

2,4-二硝基苯肼柱前衍生-高效液相色谱法测定 水中的微量乙醛

李 颖, 赵浩军*, 刘 飞, 赵 芳, 杨卫花, 杨朝义, 杨 婷

(大理州质量技术监督综合检测中心, 大理 671000)

摘 要: **目的** 探讨2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)柱前衍生高效液相色谱法测定水中微量乙醛的方法。**方法** 将样品在60 °C水浴中用DNPH衍生化20 min, 由正己烷萃取, 以乙腈: 水(52: 48, V: V)为流动相, 于365 nm波长下进行测定。**结果** 乙醛在0.015~1.00 mg/L浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 为0.9999, 加标回收率为80.2%~99.8%, 相对标准偏差为4.6%~7.4%, 方法最低检出浓度为0.003 mg/L。**结论** 该方法样品前处理简单快捷、检出限低、灵敏度高, 能够满足生活饮用水卫生规范的要求, 并且能够同时测定大批量样品, 为解决国家标准中检测方法最低检出限与其乙醛的限值相矛盾的问题提供参考。

关键词: 2,4-二硝基苯肼; 水; 乙醛; 衍生化; 高效液相色谱法

Determination of trace acetaldehyde in water by 2,4-dinitrophenylhydrazine pre-column derivation-high performance liquid chromatography

LI Ying, ZHAO Hao-Jun*, LIU Fei, ZHAO Fang, YANG Wei-Hua, YANG Chao-Yi, YANG Ting

(Dali Quality and Technical Supervision Comprehensive Inspection Center, Dali 671000, China)

ABSTRACT: Objectives To investigate the determination of acetaldehyde in water by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) pre-column derivation-high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were derivated with DNPH for 20 min in a 60 °C water bath, extracted with n-hexane, and determined at a wavelength of 365 nm using acetonitrile: water (52:48, V:V) as mobile phase. **Results** The acetaldehyde had good linear relationships in the range of 0.015–1.00 mg/L, and the correlation coefficients were 0.9999. The limit of detection was 0.003 mg/L. The recoveries were 80.2%–99.8%, with the relative standard deviations of 4.6%–7.4%. **Conclusion** The method has the advantages of simple and rapid sample preparation, low detection limit and high sensitivity, which can meet the requirements of sanitary specifications for drinking water, and can simultaneously detect large batch samples, so as to provide a reference for solving the problem of the contradiction between the minimum detection limit of national standard and the limit of acetaldehyde.

KEY WORDS: 2,4-dinitrophenylhydrazine; water; acetaldehyde; pre-column derivatization; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 赵浩军, 高级工程师, 主要从事食品质量与安全检测。E-mail: 962721345@qq.com

*Corresponding author: ZHAO Hao-Jun, Senior Engineer, Dali State Comprehensive Technical Inspection Center, Economic Development Zone 1 Box, Dali 67100, China. E-mail: 962721345@qq.com

1 引言

乙醛为无色易挥发液体、属低毒物质,主要是由呼吸道吸入蒸汽对人体的神经、肝脏等器官造成危害^[1],会对人体的皮肤、眼睛和上呼吸道黏膜产生刺激作用^[2,3],使痰增多,眼部充血红肿,还会引起过敏反应和头痛症状,具有致癌风险^[4],同时还妨碍水中有机物的自净作用,影响正常的生态平衡^[5]。另外,还有研究表明乙醛具有遗传毒性,乙醛上活泼的醛基使得它们不需经过代谢就可以进攻亲核基团,与 DNA 结合形成加合物,从而引起 DNA 链间交联和 DNA 断裂等^[6]。乙醛还能影响胚胎的发育^[7,8],甚至对大鼠的鼻粘膜具有细胞毒性和致癌性^[9,10]。随着生活水平的提高和食品安全意识的增强,人们对乙醛关注度越来越高。水是人们日常生活中必不可少的物质之一,而水中的乙醛主要来源于合成橡胶纤维、制药等工业废水的排放^[11]。另外,饮用水中的消毒副产物卤代乙醛也同样具有细胞毒性和致癌性^[12]。因此,生活饮用水中的乙醛含量也应受到高度重视。

在现行的国家标准检验方法中,测定水中的乙醛主要采用气相色谱法,且其最低检测质量浓度是 0.24 mg/L^[13,14]和 0.3 mg/L^[15],而由国家环境保护总局和国家质量监督检验检疫总局发布的地表水环境质量标准中规定生活饮用水地表水源地中的乙醛标准限值为 0.05 mg/L^[13],检验规范中乙醛检验方法的检出限不能满足标准中的要求,这就出现了检测方法最低检出限与其乙醛的限值相矛盾的情况。据文献报道,2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)柱前衍生化高效液相法对测定水^[16]、保健酒^[17]和蔬菜^[18]等中的微量醛类物质具有很高的灵敏度,但应用于水中乙醛检测的研究相对较少。

因此,本次实验采用 2,4-二硝基苯肼柱前衍生化-高效液相色谱法测定水中的乙醛-DNPH,对样品前处理条件、提取液的选择、反应温度和反应时间的优化进行了考察,为解决检测方法最低检出限与其限值相矛盾的问题提供了方案,同时为检测生活饮用水中乙醛含量的方法提供了参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); DZKW-D-1 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); M37610-33CN 漩涡振荡仪(美国赛默飞公司); AB204-E 万分之一电子天平(梅特勒-托列多公司); MTN-2800W 氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

2,4-二硝基苯肼(分析纯,中国医药公司北京采购供应站);乙醛溶液(40%,分析纯,天津市致远化学试剂有限公

司);乙腈(色谱纯,德国默克公司);二氯甲烷(分析纯,天津化学试剂有限公司);冰醋酸(分析纯,广东光华科技股份有限公司);醋酸钠(分析纯,重庆北碚精细化工厂);正己烷(分析纯,利安隆博华(天津)医药化学有限公司);环己烷(分析纯,上海试四赫维化工有限公司);石油醚(分析纯,广东光华科技股份有限公司)。

6 个水样,分别为 2 个水库水、2 个生活饮用水、1 个河水和 1 个湖水,样品由客户送检。

2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB C₁₈ 不锈钢柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈:水=52:48(V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:365 nm;柱温:40 °C;进样量:10 μL,等度洗脱。

2.3 标准曲线的制备

配制一定浓度的乙醛溶液并按 GB/T 394.2-2008^[19]进行标定得准确浓度,待用时将其稀释成 5 μg/mL 作为乙醛标准使用液使用。

准确吸取 0.00、0.20、1.00、2.00、4.00、10.00、20.00 mL 乙醛标准使用液于 100 mL 带塞比色管中,加 5 mL 醋酸钠缓冲溶液、5 mL 2,4-二硝基苯肼饱和水溶液,加水定容,摇匀,于 60 °C 水浴中衍生化 20 min。冷却至室温后加入 5.00 mL 正己烷萃取衍生物,静止分层后用移液枪吸取 1000 μL 正己烷层,在 50 °C 的氮吹仪中吹干,在加入 1000 μL 的流动相,用 0.22 μm 滤头过滤于自动进样瓶,旋涡搅拌器上旋涡后,即获得浓度为 0.00、0.01、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/L 的标准系列溶液,待测。

2.4 样品前处理

量取 90 mL 样品于 100 mL 带塞比色管中,加 5 mL 醋酸钠缓冲溶液、5 mL 2,4-二硝基苯肼饱和水溶液,摇匀,衍生方法同工作曲线操作,装样,待测。

3 结果与分析

3.1 样品前处理方法的选择

醛和 2,4-二硝基苯肼的反应属于羰基的亲核性加成反应,该类反应在酸催化下可以加强羰基上的碳的正极性,有利于引起亲核性进攻。因此在酸性条件下有利于醛和衍生试剂的反应^[5]。本实验采用醋酸盐缓冲溶液来进行催化反应。

3.2 提取液的选择

衍生后生成的苯腙类化合物,根据其化学特性可以选择正己烷、环己烷、石油醚等非极性有机溶剂进行提取^[20]。经过对这 3 种提取液的萃取效率进行比较(如图 1),发现采用正己烷作提取液的效果最佳,而且该试剂毒性低、原料容易购买,为实验的顺利进行提供了便利。

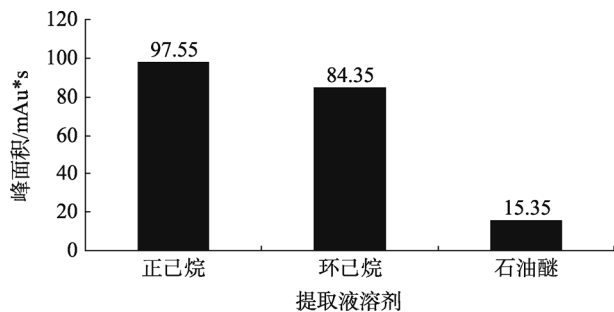


图 1 正己烷、环己烷和石油醚的萃取效率图
Fig.1 Extraction efficiency diagram of n-hexane, cyclohexane and petroleum ether

3.3 反应温度和反应时间的选择

乙醛与 2,4-二硝基苯肼在衍生过程中, 水浴的温度和水浴的时间对衍生效果有着直接影响。不同的反应温度和反应时间对乙醛和衍生剂的反应影响见表 1。实验中选择 30、40、60 °C 的水浴条件, 并分别在 10、20、30 min 的时间点测定样品。结果发现在 60 °C 下水浴 20 min, 得到的峰面积最大, 衍生效率最高。因此, 本次实验采用在 60 °C 水浴中水浴 20 min 作为衍生化条件。

表 1 衍生化温度和时间对结果的影响 Table 1 Effects of temperature and time of derivatization on the results			
反应温度/°C	峰面积/mAu*s		
	10 min	20 min	30 min
30	32.15	31.81	35.95
40	35.76	28.63	34.08
60	34.69	40.54	37.24

3.4 标准曲线

按上述色谱条件进样, 以各标准物质的峰面积对应标准浓度绘制工作曲线。得到标准曲线回归方程 $Y=912.64X+5.68$, 相关系数 $r=0.9999$ 。乙醛标准浓度在 0.015~1.00 mg/L 之间峰面积和浓度有良好的线性关系。

3.5 检出限

根据低浓度的测定方法, 配制一序列不同的乙醛标准液: 取 1 mL 5 μg/mL 的乙醛标准使用液稀释至 100 mL; 从中分别吸取 1.00、2.00、5.00、10.00、20.00 mL 按 2.3 的步骤进行操作, 分别得到浓度为 0.0005、0.0010、0.0025、0.0050、0.0100 mg/L 的标样。通过信噪比=3(S/N=3)和 = 10(S/N=10)确定出定性检出限为 0.003 mg/L, 定量检出限为 0.01 mg/L。

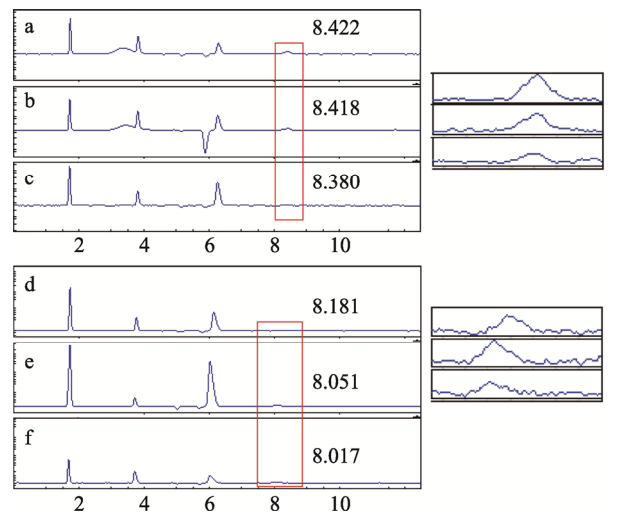
3.6 精密度和加标回收率

采用空白加标回收实验: 于配制好的空白样中加入定量的标准物质使得理论结果浓度为 0.01、0.05、0.20 mg/L, 然后对其进行衍生化和萃取, 待进样测定完成后, 根据峰面积得出相应的实际浓度, 计算加标回收率; 同一浓度平行 5 次实验, 计算相对标准偏差, 最终测定结果见表 2。

表 2 加标回收率和精密度实验结果 Table 2 Experimental results of recovery and precision					
本底值 /mL	加标量 /mL	理论值 /(mg/L)	测定平均值 /(mg/L)	回收率/%	相对标准偏差 /%
0.00	0.20	0.01	0.0088	85.0~95.0	4.6
0.00	1.00	0.05	0.0449	83.6~99.8	7.4
0.00	4.00	0.20	0.1747	80.2~91.9	5.3

3.7 样品测定

本实验对水库水、生活饮用水、湖水和河水等 6 个水样品进行检测。最终测定谱图如图 2 所示, 结果这 6 个水样中所检测出的乙醛峰面积在 0.54~1.5 mAu*s 之间, 代入标准曲线求得的乙醛含量均小于 0.003 mg/L, 可视为未检出。



注: 左图为水库水(a, b)、生活饮用水(c)、湖水(d)和河水(e, f)中乙醛含量的测定图谱, 右图为左图中红色区域(即乙醛含量)的放大图。

图 2 实际样品色谱图
Fig.2 Chromatograms of actual samples

4 结 论

实验前处理方法考察了衍生化试剂和衍生化温度、时间和提取液的选择, 在酸性条件下, 经 2,4-二硝基苯肼饱

和水溶液衍生化,在水浴温度 60 °C、水浴时间 20 min 时能达到较高的衍生化效率。

根据实验得出用 2,4-二硝基苯肼柱前衍生法测定水中乙醛的检出限为 0.003 mg/L,精密度(4.6%~7.4%)和回收率(80.2%~99.8%)都能满足环境样品的检测要求,同时这也为解决国家标准中检测方法最低检出限与其乙醛的标准限值(0.05 mg/L)相矛盾的局面提供了可行的依据,而且实验中乙醛-DNPH 在密封、避光条件下可以保存 24 h 以上,便于操作^[21,22],能对大批量样品进行分析。

参考文献

- [1] 张霞, 齐力汇, 刘文杰, 等. 气相色谱法同时测定水中乙醛、丙烯醛[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(11): 1381-1381.
- [2] 刘世杰. 劳动卫生与职业病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- [3] 顾学真. 毒理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [4] 周志刚, 戴乾圆, 钟儒刚. 丙烯醛与 DNA 碱基反应机理的 AM1 研究[J]. 中国环境科学, 1999, 19(3): 197-200.
- [5] 陆梅, 王巍. 2,4-二硝基苯肼衍生高效液相色谱法测定水中乙醛、丙烯醛[J]. 环境监控与预警, 2010, 2(4): 18-19.
- [6] 杨丹凤, 裘著革, 张华山, 等. 3 种醛类化合物对 DNA 的交联生成作用[J]. 中国公共卫生学报, 1999, 18(2): 110-111.
- [7] 屈卫东, 王健, 吴德生, 等. 乙醛对大鼠胚胎芽细胞增殖分化的影响研究[J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12(1): 16-18.
- [8] 屈卫东, 张天宝, 吴德生, 等. 乙醇及乙醛对胚胎发育的联合作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(5): 373-378.
- [9] 方家龙, 刘玉瑛. 乙醛及其毒性[J]. 国外医学卫生学分册, 1996, 23(2): 101-105.
- [10] Fang JL, Liu YY. Acetaldehyde and its toxicity [J]. Foreign Med Sci, 1996, 23(2): 101-105.
- [11] Woutersen RA, Appelman LM, Garderen-Hoetmer AV, et al. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. carcinogenicity study [J]. Toxicol, 1986, 41(2): 213-231.
- [12] 石青. 化学品毒性环境数据手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992.
- [13] Shi Q. Chemical toxicity environmental data manual [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1992.
- [14] 刘军, 严成, 钟建东, 等. 饮用水中消毒副产物卤代乙醛毒性研究进展[J]. 食品界, 2017, (4): 24-25.
- [15] Liu J, Yan C, Zhong JD, et al. Advances in research on toxicity of disinfection by-product halogenated acetaldehyde in drinking water [J]. Food Ind, 2017, (4): 24-25.
- [16] GB 3838-2002 地表水环境质量标准[S].
- [17] GB 3838-2002 Environmental quality standards for surface water [S].
- [18] GB/T 11934-1989 水源水中乙醛、丙烯醛卫生检验标准方法 气相色谱法[S].
- [19] GB/T 11934-1989 Standard method for hygienic examination of acetaldehyde and acrolin in drinking water sources-Gas chromatography [S].
- [20] GB/T 5750.10-2006 生活饮用水标准检验方法 消毒副产物指标[S].
- [21] GB/T 5750.10-2006 Standard examination methods for drinking water-Disinfection by-products parameters [S].
- [22] 刘昶. DNPH 柱前衍生高效液相色谱法测定水产品及其水产品中甲醛的方法[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(4): 533-535.
- [23] Liu C. Determination of formaldehyde in aquatic produces and soaked foods by pre-column derivation high performance liquid chromatography [J]. J Trop Med, 2014, 14(4): 533-535.
- [24] 陈蓓, 李放, 朱峰, 等. 高效液相色谱法同时测定保健酒中的微量甲醛和乙醛[J]. 江苏预防医学, 2017, 28(1): 22-24.
- [25] Chen B, Li F, Zhu F, et al. Simultaneous determination of trace formaldehyde and acetaldehyde in nutritional health care wine by high performance liquid chromatography [J]. Jiangsu J Prev Med, 2017, 28(1): 22-24.
- [26] 邓立刚, 李增梅, 谷晓红, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定蔬菜中甲醛含量[J]. 分析科学学报, 2016, 32(5): 685-688.
- [27] Deng LG, Li ZM, Gu XH, et al. Determination of formaldehyde in vegetables by high performance liquid chromatography after derivation [J]. J Anal Sci, 2016, 32(5): 685-688.
- [28] GB/T 394.2-2008 酒精通用分析方法[S].
- [29] GB/T 394.2-2008 General methods of annlysis for ethanol [S].
- [30] 姜荻, 候晓红, 康利荣. 2,4-二硝基苯肼吸收液法测定空气中醛、酮类化合物[J]. 环境保护科学, 2010, 36(5): 56-58.
- [31] Jiang D, Hou XH, Kang LR. Determination of aldehydes and ketones in atmosphere by 2, 4-dinitrophenylhydrazine absorption liquid [J]. Environ

Prot Sci, 2010, 36(5): 56–58.

- [21] 李东方, 贾薇, 张秀丽, 等. 高效液相色谱法测定水中甲醛、乙醛丙烯醛[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(12): 1511–1513.

Li DF, Jia W, Zhang XL, *et al.* Determination of formaldehyde and acetaldehyde acrolein in water by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Public Health, 2003, 19(12): 1511–1513.

- [22] 孙敏, 刘二东, 宋春霞, 等. 二硝基苯肼柱前衍生 HPLC 法测定啤酒中甲醛[J]. 化学工程师, 2006, (9): 26–28.

Sun M, Liu ED, Song CX, *et al.* Determination of trace formaldehyde in beer by HPLC with precolumn dinitrophenylhydrazine derivatization [J]. Chem Eng, 2006, (9): 26–28.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

李 颖, 主要研究方向为食品质量与安全检测。

E-mail: 936890706@qq.com



赵浩军, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。

E-mail: 962721345@qq.com