

# 高效液相色谱法测定水样中痕量双酚A

马淑青, 王丹, 管益涛  
潍坊市疾病预防控制中心 (261061)

**摘要:** 目的 建立一种超声波辅助分散液-液微萃取 (DLLME) 与高效液相色谱 (HPLC) 联用对水样中痕量双酚A (BPA) 富集分离测定的方法。方法

试验中采用富集因子来评价萃取效率, 考察并优化了影响萃取效率的主要因素, 包括萃取剂类型和用量、分散剂类型和用量、超声时间和萃取时间等。结果

在优化试验条件下, 双酚A色谱峰面积与其浓度在0.002~0.2mg/L范围内呈良好的线性关系, 相关系数大于0.9994, 双酚A的检出限为0.01 μg/L。建立的方法用于实际水样中双酚A的测定, 平均加标回收率为88.7% ~ 101.0%, 相对标准偏差为4.4% ~ 7.5%。结论该方法适用于实际水样中痕量双酚A的富集分析。

**关键词:** 分散液-液微萃取; 超声辅助; 高效液相色谱法; 双酚A; 水样

## Determination of Trace Bisphenol A in Water Samples by High Performance Liquid Chromatography

MA Shu-qing, WANG Dan, Guan Yi-tao

(Weifang Center For Disease Control And Prevention, Weifang, Shandong 261061)

**Abstract: Objective** To establish a method for enrichment and determination of trace bisphenol A (BPA) in water samples by ultrasound assisted dispersive liquid - liquid microextraction (DLLME) combined with high performance liquid chromatography (HPLC).

**Methods** Experimental conditions of chromatographic separation and DLLME such as type and volume of extractants and disperser solvents, ultrasonic microextraction time and extraction time were investigated. Enrichment factor (EF) was employed to evaluate the extraction efficiency.

**Results** Under the optimized conditions, the chromatographic peak areas were proportional to the concentrations of BPA in the range of 0.0002 - 0.2mg/L, with correlation coefficient more than 0.9994, the limit of detection was 0.01μg/L. The method was applied in the enrichment and determination of BPA in the real water samples with the average recoveries of 88.7% - 101.0%, and the relative standard deviations of 4.4% - 7.5%. **Conclusions** The developed procedure is suitable for the enrichment and determination of trace BPA in different real water samples.

**Key words:** Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME); Ultrasound-assisted; High performance liquid chromatography (HPLC); Bisphenol A; Water sample

双酚A (Bisphenol

A, BPA) 是生产聚碳酸酯塑料 (PC) 和环氧树脂 (EP) 的主要原料, 已被广泛用于食品和饮料的包装、金属材料的涂层、供水管和饮用水桶等行业中。同时, BPA又是一种典型的环境类内分泌干扰物质, 具有雌激素效应和生态毒性, ng/L~ μg/L水平就会对人类和野生动物的健康带来威胁<sup>[1]</sup>

<sup>2]</sup>。据统计, 每年有100余吨BPA以多种形式排放到环境中<sup>[3]</sup>, 人们在地表水、地下水、废水、饮用水、大气和尘埃, 甚至人体和动物体中均有检出BPA<sup>[4-6]</sup>, 它已经成为一种全球性的污染物<sup>[7,8]</sup>。

BPA在水环境中的浓度通常在ng/L级甚至更低, 不适于直接进行仪器分析, 需要对样品进行浓缩和富集处理。液-

液萃取 (LLE)<sup>[9]</sup>和固相萃取 (SPE)<sup>[10]</sup>是最为常用的萃取富集方法, 但耗时长, 费用高, 对环境污染严重。新型的萃取富集技术——分散液-

液微萃取 (DLLME)<sup>[11,12]</sup>操作简单、快速、费用低、对环境友好, 但所得样品量太少, 不适合于用自动进样器的仪器。本文将LLE和DLLME相结合, 对水样中BPA进行浓缩富集处理, 并用柱前荧光衍生化提高检测灵敏度, 旨在建立一种简便的检测水样中痕量BPA的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Agilent

1260型高效液相色谱仪 (Agilent公司, 美国), 配置四元泵、自动进样器、G1321B型荧光检测器; 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 高速离心机 (美国Thermo公司)。BPA标准品 (纯度>99.0%) 购自美国Aldrich公司; 甲醇和乙腈为色谱纯, 购自Merck公司; 其他试剂均为优级纯; 实验用水均为超纯水。

### 1.2 标准溶液的配制与衍生化

#### 1.2.1 标准溶液的配制

准确称取0.0050g

BPA标准品, 用甲醇溶解并定容到100mL棕色容量瓶中, 配成50mg/L的BPA标准储备液, 4℃冰箱中保存。试验时, 先移取1.00mLBPA标准储备液于100mL容量瓶中, 用甲醇稀释, 配成0.5mg/L的BPA标准应用液; 再根据需要用甲醇稀释BPA标准应用液到所需浓度, 得到标准系列工作溶液。

#### 1.2.2 标准溶液的衍生化

参照李鱼的柱前衍生方法<sup>[12]</sup>有所改进, 具体方法为: 吸取BPA标准系列溶液各1.00mL放入干净玻璃试管中, 加0.10mL

2.0g/L的对硝基苯甲酰氯乙腈溶液, 混匀, 置于暗处衍生化30min, 取出, 过0.45 μm有机滤膜, 上机。

### 1.3 水样的采集与前处理

#### 1.3.1 水样的采集

水样用玻璃瓶采集。采样前玻璃瓶先用重铬酸钾洗液浸泡24h, 然后用自来水冲洗干净, 用蒸馏水淋洗后置烘箱内180℃烘4h。采集的水样回到实验室后立即进行处理, 不能立即处理的样品, 加入甲醇溶液 (加入量约为水量的1%), 以防止微生物生长, 暗处保存, 一周内测定。

### 1.3.2 水样的前处理

取40.0mL水样于50mL

BD锥形离心试管（PP材料）中，用10ml刻度吸管移取8.0mL事先配好的萃取剂和分散剂的混合溶剂快速注入样品中，混匀，超声5.0min，4000r/min离心10min，含有BPA的微量萃取剂沉积于离心管底部，用玻璃注射器抽取沉积相放入干净玻璃试管中，用少量甲醇冲洗玻璃注射器1~2次，冲洗液也放入玻璃试管中，加0.10mL

2.0g/L的对硝基苯甲酰氯乙腈溶液，混匀，置于暗处衍生化30min，取出，用甲醇定容到0.60mL，混匀，过0.45 μm有机滤膜，上机。

### 1.4 色谱条件

色谱柱：Agilent

C18（4.6mm×250mm，5 μm）；流动相为乙腈：水（v：v）=50：50；进样量：10 μL；流速：1.0mL/min；柱温：35 °C；荧光检测： $\lambda_{ex}$ =227nm， $\lambda_{em}$ =315nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 萃取条件的优化

试验条件摸索中的水样为超纯水和微量BPA标准应用液配成的BPA标准稀溶液，水样取样量为40.0mL，试验考察了萃取剂类型和用量、分散剂类型和用量、超声时间、萃取时间等对萃取效果的影响，并优化和选择了最佳的试验条件。试验中采用富集倍数（EF）来评价不同萃取条件下的萃取效率，见公式（1）。式（1）中， $C_{sed}$ 为萃取定容后BPA的质量浓度（mg/L）； $C_0$ 为水样中BPA的质量浓度（mg/L）。

$$EF = C_{sed}/C_0 \quad (1)$$

#### 2.1.1 萃取剂和分散剂的选择

本法类似于浊点萃取，基于三组分溶液系统：萃取剂、分散剂和水样，主要包括2个步骤：

（1）将适量比例混合的萃取剂和分散剂混合液快速注入装有水样的锥形离心管中，本步骤中，在分散剂的作用下，萃取剂以微小液滴的形式分散在水样中，形成乳浊液，从而对水样中的分析物进行微萃取。（2）高速离心形成的微乳液，密度大于1的萃取相沉积于锥型离心管的底部，移出沉积相进行随后的分析。萃取剂需满足：密度大于水且与水不互溶，对待测物有强溶解能力等要求。分散剂需满足：能与萃取剂及水有良好的混溶性，在分相时又能形成两相，并且对目标化合物的分析不产生干扰。

试验选择三氯甲烷、四氯化碳、氯苯和离子液体[C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]（六氟磷酸1-甲基-3-己基咪唑）4种萃取剂作为考察对象，分散剂选择为甲醇、乙腈和丙酮，考察所有组合。结果发现：[C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]只有在分散剂和萃取剂使用量很小时才能形成稳定的两相，此时沉积相量太少，需稀释很多倍后才能上机；分散剂为丙酮时，各萃取剂的EF值要高于分散剂为甲醇和乙腈时；分散剂（丙酮）不变时，氯苯对BPA的萃取效果最高，EF值约为三氯甲烷和四氯化碳的3~4倍，因此，试验选用氯苯作为BPA的萃取剂，丙酮作为分散剂。

#### 2.1.2 萃取剂和分散剂的用量

固定分散剂丙酮体积不变（均为8.0mL），依次加入100、200、300、400、500  $\mu$ L氯苯，由此获得不同氯苯用量之下的EF值，结果显示：氯苯用量为400  $\mu$ L和500  $\mu$ L时EF值相当，萃取效果好，移出沉积相，试验选择氯苯用量为400  $\mu$ L。

固定萃取剂氯苯用量400  $\mu$ L不变，考察6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 mL丙酮用量时的EF值，结果显示：加入7.5mL丙酮时，萃取效果最好。综合考虑，试验时，直接向40.0mL水样中加入8.0mL氯苯：丙酮（v：v）=0.4：7.5的混合溶液。

### 2.1.3 超声时间和萃取时间的选择

超声能够加速互不相溶两相之间的质量传递，使得萃取效率在最小的溶剂使用量和最短的时间内得到快速的提高。本试验考察的超声时间为1~10min，获得不同超声时间下的EF值，结果显示：超声时间从1min增加到5min，随着超声时间的增加，EF值增大，说明超声加快了萃取过程中的传质作用，从而提高了萃取效率；当超声时间达到5min后，EF值保持稳定，因此试验选择超声时间为5min。

萃取时间是指体系中注入萃取剂和分散剂的混合溶液后到开始离心之间的时间。在其他萃取条件不变的情况下，考察了1h内萃取效率的变化情况，结果表明：萃取效率随萃取时间的变化无明显改变，体系中加入分散剂和萃取剂，超声5min后，离心即可。

## 2.2 标准曲线

按1.4的色谱条件对系列浓度的标准溶液进行测定，衍生化后的检出限较未衍生降低了约2个数量级。配成质量浓度分别为0.002、0.004、0.010、0.020、0.040、0.100、0.200mg/L的BPA标准系列，衍生化后分别进样进行HPLC分析。图1为BPA标准溶液的液相色谱图，以BPA的峰面积（y）对BPA的质量浓度（ $\rho$ ，mg/L）作标准曲线，回归方程为： $y=25.892\rho-0.0299$

（mg/L），相关系数 $r=0.9994$ ，该法的线性范围为0.002~0.2mg/L，方法检出限为0.01  $\mu$ g/L。

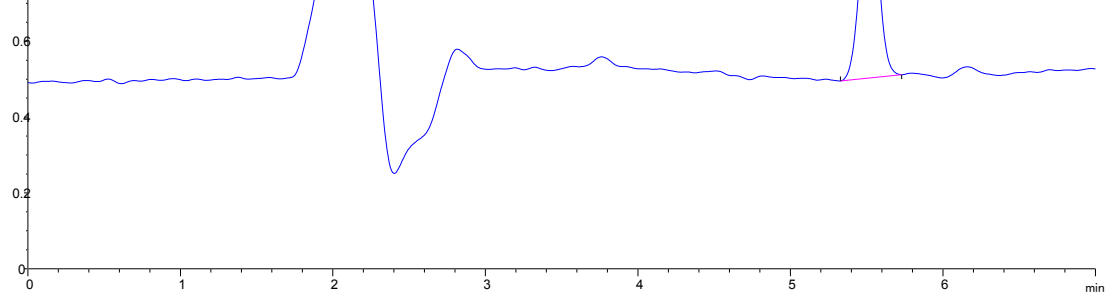


图1 BPA标准溶液的液相色谱图

## 2.3 水样的测定

应用所建立的方法，测定实验室自来水和某排水沟的污水样品，并做其加标回收实验，每个质量分数做3个平行实验，计算加标回收率和相对标准偏差，结果见表1。单位自来水中未检出BPA，排水沟水中检出BPA浓度为0.00019mg/L；各样品的加标回收率在88.7%~101.0%之间，相对标准偏差RSD（n=3）在4.4%~7.5%之间，说明本方法具有较好的重现性和较高精密度。

表1 水样中BPA的加标回收率及精密度实验

水样	本底浓度 (mg/L)	加入浓度 (mg/L)	测定浓度 (mg/L)	加标回收率 (%)	RSD (%)
自来水	未检出	0.02	0.0199 ± 0.0015	99.3	7.5
		0.10	0.1012 ± 0.0053	101.0	5.2
排水沟水	0.00019	0.02	0.0179 ± 0.0010	88.7	5.6
		0.10	0.0918 ± 0.0040	91.2	4.4

## 3 结论

本试验将LLE和DLLME相结合，并辅助超声波萃取和柱前荧光衍生化，对水样中痕量BPA进行富集分离和测定，有一定的实用参考价值。该法具有操作简便、萃取速度快、萃取效率高、试剂消耗量少、重现性好、环境友好等优点，可以用于实际水样的测定。

## 参考文献

- [1] Martin MD. Exposure to bisphenol A (BPA) from dental sealants is detectable in saliva and urine, and varies significantly between sealant formulations [J]. J Evid Based Dent Pract, 2007, 2007(2):79-80
- [2] Dash C, Marcus M, Terry PD. Bisphenol A: Do recent studies of health effects among humans inform the long-standing debate? [J]. Mutat Res, 2006, 613(2-3):68-75
- [3] Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, et al. Bisphenol A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption [J]. Endocr Rev, 2009, 30(1):75-95
- [4] 李丽莎, 杨湘霞, 汪莉. 高效液相色谱法检测桶装饮用水中双酚A[J]. 实用预防医学, 2006, 13(2): 429 -430
- [5] Ballesteros O, Zafra A, Navalón A, et al. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples [J]. J Chromatogr A, 2006, 1121(2):154-162

- [6] Zhang ZL, Hibberd A, Zhou JL. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 577(1): 52-61
- [7] 周群芳, 江桂斌. 双酚-A对Medaka的类雌激素效应研究 [J]. *环境科学学报*, 2005, 25(11):1550-1554
- [8] 刘基芳, 刘乾, 倪亚杰, 等. 双酚A对雄性小鼠生殖细胞凋亡作用 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(5): 572 -573
- [9] Jin XL, Jiang GB, Huang GL, et al. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and Bisphenol A in surface waters from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring [J]. *Chemosphere*, 2004, 56(11):1113-1119
- [10] Shao B, Han H, Hu JY, et al. Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 530(2): 245-252
- [11] Mohammad R, Yadollah Y, Shahab S, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples [J]. *J Chromatogr A*, 2009, (1216): 1511-1514
- [12] 李鱼, 刘建林, 翦英红. 分散液液微萃取-柱前衍生-高效液相色谱法测定水样中双酚A [J]. *分析化学研究报告*, 2009, (10):1484-1488