

SPE-HPLC/FLD 法同时测定水中 4 种雌激素

付银杰^{1,2}, 高彦征¹, 董长勋², 刘娟¹, 凌婉婷^{1*}

(1.南京农业大学土壤有机污染控制与修复研究所, 南京 210095; 2.南京农业大学理学院, 南京 210095)

摘要:研究建立了固相萃取(SPE)-高效液相色谱仪(HPLC)-荧光检测器(FLD)测定水体中 4 种雌激素(雌三醇、17 β -雌二醇、炔雌醇和双酚 A)的分析方法。水样过 C₁₈ 固相萃取柱净化浓缩,用 5.00 mL 超纯水淋洗,15.00 mL 甲醇洗脱,洗脱液经氮气吹干后用 50%甲醇溶解经 HPLC-FLD 测定;4 种雌激素以甲醇/乙腈/水为流动相(体积比为 25:30:45),经 Inertsil ODS-SP-C₁₈(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)反相色谱柱分离,激发和发射波长分别为 280 nm 和 310 nm,流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温 40 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L,以保留时间定性、外标法定量。该方法的线性范围为 5.00~1 000.00 μ g $\cdot$ L⁻¹,且相关性良好($R>0.999\ 9$),4 种雌激素的仪器检出限为 0.107~0.271 μ g $\cdot$ L⁻¹,方法检出限为 0.214~0.540 ng $\cdot$ L⁻¹。在自来水中添加不同浓度的雌激素混合标准溶液,测得溶液中 4 种物质的加标回收率除炔雌醇为 55.71%~66.78%外,其余雌激素的加标回收率均大于 85%,相对标准偏差 RSD($n=5$)均小于 4%。该方法灵敏度高、检出限低、重复性和精密性良好,能有效去除基质干扰,可用于水体中痕量雌激素的分析测定。

关键词:高效液相色谱仪;荧光检测器;固相萃取;雌激素;水

中图分类号:X830.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)11-2296-08

SPE-HPLC/FLD Method for the Determination of Four Estrogens in Water Samples

FU Yin-jie^{1,2}, GAO Yan-zheng¹, DONG Chang-xun², LIU Juan¹, LING Wan-ting^{1*}

(1.Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2.College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A solid phase extraction(SPE)- high performance liquid chromatography(HPLC)- fluorescence detection(FLD) method was established for the simultaneous determination of four estrogens(estril, 17 β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, and bisphenol A) in water. Water samples was concentrated using a C₁₈ solid phase extraction column, which was then consequently eluted with 5.00 mL ultrapure water and 15.00 mL methanol. Eluent was dried by nitrogen blow. The residue was then dissolved with 50% methanol solution, and determined by HPLC-FLD with the mobile phase of methanol/acetonitrile/water(volume ratio of 25:30:45) at 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, Inertsil ODS-SP-C₁₈(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) reversed phase column at 40 $^{\circ}$ C, excitation and emission of 280 nm and 310 nm, and injection volume of 20 μ L. The linear range for the detection of test four estrogens was 5.00~1 000.00 μ g $\cdot$ L⁻¹ with correlations(r) higher than 0.999 9. Four estrogens detection limits of HPLC-FLD were 0.107~0.271 μ g $\cdot$ L⁻¹, the detection limits of SPE-HPLC/FLD were 0.214~540 ng $\cdot$ L⁻¹. The recoveries of the four estrogens with SPE-HPLC/FLD were more than 85%, except 17 α -ethynylestradiol of 60%, with relative standard deviations(RSD)($n=5$) less than 4%. The method has high sensitivity, low detection limit, good reproducibility and precision, and may be used for the determination of trace amounts of estrogen in water environment.

Keywords: high performance liquid chromatography; fluorescence detector; solid phase extraction; estrogen; water

收稿日期:2012-06-15

基金项目:江苏省科技支撑计划(BE2011780);国家自然科学基金(21077056, 41171193);中央高校基本科研业务费(KYZ201109)

作者简介:付银杰(1988—),男,陕西定边人,硕士研究生,主要研究方向为环境有机污染控制。E-mail:2011811017@njau.edu.cn

* 通信作者:凌婉婷 E-mail:lingwanting@njau.edu.cn

雌激素是一类亲酯、低分子量、高生物活性的有机化合物,是已报道的具有内分泌干扰作用的环境内分泌干扰物(EDCs, 又称环境类激素)中的一类重要物质,主要分为两类:内源雌激素(如雌二醇、雌三醇和雌酮等)和外源雌激素(如炔雌醇、双酚 A 和壬基酚等)^[1]。排入环境中的雌激素经多种途径进入动物或人体内,通过模拟、干扰人类和动物体内正常分泌物质的合成、运输和释放,使其无法维持自身的平衡和调节,进而引起人类和动物界的雌性化现象^[2]。水体中的雌激素主要来源于居民的生活污水、工厂排出的废水以及生产养殖废水^[3]。近年来的研究表明,水体中 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 级的雌激素可导致水生生物雌性化、生殖能力下降、发育缺陷和卵黄蛋白原异常等现象^[4-5]。因此,快速、准确地建立水体中痕量雌激素检测方法对水体中雌激素的测量、监控以及对环境健康评估和生态评价都具有重要的现实意义。

水体中的雌激素含量较低(一般都是 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 级),而且环境基质复杂,因此需要建立一种前处理方法富集净化水中的痕量雌激素以达到分析测定的要求。常用的前处理方法主要有:液液萃取(LLE)^[6]、液液微萃取(LPME)^[7]、固相微萃取(SPME)^[8]、浊点萃取法(CPE)^[9]和固相萃取(SPE)^[10-13]等。其中液液萃取需要大量的有机溶剂并易引入新的干扰且富集效率低;液液微萃取由于样品用量少,富集倍数一般在 50~500 之间^[14],不能满足水体中痕量雌激素的分析测定的需要;固相微萃取装置价格昂贵且纤维头易损坏,同时容易吸附基质杂质,分析时受干扰较大;固相萃取方法是对水体样品中富集净化有机目标物使用最广泛的前处理方法之一,该方法有机溶剂用量少,在保证较高回收率的同时实现样品的净化,有效降低了基质干扰。目前国内外水体中雌激素的测定方法主要有液相色谱法^[13,15-16]、液相色谱-质谱联用^[17-18]、气相色谱-质谱联用^[19-23]和酶联免疫分析法^[24-25]等检测方法。气相色谱检测雌激素时存在复杂的衍生化前处理步骤^[19],液相色谱则无需此类操作。此外,高效液相色谱与其他液质、气质联用等方法相比成本低、操作简单,

同时荧光检测器的灵敏度高,检出限低,可满足分析测定的要求。

本文选择固相萃取前处理方法,利用高效液相色谱分离和荧光检测的分析技术,建立了水体中雌三醇、 17β -雌二醇、炔雌醇和双酚 A 的分析测定方法。该方法操作过程简便、检出限低且精密度和重复性良好,为水体中痕量雌激素的监控和检测提供分析依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),配有 RF-10A_{XL} 荧光检测器, SIL-20A 自动进样系统, Inertsil ODS-SP-C₁₈ 反相色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 12 头固相萃取真空富集装置(上海济成分析科技有限公司)和自制的固相萃取柱;氮吹仪(上海济成分析科技有限公司);KQ5200DE 型数字超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);RU-N 超纯水发生器(上海同田生物技术有限公司)。

雌三醇标准品(E₃, 98%)、双酚 A 标准品(BPA, 99%)、 17β -雌二醇(17β -E₂, 98%)均购自上海晶纯试剂有限公司,炔雌醇(EE₂, 99%)购自 Sigma, 4 种雌激素的理化性质见表 1。甲醇(色谱纯,江苏汉邦有限公司);乙腈(色谱纯, USA);其他试剂均为分析纯;硅胶(Silica)、中性氧化铝(Alumina-N)、弗罗里硅土(Florisil)、C₁₈(封端)、C₁₈-N(未封端)5 种填料均购自博纳艾杰尔科技有限公司。试验用水为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱 Inertsil ODS-SP-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇/乙腈/水(体积比为 25:30:45),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。荧光检测器波长:激发波长为 280 nm,发射波长为 310 nm。

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取 4 种雌激素(E₃、 17β -E₂、EE₂ 和 BPA)标准品 10.00 mg 置于 10 mL 棕色容量瓶中,用

表 1 4 种雌激素的理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of four estrogens

名称	分子式	分子量/ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	熔点/ $^{\circ}\text{C}$	pK_{a}	$\lg K_{\text{ow}}$	溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
雌三醇	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$	288.4	280~282	10.4	2.60	13 ^[26,28]
17β -雌二醇	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	272.0	176~180	10.7	3.94	13 ^[27]
炔雌醇	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	296.4	182~184	10.5	4.15	4.8 ^[28]
双酚 A	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$	228.3	155~156	11.3	3.64	120 ^[28]

甲醇溶解并定容,得到浓度均为 $1\,000.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一标准储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。各取 4 种物质单一标准储备液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 分别用 50% 甲醇水溶液定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 得到 E_3 、 $17\beta\text{-E}_2$ 、 EE_2 和 BPA 浓度均为 $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合标准储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存待用。用超纯水稀释混合标准储备液,制备成不同浓度的模拟水样。

1.4 固相萃取柱的制作

订制 6 mL 固相萃取玻璃柱管,在柱管底部填入一定量玻璃棉,称取一定量的填料加入柱管中,轻轻敲打柱身使其均匀,将填料填平、压实,上层再覆盖一层玻璃棉,再以洁净的玻璃棒按压使其装填紧密,保存待用。

1.5 样品的前处理

模拟水样以约为 $5\sim 8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过已分别用 5.00 mL 甲醇和 5.00 mL 超纯水活化的固相萃取柱萃取,用 5.00 mL 超纯水淋洗柱体并继续抽吸 3.0 min ,淋洗后的萃取柱用 15.00 mL 甲醇洗脱,洗脱液收集至小试管中。小试管置于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴并用氮气缓慢吹干,然后加入 50% 甲醇水溶液将附着物重新溶解至 2.00 mL ,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜后,HPLC/FLD 分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 检测波长的确定

由于 4 种雌激素都可以产生自然荧光,分别对各标准品的激发波长和发射波长进行波谱扫描,结果表明:雌三醇、 17β -雌二醇和炔雌醇的最佳激发波长和发射波长均分别为 280 nm 和 310 nm ,双酚 A 的最佳激发波长和发射波长为 227 nm 和 315 nm 。雌三醇、 17β -雌二醇和炔雌醇在已确定的最佳激发和发射波长条件下峰形良好、基线稳定。同时考察了双酚 A 在激发波长为 280 nm 和发射波长 310 nm 条件下的色谱峰情况,结果表明:双酚 A 峰形良好,但峰高和峰面积没有最佳波长条件下的理想。4 种物质组成的混合标准溶液在所确定的色谱条件下能完全分离,色谱峰尖锐,基线稳定。因此,试验选择 4 种物质的激发波长和发射波长均分别为 280 nm 和 310 nm 。

2.1.2 流动相、柱温和流速的选择

流动相的组成对各组分分离和保留时间有很大的影响,本试验分别考察了甲醇/水、乙腈/水和甲醇/乙腈/水 3 种流动相对 4 种雌激素的分离效果。首先,

考察了甲醇与水体积比分别为 $90:10$ 、 $80:20$ 、 $70:30$ 、 $60:40$ 条件下 4 种物质的分离情况,结果表明:4 种雌激素不能完全分离,尤其是 17β -雌二醇和炔雌醇,即使逐渐增大水相的比例,也不能将雌二醇和炔雌醇完全分离,而且随着水相比比例的增加,仪器柱压明显增大,峰形也不理想;其次,将不同体积比的乙腈/水作为流动相,也未能将 4 种物质完全分离;最后,选择甲醇/乙腈/水作为流动相,各组分间分离度大,峰形尖锐且峰形对称,经过多次优化最后选择体积比 $V_{\text{甲醇}}/V_{\text{乙腈}}/V_{\text{水}}=25/30/45$ 作为流动相,可以在 20 min 之内完全分离 4 种物质。

试验比较柱温为 30 、 35 、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时 4 种物质分离和色谱峰的峰形,结果表明:柱温对 4 种雌激素的保留时间、分离效果和柱压都有很大的影响;当柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,4 种物质的保留时间会延长,分离度小,柱压偏高;当柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,保留时间提前且 4 种物质分离度增大、峰形尖锐、柱压降低。同时柱温过高会对目标物质稳定性产生影响。因此,最终选择柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

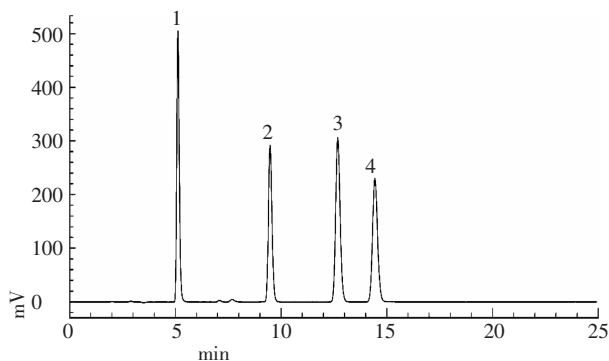
最后考察了流动相流速分别为 0.6 、 0.8 、 1.0 、 $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时 4 种物质的分离情况、峰形和保留时间,以及基线的稳定性。当流速为 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,保留时间延长,色谱峰变宽,同时流速为 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时色谱峰出现拖尾现象;当流速为 $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时雌三醇的出峰时间过早, 17β -雌二醇和炔雌醇不能完全分离,柱压也明显增大。根据最终的优化结果选择流动相流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

综上所述,在上述确定的色谱条件下 4 种雌激素的色谱图如图 1 所示。

2.2 前处理方法条件的确定

2.2.1 固相萃取填料的选择

吸附填料是固相萃取柱富集净化的核心^[29],因此选择一种好的吸附填料对目标物的富集效率具有很大的影响。本试验比较了正相型固相萃取填料(Silica, Florisil, Alumina-N)和反相型固相萃取填料(C_{18} 和 $\text{C}_{18}\text{-N}$)对 4 种雌激素富集的影响(图 2)。结果表明,正相型吸附填料对 4 种雌激素的吸附很弱,对雌三醇的回收率均小于 60% ,而 Silica 和 Alumina-N 对双酚 A、 17β -雌二醇、炔雌醇的回收率甚至低于 10% 。反相型萃取填料(C_{18} 和 $\text{C}_{18}\text{-N}$)对炔雌醇的回收率在 60% 左右,而对雌三醇、双酚 A、雌二醇的回收率则高达 $80.44\%\sim 97.36\%$ 。两组填料对雌激素具有不同的回收率,这是因为雌激素是弱极性物质,而 Silica 是



注:1. 雌三醇(E_3 , 5.141 min); 2. 双酚 A(BPA, 9.444 min); 3. 17 β -雌二醇(17 β - E_2 , 12.633 min); 4. 17 α -炔基雌二醇(EE_2 , 14.397 min)

Note: 1. Estriol (E_3 , 5.141 min); 2. Bisphenol A (BPA 9.444 min); 3. 17 β -estradiol (17 β - E_2 , 12.633 min); 4. 17 α -ethynyl estradiol (EE_2 , 14.397 min).

图1 混合标准样品的色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of standard samples

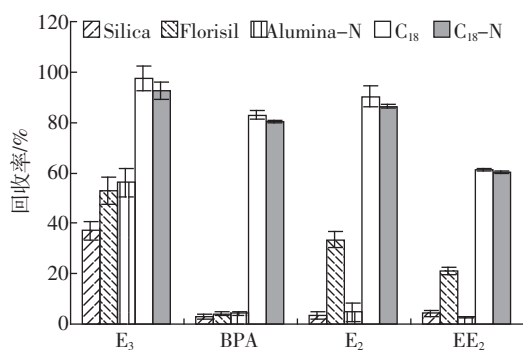


图2 固相萃取填料对回收率的影响

Figure 2 Effect of solid-phase extraction packing on recovery

以未键合硅胶为吸附剂的极性萃取填料,呈弱酸性,有很强的极性;Florisil是一种镁化硅胶,极性较强,可有效地从非极性溶剂中吸附极性物质,用于农药残留的净化、分离^[30];Alumina-N 萃取填料 pH=7.5,强极性吸附剂;因此,正相型固相萃取填料对雌激素的富集效率很低。 C_{18} 是硅胶上接有十八烷基,适合于非极性到中等极性的化合物, C_{18} -N 性质与 C_{18} 相似,适合于非极性到中等极性的化合物, C_{18} -N 对于非极性化合物的吸附较 C_{18} 的稍弱,因此本试验选用 C_{18} 作为吸附填料。

2.2.2 固相萃取柱填料量的选择

固相萃取柱填料的量是影响吸附容量的关键因素,本试验选取 C_{18} 作为固相萃取柱的填料,对比研究了 200、400、600 $mg \cdot 6mL^{-1}$ 3 种不同质量的 C_{18} 吸附填料对 4 种雌激素的富集影响(图 3)。结果表明,这 3 种 C_{18} 吸附填料对雌三醇固相萃取回收率范围为

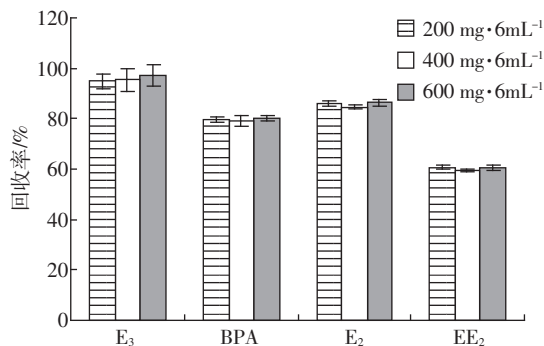


图3 吸附填料的量对回收率的影响

Figure 3 Effect of amount of adsorption packing on recovery

94.84%~97.13%、双酚 A 固相萃取回收率范围为 79.87%~80.34%、17 β -雌二醇固相萃取回收率的范围为 84.55%~86.59%、炔雌醇固相萃取回收率范围为 59.52%~60.75%,不同质量的 C_{18} 吸附填料对雌三醇、17 β -雌二醇、炔雌醇和双酚 A 的固相萃取回收率均相差很小。因此,本试验选择质量为 200 $mg \cdot 6mL^{-1}$ C_{18} 作为固相萃取吸附填料。

2.2.3 洗脱液的选择

雌激素化合物在弱极性或中等极性有机溶剂中有较高的溶解性,几乎不溶于水^[31]。本试验分别考察了选用甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳、正己烷 7 种有机溶剂作为洗脱液洗脱 C_{18} 固相萃取柱富集目标物的情况,将洗脱液用氮气缓慢吹干,经 HPLC/FLD 分析,试验结果见表 2。由表 2 可知,四氯化碳和正己烷对雌三醇的富集效率大于 95%,但是对 17 β -雌二醇、双酚 A、炔雌醇的富集效果较甲醇稍弱;乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷对 4 种物质的回收率范围仅为 57.83%~92.37%;甲醇对于 4 种雌激素的洗脱效果较好,并且甲醇是本试验 HPLC/FLD 检测的流动相,以甲醇作为洗脱液不容易引起溶剂效应,为了尽可能避免试验误差,选用甲醇溶液作为固相萃取洗脱液。

2.2.4 洗脱液体积的选择

为确保萃取柱中富集的目标物可以被完全洗脱,必须加入一定体积的洗脱液,但是当洗脱液达到一定体积后,回收率将不再提高^[32]。本试验考察了 3、5、10、15、20、25 mL 的甲醇溶液对 4 种雌激素的萃取回收率(图 4)。结果表明:少量的甲醇溶液不能将 4 种物质完全洗脱(回收率偏低),当加入 15 mL 甲醇时,雌三醇的回收率大于 90%,双酚 A、17 β -雌二醇的回收率大于 75%,炔雌醇的回收率也在 53.58%;但是随着洗脱液体积的继续增加,4 种物质的回收率略有下

表 2 洗脱液对回收率的影响(%)

Table 2 Effect of eluting solvents on recovery(%)

洗脱液	雌激素			
	雌三醇	双酚 A	雌二醇	炔雌醇
甲醇	98.32±2.33	84.79±3.77	84.56±3.39	59.78±2.07
乙腈	87.31±3.15	82.52±4.21	83.51±1.76	58.79±1.13
乙酸乙酯	86.21±3.26	83.18±4.31	81.05±3.75	62.23±1.75
二氯甲烷	91.27±3.98	85.76±3.62	83.00±0.35	57.83±1.68
三氯甲烷	92.37±4.57	82.76±0.49	82.99±1.62	58.72±0.77
四氯化碳	97.00±3.16	78.17±2.65	83.38±4.75	57.85±3.43
正己烷	97.52±2.17	76.15±1.35	83.01±1.99	57.63±1.59

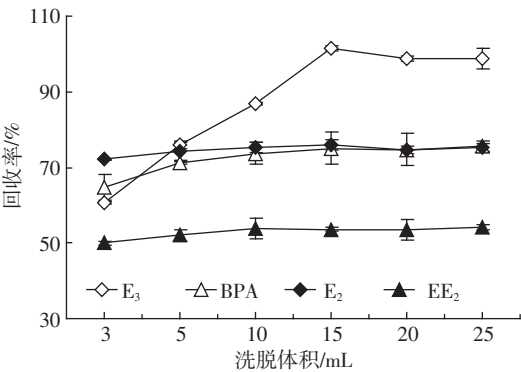


图 4 洗脱液体积对回收率的影响

Figure 4 Effect of eluting solvents volume on recovery

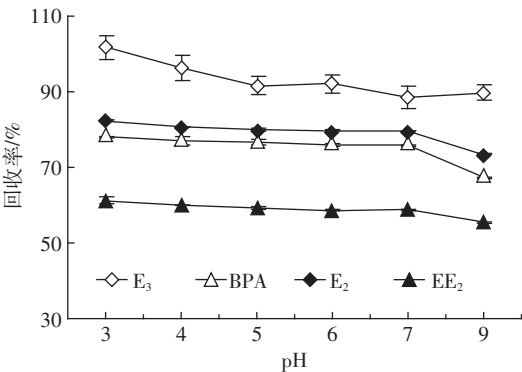


图 5 溶液 pH 对回收率的影响

Figure 5 Effect of pH on recovery

降,这可能是由于洗脱液体积增大,与试管的接触面增加,氮吹完成后加入的 2 mL 甲醇溶液在溶解试管中的雌激素未能将其全部溶解,导致回收率略有下降。同时洗脱液体积增大会造成氮吹时间加长,氮气的使用量也随之增加,还会引入一些新的杂质使得在色谱分析的时候杂质峰较多,造成试验的误差。为了避免杂质峰增多,确保样品定量的准确性,本试验选择 15 mL 甲醇溶液作为洗脱液的用量。

2.3 pH 的影响

在固相萃取条件下,取 250 mL 模拟水样用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸和 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调试其 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 9.0,考察水样中的 pH 变化对固相萃取富集效率的影响,结果见图 5。如图所示,4 种雌激素在固相萃取柱中的富集与上样时样品溶液 pH 有关。在 pH 为 3.0 时,雌三醇、双酚 A、17β-雌二醇和炔雌醇的萃取回收率较高,但随着样品溶液 pH 的逐渐增大,回收率逐渐的降低(如雌三醇在 pH 为 3.0 时回收率为 101.71%,pH 为 7.0 时回收率为 88.41%)。这是因为随着溶液 pH 的逐渐增大,雌三醇、双酚 A、17β-雌二醇和炔雌醇分子上的酚羟基发生不同程度的解离,导致固相萃取吸附率下降,

而在酸性条件下可以抑制其电离,故本试验选择水样的 pH 为 3.0。

2.4 工作曲线及检出限

采用标准物质的保留时间对色谱峰进行定性,外标法定量。将混合标准储备液依次用 50%的甲醇水溶液稀释成不同浓度的混合标准溶液进行色谱分析,以目标物浓度(μg·L⁻¹)为横坐标、峰高为纵坐标,所得标准曲线和相关参数见表 3。从表中可以知道 4 种雌激素在 5.00~1 000.00 μg·L⁻¹ 浓度范围内具有良好的线性关系,相关性良好($R>0.999\ 9$)。以仪器信噪比 S/N=3 时所对应的溶液浓度估算仪器检出限(LOD)^[33],通过计算得到 4 种物质的仪器检出限范围为 0.107~0.271 μg·L⁻¹,根据前处理方法的富集倍数(500)计算 4 种物质的方法检出限为 0.214~0.540 ng·L⁻¹,可以满足水体中痕量雌激素的测定要求。

2.5 重现性和精密度

为考察方法的重现性和精密度,做加标回收试验。以自来水为本底,分别准确加入不同浓度的 4 种雌激素混合标准溶液,制备添加浓度为 4.0、10.0、60.0 μg·L⁻¹ 的加标样品,加标样品经固相萃取柱净化富集、甲醇洗脱、氮气缓慢吹干、50%的甲醇水溶液溶

表 3 工作曲线及检出限
Table 3 Working curves and detection limits

目标物	线性方程(峰高定量)	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>R</i>	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
E ₃	$A=336\ 356.1C-516.84$	5~1000	0.999 98	0.181
BPA	$A=635\ 339.9C-442.81$	5~1000	0.999 96	0.107
17 β -E ₂	$A=366\ 072.7C+4\ 690.85$	5~1000	0.999 94	0.186
EE ₂	$A=398\ 586.4C-344.17$	5~1000	0.999 99	0.271

注:A 为峰高,C 为目标物浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。
Note:A is the peak height,C is the target concentration($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

解、过 0.22 μm 孔径滤膜后,HPLC/FLD 分析。每个混合加标样平行测定 5 次,计算 4 种雌激素的回收率与相对标准偏差(RSD),结果见表 4。由表 4 可见,雌三醇、双酚 A、17 β -雌二醇的加标回收率范围为 87.98%~102.84%,RSD 为 1.31%~2.94%,炔雌醇的回收率为 55.71%~66.78%,RSD 为 1.76%~3.08%。可见所述方法的准确性与精密度均良好。

表 4 方法的回收率及精密度(*n*=5)
Table 4 Recoveries and RSD of the method(*n*=5)

分析物	加标量/ μg	加标回收率/%	精密度 RSD/%
雌三醇 E ₃	0.4	102.84	1.40
	1.0	98.63	1.31
	6.0	97.56	2.65
双酚 A BPA	0.4	92.53	2.44
	1.0	88.34	2.94
	6.0	87.98	2.58
17 β -雌二醇	0.4	90.72	1.97
	1.0	88.34	2.28
	6.0	93.85	2.06
炔雌醇 EE ₂	0.4	55.71	3.08
	1.0	66.78	2.25
	6.0	62.57	1.76

一些文献也给出了水体中雌激素检测的分析方法,但鲜有将雌三醇、双酚 A、17 β -雌二醇和炔雌醇 4 种物质组合在一起而建立的分析方法,同时文献给出分析方法在检测方法、前处理方式、固相萃取柱的选择、洗脱液的选择以及浓缩方式等方面与本研究也有一些差别。本研究确定的分析方法重复性和精密度良好、检出限低,同时回收率也优于相关文献^[34-36]报道。

3 结论

(1)采用 SPE 样品前处理方式,建立了 HPLC/FLD 同时测定水中雌三醇、17 β -雌二醇、炔雌醇和双酚 A 的分析方法。优化了 HPLC/FLD 分析条件:流动相为

甲醇/乙腈/水(体积比为 25:30:45),激发波长和发射波长分别为 280 nm 和 310 nm,流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2)优化了 SPE 富集和净化水中 4 种雌激素的条件,优选出 C₁₈ 为富集净化水中雌激素的固相萃取填料,确定了填料添加量(200 mg $\cdot$ 6 mL⁻¹)、洗脱液(甲醇)、洗脱液体积(15.00 mL);分析了水的 pH 对 4 种雌激素富集效率的影响。

(3)所建立的 SPE-HPLC/FLD 方法的线性范围为 5.0~1 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,*R*>0.999 9,水中 4 种雌激素的 SPE-HPLC/FLD 仪器检出限为 0.107~0.271 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,方法检出限为 0.214~0.540 ng $\cdot$ L⁻¹。雌三醇、双酚 A、17 β -雌二醇的加标回收率为 87.98%~102.84%、炔雌醇的加标回收率为 55.71%~66.78%,4 种物质的相对标准偏差均小于 4%。SPE-HPLC/FLD 方法灵敏度高、检出限低、重复性和精密度好,适用于水中痕量雌激素的富集、检测。

参考文献:

[1] 肖小华,尹 怡,胡玉玲,等.液相微萃取-高效液相色谱联用分析化妆品中痕量的雌激素[J].色谱,2007,25(2):234-237.
Xiao X H, Yin Y, Hu Y L, et al. Determination of trace estrogens in cosmetic water by liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2007, 25(2):234-237.

[2] Tapiero H, Nguyen B G, Tew K D. Estrogens and environmental estrogens[J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(1):36-44.

[3] 李艳霞,韩 伟,等.环境雌激素的危害、来源与环境行为[J].生态学报,2010,30(4):1058-1065.
LI Y X, Han W, et al. Effects, sources and behaviors of environmental androgens[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(4):1058-1065.

[4] 廖 艳,余煜棉,赖子尼. SPE-GC 法测定地表水中的痕量环境激素[J].中国给水排水,2006,16(22):77-80.
Liao Y, Yu Y M, Lai Z N. Determination of three trace environmental hormones in surface water using SPE-GC method[J]. China Water & Wastewater, 2006, 16(22):77-80.

[5] Mitsui N, Tooi O, Kawahara A. Vitellogenin-inducing activities of natu-

- ral, synthetic, and environmental estrogens in primary cultured *Xenopus laevis* hepatocytes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, 146(4):581-587.
- [6] 金星龙, 江桂斌, 黄国兰, 等. 污水处理流程中几种典型酚类化合物的分布[J]. 中国环境科学, 2004, 24(6):1027-1031.
- Jin X L, Jiang G B, Huang G L, et al. Distribution of several typical phenolic compounds in sewage treatment process[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(6):1027-1031.
- [7] 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, 2009, 37(10):1484-1488.
- Li Y, Liu J L, Jian Y H. Combination of dispersive liquid-liquid microextraction and pre-column derivatization-high performance liquid chromatography for determination of bisphenol A in water sample[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(10):1484-1488.
- [8] López-D J, Pino V, Ayala J H, et al. Insituonic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction method to determine endocrine disrupting phenols in seawaters and industrial effluents[J]. *Microchimica Acta*, 2011, 174(3):213-222.
- [9] Wang L, Cai Y Q, He B, et al. Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction[J]. *Talanta*, 2006, 70(1):45-71.
- [10] Wen Y, Zhou B S. Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in-polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1133(2):21-28.
- [11] 常 红, 胡建英, 邵 兵, 等. 固相萃取-LC-MS 法检测水中痕量雌激素[J]. 环境化学, 2003, 22(4):400-403.
- Chang H, Hu J Y, Shao B, et al. Determination of trace estrogens in surface water using SPE-LC-MS[J]. *Environmental Chemistry*, 2003, 22(4):400-403.
- [12] Vicente B S, Villoslada F N. Continuous solid-phase extraction and preconcentration of bisphenol A in aqueous samples using molecularly imprinted columns[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 380(1):115-122.
- [13] Fattahi N, Samadi S, Assadi Y. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1169(1):63-69.
- [14] 李 鱼, 刘建林, 张 琛, 等. 固相萃取-分散液液微萃取-柱前衍生法测定水样中痕量雌激素[J]. 分析化学, 2012, 40(1):107-112.
- Li Y, Liu J L, Zhang C, et al. Combination of solid phase extraction-dispersive liquid liquid microextraction and Pre-column derivatization method for determination of trace level estrogens in water sample[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(1):107-112.
- [15] Cruceru I, Iancu V, Petre J, et al. HPLC-FLD determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in surface water samples[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184(5):2783-2795.
- [16] López M J, Barceló D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 911(2):203-210.
- [17] Ingrand V, Herry G, Beausse J, et al. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1(1020):99-104.
- [18] Salvador A, Moretton C, Piram A, et al. On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1145(1):102-109.
- [19] 黄 成, 姜理英, 陈建孟, 等. 固相萃取-衍生化气相色谱/质谱法测定制药厂污水中的环境雌激素[J]. 色谱, 2008, 26(5):618-621.
- Huang C, Jiang L Y, Chen J M, et al. Determination of environmental estrogens in pharmacy wastewater using solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry with derivatization[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008, 26(5):618-621.
- [20] 张 宏, 毛 炯, 孙成均, 等. 气相色谱-质谱法测定尿及河底泥中的环境雌激素[J]. 色谱, 2003, 21(5):451-455.
- Zhang H, Mao J, Sun C J, et al. Determination of environmental estrogens in urine and bed mud by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2003, 21(5):451-455.
- [21] Stuart J D, PLauner K D C, et al. Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1079(1):136-145.
- [22] Xiao Y X, McCalley D V, McEvoy J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 923(1):195-204.
- [23] Suri R P S, Singh T S. Effect of process conditions on the analysis of free and conjugated estrogen hormones by solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPE-GC/MS)[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184(3):1657-1669.
- [24] Farré M, Brix R, Kuster M, et al. Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC-MS/MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(6):1001-1011.
- [25] Kim A, Li C R, Jin C F, et al. A sensitive and reliable quantification method for bisphenol A based on modified competitive ELISA method[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(7):1204-1209.
- [26] Lai K M, Johnson K L, Scrimshaw M D, et al. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems[J]. *Environmental Science and Technology*, 2000, 34(18):3890-3894.
- [27] Liu R X, Wilding A, Hibberd A, et al. Partition of endocrine-disrupting chemicals between colloids and dissolved phase as determined by cross-flow ultrafiltration[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(8):2753-2761.
- [28] Ying G G, Kookana R S. A degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment[J]. *Environmental*

- Science and Technology*, 2003, 37(7):1256–1260.
- [29] 洪蕾洁, 石璐, 张亚雷, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定水体中的10种磺胺类抗生素[J]. 环境科学, 2012, 33(2):652–657.
Hong L J, Shi L, Zhang Y L, et al. Simultaneous determination of 10 sulfonamide antibiotics in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(2):652–657.
- [30] Columé A, Cárdenas S, Gallego M, et al. Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 849(1):235–243.
- [31] 徐英江, 田秀慧, 张秀珍, 等. 超高效液相色谱串联质谱法对水产品中8种雌激素的测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(2):152–156.
Xu Y J, Tian X H, Zhang X Z, et al. Determination of 8 estrogens in aquatic products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(2):152–156.
- [32] 王英, 张占恩. 固相萃取-GC/MS法测定水中邻苯二甲酸酯类[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(3):41–44.
Wang Y, Zhang Z E. Determination of phthalate esters in water by solid-phase extraction and GC/MS[J]. *Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2009, 21(3):41–44.
- [33] IUPAC. Analytical chemistry division, commission on spectrochemical and optical procedures for analysis, nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis; Data interpretation[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1976, 30:99–105.
- [34] 张琦, 董慧茹. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中BPA、NP和OP含量[J]. 分析科学学报, 2009, 25(2):157–160.
Zhang Q, Dong H R. Simultaneous determination of nonylphenol, octylphenol and bisphenol-A in water by solid-phase extraction high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Analytical Science*, 2009, 25(2):157–160.
- [35] Mao L S, Sun C J, Zhang H, et al. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 522(2):241–246.
- [36] Snyder S A, Keith T L, Verbrugge D A, et al. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures[J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(16):2814–2820.