(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103149308 B
(45)授权公告日 2014.11.12

(21)申请号 201310087304.1

(22)申请日 2013.03.19

(73)专利权人 深圳职业技术学院
地址 518055 广东省深圳市南山区西丽湖

(72)发明人 蒋晓华 邱彬

(74)专利代理机构 深圳市嘉宏博知识产权代理事务所 44273
代理人 李杰

(51)Int.Cl.
G01N 30/06(2006.01)
G01N 30/08(2006.01)
B01J 20/26(2006.01)
B01J 20/281(2006.01)
B01J 20/30(2006.01)
B01D 15/22(2006.01)
B01D 15/20(2006.01)

(56)对比文件

Jiang-hua Zhang et al..Selective solid-phase extraction of bisphenol A using molecularly imprinted polymers and its application to biological and environmental samples.《Anal Bioanal Chem》.2006, 第385卷 780-786.

杨本晓等.双酚A分子印迹聚合物的制备及其在环境监测中的应用初探.《河南科学》.2007, 第25卷(第6期),1047-1051.

Despina K.Alexiadou et al..Molecularly imprinted polymers for bisphenol A for HPLC and SPE from water and milk.《J. Sep. Sci.》.2008, 第31卷2272 - 2282.

刘智敏等.环境雌激素双酚A的样品前处理技术与分析检测研究进展.《云南师范大学学报》.2012, 第32卷(第6期),58-66.

F. Navarro-Villoslada et al.. Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A.《Analytica Chimica Acta》.2004, 第504卷149-162.

审查员 李香波

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种环境样品中双酚A检测的前处理方法

(57)摘要

一种环境样品中双酚A检测的前处理方法,由以下步骤组成:步骤1:准确称取样品3.00g,置于50mL离心管中,加入乙腈有机混合溶剂,将样品打散,加入2.0g的碱性氧化铝粉末,振荡1min,4500rpm/min离心10min;乙腈有机混合溶剂的配制为:20mL乙腈+10μL冰乙酸;步骤2:取10mL上清液,以10mL高纯水稀释备用,制备成20mL样品液;步骤3:规格参数为MIPs-200mg/2.5mL的双酚A分子印迹固相萃取柱的活化过程:(a)、2.0mL含10%冰醋酸的丙酮溶液淋洗;(b)、2.0mL高纯水平衡;步骤4:将步骤2中20mL样品液过柱,抽真空,5mL高纯水淋洗,弃去全部淋洗液;步骤5:再用3.0mL含10%冰醋酸的丙酮溶液洗脱,收集洗脱液,加入0.05mol/L乙酸铵溶液,定容至3.0mL;步骤6:定容液用0.22μm微孔滤膜过滤,所得滤液即可上机测试。

CN 103149308 B

1. 一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法，其特征在于，其由以下步骤组成：

步骤 1：准确称取水样、水底沉积物或土壤样品 3.00g，精确至 0.01g，置于 50mL 离心管中，加入乙腈有机混合溶剂，用高速分散均质机将样品打散，再加入 2.0g 的碱性氧化铝粉末，振荡 1min，4500rpm/min 离心 10min；所述乙腈有机混合溶剂的配制为：20mL 乙腈 +10μL 冰乙酸；

步骤 2：取 10mL 上清液，以 10mL 高纯水稀释备用，制备成 20mL 样品液；

步骤 3：规格参数为 MIPs-200mg/2.5mL 的双酚 A 分子印迹固相萃取柱的活化过程：

(a)、2.0mL 含 10％冰醋酸的丙酮溶液淋洗；

(b)、2.0mL 高纯水平衡；

步骤 4：将步骤 2 中 20mL 样品液过柱，抽真空，5mL 高纯水淋洗，弃去全部淋洗液；

步骤 5：再用 3.0mL 含 10％冰醋酸的丙酮溶液洗脱，收集洗脱液，加入 0.05mol/L 乙酸铵溶液，定容至 3.0mL；

步骤 6：将上述包含冰醋酸的丙酮溶液和乙酸铵溶液组成的定容液用 0.22μm 微孔滤膜过滤，所得滤液即可上机测试。

2. 根据权利要求 1 所述的一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法，其特征在于，上述双酚 A 分子印迹固相萃取柱的制备方法如下：

步骤 1：双酚 A 分子印迹材料的制备：取 0.5 克～ 1.0 克双酚 A 和 0.5 克～ 1.0 克甲基丙烯酸加入到 30mL 的比色管中，用 20.0mL 氯仿溶解，将混合物在 4℃的冰箱中放置 30 分钟，加入 5.0 克～ 10.0 克的二甲基丙烯酸乙二醇酯和 0.05 克～ 0.10 克引发剂偶氮二异丁腈，在超声浴中脱气 5 分钟，氮气吹扫 10 分钟并密封，放入恒温振荡水浴装置 60℃加热 24 小时，取出聚合物，进行研磨，过 200 目筛，收集粒径均匀的颗粒，用含 10％冰醋酸的丙酮溶液在索氏提取器中洗脱直至洗脱液用分光光度法检测不到双酚 A；

步骤 2：双酚 A 分子印迹固相萃取柱的制备：将 30mg 医用脱脂棉填入 2.5mL 一次性医用注射器的柱管底部，压实；称量 200mg 聚合物颗粒，用干法装柱，最后再次填充 30mg 医用脱脂棉，压实。

3. 根据权利要求 1 所述的一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法，其特征在于，上述 0.05mol/L 乙酸铵溶液的制备方法如下：1.925g 乙酸铵溶于 500mL 去离子水中，超声脱气；上述含 10％冰醋酸的丙酮溶液的制备方法如下：100mL 冰醋酸溶于 900mL 丙酮中，超声脱气。

一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域，更具体涉及一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法。

背景技术

[0002] 环境内分泌干扰物(Endocrine-disrupting chemicals,EDCs)是一些人工制造或是自然产生的化学物质，它能干扰内分泌系统的正常功能，对有机生物体的健康造成不良影响。

[0003] 双酚A(Bisphonel A,BPA)是工业上合成聚碳酸酯、环氧树脂、聚砜树脂、聚苯醚树脂、不饱和聚酯树脂等多种高分子材料的有机化工原料，是常见的环境内分泌干扰物之一。BPA 不但具有破坏甲状腺激素作用的潜在能力，而且能引起人类前列腺癌细胞的扩散，还能在低剂量时阻止睾丸激素的合成。因此，减少双酚 A 对生命体健康的影响以及正确评价环境风险，有效监控双酚 A 在环境样品中的残留量至关重要。

[0004] 当前，检测 BPA 的方法主要有高效液相色谱法、液质联用分析法、气相色谱分析法、气质联用分析法、毛细管电泳分析法、免疫分析法，光谱分析法等，任何一种方法都涉及样品的前处理，对于组分复杂的实际样品，前处理步骤在很大程度上决定了检测灵敏度的高低。常用的前处理方法有两种，一是使用有机溶剂或辅以超声波反复萃取，二是采用固相萃取柱浓缩富集，这两类技术关键缺点是萃取不具有选择性，提取效率低，有机试剂耗费量大，反复萃取损失大，处理过程耗时较长。

[0005] 分子印迹技术是一种新兴的分子识别技术，是指通过人工制备的具有对特定分子存在选择性结合位点的分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymers,MIPs)，实现对目标分子的特异性识别、分离、净化、富集等作用，近年来在化学、医学、分子生物学等领域得到了广泛的研究和运用。目前已有多种基于分子印迹技术检测双酚 A 的研究报道（分析化学研究简报，2009,37:1041；化学学报，2009,67:1475；J Appl Electrochem,2011,41:1323）和专利申请（中国专利，公开号：CN101650334A；中国专利，授权公告号：CN202267668U；中国专利，公开号：CN102445481A)，这些技术均是将分子印迹膜以涂覆或浸泡等方式固定到电极表面，不能充分地发挥分离和预富集的作用，且必须依靠电化学的方法检测，大大限制了响应灵敏度的提高。另有专利技术（中国专利，公开号：CN10230425A）制备一种表面分子印迹聚合物包裹磁性亚微米粒子，用于食品包装材料的处理，该技术涉及的萃取材料需多步化学合成，步骤繁琐，需要三天甚至更长的时间才能完成，实验条件苛刻，成功率低。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题在于：克服现有的环境样品中双酚 A 的前处理方法限制响应灵敏度的提高、步骤繁琐、耗时长、实验条件苛刻、成功率低的缺陷，提供一种操作简单、耗时短的环境样品中双酚 A 的前处理方法，经该方法处理后的待测样品能够直接用液

相色谱－串联质谱法进行检测，本发明将分子印迹技术应用于固相萃取柱中，集萃取、净化和富集为一体，建立一种处理环境样品中双酚 A 的新方法，用于实际样品的分析，本方法省时、环境友好、操作简便、特异性强、干扰少、准确可靠，适合于环境样品中双酚 A 的快速测定。

[0007] 为了解决上述技术问题，本发明提出以下技术方案：一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法，其由以下步骤组成：步骤 1：准确称取水样、水底沉积物或土壤样品 3.00g，精确至 0.01g，置于 50mL 离心管中，加入乙腈有机混合溶剂，用高速分散均质机将样品打散，再加入 2.0g 的碱性氧化铝粉末，振荡 1min，4500rpm/min 离心 10min；所述乙腈有机混合溶剂的配制为：20mL 乙腈 +10μL 冰乙酸；

[0008] 步骤 2：取 10mL 上清液，以 10mL 高纯水稀释备用，制备成 20mL 样品液；

[0009] 步骤 3：规格参数为 MIPs-200mg/2.5mL 的双酚 A 分子印迹固相萃取柱的活化过程：

[0010] (a)、2.0mL 含 10％冰醋酸的丙酮溶液淋洗；

[0011] (b)、2.0mL 高纯水平衡；

[0012] 步骤 4：将步骤 2 中 20mL 样品液过柱，抽真空，5mL 高纯水淋洗，弃去全部淋洗液；

[0013] 步骤 5：再用 3.0mL 含 10％冰醋酸的丙酮溶液洗脱，收集洗脱液，加入 0.05mol/L 乙酸铵溶液，定容至 3.0mL；

[0014] 步骤 6：将上述包含冰醋酸的丙酮溶液和乙酸铵溶液组成的定容液用 0.22μm 微孔滤膜过滤，所得滤液即可上机测试。

[0015] 上述技术方案的进一步限定在于，上述双酚 A 分子印迹固相萃取柱的制备方法如下：

[0016] 步骤 1：双酚 A 分子印迹材料的制备：取 0.5 克～ 1.0 克双酚 A 和 0.5 克～ 1.0 克甲基丙烯酸加入到 30mL 的比色管中，用 20.0mL 氯仿溶解，将混合物在 4℃的冰箱中放置 30 分钟，加入 5.0 克～ 10.0 克的二甲基丙烯酸乙二醇酯和 0.05 克～ 0.10 克引发剂偶氮二异丁腈，在超声浴中脱气 5 分钟，氮气吹扫 10 分钟并密封，放入恒温振荡水浴装置 60℃加热 24 小时，取出聚合物，进行研磨，过 200 目筛，收集粒径均匀的颗粒，用含 10％冰醋酸的丙酮溶液在索氏提取器中洗脱直至洗脱液用分光光度法检测不到双酚 A；

[0017] 步骤 2：双酚 A 分子印迹固相萃取柱的制备：将 30mg 医用脱脂棉填入 2.5mL 一次性医用注射器的柱管底部，压实；称量 200mg 聚合物颗粒，用干法装柱，最后再次填充 30mg 医用脱脂棉，压实。

[0018] 上述技术方案的进一步限定在于，上述 0.05mol/L 乙酸铵溶液的制备方法如下：1.925g 乙酸铵溶于 500mL 去离子水中，超声脱气；上述含 10％冰醋酸的丙酮溶液的制备方法如下：100mL 冰醋酸溶于 900mL 丙酮中，超声脱气。

[0019] 本发明的前处理方法与现有处理方法相比，具有选择性高、操作简单有效、耗时短、成本低、选择性高、干扰少、重现性好等优点，具有很强的可操作性。

[0020] 本发明的显著优点为：

[0021] 1、本发明采用双酚 A 分子印迹材料，能够选择性地提取双酚 A，提取效率高，从而能够有效地检测双酚 A；

[0022] 2、目前报道的大部分固相萃取方法均采用多根萃取柱串联的方法将双酚从基质

中分离出来，而本方法采用一根萃取柱直接萃取，从而简化了分离步骤，节省了分析时间；

[0023] 3、现有处理方法多采用旋转蒸发或者氮气吹干的方法进行浓缩富集，耗时较长，而本方法采用固相萃取的方法可同时进行多个样品的检测，耗时少，操作方便，大大减少有机提取剂的使用量；

[0024] 4、现有方法中采用的萃取柱大部分是商品化产品，价格昂贵、选择性差；而本方法中的分子印迹固相萃取柱合成方法简便、亲和性和选择性高、稳定性好、使用寿命长等优点，显示出广泛的应用前景。

具体实施方式

[0025] 本发明所需试剂溶液的配制方法如下：

[0026] 双酚 A 分子印迹材料的制备：取 0.5 克～ 1.0 克双酚 A 和 0.5 克～ 1.0 克甲基丙烯酸加入到 30mL 的比色管中，用 20.0mL 氯仿溶解，将混合物在 4℃的冰箱中放置 30 分钟，加入 5.0 克～ 10.0 克的二甲基丙烯酸乙二醇酯和 0.05 克～ 0.10 克引发剂偶氮二异丁腈，在超声浴中脱气 5 分钟，氮气吹扫 10 分钟并密封，放入恒温振荡水浴装置 60℃加热 24 小时。取出聚合物，进行研磨，过 200 目筛，收集粒径均匀的颗粒。用含 10％冰醋酸的丙酮溶液在索氏提取器中洗脱直至洗脱液用分光光度法检测不到双酚 A。

[0027] 双酚 A 分子印迹固相萃取柱的制备：将 30mg 医用脱脂棉填入 2.5mL 一次性医用注射器的柱管底部，压实；称量 200mg 聚合物颗粒，用干法装柱，最后再次填充 30mg 医用脱脂棉，压实。

[0028] 0.05mol/L 乙酸铵溶液：1.925g 乙酸铵溶于 500mL 去离子水中，超声脱气；含 10％冰醋酸的丙酮溶液：100mL 冰醋酸溶于 900mL 丙酮中，超声脱气；

[0029] 双酚 A 标准溶液：取 1.0mg 双酚 A 溶于 1000mL 超纯水中，得到 1.0μg/mL 双酚 A 储备液；取 1.0μg/mL 储备液 1.0mL 用乙腈稀释至 10mL，得到 0.1μg/mL 标准液；分别取 0.1μg/mL 工作液 0.50mL、1.00mL 用乙腈稀释至 10mL，得到 5.0ng/mL 和 10.0ng/mL 的双酚 A 标准工作液，用于回收率实验。

[0030] 本发明提出的一种环境样品中双酚 A 检测的前处理方法包括样品称量、均质、固相萃取、洗脱等步骤，具体包括：

[0031] 步骤 1：分别准确称取水样、水底沉积物和土壤样品 3.00g，平行五份，精确至 0.01g，置于 50mL 离心管中，加入乙腈有机混合溶剂，用高速分散均质机将样品打散，再加入 2.0g 的碱性氧化铝粉末，振荡 1min，4500rpm/min 离心 10min；所述乙腈有机混合溶剂的配制为：20mL 乙腈 +10μL 冰乙酸；

[0032] 步骤 2：取 10mL 上清液，以 10mL 高纯水稀释备用，制备成 20mL 样品液；

[0033] 步骤 3：双酚 A 分子印迹固相萃取柱（规格参数为 MIPs-200mg/2.5mL）的活化过程：

[0034] a. 2.0mL 含 10％冰醋酸的丙酮溶液淋洗；

[0035] b. 2.0mL 高纯水平衡；

[0036] 步骤 4：将步骤 2 中 20mL 样品液过柱，抽真空，5mL 高纯水淋洗，弃去全部淋洗液；

[0037] 步骤 5：再用 3.0mL10％冰醋酸的丙酮溶液洗脱，收集洗脱液，加入 0.05mol/L 乙酸铵溶液，定容至 3.0mL；

[0038] 步骤 6 :将上述包含冰醋酸的丙酮溶液和乙酸铵溶液组成的定容液用 0.22μm 微孔滤膜过滤,所得滤液即可上机测试。

[0039] 向经过上述 6 个步骤处理的水样、水底沉积物和土样样品中添加 BPA 标准溶液,进行精密度和回收率实验,结果如表 1 所示,相对标准偏差 (RSD%) 为 2.6 ～ 5.0%,回收率为 96.6 ～ 107.3%,表明该处理方法精密度和准确度良好,适用于实际样品的前处理。

[0040] 表 1 精密度和回收率 (n = 5) 实验

[0041]

样品	BPA 浓度 (ng/mL)					回收率(%)
	检出量	相对标准误差 (RSD%)	加标量	加标检出量	相对标准误差 (RSD%)	
水底沉积物	7.82 ± 0.37	4.6	5.00	12.98 ± 0.41	3.2	103.2
			10.00	17.66 ± 0.46	2.6	98.4
水样	3.39 ± 0.16	4.7	5.00	8.22 ± 0.41	5.0	96.6
			10.00	13.56 ± 0.39	2.9	101.7
土壤样品	9.24 ± 0.41	4.4	5.00	14.12 ± 0.57	4.1	97.6
			10.00	19.97 ± 0.78	3.9	107.3

[0042] 与现有方法相比,本发明提出的一种环境样品中双酚 A 的前处理方法操作方便、省时、绿色环保,大大降低了有机提取剂的使用量,如表 2 所示。

[0043] 表 2 不同前处理方法参数比较

[0044]

参数	本发明	中国专利 CN 10230425A	中国专利 CN 102435681A	中国专利 CN 102692474A	中国专利 CN 102680604A
所需时间 (h)	0.5~1.0	70~100	——(专利中未提及)	1~1.5	34~36
所需有机试剂量 (mL)	25~30	200~300	100～120	40～51	100~110

[0045] 环境中存在大量的无机离子和有机酚类化合物,这些共存物质会给双酚 A 的检测带来干扰,有必要在前处理步骤除去这些干扰物质。将 5.0ng/mL 的双酚 A 标准溶液与浓度为 100 倍的 Na^+、NH_4^+、Cl^-、NO_3^-、SO_4^{2-}、CO_3^{2-}、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{3+} ;30 倍的尿酸、抗坏血酸和乙

醇；10 倍的对硝基苯酚和对硝基苯胺；以及 5 倍的苯酚同时经过本发明涉及的分子印迹固相萃取柱，处理得到的溶液经上机测试，与 5.0ng/mL 的双酚 A 标准溶液相比，信号误差小于 5%，说明干扰物质被分子印迹固相萃取柱有效地除去，该分子印迹固相萃取柱能够特异地识别双酚 A，选择性好。

[0046] 将新制的分子印迹固相萃取柱用于提取 5.0ng/mL 的双酚 A 标准溶液，回收率为 101.3%；使用完毕后，将分子印迹固相萃取柱密封储存在 4℃的冰箱中，一星期后取出活化，再测 5.0ng/mL 双酚 A 标准溶液的提取回收率为 98.7%；使用完毕后，将分子印迹固相萃取柱继续密封储存在 4℃的冰箱中，一个月后取出再测 5.0ng/mL 双酚 A 标准溶液的提取回收率为 95.2%。结果表明该分子印迹固相萃取柱具有良好的储备稳定性，使用寿命长。