

陈瑾, 刘媚媚, 曲晋刚. 基于泡腾辅助脂肪酸形态转化的悬浮固化-分散液液微萃取测定水样中环境雌激素[J]. 环境化学, 2023, 42(11): 4043-4046.

CHEN Jin, LIU Meimei, QU Jingang. An optimized of effervescence-assisted switchable fatty acid-based microextraction with solidification of floating organic droplet for determination of environmental estrogens in environmental water samples[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(11): 4043-4046.

基于泡腾辅助脂肪酸形态转化的悬浮固化-分散液 液微萃取测定水样中环境雌激素

陈瑾¹ 刘媚媚² 曲晋刚^{3*}

(1. 浙江同济科技职业学院, 杭州, 311231; 2. 浙江鸿博环境检测有限公司, 杭州, 311100;

3. 辉佑(杭州)医药技术服务有限公司, 杭州, 310020)

摘要 本研究建立脂肪酸形态转化液液微萃取技术并结合高效液相色谱对湖水和河水中雌酮、己烯雌酚和己烷雌酚这3种环境雌激素(EEs)进行了测定. 利用脂肪酸可在亲水-疏水形态间转换的特点, 对5种中链脂肪酸筛选得到辛酸作为萃取剂, 同时根据其低温固化的特点, 利用漂浮液滴固化微萃取技术进行测定. 通过实验设计优化最优萃取条件为: H₂SO₄ (98%) 体积 238 μL、Na₂CO₃ (2 mol·L⁻¹) 体积 413 μL、脂肪酸体积 144 μL 和涡旋时间 3.3 min. 最优萃取条件下检测, 定量限范围 0.110—0.201 μg·L⁻¹, 回收率范围 89.0%—101.5%. 本方法具有简便快捷, 检测限低, 回收率高, 绿色环保等优点, 适用于多种环境水体中 EEs 的快速定性及定量分析.

关键词 环境雌激素, 中链脂肪酸, 形态转换微萃取, 环境水体样品, 响应面优化.

An optimized of effervescence-assisted switchable fatty acid-based microextraction with solidification of floating organic droplet for determination of environmental estrogens in environmental water samples

CHEN Jin¹ LIU Meimei² QU Jingang^{3*}

(1. Zhejiang Tongji Vocational College of Science and Technology, Hangzhou, 311231, China; 2. Zhejiang Hongbo Environmental Testing Co., Ltd, Hangzhou, 311100, China; 3. Huiyou (Hangzhou) Pharmaceutical Technology Service Co., Ltd, Hangzhou, 310020, China)

Abstract This study created a new method for easily and quickly determining environmental estrogens (estrone, diethylstilbestrol, and hexestrol) in samples of tap water, lake water, rainwater, and river water. This method uses a switchable fatty acid-based microextraction assisted by effervescence in conjunction with the solidification of a floating organic droplet. Five medium-chain fatty acids were tested as an extraction solvent given their ability to change between hydrophobic and hydrophilic forms by pH adjustment. Octanoic acid had the capacity to change from a liquid to a solidified floating state at low temperatures and had outstanding extraction recovery for three environmental estrogens, therefore four primary characteristics were assessed using central composite design as follows: 238 μL H₂SO₄ (98%), 413 μL Na₂CO₃ (2 mol·L⁻¹), 144 μL fatty acid and 3.3 min vortex time. Under optimized conditions, limits of quantitation were 0.110—0.201 μg·L⁻¹ and extraction recoveries were 89.0%—101.5% for three environmental estrogens in four kinds of

* 通信联系人 Corresponding author, Tel: 0571-86712009; E-mail: 394610669@qq.com

environmental water samples. Overall, the new method is simple, quick, and environment-friendly with low detection limits and high recoveries.

Keywords environmental estrogens, medium-chain saturated fatty acids, switchable fatty acid-based microextraction combined with solidification of floating organic droplet, environmental water samples, response surface optimization.

环境雌激素(environmental estrogens, EEs)是广泛分布在环境中的一类具有雌激素活性的化学物质,根据来源可分为天然雌激素,如雌酮(E1)、17 β -雌二醇(E2)和雌三醇(E3);与人工合成雌激素,如双酚S(BPS)、己烯雌酚(DES)和己烷雌酚(HS)等两大类^[1].随着2013年欧盟将E2列入新型污染物名单(Directive 2013/39/EU),EEs对水生动物的毒性效应已经引起广泛关注.EEs可以通过人及动物排泄物以及工业废水进入水体环境中,具有毒性高,难降解的特点,并干扰生殖及代谢系统的正常功能.但是EEs在水体环境中浓度极低,检测之前需对样品进行富集、浓缩与净化以降低基质影响,提高检测灵敏度与回收率^[2].

目前报道的环境水体中EEs样品前处理方法有固相萃取(SPE)^[3]、固相微萃取(SPME)^[4]、分散液液微萃取(DLLME)、漂浮液滴固化分散液液微萃取技术(DLLME-SFO)^[5]等.固相萃取法(SPE)操作繁琐,且有机溶剂消耗量大;固相微萃取法(SPME)所需溶剂极少,但萃取时间较长,纤维耗材价格高、易碎、容易超载,成本较高;分散液液微萃取法(DLLME)是一种目前新型的微萃取技术,集萃取与浓缩于一体,被广泛应用于样品前处理中,但其萃取溶剂一般为毒性较大的含氯有机试剂.漂浮液滴固化分散液液微萃取技术(DLLME-SFO)是对DLLME的改进,保留了DLLME简单、快速、成本低廉的优点,同时使用低毒的长链脂肪烃、脂肪醇等作为萃取剂,萃取水相中的目标化合物;利用萃取剂低温固化的特点进行回收,因此更加环境友好,常用于检测水体中的污染物^[6].

本文利用脂肪酸可在亲水-疏水形态间转换的特点,拟建立一种新型泡腾辅助溶剂转换液相微萃取技术,对室温下为液态的5种中链脂肪酸进行筛选,发现辛酸除具有优秀的萃取回收率外,其低熔点、低密度可以作为萃取剂应用于漂浮液滴固化微萃取^[7],结合HPLC测定湖水和河水中环境雌激素的含量.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GL224i-1SCN 分析天平(赛多利斯,德国);KH19A 高速离心机(凯达,湖南);KQ-500DE 超声波清洗仪(舒美,昆山);LC-20AT 高效液相色谱仪(岛津,日本);C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m)(岛津,日本).色谱条件:甲醇:超纯水(60:40);流速 1 mL \cdot min⁻¹;检测波长 230 nm;进样体积 50 μ L;柱温 30 $^{\circ}$ C.

雌酮、己烯雌酚和己烷雌酚标准品(纯度>99%)购于上海百灵威试剂;色谱级丙酮、甲醇、乙醇、乙腈、碳酸钠和浓硫酸购于上海安普试剂公司.

1.2 样品采集与处理

实际水样采集根据中华人民共和国生态环境部颁布的“水质-取样技术指南”(HJ494-2009).河流样本取自杭州市萧山区浦阳江.湖泊水样本取自萧山区湘湖.所有水样经 0.45 μ m 水膜过滤去除悬浮颗粒物,于 4 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.3 微萃取步骤

准确量取 10 mL 水样至 15 mL 离心管中,加入脂肪酸(144 μ L)与饱和碳酸钠溶液(413 μ L),将溶液体系变为碱性,脂肪酸转变为亲水形态.加入浓硫酸(238 μ L)产生 CO₂,涡旋(3.3 min),以 4000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,冰浴 10 min,此时萃取剂脂肪酸由于温度低于凝固点变成固态,待其融化后取 50 μ L 用甲醇稀释至 100 μ L,吸取 50 μ L 注入 HPLC 进行分析检测.

1.4 实验设计

本实验根据预实验结果,进一步优化了 H₂SO₄ 体积(A),Na₂CO₃ 体积(B),脂肪酸体积(C)和涡旋时间(D)四个主要影响萃取回收率的因素.通过 Design-Expert 8.0.5(Minneapolis, USA) 建立 4 因素 5 水平(- α , -1, 0, +1, + α)共 22 组的中心实验设计(CCD)(表 1),并以萃取回收率(extraction recovery, ER)^[7] 评价指标,共分为 2 个区组;22 组含 8 个半分点($N_f=2^{f+1}$),8 个星点($N_q=2^f$)和 6 个中心点.

表 1 CCD 设计的因素和水平

Table 1 Factors, symbols and levels for the CCD

| 因子 | 符号 | - α (低) | -1 | 0 | 1 | + α (高) |
|---|----|----------------|-----|-----|-----|----------------|
| H ₂ SO ₄ 体积/ μ L | A | 100 | 160 | 250 | 340 | 400 |
| Na ₂ CO ₃ 体积/ μ L | B | 100 | 220 | 400 | 580 | 700 |
| 脂肪酸体积/ μ L | C | 50 | 90 | 150 | 210 | 250 |
| 涡旋时间/min | D | 0 | 1.2 | 3.0 | 4.8 | 6.0 |

1.5 计算结果

通过决定系数、线性范围、检出限、精密度和萃取回收率(ER)对方法进行评价,回收率计算公式如下:

$$ER = \frac{C_{\text{found}} - C_{\text{real}}}{C_{\text{added}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, C_{found} 为实际样品中目标物浓度; C_{real} 为空白对照中目标物浓度; C_{added} 为实际样品中添加标准品后目标物浓度.

2 结果与讨论

2.1 5种脂肪酸以及pH调节剂对目标环境雌激素的萃取

低毒、难溶于水、易溶于分散剂、密度比水轻且熔点低于室温是 DLLME-SFO 萃取溶剂选择的标准, 基于此, 本文选择戊酸(-20 ℃)、己酸(-4 ℃)、庚酸(-10.5 ℃)、辛酸(16 ℃)、壬酸(12.4 ℃)这5种中链脂肪酸作为萃取溶剂. 5种中链脂肪酸在碱性体系溶液中, 可转化为亲水形态, 提高萃取效率, 利用其低温固化的特点可实现悬浮固化微萃取. 5种中链脂肪酸对3种目标环境雌激素的萃取回收率结果表明, 戊酸、己酸和庚酸回收率较低; 壬酸仅对E1的回收率较高(~100%), 对其他2种EEs回收率都较低; 辛酸对3种目标EEs回收率都较高(~90%). 戊酸、己酸和庚酸熔点均低于0℃, 在水相中低温固化不完全, 影响萃取效率; 由于DES和HS的极性大于E1, 壬酸对E1的萃取效率要高于DES和HS, 辛酸极性大于壬酸, 根据相似相溶原理, 辛酸对DES和HS的萃取效率要高于壬酸, 所以辛酸对3种目标EEs回收率都较高.

以碳酸钠和碳酸氢钠为碱性调节剂, 硫酸与盐酸为酸性调节剂进行筛选. 本实验选择碳酸钠和硫酸作为pH调节剂(回收率91.1%). 是因为常温下碳酸钠在水中溶解度约为碳酸氢钠3倍, 相同体积的饱和溶液中碳酸钠物质的含量更高, pH调节能力更强, 其与酸产生的CO₂更多, 使萃取剂与样品接触更加充分, 更好的提高萃取回收率.

2.2 实验条件筛选

3D 曲面图和等高线图(图1)显示了H₂SO₄体积、Na₂CO₃体积、脂肪酸体积和涡旋时间与回收率之间相互关系. 最终确定的最优萃取条件为: H₂SO₄体积238 μL、Na₂CO₃体积413 μL、脂肪酸体积144 μL和涡旋时间3.3 min.

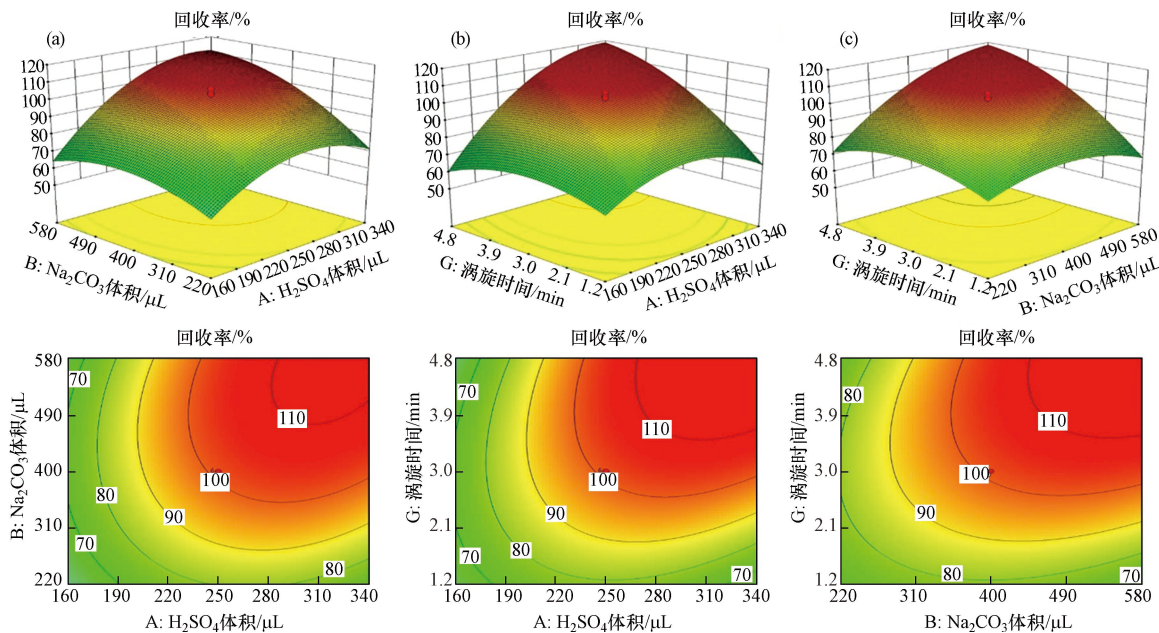


图1 CCD设计响应结果

Fig.1 3D response surface and contour plots of CCD

2.3 方法评价

在最优萃取条件下, 各物质的性能分析见表2. 稳定性评价结果表明, 3种目标环境雌激素的日内RSD范围为1.2%—6.2%; 日间RSD范围为2.5%—6.6%.

表2 前处理方法的分析性能

Table 2 The analytical performance of pre-treatment method

| 污染物 | 线性方程 | 决定系数 (R^2) | 线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|-----|------------------|----------------|--|---|---|
| E1 | $y=0.0479x-7.09$ | 0.993 | 0.201—1000 | 0.060 | 0.201 |
| DES | $y=0.0530x-5.17$ | 0.992 | 0.186—1000 | 0.056 | 0.186 |
| HS | $y=0.0392x+1.58$ | 0.998 | 0.110—1000 | 0.033 | 0.110 |

2.4 实际样品分析

采用本文的一种新型泡腾辅助溶剂转换液相微萃取技术对实际水体样品进行检测。在实际样品检测分析中,加标浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 3 种目标物质峰型优异,分离度好,无杂质峰干扰,可以准确地进行定性及定量分析。表 3 结果显示,3 种目标雌激素在湖水和河水中的相对回收率范围分别是 91.0%—101.5%, 89.0%—101.0%; 在湖水和河水空白样品中分别测得 E1 的浓度为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 3 微萃取前处理技术的性能分析($n=6$)

Table 3 Analytical performance for the proposed microextraction method (mean \pm SD, $n=6$)

| 污染物 | 湖水 | | | 河水 | | | |
|-----|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|-------|
| | 空白/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 检出/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 回收率/% | 空白/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 检出/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 回收率/% | |
| E1 | 10 | 0.5 ± 0.2 | 9.1 ± 0.9 | 91.0 | 1.2 ± 0.3 | 9.2 ± 0.8 | 92.0 |
| | 50 | 0.5 ± 0.2 | 47.6 ± 1.5 | 95.2 | 1.2 ± 0.3 | 47.9 ± 1.8 | 95.8 |
| | 100 | 0.5 ± 0.2 | 96.1 ± 1.5 | 96.1 | 1.2 ± 0.3 | 96.4 ± 2.1 | 96.4 |
| DES | 10 | 未检出 | 9.2 ± 1.2 | 92.0 | 未检出 | 9.3 ± 1.4 | 93.0 |
| | 50 | 未检出 | 48.5 ± 1.5 | 97.0 | 未检出 | 50.5 ± 2.2 | 101.0 |
| | 100 | 未检出 | 101.5 ± 2.2 | 101.5 | 未检出 | 98.7 ± 1.9 | 98.7 |
| HS | 10 | 未检出 | 9.5 ± 1.1 | 95.0 | 未检出 | 8.9 ± 1.1 | 89.0 |
| | 50 | 未检出 | 48.7 ± 1.4 | 97.4 | 未检出 | 49.5 ± 1.7 | 99.0 |
| | 100 | 未检出 | 97.9 ± 2.3 | 97.9 | 未检出 | 100.7 ± 2.1 | 100.7 |

3 结论

本研究利用辛酸可以在亲水-疏水形态间转化及低温下固化的特点,建立了脂肪酸形态转化液液微萃取技术来测定湖水和河水中环境雌激素。通过中心实验设计得到最优萃取条件: H_2SO_4 体积 $238 \mu\text{L}$ 、 Na_2CO_3 体积 $413 \mu\text{L}$ 、脂肪酸体积 $144 \mu\text{L}$ 和涡旋时间 3.3 min 。以此最佳萃取条件对湖水和河水样品中 3 种 EEs 含量进行测定,取得了良好的线性范围、决定系数、检测限、定量限,以及日内和日间精密度的,在环境水样微量 EEs 的分析中具有良好的前景。

参考文献 (References)

- [1] CHEN B B, HUANG Y L, HE M, et al. Simultaneous determination of five major bioactive components in traditional Chinese medicine formula Shugan Jianpi Recipe by high-performance liquid chromatography with diode array detector[J]. *Chromatogr A*, 2013, 1305: 17-26.
- [2] ZHANG G, YANG Y S, LU Y, et al. Effect of heavy metal ions on steroid estrogen removal and transport in SAT using DLLME as a detection method of steroid estrogen[J]. *Water*, 2020, 12(2): 589.
- [3] SIMON E, SCHIFFERLI A, BUCHER T B, et al. Characterization of the binding properties of the antibody-drug conjugate tositumomab-doxorubicin-nanocrystal by integrated biomolecular and biophysical tools[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(10): 2057-2069.
- [4] JI X P, SUN M, LI C Y, et al. Synthesis of highly ordered nanostructured carbon-based materials using a simple and low-cost method[J]. *Journal of Separation Science*, 2019, 42(14): 2398-2406.
- [5] LEONG M I, HUANG S D. A simple method for the determination of trace levels of copper in water samples using a flow-injection on-line preconcentration system coupled with flame atomic absorption spectrometry[J]. *Chromatogr A*, 2008, 1211(1-2): 8-12.
- [6] 袁继委,王金成,徐威力,等.凝固漂浮有机液滴-分散液液微萃取结合高效液相色谱法同时测定地表水中多环芳烃和酞酸酯[J]. *色谱*, 2020, 38(11): 1308-1315.
- [7] SERESHTI H, HERAVI Y E, SAMADI S. Synthesis, characterization and catalytic activity of unsupported and Pt-loaded SnO_2 catalysts prepared by sol-gel method[J]. *Talanta*, 2012, 97(16): 235-241.