

高效液相色谱法测定土壤中6种邻苯二甲酸酯的含量及其生物有效性的评价

刘成霞, 朱 洋, 刘绿叶*

(上海实朴检测技术服务有限公司, 上海 200100)

摘要:取土壤样品 10.000 g 两份,其中一份用 10 mL 甲醇超声提取 30 min 使其所含 6 种邻苯二甲酸酯(PAEs)[包括邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁基苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)及邻苯二甲酸二辛酯(DNOP)]溶于甲醇中。于提取液中加入硫酸镁和氯化钠,离心 3 min。取上清液,定容至 10.0 mL。经 0.45 μm 滤膜过滤,取滤液按色谱条件进行测定。以 Zorbax Eclipse C_{18} 色谱柱为固定相,以不同比例的乙腈(A)和水(B)的混合液为流动相进行梯度洗脱,并用紫外检测器于 245 nm 处测定。上述 6 种 PAEs 的质量浓度均在 0.10~10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与其对应的色谱峰面积呈线性关系,检出限在 0.01~0.04 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。另一份样品先用 10 mL 胃液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡提取 1 h,用碳酸氢钠调节消化液 pH 至 7.0,加入 55.0 mg 胆汁盐和 15 mg 胰液素,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡提取 2 h,完成体外胃肠模拟处理。经离心 3 min,取上清液,按上述方法加入甲醇提取,并用高效液相色谱法进行测定。所得结果表明:PAEs 的脂溶性越高,其生物有效性越低。此外,土壤的理化参数对 PAEs 的生物有效性也有影响。

关键词: 高效液相色谱法; 邻苯二甲酸酯; 生物有效性; 土壤

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2020)02-0206-05

邻苯二甲酸酯(PAEs)是一类常用的塑化剂,可增加塑料的柔韧性和强度,因此广泛应用于食品包装、儿童玩具、化妆品、纺织品和生物医学设备等软质塑料中^[1-3]。PAEs 可通过多种途径污染环境,如大气、饮用水、土壤、食品包装材料等,土壤中的塑化剂主要来源于农膜及其他废弃塑料制品的携入。PAEs 及其代谢产物和降解产物对人体健康的危害很大,不但会损伤人体肝脏、肾脏、生殖器官,还会干扰人体正常内分泌,影响体内荷尔蒙含量,长期在体内积累还可能会导致畸形、癌变和细胞突变^[4-6]。美国环保署将 6 种 PAEs 列为优先控制的重点污染物,包括邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁基苄酯(BBP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯

(DEHP)、邻苯二甲酸二辛酯(DNOP)。塑化剂的测定主要集中在塑料容器以及塑料包装材料中,但近年来,一些不法商贩利用塑化剂的增塑特点将塑化剂代替起云剂和乳化剂加入到食品,甚至药品中^[7]。对土壤中塑化剂的测定及其生物有效性的同步研究较少。

土壤中的 PAEs 能够被植物和无脊椎动物吸收,并通过食物链在动物和人体内累积,食物中的污染物从食品基质中释放后进入消化液,由上皮细胞转入静脉,继而转移到靶器官发挥毒性作用^[8]。体外胃肠模拟法可以利用人工配制的消化液,模拟人体的胃和肠的消化过程来分析污染物的生物有效性^[9-11]。通常只有部分有机污染物溶解在胃肠液中,这部分被认为是可能被人体吸收,即生物有效态的部分^[12]。测定土壤中有机污染物的生物有效性对评价其暴露风险至关重要^[13]。本工作以体外胃肠模拟法为基础,分析土壤中 PAEs 的生物有效性,为评价其健康风险和污染管控提供依据。

收稿日期: 2019-04-27

作者简介: 刘成霞,工程师,硕士研究生,主要从事化学分析与检测方法研究工作

* 通信联系人。lvye.liu@sepchina.cn

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪,配可变波长紫外检测器;梅特勒 S220 型 pH 计;0.45 μm 有机过滤膜。

6 种 PAEs 混合标准储备溶液:100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

胃液:称取 1.25 g 胃蛋白酶,0.50 g 苹果酸钠,0.50 g 柠檬酸钠,加入 420 μL 乳酸和 500 μL 乙酸溶解后,用乙酸定容至 1.000 L,并用 50% (体积分数) 盐酸溶液调节 pH 至 2.5^[14]。

甲醇、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,试验用水为超纯水。

1.2 色谱条件

Zorbax Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;进样体积 20 μL ;流量 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;测定波长 245 nm。流动相:A 为乙腈,B 为水。梯度洗脱程序:0~5 min 时,A 为 70%;6~10 min 时,A 由 70% 升至 95%,保持 10 min。

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理

分别称取 10.000 g 土壤样品于 2 个 50 mL 玻璃瓶中,第一份样品中加入 10 mL 胃液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速振荡提取 1 h,模拟胃液的消化过程。胃液提取结束后,用碳酸氢钠(粉末)调节消化液 pH 至 7.0,加入 55.0 mg 胆汁盐和 15 mg 胰液素即得肠液,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速继续振荡 2 h,完成肠液的提取。提取结束后,以 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 3 min,取上清液加入 10 mL 甲醇,超声提取 30 min。按同样方法操作进行空白试验。另一份样品中加入 10 mL 甲醇,超声提取 30 min,按同样方法操作进行空白试验。反应结束后向两份提取液中加入足量硫酸镁和氯化钠,以 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 3 min,取上清液定容至 10.0 mL,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后按色谱条件进行测定。

1.3.2 生物有效性计算

污染物的生物有效性的计算见公式(1):

$$x_B = \rho_1 / \rho_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: x_B 为污染物的生物有效性; ρ_1 为污染物从基质中释放到胃肠模拟液中的质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ρ_2 为基质中污染物的总质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

按色谱条件对 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6 种 PAEs 混合标准溶液进行测定,色谱图见图 1。

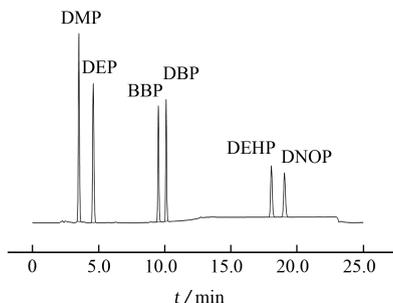


图 1 6 种 PAEs 混合标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard solution of 6 PAEs

2.2 色谱条件的选择

试验以乙腈-水二元溶剂体系为流动相,采用了 Zorbax Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm)分离,经过反复试验,摸索出有效分离 6 种 PAEs 的梯度洗脱程序,并考察了不同流量对分离 6 种 PAEs 的影响。初始,乙腈与水的比例为 70:30,以 5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率将乙腈的比例升至 95%;因 DMP 和 DEP 的保留时间较接近,控制流量为 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,在 10 min 内可有效分离 DMP、DEP、BBP;在 10~20 min 时,保持乙腈的比例为 95%,DBP 和 DEHP 的保留时间相差较大,可在 20 min 内分离 6 种 PAEs。选择合适的梯度洗脱程序,可有效降低基线漂移对 6 种 PAEs 的影响,获得较好的分离效果。试验选择的流量和梯度洗脱程序见 1.2 节。

2.3 标准曲线和检出限

移取适量的 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 种 PAEs 混合标准储备溶液,用乙腈稀释成 0.10, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6 种 PAEs 混合标准溶液系列,按色谱条件进行测定,以 6 种 PAEs 的质量浓度为横坐标,对应的色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归分析,绘制标准曲线。结果表明:6 种 PAEs 的质量浓度均在 0.10~10.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与其对应的色谱峰面积呈线性关系,线性回归方程和相关系数见表 1。

按色谱条件对 $2.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6 种 PAEs 混合标准溶液进行测定,计算 7 次平行测定的标准偏差,按照公式(2)计算方法的检出限:

$$X_{\text{MDL}} = t_{(n-1,0.99)} \times s \quad (2)$$

式中: X_{MDL} 为方法检出限; n 为样品的平行测定次数; t 为自由度为 $n-1$,置信度为 99% 时的 t 分布(单侧); s 为 n 次平行测定的标准偏差。当 $n=7$,置信度为 99% 时, $t=3.143$ 。方法的检出限结果见表 1。

表 1 线性回归方程、相关系数和检出限

Tab. 1 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits

| 化合物 | 线性回归方程 | 相关系数 | 检出限 $\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) |
|------|-------------------|-------|--|
| DMP | $y=0.333x-0.0365$ | 0.999 | 0.02 |
| DEP | $y=0.297x-0.0297$ | 0.999 | 0.01 |
| BBP | $y=0.202x-0.0207$ | 0.999 | 0.01 |
| DBP | $y=0.193x-0.0197$ | 0.999 | 0.01 |
| DEHP | $y=0.136x-0.0124$ | 0.999 | 0.03 |
| DNOP | $y=0.129x-0.0129$ | 0.999 | 0.04 |

2.4 精密度和回收试验

按试验方法对土壤标准样品(HTSB-4)、地表土壤样品、农田土壤样品进行分析,均未检出 6 种 PAEs。对上述土壤样品进行加标回收试验,平行测定 7 次,计算回收率和测定值的相对标准偏差(RSD),结果见表 2。

表 2 精密度和回收试验结果($n=7$)

Tab. 2 Results of tests for precision and recovery($n=7$)

| 样品 | 加标量 $\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 回收量 $\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 回收率/ % | RSD/ % |
|------|--|--|-----------|-----------|
| 标准土壤 | 2.50 | 2.41 | 96.4 | 0.22 |
| 地表土壤 | 2.50 | 2.39 | 95.6 | 0.56 |
| 农田土壤 | 2.50 | 2.40 | 96.0 | 0.48 |

由表 2 可知:回收率为 95.6%~96.4%,RSD 为 0.22%~0.56%。

2.5 土壤中 PAEs 的生物有效性

对土壤标准样品(HTSB-4)加标(加标量为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),其生物有效性结果见表 3。

由表 3 可知:不同 PAEs 的生物有效性存在一定差别。PAEs 脂溶性越高,其生物有效性越低。其主要原因为目前体外胃肠模拟法是基于污染物在介质和消化液中的平衡分配原理进行的,污染物的

表 3 土壤中 6 种 PAEs 的生物有效性

Tab. 3 Biological availability of 6 PAEs in soil

| 化合物 | 酶解前 $\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 酶解后 $\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 生物有效性/ % |
|------|--|--|-------------|
| DMP | 0.964 | 0.615 | 63.8 |
| DEP | 0.991 | 0.734 | 74.1 |
| BBP | 1.03 | 0.122 | 11.8 |
| DBP | 0.724 | 0.140 | 19.3 |
| DEHP | 1.02 | 0.150 | 14.7 |
| DNOP | 1.00 | — | — |

生物有效性与其辛醇-水分配系数有关。在体外胃肠模拟试验中,没有足够的亲脂性物质提供吸附力使得亲脂性有机污染物由固体颗粒释放到胃肠模拟液中,从而降低了它的转化。

2.6 土壤理化参数对 PAEs 生物有效性的影响

影响污染物对土壤生物毒性的因素主要包括:矿物质种类(影响化合物吸附)、粒径分布(影响表面积)、水含量(影响化合物分配和可利用性)、渗透度(影响传输能力)、结构(影响孔隙率)、酸度、温度、金属含量、含碳有机质(TOC)、孔隙率(影响渗透性)、密度(决定孔体积,受土壤中矿物质含量和种类、有机质、土壤结构影响)、无机离子、污染历史等^[15]。试验对某地土壤进行了研究,分析方法参照《全国土壤污染状况详查土壤样品分析测试方法技术规范》第三部分《土壤理化性质分析测试方法》。结果表明:某地土壤样品中 DEHP 检出率较高,主要原因在于 DEHP 是应用最为广泛的增塑剂,其辛醇-水分配系数较高,不易降解,易被土壤吸附,同时其生物有效性较低,造成持久性污染。土壤理化性质与生物有效性的相关性见表 4。

由表 4 可知:待测土壤样品生物有效性与含水率、湿密度成反比,与 TOC 有一定的相关性,这与文献^[16]研究结果一致。

本工作采用高效液相色谱法测定土壤中 6 种 PAEs 的含量,方法精密度高、准确可靠。同时以体外胃肠模拟法分析土壤中 PAEs 的生物有效性。人体胃肠道具有复杂的生理结构,当食物等介质进入以后,污染物不断从介质上解吸附下来,然后被胃肠道吸收。但在静态的体外胃肠模拟试验中,达到消化平衡后,并没有存在像活体一样的吸收过程,这会限制污染物从介质上的解吸附。因此,这种基于平衡分配原理的静态体外模拟试验测得的生物有效性

表4 土壤理化性质与生物有效性的相关性

Tab. 4 Correlation between physical and chemical properties of soil and biological availability

| 样品 | 生物有效性/ % | pH | TOC ω / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 孔隙度/ % | 含水率/ % | 湿密度 ρ / ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) | 土粒比/ % |
|----|-------------|------|---|-----------|-----------|---|-----------|
| 1 | 14.7 | 8.28 | 10.2 | 41.5 | 0.10 | 1.58 | 2.70 |
| 2 | 3.61 | 9.30 | 4.3 | 33.4 | 10.1 | 1.88 | 2.56 |
| 3 | 2.48 | 9.07 | 7.3 | 36.7 | 19.5 | 1.99 | 2.63 |
| 4 | — | 7.35 | 10.4 | 49.8 | 13.3 | 1.53 | 2.69 |
| 5 | — | 6.45 | 10.6 | 49.5 | 16.6 | 1.56 | 2.65 |
| 6 | — | 6.42 | 17.8 | 54.1 | 12.0 | 1.75 | 2.52 |

可能会低于活体试验测得的生物有效性。本工作为PAEs体内代谢提供前期参考,在后续的研究中建议采用液相色谱-质谱法或同位素示踪法对体内代谢物进行分析,并结合毒性因子,完善评价土壤中PAEs生物有效性的方法。

参考文献:

[1] LI R, LIANG J, GONG Z, et al. Occurrence, spatial distribution, historical trend and ecological risk of phthalate esters in the Jiulong River, Southeast China [J]. *Science of the Total Environment*, 2017,580:388-397.

[2] 王凯荣,崔明明,史衍玺.农业土壤中邻苯二甲酸酯污染研究进展[J].*应用生态学报*, 2013,24(9):2699-2708.

[3] 曹莹,陈莎,王晓伟,等.环境中邻苯二甲酸酯类化合物的分析测定[J].*环境与健康杂志*, 2007,24(7):546-549.

[4] SUN J, WU X, GAN J. Uptake and metabolism of phthalate esters by edible plants [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015,49(14):8471-8478.

[5] BUI T T, ALVES A, PALM-COUSINS A, et al. Estimating uptake of phthalate ester metabolites into the human nail plate using pharmacokinetic modelling [J]. *Environment International*, 2017,100:148-155.

[6] WINE R N, LI L H, BARNES L H, et al. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1997,105(1):102-107.

[7] 卢佑演,湛社霞,孙世宏,等.HPLC法测定饮料中6种邻苯二甲酸酯类塑化剂的研究[J].*中国卫生检验杂志*, 2013,23(11):2410-2412.

[8] STAPLES C A, GUINN R, KRAMARZ K, et al. Assessing the chronic aquatic toxicity of phthalate ester plasticizers [J]. *Human and Ecological Risk Assessment: an International Journal*, 2011,17(5):1057-1076.

[9] 李韵姿,何睿文,韩永和,等.胃肠模拟体外法的生理参数对室内灰尘中邻苯二甲酸酯与磷系阻燃剂的生物有效性的影响 [J].*环境科学学报*, 2016,36(5):1841-1848.

[10] 胡庆亮,黄宁宝,王艳,等.模拟胃肠液用 Tenax 提取法测定多溴联苯醚的生物有效性 [J].*环境化学*, 2014,33(8):1253-1260.

[11] 秦静,刘晓宇,刘幸,等.基于体外消化模型的食品中邻苯二甲酸酯生物有效性的测定 [J].*食品安全质量检测学报*, 2013(1):207-210.

[12] 陈珊,许宜平,王子健.有机污染物生物有效性的评价方法 [J].*环境化学*, 2011,30(1):158-164.

[13] 任超,赵祯,柳金明,等.典型废物回收园区土壤中邻苯二甲酸酯分布与风险评估 [J].*环境化学*, 2018,37(8):1691-1698.

[14] TILSTON E L, GIBSON G R, COLLINS C D. Colon extended physiologically based extraction test (CE-PBET) increases bioaccessibility of soil-bound PAH [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011,45(12):5301-5308.

[15] LEE C M. *Environmental organic chemistry*, 2nd edition (Schwarzenback, Rene P.; Gschwend, Philip M.; Imboden, Dieter M.) [J]. *Journal of Chemical Education*, 2003,80(10):1143-1148.

[16] 郭丽青,陶澍.不同有机质含量的土壤中 DDT 对小麦根系的生物有效性 [J].*生态环境*, 2003,12(2):135-138.

HPLC Determination of 6 Phthalates in Soil and Evaluation of Its Biological Availability

LIU Chengxia, ZHU Yang, LIU Lüye*

(Shanghai SEP Analytical Services Co., Ltd., Shanghai 200100, China)

Abstract: Two portions (10.000 g. each) of the soil sample were taken, and one portion (10 mL) of methanol were added to extract the 6 phthalates [i.e., dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), dibutyl benzyl phthalate (BBP), dibutyl phthalate (DBP), di-(2-ethyl) hexylphthalate (DEHP) and dioctylphthalate (DNOP)], into the methanol phase with the aid of ultrasonotor for 30 min. Appropriate amounts of $MgSO_4$ and NaCl were added to the extract, and the mixture was centrifuged for 3 min. The supernatant was diluted to 10.0 mL and filtered through 0.45 μm filtering membrane. The filtrate was analyzed by HPLC. Zorbax Eclipse C_{18} chromatographic column was used as stationary phase. Mixtures of acetonitrile (A) and water (B) with various ratios were used as mobile phase in the programmed gradient elution. And the 6 phthalates were determined by UV-detector at 245 nm. Linear relationships between values of chromatographic peak areas and corresponding mass concentrations of the 6 phthalates were found in the same range of 0.10—10.0 $mg \cdot L^{-1}$. Detection limits found were in the range of 0.01—0.04 $mg \cdot L^{-1}$. Another portion of the sample was treated by invitro gastrointestinal simulation with successive extractions in the following way: The sample was first extracted with 10 mL of the simulated gastric juice for 1 h at 37 $^{\circ}C$, to obtain the digestive juice, which, after adjusting its pH to 7.0 with $NaHCO_3$, and addition of 55.0 mg of bile salt and 15 mg of pancreatic secretin (acting as simulated intestinal juice) was extracted by vibration for 2 h at 37 $^{\circ}C$. After centrifuging for 3 min, the supernatant was taken and treated by the procedure given above beginning from extraction with methanol. It was found that the biological availability of the PAEs tended to give lower rates as their fat-solubility are higher. In addition, the biological availability of the PAEs was also effected by physical and chemical properties of the soil.

Keywords: HPLC; phthalate; biological availability; soil