

固相萃取检测养殖水体中邻苯二甲酸酯残留

马保华¹, 王兆梅^{2,*}, 李娜², 胡冬生¹, 李贺¹, 吕振华³

(1.南海出入境检验检疫局, 广东 佛山 528200; 2.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640;

3.惠州出入境检验检疫局, 广东 惠州 516001)

摘要: 建立固相萃取-气相色谱检测水体中6种邻苯二甲酸酯类物质的方法。采用正交设计确定最佳固相萃取条件为洗脱剂正己烷-丙酮(30:1, V/V)、洗脱体积6mL、洗脱速率2mL/min、上样速率8mL/min, 采用氢火焰离子化检测器的气相毛细管色谱。结果表明: 邻苯二甲酸酯的检测限为1.4~3.6 μ g/L, 线性范围在1~80mg/L之间, 相关系数为0.995以上; 低、高质量浓度加标回收率在72%~100%之间, 相对标准偏差均小于10%。采用此方法对广东省12个水产养殖基地的养殖水进行邻苯二甲酸酯类物质测定, 发现所有检测水样中均有邻苯二甲酸酯类物质残留(4.2~171.5 μ g/L), 其污染程度与地域密切相关。

关键词: 邻苯二甲酸酯; 养殖水体; 固相萃取

Determination of Phthalic Acid Ester Residues in Aquaculture Water by Solid Phase Extraction Coupled to Gas Chromatography

MA Bao-hua¹, WANG Zhao-mei^{2,*}, LI Na², HU Dong-sheng¹, LI He¹, LÜ Zhen-hua³

(1. Nanhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Foshan 528200, China;

2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

3. Huizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Huizhou 516001, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of 6 phthalic acid esters (PAEs) aquaculture in water by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography detection was developed. The SPE conditions were optimized using orthogonal array design as follows: n-hexane-acetone (30:1, V/V) as elution solvent at a flow rate of 2.0 mL/min, elution volume 6 mL, and sample loading rate 6.0 mL/min. Enriched samples were determined using a capillary gas chromatograph with flame ionization detector. The detection limits of 6 PAEs were in the range of 1.4–3.6 μ g/L. The method displayed a good linearity over the range of 1 to 80 mg/L, with a correlation coefficient of larger than 0.995. The recoveries of the 6 PAEs across low, medium high spike levels were 72%–117% and the relative standard deviations all lower than 10%. The PAEs in 12 samples from typical aquatic breeding areas in Guangdong province were detected by the established method. All samples were found to be polluted by total PAEs concentration in the range of 4.2–171.5 μ g/L. Moreover, the contaminations of PAEs were closely associated with geographic areas.

Key words: phthalic acid esters; aquaculture water; solid phase extraction

中图分类号: R181.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0164-04

邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)是一种广泛应用于的塑料增塑剂, 全球PAEs的使用量高达2700万吨^[1]。随着塑料制品的大量生产, 广泛使用以及随意的废弃, 作为其主要成分的增塑剂——邻苯二甲酸酯也愈来愈多地进入到环境水体、土壤和大气中, 成为全球性的环境污

染物, 其潜在危害越来越受到世界的关注^[2-3]。PAEs为环境内分泌干扰物, 可通过干扰生物体的激素合成过程影响生物体的生殖发育。作为一类高污染的环境激素污染物, PAEs在许多国家得到监测, 我国提出的“中国环境优先污染物黑名单”中就有3种邻苯二甲酸酯类化合物^[4-5]。

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 国家自然科学基金面上基金项目(B5100800); 广东检验检疫局科技计划项目(2006GDK13);

广东省大学生创新实验项目(S1010561061)

作者简介: 马保华(1975—), 男, 兽医师, 硕士, 主要从事食品检验与动物检疫研究。E-mail: mbh@nh.gdciq.gov.cn

* 通信作者: 王兆梅(1974—), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品安全分析与控制研究。E-mail: wangzm@scut.edu.cn

近年来,在多种环境和生物样本中均检测到 PAEs 残留^[6-10]。我国目前对养殖水体中 PAEs 残留尚未有规定,但水产品受养殖水的影响大。水产养殖的水体由于缺乏流动性易于产生 PAEs 富集,同时,PAEs 属于非极性化合物,在水产品体内代谢慢,易于产生富集,养殖水体中污染的 PAEs 可通过水产品吸收富集而引起水产品质量安全问题^[11-12]。为确保水产品的质量安全,建立养殖水中 PAEs 检测方法,阐明养殖水和水产品中增塑剂残留的相关性,将从源头上维护水产品安全,对于促进我国水产品质量提升和扩大出口具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

PAEs 单品及混合标准品包括美国国家环境保护局列为优先控制污染物的 6 种化合物(1mg/mL,正己烷作溶剂)美国 Ultra Scientific 公司;甲醇、二氯甲烷(色谱纯);水为去有机物水,由 Millipore 纯水器制得;无水硫酸钠(分析纯),于 350℃ 马福炉内烘 4h,保存备用。

1.2 仪器与设备

6890N 气相色谱仪(配氢火焰离子化检测器)、HP-5MS 石英毛细管色谱柱(30m × 0.25mm, 0.25μm) 美国 Agilent 公司。

12 管防交叉污染固相萃取装置 美国 Supelco 公司;GM-0.33 II 型隔膜真空泵 天津沸腾实验用品有限公司;Samplic 优化聚合物技术小柱(60mg, 3mL) 美国 Agilent 公司;DC-12 型氮吹仪 上海安谱科学仪器有限公司;Transonic T1-H-25 型超声波装置 美国 Laval Lab 公司;实验中使用的所有玻璃器具先在洗液(10g/100mL 的氢氧化钠乙醇溶液)中隔夜浸泡,自来水洗净,再分别用蒸馏水、丙酮淋洗后在烘箱中以 80℃ 烘烤 2h,以降低空白值;为降低邻苯二甲酸酯的污染,实验过程中避免使用塑料制品。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

根据水产养殖基地的地理位置、养殖面积、经营历史与模式、周围环境条件等,分别选择广州、珠海、中山、茂名市等代表性养殖地进行采样。用玻璃三角瓶取样 1L,每个鱼塘取平行样 3 个,水样取回后用 0.5μm 的滤膜过滤,然后放置在 4℃ 冰箱中备用。

1.3.2 气相色谱检测 PAEs

色谱柱为 HP-5MS 石英毛细管柱;进样口温度 250℃;氢火焰离子化检测器温度 300℃;升温程序:初始柱温 150℃,保持 0.5min,以 20℃/min 升温至 260℃,保持 5min;载气为氮气,流速 2mL/min;进样量 1μL;进样方式为不分流进样。

1.3.3 标准曲线绘制

采用外标法定量。将混合标准储备溶液用正己烷稀释至 1、5、10、20、40、80、100μg/L 标准系列溶液。将标准系列溶液按照上述的色谱条件分别测定峰面积,再以 6 种标准品的质量浓度为横坐标、对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.4 水中 PAEs 检测

技术路线:水样→过固相萃取柱→除水→浓缩至 2mL 并过 0.45μm 滤膜→进样检测。

取一定量水样,经固相萃取柱富集后,用无水硫酸钠干燥过夜,氮吹浓缩至 2mL,过 0.45μm 滤膜后转移到进样瓶中,用气相色谱检测。

1.3.5 加标水样的制备

采用加标水样作为实验材料进行固相萃取条件的研究,以加标回收率评价固相萃取效果。取 100mL 蒸馏水,加入一定量的混合标准溶液,200W、20kHz 超声处理 10min,待过柱。

1.3.6 固相萃取操作

固相萃取柱的活化:取优化聚合物技术小柱,先用 2mL 洗脱剂清洗固相萃取小柱的柱床,再依次用 2mL 甲醇和 2mL 二次蒸馏水缓慢通过萃取小柱,以达到润湿小柱,活化填料,除去干扰杂质的目的。

水样的富集提纯:量取一定体积水样(加标回收水样 100mL、养殖水样 500mL),在柱子被抽空前开始上样,在一定流速下使其连续地通过萃取柱,待水样全部通过后,用 2mL 重蒸馏水清洗柱体,并用平稳的气流继续抽吸 10min,使待测组分富集在 SEP 柱上,同时将小柱干燥。

分析物的洗脱和收集:采用一定体积正己烷丙酮混合洗脱溶剂以一定流速将待测物从固相柱上洗脱下来,浓缩定容到 2mL 供气相色谱测定。

1.3.7 固相萃取条件优化

表 1 固相萃取正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in the orthogonal design for solid phase extraction optimization

水平	因素			
	A 洗脱剂配比(正己烷:丙酮, V/V)	B 上样速率/(mL/min)	C 洗脱体积/mL	D 洗脱速率/(mL/min)
1	5:1	4	4	2
2	10:1	6	6	4
3	30:1	8	8	6

在固相萃取操作中,对分析物峰面积产生主要影响的固相萃取因素有上样速率、洗脱剂、洗脱体积和洗

脱速率^[10]。参考相关文献^[6-7], 选择用正己烷和丙酮的混合溶液作为洗脱剂进行试验。根据单因素试验, 选定以下3个水平(表1), 进行四因素三水平正交试验。

2 结果与分析

2.1 气相色谱法检测 PAEs

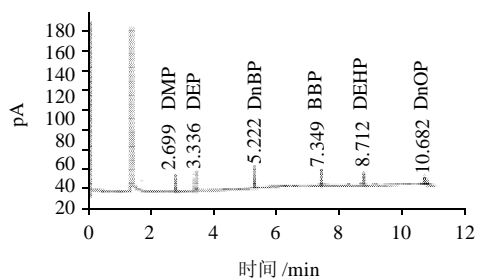


图1 6种邻苯二甲酸酯的气相色谱图

Fig.1 Gas chromatogram of 6 PAEs

用邻苯二甲酸酯的单标和混标在上述的色谱条件下确定6种邻苯二甲酸酯的保留时间, 利用样品中目标物与标样的保留时间进行对照定性。考虑到色谱柱柱效、仪器运行等因素的影响, 在测定样品的开始和结束时各测定一次标样, 观察保留时间的变化, 如果保留时间变化超过0.01min以上, 则检查仪器稳定性, 重新测量样品。如图1所示, 6种PAEs在所选的色谱条件下的保留时间分别为DMP(2.699min)、DEP(3.336min)、DnBP(5.222min)、BBP(7.349min)、DEHP(8.712min)、DnOP(10.682min), 表明PAEs在实验条件下可以实现分离。

6种PAEs的质量浓度与气相检测信号之间的关系见表2, 可见6种待测物的线性范围在1~80 μg/L之间, 相关系数均大于0.995, 线性关系良好, 因此, 在实验范围内, 可以根据气相色谱的峰面积值推算PAEs化合物的含量。

表2 6种PAEs的回归方程及相关系数

Table 2 Linear regression equations of 6 PAEs and their correlation coefficients

PAEs	回归方程	相关系数
邻苯二甲酸二甲酯(DMP)	$y = 1.821x - 0.1$	1.000
邻苯二甲酸二乙酯(DEP)	$y = 1.979x - 0.695$	0.999
邻苯二甲酸二正丁酯(DnBP)	$y = 2.328x + 0.754$	0.999
邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)	$y = 2.577x + 1.091$	0.999
邻苯二甲酸丁基苯基酯(BBP)	$y = 0.7745x + 3.0237$	0.995
邻苯二甲酸正辛酯(DnOP)	$y = 1.0459x - 4.0519$	0.997

2.2 固相萃取条件优化

正交设计试验结果如表3所示, 以6种PAEs的加标回收率表示。6种PAEs的回收率受固相萃取条件的

影响较大, 且不同种类的PAEs的加标回收率有差别, 其中常用的邻苯二甲酸酯DnBP相对较高, DEP也有较高的回收率, 这可能与分子质量或邻苯二甲酸酯结构中取代基的链长有一定关系^[13], 同时, 固相萃取条件也需要进一步优化以提高回收率。

表3 固相萃取正交试验结果

Table 3 Orthogonal design matrix and experimental results for solid phase extraction optimization

试验号	A	B	C	D	回收率/%					
					DMP	DEP	DnBP	DEHP	BBP	DnOP
1	1	1	1	1	31.9	37.2	36.0	31.6	29.7	32.6
2	1	2	2	2	58.2	68.7	77.7	55.1	69.3	50.1
3	1	3	3	3	40.6	49.0	54.6	40.8	38.9	36.1
4	2	1	2	3	35.1	50.0	54.9	36.2	44.5	31.5
5	2	2	3	1	43.7	51.7	56.8	41.5	47.7	45.2
6	2	3	1	2	23.2	26.6	36.9	19.7	12.1	15.7
7	3	1	3	2	60.7	68.9	83.8	58.3	82.3	56.6
8	3	2	1	3	39.8	47.5	57.2	38.1	56.9	41.1
9	3	3	2	1	83.7	98.9	99.8	68.0	86.1	60.4

表4 各PAEs化合物的固相萃取最佳条件

Table 4 Optimized solid phase extraction conditions

化合物	DMP	DEP	DnBP	DEHP	BBP	DnOP
A	30:1	30:1	30:1	30:1	30:1	30:1
B	8	8	6	6	6	6
C	6	6	6	6	6	6
D	2	2	2	2	2	2

对正交设计试验结果进行极差分析, 得到各分析物的最佳固相萃取条件如表4所示。可见, 6种PAEs的最佳固相萃取条件都比较一致, 只有上样速率分布在两个水平上, 即6mL/min和8mL/min。由于上样速率对回收率的影响不是很明显, 且考虑到节省处理时间, 故选择8mL/min的上样速率。而从 R_j 大小可以看出4个因素对于目标化合物回收率的影响大小。总体来说, C和A影响较大, 而B和D较小。因此在进行实验时, 洗脱剂要准确配制, 洗脱剂的体积要严格控制, 精确量取。综上所述, 本实验选定的固相萃取条件为洗脱剂V_{正己烷}:V_{丙酮}=30:1、洗脱剂体积6mL、洗脱速率2mL/min、上样速率8mL/min。经验证, 在最佳条件下, 加标量为10mg/L时, 6种PAEs的加标回收率分别是DMP(89.7±7.8)%、DEP(96.8±8.5)%、DnBP(97.8±6.2)%、DEHP(71.1±8.6)%、BBP(88.0±7.5)%、DnOP(55.6±8.3)%; 加标量为80 μg/L时, 6种PAEs的加标回收率分别是DMP(76.7±5.2)%、DEP(99.6±7.1)%、DnBP(102±6.8)%、DEHP(61.8±4.9)%、BBP(88.1±9.9)%、DnOP(64.8±9.8)%。

2.3 水加标回收PAEs方法的评价

按照加标回收实验, 所得 6 种 PAEs 的检测限分别为 DMP 1.6 $\mu\text{g/L}$ 、DEP 0.6 $\mu\text{g/L}$ 、DnBP 0.4 $\mu\text{g/L}$ 、DEHP 1.1 $\mu\text{g/L}$ 、BBP 1.3 $\mu\text{g/L}$ 、DnOP 3.2 $\mu\text{g/L}$ 。与文献所报道的用气相色谱检测法相比^[9-10], 检测限稍高, 这主要是与气相色谱柱的老化有关, 但是, 与液相色谱法相当^[14]。由于国家规定的玩具、饮用水等邻苯二甲酸酯类的安全限均为 10^{-6} 级, 高于检测限, 因此, 本研究所用的方法可用于环境中 PAEs 残留检测。

以加标水样中 PAEs 进行高(80 $\mu\text{g/L}$)、中(10 $\mu\text{g/L}$)、低(1 $\mu\text{g/L}$)质量浓度的回收率实验, 每组 6 份, 共 2 组, 进行低质量浓度和高质量浓度的回收率及精密度测定分析, 空白水样亦同时作 6 份, 结果显示, 各平行测试结果波动较小, 相对标准偏差 RSD 在 3%~9% 之间, 说明此方法准确度高、精密度好、稳定可靠。

2.4 养殖水体中 PAEs 残留分析

表 5 养殖水体中 PAEs 化合物含量

Table 5 Concentration of PAEs compounds in aquaculture water ($\mu\text{g/L}$) determined by the established method

编号	养殖基地	DMP	DEP	DnBP	DEHP	BBP	DnOP	ΣPAEs
1 [#]	广州市白云区竹料镇	—	4.5	20.4	8.9	—	0.9	34.7
2 [#]	增城市新塘镇	20.2	7.8	133.3	10.2	—	—	171.5
3 [#]	广州市番禺区东涌镇	1.2	2.1	3.6	2.8	1.0	—	10.7
4 [#]	广州市番禺区石基镇	6.3	2.2	7.6	5.5	1.3	—	22.9
5 [#]	广州市白云区江高镇	32.0	8.9	18.8	12.1	1.7	—	73.5
6 [#]	广州市白云区神山镇	16.5	7.0	19.2	10.8	0.9	—	54.4
7 [#]	珠海市三灶镇	—	1.2	3.1	—	2.8	0.5	7.6
8 [#]	珠海市平沙镇	0.8	—	2.3	—	3.1	—	7.4
9 [#]	中山市民众镇	2.2	—	3.4	1.7	6.0	—	13.3
10 [#]	中山市板芙镇	1.3	—	4.8	2.7	6.6	0.3	15.7
11 [#]	茂名市金塘镇	—	0.9	1.5	2.1	—	—	4.5
12 [#]	茂名市公馆镇	—	1.9	2.8	1.5	—	—	6.2

注: “—”表示未检测到。

共测定了广东 6 个养殖基地的 12 份养殖水, 在所有水样中均检出了 DnBP, 质量浓度范围在 1.5~133.3 $\mu\text{g/L}$, 检测结果符合我国目前用量最大的增塑剂邻苯二甲酸二丁酯(可能含有其同分异构体), 大部分样品中检出了 DEP、DEHP 和 BBP, 质量浓度范围分别在 0.9~8.9、1.5~12.1 $\mu\text{g/L}$ 和 0.9~6.6 $\mu\text{g/L}$ 之间, 有 4 份样品中未检测到 DMP, DnOP 在多数样品中未检出。检测结果说明, 邻苯二甲酸酯类在养殖水体中存在一定程度的污染。

从分布地区和 PAEs 总量来看, PAEs 污染状况具有明显的区域性, 广州市白云区、番禺区养殖水中 PAEs 污染严重, 沿海的珠海、茂名和中山等地污染程度相对较轻, 这说明养殖水体的污染与环境密切相关^[15]。另外, 增城市取的水样中 DnBP 含量高达 133.3 $\mu\text{g/L}$, 这可能是局部环境因素影响所致, 如饲料或水源的影响^[7], 目前

对养殖水体中 PAEs 残留尚未有规定, 但水产品受养殖水的影响大。养殖水体中污染的 PAEs 可通过水产品吸收富集而引起水产品质量安全。因此, 改善养殖水体环境, 对于维护水产品质量安全十分必要。

3 结 论

本研究建立了用固相萃取-气相色谱联用技术测定水样 6 种 PAEs(DMP、DEP、DnBP、BBP、DnOP、DEHP)残留的方法, 线性范围在 1~80 $\mu\text{g/L}$ 之间, 线性回归方程的相关系数 0.995 以上, 6 种 PAEs 的回收率为 72%~100%, 相对标准偏差为 3%~9%。此方法准确度高、精密度好、稳定可靠, 具有实际应用价值, 可用于水中 PAEs 残留检测。广东省主要水产品养殖基地的养殖水中均存在一定程度的 PAEs 污染, 污染程度具有一定的地域相关性, 水源可能是导致养殖水体 PAEs 污染的主要因素之一。

参考文献:

- [1] STAPLES C A, PETERSON D R, PARKERTON T F, et al. The environmental fate of phthalate esters: a literature reviews[J]. Chemosphere, 1997, 35(4): 667-749.
- [2] GOMEZ-HENS A, AGUILAR-CABALLOS M P. Social and economic interest in the control of phthalic acid esters[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(11): 847-857.
- [3] MATSUMOTO A M, HIRATA-KOIZUMIA M, EMA M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction[J]. Regulatory Toxicology Pharmacology, 2008, 50(1): 37-49.
- [4] 钱伯章. 欧盟邻苯二甲酸酯新标准将实施[J]. 精细石油化工进展, 2006, 7(11): 27.
- [5] KEITH L H, TELLIARD W A. Priority pollutants[J]. Environmental Science Technology, 1979, 13(2): 416-419.
- [6] 蔡全英, 莫测辉, 李云辉, 等. 广州、深圳地区蔬菜生产基地土壤中邻苯二甲酸酯(PAEs)研究[J]. 生态学报, 2005, 25(2): 283-288.
- [7] 谭君, 余光林. GC-EL-MS 内标法分析鱼肉中邻苯二甲酸酯[J]. 化学学报, 2007, 65(24): 2875-2882.
- [8] 白璐, 姬亚芹, 莫笑萍, 等. 水中邻苯二甲酸酯的研究进展[J]. 给水排水, 2010, 36(6): 121-124.
- [9] ZENG Feng, WEN Jiaxin, CUI Kunyan, et al. Seasonal distribution of phthalate esters in surface water of the urban lakes in the subtropical city, Guangzhou, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 169(3): 719-725.
- [10] HUANG P C, TIEN C J, SUN Y M, et al. Occurrence of phthalates in sediment and biota: relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor[J]. Chemosphere, 2008, 73(6): 539-544.
- [11] FATOKI O S, NOMA A. Solid phase extraction method for selective determination of phthalate esters in the aquatic environment[J]. Water Air Soil Pollution, 2002, 140(2): 85-98.
- [12] 曹艳平, 王大威, 张霞, 等. 气相色谱-质谱联用法测定饮用水中邻苯二甲酸酯类物质[J]. 预防医学论坛, 2007, 13(5): 441-442.
- [13] 程爱华, 王磊, 张睿, 等. 水中微量邻苯二甲酸酯类物质实用分析方法的确定[J]. 环境工程, 2007, 25(3): 77-79.
- [14] 王美丽, 陈海婷, 张会娜, 等. 高效液相色谱测定肉制品中五种邻苯二甲酸酯[J]. 分析实验室, 2008, 28(6): 49-52.
- [15] SHA Yujuan, XIA Xinghui, YANG Zhifeng, et al. Distribution of PAEs in the middle and lower reaches of the Yellow River, China[J]. Environmental Monitoring Assessment, 2007, 124(1/2/3): 277-287.