

杭州城区水域中 PAEs 分布特征及黄颡鱼 (*Pelteobagrus vachelli*)体内残留消除研究*

胡天宇¹ 胡华军¹ 韩宝瑜² 葛建^{1,2} 姚元发¹
王慧¹ 王敏君¹ 屈叶青¹ 袁萍¹

(1. 中国计量学院生命科学院 杭州 310018; 2. 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室 杭州 310018)

摘要 采用气相色谱(GC-FID)检测技术,对杭州城区水体以及黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)肌肉和脑等可食性组织中 5 种 PAEs 类化合物进行检测,确定杭州城区水体中 PAEs 分布特征,并分析了 PAEs 在黄颡鱼肌肉和脑中含量随时间动态变化规律。研究表明,杭州城区水体中 5 种 PAEs 化合物含量均较高,但每种化合物含量差异较大,其中 DEHP 含量在不同水域中含量均最高。黄颡鱼体内残留检测结果显示,5 种 PAEs 类化合物在黄颡鱼肌肉和脑等可食性组织中均有分布,其中脑和肌肉中的消除半衰期处于 17.33—32.54h 之间。结果表明,PAEs 在杭州城区不同水体中广泛分布,在鱼体肌肉和脑等可食性组织中消除较缓慢。

关键词 黄颡鱼;邻苯二甲酸酯化合物;分布特征;消除规律;气相色谱
中图分类号 X503.225

邻苯二甲酸酯类(Phthalic Acid Esters, 简称 PAEs, 别名酞酸酯)是一类重要的有机化合物,主要用于塑料增塑剂、农药、涂料、印染、化妆品、油漆和香料的生产,在自然界中普遍存在(吴平谷等, 1999; 林兴桃等, 2004; 陈珠灵等, 2007; 杨琼等, 2008)。近年来研究发现 PAEs 类化合物是一类环境内分泌干扰物,具有雌激素样活性,它可对生物的正常行为及生殖、发育相关的正常激素的合成、贮存、分泌、体内输送、结合以及清除等过程产生障碍,因此 PAEs 类化合物在环境中的富集、随食物链迁移将成为水生动物乃至人类的潜在威胁(Foster *et al*, 2000; Makoto *et al*, 2000; Van Meeuwen *et al*, 2007; Veronica *et al*, 2004)。美国国家环保局(EPA)已经将包括邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)在内的 6 种 PAEs 类列入重点控制的污染物名单中(王连生,

1995),我国优先污染物黑名单中也列出了包括 DBP 在内的 3 种 PAEs 类化合物(胡晓宇等, 2003)。

黄颡鱼(Darkbarbel Catfish, *Pelteobagrus vachelli*)又称江黄颡,属于鲇形目、鲿科、黄颡鱼属,其肉质细嫩,味道鲜美,营养丰富,具有较高的经济价值。然而近年来,水产养殖集约化技术不断深入,随后产生的由环境条件等因素引起的鱼类疾病日趋严重,尤其是水污染及水质恶化引起的疾病已经成为我国水产养殖领域一大难题。PAEs 类化合物在自然水域和养殖水域中广泛分布,在鱼体内吸收较快、分布广泛和消除缓慢(李明揆等, 2011; 葛建等, 2011);同时,PAEs 类化合物具有内分泌干扰作用以及对人类的重大影响(聂湘平等, 2007; 李玲等, 2007)。本研究首先选择杭州城区不同水域中 5 种 PAEs 类化合物作为检测对象,探索其在杭州城区不同水体的分布特征,然后选择黄颡鱼肌肉和脑等富含脂肪的可食性组织作

* 国家自然科学基金资助项目, 31100499 号, 31071744 号; 浙江省自然科学基金资助项目, Y3080255 号; 浙江省分析测试计划项目, 2011C37044 号。胡天宇, E-mail: hutianyu51@163.com; 胡华军, 同等贡献作者, E-mail: huhuajun@cjlu.edu.cn

通讯作者: 葛建, 博士, 副教授, E-mail: gejian16888@163.com

收稿日期: 2012-09-12, 收修改稿日期: 2012-11-10

为研究对象,开展 PAEs 类化合物在其中的残留消除规律研究,一方面为水生动物毒理学研究提供理论依据,同时也为水产品质量安全提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用健康黄颡鱼,体重为 (150 ± 20) g。试验前在 $1.0\text{m}\times 0.8\text{m}\times 1.0\text{m}$ 水族箱中暂养一周,水温为室温,试验期间用空气增氧机充氧,每天换水1次。

1.2 药品与试剂

邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸丁基苄酯(BBP)和邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)标准品(纯度99%以上),购自上海百灵威化学品有限公司;试验用甲醇、乙腈为HPLC级,购自杭州米克化工仪器有限公司;乙酸乙酯、正己烷、丙酮为分析纯,杭州常青化工有限公司提供。

1.3 仪器与方法

安捷伦6890气相色谱仪,氢火焰离子化检测器(FID),毛细管柱为HP-5色谱柱($0.25\mu\text{m}$, $30\text{m}\times 0.25\text{mm}$),载气为高纯氦气,燃烧气体为高纯空气和高纯氢气,载气流量为 $40\text{ml}/\text{min}$;不分流进样,体积为 $1\mu\text{l}$ 。升温程序为: 80°C 保持1min,以 $30^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 235°C ,保持15min,以 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 290°C ,保留1min,进样口温度为 280°C ,检测器温度为 300°C 。

1.4 样品的前处理

准确量取 1.0ml 水样或称取 2g 鱼肌肉、脑等生物样品匀浆液于玻璃离心管中,振荡混匀后,加入乙酸乙酯 5ml ,振荡后高速离心,取出全部上层有机相于玻璃离心管中,于水浴中氮气流吹干,准确加入 0.2ml 正己烷溶解,取 $1.0\mu\text{l}$ 进GC分析。

1.5 分析方法确证

准确称取DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP标准品 10mg 于 100ml 容量瓶中,加入一定量色谱甲醇,振荡、混匀后,定容,制得 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 的上述标准液,分别稀释为 40 、 20 、 10 、 5 、 2.5 、 1.25 、 $0.625\text{mg}/\text{L}$ 的系列标准液,弱氮气流挥发后,按照“1.4”处理后进样分析,以染毒物峰面积(Y)为纵坐标,以质量浓度(X)为横坐标作标准曲线,求出标准曲线方程和相关系数(r)。选择 1.25 、 5.00 、 $20.00\mu\text{g}/\text{g}$ 作为质控样品(QC),按照“1.4”处理后进样分析,每个浓度样品重复5次,计算方法回收率和精密度。

1.6 杭州城区水体中 PAEs 分布特征

实验人员于2012年7月对杭州城区主要水体选取具有代表性的位点,如图1所示。对水面下 5cm 处深度每隔约 50m 取水各 $8\text{—}10\text{ml}$ 装入试样玻璃瓶,共取5个样品并分别标记。将采集的水样参照“1.4”处理后进样分析,将测得的DMP、DEP、DBP、BBP及DEHP峰面积代入标准曲线方程中计算水样品中PAEs类化合物浓度,并绘制分布柱形图。

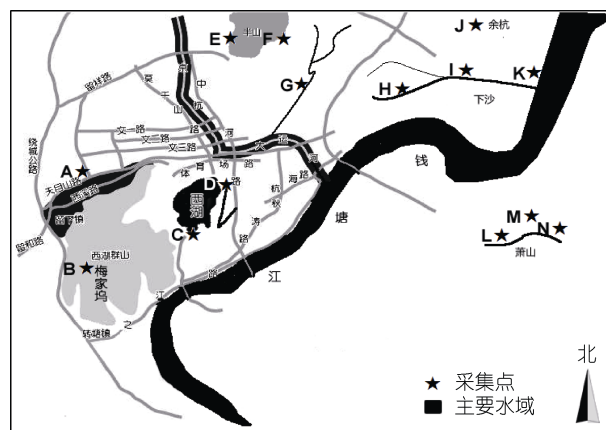


图1 杭州城区水体分布示意图

Fig.1 Sketch map of water distribution in Hangzhou city
A: 西溪湿地-访溪路路段; B: 梅家坞-梅家坞茶园; C: 西湖-苏堤; D: 贴沙河-环城北路与环城西路交叉口; E: 半山山水-半山路与康桥路交叉口; F: 虎山水库-半山国家森林公园; G: 运河-东新路路段; H: 浙江工商大学金沙港生活区-25号大街路段; I: 钱塘江环流河-文海路路段; J: 余杭-径山茶园; K: 钱塘江江水-江东路与学源街交叉口; L: 萧山-新湾镇云石围垦鱼塘; M: 萧山-新湾镇创新村河水; N: 萧山-新湾镇创新镇井水

1.7 黄颡鱼肌肉和脑组织中消除规律

采用一端光滑且有一定硬度的细塑料管,缓慢插入黄颡鱼胃中,按 $400\text{mg}/\text{kg}$ 灌入,将无回吐者保留试验。于染毒后不同时间点处死黄颡鱼,取背部肌肉和脑,每个时间点采样5尾。将所采集的样品按照“1.4”处理后进样分析,进样后将测得的DMP、DEP、DBP、BBP及DEHP峰面积代入标准曲线方程中计算样品中PAEs类化合物浓度,同时利用不同时间点黄颡鱼肌肉和脑中PAEs浓度与时间绘制浓度-时间曲线,采用线性回归方程计算消除半衰期。

2 结果与分析

2.1 样品处理和分析方法

在本试验提取方法和色谱条件下,在 $0.625\text{—}40.000\mu\text{g}/\text{g}$ 浓度范围内,线性关系良好,利用线性回

归方法计算出斜率、截距以及相关系数(表 1)。在本试验建立的样品处理方法和色谱分析条件下, DMP、DEP、DBP、BBP 和 DEHP 在水体中回收率均达到 98% 以上, 日内和日间变异系数均小于 5%。在肌肉和脑组织中的回收率均达 85% 以上, 日内和日间变异系数均小于 15%, 说明该类化合物在水体和黄颡鱼组织中回收率和精密度均符合检测要求(表 2)。

表 1 水样和肌肉中 DMP、DEP、DBP、BBP 及 DEHP 曲线方程及相关系数

Tab.1 Regression equation and correlation coefficients of DMP, DEP, DBP, BBP and DEHP in water and muscle

化合物	水样	肌肉
DMP	$Y = 0.9306X + 0.1146,$ $r = 0.9992$	$Y = 0.8997X - 0.3604,$ $r = 0.9991$
DEP	$Y = 1.1799X + 0.1913,$ $r = 0.9992$	$Y = 0.9557X + 0.1549,$ $r = 0.9992$
DBP	$Y = 1.1223X + 0.7716,$ $r = 0.9994$	$Y = 0.9090X + 0.6250,$ $r = 0.9994$
BBP	$Y = 1.1366X + 1.8552,$ $r = 0.9991$	$Y = 0.9206X + 1.5027,$ $r = 0.9991$
DEHP	$Y = 1.8198X + 0.9506,$ $r = 0.9992$	$Y = 1.4740X + 0.7700,$ $r = 0.9991$

表 2 肌肉组织中 DMP、DEP、DBP、BBP 及 DEHP 回收率和变异系数

Tab.2 Recovery and precision of DMP, DEP, DBP, BBP and DEHP in muscle tissue

化合物	添加浓度 (mg/L)	回收率(%)	精密度(%)	
			日内	日间
DMP	1.25	85.31±7.29	8.55	9.71
	5.00	88.76±7.05	7.94	7.85
	20.00	90.26±6.17	6.84	7.86
DEP	1.25	86.24±7.75	8.99	9.21
	5.00	91.21±8.01	8.78	9.89
	20.00	93.41±6.72	7.19	8.25
DBP	1.25	88.16±7.54	8.55	9.51
	5.00	90.28±9.21	9.04	10.21
	20.00	94.81±7.28	6.65	7.68
BBP	1.25	87.16±8.35	9.51	9.58
	5.00	91.28±8.71	9.04	9.54
	20.00	95.36±9.82	6.65	10.29
DEHP	1.25	87.16±8.57	9.51	9.83
	5.00	91.79±8.39	9.04	9.14
	20.00	94.88±8.72	6.65	9.19

2.2 杭州城区水体 PAEs 分布特征

PAEs 在杭州城区水体中分布广泛(图 2), 且不同水域含量差异较大, 其中 DEHP 含量最高。在梅家坞、半山和萧山新湾镇区域水体中基本包含所检测的 5 种 PAEs 类化合物。

2.3 鱼体组织中 PAEs 的代谢消除规律

根据公式: $t_{1/2} = 0.693/K_e$, 计算消除半衰期(表 3), 式中, $t_{1/2}$ 表示消除半衰期, K_e 表示消除速率常数。PAEs 类化合物在大脑和肌肉中消除半衰期处于 17.33—32.54h 之间不等, 大脑中消除的半衰期时间较肌肉中消除半衰期长, 说明 PAEs 化合物更易于在脑组织中富集和残留。这一研究结果也表明 PAEs 类化合物可能是通过干扰下丘脑—垂体—性腺轴而产生内分泌干扰作用。

3 讨论

本研究建立了一种水体和黄颡鱼体内肌肉及脑等可食性组织中 DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP5 种 PAEs 类化合物简便、快速、灵敏准确的气相色谱(GC-FID)检测方法, 并将该方法应用于杭州城区不同水体和黄颡鱼体内 5 种 PAEs 类化合物残留检测研究, 结果表明该分析方法能够满足水体和鱼体内 PAEs 类化合物的分布特征和残留消除研究。目前, PAEs 类环境激素的检测方法主要采用 HPLC、GC、GC-MS 及 LC-MS 等(Lin *et al*, 2004; Jen *et al*, 2006; Li *et al*, 2008; Rios *et al*, 2010), 由于 PAEs 脂溶性较强, 而且不同化合物极性相差较大, 故采用 HPLC 分析时, 须采用梯度洗脱方式来同时检测样品中多种化合物。由于梯度洗脱方式可引起基线漂移, 从而干扰样品分析, 导致灵敏度降低, 当检测生物样品时干扰更加明显。因此, 本研究采用 GC 来检测黄颡鱼不同组织样品中多种 PAEs, 通过改变升温程序将待测物与内源性杂质较好分离。

在建立分析方法基础上, 检测了杭州不同水域中 PAEs 类环境激素的分布特征, 同时研究 PAEs 类环境激素在黄颡鱼体内的残留消除规律, 表明此类化合物在杭州水域中分布较广泛, 而且在鱼体可食性组织肌肉、大脑中分布较多, 消除相对较缓慢, 残留期较长。同时该试验结果也表明了 5 种 PAEs 类化合物在脑组织中分布量大于在其它肌肉组织中的分布, 说明这 PAEs 类化合物易于通过机体的血-脑屏障进入脑组织, 从而干扰内分泌系统的正常生理过程。目前, 大量文献(Foster *et al*, 2000; Veronica *et al*, 2004; Van Meeuwen *et al*, 2007)显示 PAEs 类环境激素具有显著的生殖毒性, 雄激素被认为在精子发生中具有重要作用, 近年来动物实验以及临床研究提示, 过量雄激素可以导致严重少精子或者无精子症, 内源性睾酮可以引起生精细胞凋亡, 与生精细胞阻滞高度相

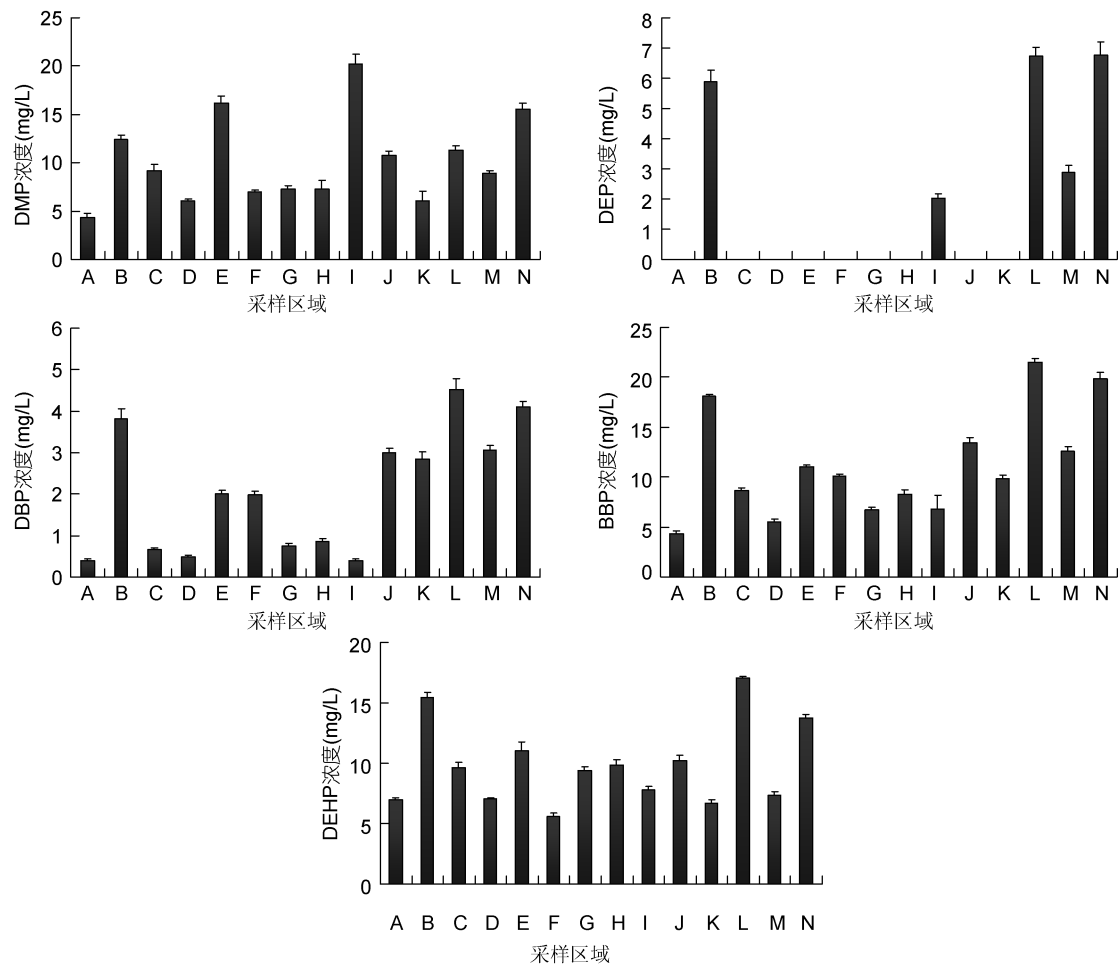


图2 杭州城区水体 PAEs 分布特征

Fig.2 The distribution characteristics of PAEs in the water of Hangzhou city

表3 PAEs 在鱼大脑和肌肉组织中的消除半衰期(h)
Tab.3 The elimination half-time (h) of PAEs in brain and muscle of fish

化合物	大脑	肌肉
DMP	19.74	17.33
DEP	24.49	18.88
DBP	31.22	28.41
BBP	27.28	24.75
DEHP	32.54	29.49

关。雄激素与精子发生的关系在于雄激素可以引起生精细胞凋亡,造成细胞重排,对精子发生起到调节作用(宋博等,2008)。因此,体内雄激素水平的变化对精子增殖、发育以及生殖能力具有重要影响。大量的研究也证实雌激素虽然在男性血清中浓度很低,但是在精液中浓度很高,体外试验也证明,雌激素可以防止男性生殖细胞凋亡(Pentikainen *et al*, 2000)。因此,PAEs 类化合物由于具有环境内分泌干扰活性,在环

境中随着食物链的迁移,可能最终在人体内产生毒性作用,从而导致人类生殖内分泌过程紊乱,引起生殖障碍。关于 PAEs 类单一化合物的毒性研究已经有大量的文献报道,然而关于 PAEs 类化合物的复合毒性的研究尚未见报道。本研究分析了 PAEs 类环境污染物在城市水体中分布特征,同时探索了其在黄颡鱼体内的残留消除规律,此研究为进一步探索 PAEs 类化合物对水生动物体内的毒理学机制及食品安全提供了理论依据,也为探索 PAEs 的复合毒性提供了技术保障。

致谢 本研究在水样采集、处理和实验鱼养殖、组织采集、匀浆以及样品前处理、GC 检测过程中,得到了杨丛军、冷贞贞、李艳、刘晓菲、李默涵、徐琪莹等同学的帮助,谨致谢忱。

参 考 文 献

王连生,1995. 环境污染化学. 北京: 化学工业出版社, 316—318

- 李 玲, 简 英, 刘贺荣, 2007. 邻苯二甲酸二丁酯对体外人肝细胞 HL-7702 毒性作用的研究. 宁夏医学院学报, 29(1): 38—40
- 李明揆, 葛 建, 林 芳等, 2011. 邻苯二甲酸二乙酯(DEP)在罗非鱼体内代谢动力学和残留研究. 海洋与湖沼, 42(1): 137—141
- 杨 琼, 张明时, 陈文生等, 2008. 气相色谱法测定食用油脂中 6 种邻苯二甲酸酯类化合物. 中国粮油学报, 23(5): 171—174
- 吴平谷, 韩关根, 王惠华等, 1999. 饮用水中邻苯二甲酸酯类的调查. 环境与健康杂志, 16(6): 338—339
- 宋 博, 蔡志明, 2008. 雄激素与精子发生的关系. 临床泌尿外科杂志, 23(7): 553—555
- 陈珠灵, 黄瑜奎, 王桂美等, 2007. 化妆品中邻苯二甲酸酯类环境激素检测方法研究. 环境科学与技术, 30(4): 43—47
- 林兴桃, 陈 明, 王小逸等, 2004. 污水处理厂中邻苯二甲酸酯类 PAEs 分析. 环境科学与技术, 27(6): 79—83
- 胡晓宇, 张克荣, 孙俊红, 2003. 中国环境中邻苯二甲酸酯类化合物污染的研究. 中国卫生检验杂志, 13(2): 9—14
- 聂湘平, 吴志辉, 李凯彬等, 2007. 不同暴露方式下酞酸酯在黄斑篮子鱼体中的富集. 中国环境科学, 27(4): 467—471
- 葛 建, 李明揆, 林 芳等, 2011. PAEs 类环境激素在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)脏器中代谢研究. 海洋与湖沼, 42(4): 549—553
- Foster P M D, Cattley R C, Mylchreest E, 2000. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. Food and Chemical Toxicology, 38(Suppl.1): s97—s99
- Jen J F, Liu T C, 2006. Determination of phthalate esters from food-contacted materials by on-line microdialysis and liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1130: 28—33
- Li X, Nie X P, Pan D B *et al*, 2008. Analysis of PAEs in muscle tissue of freshwater fish from fishponds in Pearl River Delta. Journal of Environment and Health, 25(3): 202—205
- Lin X T, Wang X Y, Chen M *et al*, 2004. Analysis of phthalic acid esters of environmental hormone in water using solid phase extraction and high performance liquid chromatography. Research of Environmental Sciences, 17(5): 71—74
- Makoto Ema, Emiko Miyawaki, Kunio Kawashima, 2000. Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Reproductive Toxicology, 14(1): 13—19
- Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen *et al*, 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 85(5): 2057—2067
- Rios J J, Morales A, Marquez-Ruiz G, 2010. Headspace solid-phase microextraction of oil matrices heated at high temperature and phthalate esters determination by gas chromatography multistage mass spectrometry. Talanta, 80(5): 2076—2082
- Van Meeuwen J A, Burg W T, Piersma A H *et al*, 2007. Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology, 45(11): 2319—2330
- Veronica Salazar, Carmen Castillo, Carmen Ariznavarreta *et al*, 2004. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. Toxicology, 205(1—2): 131—137

STUDIES ON DISTRIBUTION CHARACTERISTICS AND ELIMINATION OF PAEs IN THE WATER OF HANGZHOU AND DARKBARBEL CATFISH *PELTEOBAGRUS VACHELLI*

HU Tian-Yu¹, HU Hua-Jun¹, HAN Bao-Yu², GE Jian^{1,2}, YAO Yuan-Fa¹,
WANG Hui¹, WANG Min-Jun¹, QU Ye-Qing¹, YUAN Ping¹

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, 310018; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Hangzhou, 310018)

Abstract A GC-FID method was established for simultaneous determination of five PAEs chemicals in water and in fish tissues, which was used to study the PAEs distribution characteristics in water of Hangzhou city and elimination rule in darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli*. And the detection results showed that there were significant differences about PAEs chemicals distribution in different districts of Hangzhou and the content of DEHP was the highest. Then five PAEs chemicals were widely distributed in edible tissues of darkbarbel catfish such as muscle and brain. And their elimination half-times lie between 17.33h and 32.54h in muscle and brain. Therefore, all the results showed that five PAEs chemicals were widely distributed in the different areas of Hangzhou District and slowly eliminated from darkbarbel catfish.

Key words darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*; PAEs chemicals; distribution characteristics; elimination rule; GC-FID