

超高效液相色谱法对塑料玩具中 16 种环境雌激素的同时测定

徐靖, 陈兴宇, 朱静波, 汪欢晃

国家日用小商品质量监督检验中心, 浙江 义乌 322000

摘要: 含有环境雌激素的塑料玩具及儿童用品有可能被小孩放进口中, 如果放置的时间足够长, 就会导致雌激素的溶出量超过安全水平, 危害儿童的肝脏和肾脏, 也可引起儿童性早熟。采用超高效液相色谱法, 对塑料玩具中 16 种环境雌激素类化合物进行检测, 建立了超高效液相色谱法同时测定塑料玩具中 16 种环境雌激素的方法。采用超生萃取法进行提取, 使用乙醇作为提取溶剂, 在前处理过程中对样品进行无水硫酸钠脱水处理, 使杂质显著降低; 以乙腈-水为流动相, 考察了 5 种具有不同选择性的 UPLC 色谱柱对 16 种环境雌激素的分离效果, 结果表明, 16 种环境雌激素在 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱上获得了最为理想的分离效果。该方法的回收率为 93.6%~98.8%, RSD 为 0.5%~2.3%, 检出限达 0.11~0.76 ng。采用本方法对市售的 28 种儿童塑料玩具进行了检测, 检出的环境雌激素有 DEHP、DCHP、DMP、DNOP, 其它未检出, 其中 DEHP、DCHP 和 DMP 检出率相对较高, 分别占 32.8%、24.5%、19.5%, DNOP 则最小, 检出率为 10.4%。此方法简便、易行、分离度较好, 可作为测定塑料玩具中增塑剂环境雌激素类化合物的方法。

关键词: 超高效液相色谱; 塑料玩具; 环境雌激素

中图分类号: X132

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2010) 04-0826-04

环境雌激素类 (Environmental Estrogens, EES) 内分泌干扰物是指一类具有雌激素样作用的化合物, 能模拟或干扰天然激素的生理、生化作用, 对生物体产生各种毒效应, 包括干扰体内正常分泌物质的合成、释放、运输、结合、代谢等过程, 激活或抑制内分泌系统的调控功能, 出现生殖器异常, 雄性雌性化等^[1-3]。专家发现含有邻苯二甲酸酯的塑料玩具及儿童用品有可能被小孩放进口中, 如果放置的时间足够长, 就会导致邻苯二甲酸的溶出量超过安全水平, 危害儿童的肝脏和肾脏, 也可引起儿童性早熟。塑料玩具中邻苯二甲酸酯类增塑剂的测定方法主要为色谱法, 其中多数为气相色谱法^[4-7], 但气相色谱检测器易受其它有机物污染, 灵敏度变动较大, 对样品的前处理要求较高, 且邻苯二甲酸酯类沸点较高, 要求有较高的气化温度及柱温, 对于高沸点物质液相色谱较为优越。目前, 玩具中的有毒有害物质已越来越受到发达国家的高度重视, 欧盟、美国等发达国家对 6~8 种玩具中环境雌激素有限量要求, 国内外对玩具中环境雌激素检测方法研究的种类较少, 且检测技术尚不成熟, 本文是对塑料玩具及用品中可能存在的 16 种环境雌激素的检测技术和分析方法进行研究, 将为我国塑料玩具及用品中环境雌激素检测国家标准的建立提供依据; 准确、快速检测分析方法的开发将填补我国这方面的空白, 并具有重要的学术与创新价值。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

仪器为 ACQUITY UPLC-PDA, 以下 16 种环境雌激素标准品均为 Dr. Ehrenstorfer 公司生产。邻苯二甲酸单甲酯(MMP), 邻苯二甲酸单丁酯(MBP), 邻苯二甲酸二甲酯(DMP), 邻苯二甲酸二乙酯(DEP), 邻苯二甲酸二异丙酯(DIPP), 邻苯二甲酸二丙酯(DPRP), 邻苯二甲酸二苯酯(DPHP), 辛基酚聚氧乙烯醚(OPEO), 壬基酚聚氧乙烯醚(NPEO), 辛基酚(OP), 邻苯二甲酸二环己酯(DCHP), 壬基酚(NP), 邻苯二甲酸二己酯(DHXP), 邻苯二甲酸二庚酯(DHP), 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP), 邻苯二甲酸二辛酯(DNOP), 乙腈为色谱纯。

1.2 仪器工作条件

色谱柱: ACQUITY UPLC-BEH C₁₈ 柱(1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm); 流动相: *V*(乙腈):*V*(水)=50:50, 保持 5 min, 5~20 min 乙腈比例从 50%线性增长至 100%, 然后保持 5 min, 从 20~25 min 线性恢复至初始流动相, 然后平衡 5 min; 流速: 0.4 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测器: PDA(光电二极管阵列检测器), 检测波长为 200 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样量: 1.0 μ L。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

混合标准溶液 (100 mg $\cdot$ L⁻¹): 移取上述各单标溶液 1.0 mL 于 10.0 mL 容量瓶, 用甲醇定容。分别取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 混标溶液于 50.0 mL 容量瓶, 用甲醇定容, 摇匀, 配置成 2、4、6、8、

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目 (2009F70051); 浙江省质监系统定向委托科研项目 (20080503)

作者简介: 徐靖 (1979 年生), 男 (蒙古族), 工程师, 硕士研究生, 研究方向为检测分析。E-mail: 39487269@qq.com

收稿日期: 2009-12-28

10 mg·L⁻¹ 的系列混合标准溶液。

1.3.2 样品预处理

准确称取 0.500 0 g 已切成薄片的塑料玩具于具塞锥形瓶中, 加入 100 mL 乙醇, 放置 24 h, 超声提取, 将提取液盛有 3 g 的无水硫酸钠的漏斗过滤于 100 mL 容量瓶中, 用乙醇定容至 100 mL, 从中吸取 10 mL 溶液, 再用氮气吹干仪吹至近干后用乙醇溶解定容至 5 mL, 过 0.22 μm 滤膜 (预先用乙醇淋洗) 到样品瓶中, 待分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理溶剂的选择

玩具样品为高分子塑料样品, 种类繁多, 成份复杂, 一般多为加入增塑剂、防燃剂、着色剂溶液和填充剂等的各种形式缔合的多成分复杂体系, 很难找到能将所有高分子玩具样品溶解的溶剂。实验中比较了乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮、石油醚五种溶剂, 发现只有以乙醇作溶剂时, 既能把邻苯二甲酸酯类化合物提取出来, 又能避免其它塑料添加剂的溶出, 并能得到较理想的回收率。故选择乙醇为提取溶剂。

2.2 16 种环境雌激素化合物的标准色谱图

16 种环境雌激素化合物标准色谱图见图 1。定量检测波长为 200 nm。MMP、MBP、DMP、DEP、DIPP、DPRP、DHP、OPEO、NPEO、OP、DCHP、NP、DHXP、DHP、DEHP、DNOP 的保留时间分别是: 0.32、0.43、0.62、1.02、1.85、2.01、2.88、3.28、4.87、5.40、6.82、7.10、10.13、13.31、15.03、15.81 min。该方法各标样的保留时间有较好的重现性, 结合保留时间(±5%)和紫外光谱来进行检出峰的识别。

2.3 色谱条件的优化

2.3.1 色谱柱的选择

目前 UPLC 色谱柱的键合相主要有 5 种, 分别

为 C₁₈ 及 C₈(直链烷烃)、Shield RP₁₈ (内嵌有氨基甲酸酯极性基团, 表现出对氢键供体的特殊选择性)、Phenyl(苯基连接在 C₆ 直链的硅甲基官能团上) 和 HILIC(硅胶)。本试验分别考察了这 5 种具有不同选择性的 UPLC 色谱柱(规格均为 1.7 μm, 2.1 mm×50 mm), 即 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱、ACQUITY UPLC BEH C₈ 柱、ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ 柱、ACQUITY UPLC BEH Phenyl 柱和 ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱对 16 种环境雌激素的分离效果。结果表明, 16 种环境雌激素在 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱上获得了最为理想的分离效果。

2.3.2 流动相的选择

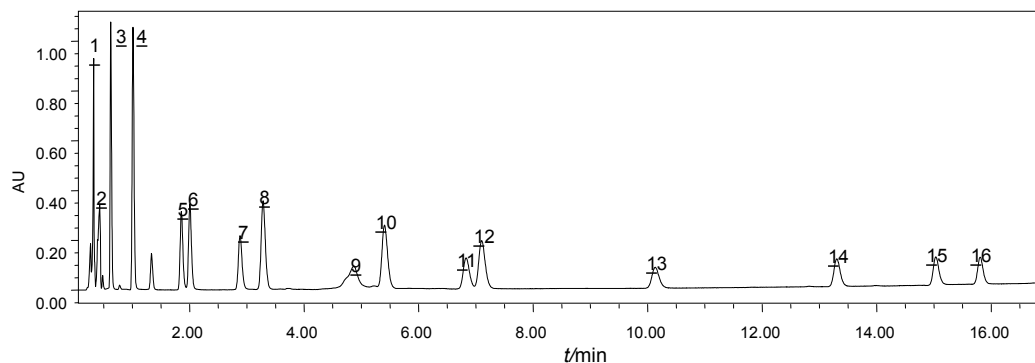
不同的流动相经常呈现出显著的分选选择性和洗脱强度的差异, 分别采用甲醇-水、乙腈-水为流动相对样品进行梯度淋洗。实验表明, 用甲醇-水作为流动相时, 随着出峰时间的增长基线直线抬高, 严重干扰测定。在低波段, 甲醇对紫外线有很强的吸收, 尤其是采用梯度淋洗程序时。而乙腈对紫外光的吸收弱, 对实验测定干扰小。因此实验选择乙腈-水为流动相。

2.4 工作曲线及检出限

在设定色谱条件下, 测定不同浓度的混合标准溶液, 其浓度(x)与峰面积(Y)相关。检测下限以噪音的 10 倍计算。16 种环境雌激素化合物的回归方程、相关系数及方法检出限见表 1。

2.5 回收率和精密度试验

采用在实际样品中加入不同添加水平的混标的方式进行回收率和精密度实验, 按 1.3.2 中的方法处理后分析, 添加混标质量浓度为 10 mg·L⁻¹, 两个添加量分别为 45 mL 和 5 mL, 每个添加水平单独测定 6 次。加标回收率和相对标准偏差结果(即精密度) 见表 2。



1-MMP, 2-MBP, 3-DMP, 4- DEP, 5- DIPP, 6- DPRP, 7- DPHP, 8- OPEO, 9- NPEO, 10-OP, 11- DCHP, 12- NP, 13- DHXP, 14- DHP, 15- DEHP, 16- DNOP

图 1 16 种环境雌激素的标准色谱图

Fig.1 The Chromatogram of 16 EEs standards

表 1 16 种环境雌激素化合物的保留时间、线性方程、相关系数和最低检出限

Table 1 Retention times, linear equations, correlation coefficients and limits of detection for 16 EEs

组分名称	保留时间/min	回归方程*	R ²	检出限/ng
MMP	0.32	$Y=4.42\times10^3x+2.72\times10^4$	0.999 9	0.24
MBP	0.43	$Y=9.37\times10^3x+2.41\times10^4$	0.999 9	0.16
DMP	0.62	$Y=6.95\times10^3x+1.90\times10^4$	0.999 9	0.24
DEP	1.02	$Y=1.39\times10^4x+3.26\times10^3$	0.999 9	0.22
DIPP	1.85	$Y=1.01\times10^3x+8.11\times10^2$	0.999 9	0.61
DPRP	2.01	$Y=2.32\times10^3x-5.68\times10^2$	0.999 9	0.76
DPHP	2.88	$Y=2.29\times10^4x-2.75\times10^2$	0.999 9	0.22
OPEO	3.28	$Y=3.32\times10^3x+2.87\times10^4$	0.999 9	0.11
NPEO	4.87	$Y=1.84\times10^4x+1.44\times10^4$	0.999 9	0.14
OP	5.40	$Y=1.61\times10^3x+2.51\times10^3$	0.999 9	0.42
DCHP	6.82	$Y=1.28\times10^4x+2.21\times10^4$	0.999 9	0.15
NP	7.10	$Y=1.03\times10^4x+1.39\times10^4$	0.999 9	0.18
DHXP	10.13	$Y=1.45\times10^4x+1.78\times10^4$	0.999 9	0.12
DHP	13.31	$Y=1.65\times10^4x+7.57\times10^3$	0.999 9	0.22
DEHP	15.03	$Y=1.40\times10^4x+4.62\times10^3$	0.999 9	0.16
DNOP	15.81	$Y=2.73\times10^3x+3.41\times10^3$	0.999 9	0.24

表 2 16 种环境雌激素化合物的添加回收率和相对标准偏差
Table 2 The recovery and repeatability for 16 EEs

组分名称	加入标准量/mL	测定量/mL	回收率/%	RSD/%
MMP	45	44.01	97.8	0.8
	5	4.71	94.2	1.1
MBP	45	44.06	97.9	0.7
	5	4.75	95.0	1.6
DMP	45	44.46	98.8	1.1
	5	4.82	96.4	1.8
DEP	45	44.01	97.8	1.3
	5	4.78	95.6	2.1
DIPP	45	43.11	95.8	0.9
	5	4.68	93.6	1.2
DPRP	45	43.83	97.4	0.6
	5	4.76	95.2	1.2
DPHP	45	44.24	98.3	1.4
	5	4.84	96.8	2.3
OPEO	45	43.83	97.4	0.7
	5	4.78	95.6	1.2
NPEO	45	43.70	97.1	0.8
	5	4.72	94.3	0.9
OP	45	44.19	98.2	1.5
	5	4.87	97.4	1.8
DCHP	45	43.92	97.6	1.0
	5	4.77	95.4	1.2
NP	45	43.56	96.8	1.6
	5	4.72	94.5	2.1
DHXP	45	43.78	97.3	0.6
	5	4.79	95.9	1.1
DHP	45	43.38	96.4	0.5
	5	4.74	94.7	0.8
DEHP	45	44.42	98.7	1.1
	5	4.82	96.5	1.8
DNOP	45	44.28	98.4	1.3
	5	4.79	95.9	2.3

2.6 样品分析

采用本方法对市售的 28 种儿童塑料玩具进行了检测, 检出的环境雌激素有 DEHP、DCHP、DMP、DNOP, 其它未检出, 其中 DEHP、DCHP 和 DMP 检出率相对较高, 分别占 32.8%、24.5%、19.5%, DNOP 则最小, 检出率为 10.4%。研究结果表明, 塑料玩具中可能存在一定的环境激素, 值得社会高度关注。

3 结论

首次建立了采用超高效液相色谱法同时测定塑料玩具中 16 种环境雌激素的方法。使用乙醇作为提取溶剂, 在前处理过程中对样品采用无水硫酸钠脱水处理, 使杂质显著降低。该方法简单、快速、准确, 适用性较强, 可应用于塑料玩具中环境雌激素类化合物的测定。

参考文献:

[1] 王蓂兰. 环境雌激素与妇女健康[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19 (2) :148-149.
WANG Yilan. Environmental estrogens and women's health [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2001, 19 (2) : 148-149.

[2] SUZUKI T,YAGUCHI K,SUZUKI S,et al.Monitoring of phthalic acid monoesters in river water by solid-phase extraction and GC-MS determination[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(18): 3757-3763.

[3] 邱东茹,吴振斌,贺峰.内分泌扰乱化学品对动物的影响和作用机制[J]. 环境科学研究, 2000,13 (6) :52-55.
QIU Dongru,WU Zhenbin,HE Feng. Effects of endocrine disrupting chemicals on animals and mechanisms of action [J]. Research of Environmental Sciences,2000, 13 (6) : 52-55.

[4] 刘芑岩,李睿,陈晓景,等. 塑料包装材料中内分泌干扰素邻苯二甲酸酯类物质的测定[J].河北大学学报 (自然科学版),2009,29(3): 284-290.
LIU Pengyan, LI Rui,CHEN Xiaojing , et al. Determination of endocrine disruptors-phthalate esters in plastic packaging materials [J]. Journal of Hebei University(Natural Science Edition), 2009, 29(3): 284-290.

[5] 刘丽,牟俊,李英,等. 聚氯乙烯塑料中增塑剂的气相色谱/质谱法分析[J].分析化学, 2002,30 (3) :289-391.
LIU Li,MOU Jun,LI Ying ,et al. Analysis of plasticizer in polyvinyl chloride plastics by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30 (3) :289-391.

[6] DING W H,TZING S H.Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas chromatography-ion trap(tandem)mass spectrometry with electron impact and chemical ioization[J]. Journal of Chromatography Bio-medical Applications, 1998, 824(1):79-90

[7] 杨左军,张伟亚,王成云,等.顶空固相微萃取/气相色谱法测定聚氯乙烯玩具在模拟唾液浸泡液中多种邻苯二甲酸二酯的溶出量[J].色谱,2003,21(6):617-620.
YANG Zuojun,ZANG Weiya,WANG Chengyun et al. Determination of the leaching quantity of phthalic diesters in polyvinyl chloride (PVC) toys dipped in simulated saliva[J].Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(6):617-620.

Simultaneous determination of sixteen kinds of EEs in plastic toys by UPLC

XU Jing , CHEN Xingyu , ZHUJingbo , WANG Huanhuang

National Center of Quality Supervision and Inspection for Commodity, Yiwu 322000, China

Abstract: Children possibly put plastic toys and children products containing environmental estrogen hormone in mouth, if this period is long enough, it will lead the release of environmental estrogen hormone exceeds to the safety level and harm to the children's liver and kidney. Finally it will lead sexual precocity. This paper uses high performance liquid chromatography to make inspection for 16 kinds of environmental estrogen hormone compounds in plastic toys and sets the method of using high performance liquid chromatography to make inspection simultaneous for 16 different kinds of environmental estrogen hormone. We use ultrasonic wave extracted method to extract and use ethanol as the solvent. In pretreatment progress, we make sodium sulphate anhydrous dehydration for samples to purify, and use acetonitrile-water as mobile phase to research separation effect of 16 kinds of environmental estrogen hormone on five selective UPLC column, finally we find the ideal separate effect of 16 kinds of environmental estrogen hormone appearing in ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column. The recovery varied from 93.6% to 98.8%, the relative standard derivation ranged from 0.5% to 2.3%. The limit of detection ranged from 0.11 to 0.76 ng. We make inspection for 28 kinds of plastic toys in the sale and detect environmental estrogen hormone concluding DEHP, DCHP, DMP, DNOP. And the detect rate of DEHP, DCHP and DMP are relatively higher, respectively accounting for 32.8%, 24.5%, 19.5%. The detect rate of DNOP is minimum, is 10.4%. This method is convenient, simple and easy to use, and have good separate effect, so it is a good choice to determine the environmental estrogen hormone compounds in plastic toys' plasticizer.

Key words: UPLC; plastic toys; environmental estrogens