

# DEHP 在冬瓜果皮和果肉的累积差异 及与果皮蜡质组成的关系

张晓蕾, 沈国明, 杜琪珍

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310012)

**摘要:**通过气相色谱-质谱联用的方法研究了不同批次广东黑皮冬瓜邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)在果皮和果肉的含量差异,同时研究了累积 DEHP 最高和最低批次冬瓜果皮蜡质的组成。结果表明:不同批次冬瓜 DEHP 在果皮和果肉中的含量均达显著性差异( $P<0.01$ ),在果皮中含量从 $(12.603\pm0.7860)\sim(37.628\pm1.7326)$ mg/kg(鲜重),而果肉含量从 $(3.642\pm0.2010)\sim(6.474\pm0.1831)$ mg/kg(鲜重)。保留时间短的蜡质在低累积 DEHP 批次冬瓜果皮中含量相对较多,保留时间长的蜡质在高累积 DEHP 批次冬瓜果皮中含量相对较多。说明蜡质的组成差异可能导致了不同批次冬瓜 DEHP 累积的差异。

**关键词:**邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;气相色谱-质谱联用;冬瓜;蜡质

**中图分类号:**S 642.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0037-04

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)是邻苯二甲酸酯(Phthalic acid ester, PAE)中最常用的化合物,主要用作塑料增塑剂、农药载体和去污剂生产原料等,进入环境的量巨大。高剂量的 DEHP 能引起睾丸和肝的损伤,并有可能致胎儿畸形、死亡和诱发肝癌<sup>[1-6]</sup>,美国 and 欧盟已相继将 DEHP 列为潜在的致癌物。美国国家环境保护署(USEPA)提出人体每天限制剂量(Reference of dose)为 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,欧盟提出的人体每日限制摄入量(Tolerable daily intake)为 $37\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重(相当于 $3\text{mg}/80\text{kg}$ 体重)<sup>[7]</sup>。DEHP 从环境迁移到农作物,通过食物链进入人体,从而对人类健康造成危害<sup>[8]</sup>。

冬瓜是我国人民喜爱的蔬菜之一。然而,研究发现,市场上出售的冬瓜可食用部分的 DEHP 含量有的竟高达 $70\text{mg}/\text{kg}$ (鲜重)<sup>[9]</sup>。冬瓜成熟之后,表面上有一层白色的蜡质,蜡质通过 ABC 转运体释放到植物表皮层<sup>[10]</sup>,而 DEHP 具有较好的脂溶性及对固体颗粒具有很强的亲和性、吸附性,因此易被蜡质吸附并通过一定的生理生化途径转运到内部组织中。试验选择了不同农贸市场购买的同一品种的不同批次的冬瓜,对冬瓜果皮及果肉 DEHP 含量进行了测定,取 DEHP 含量

最高和最低批次的冬瓜进行了果皮蜡质组分分析,以便为研究蜡质在冬瓜累积 DEHP 中的作用提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

冬瓜品种为广东黑皮冬瓜(*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. Landrace of Guangdong Sanshui),于2010年5~6月间购自杭州市不同的农贸市场(Farm produce market, FPM),取其中不同批次的冬瓜进行编号,为FPM 1~5,每批冬瓜购自4个不同的农贸市场作为重复,带回实验室后贮存于一 $80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱内,备用。DEHP 标准品(GC 色谱纯,购自 Sigma 公司),三氯甲烷、二氯甲烷、甲醇、无水硫酸钠等购自华东医药股份有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 冬瓜果皮和果肉中 DEHP 萃取** 冬瓜果皮和果肉中 DEHP 的萃取按 Du 等<sup>[9]</sup>的方法,并作如下调整:取新鲜样品 $5\text{g}$ (果皮)或 $10\text{g}$ (果肉)在研钵中匀浆,将匀浆转入 $250\text{mL}$ 锥形瓶(含 $150\text{mL}$ 二氯甲烷)轻摇 $2\text{min}$ ,过滤,滤液经冷冻干燥后,在 $100\text{mL}$ 锥形瓶中用 $1:1$ 的二氯甲烷和丙酮,室温搁置 $24\text{h}$ 进行萃取。二氯甲烷相在旋转蒸发仪中快干时,再用真空干燥。

**1.2.2 样品提取液净化及 DEHP 测定** 样品提取液净化用玻璃柱直径为 $10\text{mm}$ ,长 $300\text{mm}$ ,下端用脱脂棉堵住,然后依次装约 $100\sim120\text{mm}$ 长的中性氧化铝,约 $30\sim40\text{mm}$ 左右长的硅胶和约 $30\sim40\text{mm}$ 左右长的无水硫酸钠,上样品前先用二氯甲烷充分湿润柱子。净化的样品按 Sablayrolles 等<sup>[12]</sup>的方法用 Agilent 6890 GC/5975 MS 气相色谱/质谱联用仪(Agilent

第一作者简介:张晓蕾(1986-),女,在读硕士,研究方向为食品安全。E-mail:witersoso@163.com。

责任作者:杜琪珍(1964-),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向为食品安全及天然产物化学。E-mail:qizhendu@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20977084);浙江省自然科学基金资助项目(R507719)。

收稿日期:2011-04-28

Technologies, Palo Alto, CA, USA) 测定 DEHP。GC 测定条件为: 色谱柱用 HP-5MS 毛细管柱(长 30 m, 直径 0.25 mm, 孔径 0.25  $\mu\text{m}$ ); 升温程序: 100℃ 保持 1 min, 以 15℃/min 升至 280℃, 保持 8 min, 以 25℃/min 升至 290℃, 保持 1 min; 载气为 He, 流速为 1.0 mL/min; 不分流进样, 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。MS 测定条件为: 电子轰击 (EI) 离子源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230℃; 四极杆温度 150℃, 扫描范围 50~500 amu, 全扫描方式。溶剂切除时间 3 min。DEHP 的含量按如下 2 个校准曲线计算  $y=5\times 10^{-6}x+0.2638$  (浓度范围 1~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $R^2=0.9930$ ) 及  $y=4\times 10^{-6}x+3.4439$  (浓度范围 50~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $R^2=0.9973$ ), 所有试验均 3 次重复。

1.2.3 DEHP 回收率测定 用标准 DEHP 来检测整个萃取、净化过程中冬瓜 DEHP 的回收率。准确称取已干燥的同批次冬瓜样品 6 份于索式提取管中, 选取 5 份分别加入 1.0 mg/mL 的标准储备液 1.0、2.0、3.0、3.5、4.0 mL 于平底烧瓶中, 使其 1 份为空白对照样, 其它 5 份为加标样。按照前述样品前处理方法萃取、净化处理、上机测定。每份样品重复测定 3 次, 计算样品平均含量、平均回收率, 测定的 DEHP 回收率在 97.39%~103.85%, 符合试验要求。

1.2.4 蜡质的提取及测定 在高、低累积批次冬瓜的果皮的相同部位取 1 cm 的圆片, 立即于室温下用 5 mL 的氯仿甲醇溶液(2:1)浸提 30 s 和 24 h。蜡质测定系统同为 GC/MS (HP6890-5975), 初始柱温 120℃ 保持 2 min, 以 4℃/min 升高到 230℃, 再以速率 2℃/min 升高到 280℃ 保持 15 min, 载气 He, 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。蜡质用 GC/MS 分析确定其中的共有峰的保留时间, 实际测定样品中的保留时间的差值小于 0.1 min, 可以确定为同一种物质。并选择相对峰面积(各组分的峰面积与参考峰的峰面积的比值)  $S_r > 1.0\%$  的共有峰进行比较, 若  $S_r < 1.0\%$  时, 色谱峰的相对峰面积按零计算。各共有峰的集合作为样品的特征指纹峰。峰面积计算公式为:  $S_r = S_{ri}/S_{rs}$ , 其中  $S_{ri}$  为待测峰  $i$  的绝对峰面积,  $S_{rs}$  为参考峰的绝对峰面积。相对保留时间计算公式为:  $\alpha = t_{ri}/t_{rs}$ , 其中  $t_{ri}$  为待测峰  $i$  的绝对保留时间,  $t_{rs}$  为参考峰的绝对保留时间。浸提时间为 30 s (T1) 和 24 h (T2)。

### 1.3 统计分析

DEHP 含量采用平均值  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 15 软件分析相关数据, 当  $P < 0.01$  被认为是显著性差异。不同组份蜡质含量是以相对百分比来表示, 浸提 30 s (T1) 峰面积为  $S_{1n}$  ( $n$  代表不同保留时间的蜡质组份, 下同), 浸提 24 h (T2) 峰面积为  $S_{2n}$ , 按下列公式计算差异百分比,  $(S_{2n} - S_{1n})/S_{2n} \times 100\%$ 。以上试验均 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 DEHP 在果皮与果肉的累积差异

冬瓜果皮和果肉中 DEHP 的含量经 GC/MS 测定, 发现不同批次的冬瓜 DEHP 累积在果皮和果肉中

均存在显著差异 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。不同批次冬瓜果皮中 DEHP 的含量分别为: (12.603  $\pm$  0.7860)、(18.142  $\pm$  2.8420)、(26.693  $\pm$  1.5115)、(33.226  $\pm$  1.0640)、(37.628  $\pm$  1.7326) mg/kg (以上含量均为鲜重), 其最高批次 (FPM5) 冬瓜果皮的累积量是最低批次 (FPM1) 的 3 倍。果肉中的 DEHP 的含量分别为: (3.642  $\pm$  0.2010)、(4.016  $\pm$  0.0720)、(4.644  $\pm$  0.2220)、(5.814  $\pm$  0.1715)、(6.474  $\pm$  0.1831) mg/kg (以上含量均为鲜重), 果肉 DEHP 累积差异相对较小, 在最高与最低批次之间, 二者相差不足 2 倍。由此表明, 相对冬瓜果肉而言, 果皮中累积 DEHP 较高, 因此冬瓜去皮食用是一个合理的选择。

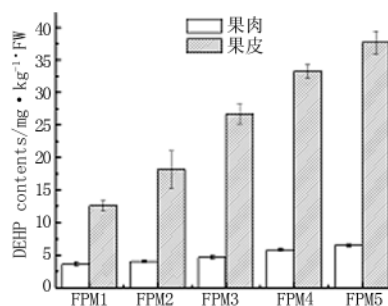


图 1 不同批次冬瓜果皮与果肉 DEHP 含量

Fig.1 DEHP content of pulp and peel of Wax gourds different farm produce markets (FPM)

### 2.2 冬瓜果皮蜡质含量差异

冬瓜果皮蜡质成分如表 1 所示, 主要 32 种蜡质分别属于脂肪族化合物、环状化合物、甾醇类化合物以及酸。浸提 24 h 与 30 s 的差异百分比, 在 DEHP 低累积批次冬瓜 (FPM1) 果皮中十四烷酸甲酯、三十四烷、Nonahexacontanoic acid (无对应中文名称)、十六碳烯、正十八烷、植烷和肉豆蔻酸异丙酯高于 DEHP 高累积批次 (FPM5), 其余 25 种均是 DEHP 高累积批次高于低累积批次。其中, 1,5,4-二布罗莫-五十四烷、正十九烷、(1-甲基十二烷基) 苯、二十烷、4-烯丙基-2-甲氧基苯酚、十八烷醇、甲基油酸酯高低累积批次冬瓜果皮中的差异百分比均为正值; 十六酸甲酯、正十八烷 Octadecane、十八烯、甲基硬脂酸、二十碳烯、正二十二烷、N-苯基-2-萘胺、正二十三烷、菲甲酸甲酯、油酸胺、二十四烷、11-Decyltetracosane (无对应中文名称)、二十七烷、木蜡酸甲酯、油酸酰胺、草酸、3-羟基对乙酰氨基酚、六硫环辛烷差异百分比在高累积批次冬瓜果皮中为正值, 在低累积批次冬瓜果皮中为负值, 而十八烯在二者中均为负值。

## 3 结论与讨论

DEHP 进入冬瓜果实可能存在如下途径: 根系从土壤吸收 DEHP 并从茎内运输到果实; 植株的叶片从大气和沉积于叶面中的灰尘吸收 DEHP, 通过冬瓜植株的茎运输到果实; 果实直接从大气或沉积于果实表面的灰尘吸收 DEHP。

表 1 高、低累积批次冬瓜果皮蜡质组成及邻苯类化合物含量

保留时间 Retention time/s	化学物质名称 Chemical name	高积累 HA/%	低积累 LA/%
15.537	十四烷酸甲酯 Methyl tetradecanoate	76.5	83.3
16.024	三十四烷 Tetratriacontane	25.0	75.0
16.658	— Nonahexacontanoic acid	25.0	66.7
17.221	十六碳稀 Z-8-Hexadecene	66.7	66.7
17.405	正十八烷 Octadecane	45.5	66.7
17.640	植烷 Phytane	21.4	81.8
18.072	肉豆蔻酸异丙酯 Isopropyl myristate	40.0	69.4
19.429	1,5,4-二布罗莫-五十四烷 1,5,4-dibromo-tetrapentacontane	33.3	19.0
19.845	正十九烷 Nonadecane	40.0	33.3
20.102	(1-甲基十二烷基)苯 (1-Methyldodecyl) benzene	66.7	35.0
20.499	十六酸甲酯 Methyl hexadecanoate	39.4	—31.0
21.551	正十八烷 Octadecane	33.3	—33.3
22.074	十八烯 1-Octadecene	—4.8	—46.7
22.217	二十烷 Eicosane	75.0	33.3
22.691	4-烯丙基-2-甲氧基苯酚 4-Allylphenol	81.3	29.4
24.168	十八烷醇 1-Octadecanol	84.8	8.3
24.541	甲基油酸酯 Methyl oleate	9.1	0.0
25.136	甲基硬脂酸 Methyl stearate	66.7	—50.0
26.578	二十碳烯 1-Eicosene	46.2	—180.0
26.705	正二十二烷 Docosane	75.0	—150.0
27.358	N-苯基-2-萘胺 N-Phenyl-2-naphthylamine	75.0	—166.7
28.819	正二十三烷 Tricosane	69.2	—60.0
29.726	菲甲酸甲酯 Methyl dehydroabietate	75.0	—125.0
30.080	油酸胺 Oleamide	85.7	—183.3
30.965	二十四烷 Tetracosane	69.2	—60.0
35.890	— 11-Decyltetracosane	75.0	—125.0
37.956	二十七烷 Heptacosane	33.3	—283.3
38.367	木蜡酸甲酯 Methyl lignocerate	33.3	—100.0
38.872	油酸酰胺 Oleamide	85.7	—183.3
40.337	草酸 Oxalic acid	68.8	—220.0
41.089	3-羟基对乙酰氨基酚 3-Hydroxyacetaminophen	25.0	—200.0
43.319	六硫环辛烷 Cyclotetracosane	5.0	—1 050.0
19.136	邻苯二甲酸(2-异丁基)酯 Diisobutyl phthalate	69.4	40.0
21.380	邻苯二甲酸(2-丁基)酯 Dibutyl phthalate	39.4	—31.0
34.572	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯 Mono-(2-ethylhexyl)phthalate	75.0	26.9

注:HA: High accumulation,高累积;LA: Low accumulation,低累积;—:表示无对应中文名称。

空气中的有机污染物可沉降于植物叶片而被叶面的角质层、气孔吸收,然后分配至邻近组织造成植物中有机污染物的累积。土壤中的有机污染物被根部吸收,再通过木质部向地上部分迁移,最终可达到叶部、植物果实并累积<sup>[12]</sup>。由于研究的作物不同,同时受环境条件的影响,所以对 DEHP 的累积途径研究结果存在争议,例如植物吸收累积 DEHP 的途径主要是从根吸收还是从叶片吸结论不一致。Schmitzer J L<sup>[13]</sup>利用同位素示踪法研究大麦(*Hordeum vulgare* L.)根、叶对 DEHP 的吸收及在体内的分布情况,表明大麦根对 DEHP 的吸收量比较小,空气中 DEHP 的蒸汽压虽然很低,但叶片中 DEHP 的含量相对于根中的含量要高,因而认为作物叶片对 DEHP 吸收占优,根系没有富集作用。曾巧云等<sup>[14]</sup>对菜心中邻苯二甲酸酯吸收途径进行了初步研究,结果表明,菜心(*Brassica rapa* ssp. *Chinensis*)根系和茎叶可以吸收累积邻苯二甲酸酯化合物,并与土壤污染程

度成正比,认为根系吸收和转运是茎、叶中邻苯二甲酸酯化合物的主要来源途径。庞金梅等<sup>[15]</sup>报道生长于塑料薄膜覆盖的土壤上的大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*)中 DEHP 含量可达 3.05 mg/kg 鲜重;而 Kato 等<sup>[16]</sup>报道生长于 DEHP 污染土壤上的 *Brassica raga* 和 菠菜(*Spinacia cleracea* L.)中测不到 DEHP; Aranda 等<sup>[17]</sup>也报道生长于施加<sup>14</sup>C 标记 DEHP 的污泥的土壤上的莴苣(*Lactuca saliva* L.)、胡萝卜、辣椒和大羊茅中用 GC/MS 方法没有测到 DEHP。造成这些不同结果的原因不得而知,很可能与土壤类型、植物生长时间以及 DEHP 浓度水平等有关。从不同的农贸市场买到冬瓜累积 DEHP 的差异也有可能与以上因素有关。此外,在试验中检测到了 Diisobutyl phthalate(DIBP)、Dibutyl phthalate(DBP)(表 1),在高累积批次中 DIBP、DBP 含量高于低累积批次,可能是由于 DEHP 降解所致。

因为冬瓜的表皮存在蜡质,因而试验中不同批次冬瓜累积 DEHP 不同,但蜡质与 DEHP 的累积是否相关,还需要深入的研究。在冬瓜表皮测定的 DEHP 累积最高、最低批次间差 3 倍,浸提的差值也在 3 倍(表 1),说明蜡质的差异可能对 DEHP 的吸收起重要作用。以往的研究表明,冬瓜叶片是吸收 DEHP 的主要器官<sup>[12]</sup>。但该试验结果证明了冬瓜果实表皮也有吸附 DEHP 的作用。植物的蜡质主要通过质膜上的 ABC 转运体转运到植物皮层的<sup>[10]</sup>,试验采集的冬瓜可能生长在不同的 DEHP 浓度的环境中,从而影响了 ABC 转运体的活性,从而导致了蜡质分泌的不同,因此致使 DEHP 累积差异。有关这个假说是否成立,应从基因组学和蛋白质组学中去寻求答案,为此,目前正在开展这方面的研究。

### 参考文献

- [1] Sathyanarayana S. Phthalates and children's health [J]. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 2008, 38: 34-49.
- [2] Swan S H. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans [J]. Environmental Research, 2008, 108: 177-184.
- [3] Rider C V, Furr J, Wilson V S, et al. A mixture of seven antiandrogens induces reproductive malformations in rats [J]. International Journal of Andrology, 2008, 31: 249-262.
- [4] Deutschle T, Reiter R, Butte W, et al. A controlled challenge study on di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in house dust and the immune response in human nasal mucosa of allergic subjects [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116: 1487-1493.
- [5] Takashima K, Ito Y, Gonzalez F J, et al. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and PPRA alpha-null mice [J]. Journal of Occupational Health, 2008, 50: 169-180.
- [6] Ito Y, Nakajima T. PPAR alpha-and DEHP-induced cancers [M]. PPAR Research, 2008: 759-716.
- [7] Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans [J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 361: 20-29.
- [8] Adibi J J, Whyatt R M, Williams P L, et al. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116: 467-473.
- [9] Du Q, Shen L, Xiu L, et al. Di-2-ethylhexyl phthalate in the fruits of *Benincasa hispida* [J]. Food Additives and Contaminants, 2006, 23: 552-555.
- [10] Pighin J A, Zheng H Q, Balakshin L J, et al. A. Lacey Samuels Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter [J]. Science, 306: 702-704.
- [11] Sablayrolles C, Montreud-Vignoles M, Benanou D, et al. Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables [J]. J Chromatogr A 2005, 1072: 233-242.
- [12] 王家文. 塑料工业区 DEHP 污染调查及其对蔬菜安全生产的影响 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2010.
- [13] Schreiber L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: New evidence for an old hypothesis [J]. Ann Bot, 2005, 95: 1069-1073.
- [14] 曾巧云, 莫测辉, 蔡全英, 等. 不同基因型菜心—土壤系统中邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯的分布特征研究 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2239-2244.
- [15] 庞金梅, 段亚利, 池宝亮, 等. DEHP 在土壤和白菜中的残留及毒性分析 [J]. 环境化学, 1995, 14(3): 239-242.
- [16] Kato K, Nakaoka T, Ikeda H. Contamination of Phthalic acid esters in vegetables. Kanagawa-Ken Eisei Kenkyusho Kenkyo Hokoku, 1980, 67 (Japan); Chem. Abstr, 1981, 95, 60034K.
- [17] Arandan J M, Oconnor G A, Eiceman G A. Effects of sewage sludge on bis-(2-ethylhexyl)phthalate uptake by plant [J]. Journal of Environmental Quality, 1989, 18: 45-50.

## The Differences of DEHP Accumulation in Wax Gourd Peel and Pulp and Relationship with Waxy Composition in Peel

ZHANG Xiao-lei, SHEN Guo-ming, DU Qi-zhen

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310012)

**Abstract:** The present study investigated the differences of DEHP accumulation in peel and pulp of the same breed of different batches of Guangdong black peel wax gourd (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) fruit by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), meanwhile, we analyzed waxy composition in DEHP accumulation of the maximum and minimum batches of wax gourd. The results indicated that the peel of wax gourd accumulated more DEHP than pulp, and all batches of wax gourd were statistically significant ( $P < 0.01$ ), DEHP accumulated from  $(12.603 \pm 0.7860)$  mg/kg to  $(37.628 \pm 1.7326)$  mg/kg (fresh weight, FW) in the peel of wax gourd, while DEHP accumulated from  $(3.642 \pm 0.2010)$  mg/kg to  $(6.474 \pm 0.1831)$  mg/kg in the pulp of wax gourd only. Short retention time wax appeared more in low accumulative batch of wax gourd, and long retention time wax appeared more in high accumulative batch of wax gourd. Present investigation showed that differences of waxy composition may lead to the accumulation of DEHP differences in wax gourd.

**Key words:** DEHP; GC-MS; wax gourd; waxy composition