

全氟辛酸和全氟辛烷磺酸经大鼠离体皮肤吸收实验

曹培, 田金凤, 杨新军, 闫洪涛*

摘要: [目的] 探讨全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)是否能体外经皮吸收及其吸收特征。[方法] 采用 Franz 扩散装置, 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFOA 和 PFOS 的混合溶液(1:1)作为供体液, 用 HPLC-MS 测定两种化合物的单位面积 SD 大鼠离体皮肤的累积渗透量, 分别计算其稳态渗透速率、渗透滞后时间和渗透系数。[结果] 各透过时间点受体液中均可检测到 PFOA 和 PFOS; PFOA 和 PFOS 的 12 h 累积渗透量分别为 (4.97 ± 1.80) 、 (1.76 ± 1.06) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 稳态渗透速率分别为 (0.48 ± 0.19) 、 (0.16 ± 0.06) $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, 渗透滞后时间分别为 (0.31 ± 0.18) 、 (0.50 ± 0.06) h, 渗透系数分别为 $(11.48 \pm 4.51) \times 10^{-2}$ 、 $(3.17 \pm 1.22) \times 10^{-2}$ cm/h 。[结论] PFOA 和 PFOS 均能够经皮吸收, 前者稳态渗透快于后者, 渗透系数大于后者, 渗透滞后时间明显小于后者。该研究确定了 PFOA 和 PFOS 的体外经皮吸收特征, 为暴露量评定和危险性评价提供了有意义的基础研究数据。

关键词: 全氟辛酸; 全氟辛烷磺酸; 经皮吸收; 渗透系数

In Vitro Experiment on Percutaneous Absorption of Perfluorooctanoate (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) CAO Pei, TIAN Jin-feng, YANG Xin-jun, YAN Hong-tao* (School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035, China). *Address correspondence to YAN Hong-tao; E-mail: htyan@wzmc.net

Abstract: [Objective] To study the percutaneous penetration of perfluorooctanoate acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) as well as its absorption characteristics through excised rat skin *in vitro*. [Methods] Using finite dose of 10 $\mu\text{mol/L}$ PFOA and PFOS mixed solution as body fluids combined with Franz diffusion cells and HPLC-MS method, the differences of accumulative permeating amounts between PFOA and PFOS were measured, and their steady-state penetration rates, lag time and permeability coefficients were calculated. [Results] PFOA and PFOS could be detected in receptor fluids at each time point, the calculated PFOA and PFOS cumulative permeation amounts at 12 h, steady-state penetration rates, lag time, permeability coefficients were (4.97 ± 1.80) and (1.76 ± 1.06) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, (0.48 ± 0.19) and (0.16 ± 0.06) $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, (0.31 ± 0.18) and (0.50 ± 0.06) h, $(11.48 \pm 4.51) \times 10^{-2}$ and $(3.17 \pm 1.22) \times 10^{-2}$ cm/h respectively. [Conclusion] PFOA and PFOS were able to conduct percutaneous absorption, the formers penetrated at a faster and higher rate with significant shorter lag time. The study identified the characteristics of PFOA and PFOS percutaneous absorption, provided basic research data for exposure and risk assessment.

Key Words: perfluorooctanoate acid; perfluorooctane sulfonate; percutaneous absorption; permeability coefficient

全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)和全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是全氟有机碳的代表性化合物,因其具有热稳定性、化学稳定性以及疏油疏水等特性而被广泛应用于泡沫灭火剂、杀虫剂、石油化工、皮革、纺织、洗洁精等数百种工业和日用消费品的生产。调查显示,世界范围内的环境介质以及多种生物体内均存在 PFOA 和 PFOS 污染^[1-2]。该类化合物的化学结构极为稳定,在环境及生物体内难于降解排除,可远距离迁移,具有生物放大效应、胚胎发育与生殖毒性、免疫毒性、神经毒性、致癌性等全身系统多种毒性作用^[3-6],并可引起生物体行为学的改变^[7],近年来已引起国内外学者的

普遍关注。

目前已知 PFOA 和 PFOS 可经过消化道和呼吸道吸收进入体内,但能否经皮吸收还不清楚^[2],尚未见国内外此类研究报道。在工业生产或日常生活中,手臂等裸露部位会直接接触含有 PFOA 和 PFOS 的物质,为其经皮吸收提供了可能的暴露条件,因此进行 PFOA 和 PFOS 的经皮吸收研究是十分必要的。本研究拟以大鼠皮肤为实验材料进行体外经皮吸收实验研究,以探讨 PFOA 和 PFOS 是否能够经皮吸收及其吸收特征。旨在丰富对其暴露途径的认识,为人群暴露量评定、危险性评价以及防护措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

98%PFOA 和 99%PFOS(德国 Augsburg 公司);色谱级甲醇和乙腈(德国 Merk 公司);色谱级乙酸铵(美国 Tedia 公司);碳酸氢钠和氯化钠(上海新宝精细化工厂);四丁铵硫酸盐

[基金项目]温州市科技局重点科研项目(编号:Y20070039),温州医学院人才引进启动基金项目(编号:QTJ05027)

[作者简介]曹培(1984-),女,硕士研究生;研究方向:环境卫生和毒理学;E-mail: caopeiapple@163.com

[*通信作者]闫洪涛副教授;E-mail: htyan@wzmc.net

[作者单位]温州医学院环境与公共卫生学院,浙江 温州 325035

(TBAHS), 色谱级甲基叔丁基醚 (MTBE), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 均购自美国 Alfa Aesar 公司。TT-6(B) 型透皮吸收仪 (天津正通科技有限公司); 高效液相色谱、质谱联用仪 (HPLC-MS, 德国布鲁克公司)。

1.2 实验动物及离体皮肤制备

雄性 SD 大鼠, 重约 300 g, 由温州医学院实验动物中心提供。脱颈处死大鼠, 将皂粉、 Na_2S 和滑石粉按 1 : 3 : 7 混合, 用水调成糊状脱毛^[8], 剥离腹部皮肤, 去除皮下脂肪, 浸于生理盐水, 4℃ 保存, 次日使用。

1.3 体外经皮吸收实验

离体皮肤固定于扩散池, 角质层面向供体池, 真皮层面向受体池。实验前后均用万能电表测定皮肤电阻, 电阻不低于 $(3.94 \pm 0.27) \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ 表明皮肤无破损^[9], 供体池内加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 PFOA 和 PFOS 混合标准溶液 (1 : 1) 2 mL, 受体池加 37℃ 的 PBS (pH=7.4) 5.5 mL 和一磁力搅拌子 (直径 3 mm, 长度 6 mm), 电磁搅拌速度为 700 r/min, 37℃、循环水流、进行经皮吸收实验。实验中用封口膜封住受体池口 (并用针头扎几个小孔, 保持内外压力平衡), 防止溶液的蒸发。分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 h 定时抽取 0.5 mL 的受体池液体 (受体液), 同时补充等量 37℃ 的 PBS。

1.4 受体液处理

0.5 mL 受体液中加入 0.5 mol/L 的 TBAHS 1.0 mL 和 0.25 mol/L 的碳酸氢钠缓冲溶液 2.0 mL, 充分混合后, 加入 5.0 mL MTBE 充分混合 20 min 进行萃取^[10]。离心后, 收集上层 MTBE 相, 重复萃取一次, 两次萃取液合并后用氮气吹干, 色谱级甲醇定容至 0.5 mL, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 有机相滤膜过滤后进样 HPLC-MS 定量分析。

1.5 HPLC-MS 测定条件

液相色谱用色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (内径 2.1 mm, 长度 150 mm, 粒径 $5 \mu\text{m}$), 流动相: 乙腈和 10 mmol/L 醋酸铵溶液; 按如下梯度洗脱: 4 min 内乙腈由 20% 上升至 55%, 而后 6 min 内升至 80%, 3 min 内重新回复到 20%, 平衡至少 6 min, 流速 0.3 mL/min , 柱温 40℃。质谱电离源: 电喷雾电离负源 (ESI-), 喷雾器压力为 172.4 kPa, 氮气流量为 7 L/min , 雾化温度 350℃, 毛细管电压为 3500 V。质谱选择性 PFOA 和 PFOS 监测离子质荷比分别为 413 和 499 的带负电准分子离子。进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。

1.6 工作曲线的制定

用磷酸盐缓冲液 (PBS) 分别稀释 1 mmol/L 的 PFOA 和 PFOS 混合溶液至 0.02、0.10、0.20、1.00 及 $2.00 \mu\text{mol/L}$, 分别从中各取 0.5 mL 至 5 支用甲醇清洗过的离心管, 按“1.4”受体液处理中方法萃取后, 进样 HPLC-MS 检测, 将检测峰面积和浓度进行线性回归分析。

1.7 结果处理

计算两次平行实验各扩散池的单位面积累积渗透量 $Q (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$, 以不同时间的 Q 对时间 t 作图, 该图的直线部分斜率和在横轴的截距分别为稳态渗透速率 J_s 和渗透滞后时间 (h), 以稳态渗透速率除以供体池溶液起始浓度即为渗透系数 K_p , 不同时间点的累积渗透量占供给量的百分比为透过率 P_t 。详见下面公式:

$$Q=1/A(V \cdot C_i+1/2\sum C_{i-1})$$

$$K_p=J_s/C_{供}$$

$$P_t=Q_t/Q_{供}$$

式中 A 为皮肤有效透过面积 0.64 cm^2 , V 是受体池体积, C_i 为第 i 个采样点测定目标物的浓度, $C_{供}$ 为供体池溶液起始浓度, Q_t 为对应时间点的累积渗透量, $Q_{供}$ 为供给量。

1.8 统计分析

数据服从正态分布, 故采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 各指标间比较用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 回收率和线性相关系数

受体液中加入一定量的标准溶液, 经测定, 得 PFOA 和 PFOS 的平均回收率分别为 $95\% \pm 9.64\%$ ($n = 6$) 和 $103.5\% \pm 8.65\%$ ($n = 6$), PFOA 和 PFOS 的线性相关系数 r 分别为 0.9976 和 0.9963。

2.2 PFOA 和 PFOS 的累积渗透量比较

0.5 h 内 PFOA 和 PFOS 的累积渗透量之间差异无统计学意义 ($t = 0.824, P > 0.05$); 1 h 及以后各时间点 PFOA 的累积渗透量均明显大于 PFOS, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 PFOA 和 PFOS 各时间点的累积渗透量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Cumulative permeation amount comparison between PFOA and PFOS (Mean $\pm$ SD, $n=8$)

取样时间 (h) Sampling time (h)	累积渗透量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) Cumulative permeation amount ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	PFOA	PFOS
0.5	0.25 ± 0.13	0.18 ± 0.03
1.0	$0.43 \pm 0.20^*$	0.19 ± 0.04
2.0	$0.76 \pm 0.38^*$	0.22 ± 0.06
4.0	$1.83 \pm 0.77^*$	0.44 ± 0.29
6.0	$2.50 \pm 1.04^*$	0.80 ± 0.40
8.0	$3.62 \pm 1.42^*$	1.13 ± 0.70
10.0	$4.32 \pm 1.64^*$	1.34 ± 0.80
12.0	$4.97 \pm 1.80^*$	1.76 ± 1.06

[注]*: 与 PFOS 比较 (Compared to PFOS), $P < 0.05$ 。

2.3 各时间点 PFOA 和 PFOS 的透过率的比较

1 h 及以后各时间点 PFOA 的累积渗透量占供给量的百分比透过率大于 PFOS, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 PFOA 和 PFOS 在各时间点的透过率 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of penetrated percentage between PFOA and PFOS at each time point (Mean $\pm$ SD, $n=8$)

取样时间 (h) Sampling time (h)	透过率 (%) Penetrated percentage (%)	
	PFOA	PFOS
0.5	1.93 ± 1.00	1.15 ± 0.19
1.0	$3.32 \pm 1.55^*$	1.22 ± 0.26
2.0	$5.87 \pm 2.94^*$	1.41 ± 0.38
4.0	$14.14 \pm 5.95^*$	2.82 ± 1.86
6.0	$19.32 \pm 8.04^*$	5.12 ± 2.56
8.0	$27.98 \pm 10.97^*$	7.23 ± 4.48
10.0	$33.39 \pm 12.68^*$	8.57 ± 5.12
12.0	$38.41 \pm 13.91^*$	11.26 ± 6.78

[注]*: 与 PFOS 相比 (Compared to PFOS), $P < 0.05$ 。

2.4 PFOA 和 PFOS 的渗透参数比较

PFOA 的稳态渗透快于 PFOS ($t = 4.257$, $P < 0.01$); 两者渗透系数的比较差异有统计学意义 ($t = 4.704$, $P < 0.01$), PFOA 的渗透系数大于 PFOS; 而其滞后时间小于 PFOS ($t = -2.677$, $P < 0.01$), 见表 3。

表 3 PFOA 和 PFOS 的渗透参数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Comparison of penetration parameters between PFOA and PFOS
(Mean $\pm$ SD, $n=8$)

渗透物 Infiltration	稳态渗透速率($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$) Steady-state penetration	渗透系数($\times 10^{-3}\text{cm}/\text{h}$) Permeability coefficient	滞后时间(h) Lag time
PFOA	$0.48 \pm 0.19^{**}$	$11.48 \pm 4.51^{**}$	$0.31 \pm 0.18^{**}$
PFOS	0.16 ± 0.06	3.17 ± 1.22	0.50 ± 0.06

[注]**: 与 PFOS 比较 (Compared to PFOS), $P < 0.01$ 。

3 讨论

本研究结果发现 PFOA 和 PFOS 能够透过离体大鼠皮肤吸收, 且经皮渗透能力较高。一般而言, 经皮吸收是外源化学物质进入体循环的主要途径之一, 该途径是由外源性化学物质穿过表皮的角质层到达活性表皮来实现的。角质层细胞和角质层细胞间隙是角质层的主要结构, 但由于角质层细胞扩散阻力大, 外源性物质主要是透过角质层细胞间隙到达活性表皮的^[11]。考虑 PFOA 和 PFOS 既不是强极性亦不是非极性化学物, 属于偏中等极性的物质^[12], 推测可能是通过角质层细胞间的脂质双分子层的水性区和疏水区实施扩散的。但从 PFOA 比 PFOS 更易经皮吸收的实验结果 (PFOA 稳态渗透快于 PFOS、渗透系数大于 PFOS、滞后时间小于 PFOS), 结合 PFOA 在同等条件下的溶解度大于 PFOS、极性稍高于 PFOS 的性质, 推测角质层细胞的脂质双分子层的水性区在 PFOA 体外经皮吸收的过程中发挥了更大的作用。外源性化学物质透过皮肤的另一途径是皮肤表面的一些附属腺, 虽然总截面积仅占皮肤总面积的 0.1%~1.0%, 但仍不失为其透过皮肤的通路。此外, 实验条件下皮肤两侧都处在液体环境中, 长时间浸泡可造成皮肤角质层水化^[13], 从而促进了 PFOA 和 PFOS 经皮渗透。其现实意义是职业暴露者在劳动环境下, 由于出汗而使得皮肤的含水量增加, 从而加速其经皮吸收。由于 PFOA 和 PFOS 不易挥发, 可使皮肤长时间暴露, 增加了经皮吸收的概率。

FASANO 等^[14]通过体外经皮吸收实验发现, PFOA 的铵盐—十五代氟辛酸铵盐 (ammonium perfluorooctanoate, AFPO) 48 h 透过大鼠背部皮肤和人体皮肤的累积渗透率分别为 1.44% 和 0.048%。本实验结果显示, PFOA 和 PFOS 在 12 h 透过大鼠腹部皮肤的累积渗透率就已经分别达到了 38.41% 和 11.26%。可见 PFOA 和 PFOS 的经皮吸收能力高于 AFPO。本实验结果, PFOA 在 12 h 的累积透过率约为 PFOS 的 3.4 倍, 可见 PFOA 经皮肤吸收的概率要高于 PFOS, 提示 PFOA 是人群健康的高风险因素。特别是对于较高浓度暴露的职业人群, PFOA 的经皮吸收应当引起足够的重视, 在作业过程中进行适当的皮肤防护是十分必要的。本实验采用的是体外经皮吸收实验, 无法反映在体皮肤的血管系统和酶系统等对 PFOA 和 PFOS 的通透性和在皮肤中两种物质代谢的影响, 因此进一步实施在体经皮吸收实验研究是必要的。

本研究通过体外经皮吸收实验证实 PFOA 和 PFOS 能够经皮吸收, 丰富了对摄入途径的认识, 为暴露量评定和危险性评价提供了新的基础资料, 也为预防措施提供了新的依据。

参考文献:

- [1] MEESTERTS RJ, SCHRODER HF. Perfluorooctane sulfonate—a quite mobile anionic anthropogenic surfactant, ubiquitously found in the environment[J]. Water Sci Technol, 2004, 50(5): 235-242.
- [2] KÄRRMAN A, Van BAVEL B, JARNBERG U, et al. Perfluorinated chemicals in relation to other persistent organic pollutants in human blood[J]. Chemosphere, 2006, 64(9): 1582-1591.
- [3] 叶露, 吴玲玲, 蒋雨希, 等. PFOS/PFOA 对斑马鱼 (Danio rerio) 胚胎致毒效应研究[J]. 环境科学, 2009, 30(6): 1727-1732.
- [4] 董光辉, 郑丽, 金一和, 等. 全氟辛烷磺酸 (PFOS) 经口染毒对 C57BL/6 小鼠脾脏 T 细胞亚群 CD4⁺/CD8⁺ 的影响[J]. 环境科学学报, 2009, 29(1): 181-185.
- [5] 刘利, 金一和, 王烈, 等. 出生前后全氟辛烷磺酸 (PFOS) 暴露对大鼠额叶皮质中 IGF- I、IGF- I R 和 IGFBP-2 mRNA 水平的影响[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(2): 190-196.
- [6] 于红瑶, 刘利, 刘薇, 等. PFOS 致大鼠肝脏氧化损伤及对脂褐质含量影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(5): 578-579.
- [7] Van GOSSUM H, BOTS J, SNIJKERS T, et al. Behaviour of damselfly larvae (Enallagma cyathigerum) (Insecta, Odonata) after long-term exposure to PFOS[J]. Environ Pollut, 2009, 157(4): 1332-1336.
- [8] 袁惠, 浦跃朴, 尹立红, 等. 对苯二胺氧化产物对小鼠经皮肤染毒的亚慢性毒性[J]. 环境与职业医学, 2002, 19(5): 290-292.
- [9] DAVIES DJ, WARD RJ, HEYLINGS JR. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(3): 351-358.
- [10] HANSEN KJ, CLEMEN LA, ELLEFSON ME, et al. Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices[J]. Environ Sci Technol, 2001, 35(4): 766-770.
- [11] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 22-23.
- [12] 金一和, 丁梅, 翟成, 等. 长江三峡库区江水和武汉地区地面水中 PFOS 和 PFOA 污染现状调查[J]. 生态环境, 2006, 15(3): 486-489.
- [13] BARICHELLO JM, YAMAKAWAN, KISYUKU M, et al. Combined effect of liposomalization and addition of glycerol on the transdermal delivery of isosorbide5-nitrate in rat skin[J]. Int J Pharm, 2008, 357(1/2): 199-205.
- [14] FASANO WJ, KENNEDY GL, SZOSTEK B, et al. Penetration of ammonium perfluorooctanoate through rat and human skin in vitro[J]. Drug Chem Toxicol, 2005, 28(1): 79-90.

(收稿日期: 2009-06-29)

(编辑: 徐新春; 校对: 王晓宇)