

文章编号:1000-582X(2009)06-716-05

污水处理中雌酮的定量分析

阳 春¹, 胡碧波¹, Wheatley Andrew²

(1. 重庆大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400030;

2. 英国拉夫堡大学 土木系, 莱斯特郡, LE11 3TU)

摘要:采用酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒定量分析了某采用生物脱氮活性污泥工艺的污水厂中的原水、一级处理出水、二级处理出水、尾水和出水口下游受纳河水中的雌酮浓度, 分析方法的定量检测限为 0.5 ng/L。ELISA 分析中增加的凝胶色谱净化步骤可降低 E1 检测值 73.0% 的假阳性, 使其检测结果平均值从液相色谱-飞行时间质谱联用(HPLC-MS(TOF))的对照分析结果平均值的 1.52 倍降为 1.15 倍。ELISA 分析检测值的假阳性与水样的污染程度呈正相关。

关键词:污水分析; 内分泌干扰物; 雌酮; 酶联免疫吸附检测; 液相色谱飞行时间质谱检测

中图分类号: X830.2

文献标志码: A

Quantification of estrone in sewage treatment by an enzyme-linked immunosorbent assay kit

YANG Chun¹, HU Bi-bo¹, WHEATLEY Andrew²

(1. Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China;

2. Department of Civil and Building Engineering, Loughborough University, Leicestershire LE11 3TU, UK)

Abstract: An estrone(E1) enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit is used for the quantification analysis of E1 concentrations in sewage and river water samples. Raw water, primary treatment effluent, secondary effluent, final effluent and downstream river water samples are collected from a sewage treatment works using the nitrifying activated sludge process. The analysis detection limit is 0.5 ng/L. The average absolute concentrations measured by ELISA are 1.52 times higher than those measured by parallel liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry(HPLC-MS(TOF)) without gel chromatography. These ELISA results are reduced to 1.15 times the HPLC-MS(TOF) results with gel chromatography cleanup. False positives of ELISA analysis are decreased by 73.0% and are positively correlated with the sewage strength.

Key words: sewage analysis; endocrine disrupting chemicals; estrone; ELISA; HPLC-MS(TOF)

污水厂尾水中的类固醇雌激素(以下简称雌激素)内分泌干扰物在 ng/L 的浓度水平即可干扰水

生生物生殖系统的正常工作模式,造成以鱼为代表的水生生物雌性化,使雄性生物体内产生高于正常

收稿日期:2009-02-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50808183);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2008BB7047);英国环保署国家示范项目

作者简介:阳春(1975-),男,重庆大学博士,主要从事内分泌干扰物方向的研究,(E-mail)eric.chun.yang@163.com。

雄性水平的卵黄蛋白原,且雄性腺体萎缩、功能退化^[1]。当水环境中的雌激素浓度高于干扰阈值则会影 响水生生物性腺的正常功能,破坏性别比例,影响其种群密度,进而通过食物链对生态系统构成威胁。人类女性青春期提前、男性生殖能力下降也被认为与这些物质有关^[2]。以雌酮(E1)、雌二醇(E2)和乙炔基雌二醇(EE2)为代表的高雌情活力雌激素^[3],已被欧盟在 118 中内分泌干扰物中列为优先研究的物质,亦即将被英国环境质量标准限制排放^[4]。在这 3 种雌激素中,E1 是 E2 降解的中间产物,且大量存在的 E1 结合物在污水输送和处理过程中的分解释放,使 E1 成为浓度变化最大,且对水生生物雌情化现象最重要的内分泌干扰物^[5-7]。

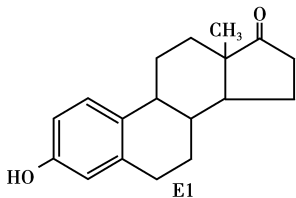


图 1 雌酮的化学结构

由于雌激素在污水和自然水体中的痕量存在以及污水介质的高度复杂性,目前尚无标准分析方法。以液/气相色谱-质谱联用为代表的分析法报道最多,但昂贵的分析费用、复杂的分析设备和专业的分析技术要求制约了它们在污水分析领域的常规使用^[8]。免疫检测技术因其灵敏度高、费用低廉和操作简单,已较多地应用于污水中雌激素的定量分析。在英国“内分泌干扰物质在污水处理过程的去除国家示范项目”中,寻找一种可靠经济的日常分析方法也是该项目的重要一项^[4]。ELISA 应用于污水介质虽有报道^[9-10],但并无与液质联用对不同污水样的平行分析比较,因而难以评估其分析的准确性。研究的特点在于采用 ELISA 试剂盒定量检测了污水厂原水经处理至排放各阶段的 E1 浓度,并通过加标回收试验和与 HPLC-MS(TOF) 的对照深入研究了 ELISA 试剂盒对各种污水介质中 E1 的定量分析效果,还研究了在水样预处理阶段增加凝胶色谱净化步骤对分析可靠性的影响。研究结果可为 ELISA 这一简便灵敏的分析方法更广泛地应用于检测污水和天然水体中的雌激素水平提供依据。

1 实验部分

1.1 材料和试剂

检测的目标物质为天然类固醇雌激素 E1。高

纯度 E1 粉末标准试剂购自 Sigma。雌激素标准储备溶液按照 1.0 g/L 配置,溶剂为甲醇。工作溶液则用液相色谱级纯水根据需要将储备溶液稀释制成。最后的标准溶液中所含甲醇浓度不超过 0.1%。液相色谱级纯水、甲醇、丙酮、正己烷及二氯甲烷均来自 Fisher Chemicals。

1.2 水样

采集了英国中部某生物脱氮活性污泥处理工艺污水处理厂的原水、一级处理出水、二级处理出水、尾水和出水口下游 100.0 m 受纳河水总计 5 个水样,并采用 1 个纯净水样作为空白参照。这 6 个待测样分别加入不同浓度的 E1 标准样,制成加标样,总计 12 个水样。每个水样体积为 3.0 L,分别用于常规 ELISA 分析(1.0 L),增加凝胶色谱预处理后的 ELISA 分析(1.0 L)以及 HPLC-MS(TOF)分析(1.0 L)。各水样加入的 E1 浓度详见表 1。

自动取样机在各取样点从 7:00 到 19:00 每小时取样 1 次,制成 12.0 h 混合样。棕色玻璃取样瓶中预先加入盐酸和硝酸铜并在低温避光条件下运输以保证 E1 在取样和样品运送过程中无降解损耗^[11]。

1.3 水样的预处理

为防堵塞,除标准样和空白样,其它水样先使用离心分离机分离(3 000 r/min),再在真空泵的抽吸下用 0.45 μm 滤膜(Whatman)过滤上清液。因 E1 具有较强的憎水性,离心分离沉淀物和过滤拦截物均用甲醇清洗,并将清洗液加至滤液中以避免分析物的损失^[12-13]。

第 1 步固相萃取采用 C18 小柱(Alltech SupercleanTM, 600 mg)。萃取前依次通过 5.0 mL 甲醇和 10.0 mL 纯净水以活化柱体。当所有水样通过吸附柱后,用 5.0 mL 纯净水清洗柱体并继续抽吸 1.0 min,然后再用 5.0 mL 正己烷清洗柱体。清洗后的萃取柱用 5.0 mL 二氯甲烷洗提,并收集至小试管中。小试管置于 40.0~50.0 °C 的恒温水浴并用氮气吹干,后加入 1.0 mL 甲醇将附着物重新溶解。

第 2 步固相萃取采用氨基小柱(Alltech SupercleanTM, 300 mg),依次通过 5.0 mL 甲醇和 5.0 mL 纯水活化柱体。重新溶解的 1.0 mL 甲醇溶液通过柱体后用另一干净小试管收集,然后再用 5.0 mL 甲醇清洗柱体,并收集清洗液获得 6.0 mL 甲醇溶液。该溶液经氮气吹干和重溶解后,制成 1.0 mL 10% 甲醇溶液待分析。

需进一步净化处理的水样则在经过了 2 次固相

萃取并吹干之后,将残留物溶于 2.5 mL 二氯甲烷,并以 1.0 mL/min 的速度通过凝胶色谱(Polymer Labs Plgel 50A, 30 °C),总运行时间为 13.5 min,收集 9.0~12.0 min 的馏分吹干。

采用 ELISA 试剂盒分析的样品吹干后溶解于 100.0 μ L 甲醇,并配置成 1.0 mL 10% 甲醇溶液待分析。采用 HPLC-MS(TOF)分析的样品吹干后则溶解于 0.2 mL 甲醇:水 = 1:9 的溶液中待分析。

1.4 ELISA 试剂盒分析

ELISA 试剂盒用于分析仅经过 C18 和氨丙基固相萃取处理的水样,以及经过 2 次固相萃取后再经过凝胶色谱净化的水样。采用的 Ecologiena[®] E1 ELISA 试剂盒(日本 EnviroChem 公司)对雌激素的定量检测基于特定单一克隆抗体对 E1 的识别。根据生产商所提供的方案,首先将抗体-酶共轭物粉末溶解于缓冲液配制成共轭物溶液并将 100.0 μ L 加至微孔中,然后再加入 100.0 μ L 含 E1 的水样(或 E1 标准液)并充分均匀混合。将 100.0 μ L 混合液再转移至已固化了抗体的微孔中,并在室温下(18~25 °C)培养 1.0 h。弃掉培养液的固化微孔板经多次洗液清洗后各孔加入 100.0 μ L 显色液,并在室温(18.0~25.0 °C)下培养 30.0 min。各孔加入反应中止液 100.0 μ L 后结束反应,此时微孔板中水样从加入显色液后的蓝色变为黄色。显色反应中止之后,

用微孔板分析仪(Thermo Electron Corporation)获得标准液和水样的吸光度,标准曲线用四参数对数曲线拟合,分析软件为 SoftmaxPro V2.6 和 GraphPad Prism。水样中的 E1 检测浓度为三重分析的平均值。最低定量分析浓度为 0.5 ng/L,该值由试剂盒最低工作浓度 50.0 ng/L 和浓缩倍数 1 000 确定。

1.5 HPLC-MS(TOF) 分析

对 E1 的对照定量分析采用英国环保署在示范项目中采用的 HPLC-MS(TOF)分析方法^[14-15]。HPLC-MS(TOF)设备为 Agilent 1100 系列,反相运行模式。

HPLC 条件:Luna Phenyl Hexyl 柱(2.0 mm \times 150 mm, 3.6 μ m, 60 °C),流速 0.3 mL/min,样品注入量 100 μ L。流动相 A 为纯水,流动相 B 为 95% 甲醇+5% 丙酮。梯度洗脱方式为:0.0~0.5 min, 95%A+5%B;0.5~1.0 min, 80%A+20%B;1.0~12.0 min, 60%A+40%B;12.0~14.0 min, 20%A+80%B;14.0~14.5 min, 95%A+5%B。

MS 条件:APPI 负离子模式。雾化气压 40 psig,扫描模式为 100~800 amu,流速 0.2 mL/min, EIC1 269.15~269.16, E1=269.154 7。

2 结果与讨论

ELISA 检测的各水样 E1 浓度,分析的相对标准偏差和加标回收率详见表 1。

表 1 各水样及加标样未经过和经过凝胶色谱净化处理之后的 ELISA 分析结果

水样	加标浓度 /(ng \cdot L ⁻¹)	未经色谱净化的分析结果			经过色谱净化的分析结果		
		测试浓度 /(ng \cdot L ⁻¹)	相对标准 偏差/%	加标回 收率/%	测试浓度 /(ng \cdot L ⁻¹)	相对标准 偏差/%	加标回收率 /%
原水	0.0	72.6 \pm 8.9	12.3	152.4	54.5 \pm 4.9	9.0	118.3
	30.0	118.2 \pm 16.8	14.2		89.9 \pm 7.4	8.2	
一级出水	0.0	67.7 \pm 7.3	10.8	147.1	51.1 \pm 4.3	8.4	112.8
	30.0	111.8 \pm 17.5	14.0		84.7 \pm 5.7	6.7	
二级出水	0.0	31.7 \pm 2.5	7.9	133.6	24.9 \pm 1.3	5.2	109.5
	15.0	51.7 \pm 4.2	8.1		41.3 \pm 2.2	2.3	
尾水	0.0	15.0 \pm 1.1	7.3	112.5	12.9 \pm 0.8	6.2	98.7
	5.0	20.6 \pm 1.7	8.3		17.8 \pm 1.2	6.7	
河水	0.0	4.1 \pm 0.3	7.3	109.2	3.2 \pm 0.1	3.1	92.6
	2.0	9.6 \pm 0.8	8.4		7.8 \pm 0.2	2.6	
纯净水	0.0	<0.5		>95.0	<0.5		>95.0
	2.0	1.9 \pm 0.0	0.0	<100.0	1.9 \pm 0.0	0.0	<100.0

在所有水样中 E1 均被检出,其浓度随处理程度的增加而降低。分析结果中,未经色谱净化的水样加标回收率均高于 100%,且水样的污染程度越高,回收率越高。此外,分析结果的相对标准偏差也随着样品污染程度的增加而增加。这表明水样污染程度的增加会降低分析结果的准确性和精确性,造成假阳性结果。若样品预处理中增加色谱净化,则 ELISA 分析的加标回收率和相对标准偏差均得到有效降低。相对标准偏差降至 $<10\%$ 。原水、一级出水和二级出水水样的加标回收率相对于未经过色谱净化的分析结果减少了超过 30%,而尾水和河水水样的回收率也减少了近 15%。这表明色谱净化步骤有效地增加了分析的准确性和精确性。

为更准确地评价 ELISA 试剂盒对污水处理过程中 E1 的定量分析,还将 ELISA 的分析结果与 HPLC-MS(TOF) 的分析结果进行了对照,液质联机的分析样均经过了色谱净化。2 组 ELISA 分析的结果与 1 组 HPLC-MS(TOF) 的分析结果对照见图 2。结果显示,如果未经过色谱净化,ELISA 检测值普遍高于 HPLC-MS(TOF) 检测值,而经过色谱净化之后 2 种检测的 E1 浓度结果则非常接近。污染程度较小的水样如尾水和河水 2 种分析的接近度最高。

研究还对 ELISA 分析和 HPLC-MS(TOF) 分析的结果进行了相关性分析,结果详见图 3。若样品仅进行 2 次固相萃取处理,则 ELISA 检测值平均为 1.52 倍 HPLC-MS(TOF) 检测值。若再经过色谱净化,则 ELISA 检测值平均为 1.15 倍 HPLC-MS(TOF) 检测值,E1 的假阳性检测值降低了 73%。进一步表明了色谱净化可以有效提高分析准确度和精度。经过净化之后的 ELISA 分析结果 87% 为真实的 E1 浓度值,而 13% 为其他与 E1 结构相似的化学物质与发生的交叉反应所致。

对该厂水样的检测浓度可知,经一级处理之后 E1 去除率 $<10\%$,经过二级处理之后去除率为 $50\% \sim 60\%$,而经过深度处理之后去除率可以提高到 70% 以上。这一检测结果表明雌酮存在于该污水处理厂各个处理阶段,虽然经过了深度处理且雌酮的去处率超过了 70%,但是在排放的尾水和河流下游 100.0 m 处中仍有 12.9 ng/L 和 3.2 ng/L 的雌酮存在。根据英国国家环保署示范项目中对雌情活性干扰阈值的规定(3 ng/L,折算为当量雌酮浓度)^[4],在该水厂出水口至下游 100.0 m 范围内的鱼类仍然存在雌情化的风险。

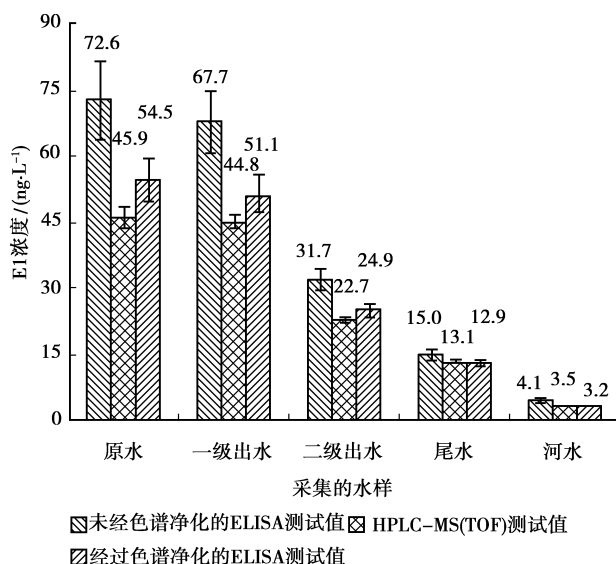


图 2 ELISA 检测值与 HPLC-MS(TOF) 检测值的比较

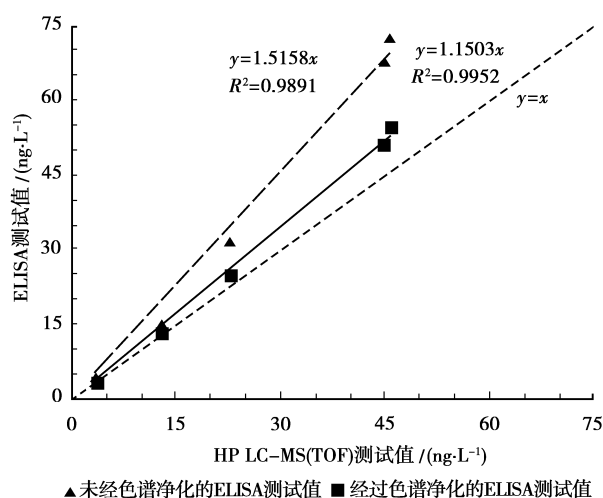


图 3 E1 浓度的 ELISA 检测值与 HPLC-MS(TOF) 检测值的相关性分析曲线

3 结 论

1) ELISA 分析结果与 HPLC-MS(TOF) 分析结果的比较表明,ELISA 试剂盒具有较高的分析灵敏度,经过复杂的水样预处理后可定量检测污水中的大于 0.5 ng/L 浓度的 E1,且与 HPLC-MS(TOF) 分析结果相近。与采用色质联用的化学分析法相比,在分析成本、分析时间和技术要求上具有优势。

2) 污水样中较多的干扰物质降低了 ELISA 分析的准确度和精确度,干扰程度与水样污染程度成正比。

3) 预处理中增加的凝胶色谱净化步骤可以降低 ELISA 分析中交叉反应造成的 E1 检测值假阳性,

增加 ELISA 分析的准确度、精确度和可靠性。

参考文献:

- [1] JOBLING S, NOLAN M, TYLER CR, et al. Widespread sexual disruption in wild fish [J]. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32(17): 2498-2506
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors: report of WHO Scientific Group [R]. Geneva: WHO, 2002.
- [3] DESBROW C, ROUTLEDGE EJ, BRIGHTY GC, et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening [J]. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32(11):1549-1558.
- [4] UK WATER INDUSTRY RESEARCH LIMITED. Scoping study for a National Demonstration Programme on EDC removal: report of UK WIR [R]. London: UK WIR, 2005.
- [5] 阳春, 胡碧波, 张智. 类固醇雌激素在生活污水处理中的去除过程[J]. *中国给水排水*, 2008, 24(10): 11-15.
YANG CHUN, HU BI-BO, ZHANG ZHI. Removal of steroid oestrogens during sewage treatment [J]. *China Water and Wastewater*, 2008, 24(10):11-15.
- [6] DASCENZO G, CORCIA AD, GENTILI S, et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities [J]. *The Science of the Total Environment*, 2003, 302(1-3):199-209.
- [7] JOHNSON AC, WILLIAMS RJ, SIMPSON P, et al. Water difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(1):194-202.
- [8] LAGANA A, BACALONI A, LEVA IE, et al. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters [J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 501(1):79-88.
- [9] SUZUKI Y, MARUYAMA T. Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge [J]. *Water Research*, 2006, 40(5):1061-1069.
- [10] FUKUHARA T, IWASAKI S, KAWASHIMA M, et al. Adsorbability of estrone and 17 β -estradiol in water onto activated carbon [J]. *Water Research*, 2006, 40(2):241-248.
- [11] 阳春, 胡碧波, 郑怀礼, 等. 雌酮、雌二醇与乙炔基雌二醇在污水样中的稳定性研究[J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(8): 967-971.
YANG CHUN, HU BI-BO, ZHENG HAI-LI, et al. Stability tests of oestrone, 17 β -oestradiol and 17 α -ethynyl oestradiol in sewage samples [J]. *Chemical Research and Application*, 2008, 20(8):967-971.
- [12] BRAGA O, SMYTHE G A, SCHAFFER A I. Steroid estrogens in ocean sediments [J]. *Chemosphere*. 2004, 61(6): 827-833.
- [13] UK Water Industry Research Limited. Endocrine disruptors in sewage sludge-a comparison of analytical methods: report of UK WIR [R]. London: UK WIR, 2003.
- [14] HUO C, HICKLEY P. Anglian Water's approach to the EDC Demonstration Programme as an early start company [C]// The Chartered Institution in Water and Environmental Management. CIWEM conference: Endocrine Disrupting Chemicals in the Water Environment. Biocity, Nottingham UK, 30th March, 2006. London: CIWEM, 2006.
- [15] YANG C. Removal of steroid oestrogen in wastewater treatment [D]. UK:UK Loughborough University, 2007.

(编辑 陈移峰)