

文章编号:1000-582X(2009)12-1446-05

## 聚联苯乙烯和石墨化碳黑固相萃取用于污水 中雌激素的定量分析

阳 春<sup>1</sup>, 胡碧波<sup>1</sup>, Andrew WHEATLEY<sup>2</sup>

(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:**研究了聚联苯乙烯(SDB)和石墨化碳黑(GCB)固相萃取用于样品前处理对污水样中雌二醇(E2)和乙炔基雌二醇(EE2)的酶联免疫吸附检测(ELISA)定量分析可靠性的影响。采用 GCB 固相萃取可对 E2 和 EE2 进行分步洗提, 相比 SDB 固相萃取在污水厂原水样中 E2 和 EE2 的加标回收率分别从 181.4% 和 122.6% 降至 113.3% 和 109.4%, 相对标准偏差均降至 10.0% 以下; 在污水厂尾水样中 E2 的加标回收率则分别从 144.2% 降至 93.5%, 而 EE2 无明显变化, 相对标准偏差均从接近 10.0% 降至 8.0% 以下。利用液相色谱-飞行时间质谱联用对污水厂原水样的平行分析的结果表明采用 GCB 固相萃取可比采用 SDB 固相萃取降低 38% 的 E2 检测假阳性和 15% 的 EE2 检测假阳性。

**关键词:**污水分析; 雌二醇; 乙炔基雌二醇; 固相萃取; 酶联免疫吸附检测

中图分类号: X830.2

文献标志码: A

## Comparison of styrene divinyl benzene and graphitized carbon black solid phase extraction in estrogen quantification in sewage

YANG Chun<sup>1</sup>, HU Bi-bo<sup>1</sup>, Andrew WHEATLEY<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China;

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

**Abstract:** This paper studies the effect of styrene divinyl benzene (SDB) solid phase extraction (SPE) and graphitized carbon black (GCB) SPE on the quantification of estradiol (E2) and ethinyl estradiol (EE2) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The recovery rates of E2 and EE2 in spiked raw sewage samples drop from 181.4% and 122.6% to 113.3% and 109.4% respectively with the relative standard deviations dropped to below 10.0%. The recovery rate of E2 in final effluent decreases from 144.2% to 93.5% whilst the rate of EE2 has marginal variation, and the relative standard deviation drops from approximately 10.0% to lower than 8.0%. The estrogen levels measured by ELISA are collated with those measured by parallel liquid chromatography coupled with time of flight mass spectrometry (HPLC-MS

收稿日期: 2009-07-03

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, CSTC2009BB030); 英国环保署国家示范项目

作者简介: 阳春(1975-), 男, 重庆大学留英博士, 主要从事水环境中内分泌干扰物的研究, (E-mail) c. yang@cqu.edu.cn.

(TOF)). GCB SPE with step elution is able to separate E2 and EE2 from the matrices thus reduces the cross reaction rate. GCB SPE decreases 38% and 15% false positives for E2 and EE2 ELISA analysis compared with SDB SPE. ELISA quantification with this improved GCB SPE pretreatment has the advantages of low cost and time-saving over the chemical analysis.

**Key words:** sewage analysis; estradiol; ethinyl estradiol; solid phase extraction; ELISA

生活污水中以雌酮(E1)、雌二醇(E2)和乙炔基雌二醇(EE2)为代表的类固醇雌激素(以下简称雌激素)内分泌干扰物,是水生生物雌情化的主要原因。女孩青春期提前、成年女性较高的生殖系统疾病发病率以及成年男性生殖力下降也被认为与这类物质长期接触产生的干扰有关<sup>[1]</sup>。在污水厂尾水中浓度仅为1ng/L水平的雌激素即可对雄性鱼类的生殖系统构成干扰产生阴阳鱼,从而破坏种群繁殖能力,进而对生态系统构成威胁。雌激素已被众多西方国家的环保部门列为重点研究和控制的内分泌干扰物质,而英国更是启动了“内分泌干扰物质在污水处理过程的去除”国家示范项目,拟将污水厂尾水中的E1、E2和EE2通过环境质量标准限制排放,其年平均排放总雌激素浓度(以E2当量浓度计)为1 ng/L<sup>[1-2]</sup>。

由于雌激素在环境水体中的痕量存在以及污水介质的复杂性,定量分析采用液/气相色谱-质谱联机的化学分析法最多,但费用昂贵、设备复杂且技术要求高,制约了在污水常规分析中的应用<sup>[3-4]</sup>。在英国的示范项目中亦针对可靠经济的常规分析方法展开了相关研究<sup>[2]</sup>。免疫检测技术分析灵敏度高、检测费用低和使用操作简单,已较多地应用于污水中雌激素的定量分析<sup>[3]</sup>。ELISA试剂盒已商业化生产,是目前采用最多的免疫检测法<sup>[5-9]</sup>,但交叉反应造成的假阳性检测结果在一定程度上影响了其可靠性<sup>[8-9]</sup>。因此有针对性的改进样品前处理方法降低假阳性结果对于ELISA的应用具有重要意义。有研究表明在样品固相萃取后增加凝胶色谱净化可以降低73.0%的E1假阳性检测值<sup>[7]</sup>,但仍不能有效地降低E2和EE2因化学结构相似(见图1)造成的较高交叉反应率<sup>[8-9]</sup>。EE2和E2相比在杂环羟基碳原子上增加了一个乙炔基,因此其水溶性、生物降解性和极性均远低于E2,这两种雌激素的物理和化学性质详见表1<sup>[10]</sup>。

表1 雌二醇和乙炔基雌二醇的物理和化学性质

雌激素	水溶性/ (mg · L <sup>-1</sup> )	辛烷/水分离 系数/Log K <sub>ow</sub>	亨利系数 /(atm · m <sup>3</sup> · mol <sup>-1</sup> )
E2	12.96	3.94	6.3 × 10 <sup>-7</sup>
EE2	4.83	4.15	6.3 × 10 <sup>-11</sup>

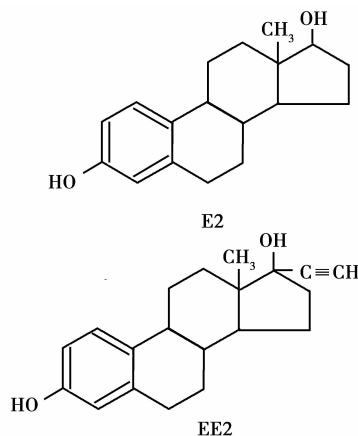


图1 雌二醇和乙炔基雌二醇的化学结构

污水介质中雌激素分析的水样前处理多采用C18和SDB固相萃取<sup>[3]</sup>,而GCB固相萃取对于复杂介质中痕量物质亦有较高的效率,能对混合液目标物质进行逐次提取<sup>[11-12]</sup>。针对水样前处理中E2和EE2有效分离问题,比较了GCB固相萃取和SDB固相萃取对不同污水介质中E2和EE2的ELISA定量分析可靠性的影响,并利用液相色谱-飞行时间质谱联用(HPLC-MS(TOF))进行了对照分析,为有效提高ELISA的分析准确性提供了一种新方法。研究的结果可为ELISA试剂盒降低假阳性检测结果以及广泛地应用于污水和环境水体介质中雌激素浓度的定量检测提供依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料和试剂

高纯度的天然雌激素E2和合成雌激素EE2粉末标准试剂购自Sigma UK。E2和EE2标准储备溶液按照1.0 g/L配置,溶剂为甲醇。工作标准溶液则用超纯水将储备溶液稀释制成,超纯水(18.2 MΩ · cm)由Milli-Q纯水仪制得。色谱级正己烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇及二氯甲烷等试剂均购自Fisher Chemicals(UK)。

### 1.2 水样的采集

在英格兰西北部某滴滤池工艺污水厂进水口和出水口使用自动取样机连续5天每天取1次瞬时样,获取了5个较高污染的原水样和5个较轻污染

的尾水样。原水样为 5.0 L, 分别用于加标样 (1.0 L) 和不加标样 (1.0 L) 经 SDB 和 GCB 两种固相萃取前处理后的 ELISA 分析以及 HPLC-MS (TOF) 的对照分析 (1.0 L)。尾水样则为 4.0 L, 仅用于加标样 (1.0 L) 和不加标样 (1.0 L) 经 2 种固相萃取前处理后的 ELISA 分析。

空白样采用 Milli-Q 超纯水, 加标空白样则在超纯水样中加入雌激素标准样, 水样的体积同采集水样。加标采集水样和加标空白样中加入的雌激素标准样浓度详见表 2 和表 3。

预先加入保存剂的棕色玻璃取样瓶盛装水样后置于冰盒中, 在避光条件下运输以保证雌激素在取样和样品运送过程中无降解损耗<sup>[13]</sup>。

### 1.3 水样的前处理

除空白样和标准样外的其它水样均首先使用离心分离机分离 (3 000 rpm) 以避免堵塞, 后在真空泵的抽吸下采用 Whatman 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤离心分离获得的上清液。因 E1 和 EE2 易吸附于固相<sup>[10, 14-15]</sup>, 离心分离沉淀物和过滤拦截物均用甲醇清洗, 并将清洗液回加至滤液以避免可能存在的 E2 和 EE2 损失<sup>[7, 13]</sup>。

SDB 固相萃取第一步采用 SDB 小柱 (Alltech Superclean<sup>TM</sup>, 300 mg)。萃取前依次通过 5.0 mL 乙酸乙酯、5.0 mL 甲醇和 5.0 mL 超纯水以活化柱体。当待测水样通过吸附柱后, 用 5.0 mL 纯净水清洗柱体, 然后用 8.0 mL 二氯甲烷洗提, 洗提液经氮气吹干后用正己烷定容至 2.0 mL。第二步采用氨丙基小柱 (Alltech Superclean<sup>TM</sup>, 300 mg), 萃取前两次通过 2.0 mL 乙酸乙酯/正己烷溶液 (3/7) 以活化柱体, 待 2.0 mL 正己烷溶液通过  $\text{NH}_2$  小柱后用 4.0 mL 乙酸乙酯/丙酮溶液 (5/5) 洗提。

GCB 固相萃取采用 GCB 萃取小柱 (Alltech

Superclean<sup>TM</sup>, 1 000 mg), 萃取前依次通过 10.0 mL 二氯甲烷、10.0 mL 甲醇和 20.0 mL 超纯水。待水样通过萃取柱后用 5.0 mL 超纯水和 10.0 mL 甲醇清洗。对 EE2 的洗提采用 10.0 mL 甲醇/二氯甲烷 (7/3) 溶液, 对 E2 的洗提则在完成对 EE2 洗提后再用 10.0 mL 甲醇/二氯甲烷 (5/5) 溶液洗提。

固相萃取洗提液用小试管收集后在恒温水浴 (40.0~50.0  $^{\circ}\text{C}$ ) 中加热并辅以氮气吹干。采用 ELISA 分析的样品吹干后配制成 1.0 mL 10% 甲醇溶液待分析; 采用 HPLC-MS (TOF) 分析的样品则配制成 0.2 mL 溶液 (甲醇: 水 = 1: 9) 中待分析。

### 1.4 ELISA 试剂盒分析

采用日本 EnviroChem 公司的 Ecologiena<sup>®</sup> E2 和 EE2 ELISA 试剂盒。该产品对 E2 和 EE2 的定量检测基于特定单一克隆抗体对雌激素的识别, 利用抗体-酶共轭物与雌激素对抗体的竞争, 并通过显色反应和酶标仪获得雌激素浓度与吸光度之间的四参数对数标准曲线, 从而达到定量分析的目的。试剂盒最低定量分析浓度为 0.5 ng/L, 水样中的雌激素检测浓度为水样三重分析的均值。分析方法依据生产商所提供的方案, 具体步骤详见 ELISA 用于污水中雌酮的定量分析<sup>[7]</sup>。

### 1.5 HPLC-MS(TOF) 分析

雌激素的对照定量分析采用 HPLC-MS (TOF) 的委托分析, 该方法在英国环保署示范项目中采用<sup>[9]</sup>, 其液相色谱和飞行时间质谱仪的分析检测条件及方法详见 E1、E2 和 EE2 在污水样中的稳定性研究中所采用的分析方法<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

污水厂原水和尾水样中 E2 和 EE2 浓度的 ELISA 检测值及加标回收率详见表 2 和表 3。

表 2 污水厂原水和尾水样 E2 浓度的 ELISA 检测值和加标回收率

水样	加标浓度 /( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	SDB 固相萃取后的 ELISA 分析结果			GCB 固相萃取后的 ELISA 分析结果		
		测试浓度 /( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	相对标准 偏差/%	加标回 收率/%	测试浓度 /( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	相对标准 偏差/%	加标回 收率/%
原水	0.0	24.7—44.8 (37.9 $\pm$ 4.9)	12.9	181.4 $\pm$ 7.7	17.7—35.4 (27.8 $\pm$ 2.7)	9.9	113.3 $\pm$ 6.1
	15.0	52.6—72.7 (65.4 $\pm$ 6.7)	14.2		35.4—51.6 (44.7 $\pm$ 4.9)	9.2	
尾水	0.0	1.8—4.9 (3.3 $\pm$ 0.3)	9.5	144.2 $\pm$ 7.3	1.8—4.5 (2.9 $\pm$ 0.2)	6.9	93.5 $\pm$ 4.9
	2.0	4.9—7.8 (6.2 $\pm$ 0.6)	9.7		4.2—6.5 (4.8 $\pm$ 0.3)	6.3	

注: 1. 括号中的浓度为平均浓度; 2. 相对标准差和加标回收率均为平均值。

表 3 污水厂原水和尾水样 EE2 浓度的 ELISA 检测值和加标回收率

水样	加标浓度 /(ng·L <sup>-1</sup> )	SDB 固相萃取后的 ELISA 分析结果			GCB 固相萃取后的 ELISA 分析结果		
		测试浓度 /(ng·L <sup>-1</sup> )	相对标准 偏差/%	加标回 收率/%	测试浓度 /(ng·L <sup>-1</sup> )	相对标准 偏差/%	加标回 收率/%
原水	0.0	(3.8-5.9) 4.7±0.5	12.3	122.6±7.4	(3.4-5.0) 4.1±0.4	9.7	109.4±2.1
	5.0	(9.9-12.0) 10.9±1.1	10.1		(9.5-11.1) 10.2±1.0	9.8	
尾水	0.0	(0.5-0.9)* 0.7±0.0		95.2±3.3	(0.5-0.8)* 0.7±0.0		96.8±4.5
	2.0	(7.5-10.1) 8.7±0.8	9.2		(2.4-2.9) 2.6±0.2	7.7	

注:1. 括号中的浓度为平均浓度; 2. 相对标准差和加标回收率均为平均值。

\* 有 1 个样结果为阳性,但浓度小于检测下限。

在所有水样中 E2 均被检出,有 1 个尾水样的 EE2 检测呈阳性,但浓度低于检测下限因而无法准确获知其浓度。水样经两种固相萃取前处理后获得的加标回收率表明,采用 GCB 固相萃取得到的 E2 和 EE2 加标回收率要低于采用 SDB 固相萃取的加标回收率,在干扰程度较高的原水样中,E2 的回收率从 118.4% 降至 113.3%,EE2 则从 122.6% 降至 109.4%。在污染物浓度较低的尾水样中,EE2 的回收率接近,但采用 SDB 固相萃取的结果 144.2% 仍然高于采用 GCB 固相萃取的回收率 93.5%。这表明采用 GCB 固相萃取法降低了来自介质的干扰以及 E2 和 EE2 之间的交叉反应率。

为更准确地评价两种固相萃取对 E2 和 EE2 ELISA 试剂盒分析可靠性的影响,还将原水样的 ELISA 的分析结果与 HPLC-MS(TOF)分析结果进行了对照和相关性分析,分析图详见图 2 和图 3。

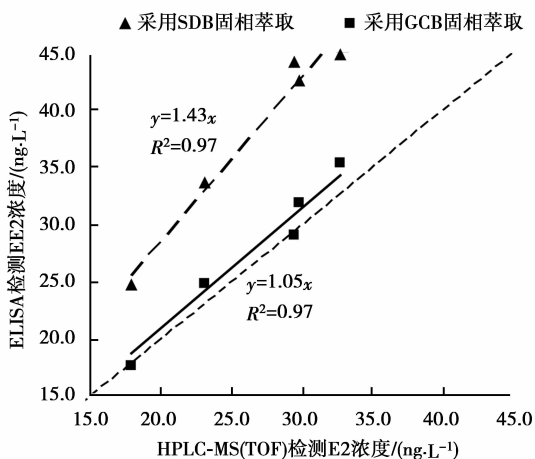


图 2 经 SDB 和 GCB 固相萃取前处理后 E2 的 ELISA 检测值与 HPLC-MS(TOF)检测值的相关性分析曲线

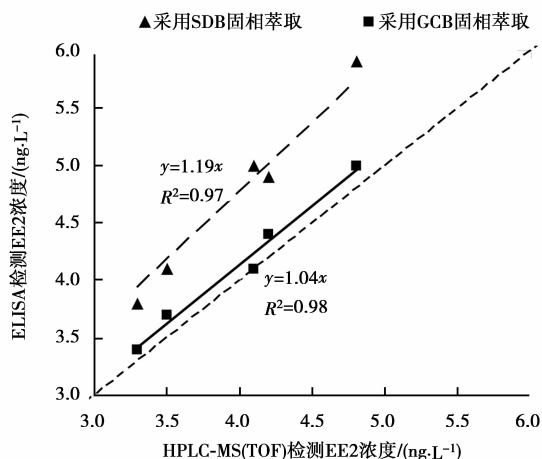


图 3 经 SDB 和 GCB 固相萃取前处理后 EE2 浓度的 ELISA 检测值与 HPLC-MS(TOF)检测值的相关性分析曲线

E2 分析的结果显示,采用 GCB 固相萃取,5 个水样的平均检测浓度为液质联用检测值 1.05 倍,存在 5% 的假阳性值。而采用 SDB 固相萃取,水样平均检测浓度则为液质联用检测值 1.43 倍,假阳性检测达到 43%。因而采用 GCB 可以较采用 SDB 降低 38% 的假阳性。EE2 的分析结果与 E2 相似,但 EE2 经过 SDB 固相萃取后的 ELISA 分析的假阳性为 19%,低于 E2,而采用 GCB 也可以降低 15% 的 EE2 检测假阳性。

采用 GCB 固相萃取柱可以利用石墨化碳黑的强吸附性,有效地吸附水相介质中中等极性的 E2 和 EE2 于柱体。在洗提过程中,通过调整甲醇和二氯甲烷的比例获得不同极性的洗提液,可以有效地将洗提液中的 EE2 和 E2 分离,并首先将对 E2 ELISA 分析影响最大的 EE2 提取,从而降低了这两种物质的交叉反应率,达到了降低假阳性检测结果的目的。

在实际使用中,由于 GCB 萃取小柱的价格要高

于 SDB,因此采用 GCB 固相萃取会在萃取步骤增加费用,但与采用增加了凝胶色谱净化的 ELISA 试剂盒分析相比,步骤更为简单、对 E2 和 EE2 分析的结果更为可靠。虽然采用 GCB 固相萃取前处理的 ELISA 分析仍然存在假阳性结果,达不到液质联用分析的可靠度和准确度,但综合分析费用和对设备的要求,ELISA 分析在日常分析中仍具有一定的竞争优势。

### 3 结 论

1)采用 GCB 固相萃取和分步洗提的样品前处理方法与采用常规的 SDB 固相萃取相比,污水厂原水样中 E2 和 EE2 的加标回收率分别从 181.4% 和 122.6% 降至 113.3% 和 109.4%,相对标准偏差均降至 10.0% 以下;在污水厂尾水样中 E2 的加标回收率则分别从 144.2% 降至 93.5%,而 EE2 则几乎无变化,相对标准偏差均从接近 10.0% 降至 8.0% 以下。

2)采用 GCB 固相萃取和分步洗提的样品前处理方法可以较采用常规的 SDB 固相萃取降低 38% 的 E2 ELISA 分析的假阳性和 15% 的 EE2 ELISA 分析假阳性。

3)通过与液质联机平行分析结果的对照,两种方法结果相近。而改进固相萃取法的 ELISA 试剂盒分析灵敏度较高、可靠性较好,可以用于定量检测污水中大于 0.5 ng/L 浓度的 E2 和 EE2,且在分析成本、分析时间和技术要求上具有优势。

致谢

研究获得了英国联合公用公司(United Utilities, Plc.)和日本 EnviroChem 公司技术人员的大力支持,在此深表谢意。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] UK Water Industry Research Limited. Scoping study for a National Demonstration Programme on EDC removal: report of UK WIR [R]. London: UK WIR, 2005.
- [3] LOPEZ DE, ALDA MJ, BACELO D. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters [J]. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2001, 371:437-447
- [4] YAMAMOTO A, KAKUTANI N, YAMAMOTO K, et al. Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources [J]. Environmental Science and Technology, 2006, 40(13): 4132-4137.
- [5] 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.
- [6] FUKUHARA T, IWASAKI S, KAWASHIMA M, et al. Adsorbability of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in water onto activated carbon [J]. Water Research, 2006, 40(2):241-248.
- [7] 阳春,胡碧波, WHEATLEY A. 污水处理中雌酮的定量分析[J].重庆大学学报,2009,32(6):716-720.  
YANG CHUN, HU BI-BO, WHEATLEY A. Quantification of estrone in sewage treatment by an enzyme-linked immunosorbent assay kit [J]. Journal of Chongqing University, 2009, 32(6):716-720.
- [8] HU B. Sewage treatment by bioreactor using a novel wool fleece media [D]. UK: Loughborough University, 2008.
- [9] YANG C. Removal of steroid oestrogen in wastewater treatment [D]. UK: Loughborough University, 2007.
- [10] LAI KM, SCRIMASHAW MD, LESTER JN. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems [J]. Environmental Science & Technology, 2000, 34(28):3890-3894.
- [11] HANSELMAN TA, GRAETZ DA, WILKIE AC, et al. Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Environmental Quality, 2006, 35(3):695-700.
- [12] YANG Y, SHAO B, ZHANG J, et al. Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877 (5-6): 489-496.
- [13] 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 HUAI-LI, et al. Stability tests of oestrone, 17 $\beta$ -oestradiol and 17 $\alpha$ -ethinyl oestradiol in sewage samples [J]. Chemical Research and Application, 2008, 20(8):967-971.
- [14] ZHOU HL, LUI R, WILDING A. et al. Sorption of selected endocrine disrupting chemicals to different aquatic colloids [J]. Environmental Science and Technology, 2007, 41(1):206-213.
- [15] KHANAL SK, XIE B, THOMASON ML, et al. Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems [J]. Environmental Science and Technology, 2006, 40(21):6527-6546.

(编辑 陈移峰)