

周 军,朱暖飞,邵启运,等. 邻苯二甲酸二丁酯酶联免疫分析方法的建立及镇江地区水体污染调查研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):289-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.075

邻苯二甲酸二丁酯酶联免疫分析方法的建立 及镇江地区水体污染调查研究

周 军,朱暖飞,邵启运,黄梦璐,张 楨,吴向阳

(江苏大学环境与安全工程学院,江苏镇江 212000)

摘要:采用制备的邻苯二甲酸二丁酯多克隆抗体建立可检测环境水体中痕量邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的间接竞争酶联免疫(ELISA)分析方法,对各种参数进行优化后,在最优条件下本方法具有较高的灵敏度(检测限为 66.6 ng/mL)、较宽的检测范围(70~1 600 ng/mL)、较好的准确度(回收率 82.8%~104.0%)。利用此高通量分析方法对镇江部分河流中水样、底泥进行分析,结果发现镇江市几处河流,DBP 普遍检出,水样中 DBP 浓度为 76.5~140.4 ng/mL,底泥中 DBP 浓度可达 114.6~248.7 ng/g。

关键词:邻苯二甲酸二丁酯;酶联免疫;抗体;水体;镇江

中图分类号:X824 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)05-0289-03

邻苯二甲酸酯类物质(phthalateesters, PAEs)是一类大量应用于塑料及一次性塑料消费品(食品包装材料、容器、医疗用品)的增塑剂,还可以作为原料用于香味剂、化妆品和冷凝剂,这类化合物的使用,造成了全球性的污染^[1]。其中,邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)在被检出的 PAEs 样品中分布最为广泛^[2],Fatoki 等对南非 East London 港中 DBP 浓度进行了分析,其含量可达 2.8~121.9 ng/mL^[3];Adeniyi 等报道称尼日利亚的河水中 DBP 的含量为 202.5~270.5 ng/mL^[4];陆继龙等对第二松花江中下游中 DBP 浓度进行了测定,其平均浓度高达 717.24 ng/mL^[5]。同时,研究表明,DBP 具有明显的生殖毒性:可以引起染色体丢失或断裂等畸变,阻碍正常精子的生成^[6];可导致雄性兔与大鼠生殖道畸形,睾丸萎缩,从而造成其生殖系统损伤^[7]。因此,建立简单、快速高通量的分析方法,对水体中此类污染物进行分析极其必要。DBP 分子的化学结构如图 1 所示。

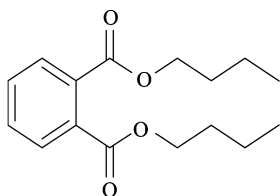


图1 DBP 分子的化学结构

目前报道的有关分析 DBP 的方法主要有气相色谱-质谱法^[8]、液相色谱法^[9]、LC-MS/MS^[10-11]等仪器方法,然而,

由于这类方法存在测试成本高、分析时间长、检测所需样品量大(通常大于 500 mL)及前处理步骤繁琐等不足,无法在较大范围内系统、全面、快速分析环境水体中 DBP 的含量。与此相比,酶联免疫法(ELISA)具有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测成本低、适合高通量分析的优势。因此,本研究利用自主制备的 DBP 多克隆抗体,建立了高灵敏的 ELISA 方法,优化了影响方法灵敏度与准确度的各种因素,并以此方法对镇江地区部分小型淡水河流中 DBP 的污染状况进行了调查。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

DBP 抗原抗体,由江苏大学环境科学团队制备;邻苯二甲酸二丁酯标准品、乙酸乙酯、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、四甲基胺,均购自美国 Sigma 公司;Tween-20、十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、浓硫酸(H_2SO_4)等,均购自国药集团化学试剂有限公司,且均为分析纯;酶标板,购自丹麦 NUNC 公司。

碳酸盐包被缓冲液 CB:0.05 mol/L、pH 值为 9.6;封闭液:含 1% 明胶的 CB 液;洗涤液 PBST:0.01 mol/L、pH 值为 7.4、含体积分数 0.05% Tween-20 的 PBS 液;抗体稀释液:0.01 mol/L、pH 值为 7.4、0.01% Tween-20、0.1% 明胶的 PBS 液;显色液:10 mg 邻苯二胺、25 mL 柠檬酸钠缓冲液、5 μL 30% 过氧化氢,用时混合;终止液:2 mol/L H_2SO_4 。

1.2 仪器设备

电子分析天平,购自重庆 CoiC 公司;恒温培养箱,上海精密科学仪器有限公司;酶标仪,购自美国 Thermo 公司。

1.3 间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)的建立

采用方阵滴定法,确定抗原最佳包被浓度、抗体最佳包被浓度,为达到最佳检测条件,对孵育条件、封闭时间、一抗竞争时间、二抗稀释倍数、pH 值、离子强度等影响因素进行优化。

收稿日期:2016-02-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:21577051)。

作者简介:周 军(1991—),男,江苏盐城人,硕士,研究方向为环境工程。E-mail:zhoujun251438@163.com。

通信作者,吴向阳,博士,教授,博士生导师,主要从事环境科学等科研工作。E-mail:wuxy@ujs.edu.cn。

具体 ic-ELISA 操作步骤为:(1)包被:用包被液将稀释的包被原加至酶标板,100 μL/孔,4 ℃ 过夜孵育;(2)洗涤:倾去孔内液体,用洗涤液洗 3 遍,200 μL/孔,在吸水纸上拍干;(3)封闭:加入 150 μL/孔封闭液,37 ℃ 孵育 1 h;(4)洗涤:倾去孔内液体,用 200 μL 洗涤液洗 1 遍,在吸水纸上拍干;(5)加样:每孔加入 50 μL 不同浓度的标准品和适当稀释的待检血清,37 ℃ 孵育 30 min;(6)洗涤:倾去孔内液体,用洗液洗 3 遍,200 μL/孔,在吸水纸上拍干;(7)加酶辣根过氧化物酶标记的二抗:加入 100 μL/孔 HRP-羊抗兔 IgG,37 ℃ 孵育 30 min;(8)洗涤:倾去孔内液体,用洗液洗 5 遍,200 μL/孔,在吸水纸上拍干;(9)显色:加入新鲜配制的 TMB 底物溶液,100 μL/孔,避光显色 10 min;(10)终止:加入终止液,50 μL/孔;(11)测定:用酶标仪读取各孔 $D_{450\text{ nm}}$ 值。

1.4 建立标准曲线及数据分析

根据以上优化的结果,按照“1.3”节中的方法建立 DBP 的标准曲线。以零标准品 $D_{450\text{ nm}}$ 值为 B_0 值,相应浓度标准品抑制时的 $D_{450\text{ nm}}$ 值为 B 值。以标准品浓度的对数为横坐标,以 B/B_0 为纵坐标,绘制标准曲线。测定 10 份空白样,取测定平均值减 3 倍标准偏差,标准曲线上其对应的浓度值即为检测限(limit of detection, LOD)。

1.5 交叉反应率的测定

选择与邻苯二甲酸二丁酯具有类似结构和类似功能的邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate, DEP)、邻苯二甲酸丁苄酯(benzyl butyl phthalate, BBP)、邻苯二甲酸单乙酯(monoethyl phthalate, MEP)、邻苯二甲酸单丁酯(monobutyl phthalate, MBP)、邻苯二甲酸单乙基己基酯(monoethylhexyl phthalate, MEHP)、邻苯二甲酸二正辛酯(di-n-octyl phthalate, DnOP)、邻苯二甲酸二异辛酯[di(2-ethylhexyl) phthalate, DiOP],测定得到各药物的 IC_{50} 值(抑制中点即抑制率为 50% 时对应的浓度),按公式(1)计算交叉反应率。

交叉反应率 = DBP 的 IC_{50} 值/相似结构物的 IC_{50} 值 × 100%。
(1)

1.6 样品前处理及添加回收率的测定

各取 2 mL(或 2 mg 泥土,自然阴干)的样品,加入 4 mL 正己烷,振荡摇匀后使用高速离心机 6 000 r/min 离心 10 min,取上清,并用氮吹仪吹干。最终样品用 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)复溶。

取空白样本,添加一定体积的 DBP 标准液,每个水平设 3 个平行。将混合物在漩涡混合器上涡动 1 min,然后静置 15 min。按建立的间接竞争 ELISA 方法测定,检测时每份样品做 3 个平行重复孔。将各样品测得的 $D_{450\text{ nm}}$ 值代入标准曲线,计算出样品中的药物浓度,并根据公式(2)计算回收率。

回收率 = 实测值/添加值 × 100%。
(2)

2 结果与分析

2.1 间接竞争 ELISA 方法的建立与优化

为达到最佳的检测效果,本研究对影响方法的各种参数进行了优化,包括抗原稀释度、抗体稀释度、孵育条件、封闭时间、一抗竞争时间、HRP 稀释度、pH 值、离子强度。在最优条件下(部分数据如表 1 所示),分别为:抗原稀释度 1:5 000、抗体稀释度 1:30 000、孵育条件 4 ℃ 过夜、封闭时间 1.5 h、

一抗竞争时间 30 min、HRP 稀释度 1:2 000、pH 值 7.0、离子强度 0.15 mol/L,以 DBP 浓度的 LOG 值为横坐标,抑制百分比(B/B_0)为纵坐标绘制标准曲线(图 2),其抑制程度与 DBP 的浓度具有明显的线性关系(70~1 600 ng/mL), IC_{50} 值为 421 ng/mL,检测限可达 66.6 ng/mL。

表 1 间接竞争 ELISA 的优化

影响因素	反应条件	B_0	DBP 的 IC_{50} (ng/mL)
包被条件	4 ℃ 过夜	1.463	424
	37 ℃ 2 h	2.097	546
	37 ℃ 2 h,4 ℃ 过夜	2.049	512
封闭时间	0.5 h	0.980	529
	1 h	1.096	726
	1.5 h	1.380	564
	2 h	0.983	703
竞争反应时间	5 min	0.802	773
	15 min	1.175	682
	30 min	1.582	424
	45 min	1.729	424
	60 min	1.846	466
HRP 稀释度	1 000 倍	2.053	424
	2 000 倍	1.505	340
	3 000 倍	1.385	546
	4 000 倍	1.377	850
	5 000 倍	1.300	494
	6 000 倍	1.237	878
pH 值	6.0	2.244	512
	6.5	2.053	451
	7.0	1.584	319
	7.4	1.462	424
	8.0	1.025	451
离子强度	0.01 mol/L	1.597	905
	0.05 mol/L	1.740	660
	0.10 mol/L	1.684	424
	0.15 mol/L	1.823	421
	0.20 mol/L	1.631	452

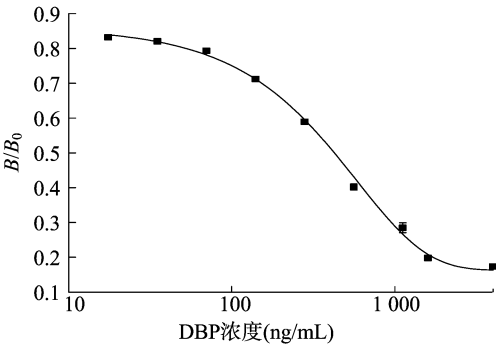


图2 DBP 的标准曲线($n=3$)

2.2 交叉反应率测定

在最佳反应条件下,测定 7 种 DBP 的类似结构物,其中对 BBP 的交叉反应率为 22.5%,对 DEP 的交叉反应率为 1.08%,其余 5 种均小于 0.01%,从而可推断该检测体系所用的 DBP 抗体具有较强的特异性。根据免疫学的基本原理^[12]:抗体倾向于识别距离偶联段最远的基团(主导的抗原决定簇)。对于所测定的 7 种 PAEs,只有 BBP 在距离偶联段最远处,和 DBP 有相似的正丁基官能团,而其他 PAEs 均无。

2.3 样本添加回收试验

DBP 在样品中的添加回收率、变异系数如表 2 所示。结果表明,其添加回收率均值在 82.8% ~ 104.0% 之间,变异系数均小于 20%,显示该方法的准确度和精确度均符合检测要求。

表 2 ELISA 法的加标回收率

样品	本底值 (ng/mL)	添加量 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 (%)
自来水	ND	50	84.5	5.09
		100	88.8	3.25
		200	100.9	4.87
		400	94.3	5.15
池水	ND	50	82.8	7.54
		100	92.2	10.20
		200	90.9	4.83
		400	104.0	4.76

注:“ND”表示未检测到。下表同。

2.4 镇江市内小型浅水河流水体和底泥的检测

表 3 为镇江市部分小型浅水河流中 DBP 在水体、底泥中的含量。由表 3 可知,DBP 作为一种常见增塑剂在环境水体中普遍存在。4 条河流中,除玉带河未检测到(玉带河离市区较远,且河道定期清淤,故水质较好),其余 3 条河流水体中 DBP 的含量介于 76.5 ~ 140.4 ng/mL 之间,显著高于台湾河(1.0 ~ 13.5 ng/mL)^[13]、意大利淡水(ND ~ 0.028 ng/mL)^[14]和加拿大 False Creek 港(9.32 ~ 63.9 ng/mL)^[15]中 DBP 的含量,而且超过《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)中 DBP 的标准限值(3 ng/mL)^[16]。显然,DBP 在 3 条市区河流中污染严重,这可能与河流周边附近工业废水的排放、固体废弃物的堆放和雨水淋洗以及 PVC 塑料的缓慢释放有关;另外下游的 DBP 含量明显高于中游,可推断出随河流沿程增加,带入水体中的污染物呈增加趋势,导致 DBP 含量也随之升高。

表 3 镇江市内小型浅水河流水体、底泥的检测结果

地点	水样 (ng/mL)	底泥 (ng/g)
玉带河(中游)	ND	ND
玉带河(下游)	ND	ND
光明河(中游)	78.2	114.6
光明河(下游)	92.3	141.2
团结河(中游)	123.9	175.8
团结河(下游)	140.4	197.3
运粮河(中游)	ND	232.6
运粮河(下游)	76.5	248.7

在中下游底泥中,DBP 的含量介于 ND ~ 248.7 ng/g 之间,与江汉平原底泥(ND ~ 289.8 ng/g)^[17]、西班牙 Urdaibai 河底泥(20 ~ 790 ng/g)^[18]等接近,但低于黄河中下游底泥(3 630 ~ 72 150 ng/g)^[19]。DBPs 是一种亲脂性的有机污染物,其辛醇-水分配系数较高,水溶性低^[20],进入水体中的 DBPs 多在底泥中富集,尤其是对于水中溶解度相对较小的 DBP,因此可以明显看出 3 条河流底泥中 DBP 含量均高于相同地点水体中的含量。对此,可以归纳出镇江市区内部分水体已受到不同程度的 DBP 污染,对水体环境构成了一定的潜在生态风险危害,我们应予以高度重视,并开展实地的调查和分析研究,控制、减少污染物的输入,保护水体环境。

3 结论

本研究建立了环境水体中 DBP 间接竞争 ELISA 分析方法。通过条件优化,本方法的 IC₅₀ 值可达 421 ng/mL,线性范围为 70 ~ 1 600 ng/mL,检测限为 66.6 ng/mL。同时,本方法具有较高的准确度与精确度(回收率为 82.8% ~ 104.0%,变异系数为 3.25% ~ 10.20%)。利用此方法对镇江市部分小型浅水河流进行检测分析,结果表明市区内水体中 DBP 污染较为严重。本研究为 DBP 在镇江区域的污染状况调查、风险评估提供了一定的技术支持。

参考文献:

[1] Fromme H, K  chler T, Otto T, et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment[J]. Water Research, 2002, 36 (6): 1429 ~ 1438.

[2] Fernandez M P, Ikonomou M G, Buchanan I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters[J]. Science of the Total Environment, 2007, 373 (1): 250 ~ 269.

[3] Fatoki O S, Noma A. Solid phase extraction method for selectivedetermination of phthalate esters in the aquatic environme[J]. Water Air and Soil Pollution, 2002, 140 (1/2/3/4): 85 ~ 98.

[4] Adeniyi A A, Okedeyi O O, Yusuf K A. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2011, 172 (1/2/3/4): 561 ~ 569.

[5] 陆继龙, 郝立波, 王春振, 等. 第二松花江中下游水体邻苯二甲酸酯分布特征[J]. 环境科学与技术, 2007, 30 (12): 35 ~ 37.

[6] 蔡智鸣, 杨科峰, 厉曙光, 等. DBP、DOP 对小鼠的联合遗传毒性[J]. 环境与职业医学, 2002, 19 (3): 197 ~ 198.

[7] Howdeshell K L, Furr J, Lambright C R, et al. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development; altered fetal steroid hormones and genes [J]. Toxicological Science, 2007, 99 (1): 190 ~ 202.

[8] 常宇文, 李 伟, 周相娟, 等. 食品中邻苯二甲酸酯的测定: GB/T 21911—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[9] Jen J F, Liu T C. Determination of phthalate esters from food - contacted materials by on - line microdialysis and liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1130 (1): 28 ~ 33.

[10] 王金花. 食品中塑化剂检测技术评析[J]. 北京工商大学学报 (自然科学版), 2011, 29 (5): 10 ~ 11.

[11] 佟晓芳. 乳制品中邻苯二甲酸酯类化合物残留量检测方法[J]. 中国乳品工业, 2012, 40 (1): 59 ~ 62.

[12] Moon J K, Keum Y S, Hwang E C. Hapten synthesis and antibody generation for a new herbicide, metamifop [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55 (14): 5416 ~ 5422.

[13] Yuan S Y, Liu C, Liao C S, et al. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments [J]. Chemosphere, 2002, 49 (10): 1295 ~ 1299.

[14] Matteo V, Maurizio G, Giannetto M. Phthalate esters in freshwaters as markers of contamination sources; a site study in Italy [J]. Environment International, 1997, 23 (3): 337 ~ 347.

[15] Mackintosh C, Maldonado J A, Ikonomon M G, et al. Sorption of phthalate esters and PCBs in a marine ecosystem[J]. Environmental

冯应斌,韩德军,敖贵艳. 贵州省城镇化进程中耕地保护存在的问题与对策建议[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):292-296.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.076

贵州省城镇化进程中耕地保护存在的问题与对策建议

冯应斌,韩德军,敖贵艳

(贵州财经大学公共管理学院,贵州贵阳 550025)

摘要:城镇化是国家或地区现代化水平的重要标志,传统发展方式下的快速城镇化模式以占用大量耕地为代价,如何在快速城镇化进程中实现耕地的有效保护,已成为政府和社会各界普遍关注的重大社会经济问题之一。本研究结果表明,贵州省城镇化水平严重滞后于全国平均水平,存在着人口城镇化和土地城镇化发展不均衡、城镇建设占用耕地数量与所占比例均呈上升趋势等突出问题。优质耕地空间分布与城市扩展区、工业园区存在空间“重叠”,面临着坝区耕地保护与城镇化、工业化建设占用的“两难困境”。基于此,从设置耕地保护“规模红线”与城镇用地“扩展红线”2个方面提出了贵州省快速城镇化进程中耕地数量保护的策略与措施;从提升城镇建设用地集约利用水平、合理管控农村宅基地规模2个方面明确了贵州省快速城镇化进程中应强调城乡建设用地内涵式管控方向。同时,加强坝区耕地高标准整治,通过土地流转促进规模经营,促进坝区耕地高效利用;通过合理配置坡耕地种植模式,稳步提升坡耕地生态涵养功能。

关键词:城镇化;耕地保护;问题;对策;贵州省

中图分类号: F321.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0292-05

城镇化过程需要一定的土地保障,城镇化发展与耕地保护之间存在着矛盾的对立统一^[1]。随着城镇化的发展,耕地数量减少的幅度呈现出先上升、后下降的倒“U”形变化趋势^[2]。在全国层面,1986—2010年我国城镇化率每提高1%,建设占用耕地数量将增加2.6934%^[3];在省域层面,1978—2005年湖北省城镇化率每提高1%,建设占用耕地数量将增加1.8868%^[4];在市域层面,地处岩溶区的广西壮族自治区河池地区,其1997—2006年耕地总量随着城镇化的提高而逐渐减少,城镇化率每提高1%,耕地总量将下降0.744%^[5]。从土地利用空间分布来看,建设用地和耕地高邻接度的空间格局,以及城市在空间上的摊饼式发展是导致城市扩展占用耕地比例大的直接原因^[6]。上述研究结果表明,城镇化进程不可避免地造成耕地面积减少,如何在快速城镇化进程中实现耕地的有效保护,已成为政府和社会各界普遍关注的重大社会经济问题之一。贵州省山多平地少,土地资源尤其是耕地资源匮乏,城镇化水平低,人口城镇化率长期位于全国末

尾。实施工业化和城镇化带动战略,成为新时期贵州省加快发展、实现后发赶超的重要路径。然而,在城镇化进程中同样面临着耕地总量减少较快的难题,尤其是耕地质量较高的坝区耕地持续减少^[7-8]。本研究在分析贵州省城镇化发展历程、耕地面积变化的基础上,诊断贵州省城镇化进程中耕地保护面临的特殊困境,借鉴相关成功经验,重构贵州省城镇化进程中的耕地保护策略,破解“城镇化快速发展导致耕地大规模减少”的资源诅咒,为贵州省在加速城镇化进程中有效保护耕地提供政策建议。

1 贵州省城镇化进程及其耕地保护的主要问题

1.1 贵州省城镇化进程及其特征

1952—1999年间,贵州省总人口从1489.90万人增长至3710.06万人,非农业人口从118.95万人增长至528.78万人,非农业人口比例从7.23%增长至14.35%。2000年以来,贵州省人口城镇化率从24.01%增长至2014年的40.01%,年均增长1.07个百分点,实现了较快增长(表1)。横向对比来看,贵州省与全国人口城镇化率的差距从2006年的16.79个百分点缩小至2014年的14.76个百分点;与西部地区的差距从8.14个百分点缩小至7.36个百分点;与西南地区的差距从6.35个百分点缩小至5.81个百分点(图1)。西部地区包括内蒙古自治区、新疆维吾尔自治区、青海省、宁夏回族自治区、甘肃省、陕西省、四川省、重庆市、贵州省、云南省、西藏自治区、

收稿日期:2016-07-29

基金项目:贵州省教育厅高校人文社会科学研究项目(编号:2015QN05)。

作者简介:冯应斌(1982—),男,贵州思南人,博士,副教授,主要从事国土资源与区域规划、乡村发展与土地利用研究。E-mail: fengyingbin@sina.com。

Science and Technology,2006,40(11):3481-3488.

[16] 吴丽娟,杨丽莉,胡恩宇,等. 液液萃取-气质联用法测定饮用水源地水中SVOCs[J]. 环境监测管理与技术,2014,26(1):35-37.

[17] Liu H,Liang H C,Liang Y,et al. Distribution of phthalate esters in alluvial sediment;a case study at Jiangnan Plain,Central China[J]. Chemosphere,2010,78(4):382-388.

[18] Bartolomé L,Cortazar L E,Raposo J C,et al. Simultaneous micro-

wave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls,phthalate esters and nonylphenols in sediments [J]. Journal of Chromatography A,2005,1068(2):229-236.

[19] 沙玉娟,夏星辉,肖翔群. 黄河中下游水体中邻苯二甲酸酯的分布特征[J]. 中国环境科学,2006,26(1):120-124.

[20] 胡晓宇,张克荣,孙俊红,等. 中国环境中邻苯二甲酸酯类化合物污染的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(1):9-14.