

· 监测技术 ·

二噁英类物质 CALUX 报告基因法在造纸行业的应用探究

陈燕¹, 周志广^{2,3*}, 潘海婷¹, 毕军平¹, 秦迪岚¹, 宋冰冰¹, 谢沙¹, 龙雯琪¹

- (1. 湖南省生态环境监测中心, 国家环境保护重金属污染监测重点实验室, 湖南 长沙 410019;
2. 国家环境分析测试中心, 北京 100029; 3. 国家环境保护二噁英污染控制重点实验室, 北京 100029)

摘要: 选择典型造纸厂, 采用化学激活报告基因法(CALUX)测定造纸过程中废水和纸浆中的二噁英类物质, 并将部分样品测定结果与高分辨气相色谱-高分辨质谱(HRGC-HRMS)法测定结果作线性回归, 换算系数为0.21, 表明CALUX可用于造纸行业废水中二噁英类物质的快速筛查。将CALUX用于测定造纸厂废水中二噁英类物质, 结果表明用含元素氯的漂白工艺会产生大量二噁英类物质, 其中漂白废水中的目标物毒性当量浓度最高, 经处理后可达到国家排放标准; 而用无元素氯的漂白工艺, 二噁英类物质的产生量会大幅降低。

关键词: 二噁英; CALUX; 高分辨气相色谱-高分辨质谱法; 造纸行业; 废水

中图分类号: O657.63 文献标志码: B 文章编号: 1006-2009(2020)02-0042-03

Application of Chemical Activated Luciferase Gene Expression in Dioxins Detection in Papermaking Industry

CHEN Yan¹, ZHOU Zhi-guang^{2,3*}, PAN Hai-ting¹, BI Jun-ping¹, QIN Di-lan¹, SONG Bing-bing¹,
XIE Sha¹, LONG Wen-qi¹

- (1. Hunan Ecology and Environment Monitoring Center, State Environmental Protection Key Laboratory of Monitoring for Heavy Metal Pollutants, Changsha, Hunan 410019, China; 2. National Research Center for Environmental Analysis and Measurement, Beijing 100029, China; 3. State Environmental Protection Key Laboratory of Dioxin Pollution, Beijing 100029, China)

Abstract: Dioxins in pulping wastewater were detected by chemical activated luciferase gene expression (CALUX). Compared with high resolution gas chromatography-high resolution mass spectrometry (HRGC-HRMS), the results of some samples by the two methods were well correlated, the conversion coefficient was 0.21. The CALUX method could be applied in rapid screening for dioxins in pulping wastewater. In actual testing, large amount of dioxins were produced in the bleaching process with elemental chlorine, the toxic equivalent concentration of the target objects were the highest. After treatment, dioxins in the wastewater could meet the requirements of national discharge standard. The amount of dioxins would slash when using the bleaching process without elemental chlorine (ECF).

Key words: Dioxins; CALUX; HRGC-HRMS; Paper industry; Waste water

二噁英类物质主要是人类工业活动的副产物^[1-2], 其中造纸制浆是其重要来源^[3-4]。发达国家造纸基本采用无元素氯漂白技术(ECF)或全过程无元素氯漂白技术(TCF), 使得二噁英类物质的排放量显著降低^[5-6]。然而, 中国、印度等发展中国家仍采用含元素氯漂白(CEH)技术, 故有必要监测造纸企业排放的二噁英类物质。

现阶段国内实验室测定二噁英普遍采用“黄金标准”HRGC-HRMS法, 该方法能够对二噁英

收稿日期: 2019-01-04; 修订日期: 2020-01-20

基金项目: 全球环境基金资助项目(No. P125528)

作者简介: 陈燕(1984—), 女, 湖南湘乡人, 工程师, 硕士, 从事环境监测分析与研究工作。

* 通信作者: 周志广 E-mail: zzguang2004@126.com

类物质精确定量,不过成本高昂、检测周期长^[7]。生物检测法具有操作简单、检测范围广、分析费用低和检测周期短等优势,作为 HRGC - HRMS 的补充,被美国、日本和欧盟等广泛用于各种环境介质及食品和饲料中二噁英类物质的初步筛选监测^[8]。我国对生物检测法的应用研究虽处于起步阶段,但已将该方法用于垃圾焚烧废气和飞灰中二噁英类物质的测定^[7,9]。CALUX 是以细胞为基础的生物检测法的一种,其原理为利用二噁英类物质及芳香烃受体(AhR)与荧光素酶转基因重组细胞结合的特性,通过测定荧光素的量求得样品中二噁英类总量。今以典型造纸企业作为研究对象,采用 CALUX 测定不同介质中二噁英类物质的含量,将部分样品测定结果与 HRGC - HRMS 测定结果做比对和换算,并作分析讨论。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

JF 602 型全自动样品净化系统;AutoSpecULTima NT 型 HRGC - HRMS 测定仪,英国 Waters 公司;Spec-tra Max L 型酶标仪,英国 Molecular Devices 公司。

丙酮、甲苯、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯(农残级),美国 J. T - Baker 公司;二甲基亚砜(DMSO),日本和光纯药;PRIM - 1640 培养液,胎牛血清(FBS),美国 Gibco 公司;青霉素链霉素双抗(P/S),日本大冢制药。

1.2 样品采集与前处理

选择 4 家典型造纸厂,选择 1 家采集其漂前浆、漂后浆、漂白废水、总排口水,另 3 家采集其漂白废水。固体样品采集完后晾干。液体样品采样体积为 20 L ~ 40 L,用不锈钢容器静置过夜,再用二噁英类物质水样富集装置经过滤膜、XAD - 2 和聚氨基甲酸乙酯泡沫(PUF)对水样进行现场富集,负压控制流速。样品富集完后,将滤膜、XAD - 2 和 PUF 装入不锈钢罐待进一步处理。样品若不能及时处理和分析,则均需 4 °C ~ 10 °C 暗处冷藏保存,并尽快分析。

1.3 样品的提取与净化

提取:将富集后滤膜、XAD - 2 和 PUF 剪碎装入萃取池,用加速溶剂萃取仪对样品提取,提取液为正己烷 - 二氯甲烷(体积比为 1:1)。

净化:样品分别经过下述酸性硅胶柱和活性炭柱净化。10 mL 酸性硅胶柱,从下至上依次填充玻

璃纤维、无水硫酸钠 1.7 g、质量分数为 33% 的硫酸硅胶 3.0 g、无水硫酸钠 1.7 g,用 30 mL 正己烷预淋洗。5 mL 活性炭柱:从下至上依次填充玻璃棉、0.5 g 无水硫酸钠、1% 的 XCARB/硅藻土 0.3 g、无水硫酸钠 1.0 g,依次采用 5 mL 丙酮、20 mL 甲苯、10 mL 正己烷预淋洗。

淋洗:先采用 10 mL 正己烷淋洗串联柱,弃去淋洗液,然后弃掉多层硅胶柱,用 10 mL 甲苯淋洗活性炭柱,分离出 PCDD/Fs。将淋洗液旋转蒸发浓缩,用正己烷定容至 4 mL。

1.4 测定

HRGC - HRMS 测定方法、质量控制和质量保证严格参照标准《水质 二噁英类的测定 同位素稀释高分辨气相色谱 - 高分辨质谱法》(HJ 77.1—2008)^[10](以下简称《标准》)。

CALUX 生物检测法参考周志广等^[7]有关研究,细胞试验时,从 4 mL 待测样品中取出部分样品于试管中,加入 4 μL DMSO 并浓缩至正己烷完全挥发,加入 400 μL 培养基(500 mL PRIM - 1640 + 40 mL FBS + 5 mL P/S)后混匀。在已经放置有细胞的 96 孔板上每孔加入 190 μL 混合液,培养 20 h ~ 24 h(37 °C,体积分数为 5% 的 CO₂)。用化学发光酶标仪测量发光度,通过发光度计算出 PCDD/Fs 的浓度。CALUX 法前处理部分的质量控制和质量保证可参考《标准》。细胞操作部分,将每次测量时标准溶液点(STD 5)和已知浓度的混合标准溶液(QC)当作质量控制和质量保证样品。经过多次测量以后,计算上述两个样品的算数平均值 μ 和标准偏差 σ ,将 $\mu \pm 2\sigma$ 作为管理界限,每次测量以后的 STD 5 和 QC 溶液的值必须处于上述管理界限之内,否则此次测量结果不可接受。

2 结果与讨论

2.1 两种分析方法特征比较

在分析时间上 CALUX 法前处理简单,检测周期为 5 d ~ 7 d,而 HRGC - HRMS 法前处理复杂,检测周期为 10 d ~ 14 d。CALUX 方法可做批量处理,即一批可以同时测定十几个样品,甚至更多,HRGC - HRMS 法无法批量处理。在样品需求量上,CALUX 需要 3.50 L 灵敏度即可达到 1.00 pg/L,而 HRGC - HRMS 需要至少 10.00 L 甚至更多,灵敏度才能达到 0.50 pg/L。另外,CALUX 法可直接测定二噁英总毒性当量,从而避免了 HRGC -

HRMS 测定时因不能准确测定样品中每个二噁英同系物的毒性当量而造成毒性偏低等问题。因此, CALUX 方法可以用来做快速筛查, 作为 HRGC - HRMS 方法的有效补充。

2.2 两种分析方法毒性当量浓度对比

HRGC - HRMS 法毒性当量浓度 (I - TEQ) 的计算采用各异构体的毒性当量因子 (I - TEF) 乘以质量浓度, 而 CALUX 方法直接测定的结果就是其毒性当量浓度 (CALUX - TEQ)。选择部分样品进行 HRGC - HRMS 法和 CALUX 法测定, 并将结果作对比, 见表 1。由表 1 可知, CALUX 测定值与 HRGC - HRMS 测定值相差较大, 主要原因是样品中存在其他可激活细胞的化合物, 例如溴代二噁英和部分多环芳烃^[11]; 其次, 两种方法使用不同毒性当量系数也是造成偏差的原因^[12]。对比 CALUX 的毒性当量系数 (REP) 和 I - TEF 可以发现, PCDDs 中部分异构体的 I - TEF 比 REP 大, 而 PCDFs 正好相反, 这就造成两种方法 TEQ 之间的偏差, 其他报告基因法也呈现出类似的规律^[13-14]。

将两种方法测定结果做线性回归, 两者相关系数 R^2 为 0.93, 换算方程为 $y = 0.21x$, 即换算系数为 0.21, 将 CALUX 值乘以 0.21 即可得到换算后的 HRGC - HRMS 值, 见表 2。日本规定换算后的数值介于 HRGC - HRMS 实际测定值的 0.5 倍 ~ 2 倍之间就可以接受。从表 2 换算值与仪器法比值可看出, 换算后的 HRGC - HRMS 值全部处于 HRGC - HRMS 实际测定值的 0.5 倍 ~ 2 倍之间, 故 CALUX 法可用来筛查造纸企业废水和纸浆中的二噁英类物质。

2.3 造纸过程纸浆和废水排放二噁英情况

从表 1 和表 2 中换算后的数值可以看出, 在造纸过程中纸浆和废水二噁英类物质的测定值不同。漂前浆中二噁英类物质主要来源于外部添加剂, 测定值为 0.07 pg - TEQ/L ~ 0.14 pg - TEQ/L。漂后浆中目标物测定值为 0.72 pg - TEQ/L ~ 1.04 pg - TEQ/L, 相比漂前浆目标物毒性当量浓度增加 8 倍 ~ 10 倍。研究表明, 造纸企业采用多氯酚类物质 (PCP) 作为木材防腐剂, 而工业使用的 PCP 中含有氯化二噁英类物质^[15]。

纸浆漂白过程是造纸企业二噁英类物质主要生成阶段。传统的漂白工艺中使用含有氯元素的漂白剂, 有机氯化物中的氯苯类和氯酚类物质是形成二噁英的关键前驱物。另外, 油基消泡剂是漂前

表 1 两种方法测定值 pg - TEQ/L

Table 1 Measured values by CALUX and HRGC-HRMS pg - TEQ/L

点位名称	介质类型	CALUX 值	HRGC - HRMS 值	换算值
漂白车间 1 进口	废水	5.90	1.10	1.20
漂白车间 2 进口	废水	33.90	6.50	7.10
漂白车间 1 出口	废水	104.00	12.10	21.80
漂白车间 2 出口	废水	192.10	45.10	40.30
漂白车间 3 出口	废水	9.50	1.20	2.00
漂白车间 4 出口	废水	5.34	1.30	1.10

表 2 CALUX 测定值与换算值 pg - TEQ/L

Table 2 Measured value and conversion value by CALUX pg - TEQ/L

点位名称	介质类型	CALUX 值	换算值
纸厂 6	漂前浆	0.14	0.03
纸厂 7	漂前浆	0.07	0.01
纸厂 6	漂后浆	1.04	0.22
纸厂 7	漂后浆	0.72	0.15
漂白车间 6 出口	废水	0.96	0.20
漂白车间 6 出口	废水	0.82	0.17
漂白车间 7 出口	废水	1.08	0.23
漂白车间 7 出口	废水	0.84	0.18
漂白车间 7 出口	废水	17.90	3.76
纸厂 6 总排口	废水	0.48	0.10
纸厂 7 总排口	废水	0.16	0.03

浆中二噁英类物质的另一主要来源, 纸浆氯化过程中使用油基消泡剂, 其中含有生成二噁英类物质的前驱物, 如二苯并二噁英 (DBD) 和二苯并二呋喃 (DBF)^[16]。漂白过程中形成的二噁英类物质主要存在于漂白废水和污泥中, 研究表明, 使用 CEF 漂白工艺漂白废水和污泥中的二噁英类数值毒性当量浓度分别为 1.80 pg - TEQ/L ~ 18.00 pg - TEQ/L 和 1.20 pg - TEQ/L ~ 39.00 pg - TEQ/L^[16], 而用 ECF 漂白工艺为 0.15 pg - TEQ/L ~ 1.90 pg - TEQ/L 和 0.77 pg - TEQ/L ~ 13.00 pg - TEQ/L^[16]。该研究中纸厂 6 使用 ECF 漂白工艺后漂白车间废水二噁英类物质毒性当量浓度低至 0.17 pg - TEQ/L, 这表明使用 ECF 漂白工艺, 产生的二噁英类物质会大幅减少, 废水排放符合《制浆造纸业工业水污染排放标准》(GB 3544—2008)^[17] 限值 30.00 pg - TEQ/L 要求。漂白废水进入造纸厂的污水处理设施后, 二噁英类物质的毒性当量浓度可以被其他厂区污水稀释 25% ~ 45%, 故厂区总排口废水中的二噁英类物质最低为 0.03 pg - TEQ/L。

(下转第 48 页)