

试验研究

用 MTT 比色法比较五种国产活性炭对饮用水中 毒性物质的吸附作用

李素文¹, 曲宁¹, 樊颖¹, 金维荣², 张保华², 张素霞²

(1. 北京师范大学生命科学学院细胞所, 北京 100875; 2. 北京市第九水厂, 北京 100085)

[摘要] 饮用水处理的一项关键工艺流程是活性炭吸附。我们采用 MTT 比色法, 对五种国产活性炭吸附饮用水中毒性物质的处理效果进行了比较。结果表明: 与未经活性炭处理的 6 号水样的水质相比, 活性炭被使用 1.5 a 后, 处理 1 号水样所用的活性炭仍有一定的吸附作用; 处理 5 号、2 号和 3 号水样所用的活性炭基本上已失去了其吸附作用; 对 4 号水样所用活性炭的处理效果应进一步研究。

[关键词] 活性炭; 饮用水; MTT; OD 值; CHO 细胞

[中图分类号] TQ028.1⁺5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-829X(2001)03-0010-03

Comparison of the adsorption of the toxicant in drinking water with
five kinds of China made activated carbon by using MTT colorimetry

LI Su-wen¹, QU Ning¹, FAN Ying¹, JIN Wei-rong², ZHANG Bao-hua², ZHANG Su-xia²

(1. Institute of Cell Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

2. Ninth Water Factory of Beijing, Beijing 100085, China)

Abstract: The adsorption with activated carbon is one of the key technological processes for treating drinking water. The effects of treating the toxicant in drinking water with the five kinds of China made activated carbon have been compared by using MTT colorimetry. The results show that compared with the water quality of water sample No. 7 which had not been treated with activated carbon, after the activated carbon have been used for 1.5 years, the activated carbon being used to treat water sample No. 1 still retains some adsorption function. But the activated carbon being used to treat water samples No. 5, 2 and 3 loses its adsorption function. The effects of activated carbon being used to treat water sample No. 4 should be studied further.

Key words: activated carbon; drinking water; MTT; OD value; CHO cell

我们前期的工作是用几种细胞生物学指标研究比较饮用水各主要工艺流程有机提取物的细胞毒性^[1,2], 实验结果表明: 与其他几个工艺流程相比较, 活性炭滤池吸附后从细胞毒性的角度水质明显转好, 说明活性炭处理饮用水是一项有效的、关键性的工艺流程。用活性炭处理饮用水在国外始于 20 世纪 20 年代, 我国 70 年代也开始应用。

1963 年 Slater 研究四种四唑盐与细胞线粒体呼吸链的偶联位置时, 发现其中 MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 对细胞化学研究具有应用价值^[3], 1983 年 Mosmann 进一步开发了 MTT 比色法

对于定量检测细胞毒性、增殖与存活等方面的应用^[4]。此后, 国内外一方面进行 MTT 比色法的方法学研究^[5~7], 另一方面进行了大量应用研究, 例如, 用 MTT 法检测小鼠 NK 细胞活性^[8], 用 MTT 法检测癌细胞对药物的敏感性^[9], 用 MTT 法检测小牛血清支持细胞生长的能力^[10]。

MTT 比色法的主要原理是: MTT 被活细胞中线粒体脱氢酶还原后, 裂解成暗蓝色甲簪, 甲簪被助溶剂溶解后, 可在酶标仪上读取光吸收值 (OD 值), 在一定范围内吸收值与活细胞数量呈线性关系。本课题的目的是用 MTT 比色法对已使用 1.5 a 的五种国产活性炭吸附饮用水中毒性物质的效果进行比

[基金项目] 北京市自然科学基金资助项目 (8982012)

较,为改进饮用水水质提供科学依据。

1 实验材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

细胞:中国仓鼠卵巢上皮细胞(Chinese Hamster Ovary, CHO)是我室冻存的细胞系,培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,置于 $\phi = 5\%$ 的 CO_2 培养箱中,37 条件下培养,进行 MTT 比色实验。

试剂:DTW,将 1 份 Triton X-100(Sigma 公司)溶于 3 份 DMF 中,摇匀后加入 2 份去离子水,加柠檬酸至 0.2 mol/L,调 pH 为 5~6。MTT(Sigma 公司)用 PBS(pH 7.4)配成 5 g/L 的储液,过滤除菌后,4 避光保存。

仪器:550 型酶标仪,Bio Rad 公司。

1.2 水样的采集

源水经管道引入水厂,加氯去除藻类等微生物后,在大波纹板反应沉淀池中进行混凝沉降,再经煤砂滤池后分别经五种来自不同产地的国产活性炭吸附过滤,分别记为 1 号、2 号、3 号、4 号和 5 号水样,另有 6 号水样为未经任何活性炭吸附过滤,是直接来自煤砂滤池后获得的水样,各种活性炭已使用 1.5 a。取上述水样各 150 L,调 pH 为 2,以 60~100 mL/min 的流速,分别通过装有 Amberlite XAD-2 树脂的玻璃柱。然后用 3~5 倍床体积的乙酸乙酯洗脱(流速为 3 mL/min),经无水 Na_2SO_4 脱水,在温度为 50~60 时减压蒸馏,将洗脱液浓缩至 20~30 mL。试验前将有机提取物在 40~50 水浴下氮气吹干,在干燥皿内过夜至恒重,作为残渣量,然后以 200 g/L 的浓度溶于二甲基亚砜(DMSO)中,储于 -20 冰箱中备用。

1.3 比较两种 MTT 助溶剂 DMSO 和 DTW 助溶效果的方法

采用下列方法比较两种 MTT 助溶剂 DMSO 和 DTW 的使用效果:在两块 96 孔板上每孔 100 μL 培养液中都以同样比例浓度接种 CHO 细胞,将其置于 37、 $\phi = 5\%$ 的 CO_2 培养箱中培养,48 h 后弃去上清液加入 MTT 储液 10 μL 继续孵育 4 h,(1)DMSO 实验组弃去上清液后,每孔加入 DMSO 各 100 μL ,振荡 15 min;(2)DTW 实验组直接向每孔加入 DTW 各 100 μL ,静置 30 min;待两板中沉淀充分溶解后,立即用酶标仪在波长 570 nm 处测定 OD 值,同时用计数板对每孔中的细胞进行计数。

1.4 用 MTT 比色法测量各水样对 CHO 细胞增殖活性影响的方法

MTT 比色法采用效果较好的 DMSO 作为 MTT 助溶剂。对 CHO 细胞增殖活性的检测共分七个实验组:在 96 孔板上每孔 100 μL 培养液中接入 10^4 个 CHO 细胞,在 37、 $\phi = 5\%$ 的 CO_2 培养箱中培养 24 h 后,同时加入 DMSO 做为阴性对照,终质量浓度为 200 mg/L,加入各水样残渣储液(见 1.2),使终质量浓度分别为 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L 和 500 mg/L 六个实验浓度组,处理细胞 72 h 后弃去上清液,每孔加入 MTT 储液 10 μL 继续孵育 4 h,再弃去上清液,向每孔中分别加入 DMSO 100 μL ,振荡 15 min,待沉淀充分溶解后,立即用酶标仪在波长 570 nm 处测定 OD 值。每组设三个平行样,实验被重复三次,共 9 个数据,算出平均值和标准差。

2 结果与讨论

2.1 两种 MTT 助溶剂 DMSO 和 DTW 助溶效果的比较

对于 DMSO 和 DTW 两种助溶剂效果的比较如图 1 所示。

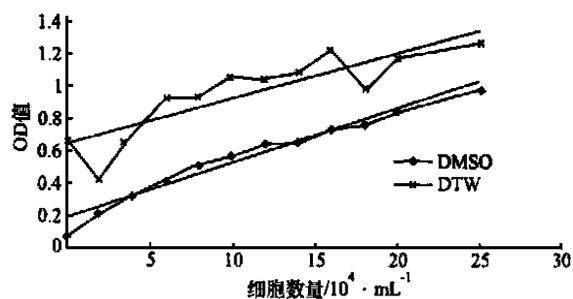


图 1 DMSO 和 DTW 助溶效果的比较

图 1 横坐标为细胞数量,纵坐标为用酶标仪测出的光吸收值(OD 值),活细胞数量越多,细胞活性越强,OD 值越高。统计分析表明:用 DTW 作助溶剂,细胞数量与 OD 值间的相关系数 $r = 0.8705$, $t = 5.7763$, ($P < 0.01$);用 DMSO 作助溶剂,细胞数量与 OD 值间的相关系数 $r = 0.9835$, $t = 18.5637$, ($P < 0.01$),说明两种情况下线性相关都非常显著,且 DMSO 的线性相关优于 DTW。通过线性回归可以发现:在本实验条件下,当细胞数量在 $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 以下时,对于 DMSO,OD 值在 0.2~1.0 的范围内呈线性相关;对于 DTW,OD 在 0.7~1.3 的范围内呈线性相关。

国内外进行 MTT 实验,多采用 DTW^[11]和 DMSO^[10]作为助溶剂,但未见到比较它们的文章。我们的实验结果表明:对同样的细胞数量,用 DTW

比 DMSO 测出的 OD 值高,这是 DTW 优越的一点,当需要高灵敏度测试时,可采用此助溶剂。但 DMSO 与 DTW 相比又具有线性相关好、快速、操作简便等优点。所以在正式实验中我们选 DMSO 做为助溶剂。

2.2 各水样的残渣量和相应的原水体积

如 1.2 水样采集中所述,经活性炭处理的各水样经氮气吹干,干燥皿内过夜至恒重后,所获得各水样的残渣量如表 1 所示(表 1 中 mg L^{-1} 指 1 L 原水中的残渣量),从中可推算出已知残渣量(如 50 μg 、100 μg 、200 μg 、300 μg 、400 μg 和 500 μg)对应的原水体积。

表 1 各水样的残渣量及各残渣量所占的原水体积

水样	残渣含量 / mg L^{-1}	不同残渣量所占的原水体积 / L					
		50 μg	100 μg	200 μg	300 μg	400 μg	500 μg
1 号	0.563	0.089	0.177	0.355	0.533	0.710	0.890
2 号	0.675	0.074	0.148	0.296	0.444	0.592	0.741
3 号	0.734	0.068	0.136	0.272	0.409	0.545	0.681
4 号	0.564	0.088	0.177	0.355	0.532	0.709	0.887
5 号	0.631	0.079	0.159	0.317	0.476	0.634	0.793
6 号	0.640	0.078	0.156	0.313	0.470	0.625	0.782

从表 1 可以看出,残渣量从高到低的顺序是:3 号、2 号、6 号、5 号、4 号、1 号。

2.3 各水样对 CHO 细胞增殖活性的比较

按方法 1.4,各水样分 6 种浓度分别作用于 CHO 细胞,72 h 后,用 MTT 法测量各水样的 OD 值,测试结果如表 2 所示,每个 OD 值都是 9 个数据的平均值和标准差。

根据表 2 各水样在不同残渣量的 OD 值和表 1 各残渣量相应原水的体积,可以得出图 2 所示各水样原水体积和 OD 值之间的关系。

根据图 1,DMSO 作为助溶剂时,OD 值的线性相关范围为 0.2 ~ 1.0(见 2.1),本实验测得的 OD 值落入此范围内,故结果准确可信。从预实验中已知,当 96 孔板中每孔接入 10^4 个 CHO 细胞,生长 24 h 后,贴壁状态良好,细胞正处于对数生长期中,这时再向细胞中加入各水样作用 72 h,所得出的实验结果反映的完全是各水样对 CHO 细胞的增殖抑制效应,并有 9 个重复数据,所以实验数据是可靠的。

表 2 各水样在不同残渣浓度下的 OD 值 (平均值 \pm 标准差)

残渣浓度 / mg L^{-1}	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	阴性对照
50	0.960 \pm 0.092	0.853 \pm 0.057	0.905 \pm 0.039	0.973 \pm 0.067	0.948 \pm 0.007	0.940 \pm 0.015	1.022 \pm 0.04
100	0.932 \pm 0.101	0.890 \pm 0.052	0.816 \pm 0.026	0.860 \pm 0.054	0.828 \pm 0.072	0.852 \pm 0.076	
200	0.863 \pm 0.062	0.758 \pm 0.103	0.760 \pm 0.015	0.777 \pm 0.047	0.862 \pm 0.023	0.835 \pm 0.107	
300	0.855 \pm 0.097	0.789 \pm 0.105	0.698 \pm 0.048	0.715 \pm 0.103	0.656 \pm 0.071	0.707 \pm 0.071	
400	0.630 \pm 0.062	0.384 \pm 0.025	0.564 \pm 0.168	0.520 \pm 0.124	0.534 \pm 0.354	0.423 \pm 0.039	
500	0.275 \pm 0.113	0.238 \pm 0.082	0.187 \pm 0.075	0.421 \pm 0.120	0.259 \pm 0.032	0.333 \pm 0.020	

本实验选择水样作用时间点除 72 h 外,还进行了 24 h 和 48 h 作用时间的实验,结果都与 72 h 的规律相符(未列出)。

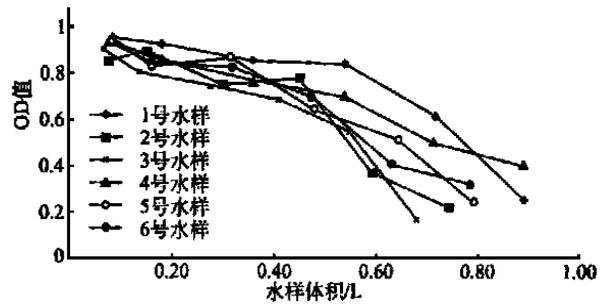


图 2 各水样在不同体积下的 OD 值

实验中 6 号水样为没做任何活性炭处理的水样,可用它作为标准比较五种国产活性炭使用 1.5 a 后的处理效果。图 2 表明:随着原水体积的增加,1 号水样的 OD 值保持在最上面,4 号水样的 OD 值低于 1 号水样,但优于其他 4 种水样,变化趋势比较缓和。5 号、2 号和 3 号水样与 6 号水样 OD 值变化趋势相似,这些数据表明:使用 1.5 a 后处理 1 号水样所用活性炭仍有较好的吸附作用;处理 5 号、2 号和 3 号水样所用活性炭基本上已失去了吸附能力;处理 4 号水样所用活性炭的效果还应进一步研究。

[参考文献]

[1] 李素文,等. CHO 细胞胞质分裂阻断微核技术的研究[J]. 北京 (下转第 30 页)

2.8 比尔定律范围及灵敏度

单波长和双波长测定时, Hg()量分别在 0 ~ 12 $\mu\text{g}/25\text{ mL}$ 和 0 ~ 10 $\mu\text{g}/25\text{ mL}$ 范围遵守比尔定律。回归方程为 $A_{450} = 0.0105 + 0.0372C$ 和 $A_{450,530} = 0.0207 + 0.0829C$ (C $\mu\text{g}/25\text{ mL}$), 相关系数分别为 0.9997 和 0.9994。表观摩尔吸光系数分别为 $\epsilon_{450} = 9.89 \times 10^4$ 和 $\epsilon_{450,530} = 2.18 \times 10^5$ 。

2.9 共存离子的影响

对 5 $\mu\text{g}/25\text{ mL}$ Hg()的测定, 相对误差不大于 $\pm 5\%$ 时, 各离子的允许量 (μg) 为: K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 5 000; Mo () 1 000; Sn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 500; Bi^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 200; Ba^{2+} 100; B^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 50; Ag^+ 、 Cr ()、 Cr^{3+} 、 La^{3+} 、 Ni^{2+} 20; Fe^{3+} 、 Co^{2+} 10。 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 的存在对测定有干扰。在 5 mg 焦磷酸钠存在下, 可允许 200 μg 的 Cu^{2+} 存在。

表 1 水样中汞的分析结果

样品名称	测定值/ mg L^{-1}	对照值/ mg L^{-1}	RSD ($n=5$)/%
工业废水 1 #	1.93	1.91	1.51
工业废水 2 #	1.27	1.23	2.10
环境水样 1 #	0.545	0.532	1.41
环境水样 2 #	0.255	0.241	1.23
对照使用双硫脲光度法。			

3 分析应用

取一定量废水, 加 4 mL 3 mol/L H_2SO_4 和几滴

0.5 mol/L KMnO_4 溶液, 低温加热 1 h。然后滴加 10% 盐酸羟胺溶液使过量 KMnO_4 还原。再用 NaOH 溶液调节 pH 为 3~4, 转移入容量瓶中, 以水定容并摇匀。吸取此试液于 25 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 0.5% 焦磷酸钠溶液, 以下按实验方法测定。结果见表 1。

[参考文献]

- [1] Chavanne P, Geronimi C. I UN MICRODOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DU CADMIUM [J]. Anal. Chim. Acta, 1958, 19:377.
- [2] Popa Gr, Danet A F, Popescu M. Spectrophotometric Study of the Reaction of Hg() with Cadion A and Cadion 2B [J]. Talanta, 1978, 25:546.
- [3] Hsu Churg-jin, Hu Chao-sheng, Jing Ji-hong. Spectrophotometric Determination of Micro Amounts of Cadmium in Wastewater with Cadion and Triton X-100 [J]. Talanta, 1980, 27:676.
- [4] Wei Fu-sheng, Yin Fang. Spectrophotometric Determination of Silver with Cadion 2B and Triton X-100 [J]. Talanta, 1983, 30(3):190.
- [5] 赵书林, 夏心泉, 吴丽波, 等. 苯并噻唑重氮氨基偶氮苯与汞的显色反应及应用 [J]. 分析化学, 1997, 25(10):1206.
- [6] 夏心泉, 赵书林, 吴振. 新试剂 6-硝基-苯并噻唑重氮氨基偶氮苯与汞的显色反应 [J]. 分析实验室, 1998, 17(6):14.
- [7] 夏心泉, 赵书林, 史洪刚. 新试剂 6-甲氧基-苯并噻唑重氮氨基偶氮苯与汞的显色反应 [J]. 化学世界, 1999, 40(1):28.

[作者简介] 夏心泉(1939 -), 1963年毕业于武汉大学, 教授。

[收稿日期] 2000 - 08 - 29

(上接第 12 页)

师范大学学报, 1997, 33:539~542.

- [2] 刘艳红, 等. 用 CBMN 法评价饮用水处理流程中有机提取物的细胞毒性 [J]. 环境科学, 1998, 19:42~45.
- [3] Slater T F, et al. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems [J]. Biochem. Biophys. Acta., 1963, 77:383~393.
- [4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J. Immunological Methods, 1983, 65:55~63.
- [5] Tada H, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2 [J]. J. Immunological Methods, 1986, 93:157~165.
- [6] Denizot F, et al. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and Reliability [J]. J. Immunological Methods, 1986, 89:271~277.
- [7] Carmichael J, et al. Evaluation of a Tetrazolium-based semiauto-

mated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing [J]. Cancer Research, 1987, 47:936~942.

- [8] 王新江, 等. 用 MTT 法检测小鼠 NK 细胞活性 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1991, 5:81~83.
- [9] 曹建国, 等. 人肺癌细胞药物敏感性的琼脂培养 MTT 测定 [J]. 癌症, 1995, 14:182~184.
- [10] 李淑云, 等. 应用 MTT 比色法检测小牛血清支持细胞生长的能力 [J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10:91~97.
- [11] 贾熙华, 等. MTT 比色法在微囊培养动物细胞计数中的应用 [J]. 军事医学科学院院刊, 1993, 17:207~210.
- [12] 马梅, 等. 城市污水生物处理过程中有毒有机污染物浓度及毒性变化的规律 [J]. 工业水处理, 1999, 19(6):9~12.

[作者简介] 李素文(1941 -), 1964年毕业于中国科技大学, 教授。

[收稿日期] 2000 - 07 - 31