

ICS 13.030
Z 70
备案号: 33235-2012

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB50/T427—2012

土壤、沉积物和固体废物 二恶英类的 筛查 酶联免疫法

Soil, Sediment and Solid Waste Screening of polychlorinated
dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)
Enzyme-Linked Immunoassay

2012-02-15 发布

2012-09-01 实施

重庆市环境保护局
重庆市质量技术监督局

发布

目 次

前 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义、符号和缩略词	1
4 方法原理	2
5 试剂和材料	2
6 仪器设备	3
7 样品采集	3
8 样品前处理	3
9 酶联免疫分析	5
10 标准曲线绘制	6
12 检测限、精密度和准确度	7
13 质量保证和质量控制	8
14 报告	8
15 废物处理	9
16 注意事项	9
附 录 A（规范性附录）二恶英类分析流程图	10
附 录 B（资料性附录）样品蒸发模式	11
附 录 C（资料性附录）标准溶液浓度序列	12
附 录 D（资料性附录）标准曲线控制参数	13

前 言

本标准根据 GB/T1.1-2009 规定进行编制。

本标准为您推荐性标准。

本标准首次发布。

本标准由重庆市环境保护局提出并归口。

本标准起草单位：重庆市固体废物管理中心。

本标准起草人：廖世国 阳 剑 蔡洪英 季祥海 郑鸿柯

本标准自2012年9月1日实施。

土壤、沉积物和固体废物 二恶英类的筛查 酶联免疫法

1 范围

本标准规定了采用酶联免疫法筛查土壤、沉积物和固体废物（包含飞灰、盐泥、工业废渣、污泥）中的多氯代二苯并二恶英（PCDDs）和多氯代二苯并呋喃（PCDFs）方法。

本标准适用于土壤、沉积物和固体废物中二恶英类的筛查，利用酶联免疫法筛查土壤、沉积物和固体废物中的多氯代二苯并二恶英和多氯代二苯并呋喃。

2 规范性引用文件

下列文件对本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

HJ/T20-1998 《工业固体废物采样制样技术规范》

HJ/T166-2004 《土壤环境监测技术规范》

HJ 494-2009 《水质采样技术指导》

3 术语和定义、符号和缩略词

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 术语和定义

3.1.1 二恶英类

多氯代二苯并二恶英（PCDDs）和多氯代二苯并呋喃（PCDFs）的总称。

3.1.2 同类物

二恶英类所有化合物互为同类物。二恶英类共有 210 种同类物。

3.1.3 2,3,7,8-多氯代二恶英类

指在 2,3,7,8 位均有氯原子取代的二恶英类同类物，共有 17 种，其中多氯代二苯并二恶英有 7 种，多氯代二苯并呋喃有 10 种。

3.1.4 毒性当量（TEQ）

各二恶英类同类物浓度折算为相当于 2,3,7,8-四氯代二苯并二恶英毒性的等价浓度，本标准检测结果为 Bio-TEQ，经换算后可转换为 I-TEQ。

3.1.5 孵育

在 20-26℃下，使二恶英类与酶联免疫测定管中的抗体充分结合的过程。

3.1.6 试剂空白

以分析待测样品溶液所使用的溶剂作为空白，其余操作步骤和实际样品相同的空白实验。

3.1.7 操作空白

除不添加实际样品外，样品制备、前处理、仪器分析和数据处理步骤与实际样品分析步骤相同的空白实验。

3.2 符号和缩略词

3.2.1 PCDDs

多氯代二苯并二恶英，有 75 种同类物。

3.2.2 PCDFs

多氯代二苯并呋喃，有 135 种同类物。

3.2.3 2,3,7,8-TCDD

2,3,7,8-四氯代二苯并二恶英。

3.2.4 HRP

辣根过氧化物酶。

3.2.5 TEG

四乙烯乙二醇。

3.2.6 DF1-60 酶联免疫试剂盒

本标准采用的一种试剂盒，包含酶联免疫测定管，样品稀释液，HRP，HRP 底物，终止液（1mol/L 盐酸溶液），Triton X-100，保留剂。

3.2.7 CAF

校正因子。

4 方法原理

酶联免疫法的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，受检样品（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与样品中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与样品中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。参见图 1 和附录 A “二恶英分析流程图”。

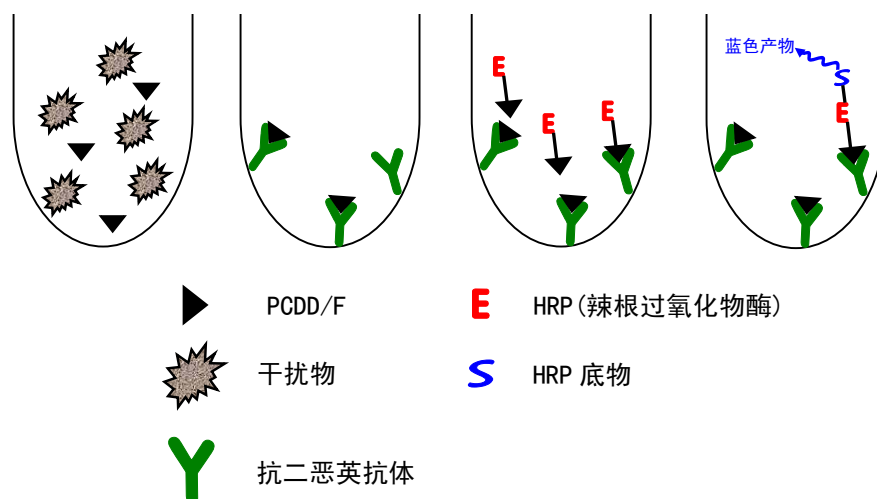


图 1 筛查原理简单示意图

5 试剂和材料

除非另有说明，分析试剂均使用农残级试剂，并进行空白实验。有机溶剂浓缩万分之一倍，不得检出二恶英类。

- 5.1 2,3,7,8-四氯代二苯并二恶英：标准品试剂
- 5.2 无水硫酸钠：分析纯
- 5.3 酸洗石英砂
- 5.4 正己烷
- 5.5 丙酮
- 5.6 甲苯
- 5.7 甲醇
- 5.8 正十四烷：分析纯
- 5.9 盐酸：优级纯。
- 5.10 二氯甲烷
- 5.11 SP3-60 试剂盒（含 40mL 萃取瓶、碳柱、钢珠和酸性硅胶），SP2-ST 试剂盒（含硅胶柱和空柱），SP2-RT 试剂盒（含活塞），DF1-60 试剂盒
- 5.12 25mL 容量瓶
- 5.13 连续移液器（100 μ L-2mL），微量移液器（0-10 μ L，0-100 μ L）。
- 5.14 带有聚四氟乙烯树脂内衬盖子的玻璃小瓶（2-12mL）。
- 5.15 玻璃试管（15-20mL）
- 5.16 铝箔
- 5.17 过滤筛（200 目）

6 仪器设备

- 6.1 电子天平（百分之一）
- 6.2 平板轨道振荡器（可做椭圆旋转）
- 6.3 离心机
- 6.4 氮气吹干仪
- 6.5 旋转蒸发仪
- 6.6 索氏提取器
- 6.7 分光光度计（波长 450nm）

7 样品采集

土壤采集按 HJ/T166-2004《土壤环境监测技术规范》中采样的规定方法实施。沉积物采集按 HJ 494-2009《水质采样技术指导》中采样的规定方法实施。固体废物采集按 HJ/T20-1998《工业固体废物采样制样技术规范》中采样的规定方法实施。采集后的土壤、沉积物和固体样品在实验室中风干、磨碎、过筛，保存在棕色玻璃瓶中，贮存于 2-6℃ 环境中。样品采集后，40 天内应完成提取。

8 样品前处理

- 8.1 土壤和沉积物样品
 - 8.1.1 所有与实验相关的玻璃器皿，都要预先用甲苯清洗，干燥。空白值偏高时，可考虑使用马弗炉

对所有仪器进行烘干,降低空白值。

8.1.2 样品实验前应进行风干、磨碎和过筛(200目过滤筛)处理。

8.1.3 样品混匀后称取5.00g加入到40mL萃取瓶(SP3-60试剂盒)中(每个瓶子写好标签)。

8.1.4 每个萃取瓶中加入5g酸洗石英砂、10-20g无水硫酸钠,再加入3颗钢珠(在此步添加2,3,7,8-TCDD于方法空白和样品中,通过筛查结果计算方法空白和样品的加标回收率)。

8.1.5 每个萃取瓶中加入20mL正己烷和丙酮混合溶液(体积比1:1),拧紧瓶盖,将萃取瓶放入平板轨道振荡器中进行椭圆震荡4小时,振动频率为180-200次/分。此步同时计算正己烷和丙酮混合溶液(体积比1:1)的密度。

8.1.6 震荡完毕后取出萃取瓶静置6-8小时,用吸量管将萃取瓶中上清液全部转移到已标记的玻璃试管中(玻璃试管事先称重),转移完成后对玻璃试管进行称重,记录所转移上清液的质量。再根据记录的上清液的质量计算所转移上清液的体积。

8.1.7 每个玻璃试管中加入0.25mL正十四烷,将每个玻璃试管置于氮气吹干仪中在40℃水温下进行氮吹,至丙酮溶液完全清除。

8.1.8 氮吹完毕后每个玻璃试管中加入5mL正己烷,若玻璃试管中溶液颜色较深则应加入1-2g酸性硅胶(SP3-60试剂盒)处理,待溶液澄清。

8.1.9 预洗柱:硅胶柱(SP2-ST)中加入10mL正己烷,正己烷从柱子底端滴下,从SP3-60试剂盒中取出碳柱,加入正己烷在碳柱的平口端,将其平口端接到硅胶柱的底端并拧紧,硅胶柱与碳柱连接处不允许气泡产生。同时硅胶柱中正己烷应覆盖硅胶(每根硅胶柱做好标记)。

8.1.10 预洗后的硅胶柱中加入8.1.8步骤中玻璃试管中溶液进行过柱,分2次每次用2mL正己烷润洗玻璃试管,润洗液全部加入已标记的硅胶柱中,以保证所有的溶液全部转入硅胶柱中,进行加压过柱,至溶液液面略高于硅胶上表面时停止加压。

8.1.11 分2次过柱,每次加入15mL正己烷到硅胶柱中过柱。第二次过柱时溶剂距离碳柱顶部1-2cm时停止加压(保持碳柱的湿润状态)。

8.1.12 从硅胶柱上取下碳柱,将其平口端连接到空柱(SP2-ST试剂盒)底部,加入6mL甲苯和正己烷混合溶液(1:1)到空柱中进行加压过柱,待溶液流至碳柱顶部时停止加压(保持碳柱湿润状态)(空柱做好标记)。

8.1.13 从空柱上取下碳柱,将其斜口端接到同一根空柱上,加入12mL甲苯加压过柱进行洗脱,洗脱液接收在玻璃试管中,甲苯完全流过碳柱,直至不再有液体滴下为止(玻璃试管作好标记)。

8.1.14 根据实验样品情况选择蒸发模式(见附录B),在玻璃试管中加入保留剂(DF1-60试剂盒)(以附录B中B模式为例,B模式下加入量为62.5μL),在70℃水温下进行氮吹,至甲苯全部清除。

8.1.15 氮吹完毕后取出试管,放置于离心机中在1500-2000转每分钟转速下离心5分钟,将所有样品溶液富集在试管底部。

8.2 固体废物样品

8.2.1 所有与实验相关的玻璃器皿,都要预先用甲苯清洗,干燥。空白值偏高时,可考虑使用马弗炉对所有仪器进行烘干,降低空白值。

8.2.2 润洗索氏提取器,接250mL甲苯到旋转蒸发仪的圆底烧瓶中进行索氏提取,润洗约2小时。

8.2.3 样品实验前应进行风干、磨碎和过筛(200目过滤筛)处理。

8.2.4 样品混匀后称取 0.25g 用 2mol/L 盐酸处理 1 小时。盐酸的用量为每 1g 样品加不少于 20mmol 盐酸，使其与盐酸充分接触并观察发泡情况，必要时再添加盐酸，直至不再发泡为止。过滤干燥后用玻璃纤维包好，加入到润洗后的圆底烧瓶中。过滤后的盐酸处理液用 100mL 二氯甲烷萃取三次。

8.2.5 在 8.2.4 步圆底烧瓶中加入 250mL 甲苯用索氏提取器进行索氏提取，提取 16-20 小时（在此步添加 2, 3, 7, 8-TCDD 于方法空白和样品中，通过筛查结果计算方法空白和样品的加标回收率）。

8.2.6 提取完毕后，将圆底烧瓶中的甲苯提取液和 8.2.4 步骤中的二氯甲烷萃取液合并加入到旋转蒸发仪的梨形瓶中，圆底烧瓶和萃取瓶用少量甲苯各润洗 2 次后转移到梨形瓶中，保证样品溶液全部转入梨形瓶中。

8.2.7 样品溶液在旋转蒸发仪中进行蒸发，水浴温度设置 80℃，真空泵压力调整至 0.08MPa，蒸发至剩余溶液体积为 2-3mL 后停止，用吸量管将溶液转入 25mL 容量瓶中，用少量正己烷润洗梨形瓶 2-3 次以保证样品全部转入容量瓶中，最后用正己烷定溶，摇匀。

8.2.8 预洗柱：硅胶柱（SP2-ST）中加入 10mL 正己烷，正己烷从柱子底端滴下，从 SP3-60 试剂盒中取出碳柱，在碳柱的平口端加入正己烷，将其平口端接到硅胶柱的底端并拧紧，硅胶柱与碳柱连接处不能产生气泡。同时硅胶柱中正己烷应覆盖硅胶（每根硅胶柱做好标记）。

8.2.9 用移液器从 8.2.7 步骤定溶后的容量瓶中移取样品溶液 3.0mL 加入到预洗后的硅胶柱中，进行加压过柱。

8.2.10 分 2 次过柱，每次加入 15mL 正己烷到硅胶柱中过柱，第二次过柱时当溶剂距离碳柱顶部 1-2cm 时停止加压（保持碳柱的湿润状态）。

8.2.11 从硅胶柱上取下碳柱，将其平口端接到空柱（SP2-ST 试剂盒）底部，加入 6mL 甲苯和正己烷混合溶液（体积比 1:1）到空柱中进行加压过柱，待溶液流至碳柱顶部时停止加压（保持碳柱湿润状态）（空柱做好标记）。

8.2.12 从空柱上取下碳柱，将其斜口端连接到同一根空柱上，加入 12mL 甲苯加压过柱进行洗脱，洗脱液接收在玻璃试管中，甲苯完全流过碳柱，直到不再有液体滴下为止（玻璃试管作好标记）。

8.2.13 根据实验样品情况选择蒸发模式（以附录 B 中 B 模式为例），在玻璃试管中加入保留剂（B 模式下加入量为 62.5 μL）（DF1-60 试剂盒），在 70℃ 水温下进行氮吹，至甲苯溶液全部清除。

8.2.14 氮吹完毕后取出试管，放置于离心机中在 1500-2000 转每分钟转速下离心 5 分钟，将所有样品溶液富集在试管底部。

9 酶联免疫分析

9.1 将 DF1-60 试剂盒内所有试剂回温至 20-26℃ 才可使用。使用前，将所有溶剂轻轻地倒置混匀。

9.2 清洗剂配制：从 DF1-60 试剂盒中取出标有“0.5mL neat Triton X-100”的玻璃瓶。用微量移液器移取 10 μL 的 Triton X-100 直接加入到 100mL 去离子水中混匀，制作出浓度为 0.01% V/V 的清洗剂。

9.3 从 DF1-60 试剂盒中取出酶联免疫测定管，编号排列后用去离子水清洗每个测定管，重复清洗 3 次，倒去去离子水并反置，拍干。

9.4 将标准品系列溶液按低浓度到高浓度依次排列，混匀后静置待用。

9.5 每个酶联免疫测定管中加入 500 μL 样品稀释液（DF1-60 试剂盒）。

9.6 添加标准品（2, 3, 7, 8-TCDD 标准品）：用微量移液器移取 50 μL 标准品加入到已标记的酶联免疫

测定管中，标准品必须用移液器从液面以下加入到溶液中，不能在液体上部悬空加入到溶液中，加入后摇匀（注意标准品的添加，应是从低浓度到高浓度）。

9.7 根据蒸发模式要求，8.1.15 和 8.2.14 步骤中离心后的每个玻璃试管中加入甲醇（B 模式下加入量为 50 μL）到试管底部，震荡，混匀 15 秒后让试管保持垂直 15—30 秒，保证液体富集在试管底部，立即进行下一步实验操作。

9.8 加入待测样品：用微量移液器在玻璃试管中移取 50 μL 样品溶液加入到已标记的酶联免疫测定管中。样品溶液必须用移液器从液面以下加入到溶液中，不能在液体上部悬空加入到溶液中。加入后立即摇匀样品，在 20–26℃ 温度下孵育 12 到 24 个小时。

9.9 第一次孵育完成后，清洗全部的酶联免疫测定管，用 9.2 步骤配制好的清洗剂进行清洗，每次 1mL，重复清洗 4 次。清洗完毕后倒置除去测定管中水分，然后加入 HRP（辣根过氧化物酶）（DF1-60 试剂盒）进行第二次孵育，时间为 15 分钟。孵育完成后用去离子水进行清洗，每次 1mL，重复清洗 4 次。清洗完毕后倒置除去测定管中水分，然后加入 HRP 底物（DF1-60 试剂盒）进行第三次孵育，时间为 30 分钟。孵育完成后加入终止液 1mol/L 盐酸溶液（DF1-60 试剂盒）。

9.10 使用分光光度计（450nm 波长），加入不少于 1mL 去离子水到空白酶联免疫测定管并置于光度计上对光度计进行校正。擦干每个酶联免疫测定管的外表面并放置于光度计上测定每个测定管的吸光度值。

10 标准曲线绘制

将 2, 3, 7, 8-TCDD 用甲醇配制成 0、3.2、10、32 和 100pg/管（每个酶联免疫测定管中标准品的添加量均为 50 μL）的系列标准工作溶液（见附录 C），分别进行酶联免疫分析，测得各浓度所对应的吸光度值。

根据式（1）作 2, 3, 7, 8-TCDD 的剂量-效应关系标准曲线。如图 2 所示，标准曲线为倒“S”型。

$$Y = ((A-D) / (1 + (X/C)^B)) + D \quad (1)$$

式中：

X=pg/tube (2, 3, 7, 8-TCDD 标准品的毒性当量值)

Y=每个酶联免疫测定管所测得的吸光度值与 0 浓度测得的吸光度值的百分比

A: 0 浓度时对应的 Y 值

B: 曲线部分的斜度

C: Y 值为 50 时对应的 X 值

D: 较低渐近线的 Y 值

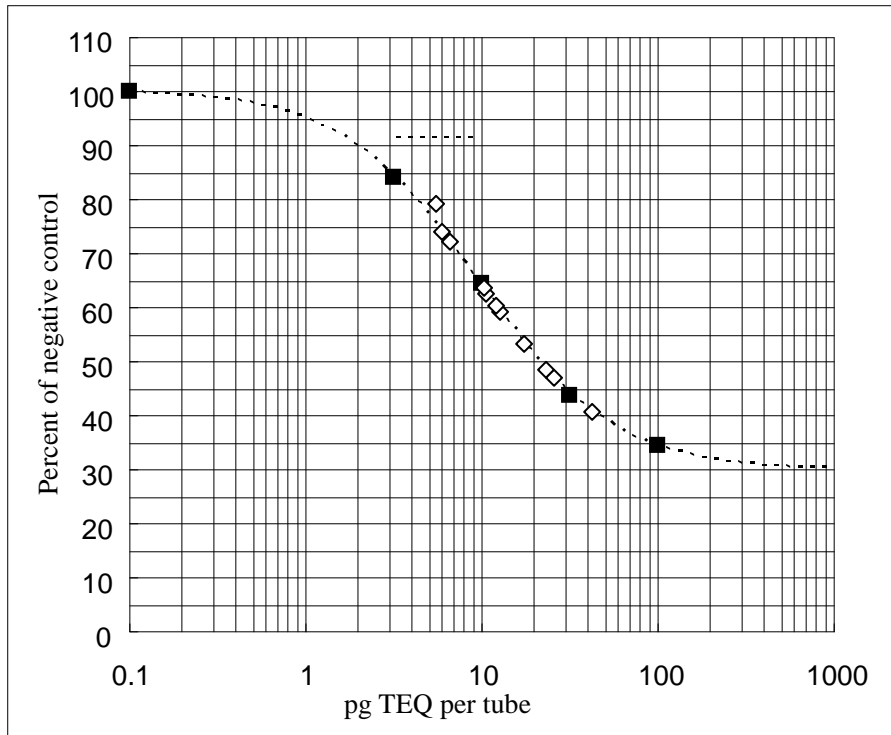


图2. 2, 3, 7, 8-TCDD 剂量-效应关系标准曲线

11 结果计算

利用分光光度计测定二恶英类样品时得到的吸光度值 M ，测定 0 浓度时得到的吸光度值 N ，计算出吸光度值的相对值 Y 。再通过上述的标准曲线求得衍生物换算浓度 TEQ (pg/管) 即 X (pg/管)。按操作步骤进行酶联免疫检测，加待测样品 a (g) 加入到酶联免疫测试管中，将相应数据代入公式 (1) ~ (3)，计算出每单位样品重量中的毒性当量。

$$Y = (M/N) \times 100\% \quad (2)$$

$$TEQ \text{ (pg I-TEQ/g)} = TEQ \text{ (pg/tube)} / a \times CAF \quad (3)$$

注：以上涉及到的符号在本标准中含义相同，本标准CAF取值范围为1.0-4.0，土壤和沉积物样品建议取值4.0，固体废物样品建议取值2.0。

12 检测限、精密度和准确度

12.1 检测限

本标准方法检出下限值为 4.0ngI-TEQ/kg。

12.2 精密度

同一样品重复测定相对标准偏差 (RSD) 变化范围为 5-70%。

12.3 准确度

方法空白加标回收率变化范围为70-130%。

方法样品加标回收率变化范围为60-135%。

13 质量保证和质量控制

13.1 标准曲线质量控制情况

二恶英类筛查所有批次的实验所得到的 2,3,7,8-TCDD 校准标准测定值应在标准曲线质量控制范围内，实验所得到的标准曲线方为合格。标准曲线质量控制情况见附录 D。

13.2 分析质量保证最基本的要求

13.2.1 应用方法空白来证明系统未被污染，空白值变化范围应在3.0-8.0 ng I-TEQ/kg之间。

13.2.2 实验室应每批次考察校正结果、精密度和回收率一次，以确认分析系统处于正常状态。

13.3 样品中标记化合物的回收率需要按期评价并做好记录，每30天对各种基质样品进行平行样分析（不少于五个），计算出标记化合物的平均回收率（R）和回收率标准偏差（SR）。

13.4 空白实验

空白实验分为两种：试剂空白和操作空白。试剂空白用来检查分析仪器的污染情况；操作空白用来检查样品制备过程的污染程度。

13.4.1 试剂空白：所有试剂空白测试结果应低于方法检出限。

13.4.2 操作空白：为评价实验环境的污染干扰水平，应进行操作空白实验。除不添加实际样品外，操作空白试验的样品制备、前处理、仪器分析和数据处理步骤与实际样品分析步骤相同，结果应低于评价浓度的1/10。在样品制备过程有重大变化时(如使用新的试剂或仪器设备，或者仪器维修后再次使用时)或样品间可能存在交叉污染时(如高浓度样品)应进行操作空白的分析。

13.5 标准溶液：标准溶液应装在密封的玻璃容器中避光冷藏保存。

13.6 质量控制考察样品：每批次实验分析质量控制考察样品以确认校正标准的准确性和分析过程中的可靠性。

13.7 筛查实验材料

筛查中所用试剂，实验仪器均按照筛查方法的规定进行采购，所有试剂、材料均满足筛查实验要求。

13.8 采样控制

在样品采集过程中，土壤采集按HJ/T166-2004《土壤环境监测技术规范》中采样的规定方法实施。沉积物采集按HJ 494-2009《水质采样技术指导》中采样的规定方法实施。固体废物采集按HJ/T20-1998《工业固体废物采样制样技术规范》中采样的规定方法实施。

14 报告

14.1 报告格式

结果报告应采用表格形式，表中需包括样品种类、采样地点、测定对象、毒性当量浓度等内容。

14.2 样品名称

实验室检测样品种类包括土壤、沉积物和固体废物。

14.3 筛查对象

筛查对象包括 PCDDs 与 PCDFs。

14.4 浓度单位

所有样品的毒性当量浓度单位均以 ng I-TEQ/kg 表示。

15 废物处理

15.1 实验室应遵守废物管理法律规定，避免废物排放对周边环境造成污染。

15.2 实验室产生的废弃物属于危险废物的，应按有关法律规定进行处置。

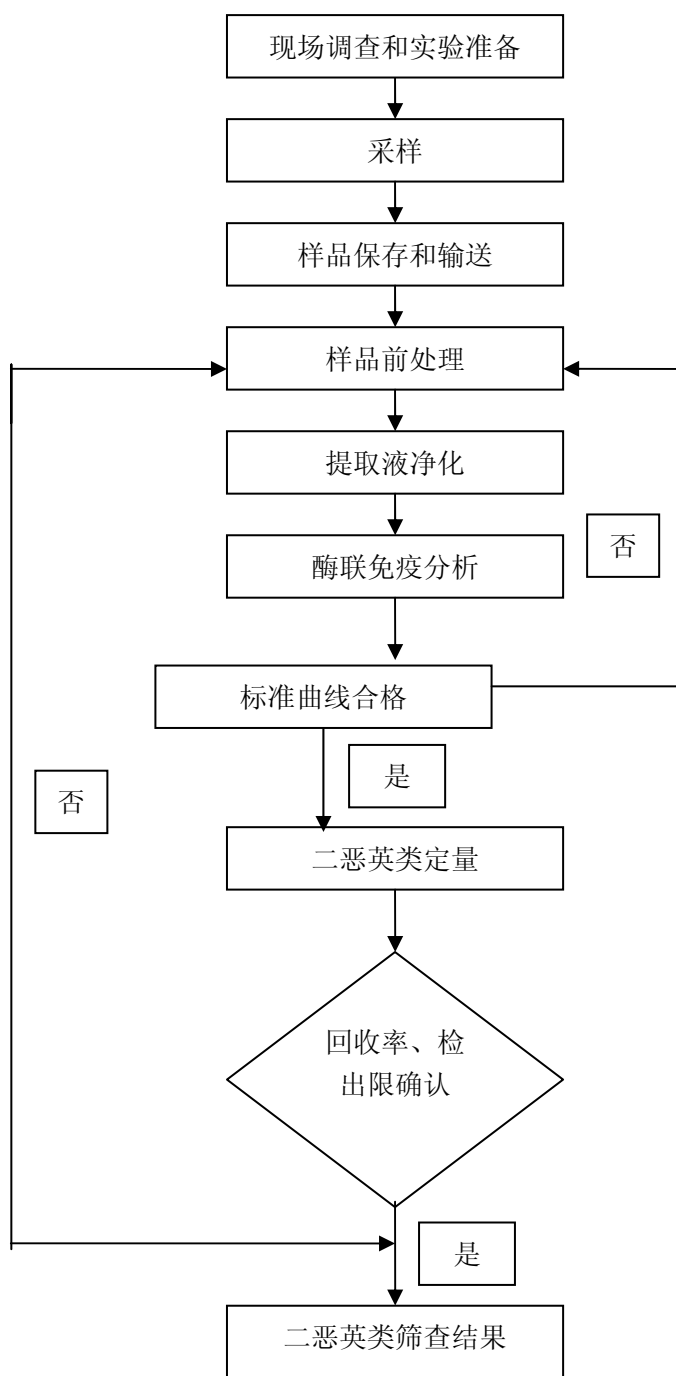
16 注意事项

本实验方法是根据 PCDDs 和 PCDFs 同类物与其毒性当量因子 (TEF) 之积的 TEQ 设计来进行样品筛查。在某些情况下也可以进行定量检测。

分析质量控制样品来确认实验分析过程中的可靠性是非常必要的。为确保精度和结果的可靠性，实验酶联免疫分析的所有操作必须在 20—26℃ 下操作。

试剂盒中试剂的 40% 用来做标准品和质量保证。重复，复查样品，标准相关材料，方法空白，以确保实验的准确性。

附录 A (规范性附录) 二恶英类分析流程图



附录 B (资料性附录) 样品蒸发模式

蒸发模式选项	A	B	C
可允许样品数量	无限	有限	均可
可做重复次数 (次)	2	1	1
样品稀释所加容量 (μL)	约 30	0	30
蒸发前加入样品试管中的保留液 (μL)	150	62.5	100
蒸发后残留 (20%最初保留液) (μL)	30	12.5	20
加入残留中的甲醇 (μL)	120	50	80
加入酶联免疫测定管中的起始液比例	33%	80%	50%

附录 C (资料性附录) 标准溶液浓度序列

标准溶液序号	0	1	2	3	4
2, 3, 7, 8-TCDD 浓度 (ng/mL)	0	0.064	0.20	0.64	2.0
加入到每管中的 2, 3, 7, 8-TCDD 质量 (pg)	0	3.2	10	32	100

附录 D (资料性附录) 标准曲线控制参数

标准序号	1	2	3	4
2, 3, 7, 8-TCDD 浓度 (ng/mL)	0.064	0.20	0.64	2.0
平均阴性空白比例 (%NC)	87	66	41	29
标准偏差 (SD)	6.0	7.0	7.0	6.0
阴性空白比例控制范围	75-99	52-80	27-55	17-41