

附件 11

《固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法
(征求意见稿)》
编制说明

《固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法》

标准编制组

二〇一八年五月

项目名称：固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法

项目统一编号：2015-23

承担单位：国家环境分析测试中心

协作单位：中国环境监测总站、中国科学院生态环境研究中心、环境保护部环境保护对外合作中心、浙江大学

编制组主要成员：周志广、许鹏军、任玥、齐丽、张炅、刘爱民

标准所技术管理负责人：朱静

监测司项目负责人：张宗祥

目 录

1 项目背景.....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
2 标准制修订的必要性分析.....	2
2.1 二噁英的环境危害.....	2
2.2 相关环保标准和环保工作的需要.....	4
3 国内外相关分析方法研究.....	5
3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	5
3.2 国内相关分析方法研究.....	9
3.3 国内外相关环境监测分析方法的发展趋势.....	10
3.4 国内外方法与本标准的关系.....	17
4 标准制修订的基本原则和技术路线.....	17
4.1 标准制修订的基本原则.....	17
4.2 标准制修订的技术路线.....	18
5 方法研究报告.....	20
5.1 方法研究的目标.....	20
5.2 方法原理.....	20
5.3 试剂和材料.....	20
5.4 仪器和设备.....	22
5.5 样品采集与提取.....	23
5.6 样品净化方法的验证及测定过程.....	26
5.7 方法特性参数.....	33
5.8 质量保证和质量控制措施.....	37
6 方法验证.....	38
6.1 方法验证方案.....	38
6.2 方法验证过程.....	39
6.3 方法验证结论.....	39
7 与开题报告的差异说明.....	39
8 标准实施建议.....	40
9 参考文献.....	40
附一 方法验证报告.....	46

《固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2015年4月，国家环境保护部办公厅发布了《关于开展2015年度国家环境保护标准项目实施工作的通知》，下达了《固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法》国家环保标准制订计划，项目统一编号为：2015-23。由国家环境分析测试中心承担本标准的制定工作。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组并查询国内外相关标准和资料调研

国家环境分析测试中心接到此项标准制订任务后，立即成立标准编制小组，小组成员由项目主持单位和中国环境监测总站、环境保护部对外合作中心、中国科学院生态环境研究中心、浙江大学的相关人员组成，小组成员由从事二噁英研究的科研人员、有多年分析经验的高级工程师、目前主要从事二噁英分析的技术人员与单位项目管理人员组成。2015年5月，标准编制组根据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国环规科技〔2017〕1号）和《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的相关规定，查询和收集国内外相关标准和文献资料。

1.2.2 编制开题报告和标准文本初稿并组织开题论证会

2015年9月完成了《国家环境保护标准制修订项目开题论证报告》及《固体废物 二噁英类筛查 报告基因法》标准文本（草案）的编写。2015年9月29日，环境保护部科技标准司组织召开了本标准的开题论证会，论证委员会听取了标准主编单位所作的标准开题论证报告和标准初稿内容介绍，经质询、讨论，形成以下论证意见：1、标准主编单位提供的材料齐全，内容较为详实完整，格式较规范；2、标准主编单位对国内外相关标准及文献进行了充分调研；3、本标准适用范围、主要内容及编制标准的技术路线较为合理可行，论证委员会通过该标准的开题论证。提出如下修改意见和建议：1、明确技术路线的内容和依据；2、通过实验筛选本标准所适用的细胞株，给出细胞株的质量要求；通过加标方式确定 DL-PCBs 等干扰物质的影响结果，增加干扰与消除的内容；3、采用飞灰、城市污水处理厂的污泥等 2-3 种典型的固体废弃物进行验证；4、按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》（环科函〔2009〕10号）的要求开展实验、验证和标准草案的编制工作。

1.2.3 项目研究工作

编制组进一步优化了前处理和仪器分析等参数，并于2016年2月根据优化后的实验条件，进一步完善了编制说明和标准草案，并组织6家实验室进行方法验证，于2016年8月

开始进行数据汇总和整理分析工作，编写方法验证报告。

1.2.4 编写标准征求意见稿和征求意见稿编制说明

2016年10月，根据《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ168-2010)、《国家环境污染物监测方法制修订工作暂行要求》(环科函(2009)10号)的相关要求编写完成标准征求意见稿和编制说明；2017年3月，编制组根据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(国环规科技(2017)1号)对标准征求意见稿和编制说明进行了进一步的修改和完善，并上报环境保护部监测司和环境标准研究所。

1.2.5 召开征求意见稿技术审查会

2017年7月14日召开了征求意见稿技术审查会，专家组听取了标准编制单位关于征求意见稿的主要技术内容、编制工作过程的汇报，经质询、讨论，形成以下审查意见：

- 一、标准主编单位提供的材料齐全、内容较完整、格式规范；
 - 二、制定的标准具有科学性、通用性和可操作性，能满足测定需求；
- 专家组通过对该标准征求意见稿的技术审查，并提出以下修改意见：

- 1、规范方法检出限和测定下限的描述、补充仪器设备的性能要求；
- 2、将第7章样品的采集与分析拆分为样品和分析步骤分别描述、细化前处理步骤、完善计算公式、进一步核实精密度和准确度的表述；
- 3、进一步按照HJ 168、HJ 565的要求对标准文本和编制说明的征求意见稿进行规范性编辑。

1.2.6 修改标准征求意见稿

征求意见稿技术审查会召开完毕后，标准编制组严格按照专家组的审查意见对标准文稿和编制说明进行了修改，进一步完善了上述两个文本。

2 标准制修订的必要性分析

2.1 二噁英的环境危害

2.1.1 二噁英的理化性质

二噁英不是单一物质，而是多种物质的总称，因此准确的叫法应是“二噁英类物质”。它是对有两个或一个氧原子连接的0-8个氯原子取代的苯环而构成的芳香族有机化合物的统称，包括多氯二苯并-对-二噁英(polychlorinated dibenzo-p-dioxins, 简称PCDDs)和多氯二苯并呋喃(polychlorinated dibenzofurans, 简称PCDFs)。PCDDs和PCDFs的结构如图1-1所示：

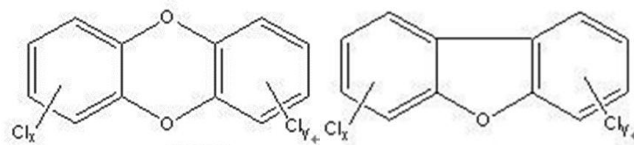


图1-1 PCDDs和PCDFs的结构图

根据取代位置的不同,对于某一氯原子取代的二噁英,其可能存在一种以上的异构体,而对于不同氯原子取代数的二噁英化合物互称同类物,依此定义,PCDDs有75种同类物,PCDFs有135种同类物,所以二噁英类物质共有210种同类物。但是根据世界卫生组织的最新定义已经将共平面的多氯联苯类物质也包括在二噁英类物质中,所以二噁英类还应该包括更多的物质,而我国还没有将多氯联苯列入二噁英类^{[1][2][3]}。

二噁英类是一类非常稳定的亲脂性白色固体化合物,其熔点为302~305℃,饱和蒸汽压很低,在标准状态下低于 1.33×10^{-8} Pa,分解温度大于700℃,极难溶于水,可溶于大部分有机溶剂,所以二噁英类很容易在生物体内累积。自然界的微生物降解、水解和光解作用对二噁英类的分子结构影响较小,难以自然降解^[4]。

2.1.2 二噁英的环境危害及来源

二噁英类是一类剧毒物质,其急性毒性相当于氰化钾的1000倍。大量的动物实验表明,很低浓度的二噁英类就对动物表现出致死效应。从职业暴露和工业事故受害者身上已得到一些二噁英类对人体毒性数据及临床表现,暴露在含有PCDDs和PCDFs的环境中,可引起皮肤痤疮、头痛、失聪、忧郁、失眠等症状,并可能导致染色体损伤、心力衰竭、癌症等。其最大危险是具有不可逆的致畸、致癌、致突变(“三致”)效应^[5]。二噁英类有多种同类物,各同类物的毒性与所含氯原子的数量及氯原子在苯环上取代位置有很大关系。含有1-3个氯原子的同类物被认为无明显毒性;含4-8个氯原子的化合物有毒,其中毒性最强的是2,3,7,8-四氯二苯并二噁英(2,3,7,8-TCDD),动物实验表明2,3,7,8-TCDD对天竺鼠(*guinea pig*)的半致死剂量(LD₅₀)为1 pg/kg,是迄今为止发现过的最具致癌潜力的物质,所以有人把2,3,7,8-TCDD称作为“世纪之毒”^[6]。但是,若不仅2,3,7,8位置上含有4个氯原子,其他4个取代位置上增加氯原子数,则其毒性将会有所减弱。由于环境二噁英类主要以混合物形式存在,在对二噁英类的毒性进行评价时,国际上常把不同组分折算成相当于2,3,7,8-TCDD的量来表示,称为毒性当量(Toxic Equivalent Quantity,简称TEQ)。为此引入毒性当量因子(Toxic Equivalency Factor,简称TEF)的概念,即将某PCDDs/PCDFs的毒性与2,3,7,8-TCDD的毒性相比得到的系数。样品中某PCDDs或PCDFs的浓度与其毒性当量因子TEF的乘积,即为其毒性当量TEQ。而样品的毒性大小就等于样品中所有TEQ的总和^[7]。

有机物燃烧时与无处不在的氯离子生成氯代甲烷和有机氯化物,因此自然界的燃烧过程有可能生成二噁英。Bumb曾提出自然燃烧形成二噁英的观点^[8]。Nestrick和Sheffield等的研究证明森林大火可能是早期环境中的二噁英的主要来源^{[9][10]},因此有理由相信环境中的痕量二噁英很早就存在^[11],据估计自然界中生物燃烧向大气释放的二噁英占大气总沉降量的3%^[12],因此二噁英的自然来源并不大。对湖底污泥中的PCDD/Fs研究结果表明在1935年前,PCDD/Fs没有大范围出现过^[13],从1935到1970年之间PCDD/Fs的增加量是1935年以前的25倍^[14]。美国EPA估计环境中的二噁英来源主要是人类的活动^[15],大致有以下几种:

(1) 烧结及有色金属冶炼。数据表明,目前我国烧结和有色金属冶炼是二噁英第一大排放源。

(2) 城市垃圾和工业固体废物焚烧时生成二噁英类。调查表明,城市固体废物以及含氯的有机化合物如多氯联苯、五氯酚、聚氯乙烯等焚烧时排出的烟尘中含有PCDDs和PCDFs,

其产生机制目前尚不清楚，一般认为它是由于含氯有机物不完全燃烧通过复杂热反应形成的。例如，多氯联苯（PCBs）广泛使用于变压器、电容器和油墨中，这类物品的燃烧，特别是油墨和含油墨的物品混入生活垃圾进入焚烧厂，它们在不完全燃烧的条件下，将会产生PCDFs。五氯酚是一种木材防腐剂，经防腐处理的木材及其木屑、下脚料等，在加热制成合成板或焚烧时，也会产生PCDDs和PCDFs。聚氯乙烯（PVC）被广泛用于电缆线外覆及家用水管等，遇火燃烧亦会产生PCDDs和PCDFs。

（3）含氯化学品及农药生产过程可能伴随产生PCDDs和PCDFs。其生成条件为温度大于145℃，有邻氯酚类物质，碱性环境或有游离氯存在。苯氧乙酸类除草剂、五氯酚木材防腐剂等的生产过程常伴有二噁英类产生。目前，大多数发达国家已经开始削减此类化学品的生成和使用，如美国已经全面禁止2,4,5-三氯苯氧乙酸的使用和限制木材防腐剂及六氯苯的生成和使用，以减少二噁英类的环境污染。

（4）在纸浆和造纸工业的氯气漂白过程中也可以产生二噁英类，并随废水或废气排放出来。

以上四种过程均可导致环境二噁英类污染，但其贡献大小不同。另外，还存在其他一些二噁英类排放源，如燃煤电站、火葬厂、抽烟、含铅汽油的使用等，是环境二噁英类的次要来源，也有的科学家认为任何燃烧过程都或多或少的产生二噁英。

目前对固体废物中二噁英的报道主要集中于垃圾焚烧后飞灰中的二噁英。近年来，我国垃圾焚烧产生的飞灰量大规模增加，据统计我国生活垃圾焚烧处理量约为30万吨/天，经处理后飞灰的产生量约为总量的4%，数量庞大。飞灰等固体废物中的二噁英含量较高，最高可以达到20 ng-TEQ/g以上，而且大约65.3%的二噁英通过飞灰进入环境。2013年，杨立波对全国15家生活垃圾焚烧后产生的飞灰中的二噁英进行了研究^[16]，结果表明飞灰样品中二噁英类物质的浓度范围为2.8-190 ng/g，平均浓度为59.6 ng/g；毒性当量浓度为0.034-2.5 ng-TEQ/g，平均毒性当量浓度为0.79 ng-TEQ/g。PCDDs中六氯取代同系物的浓度最高，PCDFs中四氯取代同系物的浓度最高。PCDDs与PCDFs的浓度比值范围为0.32-2.44，平均值为0.97。DL-PCBs对二噁英总浓度的贡献相对较小，DL-PCBs的毒性当量主要来自3,3',4,4',5-PeCB，各单体中3,3',4,4'-TeCB的浓度最高。1,2,3,7,8-PeCDD和2,3,4,7,8-PeCDF的浓度与飞灰中二噁英总毒性当量浓度线性相关性较好，飞灰中二噁英毒性当量主要来自1,2,3,7,8-PeCDD和2,3,4,7,8-PeCDF。由此可见，二噁英在飞灰中的含量最高，而且也是进入环境的主要途径之一。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

现行国家环境质量和污染物排放（控制）标准中涉及固体废物中二噁英排放控制的有：《生活垃圾填埋场污染控制标准》（GB 16889-2008）规定飞灰中的二噁英含量（毒性当量浓度）低于3 μg-TEQ/kg才可以填埋；《危险废物鉴别标准毒性物质含量鉴别》（GB 5085.6-2007）规定了固体废物中二噁英的含量如果大于或者等于15 μg-TEQ/kg时，即可判断为危险废物；《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002），规定干污泥中的多氯代二苯并二噁英/多氯代二苯并呋喃的含量必须小于100 ng-TEQ/kg时才可以农用；《生活垃圾焚烧污染控制标准》（GB 18485-2014）、《水泥窑协同处置固体废物污染控制标准》（GB 30485-2013）处理固体废物时废气中的二噁英浓度限值为0.1 ng-TEQ/m³。

自 20 世纪 50 年代以来,由二噁英引起的污染事件频繁发生,二噁英类污染物引起了人们的高度重视。中国政府联合九部门发布了《关于加强二噁英污染防治的指导意见》,明确了二噁英的污染防治目标,环境保护部主导的《全国主要行业持久性有机污染防治“十二五”规划》也将二噁英作为重要的目标污染物进行监管与减排。而随着《斯德哥尔摩公约》的签署,我国面临着二噁英检测能力不足的压力。近年来,随着我国经济的发展,固体废物焚烧炉的建设、钢铁及有色金属冶炼产量的大幅提升,造成我国二噁英的年排放量逐渐上升,各种环境介质中的二噁英已被列为环境保护监测项目之一。建立可靠、简单、与国际接轨的二噁英标准分析方法体系,对于减轻二噁英污染、保护生态环境和履行国际公约具有重要应用价值和意义。

目前国内测定固体废物中的二噁英类物质主要是采用高分辨气相色谱-高分辨质谱法(HRGC/HRMS),这种分析方法灵敏度高、特异性和选择性较高,可以精确定量各种异构体,但是也存在诸多缺点,如要求实验条件较高、耗材较贵、前处理流程比较复杂、耗费时间较长、对人员素质要求较高等。正是由于存在上述缺点造成此方法难以大规模的推广使用,同时也造成了有限的实验室与需要测定的大量的二噁英样品之间的矛盾。因此急需建立二噁英的多级监测体系,将适合检测的方法、介质纳入筛查方法体系中。本方法将采用荧光素酶报告基因法检测固体废物中的二噁英。该方法具有以下优点:(1)低的检出限和良好重现性;(2)实验前处理方法操作简单,分析时间短;(3)样品需求量较小。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

二噁英分析方法主要分为仪器的分析方法和生物分析方法,下面将分别介绍上述两类分析方法。

3.1.1 仪器分析方法

3.1.1.1 美国环境保护局(EPA)

3.1.1.1.1 EPA 613《工业废水、城市污水中 2,3,7,8-TCDD 的分析》

1) 适用范围:工业废水、城市污水;

2) 目标化合物:2,3,7,8-TCDD;

3) 方法简介:样品经萃取后,用氧化铝柱及硅胶柱净化;采用 SP-2330 色谱柱,LRMS 或 HRMS 分析;内标为 ^{13}C 或 ^{37}Cl 标记的 2,3,7,8-TCDD;

4) 方法检出限为 $0.002\ \mu\text{g/L}$ 。

3.1.1.1.2 EPA 8280、8280A、8280B《采用气相色谱/质谱联用技术测定 4-8 氯取代的 PCDDs/PCDFs》

1) 适用范围:分析土壤、底泥、飞灰、燃油、蒸馏残渣和水等废物中含 4-8 个氯的 PCDDs/PCDFs;

2) 目标化合物:4-8 个氯的 PCDDs/PCDFs;

3) 方法简介:样品提取后,经碱液、浓硫酸、氧化铝及 PX-2 活性碳柱净化,采用 HRGC/LRMS 分析。可选择三种色谱柱:CP-sil-88、DB-5 或 SP-2250,内标为 ^{13}C 标记的 8

种 2, 3, 7, 8-位取代二噁英。随着新技术的不断出现, 此方法不断的改进, 例如, 出现了 8280A 和 8280B, 8280B 比 8280A 多了当时较先进的萃取方法-加压流体萃取方法;

4) 方法测定下限为 10-50 ng/L 或者 1.0-5.0 µg/kg。

3.1.1.1.3 EPA 8290、8290A 《采用 HRGC/HRMS 技术测定 4-8 氯取代的 PCDDs/PCDFs》

1) 适用范围: 主要分析土壤、底泥、飞灰、燃油、蒸馏残渣和水等废物中含 4-8 氯取代的 PCDDs/PCDFs;

2) 目标化合物: 4-8 氯取代的 PCDDs/PCDFs;

3) 方法简介: 是 8280B 的进一步发展, 主要差别是分析仪器使用了 HRGC/HRMS; DB-5 色谱柱, 并用 DB-225 柱重复分离; 内标使用 ¹³C 或 ³⁷Cl 标记的 11 种异构体;

4) 方法测定下限: 方法测定下限可达到 pg 级别。

3.1.1.1.4 EPA TO-9 《大气中的二噁英类物质测定方法》

1) 适用范围: 测定环境空气中的二噁英类分析方法;

2) 目标化合物: 4-8 氯取代的 PCDDs/PCDFs;

3) 方法简介: 用装填聚氨酯泡沫 (PUF) 的吸附柱吸附环境空气中的二噁英类, 吸附柱用苯萃取后, 用酸化改性的硅胶及酸性氧化铝柱净化, 采用 HRGC/HRMS 分析, 色谱柱为 DB-5; 内标为 ¹³C 标记的 2, 3, 7, 8-TCDD;

4) 方法测定下限: 当采样体积为 300-450 m³ 时, 方法检出限为 0.2 pg/m³。

3.1.1.1.5 EPA 23 《废气中二噁英类物质测定方法》

1) 适用范围: 烟道气中的二噁英类采样和分析方法,

2) 目标化合物: 17 种 2, 3, 7, 8-位取代二噁英;

3) 方法简介: 用滤筒加 XAD-2 吸附柱进行跟踪采样, 样品经提取后, 用改性硅胶、碱性氧化铝净化, 净化液用 HRGC/HRMS 分析; 色谱柱为长 60 m 的 DB-5 及长 30 m 的 DB-225, 质谱的分辨率至少为 10000; 以 ¹³C 标记的 15 种二噁英类异构体为内标, 可以对 17 种 2, 3, 7, 8-位取代二噁英单独定量, 得到准确的毒性当量结果, 并规定了严格的质量控制措施;

4) 方法检出限: 当采样体积为 4 m³ 时, 2, 3, 7, 8-TCDD 的方法检出限为 0.6 pg/m³。

3.1.1.1.6 EPA 1613、1613B 《同位素稀释 HRGC/HRMS 测定 4-8 氯代二噁英类物质》

1) 适用范围: 测定土壤、底泥、组织及其它样品中的 17 种二噁英类异构体;

2) 目标化合物: 17 种 2, 3, 7, 8-位氯取代二噁英;

3) 方法简介: 样品的前处理程序比较复杂, 样品先以酸、碱萃取, 再以酸碱改性硅胶、HPLC、AX-21 活性碳柱、GPC 等净化, 使用 17 种 ¹³C 标记的 2, 3, 7, 8-位氯代异构体内标, 因此可以对 17 种 2, 3, 7, 8-位氯代异构体单独定量, 得到准确的毒性当量结果, 并规定了严格的质量控制措施。

4) 方法检出限: 4.4 pg/L

3.1.1.2 欧盟 (EN)

EN1948 《废气固定污染源废气中二噁英测定方法》

1) 适用范围: 废气中的 17 种 2, 3, 7, 8 位取代的二噁英;

2) 目标化合物: 17 种 2, 3, 7, 8 位取代的二噁英;

3) 方法简介: 用滤筒加 XAD-2 吸附柱进行等速采样, 样品经提取后, 用改性硅胶、碱性氧化铝净化, 净化液用 HRGC/HRMS 分析; 色谱柱为长 60 m 的 DB-5 及长 30 m 的 DB-225, 质谱的分辨率至少为 10000; 以 ^{13}C 标记的 15 种二噁英类异构体为内标, 可以对 17 种 2, 3, 7, 8-位氯代异构体单独定量, 得到准确的毒性当量结果, 并规定了严格的质量控制措施;

4) 方法检出限: 当采样体积为 4 m^3 时, 2, 3, 7, 8-TCDD 的方法检出限为 0.6 pg/m^3 。

3.1.1.3 日本工业标准 (JIS)

3.1.1.3.1 JIS K 0311 《固定污染源废气中二噁英测定方法》

1) 适用范围: 固定污染源废气中二噁英的测定;

2) 目标化合物: 17 种 2, 3, 7, 8 位取代的二噁英和共平面多氯联苯(Co-PCBs);

3) 方法简介: 用滤筒加 XAD-2 吸附柱进行跟踪采样, 样品经提取后, 用改性硅胶、碱性氧化铝净化, 净化液用 HRGC/HRMS 分析; 色谱柱为长 60 m 的 DB-5 及长 30 m 的 DB-225, 质谱的分辨率至少为 10000; 以 ^{13}C 标记的 15 种二噁英类异构体为内标, 可以对 17 种 2, 3, 7, 8-位氯代异构体单独定量, 得到准确的毒性当量结果;

4) 方法检出限: 当采样体积为 4 m^3 时, 2, 3, 7, 8-TCDD 的方法检出限为 0.6 pg/m^3 。

3.1.1.3.2 JIS K 0312 《工业废水和污水中二噁英类物质测定》

1) 适用范围: 工业废水和污水中的二噁英的测定;

2) 目标化合物: 17 种 2, 3, 7, 8 位取代的二噁英和共平面多氯联苯(Co-PCBs);

3) 方法简介: 样品富集、萃取后, 经过硫酸处理然后经过多层硅胶柱或者氧化铝柱, 然后在经过活性炭柱分离, 采用 HRGC-HRMS 分析, 质谱的分辨率至少为 10000, 此方法采用同位素稀释法定量, 可以对 17 种 2, 3, 7, 8-位氯代异构体二噁英和 12 种 Co-PCBs 单独定量;

4) 方法检出限: 当采样体积为 10 L 时, 对 2, 3, 7, 8-TCDD 的方法检出限为 0.5 pg/L 。

3.1.1.4 国际标准化组织 (ISO)

3.1.1.4.1 ISO 16000-12: 2008 《测定室内空气中的多氯联苯、二噁英类物质、多环芳烃时的采样方法》

此方法详细规定了, 在测定室内空气中的多氯联苯、二噁英、多环芳烃时的布点方法、仪器使用方法等具体的采样方法。

3.1.1.4.2 ISO 16000-13: 2008 《采用具有催化剂的吸附装置采集室内空气中的类二噁英多氯联苯、二噁英类物质》

此方法详细的规定了, 在测定室内空气中的类二噁英多氯联苯、二噁英类物质时, 采用附着有催化剂的吸附装置采集样品时的具体操作过程。

3.1.1.4.3 ISO 16000-14: 2009 《采用 HRGC/HRMS 测定室内空气中类二噁英多氯联苯、二噁英类物质》

1) 适用范围: 室内空气中类二噁英类多氯联苯、二噁英类物质;

2) 目标化合物: 17 种 2, 3, 7, 8 位取代的二噁英和共平面多氯联苯(Co-PCBs);

3) 方法简介: 此方法采用气体采样装置采集气体, 样品经过萃取后, 采用多层硅胶柱或者氧化铝柱净化, 然后经过活性炭柱分离, 最后采用 HRGC/HRMS 分析, 此方法采用同

位素稀释法定量，可以对 17 种 2, 3, 7, 8-位氯代二噁英和 12 种 Co-PCBs 单独定量；

4) 方法检出限：当采样体积为 360 m³ 时，方法检出限为 0.2 pg/m³。

3.1.1.4.4 ISO 18073: 2004 《采用同位素稀释和 HRGC/HRMS 仪器测定水、废水中二噁英类物质》

1) 适用范围：水和废水中的二噁英测定；

2) 目标化合物：17 种 2, 3, 7, 8-位氯代二噁英；

3) 方法简介：采用液-液萃取法或者固相萃取法对样品进行富集，然后经过多层硅胶柱净化、活性炭柱分离，最后采用 HRGC/HRMS 测定；

4) 方法检出限：可以达到 4.4 pg/L。

3.1.1.4.5 ISO 17858: 2007 《采用 HRGC/HRMS 测定水、废水中类二噁英多氯联苯、二噁英类物质》

此方法与 ISO 18073: 2004 类似，只是加入了 12 种 Co-PCBs 的分析。

3.1.1.4.6 ISO 13914: 2013 《采用 HRGC/HRMS 测定土壤、生物废弃物、污泥中类二噁英多氯联苯、二噁英类物质》

1) 适用范围：土壤、生物废弃物、污泥中类二噁英多氯联苯、二噁英类物质的测定；

2) 目标化合物：17 种 2, 3, 7, 8-位氯代二噁英和 12 种 Co-PCBs；

3) 方法简介：采用索氏提取或者加速溶剂萃取样品，然后经过液相色谱净化和分离，最后采用 HRGC/HRMS 测定；

4) 方法检出限：可以达到 1 pg/g。

3.1.2 生物检测方法

3.1.2.1 美国 EPA 方法

3.1.2.1.1 EPA 4025 《酶联免疫法筛查土壤中的二噁英类物质》

1) 适用范围：土壤中的二噁英筛查；

2) 目标化合物：二噁英总毒性当量的测定；

3) 方法简介：其前处理的方法为样品萃取、多层硅胶柱净化、活性炭柱分离，然后采用商业化的试剂盒对二噁英进行筛查，由于此方法是筛查的方法，因此灵敏度要比仪器方法低，而且特异性和选择性较差；

4) 方法检出限：500 pg/g。

3.1.2.1.2 EPA 4425 《报告基因法筛查土壤、底质、组织和水中的平面类有机污染物》

1) 适用范围：土壤、底质、组织、水中类二噁英类物质的筛查；

2) 目标化合物：类二噁英类物质；

3) 方法简介：EPA 4425 是采用的报告基因法筛查土壤、底质、组织和水中的平面类有机污染物，如，PAHs、PCBs、PCDD/Fs 等。其所采用的细胞是人源的肝癌细胞。其基本操作流程为：将样品进行提取，然后硫酸处理、简化的多层硅胶柱净化和简化的活性炭柱分离，将样品分离完毕后，对细胞进行暴露，暴露完毕后，对细胞进行裂解，裂解后进行化学发光测定，其发光量的大小与二噁英的量成正比，根据此原理可以定量二噁英的量；

4) 方法检出限：对于土壤和底质中的 PAHs 和 Co-PCBs 而言，其测定范围为 0.1-100

mg/kg, 对于 PCDD/Fs 而言测定范围为 100 ng/kg 至 1mg/kg 甚至更高, 对于水样品, PAHs 和 PCBs 的测定范围为 4 µg/L-4 mg/L, PCDD/Fs 的测定范围为 4 ng/L-40 µg/L。

3.1.2.1.3 EPA 4435 《报告基因法筛查土壤和底质中二噁英类物质》

1) 适用范围: 土壤和底质中的二噁英筛查;

2) 目标化合物: 二噁英类物质;

3) 方法简介: EPA 4435 是报告基因法筛查土壤和底质中二噁英的方法, 也是现在应用最广泛的一种方法, 其原理和 EPA 4425 类似, 但是所使用的细胞系不同, EPA 4435 采用的是小鼠的肝癌细胞。4435 的萃取方法和前处理方法和 4425 类似;

4) 检出限: 其标准溶液的检出限为 0.98 pg/ml, 测定下限为 1.96 pg/ml, 当样品量为 3.5 g 时, 其方法检出限为 1 pg TEQ/g。

3.1.2.2 欧盟 (EN)

3.1.2.2.1 COMMISSION DIRECTIVE 2002/69/EC 和 COMMISSION DIRECTIVE 2002/70/EC

其方法与美国 EPA 4435 相同, 规定了饲料和食品中二噁英的报告基因快速筛查方法。基本操作流程为: 将样品进行提取, 然后硫酸处理、简化的多层硅胶柱净化和简化的活性炭柱分离, 将样品分离完毕后, 对细胞进行暴露, 暴露完毕后, 对细胞进行裂解, 裂解后进行化学发光测定, 其发光量的大小与二噁英的量成正比, 根据此原理可以定量二噁英的量。

3.1.2.3 日本工业标准 (JIS)

3.1.2.3.1 JIS K 0463-2009

日本工业标准 JIS K 0463-2009 中, 规定了迄今为止最为详细的二噁英报告基因检测法, 方法里面共包括 5 种报告基因法 (如表 3-1), 而且日本还规定生物检测法可以应用于污水、土壤、底质的日常筛查, 而且还应用于小于 2 t/h 的垃圾焚烧炉废气的检测以及其他垃圾焚烧炉焚烧产生的飞灰和炉渣中二噁英的检测。此标准的原理与 EPA 4435、欧盟 COMMISSION DIRECTIVE 2002/69/EC 和 COMMISSION DIRECTIVE 2002/70/EC 相似, 但是里面包括的细胞的种类更加全面。

表 3-1 《二噁英生物对策法》中五种报告基因法

方法序号	细胞系名称	原理	标准物质的检出限	标准物质的测定下限
1	H1L6.1c2	报告基因法	0.977 pg/ml	1.95 pg/ml
2	101L	报告基因法	0.3 ng/ml	0.5 ng/ml
3	HeB5	报告基因法	不祥	不祥
4	H4 II E-luc	报告基因法	12.1 pg/ml	15.1 pg/ml
5	DR-EcoScreen	报告基因法	0.03 pg/ml	不祥

3.2 国内相关分析方法研究

3.2.1 仪器分析方法

目前国内关于二噁英分析方法标准有《水质 二噁英类的测定 同位素稀释高分辨气相色谱

谱/高分辨质谱法》(HJ 77.1-2008)、《环境空气和废气 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 77.2-2008)、《固体废物 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 77.3-2008)、《土壤和沉积物 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 77.4-2008)。此四种方法基本上类似于 EPA 1613。这四种方法的前处理基本是：样品经过萃取后，进行硫酸处理，然后多层硅胶柱净化或者氧化铝柱净化，最后采用活性碳柱分离，然后进行 HRGC-HRMS 分析。由于此方法是建立在 HRGC-HRMS 的基础上，所以仪器检出限为 0.1 pg-0.5 pg。关于此方法的优缺点前面已经论述。

3.2.2 生物检测方法

国内关于固体废物二噁英生物分析方法唯一的地方标准是重庆《土壤、沉积物和固体废物 二噁英类的筛查 酶联免疫法》(DB50/T 427-2012)。此方法的建立是基于酶联免疫的方法，前处理是采用简化的多层硅胶柱和活性炭柱，样品净化完毕后，采用商业的试剂盒进行定量，方法检出限为 4.0 ng TEQ/kg。

关于《固体废物二噁英筛查报告基因法》，国内无其他方法涉及到。

3.3 国内外相关环境监测分析方法的发展趋势

由于环境中的二噁英类物质大多以极微量水平存在，且同系物、异构体较多，分离较困难，对分析检测系统的特异性、选择性和灵敏度要求极高，因此其定量检测是超痕量有机分析领域的难点。目前HRGC/HRMS是二噁英类物质检测的“黄金标准”^[17]。但是该方法检测过程复杂，检测成本高昂、通量低、周期长，不适于对环境样品进行大量筛查。近年来，随着生物技术和二噁英毒理研究的发展，研究者陆续发明了多种二噁英类物质的生物检测方法，其通量高、周期短、成本较低，更适合环境样品的大量及快速筛查。2004年中国加入《斯德哥尔摩公约》，在履约任务书中也明确提出了发展生物检测方法的要求，以适应我国二噁英类物质污染范围广，污染源较多的特点^[18]。随着履约的实施进程及国家环境监管需求的不断增加，开发我国自主知识产权的生物检测方法迫在眉睫。二噁英类的生物检测方法主要包括两类，一类是免疫类检测方法，另一类是基于芳香烃受体(AhR)信号通路的检测方法。免疫类检测方法特异性较强，检测方便，耗时较短，成本相对较低，但是灵敏度不足。基于AhR信号通路的方法如EROD、报告基因法等灵敏度较高，能够评价污染物的总体毒性，但是特异性则逊于免疫方法。以下内容将主要综述这两类生物检测方法及其发展趋势，并着重介绍我国二噁英检测体系的发展。

3.3.1 免疫类分析方法

3.3.1.1 酶联免疫分析方法(ELISA)

免疫测定法是指通过抗原-抗体特异性反应对待测物质进行测定的方法。主要原理是利用抗体技术筛选可以特异性识别二噁英类化合物的抗体，并以此特异性抗体为基础通过酶联免疫反应定量二噁英的浓度，此技术的关键是设计出高特异性抗原。1977年，Chae等首次合成二噁英抗原^[19]，1979年，Albro等采用此种方法获得兔抗二噁英多克隆抗体^[20]，但是多克隆抗体存在特异性差等缺点。1975年，英国科学家Milstein和Köhler发明了单克隆抗体

制造技术之后,该技术被应用在二噁英抗体制备上^[21],1987年,Stanker等首次制得抗二噁英的小鼠单克隆抗体^[22],1989年,Vanderlaan等将单克隆抗体应用于对环境样品的检测中^[23]。随着单克隆抗体的应用,根据试剂的来源和标本的情况以及检测的具体条件,发展出一系列检测方法。目前,ELISA方法主要有用于检测抗原的双抗体夹心法、用于检测抗体的间接法以及用于检测小分子抗原或半抗原的抗原竞争法等^[24],而竞争ELISA法又可分为直接竞争法和间接竞争法,以及避免竞争步骤的结合平衡除外法。

双抗体夹心法是检测抗原的常用方法,其原理是利用包被特异性抗体的载体以及酶标记的特异性抗体检测双价或双价以上大分子抗原^[24],由于小分子抗原或半抗原缺乏夹心法所需两个以上的位点,因此双抗体夹心法在二噁英类检测中少有应用。间接法是检测抗体常用方法,其原理是利用已知抗原包被固相载体,加入待测样本,再与酶标记的抗体进行反应,加底物显色以检测与固相抗原结合的抗体^[25]。间接法灵活性较高,只需变换包被抗原就可利用同一酶标抗体检测不同待测抗体。然而在二噁英类生物检测中应用较多的是竞争ELISA法,包括直接及间接竞争法。直接竞争法原理是样品中的受检抗原(二噁英类化合物)与一定量的酶标抗原竞争结合固相抗体,这样与对照相比结合到固相的酶标抗原的量的变化即可反映待测样品中的抗原量(二噁英类化合物)^[26]。间接竞争法则是样品中的抗原(二噁英类化合物)与一定量的固相抗原竞争结合抗体(二噁英类化合物的抗体),之后用酶标二抗识别固相结合抗体,这样固相结合抗体减少的程度即可反映待测样品中的抗原量^[26]。在间接竞争法实验中采用两种抗体,因此比直接竞争法更加准确^[26]。为避免竞争步骤带来的误差,Matsuki等建立了一种以更为自动化的仪器(DXS-600)为检测工具的方法,可以采用此方法测定环境介质中的二噁英类物质。由于避免了人工操作带来的误差以及消除了竞争步骤,检出限为常规酶联免疫的四分之一^[27]。周志广等采用此仪器分析了中国的废气样品,并将结果与HRGC/HRMS进行了对比,呈现出较好的一致性^[28]。

ELISA方法目前在国际上已得到了广泛应用。有研究者已经采用ELISA方法检测了飞灰、土壤、动物组织、沉积物、牛奶、固体废弃物等介质中的二噁英类物质的浓度,其结果与HRGC/HRMS具有较好的一致性^[29-32]。我国对此技术的研究开始于2003年,上海市检测中心应用此技术筛查了上海市土壤和底质中的二噁英,2009年国家环境分析测试中心则将此技术应用于废气、飞灰的检测,检出限分别为:0.01 ng-TEQ/m³和0.003 ng-TEQ/g^[33],2010年重庆市固体废物管理中心正式规定了将此方法列为土壤和底质的筛查方法,成为我国第一个地方环保标准^[34]。

3.3.1.2 时间分辨荧光免疫法

ELISA方法虽然操作简便,但是在灵敏度方面还存在明显的不足,研究人员进一步改进了竞争ELISA法,将辣根过氧化物酶(HRP)标抗原(二噁英)换成铕原子标记的抗原,并应用抗二噁英的单克隆抗体,从而发展出时间分辨荧光免疫法(DELFIA)^[35]。与ELISA方法类似,样品中的二噁英浓度越高,则与铕原子标记的某种特殊抗原结合的就越少,最后通过分析荧光强度推算样品中二噁英类化合物的浓度。此方法可以消除非特异性荧光干扰,大大提高了灵敏度,而且需要较少的样品量,降低了检测成本^[36-37]。目前研究者已将DELFLIA方法应用于动物脂肪等样品的检测,其检测限为48 ng/g,检测结果与GC-MS检测结果的相关性系数为0.903^[37]。

3.3.1.3 免疫类检测技术的发展

由于免疫方法操作简便快速,已应用于对环境样品及多种生物样品的二噁英类定性及半定量分析,但是该类生物检测方法依然存在一些明显的缺陷,研究者针对这些缺陷对免疫法进行各种改造,同时也形成了该类生物检测方法未来发展的方向。

首先,在检测限方面免疫类检测方法仍然存在较大的局限性。为克服灵敏度上的缺点,研究者将其他涉及信号放大的灵敏的生物分析方法与免疫分析法结合起来检测浓度较低的样品。其中 Real-time immuno-polymerase chain reaction (Rt-IPCR)就是一种效果较好的联用方法。此种方法的核心和间接竞争 ELISA 法相同,将抗原孵育在 PCR 管上,然后加入抗二噁英抗体和含有二噁英类物质的待测样品,随后加入一定量生物素化的二抗来取代传统方法中的酶标二抗,与已经固定在 PCR 管上的抗二噁英抗体进行结合,再加入亲和素和生物素标记的 DNA 标签,以便在 PCR 管底形成生物素标记的二抗、亲和素以及生物素标记的 DNA 标签的夹心复合物,最后应用 PCR 扩增法定量 DNA 标签,以推算样品中二噁英的含量^[38-40]。其原理图如图 3-1 所示。这种方法是综合应用生物放大技术的一个很好的实例,目前已经应用于对实际环境样品的检测,例如 Chen 等利用此方法检测了土壤中 PCBs 的浓度,其检出浓度可低至 10 fg/ml,并且与 GC-MS 检测结果的相关性系数达到 0.99,充分说明了该方法的高特异性和灵敏性^[41]。从实践上验证了多种生物放大技术的综合应用是免疫检测方法优化的一个很好的思路。

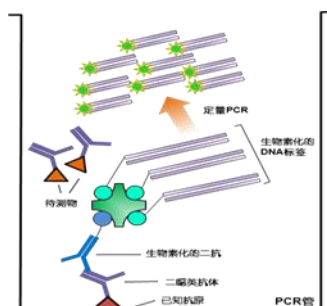


图3-1 Rt-IPCR检测原理示意图

另外,由于环境样品较复杂,往往是多种二噁英同类物并存,而免疫类检测方法通常只针对一种二噁英同类物而设计,在二噁英类总毒性当量分析方面也存在局限性。为突破这方面的局限并拓宽免疫类检测方法的应用范围,研究者将多种抗体混合在一起对样品进行检测,例如, Glass 等将多种单抗混合在一起检测 PCB 类物质并建立了多种抗体混合检测时的计算模型,在检测多成分样品时相对于传统的 ELISA 方法简化了检测过程,但是计算过程相对较为复杂^[42]。为实现对多种二噁英同类物的检测及高通量筛查,抗体的特异性、亲和力及合成过程的成本消耗将在很大程度上影响整体的检测成本。近年来一些研究者开始研究重组单克隆抗体,相对于传统的单克隆抗体和多克隆抗体,重组单克隆抗体具有生产成本较低、稳定、亲和力高等优点^[43]。但是重组单克隆抗体制作过程较为复杂并且需要特殊的生物工程技术,使得该技术目前对于 ELISA 优化的主要贡献在于提高了检测系统对于 DMSO 的耐受性,避免了在实验之前需要较大程度地稀释样品的问题^[44-45]。因此,一方面针对二噁英类等小分子化合物单克隆抗体的制备技术仍有进一步优化和发展的空间,另一方面亟需其他生物检测方法的发展以应对二噁英类总毒性当量分析的需求,由此基于 AhR 信号通路

的检测方法成为该领域的一大焦点。

3.3.2 基于 AhR 信号通路的检测方法

近年来，由于二噁英类总毒性当量生物分析检测方面的需求不断提高，基于AhR信号通路的新型二噁英生物检测技术层出不穷，一方面在灵敏度及实际样品检测的适用性方面进行了不断的优化；另一方面在检测原理方面不再局限于信号通路的终点，而是着眼于整个信号通路的不同环节，呈现出全通路检测的趋势，这不仅有助于进行全面的AhR相关毒性的评估，还将生物检测与毒性机制的阐述有机结合起来，另外，还有助于摒除终点法检测所造成的“假阴性”，从而实现对所具有信号通路扰动作用的可能的化合物的检测。

基于AhR信号通路的检测方法的发展有赖于多年以来对AhR信号通路的深入研究，如图3-2所示，二噁英的细胞效应多由下述信号通路所介导。二噁英进入细胞与胞质内的AhR结合，活化AhR并形成二噁英-AhR复合物，随后二噁英-AhR复合物转移入核，在细胞核中聚集，并与AhR转运蛋白(Ah receptor nuclear translocator protein, ARNT)结合形成异二聚体，进而与基因上游的特异增强子即二噁英反应原件(Dioxins responsive element, DRE)结合，激活效应基因的转录，其中最经典的效应基因包括CYP家族成员，如CYP1A1等^[46-47]。虽然上述过程中还存在许多未知的细节，如AhR信号通路的激活与毒理学效应之间的关联等，需要研究者进行进一步探索，但是目前针对二噁英类化合物能激活AhR、诱导AhR信号通路中重要的生物分子的各个特征性进程，研究者们构建了一系列生物分析方法。这些重要的分子进程包括配体-受体结合、受体激活后核转运过程、入核后与特定DNA序列结合及诱导下游相应基因转录和表达等（图3-3）。

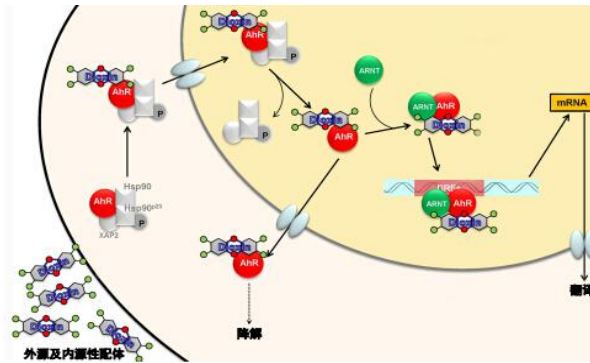


图3-2 AhR依赖的信号通路是二噁英细胞效应的主要媒介



图3-3 AhR信号通路的分子进程

3.3.2.1 基于受体和配体结合的方法

传统的受体和配体结合方法是含有二噁英类化合物的待测样品与一定量同位素标记的二噁英标记品（如³H 标记的TCDD）竞争一定量的AhR，然后通过测定不与AhR结合的放射性TCDD的量来推算待测二噁英类化合物与AhR的亲合力，曾用于测定PCDF等物质与AhR的亲合力^[48]，但是放射性元素氚的使用限制了该检测方法在普通实验室中的应用。Wang等构建了一种全新的类似于荧光共振能量转移(Forster resonance energy transfer, FRET)技术的配体-受体结合实验。该技术无需使用放射性元素，可以方便、高通量地检测二噁英污染物等配体与AhR受体之间结合的情况^[49]。其检测原理如图3-4所示，构建配体-荧光淬灭剂结合物以及荧光蛋白GFP与AhR的融合蛋白，当配体与AhR结合后，使得GFP与荧光淬灭分子相接近，诱发绿色荧光淬灭，当存在于样品中的其他竞争性AhR配体(如二噁英类物质)存在的时候，与配体-荧光淬灭剂形成竞争，造成绿色荧光淬灭的程度减弱，这样根据绿色荧光的变化就可以推算出样品中AhR配体的含量^[49]。该方法可作为传统的DRE相关的生物检测方法的一种补充，并为在活细胞条件下实时研究相应配体与人AhR结合的过程奠定了基础。

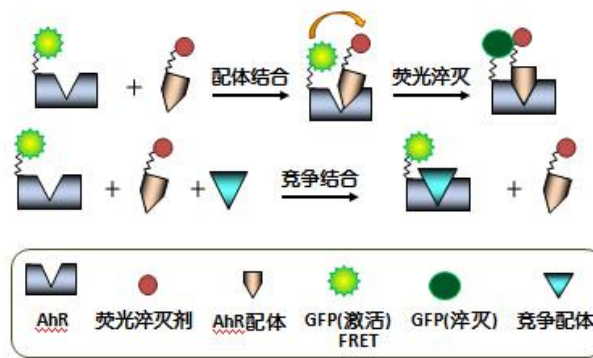


图3-4基于FRET的AhR配体-受体结合方法原理

3.3.2.2 基于AhR受体核转运过程的检测方法

AhR受体被二噁英激活后入核的过程也是污染物致毒的重要环节，Zhao等根据此构建了一种基于绿色荧光蛋白标记的AhR的可视化的方法，可利用荧光显微镜实时观测整个入核过程。当细胞暴露于二噁英，二噁英与AhR结合进而由细胞质转入细胞核，细胞核内的荧光强度会显著增强，这样根据不同时间荧光的亚细胞分布及强度变化可以推断出配体激活的进程，而当有AhR信号通路的抑制剂存在时，这种入核的过程被明显抑制^[50]。虽然目前该方法仅限于对标准物质的实验室检测，并且以定性检测为主，但是为未来实现具有生物学意义活细胞可视化的检测奠定了基础；此外随着高分辨显微成像技术及图像数据处理技术的发展、荧光蛋白技术的完善及稳定转染细胞系的建立，该方法实现定量检测是必然的趋势。

3.3.2.3 基于AhR-ARNT与DRE结合的检测方法

当AhR入核与ARNT形成异源二聚体后需要识别及结合特定DNA序列，才能够诱导下游基因的转录表达，如果无法结合到DNA上，将不能够产生相应毒性效应，因而构建方法分析与DNA结合这一过程也非常重要。传统方法使用带有³²P同位素标记的DNA标签，通过凝胶阻滞实验实现检测，虽然灵敏度较高，但是具有放射性危害。为提高检测方法的安全性，

发展具有相当灵敏度的凝胶阻滞的检测方法，研究者用带有荧光的或生物素标记的DNA标签代替³²P同位素标记，同样可以实现检测，但是不及同位素法灵敏^[51]。

Sun等则构建了酶切保护PCR方法检测二噁英系统，二噁英-AhR复合物与一定量的特定的DNA片段两端的DRE位点结合，使得这段DNA得到保护免遭外切酶的酶切，而游离DNA则被外切酶酶切，随后利用定量PCR法分析保护下来DNA片段则可定性和定量地估算二噁英含量，该方法灵敏度较高，对于TCDD的最低检测限为0.01 pmol·L⁻¹，EC₅₀值为3 pmol·L⁻¹^[52]。

由Wheelock等建立的Ah免疫法（AhR-I）是基于AhR信号通路的一种ELISA法，在孵育了链霉素的96孔板中加入生物素标记的DRE寡核苷酸序列，以及富含AhR和ARNT的裂解液和待测样品，如样品中存在二噁英类物质，则可在板底形成AhR:ARNT:DRE的复合物，随后加入抗AhR或ARNT抗体以及酶标记的二抗和过量的相应酶底物，通过酶催化底物反应产生的吸光度来推算样品中二噁英类物质的含量。该方法不需要培养细胞，也不需要购买较昂贵的设备，操作较简单，检测限也相对较高^[53]。与前述的ELISA方法不同，AhR-I法需要应用AhR或ARNT的抗体，并与毒理效应相关，可以获得总毒性当量等指标。而AhR或ARNT单克隆抗体的获得、特异性及亲和力以及DRE寡核苷酸序列的选择等是进一步优化AhR-I法的重要方面。

3.3.2.4 基于基因转录表达的检测方法

基于基因转录表达的检测方法包括两类，一类是基于效应基因的检测方法，另一类是以重组细胞为检测工具的检测方法（如CALUX）。

（1）基于效应基因的检测方法

体内法主要检测AhR信号通路直接调控的CYP1A1基因或者其他特征基因或蛋白的表达情况，这些基因就是二噁英的生物标记（biomarker）。随着基因表达调控生物技术的发展，目前多采用荧光定量PCR检测其mRNA的表达水平^[54-55]，或者用乙氧基异吩噻唑酮-O-脱乙酰酶（EROD）法在蛋白水平检测CYP1A1基因表达产物EROD的酶活性。荧光定量PCR检测因其检测灵敏度既与所用的动物模型有关，又与检测的基因、采用的器官以及检测方法有关，且检测周期长，费用高，在二噁英的大规模筛查上已不再常用^[56-59]。而实验证实二噁英类物质导致毒性的能力与诱导EROD酶的能力是呈正比的。20世纪80年代，美国食品与药物管理局首次以EROD作为指标应用H4IIE细胞检测提取物中的多卤代烃（PHH），其结果显示该方法对于TCDD的检测限为10 pg/assay^[60]。作为与毒性相关的经典二噁英生物检测方法，研究者们在不同种属的细胞系统对EROD法进行了优化，并使之应用在对实际环境样品的检测中。如Sanderson等利用H4IIE-wt细胞对二噁英类物质进行了检测，检测限达到了20 pmol/L^[61]。在EROD实验中，常用的细胞系参数如表3-2所述，涉及鱼、大鼠、鸡及人类的细胞系，但是检测参数却大相径庭。在实际应用方面，Behnisch等将EROD法与其他生物检测方法相结合测定了飞灰中二噁英类物质的含量^[62]，Wu等人利用EROD法测定了沉积物等环境介质中二噁英类物质的含量，其检测结果与GC-MS检测结果具有很好的相关性^[63]，Torre等利用EROD法检测土壤中二噁英类物质等^[64]。相比定量PCR法，EROD法具有检测周期短，结果精确而且灵敏度较高的特点，是生物检测方法中的“黄金标准”，但是也有研究表明EROD法也存在底物竞争性抑制的缺点，同时容易出现假阴性结果，且其检出限仍然不能满足超痕

量环境二噁英的筛查，而荧光素酶报告基因法在灵敏度方面具有更明显的优势和优化空间。

表3-2 EROD法所用细胞系参数

种属	细胞系	EC ₅₀ (pmol/L)	参考文献
鱼	PLHC-1	17.9	Torre 2013 ^[64]
鱼	RTL	6	Denison 2004 ^[65]
大鼠	H4IIE	3.79	Kang 2011 ^[66]
鸡	Hepatocytes	2.6	Denison 2004 ^[65]
人	HepG2	100 (pg/assay)	Denison 2004 ^[65]

(2) 荧光素酶报告基因法 (CALUX)

1993年, Denison等将萤火虫的荧光素酶作为报告基因结合到控制转录的DRE下游, 制备成报告基因质粒并转染H4IIE大鼠肝细胞以获得稳定转染的细胞株, 当待测样品与细胞株共同孵育后, 其中的二噁英类化合物将进入细胞, 激活细胞内源的AhR信号通路, 从而激活报告基因上游DRE诱导荧光素酶的转录表达, 而该报告基因的表达水平和二噁英的毒性系数相对应, 最终可测得待测样品中二噁英类的含量, 该方法被称为荧光素酶报告基因法 (Chemical-activated luciferase gene expression, CALUX) ^[67]。

由于稳定转染细胞株的获得是基于常规的基因工程改造过程, 因此获得灵敏度较高的检测细胞株的最核心技术是如何获得具有良好特异性及灵敏度的二噁英响应的报告基因质粒。由于AhR与二噁英结合的亲和力具有明显的种属差异性, 所选细胞的种属来源与检测灵敏度也有很大关系, 如人源的细胞系较啮齿类细胞灵敏度低; 而细胞信号通路调节剂 (如地塞米松等) 以及报告基因合成过程中细胞培养条件的改变 (如适当降低温度等) 都可明显增加CALUX方法的灵敏度, 进一步降低检出限^[68]。除了以上对生物检测法本身优化的几个方面以外, 样品前处理方法的优化也将有助于检测系统特异性及抗干扰能力的增强。

除Denison的CALUX系统以外, 国际上其他研究团队例如Takeuchi等也构建出了二噁英检测细胞株, 其最低检出限为0.1 pmol/L TCDD^[69]; Zhou等采用此细胞株分析了高浓度样品, 例如, 废气^[70]; Kojima等则分析了低浓度样品, 例如, 大气和食品等, 其结果与HRGC-HRMS保持良好的相关性^[71]。CALUX方法分析样品中的二噁英时, 无论线性范围还是灵敏度, 均高于EROD方法, 而且在实际样品的前处理方面, CALUX方法前处理过程简单, 成本较低, 已经成为美国、欧盟法定分析方法^[72-73]。近年来, 研究者在构建高灵敏度重组细胞株方面进行了不断的探索, 目前使用的不同细胞株的灵敏度有了较大提高, 见表3-3。

中国科学院生态环境研究中心、国家环境分析测试中心等单位也将此方法试用在废气、飞灰、土壤底质等介质二噁英检测上, 并与HRGC/HRMS相比得到了较好的结果, 初步验证了基于报告基因的二噁英生物分析方法的实用性。然而在我国, 相关方法的系统研发及标准建立在过去十几年一直处于空白, 主要原因在于缺乏具有自主知识产权的二噁英检测细胞株。前面提到获得高灵敏检测细胞株的最核心技术是具有自主知识产权的高特异及高灵敏的二噁英响应报告基因质粒的研发, 在对小鼠CYP1A1基因上游启动子序列及其中的7个DRE序列进行详尽转录效率分析的基础上, 本课题组发现不同的DRE位点、DRE序列的方向、DRE周边序列以及DRE的通用序列中N的不同都会影响转录效率。利用序列截断技术以及突

变技术，找到了转录效率最高的DRE序列，而且高转录效率序列在人和小鼠中保守性很高。通过反转核心DRE序列，所有DRE位点的转录效率都降低，证明了周围序列在基因转录过程中的重要性。当通用序列中N为“T”或“C”时，转录的效率比较高。此外高转录效率DRE序列的多少也在一定程度上影响着报告基因质粒的灵敏度，但是DRE不能无限增多，存在一个最优的DRE个数。在报告基因质粒和检测细胞株筛选的过程中，传统的概念认为二噁英暴露后报告基因表达水平较溶剂对照升高的倍数是主要的筛选指标，而对CALUX系统改进的研发过程提示荧光强度也应纳入为筛选因素，一味追求检测的特异性而在检测强度上做出过多的牺牲，将提高对检测器的要求，可能不利于对超痕量二噁英类的实际检测。在上述研究的基础上，本课题组构建出了灵敏度可达0.01 pmol/L的质粒，通过稳转小鼠肝癌细胞，得到了超高灵敏的，具有自主知识产权细胞株，可用于二噁英类样品的大面积筛查和高通量检测，相关方法正在基层环保监测部门进行初试，为制定二噁英生物分析方法的国家标准奠定了良好的基础，同时也为优化基于报告基因的生物检测法提供了借鉴。

表3-3 CALUX方法细胞株参数

种属	细胞系	DRE 个数	EC ₅₀ (pmol/L)	MDL (pmol/L)	参考文献
小鼠	H1L7.5c3	20	10-16	0.01	He 2011 ^[72]
小鼠	H1L7.2c1	8	56-84	1	He 2011 ^[72]
小鼠	H1L6.1c2	4	12-50	1	He 2011 ^[72]
小鼠	H1L1.1c2	4	70	1	He 2011 ^[72]
小鼠	DR-EcoScreen	7	2.8	0.1-1	Takeuchi2008 ^[69]
小鼠	H1L7.5c1	20	6.9	0.1-1	Langenhove2011 ^[73]
人类	HKY1.7	4	200	10	Yang 2008 ^[74]
人鼠	AZ-AHR		1310-1980		Novotna 2011 ^[75]
鱼	RTL1.0/2.0	4	64	1-4	Hahn 2002 ^[76]

3.4 国内外方法与本标准的关系

2009年和2013年本实验室在环保公益项目的资助下，分别进行了二噁英生物检测分析方法的研究，对目前世界上主要的二噁英生物检测方法进行了验证，筛选出了适合我国国情的细胞株，同时本课题组也构建了具有自主知识产权的细胞株。

本标准是在美国EPA 4435、日本JIS K 0463的基础上进行一定的优化与扩充，分析指标和应用范围更广，更适合中国目前的环境监测现状。

4 标准制修订的基本原则和技术路线

4.1 标准制修订的基本原则

(1) 方法的检出限和测定范围满足相关环保标准和环保工作的要求

本标准方法的检出限和测定范围至少应满足《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB 16889-2008)、《危险废物鉴别标准毒性物质含量鉴别》(GB 5085.6-2007)、《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)等标准的控制限值的要求。

(2) 方法准确可靠，满足各项方法特性指标的要求

至少进行 6 家实验室方法验证, 对本标准方法进行可行性验证, 以确保本标准方法采用的分析技术和规定的各项技术指标准确可靠。

(3) 方法具备普遍适用性, 易于推广使用

既参考国外最新的方法技术以及仪器设备, 又考虑国内监测机构现有仪器水平及技术储备, 使制订后的标准分析方法能满足相关环保标准和环保工作的要求, 确保方法标准的科学性、先进性和普遍适用性。

4.2 标准制修订的技术路线

4.2.1 采用本项目技术方案的理由

(1) 与国际主流分析方法接轨

目前美国 EPA4435 主要用于分析土壤和底质中的二噁英类物质, 该方法得到国际国内的广泛认可, 本方法与此方法类似, 分析数据之间更具有可比性。

(2) 更低的检出限

该方法对二噁英类物质的检出限 0.98 pg/ml, 当取样量为 3.5 克时, 样品检出限为 1 pg-TEQ/g。相比较国内外其他生物分析方法具有更低的检出限, 能适应固体废物中二噁英的分析要求。

(3) 更稳定的分析结果

本方法采用灵敏度较高的细胞株测定, 相比较其他生物分析方法, 具有灵敏度高、特异性高等优点。

(4) 简单的前处理方法

本方法主要通过简化的多层硅胶柱和简化的活性炭柱净化, 无溶剂的大量使用, 在操作上, 相比较于传统的二噁英分析方法, 更为简单和高效。

(5) 分析成本低

本分析方法所用试剂用量少, 每个样品分析所用试剂最多 20 ml, 相关耗材如多层硅胶柱和活性炭柱的填料用量较少而且价格也较低。

(6) 分析时间短

由于使用简化的多层硅胶柱和活性炭柱, 而且此方法可以批量处理大量的样品, 所以大大简化分析步骤和缩短了测定时间。

编制组在美国 EPA 4435 和日本 JIS K 0463 的基础上, 通过实验验证了前处理等相关参数, 同时验证了检测指标和应用范围等技术内容。

4.2.2 国内环境监测系统相关仪器设备的装备情况

目前国内具有二噁英生物检测能力的实验室有 10 几家, 主要集中在北京以及发达地区的高校、科研单位。但是目前国内使用的测定用的细胞主要有两种, 一是国外公司提供的第二代细胞株, 另外一种是国内自主研发的第三代细胞株, 本标准主要采用国际上应用较为广泛的第二代细胞作为验证细胞。选择河南省环境监测中心站、中国农业科学院、湖南省环境监测中心站、广西壮族自治区环境保护监测中心站、成都市环境保护科学研究院、宁波市环境监测中心作为验证单位, 6 家验证单位均具备独立的二噁英生物检测实验室, 实验室装备

了较先进的酶标仪、培养箱、显微镜等，上述实验室条件和仪器装备可以满足实验的要求。

4.2.3 本分析方法的应用前景

本分析方法具有低的检出限和较短的分析时间，能适用于固体废物中二噁英类物质的快速筛查，可以作为传统分析方法的补充，如果稍微改进前处理方法，此方法还可以扩展到其他介质的分析，如土壤、沉积物、废气、生物样品、大气等样品的分析。具有较大的应用范围和良好的应用前景。

4.2.4 技术路线图

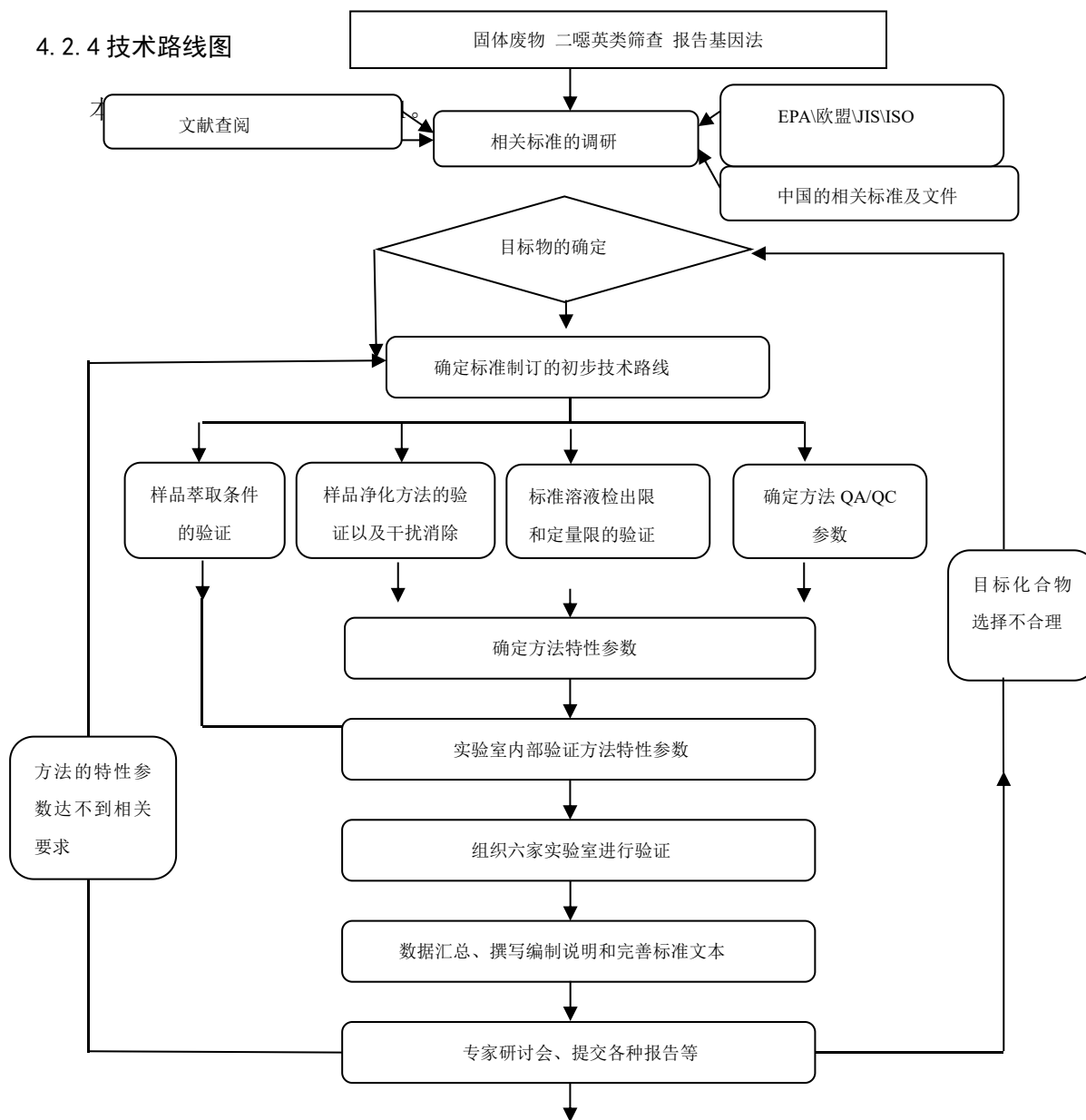


图 4-1 技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

本标准规定了固体废物中二噁英类筛查的报告基因法，包括适用范围、方法原理、干扰和消除、试剂和材料、仪器和设备、样品采集和保存、样品制备、定性定量方法、结果的表示、质量控制和质量保证等几方面的内容，研究的主要目的在于建立既适应当前环境保护工作的需要，又满足当前实验室仪器设备要求的标准分析方法。

5.1.1 适用范围

由于本方法不能测定各异构体的含量，测定的是所有二噁英类物质的总毒性当量，因此标准适用于固体废物中二噁英总毒性当量的测定。

5.1.2 本标准拟达到的特性指标

(1) 本标准方法对二噁英类物质的测定下限为 1.96 pg/ml，满足《生活垃圾填埋场污染控制标准》(GB 16889-2008)、《危险废物鉴别标准毒性物质含量鉴别》(GB 5085.6-2007)、《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)等有关二噁英控制限值的要求。

(2) 准确度要求：同位素取代的内标回收率为 40%-130%，基质加标的回收率为 80%-120%。

(3) 精密度要求：实验室内的三种浓度水平的平行测试结果（大于等于 6 次）相对标准偏差小于 20%。实验室准确度实验测试结果（大于等于 6 次）相对标准偏差小于 20%。

5.2 方法原理

本标准的原理为：利用荧光素酶转基因重组细胞与二噁英类及芳香烃受体 (AhR) 结合的特性，通过测定荧光素酶活性求得样品中二噁英类总量。该系统合成的荧光素量以及荧光强度与测试系统加入的二噁英类物质的量成正比。

5.3 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的农残级试剂，并进行空白试验。有机溶剂浓缩 10000 倍不得检出二噁英类。实验用水为用正己烷充分洗涤过的蒸馏水，但与细胞培养相关的水必须是灭菌后的超纯水。

5.3.1 前处理过程

固体废物中的二噁英分析容易受到基质干扰的影响，对萃取液进行硫酸处理可以减少基质干扰的影响。硫酸处理过程中，需要对硫酸的量进行控制，一般需要每次添加 10 ml，然后震荡 5 min，静置 5 min，如此循环直至硫酸层无色，然后采用去离子水将萃取液洗至中性。然后再进行下一步的多层硅胶柱净化工作。

5.3.2 细胞培养基

根据所使用的细胞营养需求，来决定培养基的种类。可以选择美国模式培养物集存库

(ATCC) 推荐的培养基, 也可以根据实际培养过程中的经验选择适合的培养基。培养基中通常加入 10% 的胎牛血清 (FBS) 以及 1% 体积百分比的青霉素/链霉素混合溶液。

血清可以向细胞提供生长因子、粘附因子、激素、脂类以及矿物质。此外, 血清还可以调节细胞膜的通透性, 并且作为脂类、酶以及营养物质的载体运送至细胞内。胎牛血清取自剖腹产的胎牛, 小牛血清取自出生后的小牛。由于胎牛血清中所含抗体、补体等成分最少, 最适于细胞培养。

青霉素/链霉素混合溶液加入培养基后, 有利于抑制细菌生长, 避免细胞污染。同时, 高浓度的青霉素/链霉素会抑制细胞生长。因此, 培养过程中应按照推荐浓度使用。

5.3.3 胰蛋白酶溶液

胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白水解酶, 可以水解细胞间的蛋白质从而离散细胞, 因而用于贴壁细胞的消化。胰酶的活性与其浓度、温度和作用时间相关。胰酶的最适 pH 为 8.0, 最适温度为 37°C。常用的胰酶浓度为 0.25% 以及 0.05%, 可以根据细胞特性、作用条件再进行选择。Ca²⁺、Mg²⁺ 和血清可降低胰酶的活性, 可以通过加入含有血清的培养基来终止胰酶的消化作用。胰酶的过度消化会造成细胞损伤。

5.3.4 细胞冻存液

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一。利用冻存技术将细胞置于 -196°C 液氮中低温保存, 可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来, 这样在需要的时候再复苏细胞用于实验。而且适度地保存一定量的细胞, 可以防止因正在培养的细胞被污染或其他意外事件而使细胞丢种, 起到了细胞保种的作用。除此之外, 还可以利用细胞冻存的形式来购买、寄赠、交换和运送某些细胞。

细胞冻存时向培养基中加入保护剂 (通常为甘油或二甲基亚砷), 可使溶液冰点降低, 加之在缓慢冻结条件下, 细胞内水分透出, 减少了冰晶形成, 从而避免细胞损伤。采用“慢冻快融”的方法能较好地保证细胞存活。标准冷冻速度开始为 -1 到 -2°C/min, 当温度低于 -25°C 时可加速, 到 -80°C 之后可直接投入液氮内 (-196°C)。常用的细胞冻存液为含血清的培养基与 DMSO 按照 9:1 的体积比配制而成, 现用现配即可, 亦可选择商品化的细胞冻存液。

5.3.5 荧光素酶测定 96 孔板

测定荧光素酶应选择透明底、白色的 96 孔板, 在读数之前, 在底部贴上一层不透明的膜, 才能测得正确值。

5.3.6 细胞裂解液

用来裂解细胞, 释放细胞中的荧光素酶等物质, 其主要成分是界面活性剂, 不能含有抑制荧光素酶活性的物质。荧光素酶检测试剂盒中一般配备有 5× 浓度的细胞裂解液, 使用前现用现配, 可以使用超纯水或者磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 稀释。

5.4 仪器和设备

5.4.1 酶标仪

酶标仪核心是一台光电比色计或分光光度计，其基本工作原理与主要结构和光电比色计基本相同。检测单位用 OD 值表示，OD 是 optical density（光密度）的缩写，表示被检测物吸收掉的光密度。多功能酶标仪指拥有多种检测模式的单体台式酶标仪，通常多用途高端型酶标仪可以进行吸光度（Abs）、荧光强度（FI）、时间分辨荧光（TRF）、荧光偏振（FP）和化学发光（RLU）检测。

5.4.2 CO₂ 细胞培养箱

一般细胞培养基的 pH 在 7.0-7.4 之间，大多数培养基用碳酸盐缓冲系统来维持稳定的 pH。对大多数以碳酸盐作为 pH 缓冲系统的培养基而言，为了维持稳定的 pH，培养箱中的二氧化碳需要维持在 2%-10% 之间，以保持培养基中溶解的二氧化碳的浓度。细胞培养基中常添加其他的 pH 缓冲系统，比如 4-羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）缓冲系统，来增加 pH 缓冲能力。此外，CO₂ 细胞培养箱还必须保证细胞培养所需要的温度能够维持在 37℃ 左右。

5.4.3 离心分离机

离心机是利用离心力，分离液体与固体颗粒或液体与液体的混合物中各组分的机械，又称离心机。在将细胞与培养基进行分离时，大多使用 1 000 rpm 的转速，因此要求选用的离心机在转速上应达到要求。

5.4.4 生物安全柜

生物安全柜可分为一级、二级和三级三大类以满足不同的生物研究和防疫要求。一级生物安全柜可保护工作人员和环境而不保护样品。二级生物安全柜是目前应用最为广泛的柜型。与一级生物安全柜一样，二级生物安全柜也有气流流入前窗开口，被称作“进气流”，用来防止在微生物操作时可能生成的气溶胶从前窗逃逸。与一级生物安全柜不同的是，未经过滤的进气流会在到达工作区域前被进风格栅俘获，因此试验品不会受到外界空气的污染。二级生物安全柜的一个独特之处在于经过 HEPA 过滤器过滤的垂直层流气流从安全柜顶部吹下，被称作“下沉气流”。下沉气流不断吹过安全柜工作区域，以保护柜中的试验品不被外界尘埃或细菌污染。按照 NSF49 中的规定，二级生物安全柜依照入口气流风速、排气方式和循环方式可分为 4 个级别：A1 型，A2 型(原 B3 型)，B1 型和 B2 型。所有的二级生物安全柜都可提供工作人员、环境和产品的保护。三级生物安全柜是为 4 级实验室生物安全等级而设计的，是目前世界上最高安全防护等级的安全柜。本方法中使用二级生物安全柜即可满足要求。

5.4.5 液氮罐

用于冻存细胞的长期保存，可根据冻存细胞的数量选择不同容量。取放提斗时，应先将提斗略微提高，使斗底离开底座，再将提斗平行移至罐的中央，顺其自然向上提，动作要从容迅捷，不可使用强力，以免扭弯或折断把柄；手柄要放妥分度圈内，盖好盖塞以免液氮气

化损失。应关注液氮罐内剩余液氮体积，及时进行补充。

5.4.6 显微镜

对于生物的研究，使用最广泛的是正置显微镜和倒置显微镜。正置显微镜的物镜在被观测物体的上方，而倒置显微镜的物镜在被观测物体的下方。正置显微镜操作方便，但是工作路径较短，适用于观察切片、血球计数板等。倒置显微镜适于观察活体细胞及其动态。

5.4.7 灭菌器

微生物广泛存在于周围环境中，由于细胞培养必须严格执行无菌操作，因此需要对所用的物品进行消毒灭菌。通常有湿热灭菌和干热灭菌两种方法。湿热灭菌法是用饱和水蒸气、沸水或流通蒸汽进行灭菌的方法，以高温高压水蒸气为介质，由于蒸汽潜热大，穿透力强，容易使蛋白质变性或凝固，最终导致微生物的死亡。常用的高压蒸汽灭菌法应当在排尽冷空气后，关闭排气阀，待压力上升至 103.4 kPa 蒸汽压，温度达 121.3℃，维持 15-30 min。停止加热后，需待压力降至零后，打开排气阀排除余气方可取出物品。干热灭菌法不适合橡胶、塑料的灭菌，与湿热灭菌法相比，需要更高的温度以及更长的时间才能保证灭菌效果。一般规定：135-140℃灭菌 3-5 h；160-170℃灭菌 2-4 h；180-200℃灭菌 0.5-1 h。到达时间后，停止加热，待温度自然下降至 40℃以下，方可开门取物，否则冷空气突然进入，易引起玻璃炸裂；且热空气外溢，往往会灼伤操作者的皮肤。

5.5 样品采集与提取

5.5.1 样品的采集与保存

按照 HJ/T20 和 HJ/T 298 的相关规定进行固体废物样品的采集和保存。

5.5.2 样品的制备

5.5.2.1 固态样品

固体废物的制样方法参照 HJ/T20 执行。工业固体废物和危险废物焚烧处理后的灰渣和飞灰，经风干和粉碎研磨处理以降低样品的粒度。用机械方法或人工方法破碎和研磨，筛分使样品的 95%达到 2 mm 以下的粒径度。样品经混合及缩分后制成分析用样品。

5.5.2.2 半固态样品

半固态样品制样时，样品经自然风干后，用机械方法或人工方法破碎和研磨，筛分使样品的 95%达到 2 mm 以下的粒径度。样品经混合及缩分后制成分析用样品。半固态的样品在制样的同时应测定含水量。

5.5.2.3 液态样品

液体样品制样时，应充分混均并缩分。样品混均采用人工或者机械搅拌方法进行。样品混均后，采用二均法，每次减量一半，最终样品量为检测分析用样品量的 10 倍左右。

5.5.3 试样的制备

5.5.3.1 提取

5.5.3.1.1 固态样品的提取

称取一定量制备好的固态样品，添加盐酸，添加量为每 1 g 固态样品添加 20 ml。搅拌固态样品，并观察发泡情况，必要时再添加盐酸，直至不再发泡为止。用布氏漏斗过滤盐酸处理液，并用水充分冲洗固态样品，再用少量甲醇或者丙酮除去水分。将玻璃纤维滤膜和固态样品放入烧杯中干燥。盐酸处理液采用二氯甲烷萃取，添加量为每 1 L 处理液添加 100 ml 二氯甲烷，振荡萃取，萃取液采用无水硫酸钠脱水，重复三次上述操作。以甲苯为溶剂，将充分干燥后的玻璃纤维滤膜和固态样品进行 19 h 以上的索式提取或者性能相当的提取设备进行提取操作。将二氯甲烷萃取液和甲苯提取液混合作为该固态样品的提取液。

5.5.3.1.2 液态样品的提取

1) 水溶性样品

称取一定量混合均匀的样品，按照每 1 L 样品添加 100 ml 二氯甲烷（或者甲苯）的比例，进行振荡萃取，萃取液采用无水硫酸钠脱水，重复 3 次萃取，作为该液态样品的提取液。

2) 油状样品（含油淤泥、化学反应釜脚）

称取一定量的油状样品于烧杯中，然后添加 50 ml 甲苯，搅拌使可溶成分完全溶解。用布氏漏斗和玻璃纤维滤膜过滤甲苯处理液。将玻璃纤维滤膜和不溶性残渣放入干燥器中干燥。将甲苯处理液中的水溶性成分分离，加入二氯甲烷（或者甲苯），振荡萃取，萃取液过无水硫酸钠脱水，重复 3 次。以甲苯为溶剂，将干燥完毕后的玻璃纤维滤膜和不溶性残渣进行 19 h 以上的索式提取或者性能相当的提取设备进行提取操作。将二氯甲烷萃取液和甲苯提取液混合作为该液态样品的提取液。

5.5.3.2 不同提取方法的选择

由于二噁英类化合物种类繁多，在环境介质中含量低，因此需要经过提取、净化、浓缩等一系列复杂的预处理步骤后方可进仪器分析。在保证数据质量的基础上，如何缩短样品净化处理时间、减少溶剂使用量成为分析方法改进的目标，目前由于该类化合物提取和净化技术多种多样，不同方法对二噁英类化合物样品分析结果也存在一些偏差，例如净化过程中有机溶剂用量和样品内标的回收率等。本实验主要参照 EPA 公布的 PCDD/Fs 分析方法 EPA1613 和类二噁英 PCBs 分析方法 EPA1668，对萃取方法进行比较。样品采用的提取方式为索氏提取、ASE 加速溶剂萃取（DIONEX，美国）、E-916 自动索氏提取装置（BUCHI，瑞士）、B-811 快速溶剂萃取仪（BUCHI，瑞士），从样品回收率、溶剂消耗量及提取时间方面进行比较，选择一个相对优化的萃取方法。

准确称取飞灰 10 g，提取前加入 PCDD/Fs 和 DL-PCBs 提取内标，分别进行如下四种方法提取。

传统索氏提取法：将样品置于索氏提取套筒内，用 300 ml 甲苯溶剂提取 19 h；

自动索氏提取法：将样品置于 BUCHI 811 自动索氏提取器套筒内，用 300 ml 甲苯溶剂提取 8 h。

ASE-300 加速溶剂提取法：将样品置于 33 ml 萃取池中，设定 ASE 条件为，温度 150℃，压力 1500 psi，静态提取时间 7 min，循环 2 次，甲苯提取，所用提取液约 60 mL。

BUCHI-E916 加速溶剂提取法：将样品置于萃取池中，设定温度为 130℃，压力为 100 bar，循环次数为 4 次，甲苯提取，所用提取液约 160 ml。

将上述四种方法得到的提取液浓缩并转置成正己烷。经过硫酸处理，多层硅胶柱净化，

埋藏活性炭柱等多步净化过程后，加入进样内标，癸烷定容至 50 μl ，经 HRGC-HRMS 测定。

从四种不同提取方法对 17 种二噁英类和 12 种 DL-PCBs 类化合物之间质量浓度和样品回收率方面进行分析比较，从图 5-1 中可以看出，四种不同提取方法均能有效的提取所需样品中的化合物。从个别同类物的回收率方面可以看出（图 5-2），应用 DIONEX-ASE 提取技术样品的回收率要普遍略高于其他提取方法。这可能与 ASE 提取设备的工作原理有关，该方法是在较高的温度（150 $^{\circ}\text{C}$ ）和较高压力（1500 psi）用有机剂溶剂萃取。普通索氏提取器提取结果比较稳定，无论 PCDD/Fs 组分还是 DL-PCBs 组分，均可满足要求。

鉴于上述实验结果以及考虑实验室仪器的基本配置，实验将选择普通索氏提取作为提取方法。

若提取液中含有油脂，可以使用二甲基亚砷萃取法（DMSO 萃取法），去除碳氢化合物等低极性有机物后，再进行样品净化。在分液漏斗中加入 25 ml 用正己烷饱和的二甲基亚砷溶液，将浓缩到 1 ml 左右的提取液加入分液漏斗中，用少量正己烷冲洗，并将冲洗液一并加入分液漏斗，振荡萃取，静置分离二甲基亚砷层。重复以上操作四次，共得到约 100 ml 二甲基亚砷溶液，将其移入分液漏斗中，并加入 40 ml 正己烷，振荡萃取，静置分层，弃掉正己烷层。向盛有 100 ml 二甲基亚砷溶液的分液漏斗中加入 75 ml 正己烷和 100 ml 水，振荡萃取，静置分层。重复以上操作 3 次，共得到约 225 ml 正己烷萃取液。将正己烷萃取液移入分液漏斗中，加入 2 mol/L 的氢氧化钾水溶液 10 ml，振荡洗涤，然后再加入 25 ml 水洗涤，静置分层，正己烷萃取液经无水硫酸钠脱水后浓缩，进行净化处理。

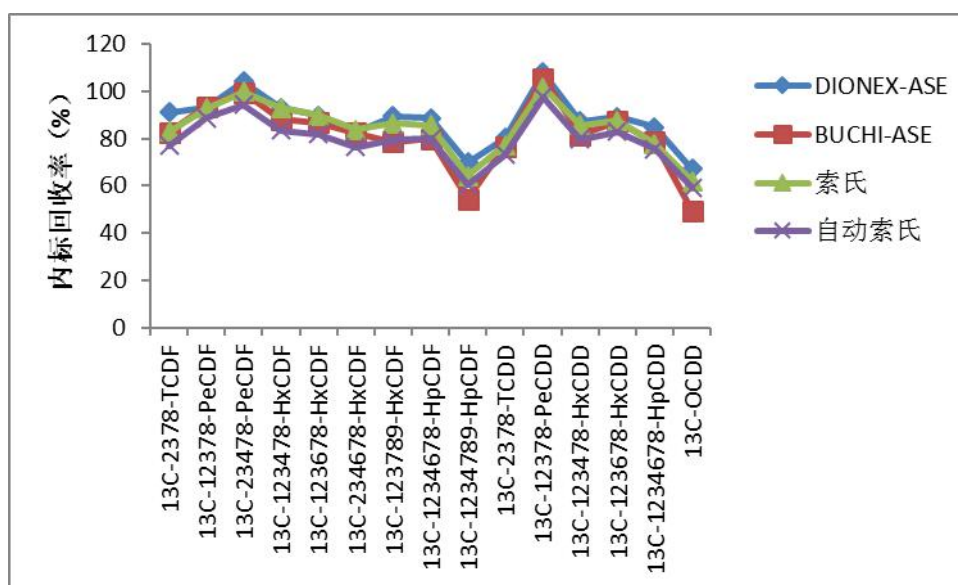


图 5-1 PCDD/Fs 组份的回收率

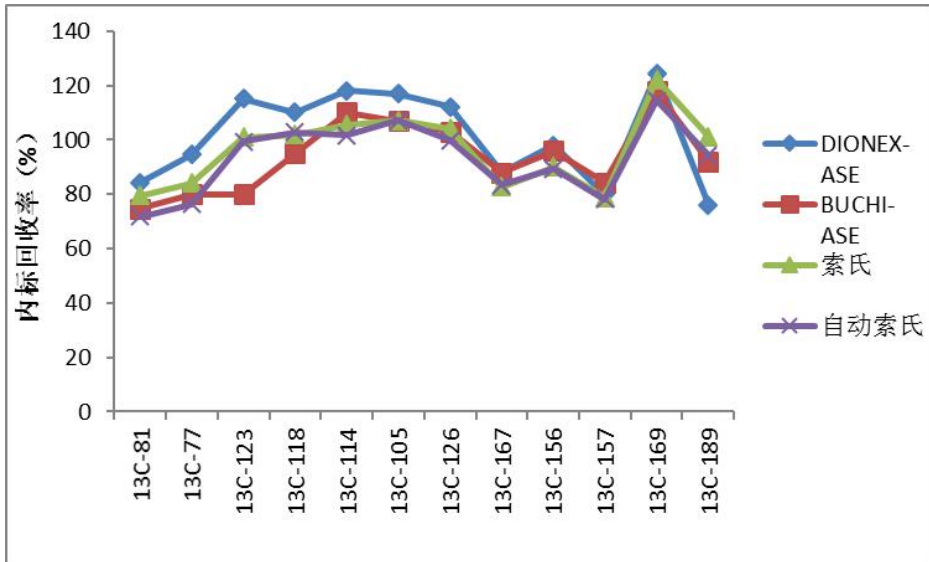


图 5-2 DL-PCBs 组份的回收率

5.6 样品净化方法的验证及测定过程

EPA 4435 和 JIS K0463 中规定的样品基本净化流程见下图 5-3 所示，本课题组对此净化方案进行了验证。称取飞灰 3.5 g，按照 5.5.3 确定的萃取方法进行萃取，然后添加净化内标，进行下述净化，净化完毕后进行 HRGC-HRMS 分析。

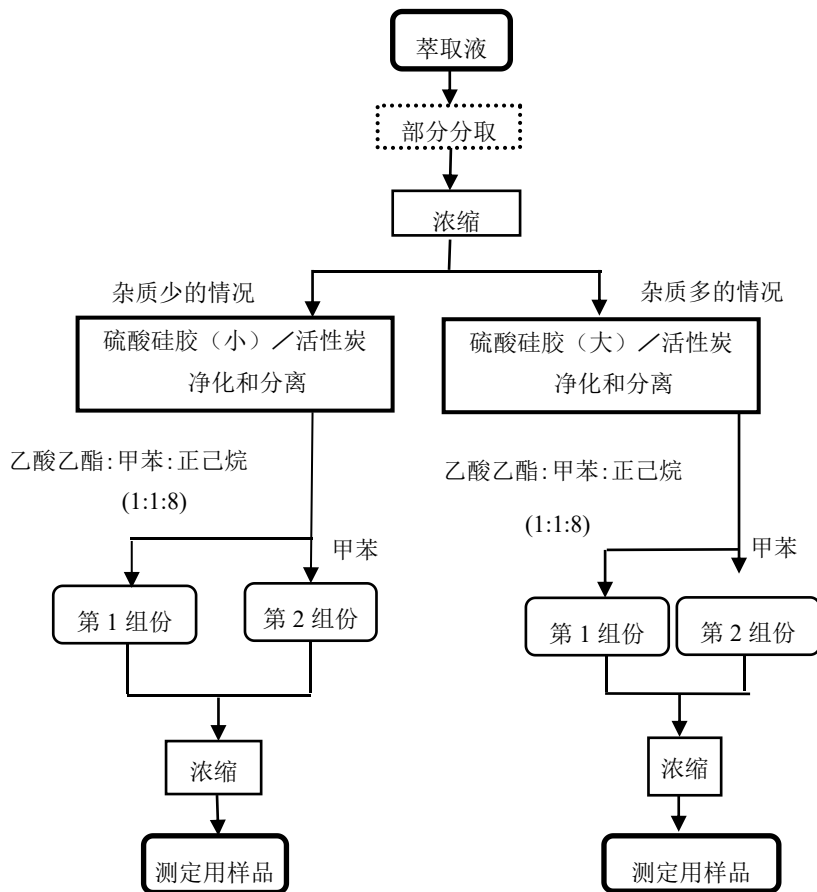


图 5-3 样品处理基本流程

5.6.1 提取液的分取

根据样品中二噁英类预期浓度的高低分取 25%-100%（整数比例）的提取液作为试样溶液，剩余样品转移至棕色密封储液瓶中冷藏贮存。

5.6.2 样品的净化

5.6.2.1 硅胶柱

将硅胶柱底部塞好玻璃棉，依次填充无水硫酸钠 1.5 g、酸性硅胶（33%，质量百分比）硅胶 4.0 g、以及无水硫酸钠 1.5 g，如图 5-4 所示。加入正己烷 30 ml 预淋洗硅胶柱。

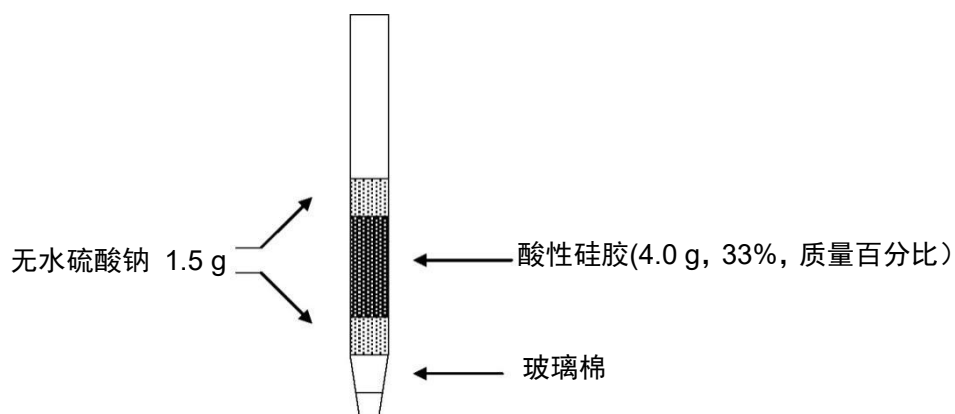


图 5-4 硅胶柱的构成

5.6.2.2 活性炭分离柱

将活性炭分离柱的底部塞好玻璃棉，依次填充无水硫酸钠 0.4 g、活性炭 0.4 g、以及无水硫酸钠 0.8 g（图 5-5）。依次采用丙酮 5 ml、甲苯 20 ml、正己烷 10 ml，进行预淋洗活性炭分离柱。

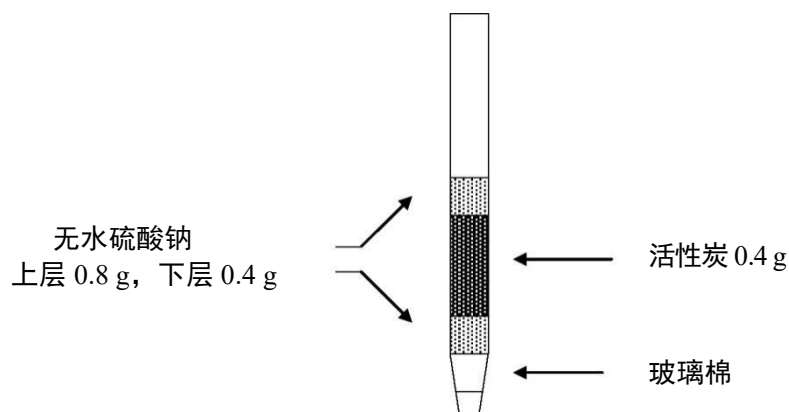


图 5-5 活性炭柱的构成

5.6.2.3 硅胶柱-活性炭分离柱色谱仪操作

将硅胶柱与活性炭分离柱串联。将样品慢慢添加到串联柱上。添加正己烷 2 ml 于样品瓶中，一边进行超声清洗，一边洗净样品瓶，将洗净液加入到分离柱。添加正己烷 1 ml 于上述样品瓶中，进行上述同样的操作。采用 10 ml 正己烷淋洗串联柱。取下硫酸硅胶分离柱。向活性炭分离柱中加入正己烷 10 ml，洗净活性炭分离柱。加入 DL-PCBs 淋洗液(乙酸乙酯/甲苯/正己烷(10%/10%/80%的体积百分比))15 ml，淋洗出 DL-PCBs 组分。加入甲苯 20 ml 淋洗出 PCDD/Fs 组分。

5.6.2.4 结果分析

将净化完毕后的样品旋转蒸发，然后氮吹至微湿，添加 DL-PCBs 和 PCDD/Fs 的进样内标，最后用壬烷或癸烷定容 50 μ l，进行 HRGC/HRMS 分析，计算内标的回收率以评价净化方法的准确性。

将 7 次上机分析结果中的回收率计算平均值，然后制作淋洗曲线，结果如图 5-6 和图 5-7 所示。从上述两图可以看出，二噁英组分中，OCDD 的回收率略低外，其余异构体回收率基本在 40%以上，DL-PCBs 组分中，除 PCB114 和 123 回收率略低，大约 30%左右，其余组份的回收率基本在 40%以上。从实验结果来看，本实验的淋洗方案完全可以把二噁英组分和 DL-PCBs 组分完全分离，从回收率曲线来看，除个别异构体外，无论 PCDD/Fs 组份还是 DL-PCBs 组份基本可以满足 EPA1613 所要求的回收率（40%-130%）。

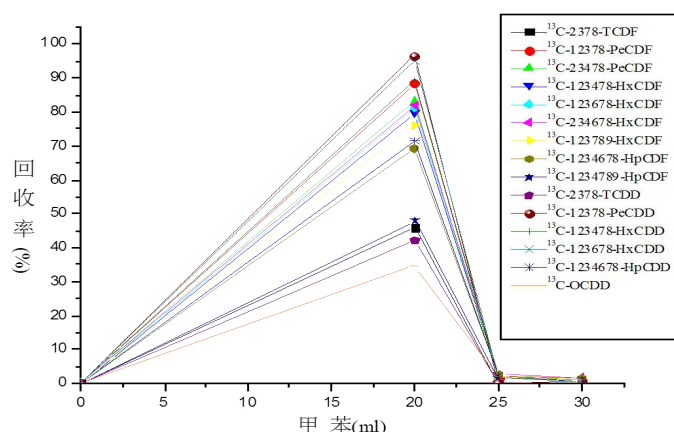


图 5-6 二噁英组份的回收率

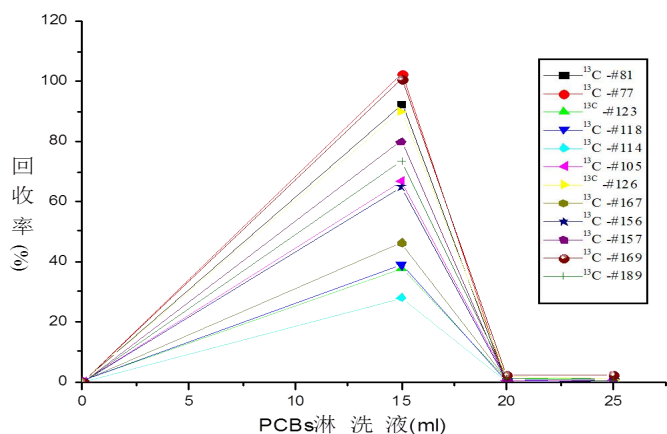


图 5-7 DL-PCBs 组份的回收率

5.6.2.5 干扰和消除

通过文献调研得知，多环芳烃中的蒽（Chrysene）和苯并（b）荧蒹（benzo(b)fluoranthene）具有激活细胞的能力，因此本方法通过空白加标的方法研究了净化方法对其的去除效率。

在空白样品加入 50 ng 的蒽和苯并（b）荧蒹，然后按照上述建立的净化方法进行前处理，收集各段的淋洗液，进行仪器分析，建立的净化方法对上述两种物质的去除能力见下表：

表 5-1 干扰物的去除能力

化合物	硅胶柱组份	二噁英组份	PCBs 组份
蒽	25%	0.2%	ND
苯并（b）荧蒹	27%	3.5%	ND

从表中数据可以看出，经过硅胶柱净化和活性炭分离后，蒽和苯并（b）荧蒹在二噁英组份中仅占 0.2%和 3.5%，对二噁英的检测不会产生干扰。

5.6.2.6 空白对结果的影响

5.6.2.6.1 溶剂对照空白

将 DMSO 直接暴露于细胞，然后检测 RLU，DMSO 的测定结果如下图 5-9 所示，20 次溶剂空白的平均值为 1887.1、标准偏差为 1.94%、CV 值为 10.27%。DMSO 的最小值为 1534.4，最大值为 2198.3。从测定结果来看，DMSO 的溶剂空白值基本稳定，标准偏差和 CV 值满足要求。

5.6.2.6.2 实验室空白

称取等量的石英砂作为样品，按照上述确定的萃取方法和净化方法进行分析，将最后的样品进行生物检测，空白样品 20 次测定结果的平均值为 2968.4、标准偏差为 2.0%、CV 值为 6.76%。空白样品的最大值为 3400.8，最小值为 2669.6。空白样品的最大值为溶剂空白最

小值的 2.2 倍，空白样品的最小值为溶剂空白最大值的 1.2 倍。从空白样品的标准偏差和 CV 值来看，测定结果满足相关要求。

空白样品的测定值显著高于 DMSO 空白，这说明所使用的材料中能淋洗出可以激活 AhR 的物质，但是如果此种物质一直处于固定的范围之内，则对于最后的实际样品的测定没有影响。

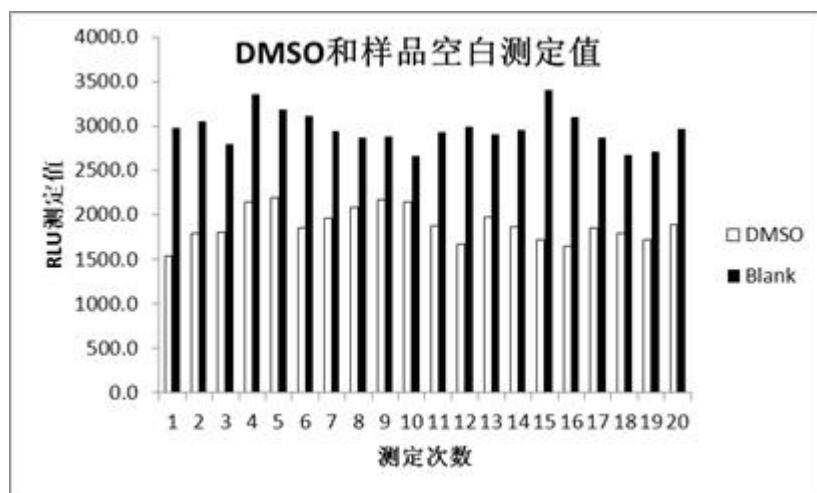


图 5-8 DMSO 和样品空白测定值

5.6.2.7 测定用样品的保存

将上述净化完毕后的净化液浓缩或者平行蒸发充分除去溶剂，然后加入 4 ml 正己烷。将样品超声 2 分钟，转移到棕色样品瓶中，放入冰箱(4℃)中进行保存。

5.6.3 测定操作

(操作方式以细胞的不同而不同，下以 H1L6.1C2 细胞为例)

5.6.3.1 决定稀释倍数的实验

5.6.3.1.1 将计数完毕后的细胞悬浮液，进行稀释，使其浓度达到 7.5×10^5 cell/ml。

5.6.3.1.2 准备 96 孔板，其四周不加细胞，每孔加 100 μ l 的超纯水或者 PBS，中间总共 60 个孔添加细胞悬浮液（横 10 纵 6），每个孔各添加 200 μ l。

5.6.3.1.3 将上述 96 孔板放入培养箱中，进行 24 h 的培养（CO₂ 5%、37℃）。

5.6.3.1.4 测定液配制过程

a) 测定用样品的分取

1) 在 13 mm 的玻璃试管中加入 DMSO 2 μ l。

2) 从 4 ml 的样品瓶中分取适量的样品，一般二噁英类组份稀释的比率为 20、200 和 2000。

b) 标准曲线绘制用标准液以及 QC (STD 5) 溶液的分取

将配制好的标准液以及 QC 溶液，分别添加 4 μ l 到试管中。

c) 阴性对照 (NC) (DMSO) 的分取

在 13 mm 的玻璃试管中加入 DMSO 4 μ l。

5.6.3.1.5 DMSO 的置换以及培养基混合操作

- a) 加入正己烷，将样品定容为 0.5 ml，标准溶液、QC 溶液以及 NC 定容为 1 ml。
- b) 将试管放入旋转蒸发仪中进行 12 min 浓缩。
- c) 每隔 2 min，对玻璃试管内的正己烷的残余量进行确认。

d) 在样品试管中加入培养基 200 μ l，在标准溶液、QC 溶液以及 NC 的试管中加入培养基 400 μ l，用搅拌器进行 10 sec 左右的搅伴。

5.6.3.1.6 将培养了 24 h 的 96 孔板拿出，将培养基去掉，对细胞的状态进行确认，如果发生异常，则做好记录，同时追查原因，如果影响后续测试结果，则将整盘细胞弃掉，重新培养细胞，如果确认无误，则进行下面的实验。

5.6.3.1.7 将 190 μ l 已经稀释完毕后的样品添加到 96 孔板上，标记好 96 孔板后，将其放入培养箱中进行 20-24 h 的培养（CO₂ 5%、37 $^{\circ}$ C）。

5.6.3.1.8 RLU 的检测

以每次检测 3 只 96 孔板为例：先将裂解缓冲溶液稀释 5 倍，保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用，使用前室温水浴 30 min，使之解冻及并恢复至室温。准备一瓶发光基质（10 ml）。

a) 细胞的裂解

- 1) 将培养了 20-24 h 的微孔板从培养箱中取出。
- 2) 将微孔板内的培养基完全除掉。
- 3) 使用 12 通道移液枪，将 PBS 50 μ l 加入到各孔，进行洗净。
- 4) 将微孔板内的 PBS 完全除掉。
- 5) 通过显微镜对所有孔的细胞状态进行核实。如果有异常，必须在微孔板记录纸上做好记号。
- 6) 将粘贴纸贴到微孔板底上。
- 7) 将细胞裂解液各 100 μ l 分别加入到各孔。
- 8) 使用微孔板振荡器对 96 孔板进行 20 min 的震动。
- 9) 向每孔添加 50 μ l 的荧光素酶溶液（荧光素酶溶液须提前配制好），如果酶标仪具有自动添加功能，则将仪器设定自动添加模式。

b) 荧光素酶活性的测定（自动添加示例）

- 1) 向酶标仪中添加发光基质溶液。
- 2) 放好 96 孔微孔板，对各孔的发光量进行测定。

5.6.4 标准曲线的制作

5.6.4.1 基本原理

报告基因法标准曲线的建立一般采用四参数方程或者直线回归方程，下以四参数方程为例说明标准曲线的具体建立过程。

5.6.4.2 四参数 Hill 公式最简单的计算式为：

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}))})$$

式中：Y—化学发光值，RLU；

X—标准溶液浓度，pg/ml；

TOP—最大化学发光值，RLU；

Bottom—最小化学发光值，RLU；
 EC50—RLU 达到一半时标准溶液的浓度，pg/ml；
 HillSlope—斜率变量。

表 5-2 标准物质换算示例

标准物质量 (pg/well)	标准物质浓度 (pg/ml)	标准物质对数换算值	标准物质测量值
A	$B=A/100*1000$	$C=LN(B*100)$	(RLU)
29.9182	299.18	10.31	382759.60
9.9727	99.73	9.21	359945.60
3.3242	33.24	8.11	289092.60
1.1081	11.08	7.01	176615.20
0.3694	3.69	5.91	64799.68
0.1231	1.23	4.81	10299.39
0.0410	0.41	3.71	7042.64
0.0137	0.14	2.62	4716.21
0.0046	0.05	1.52	4101.76

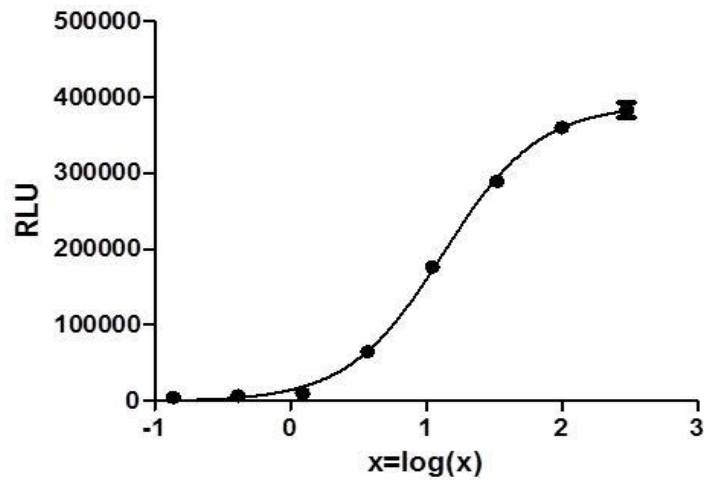


图 5-9 标准曲线示例

5.6.4.3 将 DMSO 配制的不同系列的 2, 3, 7, 8-TCDD 标准溶液, 按照标准方法操作, 得出 RLU, 带入理论式, 使用软件计算, 进行 4 参数 TOP、Bottom、EC₅₀、Hillslope 的优化 (使理论的 RLU 和实测的 RLU 之间偏差的 2 次方最小), 从而得出四个参数: TOP, Bottom, LogEC₅₀ 和 Hillslope。将得出的 4 参数带入上述方程, 得到四参数方程。

5.6.5 结果计算

将每个样品的 RLU 值, 带入上述的四参数方程, 求出每个样品相对应于标准曲线的浓度值。

5.6.6 样品的定量

将样品的 RLU 带入标准曲线方程，即可得出样品的浓度。然后根据稀释倍数、测定时用的萃取液的量、萃取液的分取量、样品用量，计算样品中二噁英的浓度。具体计算公式如下所示：

$$W = \rho \times F \times V \times \frac{V_E}{V_E'} \times \frac{1}{W_0}$$

式中： W —样品中的二噁英浓度，ng/g；

ρ —测定液中的浓度，ng/ml；

F —稀释倍数；

V —测定液的体积，ml；

V_E —萃取液的体积，ml；

V_E' —萃取液分取体积，ml；

W_0 —取样量，g（干重）。

5.6.7 定量操作

经过上述操作，根据结果可以得出最佳的稀释倍数，如果上述操作恰好在最佳的线性范围内，则不需要进一步的定量操作，反之，则需要根据得出的最佳稀释倍数，进行定量操作。定量操作的步骤与决定稀释倍数的实验操作步骤一致，仅稀释倍数相异。

5.7 方法特性参数

5.7.1 标准溶液的检出限和测定下线的确认

将标准溶液按照下述浓度进行配制。

表 5-3 标准溶液浓度系列

标准物质	浓度(ng/mL)									
	STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9
2,3,7,8-TCDD	25.0	12.5	6.25	3.13	1.56	0.781	0.391	0.195	0.100	0.049

对于配制完成的标准溶液，根据确定的测定方法，进行 $n=5$ 次以上的测定，并定量，计算测定值（毒性等价量）的平均值、标准偏差以及变异系数(CV%)，制作精度管理图，从图中得出检出下限以及定量范围。下图 5-11 为检出下限以及定量范围的酶标板布局示例。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DMSO	→"	→"	→"	→"	STD5	→"	→"	→"	→"	
C		STD10	→"	→"	→"	→"	STD4	→"	→"	→"	→"	
D		STD9	→"	→"	→"	→"	STD3	→"	→"	→"	→"	
E		STD8	→"	→"	→"	→"	STD2	→"	→"	→"	→"	
F		STD7	→"	→"	→"	→"	STD1	→"	→"	→"	→"	
G		STD6	→"	→"	→"	→"	STD0	→"	→"	→"	→"	
H												

图 5-10 酶标板布局示意图

标准溶液检出限和测定下限：计算系列标准溶液测定值的变异系数(CV%)，30%以下标准溶液的点作为检出限；20%的点作为测定下限。

定量范围：将 20%之间的范围作为定量范围。

测定结果如下表所示：

表 5-4 标准溶液的检出限和测定下限的确认

平行样品 编号		标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测 定 结 果 (pg/ml)	1	0.980	1.96
	2	0.980	1.96
	3	0.980	1.96
	4	0.980	1.96
	5	0.980	1.96
	6	0.980	1.96
	7	0.980	1.96

从上表可以看出，标准溶液的检出限为 0.980 pg/ml，测定下限为 1.96 pg/ml，当取样量为 3.5 克时，样品定量下限为 1 pg-TEQ/g。

5.7.2 精密度和准确度

5.7.2.1 精密度

精密度采用实际样品进行验证，垃圾焚烧后的飞灰选择浓度为 1.68 ng/g、34.3 ng/g、142 ng/g 的样品进行测试。生活污水厂污泥样品，将此作为低浓度样品进行验证，由于生活污水浓度较低，无法找到合适的中浓度和高浓度的样品，故采取基质加标的方式进行验证，三个样品浓度分别为 0.03 ng/g、5.23 ng/g 和 23.8 ng/g。以上每个浓度测试 6 个平行样品，计算其平均值、标准偏差、相对标准偏差。

表 5-5 实际样品精密度计算

平行号		飞灰样品 (ng/g)			污泥样品(ng/g)		
		1.68	34.3	142	0.03	5.23	23.8
测定结果	1	1.54	34.7	150	0.02	4.45	24.6
	2	1.76	33.0	138	0.02	5.21	25.7
	3	1.68	36.8	149	0.02	4.65	23.6
	4	1.56	32.3	141	0.02	5.31	26.7
	5	1.39	33.9	136	0.03	5.61	25.6
	6	1.67	34.7	142	0.02	5.20	24.8
平均值		1.60	34.2	143	0.02	5.07	25.2
标准偏差		0.130	1.57	5.72	0.00300	0.435	1.07
相对标准偏差 (%)		8.21	4.60	4.01	15.9	8.58	4.26

从上表可以看出飞灰低、中、高浓度样品的相对标准偏差分别为 8.21%、4.60%、4.01%；底质低、中、高浓度样品的相对标准偏差为 15.9%、8.58%、4.26%。

5.7.2.2 准确度

准确度验证，二噁英的飞灰标准样品极少，故采用本实验室自行研制的生活垃圾飞灰样品进行精密度验证，浓度分别为 7.81 ng/g 和 10.4 ng/g。实际样品选取北京某生活垃圾焚烧厂的焚烧飞灰，浓度为 1.68 ng/g、34.3 ng/g 和 142 ng/g，加标当量为 TEQ=2.41 ng/g；某生活污水处理厂的污泥样品（0.04 ng/g）进行加标实验，此处添加二噁英标准为非同位素取代的标准，加标当量为 TEQ=0.960 ng/g、TEQ=4.80 ng/g 和 TEQ=24.1 ng/g。将上述样品进行 6 次平行测定，对上述测定结果计算平均值、加标回收率等。

表 5-6 飞灰标准样品的测试数据

平行号	飞灰标样 (7.81 ng/g)	飞灰标样(10.4 ng/g)	
测定结果	1	7.73	9.30
	2	6.85	9.60
	3	7.20	11.2
	4	8.45	10.5
	5	8.30	11.6
	6	7.31	11.3
平均值	7.64	10.6	
标准物质浓度	7.81	10.4	
相对误差 (%)	-2.18	1.76	

从上表可以看出，当飞灰标样浓度为 7.81 ng/g 时，相对误差为-2.18%，当飞灰标样为 10.4 ng/g 时，相对误差为 1.76%。

表 5-7 实际样品加标测试数据

平行号	飞灰样品 (5 μl, TEQ=2.41)									
	1.68	测定值	回收率	34.3	测定值	回收率	142	测定值	回收率	
测定结果	1	1.65	4.05	99.6	32.5	35.2	112	147	149	95.4
	2	1.89	4.50	108	33.6	35.9	95.4	139	142	108
	3	1.43	3.96	105	35.2	37.8	108	154	157	116
	4	1.53	4.16	109	32.3	34.8	104	136	138	95.4
	5	1.38	4.20	117	34.5	37.1	108	137	139	99.6
	6	1.56	3.87	95.9	38.7	41.5	116	142	154	112
平均值		1.57	4.14	105	34.5	37.1	107	143	145	104
平行号	污泥样品 (低: 2 μl TEQ=0.96; 中: 10 μl, TEQ=4.80; 高: 50 μl, TEQ=24.1)									
	0.04	测定值	回收率	0.03	测定值	回收率	0.03	测定值	回收率	
测定结果	1	0.04	0.921	91.9	0.03	4.46	92.2	0.03	25.3	105
	2	0.03	0.941	95.3	0.03	5.20	108	0.03	26.1	108
	3	0.04	1.05	105	0.03	4.56	94.3	0.03	22.6	93.6
	4	0.04	1.10	111	0.03	5.41	112	0.03	25.4	105
	5	0.02	0.936	95.0	0.03	5.69	118	0.03	24.3	101
	6	0.04	1.17	119	0.03	5.21	108	0.03	24.6	102
平均值		0.03	1.02	103	0.03	5.09	105	0.03	24.7	102

从上表可以看出，飞灰低、中、高样品的加标回收率平均值为 105%、107%、104%；底泥样品的加标回收率的平均值为 103%、105%、102%。

5.7.3 细胞稳定性实验

将细胞传代 20 次以上，每次传代完毕后，用其测定 DMSO 值，测定结果如 5-11 所示，当传代次数达到 23 次时其响应值明显下降。

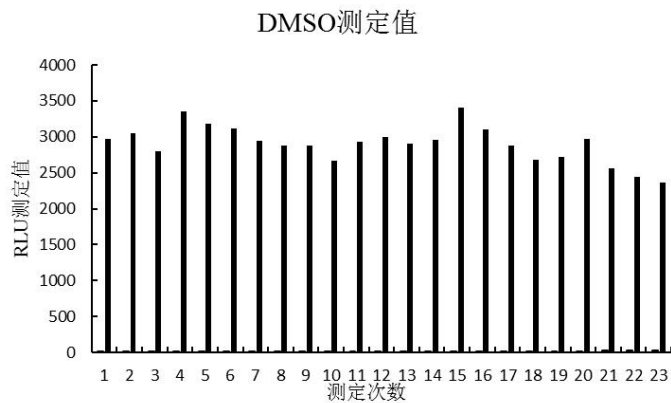


图 5-11 细胞稳定性实验

5.8 质量保证和质量控制措施

5.8.1 试剂

二噁英生物检测法对试剂的要求，可参考 HRGC-HRMS 方法对试剂的要求，即浓缩 10000 倍时不得有二噁英检出，DMSO 空白检测值必须小于标准溶液的检出限。

5.8.2 器具和装置

二噁英生物检测法所使用的器具和装置必须满足 HRGC-HRMS 实验室所要求的质量保证和质量控制要求，即高、低浓度样品所使用的器具必须分开以防止交叉污染。接触细胞的器具和装置必须保证下列事项：防止细胞污染、实验平台必须定期清扫和消毒、细胞操作实验必须在生物安全柜内进行、适合细胞培养环境的维持。

5.8.3 细胞

在对细胞进行暴露之前，必须保证细胞的状态达到最佳状态，即细胞对二噁英的响应必须呈现一定的线性范围、必须能稳定传代 20 次以上（以使用 H1L6.1c2 为例）、细胞的测定下限必须达到 1.96 pg/ml（以使用 H1L6.1c2 为例），满足上述条件方可进行实验。

5.8.4 空白试验

每批样品（以 20 个样品为一批次）应至少做一个实验室空白试验，所有空白测试结果中的目标化合物浓度应小于标准溶液的测定下限（1.96 pg/ml）（以使用 H1L6.1c2 为例），并且记录空白实验值，如果高于此值，应查明原因，并将采取的改进措施一一记录。

5.8.5 平行测定

按照要求进行平行测定实验，然后进行实验结果的比较，两次测定的结果相对标准偏差必须 $\leq 20\%$ ，并将相关数据进行记录。如果平行样品差异非常大，必须查找原因，采取措施，并将相关数据进行记录。

5.8.6 回收率的确认

生物检测方法有其特殊性，不能添加同位素内标，因此可以采取添加非同位素标记的标准物质的方式衡量整个过程的精密度，其加标的回收率必须满足 80%~120%。但是样品前处理过程中的回收率，可以按照 HJ 77.3 中的规定，添加同位素内标进行样品前处理，上机分析，计算同位素内标的回收率，同位素内标的回收率必须控制在 40%~130%之间。

5.8.7 检出限以及定量范围

5.8.7.1 标准溶液的检出限和定量范围的确认

按照规定，检出限必须按照标准曲线来计算，定性范围必须为变异系数 CV 的 30% 以内，定量范围为变异系数的 20% 以内，其中浓度最小点为定量下限。

标准曲线以及定量范围必须每 6 个月确认一次，测定场合、仪器、条件发生变化后必须重新制作标准曲线以及定量范围。

5.8.8 质控点的管理

在实际的操作中，一般选择标准曲线中间点作为质控点，将多次测量的质控点的浓度值计算平均值 μ ，标准偏差 α ，则每次测量值必须处于 $\mu\pm 2\alpha$ 之内，否则，此次测量值不可信任，需要重新测定。

5.8.9 质控样品的测定

按照方法的测定程序，进行质控样品的测定，然后对实验结果进行确认，质控样品的实验结果必须在 $\pm 30\%$ 以内。如果发生异常，必须从样品的前处理开始查找原因，并采取相应的措施，将相关的数据进行记录。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 基本情况

按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010），组织六家实验室进行验证。根据影响方法的精密度和准确度的主要因素和数理统计学要求，编制方法验证报告，验证数据主要包括检出限、测定下限、精密度、准确度及实际样品加标回收率等。

六家实验室分别为：河南省环境监测中心站、中国农业科学院、湖南省环境监测中心站、广西壮族自治区环境保护监测中心站、四川省环境保护科学研究院、宁波市环境监测中心。参加验证的实验室及人员基本情况、仪器使用情况及试剂使用情况，见附件一《方法验证报告》。

6.1.2 方法验证方案

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，组织六家有资质的实验室，按照“固体废物 二噁英类筛查 报告基因法”（草案）中样品分析的全部步骤进行分析和方法验证。根据影响方法的精密度和准确度的主要因素和数理统计学的要求，编制方法验证报告，确定样品类型、含量水平、分析人员、分析设备、分析时间及重复测试次数等，验证单位按照要求完成方法验证报告。

检出限和测定下限采用系列标准溶液重复测定 6 次以上，然后计算其检出限和测定下限。

精密度采用实际样品进行验证，选择垃圾焚烧后的飞灰，浓度为 1.68 ng/g、34.3 ng/g、142 ng/g 的样品进行测试。生活污水处理厂污泥样品，将此作为低浓度样品进行验证，由于生活污水浓度较低，无法找到合适的中浓度和高浓度的样品，故采取基质加标的方式进行验证，三个样品浓度分别为 0.026 ng/g、5.23 ng/g 和 23.8 ng/g。以上每个浓度测试 6 个平行样品，计算其平均值、标准偏差、相对标准偏差、重复性限 r 和再现性限 R 。

准确度验证，采用生活垃圾飞灰标样进行精密度验证，浓度分别为 7.81 ng/g 和 10.4 ng/g。实际样品选取北京某生活垃圾焚烧厂的飞灰，浓度为 1.68 ng/g、34.3 ng/g 和 142 ng/g，加标当量为 $TEQ=2.41$ ng/g；某生活污水处理厂的污泥样品（0.04 ng/g）进行加标实验，此处添

加二噁英标准为非同位素取代的标准，加标当量为 TEQ=0.960 ng/g、TEQ=4.80 ng/g 和 TEQ=24.1 ng/g。将上述样品进行 6 次平行测定，对上述测定结果计算平均值、加标回收率等。

用于精密度和准确度验证的样品由主持单位统一采集、制备，然后统一发放到各实验室进行后续的实验。

标准溶液的检出限、测定下限、精密度、准确度等方法特性指标均按照 HJ 168-2010 附录 A 的规定进行验证，验证结果符合方法特性的要求。

验证报告中的数据如无特殊说明均为毒性当量（TEQ）浓度。

6.2 方法验证过程

通过筛选确定有资质方法验证单位。按照方法验证方案准备实验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，确保参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

6.2.1 标准溶液的检出限、测定下限的验证

原则上应该按照 HJ168-2010 规定的方法计算标准溶液的检出限和测定下限，但是生物检测法有其特殊性，故按照 5.7.1 中所述的方法计算标准溶液的检出限和测定下限。

6.2.2 精密度验证

精密度采用实际样品进行验证，垃圾焚烧后的飞灰选择浓度为 1.68 ng/g、34.3 ng/g、142 ng/g 的样品进行测试。生活污水处理厂污泥样品，将此作为低浓度样品进行验证，由于生活污水处理厂污泥浓度较低，无法找到合适的中浓度和高浓度的样品，故采取基质加标的方式进行验证，三个样品浓度分别为 0.03 ng/g、5.23 ng/g 和 23.8 ng/g。以上每个浓度测试 6 个平行样品，计算其平均值、标准偏差、相对标准偏差、重复性限 r 和再现性限 R 。

6.2.3 准确度验证

准确度验证，采用生活垃圾焚烧飞灰标准样品进行精密度验证，浓度分别为 7.81 ng/g 和 10.4 ng/g。实际样品选取北京垃圾焚烧厂的飞灰，浓度为 1.68 ng/g、34.3 ng/g 和 142 ng/g，加标当量为 TEQ=2.41 ng/g；某生活污水处理厂的污泥样品（0.04 ng/g）进行加标实验，此处添加二噁英标物为非同位素取代的标物，加标当量为 TEQ=0.960 ng/g、TEQ=4.80 ng/g 和 TEQ=24.1 ng/g。将上述样品进行 6 次平行测定，对上述测定结果计算平均值、加标回收率等。

6.3 方法验证结论

见附件一《方法验证报告》。

7 与开题报告的差异说明

内容与开题报告无差异。

8 标准实施建议

本标准配套《生活垃圾填埋场污染控制标准》、《危险废物鉴别标准毒性物质含量鉴别》、《城镇污水处理厂污泥处置园林绿化用泥质》等标准的监测方法标准，在实施过程中建议根据实际样品的来源和特点选择适宜的萃取方法。

9 参考文献

- [1] 吴永宁, 王绪卿. 二噁英及其类似物-环境与食品污染. 中国食品与卫生杂志, 1999, 11 (5): 27-33
- [2] 唐景春. 国外二噁英污染及有关标准. 城市环境与城市生态, 2001, 14 (1): 30-32
- [3] 蒋可. 燃烧排放物中的有毒二噁英及类二噁英多氯联苯. 化学进展, 1995, 7 (1): 30-46
- [4] 吴永宁, 陈君石. 二噁英及其类似物-毒理学. 中国食品卫生杂志, 1999, 11 (5): 34-40
- [5] 盖虹云, 全翔翼. 二噁英的毒性及其对人类健康的影响. 包头医学院学报, 2002, 18(4): 370-372
- [6] 孙成均. 二噁英化合物的环境污染、毒性及分析方法. 现代预防医学, 2000, 27 (1): 63-66
- [7] 张志仁, 徐顺清. 二噁英类化合物毒性的分子机理. 环境与健康杂志, 2000, 17 (5): 316-319
- [8] Bumb, R. R.; et al. Trace Chemistries of Fire: A Source of Chlorinated Dioxins. Science 1983, 210, 385.
- [9] Nestrick T J, Lamparski L L. Isomer-specific determination of chlorinated dioxins for assess of formation and potential environmental emission for wood combustion. Anal Chem, 1982, 54: 2292-2299
- [10] Sheffield A. Sources and releases of PCDDs and PCDFs to the Canadian environment. Chemosphere, 1985, 14: 811-814
- [11] Gribble G W. The natural production of chlorinated compounds [J]. Environ Sci Technol, 1994, 28, 310 A-319 A
- [12] Anonymous. Response to comment on "Global mass balance for polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. Environ. Sci. Technol. 1996, 30: 3647-3648
- [13] Brzuzy L P, Hites R A. Estimating the atmosphere deposition of polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans from soil [J]. Environ. Sci. Technol. 1995, 29: 2090-2097
- [14] Hites R H. Environmental Behavior of Chlorinated Dioxins and Furans [J]. Acc Chem Res. 1990, 23: 194-201
- [15] Anonymous. EPA's Dioxins and Reassessment [J]. Environ. Sci. Technol. 1995, 29: 26 A-28 A
- [16] 杨立波. 生活垃圾焚烧飞灰中二噁英与汞的分布特性研究. 上海大学硕士学位论文, 2013。

- [17] Behnisch P A, Hosoe K, Sakai S I. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds a review of bioassay/biomarker technology [J]. *Environment International*, 2001, 27(5), 413 - 439
- [18] 国家履行斯德哥尔摩公约工作协调组办公室. 中华人民共和国履行关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约国家履约计划 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2008
- [19] Chae K, Cho L K, McKinney J D. Synthesis of 1-amino-3,7,8-trichlorodibenzo-p-dioxin and 1-amino-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin as haptenic compounds[J]. *J Agr Food Chem*, 1977, 25(5), 1207-1209
- [20] Albro P W, Luster M I, Chae K, et al. A radioimmunoassay for chlorinated dibenzo-p-dioxins [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1979, 50(1): 137-146
- [21] Köhler G, Milstein C. Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497
- [22] Stanker L H, Watkins B E, Rogers N, et al. Monoclonal antibodies for dioxin: antibody characterization and assay development [J]. *Toxicology*, 1987, 229-243
- [23] Vanderlaan M, Stanker L H, Watkins B E, et al. Monoclonal antibodies and method for detecting dioxins and dibenzofurans [P]. US Patent 4, 798, 807
- [24] 王晶, 王林, 黄晓蓉, 等. 食品安全快速检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [25] 王叔淳. 食品卫生检验技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [26] Matsuki T, Nakama E, Kishino J, et al. A simplified dioxin analysis system - automatic sample preparation device and dioxin biosensor [J]. *Organohalogen Compd*, 2005, 67: 39-41
- [27] 周志广, 许鹏军, 任玥. 自动净化和新型酶联免疫法测定废气中的二噁英 [J]. *分析测试学报*, 2013, 32(1):127-132
- [28] Chuang J C, Van Emon J M, Schrock M E. High-throughput screening of dioxins in sediment and soil using selective pressurized liquid extraction with immunochemical detection [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(9): 1217-1223
- [29] Okuyama M, Kobayashi N, Takeda W, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring toxic dioxin congeners in milk based on a newly generated monoclonal anti-dioxin antibody [J]. *Anal Chem*, 2004, 76, 1948-1956
- [30] Kurosawa S, Aizawa H, Park J W. Quartz crystal microbalance immunosensor for highly sensitive 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin detection in fly ash from municipal solid waste incinerators [J]. *Analyst*, 2005, 130 (11): 1495-1501
- [31] Harrison R O, Eduljee G H. Immunochemical analysis for dioxins-progress and prospects [J]. *Sci Total Environ*, 1999, 239:1-18
- [32] 周志广, 赵斌, 许鹏军, 等. 新型酶联免疫测定废气中二噁英类物质 [J]. *环境化学*, 2013, 32 (7):1358-1364
- [33] 廖世国, 阳剑, 蔡洪英等. 土壤、沉积物和固体废物二噁英类的筛查酶联免疫法[S]. 重庆市地方标准(DB-50), 2012
- [34] Allen R. AhRC PCRTM-Receptor Capture PCR [EB/OL]. [2014-6-18]. [Http://](http://)

www.hybrizyme. Com/PCROverview.html

- [35] Wei X, Ching L Y, Cheng S H, et al. The detection of dioxin- and estrogen-like pollutants in marine and freshwater fishes cultivated in Pearl River Delta, China [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158 (6): 2302-2309
- [36] Jaborek-Hugo S, Von Holst C, Allen R, et al. Use of an immunoassay as a means to detect polychlorinated biphenyls in animal fat [J]. *Food Addit Contam*, 2001, 18 (2): 121-127
- [37] Barletta J M, Edelman D C, Constantine N T. Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen [J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 122 (1): 20-27
- [38] Barletta J M, Edelman D C, Highsmith W E, et al. Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2005, 127 (2): 154-164
- [39] Sugawara K, Kobayashi D, Saito K, et al. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for human angiotensinogen using the identical first and second polyclonal antibodies [J]. *Clin Chim Acta*, 2000, 299 (1): 45-54
- [40] Chen H Y, Zhuang H S. Real-time immuno-PCR assay for detecting PCBs in soil samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394, 1205 - 1211
- [41] Glass T R, Ohmura N, Morita K, et al. Improving an immunoassay response to related polychlorinated biphenylanalytes by mix in gantibodies [J]. *Anal Chem* ↑ , 2006, 78, 7240 - 7247
- [42] Tian W, Xie H Q, Fu H, et al. Immunoanalysis methods for the detection of dioxins and related chemicals [J]. *Sensors (Basel)*, 2012, 12 (12): 16710-16731
- [43] Fillmann G, Galloway T S, Sanger R C, et al. Relative performance of immunochemical (enzyme-linked immunosorbent assay) and gas chromatography - electron-capture detection techniques to quantify polychlorinated biphenyls in mussel tissues [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 461 (1): 75-84
- [44] Shelver W L, Parrotta C D, Slawecki R, et al. Development of a magnetic particle immunoassay for polybrominated diphenyl ethers and application to environmental and food matrices [J]. *Chemosphere*, 2008, 73 (1): S18-S23
- [45] DeVito M J, Ma X F, Babish J G, et al. Dose-response relationships in mice following subchronic exposure to 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-dioxin: CYP1A1, CYP1A2, estrogen receptor, and protein tyrosine phosphorylation [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1994, 124 (1): 82-90
- [46] Hamada M, Satsu H, Natsume Y, et al. TCDD-induced CYP1A1 expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54 (23): 8891-8898
- [47] Farrell K, Safe L, Safe S. Synthesis and AhR binding properties of radiolabeled PCDF congeners [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 259: 185 - 195
- [48] Wang Y, Yang D, Chang A, et al. Synthesis of a ligand - quencher conjugate for the ligand

- binding study of the aryl hydrocarbon receptor using a FRET assay [J]. *Med Chem Res*, 2012, 21 (6): 711-721
- [49] Zhao B, DeGroot D E, Hayashi A, et al. CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 117 (2): 393-403
- [50] Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) Using IRDye® Oligonucleotides [OL]. [2014-6-15]. <http://www.licor.com>
- [51] Sun X, Li F, Wang Y J, et al. Development of an exonuclease protection mediated PCR bioassay for sensitive detection of Ah receptor agonists [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 80 (1): 49-53
- [52] Wheelock G D, Hurst K R, Babish J G. Bioimmunoassay of aryl hydrocarbon (Ah) receptor transformation in vitro by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) [J]. *Toxicol Methods*, 1996, 6: 41-50
- [53] Abbott B D, Held G A, Wood C R, et al. AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantitation in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate in vivo and in culture [J]. *Toxicol Sci*, 1999, 47 (1): 62-75
- [54] Munkittrick K R, Servos M R, Van Der Kraak G J, et al. Survey of receiving - water environmental impacts associated with discharges from pulp mills: 2. Gonad size, liver size, hepatic erod activity and plasma sex steroid levels in white sucker [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1994, 13 (7): 1089-1101
- [55] Jönsson E M, Brandt I, Brunström B. Gill filament-based EROD assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36 (15): 3340-3344
- [56] Jönsson M, Abrahamson A, Brunström B, et al. EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants [J]. *Comp Biochem Phys Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 136 (3): 235-243
- [57] Engwall M, Brunström B, Näf C, et al. Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on EROD induction in chicken embryo liver cultures [J]. *Chemosphere*, 1999, 38 (10): 2327-2343
- [58] Petrusis J R, Bunce N J. Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds [J]. *Toxicol Lett*, 1999, 105 (3): 251-260
- [59] Tillitt D E, Giesy J P, Ankley G T. Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay as a tool for assessing toxic potency of planar halogenated hydrocarbons in environmental samples [J]. *Environ Sci Technol*, 1991, 25 (1): 87-92
- [60] Sanderson J T, Jac M M, Abraham B, et al. Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-o-deethylase induction in H4IIE cells: Implication for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 137 (2): 316-325
- [61] Behnisch P A, Hosoe K, Brouwer A, et al. Screening of dioxin-like toxicity equivalents for various matrices with wildtype and recombinant rat hepatoma H4IIE cells [J]. *Toxicol Sci*,

- 2002, 69 (1): 125-130
- [62] Li W, Wu W Z, Xu Y, et al. Measuring TCDD equivalents in environmental samples with the micro-EROD assay: Comparison with HRGC/HRMS data[J]. *B Environ Contam Tox*, 2002, 68 (1): 111-117
- [63] Della Torre C, Mariottini M, Malysheva A, et al. Occurrence of PCDD/PCDFs and PCBs in soil and comparison with CYP1A response in PLHC-1 cell line [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2013, 94: 104-111
- [64] Wang B, Yu G, Huang J, et al. Probabilistic ecological risk assessment of OCPs, PCBs, and DLCs in the Haihe River, China [J]. *The Scientific World Journal*, 2010, 10: 1307-1317
- [65] Denison M S, Zhao B, Baston D S, et al. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals [J]. *Talanta*, 2004, 63 (5): 1123-1133
- [66] Kang Y, Cheung K C, Cai Z W, et al. Chemical and bioanalytical characterization of dioxins in indoor dust in Hong Kong [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2011, 74 (4): 947-952
- [67] El-Fouly M H, Richter C, Giesy J P, et al. Production of a novel recombinant cell line for use as a bioassay system for detection of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin-like chemicals [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1994, 13 (10): 1581-1588
- [68] Zhao B, Baston D S, Khan E, et al. Enhancing the response of CALUX and CAFLUX cell bioassays for quantitative detection of dioxin-like compounds [J]. *Sci China Chem*, 2010, 53 (5): 1010-1016
- [69] Takeuchi S, Iida M, Yabushita H, et al. In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron [J]. *Chemosphere*, 2008, 74 (1): 155-165
- [70] Zhou Z G, Zhao B, Kojima H, et al. Simple and rapid determination of PCDD/Fs in flue gases from various waste incinerators in China using DR-EcoScreen cells [J]. *Chemosphere*, 2014, 102:24-30
- [71] Kojima H, Takeuchi S, Tsutsumi T, et al. Determination of dioxin concentrations in fish and seafood samples using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells [J]. *Chemosphere*, 2011, 83 (6): 753-759
- [72] He G, Tsutsumi T, Zhao B, et al. Third-generation Ah receptor-responsive luciferase reporter plasmids: Amplification of dioxin-responsive elements dramatically increases CALUX bioassay sensitivity and responsiveness [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 123 (2): 511-522
- [73] Van Langenhove K, Croes K, Denison M S, et al. The CALUX bio-assay: analytical comparison between mouse hepatoma cell lines with a low (H1L6.1c3) and high (H1L7.5c1) number of dioxin response elements [J]. *Talanta*, 2011, 85(4): 2039-2046
- [74] Yang J H, Lee H G, Park K Y. Development of human dermal epithelial cell-based bioassay for the dioxins [J]. *Chemosphere*, 2008, 72(8): 1188-1192

- [75] Novotna A, Pavek P, Dvorak Z. Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: Construction and characterization [J].*Environ Sci Technol*, 2011, 45(23): 10133-10139
- [76] Hahn M E. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment [J].*Sci Total Environ*, 2002, 289 (1): 49-69

附一

方法验证报告

方法名称：固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法

项目主编单位：国家环境分析测试中心

验证单位：河南省环境监测中心站、中国农业科学院、湖南省环境监测中心站、广西壮族自治区环境保护监测中心站、四川省环境保护科学研究院、宁波市环境监测中心

项目负责人及职称：周志广（高级工程师）

通讯地址：北京市朝阳区育慧南路1号电话：（010）84665758

报告编写人及职称：周志广（高级工程师）

报告日期：2016年9月15日

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)的规定,组织六家实验室进行方法验证。根据影响方法的精密度和准确度的主要因素和数理统计学的要求,编制方法验证报告。下述数据如无特殊说明均为毒性当量 (TEQ) 浓度。

1 原始测试数据

1.1 河南省环境监测中心站原始测试数据

1.1.1 实验室基本情况

表 1.1.1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	参加分析工作年份	验证方法名称
彭华	女	50	高级工程师	土壤学	26	固体废物二噁英类的筛查报告基 因法
梁晶	女	32	工程师	分析化学	5	
李洁	女	29	助理工程师	土壤学	2	

表 1.1.2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
ASE	戴安, ASE 350	良好	
读板机	美国分子, SpectraMax	良好	

表 1.1.3 使用试剂及溶剂登记表

名称	厂家、规格	纯化处理方法	备注
甲苯	JT Baker 公司 (农残级)	无	
丙酮	JT Baker 公司 (农残级)	无	
正己烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
二氯甲烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
DMSO	Sigma (细胞培养级别)	无	
胎牛血清	Life Technologies (细胞培养级别)	无	
RPMI 1640	Life Technologies (细胞培养级别)	无	

1.1.2 方法检出限、测定下限测试数据

表 1.1.4 河南省环境监测中心站标准溶液检出限、测定下限测试数据表

验证单位: 河南省环境监测中心站

测试日期: 2016.5.16

平行样品 编号		标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测 定	1	0.980	1.96
	2	0.980	1.96

结 果 (pg/ml)	3	0.980	1.96
	4	0.980	1.96
	5	0.980	1.96
	6	0.980	1.96
	7	0.980	1.96

1.1.3 方法精密度测试数据

实际样品的测试结果如下表所示。

表 1.1.5 精密度测试数据

验证单位：河南省环境监测中心站

测试日期：2016.5.30

平行号		飞灰样品 (ng/g)			污泥样品(ng/g)		
		1.68	34.3	142	0.03	5.23	23.8
测定结果	1	1.78	32.5	125	0.02	5.10	25.4
	2	1.96	32.0	139	0.02	4.90	24.3
	3	1.65	35.4	128	0.02	5.23	24.0
	4	1.53	31.2	126	0.02	5.06	26.8
	5	1.26	32.7	124	0.02	4.05	25.5
	6	1.56	34.6	127	0.02	4.86	24.9
平均值		1.62	33.1	128	0.02	4.87	25.1
标准偏差		0.24	1.6	5.5	0.0030	0.42	1.0
相对标准偏差 (%)		15	4.9	4.3	17	8.7	4.0

1.1.4 方法准确度测试数据

由于飞灰有证标准样品极少，故选择的是国家环境分析测试中心研制的飞灰标样，其低浓度样品为 7.81 ng/g，高浓度样品为 10.4 ng/g。实际样品加标回收率测定时的加标量见附表。

表 1.1.6 飞灰标准样品的测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：河南省环境监测中心站

测试日期：2016.6.7

平行号		飞灰标样 (7.81 ng/g)	飞灰标样(10.4 ng/g)
测定结果	1	7.61	9.80
	2	6.93	9.50
	3	7.15	11.3
	4	8.33	11.5
	5	8.46	10.9
	6	7.12	10.8

平均值		7.60	10.6
标准物质浓度		7.81	10.4
相对误差 (%)		-2.7	1.8

表 1.1.7 实际样品加标测试数据 (平行测定 6 次, n=6)

验证单位: 河南省环境监测中心站

测试日期: 2016.6.21

平行号	飞灰样品 (5 μ l, TEQ=2.41)									
	1.68	测定值	回收率	34.3	测定值	回收率	142	测定值	回收率	
测定结果	1	1.78	4.03	93.4	32.3	35.2	114	125	128	110
	2	1.96	4.52	106	32.0	34.6	110	139	142	106
	3	1.65	4.08	100	34.6	37.8	97.1	128	130	92.5
	4	1.53	4.22	111	31.2	33.5	93.8	126	128	101
	5	1.26	4.00	113	32.7	35.1	101	124	127	113
	6	1.56	4.09	105	34.7	37.1	107	127	130	111
平均值	1.62	4.16	105	33.1	35.6	104	128	131	106	
平行号	污泥样品 (低: 2 μ l TEQ=0.96; 中: 10 μ l, TEQ=4.80; 高: 50 μ l, TEQ=24.1)									
	0.044	测定值	回收率	0.04	测定值	回收率	0.04	测定值	回收率	
测定结果	1	0.03	0.899	90.6	0.04	4.39	90.6	0.04	24.5	101
	2	0.04	0.988	99.0	0.04	5.43	112	0.04	24.4	101
	3	0.04	1.06	106	0.04	4.60	95.0	0.04	22.6	93.6
	4	0.03	1.09	110	0.04	5.41	112	0.04	26.7	110
	5	0.03	0.938	94.8	0.04	5.71	118	0.04	25.5	106
	6	0.04	1.17	117	0.04	5.30	110	0.04	25.8	107
平均值	0.04	1.03	103	0.04	5.14	106	0.04	24.9	103	

1.2 中国农业科学院原始测试数据

1.2.1 实验室基本情况

表 1.2.1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	参加分析工作年份	验证方法名称
张维	男	35	助理研究员	兽医生物医学	2009	固体废物二噁英类筛查报告基因法
王瑞国	男	37	助理研究员	动物营养	2009	
李阳	男	36	助理研究员	食品化学	2008	

表 1.2.2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
ASE	戴安, ASE 350	良好	
读板机	Promega, GloMax Multi+	良好	

表 1.2.3 使用试剂及溶剂登记表

名称	厂家、规格	纯化处理方法	备注
甲苯	JT Baker 公司 (农残级)	无	
丙酮	JT Baker 公司 (农残级)	无	
正己烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
二氯甲烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
DMSO	Sigma (细胞培养级别)	无	
胎牛血清	Life Technologies (细胞培养级别)	无	
RPMI 1640	Life Technologies (细胞培养级别)	无	

1.2.2 方法检出限、测定下限测试数据

表 1.2.4 中国农业科学院标准溶液检出下限、定量下限测试数据表

验证单位: 中国农业科学院 测试日期: 2016.3.21

平行样品 编号		标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测 定 结 果 (pg/ml)	1	0.980	1.96
	2	0.980	1.96
	3	0.980	1.96
	4	0.980	1.96
	5	0.980	1.96
	6	0.980	1.96
	7	0.980	1.96

1.2.3 方法精密度测试数据

实际样品的测试结果如下表所示。

表 1.2.5 精密度测试数据

验证单位: 中国农业科学院 测试日期: 2016.3.28

平行号		飞灰样品 (ng/g)			污泥样品 (ng/g)		
测定结果		1.68	34.3	142	0.03	5.23	23.8
	1	1.84	33.6	119	0.03	4.62	24.1
	2	1.56	31.9	123	0.03	4.72	24.5

	3	1.79	37.6	138	0.03	5.55	24.2
	4	1.46	32.5	126	0.02	5.37	24.6
	5	1.78	31.2	123	0.03	5.71	24.3
	6	1.45	33.1	121	0.03	4.96	23.2
平均值		1.65	33.3	125	0.03	5.15	24.1
标准偏差		0.18	2.3	6.8	0.004	0.5	0.5
相对标准偏差 (%)		11	6.9	5.4	14	8.8	2.1

1.2.4 方法准确度测试数据

由于飞灰有证标准样品极少，故选择的是国家环境分析测试中心研制的飞灰标样，其低浓度样品为 7.81 ng/g，高浓度样品为 10.4 ng/g。实际样品加标回收率测定时的加标量见附表。

表 1.2.6 飞灰标准样品的测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：中国农业科学院

测试日期：2016.4.06

平行号	飞灰标样（低，ng/g）	飞灰标样（高，ng/g）	
测定结果	1	8.45	11.4
	2	8.36	12.6
	3	7.29	10.4
	4	6.97	9.21
	5	6.85	9.04
	6	8.58	11.3
平均值		7.75	10.7
标准物质浓度		7.81	10.4
相对误差 (%)		-0.8	2.2

表 1.2.7 实际样品加标测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：中国农业科学院

测试日期：2016.4.13

平行号	飞灰样品（5 μl，TEQ=2.41）									
	1.68	测定值	回收率	34.30	测定值	回收率	142	测定值	回收率	
测定结果	1	1.84	4.13	95.0	33.6	34.8	103	119	122	107
	2	1.56	3.92	97.9	31.9	34.6	107	123	126	107
	3	1.79	4.55	114	37.6	27.4	97.1	138	141	111
	4	1.46	4.27	117	32.5	35.0	115	126	129	118
	5	1.78	4.46	111	33.0	31.2	117	123	126	113
	6	1.45	3.99	105	30.2	33.1	114	121	124	105
平均值		1.65	4.22	107	33.3	33.4	109	125	128	110

平行号	污泥样品（低：2 μl, TEQ=0.96；中：10 μl, TEQ=4.8；高：50 μl, TEQ=24.1）									
	0.04	测定值	回收率	0.04	测定值	回收率	0.04	测定值	回收率	
1	0.04	0.92	91.7	0.04	4.59	94.8	0.04	23.9	99.1	
2	0.04	1.01	101	0.04	4.73	97.7	0.04	24.6	102	
3	0.05	1.09	108	0.04	5.61	116	0.04	25.7	106	
4	0.05	1.23	123	0.04	5.28	109	0.04	26.4	109	
5	0.04	1.05	105	0.04	5.67	117	0.04	28.4	118	
6	0.04	0.98	97.9	0.04	4.96	102	0.04	23.2	96.0	
平均值	0.04	1.05	105	0.04	5.14	106	0.04	25.4	105	

1.3 湖南省环境监测中心站原始测试数据

1.3.1 实验室基本情况

表 1.3.1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	参加分析工作年份	验证方法名称
陈燕	女	35	工程师	环境工程	6 年	固体废物二噁英类的筛查报告基因法
龙雯琪	女	27	助理工程师	环境工程	2 年	

表 1.3.2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
ASE	戴安, ASE 350	良好	
读板机	美国分子, SpectraMax	良好	

表 1.3.3 使用试剂及溶剂登记表

名称	厂家、规格	纯化处理方法	备注
甲苯	JT Baker 公司（农残级）	无	
丙酮	JT Baker 公司（农残级）	无	
正己烷	JT Baker 公司（农残级）	无	
二氯甲烷	JT Baker 公司（农残级）	无	
DMSO	Sigma（细胞培养级别）	无	
胎牛血清	Life Technologies（细胞培养级别）	无	
RPMI 1640	Life Technologies（细胞培养级别）	无	

1.3.2 方法检出限、测定下限测试数据

表 1.3.4 湖南省环境监测中心站标准溶液检出限、定量下限测试数据表

验证单位：湖南省环境监测中心站

测试日期：2016.7.21

平行样品 编号		标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测 定 结 果 (pg/ml)	1	0.980	1.96
	2	0.980	1.96
	3	0.980	1.96
	4	0.980	1.96
	5	0.980	1.96
	6	0.980	1.96
	7	0.980	1.96

1.3.3 方法精密度测试数据

实际样品的测试结果如下表所示。

表 1.3.5 精密度测试数据

验证单位：湖南省环境监测中心站

测试日期：2016.7.27

平行号		飞灰样品 (ng/g)			污泥样品 (ng/g)		
		1.68	34.3	142	0.03	5.23	23.8
测定结果	1	1.56	38.5	116	0.02	5.23	19.9
	2	1.95	39.1	126	0.02	4.65	19.5
	3	1.67	39.3	125	0.02	5.56	19.0
	4	1.45	38.7	120	0.02	5.41	24.1
	5	1.38	40.1	119	0.02	5.69	24.1
	6	1.49	33.3	129	0.03	5.48	20.3
平均值		1.58	38.2	123	0.02	5.34	21.1
标准偏差		0.21	2.5	4.9	0.004	0.37	2.3
相对标准偏差 (%)		13	6.5	4.0	18	7.0	11

1.3.4 方法准确度测试数据

由于飞灰有证标准样品极少，故选择的是国家环境分析测试中心研制的飞灰标样，其低浓度样品为 7.81 ng/g，高浓度样品为 10.4 ng/g。实际样品加标回收率测定时的加标量见附表。

表 1.3.6 飞灰标准样品的测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：湖南省环境监测中心站

测试日期：2016.8.03

平行号		飞灰标样 (7.81 ng/g)	飞灰标样(10.4 ng/g)
测定结果	1	7.65	11.4
	2	9.24	9.27
	3	7.16	9.67
	4	8.94	9.36
	5	8.09	11.5
	6	7.39	10.3
平均值		8.08	9.29
标准物质浓度		7.81	10.4
相对标准偏差 (%)		3.5	-11

表 1.3.7 实际样品加标测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：湖南省环境监测中心站

测试日期：2016.8.22

平行号		飞灰样品 (5μl, TEQ=2.41)								
		1.68	测定值	回收率	34.30	测定值	回收率	142	测定值	回收率
测定结果	1	1.56	3.95	99.2	38.5	41.0	108	116	118	92.1
	2	1.96	4.80	118	39.1	41.8	111	126	128	97.1
	3	1.67	4.43	115	39.3	41.7	98.8	125	128	106
	4	1.45	4.09	110	38.7	41.0	94.2	120	123	111
	5	1.38	4.05	111	40.1	42.8	113	119	122	115
	6	1.49	3.95	102	33.3	35.9	109	129	132	117
平均值		1.58	4.21	109	38.2	40.7	106	123	125	106
平行号	污泥样品 (低: 2 μl, TEQ=0.96; 中: 10 μl, TEQ=4.8; 高: 50 μl, TEQ=24.1)									
		0.04	测定值	回收率	0.05	测定值	回收率	0.05	测定值	回收率
	1	0.05	1.08	107	0.05	4.61	95.0	0.05	28.6	118
	2	0.06	1.18	117	0.05	4.73	97.5	0.05	26.4	109
	3	0.05	1.10	109	0.05	5.63	116	0.05	22.2	91.9
	4	0.04	1.01	101	0.05	5.54	114	0.05	25.5	106
	5	0.05	1.04	103	0.05	5.74	119	0.05	24.2	100
	6	0.05	1.07	106	0.05	5.55	115	0.05	28.0	116
平均值		0.05	1.05	107	0.05	5.30	109	0.05	25.8	107

1.4 广西壮族自治区环境保护监测中心站原始测试数据

1.4.1 实验室基本情况

表 1.4.1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	参加分析工作年份	验证方法名称
田艳	女	38	主任/高工	高分子化学与物理	13 年	固体废物二噁英类的筛查报告基因法
黄宁	女	36	工程师	控制与分析化学	9 年	
陈德翼	男	31	工程师	环境科学	5 年	
梁鹏	男	29	助理工程师	应用化学	2 年	

表 1.4.2 使用仪器情况登记表

	规格型号	性能状况	备注
ASE	戴安, ASE 350	良好	
读板机	美国分子, SpectraMax	良好	

表 1.4.3 使用试剂及溶剂登记表

名称	厂家、规格	纯化处理方法	备注
甲苯	JT Baker 公司 (农残级)	无	
丙酮	JT Baker 公司 (农残级)	无	
正己烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
二氯甲烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
DMSO	Sigma (细胞培养级别)	无	
胎牛血清	Life Technologies (细胞培养级别)	无	
RPMI 1640	Life Technologies (细胞培养级别)	无	

1.4.2 方法检出限、测定下限测试数据

表 1.4.4 广西壮族自治区环境保护监测中心站标准溶液检出下限、定量下限测试数据表

验证单位：广西壮族自治区环境保护监测中心站

测试日期：2016.6.13

平行样品 编号	标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测定 结果 (pg/ml)	1	0.980
	2	0.980
	3	0.980
	4	0.980
	5	0.980
	6	0.980

	7	0.980	1.96
--	---	-------	------

1.4.3 方法精密度测试数据

实际样品的测试结果如下表所示。

表 1.4.5 精密度测试数据

验证单位：广西壮族自治区环境保护监测中心站

测试日期：2016.6.20

平行号		飞灰样品(ng/g)			污泥样品(ng/g)		
		1.68	34.3	142	0.03	5.23	23.8
测定结果	1	1.47	39.1	128	0.03	4.32	28.0
	2	1.87	39.6	121	0.03	4.21	29.6
	3	1.78	38.9	120	0.02	4.06	29.4
	4	1.36	39.2	125	0.03	4.12	28.5
	5	1.40	40.4	119	0.02	4.02	23.4
	6	1.67	37.5	123	0.03	4.12	23.9
平均值		1.59	39.1	123	0.03	4.13	27.1
标准偏差		0.21	0.96	3.4	0.005	0.11	2.8
相对标准偏差 (%)		13	2.5	2.8	19	2.8	10

1.4.4 方法准确度测试数据

由于飞灰有证标准样品极少，故选择的是国家环境分析测试中心研制的飞灰标样，其低浓度样品为 7.81 ng/g，高浓度样品为 10.4 ng/g。实际样品加标回收率测定时的加标量见附表。

表 1.4.6 飞灰标准样品的测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：广西壮族自治区环境保护监测中心站

测试日期：2016.6.28

平行号	飞灰标样 (7.81 ng/g)	飞灰标样(10.4 ng/g)	
测定结果	1	9.56	12.9
	2	7.72	11.3
	3	7.29	10.9
	4	9.03	9.32
	5	8.01	11.6
	6	7.28	11.3
平均值	8.15	11.2	
标准物质浓度	7.81	10.4	
相对误差 (%)	4.4	7.5	

表 1.4.7 实际样品加标测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：广西壮族自治区环境保护监测中心站

测试日期：2016.7.11

平行号	飞灰样品（5 μ l，TEQ=2.41）									
		1.68	测定值	回收率	34.3	测定值	回收率	142	测定值	回收率
测定结果	1	1.47	3.70	92.5	39.1	41.3	91.3	128	131	110
	2	1.87	4.06	90.9	39.6	41.9	97.9	121	123	101
	3	1.78	4.46	111	39.1	41.4	102	120	123	107
	4	1.36	4.09	113	39.2	41.8	107	125	127	98.3
	5	1.40	3.91	104	40.4	43.1	115	119	122	109
	6	1.67	4.06	99.2	37.5	40.0	107	123	125	103
平均值		1.59	4.05	102	39.1	41.6	103	123	125	105
平行号	污泥样品（低：2 μ l，TEQ=0.96；中：10 μ l，TEQ=4.8；高：50 μ l，TEQ=24.1）									
		0.04	测定值	回收率	0.06	测定值	回收率	0.06	测定值	回收率
	1	0.06	1.02	100	0.06	4.74	97.5	0.06	21.4	88.7
	2	0.06	1.01	99.0	0.06	4.51	92.7	0.06	24.4	101
	3	0.06	1.11	109	0.06	4.66	95.8	0.06	27.7	114
	4	0.06	1.11	110	0.06	5.30	109	0.06	22.8	94.5
	5	0.06	1.23	122	0.06	5.55	114	0.06	26.2	108
	6	0.06	1.05	103	0.06	5.36	110	0.06	27.4	114
平均值		0.06	1.09	107	0.06	5.02	103	0.06	25.0	104

1.5 四川省环境保护科学研究院原始测试数据

1.5.1 实验室基本情况

表 1.5.1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	参加分析工作年份	验证方法名称
王维	男	33	高级工程师	环境工程	2 年	固体废物二噁英类的筛查报告基因法
许利	女	31	工程师	高分子科学与工程	5 年	
张悦	女	27	工程师	环境工程	2 年	
刘彦	男	25	助理工程师	环境工程	2 年	

表 1.5.2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
ASE	戴安, ASE 350	良好	
读板机	美国分子, SpectraMax	良好	

表 1.5.3 使用试剂及溶剂登记表

名称	厂家、规格	纯化处理方法	备注
甲苯	JT Baker 公司 (农残级)	无	
丙酮	JT Baker 公司 (农残级)	无	
正己烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
二氯甲烷	JT Baker 公司 (农残级)	无	
DMSO	Sigma (细胞培养级别)	无	
胎牛血清	Life Technologies (细胞培养级别)	无	
RPMI 1640	Life Technologies (细胞培养级别)	无	

1.5.2 方法检出限、测定下限测试数据

表 1.5.4 四川省环境保护科学研究院标准溶液检出下限、定量下限测试数据表

验证单位: 四川省环境保护科学研究院

测试日期: 2016.5.9

平行样品 编号	标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测 定 结 果 (pg/ml)	1	0.980
	2	0.980
	3	0.980
	4	0.980
	5	0.980
	6	0.980
	7	0.980

1.5.3 方法精密度测试数据

实际样品的测试结果如下表所示。

表 1.5.5 精密度测试数据

验证单位: 四川省环境保护科学研究院

测试日期: 2016.5.24

平行号	飞灰样品(ng/g)			污泥样品(ng/g)		
	1.68	34.30	142	0.03	5.23	23.8

测定结果	1	1.67	33.1	145	0.03	4.32	26.1
	2	1.78	32.5	149	0.03	4.61	27.2
	3	1.98	31.9	153	0.02	4.12	25.2
	4	1.56	34.6	156	0.03	4.01	27.9
	5	1.45	35.7	148	0.03	4.48	26.9
	6	1.34	32.1	140	0.02	4.56	27.1
平均值		1.63	33.3	149	0.03	4.35	26.7
标准偏差		0.23	1.5	5.5	0.005	0.24	0.95
相对标准偏差 (%)		14	4.5	3.7	19	5.6	3.6

1.5.4 方法准确度测试数据

由于飞灰有证标准样品极少，故选择的是国家环境分析测试中心研制的飞灰标样，其低浓度样品为 7.81 ng/g，高浓度样品为 10.4 ng/g。实际样品加标回收率测定时的加标量见附表。

表 1.5.6 飞灰标准样品的测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：四川省环境保护科学研究院

测试日期：2016.5.30

平行号		飞灰标样 (7.81 ng/g)	飞灰标样(10.4 ng/g)
测定结果	1	7.24	11.0
	2	8.39	12.9
	3	9.37	11.3
	4	9.08	9.47
	5	8.05	11.5
	6	7.15	11.6
平均值		8.21	11.3
标准物质浓度		7.81	10.4
相对误差 (%)		5.1	8.3

表 1.5.7 实际样品加标测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：四川省环境保护科学研究院

测试日期：2016.6.14

平行号		飞灰样品 (5μl, TEQ=2.41)								
		1.68	测定值	回收率	34.30	测定值	回收率	142	测定值	回收率
测	1	1.67	3.85	90.5	33.1	35.5	98.8	145	147	101

定 结 果	2	1.78	4.04	93.8	32.5	34.9	100	149	152	111
	3	1.98	4.43	102	31.9	34.5	107	153	156	107
	4	1.56	4.24	111	34.6	37.2	110	156	158	94.2
	5	1.45	3.99	105	35.7	38.5	117	148	151	97.1
	6	1.34	3.71	98.3	32.1	34.9	114	140	143	109
平 均 值		1.63	4.04	100	33.4	35.9	108	149	151	103
平 行 号	污泥样品（低：2 μ l, TEQ=0.96；中：10 μ l, TEQ=4.8；高：50 μ l, TEQ=24.1）									
		0.04	测定值	回收率	0.05	测定值	回收率	0.05	测定值	回收率
	1	0.04	1.01	101	0.05	5.41	112	0.05	26.2	108
	2	0.05	1.18	118	0.05	5.67	117	0.05	27.3	113
	3	0.06	1.14	113	0.05	4.94	102	0.05	25.3	105
	4	0.04	1.08	108	0.05	5.02	104	0.05	23.5	97.3
	5	0.05	1.22	122	0.05	4.47	92.1	0.05	24.6	102
	6	0.05	1.10	109	0.05	4.48	92.3	0.05	27.7	115
平 均 值		0.05	1.12	112	0.05	4.99	103	0.05	25.8	107

1.6 宁波市环境监测中心原始测试数据

1.6.1 实验室基本情况

表 1.6.1 参加验证的人员情况登记表

李申杰	男	38	高级工程师	分析化学	10	固体废物二噁英 类的筛查报告基 因法
杨炳建	男	40	高级工程师	药物化学	17	
陈荣枫	男	29	工程师	环境科学	3	

表 1.6.2 使用仪器情况登记表

仪器名称	规格型号	性能状况	备注
ASE	戴安, ASE 350	良好	
读板机	德国, Berthold Centro LB960	良好	

表 1.6.3 使用试剂及溶剂登记表

名称	厂家、规格	纯化处理方法	备注
甲苯	JT Baker 公司（农残级）	无	
丙酮	JT Baker 公司（农残级）	无	

正己烷	JT Baker 公司（农残级）	无	
二氯甲烷	JT Baker 公司（农残级）	无	
DMSO	Sigma（细胞培养级别）	无	
胎牛血清	Life Technologies（细胞培养级别）	无	
RPMI 1640	Life Technologies（细胞培养级别）	无	

1.6.2 方法检出限、测定下限测试数据

表 1.6.4 宁波市环境监测中心标准溶液检出下限、定量下限测试数据表

验证单位：宁波市环境监测中心

测试日期：2016.7.4

平行样品 编号		标准溶液检出限	标准溶液测定下限
测 定 结 果 (pg/ml)	1	0.980	1.96
	2	0.980	1.96
	3	0.980	1.96
	4	0.980	1.96
	5	0.980	1.96
	6	0.980	1.96
	7	0.980	1.96

1.6.3 方法精密度测试数据

实际样品的测试结果如下表所示。

表 1.6.5 精密度测试数据

验证单位：宁波市环境监测中心

测试日期：2016.7.4

平行号		飞灰样品 (ng/g)			污泥样品(ng/g)		
		1.68	34.3	142	0.03	5.23	23.8
测 定 结 果	1	1.85	33.4	148	0.02	5.67	27.5
	2	1.83	31.9	130	0.03	5.78	26.5
	3	2.03	36.0	156	0.03	5.95	28.9
	4	2.35	31.4	135	0.02	4.59	28.4
	5	2.02	32.2	128	0.03	4.69	27.8
	6	2.01	31.8	138	0.03	4.92	28.3
平均值		2.03	32.8	139	0.03	5.26	27.9
标准偏差		0.19	1.7	11	0.005	0.60	0.84
相对标准偏		9.3	5.2	7.7	19	11	3.0

差 (%)							
-------	--	--	--	--	--	--	--

1.6.4 方法准确度测试数据

由于飞灰有证标准样品极少，故选择的是国家环境分析测试中心研制的飞灰标样，其低浓度样品为 7.81 ng/g，高浓度样品为 10.4 ng/g。实际样品加标回收率测定时的加标量见附表。

表 1.6.6 飞灰标准样品的测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：宁波市环境监测中心

测试日期：2016.7.4

平行号		飞灰标样 (7.81 ng/g)	飞灰标样(10.4 ng/g)
测定结果	1	7.71	10.4
	2	8.23	10.2
	3	8.56	9.87
	4	8.12	9.98
	5	8.97	11.3
	6	7.4	11.4
平均值		8.17	10.5
标准物质浓度		7.81	10.4
相对标准偏差 (%)		4.6	1.1

表 1.6.7 实际样品加标测试数据（平行测定 6 次，n=6）

验证单位：宁波市环境监测中心

测试日期：2016.7.4

平行号	飞灰样品 (5 μl, TEQ=2.41)									
	1.68	测定值	回收率	34.3	测定值	回收率	142	测定值	回收率	
测定结果	1	1.64	4.42	115	33.4	36.0	107	148	151	97.9
	2	1.56	4.20	110	31.9	34.6	111	130	133	106
	3	1.75	4.44	112	36.0	38.8	115	156	158	102
	4	1.40	3.94	105	31.4	33.9	103	135	138	119
	5	1.52	4.25	113	32.2	34.6	98.8	128	131	114
	6	1.45	4.13	111	31.8	34.1	95.0	138	141	109
平均值		1.55	4.23	111	32.8	35.3	105	139	142	108
平行	污泥样品（低：2 μl, TEQ=0.96；中：10 μl, TEQ=4.8；高：50 μl, TEQ=24.1）									

号		0.04	测定值	回收率	0.04	测定值	回收率	0.04	测定值	回收率
	1	0.03	1.01	102	0.04	5.60	116	0.04	27.6	114
	2	0.04	1.07	107	0.04	5.67	117	0.04	25.5	106
	3	0.04	1.13	114	0.04	4.53	93.5	0.04	27.2	113
	4	0.04	1.09	109	0.04	5.02	104	0.04	22.6	93.6
	5	0.04	0.98	97.9	0.04	4.81	99.4	0.04	25.4	105
	6	0.05	1.09	108	0.04	5.03	104	0.04	26.8	111
平 均 值		0.040	1.06	106	0.04	5.11	106	0.04	25.9	107

2 方法验证数据汇总

2.1 标准溶液的检出限、测定下限汇总

按照第五章中的 5.7.1 的操作计算标准溶液的检出限和测定下限。由于生物检测方法的特殊性，细胞的灵敏度必须达到规定的测定下限才能进行测试，因此每家实验室的检出限和测定下限都一致。河南省环境监测中心站实验室编号为 1，中国农业科学院实验室编号 2，湖南省环境监测中心站实验室编号 3，广西壮族自治区环境保护监测中心站实验室编号为 4，成都市环境保护科学研究院实验室编号为 5，宁波市环境监测中心实验室编号为 6。

表 2.1 标准溶液检出限、测定下限汇总结果

实验室号	试样	
	标准溶液检出限 (pg/ml)	标准溶液测定下限(pg/ml)
1	0.980	1.96
2	0.980	1.96
3	0.980	1.96
4	0.980	1.96
5	0.980	1.96
6	0.980	1.96

结论：六家实验室按照“固体废物 二噁英类筛查 报告基因法”（草案）中规定的标准溶液检出限和测定下限操作步骤进行分析，当使用 H1L6.1c2 细胞时，标准溶液的检出限为 0.980 pg-TEQ/ml (0.200 pg-TEQ/well)，测定下限为 1.96 pg-TEQ/ml (0.400 pg-TEQ/well)，当取样量为 3.5 g 时，方法测定下限为 1.00 pg-TEQ/g。

2.2 方法精密度数据汇总

六家实验室进行了方法精密度的验证工作，数据汇总见附表 2.2-2.4。河南省环境监测中心站实验室编号为 1，中国农业科学院实验室编号 2，湖南省环境监测中心站实验室编号 3，广西壮族自治区环境保护监测中心站实验室编号为 4，成都市环境保护科学研究院实验室编号为 5，宁波市环境监测中心实验室编号为 6。

表 2.2 飞灰实际样品精密度试验数据

实验室号	浓度 (1.68 ng/g) 1			浓度 (34.3 ng/g) 2			浓度 (142 ng/g) 3		
		S _i	RSD _i (%)		S _i	RSD _i (%)	∴	S _i	RSD _i (%)
1	1.62	0.24	15	33.1	1.6	4.9	128	5.5	4.3
2	1.65	0.18	11	33.3	2.3	6.9	125	6.8	5.4
3	1.58	0.21	13	38.2	2.5	6.5	123	4.9	4.0
4	1.59	0.21	13	39.1	1.0	4.2	123	3.4	2.8
5	1.63	0.23	14	33.3	1.5	4.5	148	5.5	3.7
6	2.03	0.19	9.3	32.8	1.7	5.2	139	11	7.7
总均值	1.68			35.0			131		
S	0.17			2.9			10		
RSD	10			8.2			7.8		
重复性限 r	0.590			5.10			18.0		
再现性限 R	0.590			5.10			18.0		

表 2.3 污泥实际样品精密度试验数据

实验室号	浓度 (0.03 ng/g) 1			浓度 (5.23 ng/g) 2			浓度 (23.8 ng/g) 3		
	∴	S _i	RSD _i (%)	∴	S _i	RSD _i (%)	∴	S _i	RSD _i (%)
1	0.02	0.003	17	4.87	0.42	8.7	25.1	1.0	4.0
2	0.03	0.004	12	5.15	0.45	8.8	24.1	0.52	2.1
3	0.02	0.002	13	5.34	0.37	6.9	21.1	2.3	11
4	0.03	0.003	14	4.13	0.11	2.8	27.1	2.8	10
5	0.03	0.005	18	4.35	0.24	5.6	26.8	0.95	3.6
6	0.03	0.003	12	5.26	0.60	11	27.9	0.84	3.0
总均值	0.03			4.85			25.4		
S	0.005			0.50			2.5		
RSD	19			10			9.9		
重复性限 r	0.01			1.50			4.60		
再现性限 R	0.01			1.50			4.60		

结论:

六家实验室分别对浓度为 1.70 ng/g、34.0 ng/g、142 ng/g 的飞灰统一样品进行了 6 次测定。实验室内相对标准偏差分别为: 9.3%~15%、2.4%~6.9%、2.7%~7.7%; 实验室间相对标准偏差分别为: 10%、8.2%、7.8%; 重复性限分别为: 0.590 ng/g、5.10 ng/g 和 18.0 ng/g; 再现性限分别为: 0.590 ng/g、5.10 ng/g 和 18.0 ng/g。

六家实验室分别对浓度为 0.03 ng/g、5.20 ng/g、24.0 ng/g 的污泥统一样品进行了 6 次测定。实验室内相对标准偏差分别为：12%~17%、8.6%~11%、5.7%~10%；实验室间相对标准偏差为：17%、11%、9.8%；重复性限分别为：0.01 ng/g、1.50 ng/g 和 4.60ng/g；再现性限分别为：0.01 ng/g、1.50 ng/g 和 4.60 ng/g。

2.3 方法准确度数据汇总

六家实验室进行了方法精密度的验证工作，数据汇总见附表 2.4 和 2.5。河南省环境监测中心站实验室编号为 1，中国农业科学院实验室编号 2，湖南省环境监测中心站实验室编号 3，广西壮族自治区环境保护监测中心站实验室编号为 4，成都市环境保护科学研究所实验室编号为 5，宁波市环境监测中心实验室编号为 6。

表 2.4 飞灰标准样品准确度试验数据

实验 室号	浓度 (7.81 ng/g) 1		浓度 (10.4 ng/g) 2	
		RE		RE
1	7.60	-2.7	11.0	1.8
2	7.80	-0.77	11.0	2.2
3	8.10	3.5	9.30	-11
4	8.20	4.4	11.0	7.5
5	8.20	5.1	11.0	8.3
6	8.20	4.6	11.0	1.7
\overline{RE}	2.4		1.7	
S_{RE}	2.4±6.5		1.7±6.9	

表 2.5 飞灰实际样品加标回收率测试数据

平行号	实际样品									
	样品 1			样品 2			样品 3			
	样品	加标样品	回收率	样品	加标样品	回收率	样品	加标样品	回收率	
测 定 结 果	1	1.62	4.16	105	33.1	35.5	104	128	131	106
	2	1.65	4.22	107	33.3	35.9	109	125	128	110
	3	1.58	4.21	109	38.2	40.7	106	123	125	106
	4	1.59	4.06	102	39.1	41.6	103	123	125	105
	5	1.63	4.04	101	33.3	35.9	108	148	151	103
	6	2.03	4.23	111	32.8	35.3	105	139	142	108
平均值	1.68	4.15	102	35.0	37.4	99.6	131	133	83	
加标量	TEQ: 2.41			TEQ: 2.41			TEQ: 2.41			
\overline{P}	106%			106%			106%			
S_P	3.9%			2.3%			2.4%			

表 2.6 污泥实际样品加标回收率测试数据

平行号	实际样品									
	样品 1			样品 2			样品 3			
	样品	加标样品	回收率	样品	加标样品	回收率	样品	加标样品	回收率	
测定结果	1	0.04	1.03	103	0.04	5.14	106	0.04	24.9	103
	2	0.04	1.05	105	0.04	5.14	106	0.04	25.4	105
	3	0.05	1.08	107	0.05	5.30	109	0.05	25.8	107
	4	0.06	1.09	107	0.06	5.02	103	0.06	25.0	104
	5	0.05	1.12	102	0.05	4.99	103	0.05	25.8	107
	6	0.04	1.06	106	0.04	5.11	106	0.04	25.9	107
平均值	0.05	1.07		0.05	5.12	99.6	0.05	25.5	83	
加标量	TEQ: 0.96			TEQ: 4.80			TEQ: 24.1			
\bar{P}	105%			106%			106%			
S_P	2.1%			2.3%			1.8%			

结论：六家实验室对浓度为 7.81 ng/g、10.4 ng/g 的飞灰标准样品进行了 6 次重复测定：
相对误差的平均值为：2.4%、1.7%；

相对误差的标准偏差为：2.4%±6.5%、1.7%±6.9%。

六家实验室对浓度为 1.70 ng/g、34.3 ng/g、142 ng/g 的飞灰加标样品（加标量为 TEQ=2.41 ng/g）进行了 6 次重复测定：

加标回收率分别为：90.5%~118%、91.3%~117%、92.1%~119%；

加标回收率最终值为：106%±7.8%、106%±4.6%、106%±4.8%。

六家实验室对浓度为 0.04 ng/g 的污泥加标样品（加标量为 TEQ=0.96 ng/g、TEQ=4.8 ng/g、TEQ=24 ng/g）进行了 6 次重复测定：

加标回收率分别为：90.6%~119%、90.6%~119%、88.7%~118%；

加标回收率最终值为：105%±4.2%、106%±4.5%、106%±3.5%。

3 方法验证结论

经过实验室内和六家实验室间的验证得到如下结论：

(1) 标准溶液的检出下限和定量下限

实验室内和实验室间验证数据均表明，标准溶液的检出限为 0.980 pg/ml，测定下限为 1.96 pg/ml，当取样量为 3.5 克时，方法测定下限为 1.00 pg-TEQ/g。

(2) 精密度

六家实验室分别对浓度为 1.70 ng/g、34.0 ng/g、142 ng/g 的飞灰统一样品进行了 6 次测定。实验室内相对标准偏差分别为：9.3%~15%、2.4%~6.9%、2.7%~7.7%；实验室间相对标准偏差分别为：10%、8.2%、7.8%；重复性限分别为：0.59 ng/g、5.10 ng/g 和 18.0 ng/g；再现性限分别为：0.590 ng/g、5.10ng/g 和 18.0 ng/g。

六家实验室分别对浓度为 0.03 ng/g、5.20 ng/g、24.0 ng/g 的污泥统一样品进行了 6 次测

定。实验室内相对标准偏差分别为：12%~17%、8.6%~11%、5.7%~10%；实验室间相对标准偏差为：17%、11%、9.8%；重复性限分别为：0.01 ng/g、1.50 ng/g 和 4.60 ng/g；再现性限分别为：0.01 ng/g、1.50 ng/g 和 4.60 ng/g。

(3) 准确度

六家实验室对浓度为 7.81 ng/g、10.4 ng/g 的飞灰标准样品进行了 6 次重复测定：

相对误差的平均值为：2.4%、1.7%；

相对误差的标准偏差为：2.4%±6.5%、1.7%±6.9%。

六家实验室对浓度为 1.70 ng/g、34.3 ng/g、142 ng/g 的飞灰加标样品（加标量为 TEQ=2.41 ng/g）进行了 6 次重复测定：

加标回收率分别为：90.5%~118%、91.3%~117%、92.1%~119%；

加标回收率最终值为：106%±7.8%、106%±4.6%、106%±4.8%。

六家实验室对浓度为 0.04 ng/g 的污泥加标样品（加标量为 TEQ=0.960 ng/g、TEQ=4.80 ng/g、TEQ=24.0 ng/g）进行了 6 次重复测定：

加标回收率分别为：90.6%~119%、90.6%~119%、88.7%~118%；

加标回收率最终值为：105%±4.2%、106%±4.5%、106%±3.5%。

(4) 整体结论

在方法检出限和测定下限方面，六家实验室得出的检出下限和定量下限均一致，而且低于《生活垃圾填埋场污染控制标准》（GB 16889-2008）规定飞灰中的二噁英含量（毒性当量浓度）低于 3 μg/kg 才可以填埋、《危险废物鉴别标准毒性物质含量鉴别》（GB 5085.6-2007）规定的固体废物中二噁英的含量如果大于或者等于 15 μg-TEQ/kg 时即可判断为危险废物、《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）规定的干污泥中多氯代二苯并二噁英/多氯代二苯并呋喃的含量必须小于 100 ng-TEQ/kg 时才可以农用的要求。

在方法精密度方面，当飞灰实际样品浓度为 1.70 ng/g 时，实验室内相对标准偏差为 9.3%-15%；当飞灰实际样品浓度为 34.0 ng/g 时，实验室内相对标准偏差为 2.4%-6.9%；当飞灰实际样品浓度为 142 ng/g 时，实验室内相对标准偏差为 2.7%-7.7%，相对应的实验室之间的相对标准偏差为 10%、8.2%、7.8%。当污泥样品浓度为 0.03 ng/g 时，实验室内相对标准偏差为 12%-17%；当污泥样品浓度为 5.23 ng/g 时，实验室内相对标准偏差为 8.6%-11%；当污泥样品浓度为 23.8 ng/g 时，实验室内相对标准偏差为 5.7%-10%，相对应的实验室之间的相对标准偏差为 17%、11%、9.8%。

在方法准确度方面，经六家实验室对浓度为 7.81 ng/g、10.4 ng/g 的飞灰标准样品进行了测定，相对误差的平均值为 2.4%、1.7%；相对误差的标准偏差为：2.4%±6.5%、1.7%±6.9%

实际样品加标测定方面，飞灰的最终加标回收率为 106%±7.8%、106%±4.6%、106%±4.8%；污泥的最终加标回收率为 105%±4.2%、106%±4.5%、106%±3.52%，回收率范围在可以接受的范围之内（80-120%）。

(5) 经过上述 6 家实验室数据的分析，方法各项特性指标达到预期要求。