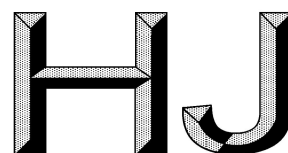


附件 10



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ □□□-20□□

固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法

Solid waste—Screening of PCDD/Fs

—Chemical activated luciferase expression

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	2
5 干扰和消除.....	2
6 试剂和材料.....	2
7 仪器和设备.....	4
8 样品.....	4
9 分析步骤.....	9
10 结果计算与表示.....	11
11 精密度和准确度.....	12
12 质量保证和质量控制.....	13
13 废物处理.....	14
附录 A（规范性附录） 标准溶液的检出限及定量范围.....	15
附录 B（资料性附录） 方法的精密度和准确度汇总表.....	16

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》，保护环境，保障人体健康，规范固体废物中二噁英的筛查方法，制定本标准。

本标准规定了筛查固体废物中二噁英类的报告基因法。

本标准的附录A为规范性附录、附录B为资料性附录。

本标准首次发布。

本标准由环境监测司、科技标准司组织制订。

本标准起草单位：国家环境分析测试中心。

本标准验证单位：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所和宁波市环境监测中心。

本标准生态环境部20□□年□□月□□日批准。

本标准自20□□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

固体废物 二噁英类的筛查 报告基因法

警告：操作人员应了解二噁英类分析操作的相关风险，并接受相关培训。实验中所使用的溶剂及标准样品均为有毒有害化合物，其溶液配制应在通风柜中进行，操作时应按规定要求佩戴防护器具，避免接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了筛查固体废物中二噁英类化合物的报告基因法。

本标准适用于固体废物中二噁英类化合物的筛查。

标准溶液的检出限和测定下限根据使用细胞的不同而异。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 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

- HJ 77.3 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/T 20 工业固体废物采样制样技术规范
- HJ/T 298 危险废物鉴别技术规范

3 术语和定义

3.1 二噁英类 polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)

指多氯代二苯并-对-二噁英(PCDDs)和多氯代二苯并呋喃(PCDFs)的统称。

3.2 芳香烃受体 arylhydrocarbon receptor

指一种配体激活的转录因子，其配体为二噁英类等多环芳烃，也可简称为 Ah 受体或 AhR。

3.3 报告基因 reporter gene

指一种位于启动子下游，编码可被检测的蛋白质或酶的基因，其表达产物可以定量测定。

3.4 二噁英应答序列 dioxin responsive element (DRE)

指位于基因上的一段碱基序列。AhR 与配体结合后进入细胞核，与核转录因子接合形成复合体，DRE 可以与该复合体特异性识别并结合。

3.5 荧光素酶 luciferase

自然界中能够产生生物荧光的酶的统称，其中最具有代表性的为萤火虫的荧光素酶。

3.6 传代培养 subculture

指将冻存细胞或培养细胞的一部分，接种到新鲜培养基中继续培养的操作。

3.7 复苏 initial culture

指将冻存的细胞从冻存的容器中取出进行培养的操作。

3.8 相对发光量 relative light unit (RLU)

样品中的二噁英与基质反应后发光，发光强度经仪器检测后所呈现出的数值。

3.9 标准物质的检出限 limits of detection

生物检测法中，用标准物质制作标准曲线后，利用标准曲线计算能够检测出的最小标准物质的浓度。

3.10 标准物质的测定下限 limits of quantitation

生物检测法中，用标准物质制作标准曲线后，利用标准曲线计算能够定量的最小标准物质的浓度。

4 方法原理

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 干扰和消除

在本方法规定的条件下，其他有机物可能会产生干扰。可通过优化净化步骤，例如增加硫酸处理步骤或者采用多种净化步骤去除干扰。

6 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。实验用水为正己烷充分洗涤过的蒸馏水，与细胞培养相关的水必须是灭菌后的超纯水。

6.1 甲醇 (CH₃OH)。

6.2 丙酮 (C₃H₆O)。

6.3 甲苯 (C₇H₈)。

6.4 正己烷 (C₆H₁₄)。

6.5 二氯甲烷 (CH₂Cl₂)。

6.6 壬烷 (C₉H₂₀) 或癸烷 (C₁₀H₂₂)。

6.7 二甲基亚砜 (C₂H₆OS) (DMSO)：细胞培养级别。

6.8 乙酸乙酯 (C₄H₈O₂)。

6.9 异丙醇 (C₃H₈O)：分析纯。

6.10 盐酸： ρ (HCl) = 1.19 g/ml，优级纯。

6.11 硫酸： ρ (H₂SO₄) = 1.84 g/ml，优级纯。

6.12 二噁英类多氯联苯淋洗液 (DL-PCBs)：将甲苯 (6.3)、乙酸乙酯 (6.8)、正己烷 (6.4) 按照体积比为 1:1:8 的比例配制而成的溶液。

- 6.13 基础培养基：主要包括 199、MEM、RPMI-1640、DMEM、DMEM/F12 等。主要成分为氨基酸、维生素、碳水化合物、无机盐和其它一些辅助物质。
- 6.14 青霉素/链霉素混合溶液：3 mg/ml 青霉素和 5 mg/ml 链霉素的混合溶液。使用前经过滤灭菌以及内毒素测试，0°C 以下冷冻保存。
- 6.15 胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）：使用前在 56°C 下，经过 30 min 非活化处理，-20°C 冷冻保存。
- 6.16 培养基：将青霉素/链霉素混合溶液（6.14）、胎牛血清（6.15）、基础培养基（6.13）等按照一定体积比配制成的细胞培养液，例如：1:10:100。
- 6.17 胰蛋白酶溶液（trypsin）：含量 0.25%，0°C 以下冷冻保存。
- 6.18 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：不含钙、镁的 PH 值为 7.6 的磷酸盐缓冲溶液。
- 6.19 细胞冻存液：用于保存细胞的溶液。
用二甲基亚砷（6.7）和胎牛血清（6.15）按 1:9 体积比混合配制，亦可购买市售有证产品。
- 6.20 细胞裂解液：可将细胞质内蛋白完全提取出的溶液。
- 6.21 荧光素溶液：在荧光素酶作用下，可以发出荧光的物质的统称。
- 6.22 二氧化碳（CO₂）：纯度≥99.99%。
- 6.23 液氮：纯度≥99.999%。
- 6.24 2,3,7,8-TCDD 标准溶液：浓度为 32 pg/μl，溶剂为甲苯或者 DMSO。
- 6.25 无水硫酸钠（Na₂SO₄）：分析纯。
380°C 加热处理 4 h，密封保存。
- 6.26 氢氧化钾（KOH）：优级纯。
- 6.27 硝酸银（AgNO₃）：优级纯。
- 6.28 硅藻土（celite 545）：二氧化硅含量≥89%，平均粒径≤125.3 μm，900°C 下热灼减率≤0.3%。
- 6.29 石英砂：二氧化硅含量≥98%，粒径 100 目~40 目，盐酸可溶率≤3.0%。
- 6.30 硅胶：0.063 mm~0.212 mm（230 目~70 目）。
在烧杯中用甲醇（6.1）洗净，甲醇挥发完全后，在蒸发皿中铺开，厚度小于 10 mm。130°C 下干燥 18 h 然后放入干燥器冷却 30 min，装入试剂瓶中密封，保存在干燥器中。
- 6.31 20%的硫酸硅胶。
取硅胶（6.30）80 g，加入硫酸（6.11）20 g，充分振荡后变成粉末状。将所制成的硅胶装入试剂瓶密封，保存在干燥器中。
- 6.32 33%的硫酸硅胶。
取硅胶（6.30）67 g，加入硫酸（6.11）33 g，充分振荡后变成粉末状。将所制成的硅胶装入试剂瓶密封，保存在干燥器中。
- 6.33 活性炭：可使用市售成品，也可选用下述方法配制。
将经过处理的活性炭 1 g 与 99 g 的硅藻土（6.28）在 500 ml 玻璃瓶（需具有聚四氟乙烯内衬螺帽）中混合均匀，贮于干燥箱内保存备用。
- 6.34 铜粒（粉）。使用前用盐酸（6.10）清洗，去除表面的氧化物后，用水清洗并干燥。

- 6.35 石英棉：200°C 下处理 2 h，密封保存。
- 6.36 微孔板：底部透明、经灭菌后的微孔板。
- 6.37 重组细胞：经过重组的肝癌细胞（人类、小鼠、天竺鼠），重组系列包括二噁英响应原件、基础启动子以及下游的荧光素酶报告基因。

7 仪器和设备

- 7.1 提取装置：索氏提取器、自动索氏提取装置、加速溶剂萃取仪或快速溶剂萃取仪等装置。
- 7.2 浓缩装置：旋转蒸发装置或者平行蒸发装置、氮吹仪等性能相当的设备。
- 7.3 多通道移液器：8 通道或 12 通道移液器。
- 7.4 细胞计数器。
- 7.5 CO₂ 细胞培养箱：饱和湿度、温度为 37°C、CO₂ 浓度为 5%。
- 7.6 离心分离机：转数可达 3 000 rpm ~4 000 rpm。
- 7.7 生物安全柜：II 级 A 型。
- 7.8 倒置显微镜：可放大 10 倍、40 倍或 100 倍。
- 7.9 酶标仪。
- 7.10 真空泵。
- 7.11 搅拌器。
- 7.12 微孔板振荡器。
- 7.13 恒温槽：温度控制在 30°C~50°C。
- 7.14 一次性巴斯德移液管。
- 7.15 移液管：5 ml 和 10 ml。
- 7.16 培养瓶(皿)：25 cm²、75 cm² 和 150 cm²。
- 7.17 移液器吸头：10 μl、20 μl、200 μl 和 1 000 μl。
- 7.18 液氮贮存罐：保温性能均一、工作液氮量、静态蒸发速率必须满足相关规定的产品。
- 7.19 高压蒸汽灭菌器：器内压力 196 kPa，蒸汽温度 121°C 以上，或者相同品质的产品。
- 7.20 细胞冻存管。
- 7.21 超低温冰箱：温度可到-80°C。
- 7.22 一般实验室常用仪器和设备。

8 样品

8.1 样品采集和保存

按照 HJ/T 20 和 HJ/T 298 的相关规定进行固体废物样品的采集和保存。

8.2 样品的制备

8.2.1 固态样品

固体样品的制样方法参照 HJ/T 20 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减小样品的粒度。用机械方法或人工破碎和研磨，筛分，使 95% 的样品粒径达到 2 mm 以下。样品经混合及缩分后制成分析用样品。

8.2.2 液体样品

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。

8.2.3 半固态样品

半固态样品制样时，样品经自然风干后，采用人工或者机械方法破碎和研磨，筛分，使 95% 的样品粒径达到 2 mm 以下。样品经混合及缩分后制成分析用样品。半固态样品在制样时，应同时测定含水率。

8.3 试样的制备

8.3.1 提取

8.3.1.1 固态样品的提取

称取一定量制备好的固态样品，添加盐酸（6.10），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（6.10），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（6.1）或者丙酮（6.2）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（6.5）萃取，添加量为每 1 L 处理液添加 100 ml 二氯甲烷（6.5），振荡萃取，萃取液采用无水硫酸钠（6.25）脱水，重复三次上述操作。以甲苯（6.3）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。

8.3.1.2 液态样品的提取

8.3.1.2.1 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（6.5）（或者甲苯（6.3））的比例，进行振荡萃取，萃取液采用无水硫酸钠（6.25）脱水，重复 3 次萃取，作为该液态样品的提取液。

8.3.1.2.2 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（6.3），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（6.5）（或者甲苯（6.3））（添加

量可参考 8.3.1.1), 振荡萃取, 萃取液过无水硫酸钠 (6.25) 脱水, 重复 3 次。以甲苯 (6.3) 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。

8.3.1.3 DMSO 萃取法

若提取液中含有油脂, 可以使用以下 DMSO 萃取法, 去除低极性的碳氢化合物后, 再进行 8.3.3 的净化步骤。

8.3.1.3.1 在分液漏斗中加入 25 ml DMSO (6.7), 并用正己烷 (6.4) 饱和, 将浓缩至 1 ml 的提取液加入分液漏斗, 用少量正己烷 (6.4) 清洗, 并将清洗液也加入分液漏斗, 振荡萃取, 静置分离 DMSO (6.7) 层。重复上述操作四次, 共得到约 100 ml DMSO (6.7) 溶液, 将其移入新的分液漏斗中, 加入 40 ml 正己烷 (6.4), 振荡萃取, 静置分层, 弃掉正己烷 (6.4) 层。向分液漏斗中加入 75 ml 正己烷 (6.4) 和 100 ml 水, 振荡萃取, 静置分层, 重复 3 次, 得到约 225 ml 正己烷萃取液。

8.3.1.3.2 将氢氧化钾 (6.26) 配制成 2 mol/L 的水溶液。将正己烷萃取液移入新的分液漏斗中, 添加 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 (6.25) 脱水后进行下述实验。

8.3.2 浓缩

将萃取后的溶液浓缩至 1 ml, 待净化。

8.3.3 净化

8.3.3.1 根据使用细胞的不同而选择与之相对应的净化方法。以下是两种细胞所对应的净化方法。

根据样品中二噁英类预测浓度的高低, 分取 25%~100% (整数比例) 的提取液作为测试溶液, 剩余样品转移至棕色密封贮液瓶中冷藏贮存。

8.3.3.2 硅胶柱-活性炭柱净化

8.3.3.2.1 硅胶柱的填充与制备

将洗净的硅胶柱底部塞好石英棉 (6.35), 依次填充无水硫酸钠 (6.25) 1.5 g、33% 的硫酸硅胶 (6.32) 4.0 g 以及无水硫酸钠 (6.25) 1.5 g, 如图 1 所示。加入正己烷 (6.4) 30 ml 预淋洗硅胶柱。

8.3.3.2.2 活性炭分离柱的填充与制备

将洗净的活性炭分离柱底部塞好石英棉 (6.35), 依次填充无水硫酸钠 (6.25) 0.4 g、活性炭 (6.33) 0.4 g、以及无水硫酸钠 (6.25) 0.8 g (图 2)。依次使用丙酮 (6.2) 5 ml、甲苯 (6.3) 20 ml、正己烷 (6.4) 10 ml, 进行预淋洗活性炭柱。

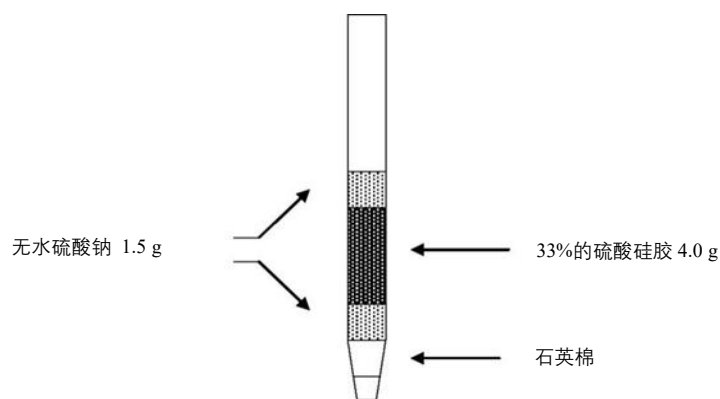


图1 硅胶柱的构成

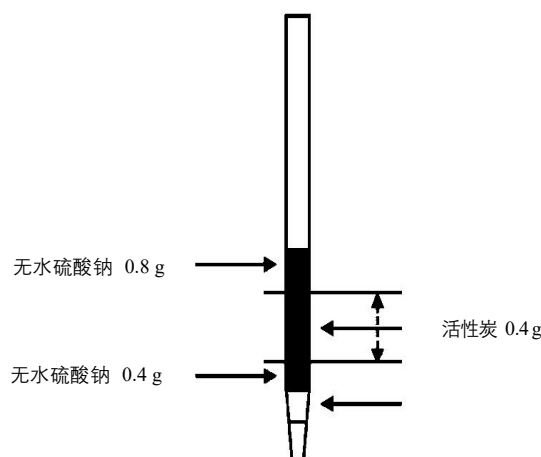


图2 活性炭柱的构成

8.3.3.2.3 硅胶柱-活性炭柱的净化

将硅胶柱与活性炭柱串联。然后将样品缓慢添加到串联柱上。添加正己烷（6.4）2 ml 于样品瓶中，超声洗净样品瓶，将溶液加入到分离柱。添加正己烷（6.4）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（6.4）淋洗串联柱。取下硫酸硅胶分离柱。向活性炭柱中加入正己烷（6.4）10 ml，洗净活性炭柱。加入 DL-PCBs 淋洗液(6.12)15 ml，淋洗出 DL-PCBs 组分。加入甲苯（6.3）20 ml 淋洗出 PCDD/Fs 组分。

8.3.3.3 多层硅胶柱净化

8.3.3.3.1 多层硅胶柱的填充与制备

将洗净的硅胶柱底部塞好石英棉（6.35），依次填充 33%的硫酸硅胶（6.32），15 g、20%的硫酸硅胶（6.31）15 g、高度为 1 cm 的无水硫酸钠（6.25）。加入正己烷（6.4）40 ml 预淋洗硅胶柱。

8.3.3.3.2 多层硅胶柱的净化

将样品缓慢添加到多层硅胶柱上。添加正己烷（6.4）2 ml 于样品瓶中，超声洗净样品瓶，将溶液加入到分离柱。添加正己烷（6.4）1 ml 于上述样品瓶中，进行上述同样的操作。采用 60 ml 正己烷（6.4）淋洗多层硅胶柱，淋洗下来的溶液为 DL-PCBs 组份和 PCDD/Fs 组份。

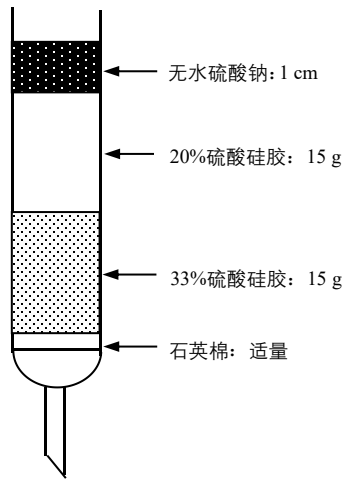


图3 多层硅胶柱的构成

8.3.3.3.3 其他净化方法

可以使用凝胶渗透色谱（GPC）、高压液相色谱（HPLC）、自动样品处理装置以及其他净化方法或者装置进行样品的净化处理。使用其他净化方法之前应用标准样品或者标准溶液进行分离效果验证，并确认是否与使用的细胞相适应以及是否满足本方法规定的质量控制/质量保证要求。

8.4 试样的保存

将上述净化后的溶液浓缩或者平行蒸发充分除去溶剂。保存时使用的溶剂根据使用细胞的种类不同而不同，以 H1L6.1C2 细胞为例，需加入 4 ml 正己烷（6.4）定容，超声 2 分钟，转入棕色瓶中，然后将试样放入冰箱中 4℃ 保存。

8.5 操作空白样品的制备

以相同量的石英砂（6.29）代替样品，分别进行 8.3 和 8.4 的操作以制备操作空白样品。

8.6 细胞的管理

8.6.1 细胞的复苏

从液氮贮存罐（7.18）中取出细胞冻存管（7.20），将细胞冻存管（7.20）放入 37℃ 水中快速融化，利用移液管（7.15）把细胞液转移到离心管中，离心分离机（7.6）离心速率设定 500 转/min，离心 10 min，（转数和离心时间的设定根据使用细胞的种类不同而不同），除掉培养基（6.16）。使用移液管向装有细胞沉淀的试管中加入新培养基（6.16），通过移液管搅拌使细胞悬浮。将细胞悬浮液转入培养皿（7.16）中，然后放入 CO₂ 细胞培养箱（7.5）中进行培养。

8.6.2 细胞的传代

当培养皿（7.16）中的细胞长满 90% 时，将其从 CO₂ 细胞培养箱（7.5）中取出，放入生物安全柜中（7.7）。用 1 ml 磷酸盐缓冲溶液（6.18）（加入的体积根据培养皿表面积的不同而不同，此处以 25 cm² 为例）清洗，然后加入胰蛋白酶溶液（6.17）0.5 ml 润洗，静置 2 min，

用手轻轻敲打培养皿外壁使细胞剥离，将剥离的细胞转移至离心管离心，吸走上清液，加入一定量培养基(6.16)，使细胞悬浮并充分混匀后，取其中的一部分，加入到新的培养皿(7.16)中。将新的培养皿(7.16)放到 CO₂ 细胞培养箱(7.5)中继续培养。

8.6.3 细胞的冻存

经过几次传代后，如果细胞的状态达到最佳状态，则必须对细胞进行冻存，以留备份。按照 8.5.2 操作，直至细胞悬浮液制备完毕。对细胞进行计数，离心，去掉培养基(6.16)，添加细胞冻存液(6.19)，使其密度达到冻存要求(根据使用细胞的不同而不同)，装入细胞冻存管(7.20)中。将细胞冻存管(7.20)做好标记后，放入程序降温盒(程序降温盒使用之前，里面加异丙醇(6.9)至刻度线，恢复至室温，内部保持干燥)，将程序降温盒放入超低温冰箱(7.21)至 4 h 以上，然后转移至液氮贮存罐(7.18)中长期保存。

9 分析步骤

9.1 仪器参考条件

设定测定化学发光模式，波长 300 nm ~900 nm；
终点法。

9.2 校准

9.2.1 仪器校准

打开酶标仪(7.9)预热 15 min，按照 9.1 设定参考条件，将仪器自带的校准专用版放入酶标仪进行自动校准，根据测定结果评估仪器是否达到要求。

9.2.2 标准曲线的绘制

9.2.2.1 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。

9.2.2.2 四参数 Hill 公式按照公式(1)进行计算：

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

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。

9.2.2.3 将 DMSO (6.7) 配制的不同系列的 2, 3, 7, 8-TCDD 标准溶液 (6.24), 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。

表 1 二噁英类化合物标准溶液配制示例 (浓度: pg/ml)

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	0.05

9.3 试样测定

9.3.1 样品的测定过程以使用细胞的不同而不同, 下以 H1L6.1C2 细胞为例。

9.3.2 决定稀释倍数的实验

9.3.2.1 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 个/ml。

9.3.2.2 准备微孔板 (6.36), 其边缘孔不加细胞, 每孔加 100 μ l 水或者 PBS (6.18), 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。

9.3.2.3 将添加完毕后的微孔板 (6.36) 放入 CO₂ 细胞培养箱 (7.5) 中, 进行 24 h 培养。

9.3.2.4 测定液配制过程

9.3.2.4.1 溶液的分取

a) 测定用样品的分取

1) 在玻璃试管中加入二甲基亚砷 (6.7) 2 μ l。

2) 从 4 ml 的样品瓶中分取适量的样品, 一般二噁英类组分稀释的比率为 20、200 和 2 000。

b) 绘制标准曲线用标准溶液 (6.24) 以及质控 (QC) (STD 5) 溶液的分取

1) 将配制好的标准溶液 (6.24) 以及 QC 溶液, 分别添加 4 μ l 到试管中。

2) 在玻璃试管中加入二甲基亚砷 (6.7) 4 μ l, 将此作为阴性对照溶液 (NC)。

9.3.2.4.2 加入正己烷 (6.4), 将样品定容为 0.5 ml, 标准溶液 (6.24)、QC 溶液以及 NC 定容为 1 ml。

9.3.2.4.3 将试管放入浓缩装置 (7.2) 中进行浓缩近干。每隔 2 min, 对玻璃试管内的正己烷 (6.4) 的残余量进行确认。

9.3.2.4.4 平行蒸发完毕后, 在样品试管中加入培养基 (6.16) 200 μ l, 在装有标准溶液 (6.24)、QC 溶液以及 NC 溶液的试管中加入培养基 (6.16) 400 μ l, 用搅拌器 (7.11) 进行 10 sec 左右的搅拌。

9.3.2.5 将培养了 24 h 的微孔板 (6.36) 取出, 将培养基 (6.16) 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。

9.3.2.6 将 190 μl 已经稀释完毕后的样品添加到微孔板 (6.36) 上, 标记好微孔板 (6.36) 后, 将其放入 CO_2 细胞培养箱 (7.5) 中进行 20~24 h 的培养。

9.3.2.7 化学发光值 (RLU) 的检测

9.3.2.7.1 以每次检测 3 个微孔板 (6.36) 为例: 先将细胞裂解液 (6.20) 稀释 5 倍, 保存在 -20°C 备用, 使用前室温水浴 30 min, 使之解冻并恢复至室温。准备一瓶荧光素溶液 (6.21) (10 ml)。

9.3.2.7.2 细胞的裂解

- a) 将培养了 20 h~24 h 的微孔板 (6.36) 从 CO_2 细胞培养箱 (7.5) 中取出。
- b) 将微孔板 (6.36) 内的培养基 (6.16) 完全除掉。
- c) 使用多通道移液器 (7.3), 将 PBS (6.18) 50 μl 加入到各孔, 进行洗净。
- d) 将微孔板 (6.36) 内的 PBS (6.17) 完全除掉。
- e) 通过倒置显微镜 (7.8) 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。
- f) 将微孔板 (6.36) 底部贴上自带的透明的贴纸或者不透明的纸张。
- g) 将细胞裂解液 (6.20) 各 100 μl 分别加入到各孔。
- h) 使用微孔板振荡器 (7.12) 对微孔板 (6.36) 进行 20 min 的振荡。
- i) 向每孔添加 50 μl 的荧光素溶液 (6.21), 如果酶标仪 (7.9) 可以自动添加荧光素溶液 (6.21), 设定自动添加。

9.3.2.7.3 化学发光量的测定 (自动添加示例)

- a) 向酶标仪 (7.9) 中添加荧光素溶液 (6.21)。
- b) 将微孔板 (6.36) 放置到酶标仪 (7.9) 上, 对各孔的发光量进行测定。

9.3.3 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。

9.3.4 实验室空白测定

按照与试样测定 (9.3) 相同的步骤进行空白试样的测定。

10 结果计算与表示

10.1 结果计算

将样品的相对发光量带入标准曲线方程, 即可得出测试液中二噁英类的浓度。样品中二噁英类的浓度按照公式 (2) 进行计算:

$$W = \rho \times F \times V \times \frac{V_E}{V_E} \times \frac{1}{W_0} \quad (2)$$

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）。

10.2 结果表示

当测定结果小于 0.1 ng/g 时，保留小数点后 2 位；当测定结果大于等于 0.1 ng/g 时，保留三位有效数字。

11 精密度和准确度

11.1 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：0.590 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 4.60 ng/g；再现性限分别为：0.01 ng/g、1.50 ng/g 和 4.60 ng/g。

11.2 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%。

12 质量保证和质量控制

12.1 试剂

前处理过程中所使用的试剂，浓缩 10000 倍时不能有二噁英检出，DMSO（6.7）空白的检测值必须小于标准溶液的检出限。

12.2 器具和装置

二噁英类生物检测法所使用的器具和装置切勿和其他化合物分析所使用的器具和装置混用，接触细胞的器具和装置须定期消毒以防止细胞污染。

12.3 细胞

12.3.1 细胞对二噁英的响应必须呈现一定的线性范围。

12.3.2 细胞必须可以稳定传代 20 次以上。

12.3.3 细胞在开始检测样品之前，其活性必须满足标准溶液的测定下限。假如采用 H1L6.1c2 细胞，则检测样品之前，细胞对标准溶液的测定下限必须达到 1.96 pg/ml。

12.4 空白试验

每 20 个样品或每批次（少于 20 个样品/批）应至少做一个实验室空白，所有空白测试结果中目标化合物的检测值必须低于标准溶液的测定下限，并且记录检测值，如果检测值异常高，则必须查明原因，并将采取的改进措施一一记录。

12.5 平行测定

按照样品数量的 10% 进行平行测定，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，然后重新分析。

12.6 回收率的确认

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%。仅评估样品前处理过程中的精密度，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。

12.7 质量控制图

在实际操作中，一般选择标准曲线中间点作为质控点，多次测量的质控点的浓度值计算平均值 μ ，标准偏差 σ ，每次测量值必须处于 $\mu \pm 2\sigma$ 之内。

12.8 标准物质的测定

按照方法测定程序，进行样品的测定，然后对实验结果进行确认，标准物质的实验结果

必须在±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。

12.9 检出限和定量范围的确认

检出限及定量范围必须每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。

13 废物处理

实验产生的有机废液和废物应分类收集，集中保管，并委托具有资质的单位处置。

附录 A

(规范性附录)

标准溶液的检出限及定量范围

A.1 标准溶液的检出限以及定量范围的计算示例

配制表 A.1 中的标准溶液浓度系列，然后进行 5 次以上的测定并定量，计算每个浓度点（毒性等价量）测定值的变异系数（CV%），以变异系数值为纵坐标，以浓度值为横坐标做图，规定与变异系数 30% 相交点的浓度值为检出限值，变异系数 20% 之间的浓度范围为定量范围，其范围内的最小浓度值为测定下限值。

表 A.1 计算检出限用标准溶液的配制示例（浓度 pg/ml）

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	0.05

表 A.2 确认检出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		NC	→"	→"	→"	→"	STD5	→"	→"	→"		→"	
C		STD10	→"	→"	→"	→"	STD4	→"	→"	→"		→"	
D		STD9	→"	→"	→"	→"	STD3	→"	→"	→"		→"	
E		STD8	→"	→"	→"	→"	STD2	→"	→"	→"		→"	
F		STD7	→"	→"	→"	→"	STD1	→"	→"	→"		→"	
G		STD6	→"	→"	→"	→"	STD0	→"	→"	→"		→"	
H													

对于标准物质的检出限以及定量范围，至少要每隔 6 个月进行 1 次确认，确认其是否发生变化。另外，当测定条件发生大幅度改变时（机器、试剂或者设施等发生变化以及测定负责人的发生变化等）也要进行确认。

A.2 样品的检出限及测定下限

样品的检出限以及测定下限，由样品量和经过预处理的最终样品的体积数值和反应液中的标准物质的检出限以及测定下限进行计算得出。由于样品的检出限以及测定下限，会因为样品的采集量以及最终检测液的量不同而不同，因此要对各个样品进行计算。

附录 B

(资料性附录)

方法的精密度和准确度汇总表

B.1 飞灰精密度汇总表

实验室号	浓度 (1.68 ng/g) 1			浓度 (34.3 ng/g) 2			浓度 (142 ng/g) 3		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_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 \bar{x}_i	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		

B.2 污泥精密度汇总表

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		
	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_i	S_i	RSD _i (%)	\bar{x}_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	0.5	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 \bar{x}_i	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		

B.3 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	
	\bar{x}_i	RE	\bar{x}_i	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	

B.4 飞灰实际样品加标回收率汇总表

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			
\bar{P}	106%			106%			106%			
$S_{\bar{P}}$	3.9%			2.3%			2.4%			

B.5 污泥实际样品加标回收率汇总表

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: 0.960			TEQ: 4.80			TEQ: 24.1		
\bar{P}		105%			106%			106%		
$S_{\bar{P}}$		2.1%			2.3%			1.8%		