

中华人民共和国国家标准

环境中有机污染物遗传毒性检测的 样品前处理规范

GB/T 15440—1995

Guidelines for preparing samples for
genotoxicity testing of organic
pollutants in environment

本规范规定了环境中有机污染物遗传毒性检测时样品前处理的技术要求。

本规范分五篇：

第一篇 大气可吸入颗粒物样品前处理

第二篇 地面水及废水样品前处理

第三篇 非水液态废弃物样品前处理

第四篇 土壤及沉积物样品前处理

第五篇 固体废弃物样品前处理

规范所给定义仅限定在本规范内使用，不具普遍性。

本规范不对样品前处理的质量控制及操作安全性作全面阐述，仅对特定问题给以说明，其他问题应遵从合格实验室准则的有关原则。

本规范的质量控制原则皆以遗传毒性检测系统本身正常为前提。

本规范不另提供记录表格，样品前处理过程的记录应遵从常规分析测试原则。

第一篇 大气可吸入颗粒物样品前处理

1 适用范围

本规范适用于大气可吸入颗粒物中非挥发性有机物，不适用于大气可吸入颗粒物的气态及半气态有机物。

2 引用标准

GB 6921 大气飘尘浓度测定方法

GB 6682 实验室用水规格和实验方法

3 定义

可吸入颗粒物：能长期悬浮在空气中，空气动力学当量直径 $\leq 10 \mu\text{m}$ 的、能进入人体呼吸道的颗粒物。

4 仪器、设备

4.1 采样系统：符合 GB 6921 的要求。

4.2 超细玻璃纤维滤膜：过滤效率不低于 99.99%。

国家环境保护局 1995-03-25 批准

1995-08-01 实施

- 4.3 索氏提取器:500 mL 容量。
- 4.4 超声波清洗器:250 W 功率。
- 4.5 分液漏斗。
- 4.6 旋转蒸发器。
- 4.7 KD 浓缩器。
- 4.8 钢瓶。
- 4.9 减压阀。
- 4.10 高纯氮气。
- 4.11 一般实验室器具及玻璃器皿。为避免其他有机物质的干扰,所有玻璃器皿及直接接触样品的器具均需洗净,并经纯水及纯有机溶剂冲洗。

5 试剂

- 5.1 纯水:符合 GB 6682 实验室用水规格中一级水标准的水,即电导率 $\leq 0.01 \mu\text{S}/\text{cm}$ (25℃),吸光度 ≤ 0.001 (254 nm, 1 cm 光程)二氧化硅含量 $\leq 0.01 \text{ mg}/\text{L}$ 。可用去离子水(加少量 KMnO_4)经全玻璃器皿重蒸馏制得。
- 5.2 溶剂:等级不得低于分析纯,且皆应在玻璃容器中重蒸馏后方能使用。
- 5.2.1 二氯甲烷。
- 5.2.2 二甲基亚砜(DMSO)。
- 5.3 氢氧化钠: $c(\text{NaOH})=1 \text{ mol}/\text{L}$ 。
- 5.4 盐酸: $c(\text{HCl})=1 \text{ mol}/\text{L}$ 。
- 5.5 无水硫酸钠。

6 样品采集

按 GB 6921 的方法采集一定量的大气可吸入颗粒物,记录流量及采样时间。采样前,将滤膜于 500℃ 灼烧半小时后称重。采样后,将对折的滤膜用硫酸纸包好,装入黑色纸袋,于 4℃ 条件下运输并于采样前的称重条件下平衡至少 24 h 后称重。称重后的滤膜装入塑料袋,于 -20℃ 以下避光保存。采样后应尽快进行样品制备。

采样时间不应超过 24 h,在此期间如不能采集到足量的尘,可在同一采样地同时设置两个或更多的采样器,将所得尘样合并为一个样品。

7 样品制备

7.1 有机物分离提取

可采用索氏提取法、超声提取法,必要时进行不同有机组分的提取。

7.1.1 索氏提取

将样品滤膜对折成卷状,放入提取器。分别用 100 mL 二氯甲烷在溶剂沸点条件下(40℃)提取 2 次,每次 16 h(每小时回流 5~10 次),将两次的提取液冷却至室温后合并。用孔径 $\leq 0.5 \text{ mm}$ 的微孔全玻璃砂芯漏斗将提取液滤至一圆底烧瓶中。

7.1.2 超声提取

将滤膜剪成 1 cm 小片,放入瓶塞配有聚四氟乙烯衬垫的玻璃试管中,在超声波清洗器中用二氯甲烷提取 2 次,每次 10 min。用孔径 $\leq 0.5 \text{ mm}$ 的微孔全玻璃砂芯漏斗将提取液滤至一圆底烧瓶中。

7.1.3 不同有机组分的提取

7.1.3.1 将索氏提取或超声提取得到的提取滤液放入分液漏斗,用 1 mol/L 盐酸提取 3 次,每次用量约 50~75 mL(提取液 pH 为 1~2)。

7.1.3.2 碱性组分:将 7.1.3.1 中 3 次提取所得的水相合并,用 1 mol/L 氢氧化钠将 pH 调至 11~12,用二氯甲烷提取 3 次,每次用量约 50~100 mL,将 3 次提取的有机相合并,并使其通过无水硫酸钠除去水分。此为碱性组分。

7.1.3.3 中性组分:将 7.1.3.1 中 3 次提取所得的有机相合并,用 1 mol/L 氢氧化钠提取 3 次,每次用量约 50~75 mL(提取液 pH 为 11~12)。将 3 次提取的有机相合并,并使其通过无水硫酸钠除去水分。此为中性组分。

7.1.3.4 酸性组分:将 7.1.3.3 中 3 次提取所得的水相合并,用 1 mol/L 盐酸将 pH 调至 1~2。用二氯甲烷提取 3 次,每次用量约 100 mL。合并 3 次提取的有机相,使其通过无水硫酸钠除去水分。此为酸性组分。

注意在提取过程中如水相、有机相间的乳化层超过有机相的 1/3,应使用离心等物理学方法进行分离。

7.2 提取液浓缩

7.1.1、7.1.2 所得提取液及 7.1.3 所得各有机组分提取液体积在 1 L 以下时,可用 K-D 浓缩器浓缩,如提取液体积大于 1 L,使用旋转蒸发器,将提取液蒸发至近 100 mL,用 K-D 浓缩器浓缩。留出 50% 浓缩后的提取液以备重量分析及化学分析,另外 50% 继续用 K-D 浓缩器浓缩至 1 mL。

7.3 溶剂置换

于 40℃ 水浴条件下用平稳氮气流将浓缩过的提取液吹干。加入适量(1 mL 左右)DMSO 或遗传毒性检测所需的其他溶剂使萃取物溶解,并稀释至适当浓度以备进行遗传毒理学检测。

提取液应于 -20℃ 避光保,并应在提取之日起的 3 周内进行检测。

8 样品量计算结果的表示

8.1 采气总量用 m^3 表示。

8.2 可吸入颗粒物采集总量用 mg 表示。

8.3 提取有机物的量用 mg 表示。

9 质量控制

9.1 设置现场采样及溶剂对照,即在采样期间将空白滤膜放置在现场(注意防止污染),除不参与采样外,空白滤膜需经历从膜准备到遗传毒性检测的全过程。如此对照的遗传毒性检测呈阳性反应,应分别检查采样过程及制备系统,找出原因,重复对照试验,至合格为止。

9.2 设置阳性对照,即将在所要进行的遗传毒性检测中肯定会产生阳性结果的对照物滴加在空白滤膜上,使其经历样品制备的全过程。如遗传毒理学检测结果为阴性,应检查制备系统,找出原因,重复阳性对照试验,至合格为止。

10 安全性

由于对样品制备中涉及的毒性与致癌性不完全清楚,应将其按有潜在健康危害的物质对待,操作者应保持最低限度的接触。

第二篇 地面水及废水样品前处理

11 适用范围

本规范适用于地面水及废水中的非挥发性有机物,不适于挥发性有机物。

12 定义

地面水:本规范中包括江水、河水、湖水、池塘水等。

废水:本规范中包括工业废水及生活污水等。

非水液相:本规范中为与水介质分层、主成分不是水的液相。

沉积固相:本规范中为从静置 24 h 的废水样中分离出来的固相或半固相。

13 仪器、设备

13.1 采样瓶:瓶盖具聚四氟乙烯衬垫的棕色、螺口、大口玻璃瓶,或在样品无腐蚀性条件下使用具铝箔外衬的橡皮塞。

13.2 分液漏斗。

13.3 贮水器:具下口的玻璃或搪瓷容器。

13.4 玻璃树脂柱:不低于 10 cm 高,柱直径与柱长比为 1:4~1:10 之间。

13.5 输液泵。

13.6~13.11 分别与 4.6~4.11 相同。

14 试剂

14.1 纯水:与 5.1 相同。

14.2 氢氧化钠: $c(\text{NaOH})=10 \text{ mol/L}$ 。

14.3 1:1(V/V)硫酸。

14.4 氢氧化钠: $c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$ 。

14.5 盐酸: $c(\text{HCl})=1 \text{ mol/L}$ 。

14.6 溶剂:等级不得低于分析纯,且皆应在玻璃容器中重蒸馏后方能使用。

14.6.1 二氯甲烷。

14.6.2 甲醇。

14.6.3 丙酮。

14.6.4 己烷。

14.6.5 二甲基亚砜(DMSO)。

14.7 XAD-2 树脂或等效的大孔树脂。树脂应经纯水及甲醇漂洗后,在索氏提取器中分别用甲醇、二氯甲烷、己烷、丙酮提取 8 h,去除有机物。净化后的树脂浸于甲醇中,置冰箱冷藏备用。

15 样品采集

手工采集适量样品放入采样瓶中,样品要完全充满容器,密封,并于 2 h 内送至实验室,尽快进行处理。

16 样品制备

16.1 有机物的分离提取

16.1.1 有机物分离提取前的样品预处理

将采样瓶于 4℃ 静置 24 h,使非水液相、水相、沉积固相分离。非水液相按非水液态废弃物样品制备规范处理;沉积固相按固态废弃物样品制备规范处理。水相按下述原则处理:悬浮物重量低于 5% 的地面水可直接进行有机物的大孔树脂提取;悬浮物重量高于 5% 地面水及废水进行有机物的液-液提取。

16.1.2 有机物的液-液提取

取 2 份 1 500 mL 的水样分放到 2 个 2 000 mL 分液漏斗中。用 10 mol/L 氢氧化钠将 pH 调至 11。向每个分液漏斗加入 150 mL 二氯甲烷,振荡 2 min,注意放气。至少静置 10 min,使有机相与水相分离;分出有机相。再各用 100 mL 二氯甲烷提取两次。将 3 次提取液合并于 1 000 mL 烧瓶中。如有机相与水相间的乳化层多于溶剂层的 1/3,则可用离心等物理学方法完成两相的分离。用 1:1 硫酸溶液将水

相的 pH 调至 2 以下。用二氯甲烷 150 mL、100 mL、100 mL 分三次进行溶剂提取。将这三次提取的有机相也并入 1 000 mL 烧瓶中。

16.1.3 有机物的大孔树脂分离提取

将净化后的树脂连同丙酮一道装入树脂柱,树脂上、下端分别垫、盖玻璃棉,将盛水容器与树脂柱相连。排去柱中丙酮,用纯水洗柱 3 次。使水样流经树脂柱,流速为 1~2 倍柱体积/min,水样量不超过 2 000 倍柱体积,用真空泵抽去柱中余水,然后用 4~8 倍柱体积 85:15 的己烷:丙酮和 8 个柱体积二氯甲烷分别 3 次浸柱以洗脱有机质。浸泡时间为每次 10 min。然后缓缓滴流,将洗脱液收集至烧瓶中。

16.1.4 必要时,按 7.1.3 对 16.1.2 提取液和 16.1.3 的洗脱液进行不同有机组分的提取。

16.2 提取液浓缩

将经 16.1.2、16.1.3、16.1.4 获取的提取液或洗脱液按 7.2 所述方法浓缩。

16.3 溶剂置换

与 7.3 相同。

17 样品量计算结果的表示

17.1 样品前处理所得水相体积或流经树脂柱水样的体积以 L 表示。

17.2 有机提取物的重量以 mg 表示。

18 质量控制

18.1 设置树脂及溶剂对照,即用纯水代替水样,完成样品制备全过程。用所得浓缩物进行遗传毒性检测,如呈阳性反应,则分别检查树脂及溶剂系统,找出原因,重复该试验,直至合格为止。

18.2 设置平行样。

18.3 设置阳性对照,见 9.2。

19 安全性

与 10 相同。

第三篇 非水液态废弃物样品前处理

20 适用范围

本规范适用于非水液态废弃物中的挥发性及非挥发性有机物。

21 定义

非水液态废弃物:本规范中为主要成分不是水的液体,包括水溶性和非水溶性液体以及某些液体的混合物。液体中固体含量应低于 5%。

22 仪器、设备

22.1 采样瓶 1 000~1 500 mL,瓶塞盖具聚四氟乙烯衬垫的螺口玻璃瓶。

22.2 超声波清洗器。

22.3 分液漏斗

22.4 同 4.6~4.10 所列仪器设备。

22.5 一般实验室器具及玻璃器皿,处理方法与 4.11 相同。

23 试剂

23.1 纯水:与 5.1 相同。

23.2 溶剂:等级不得低于分析纯,且皆应在玻璃容器中重蒸馏后方能使用。

23.2.1 二氯甲烷。

23.2.2 二甲基亚砜(DMSO)。

23.3 氢氧化钠: $c(\text{NaOH})=1\text{ mol/L}$ 。

23.4 盐酸: $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 。

23.5 无水硫酸钠。

24 样品采集

用玻璃容器随机采集一定量的样品,样品应将容器充满,并于2 h之内送至实验室。用前将样品在室温条件下放置1~2 h,称重。采样后应尽快进行样品制备。

25 样品制备

25.1 无须进行组分提取的挥发性非水液态废弃物不必进行有机物提取,即可直接用于以干燥器法等实验手段进行的诱变性检测。

25.2 无须进行组分提取的非挥发性非水液态废弃物不必进行有机物提取,仅需称取一定量受试液溶于或悬浮于一定量DMSO或遗传毒性检测所需其他溶剂中,于室温下超声处理5 min后进行遗传毒理学检测。

25.3 不同有机物组分的提取:如遗传毒性检测需要按组分提取的样品,按下述方法操作。首先,称取近5 g样品,放入250 mL锥形瓶中,加100 mL二氯甲烷,搅动烧瓶,使样品溶解。若不完全,用分液漏斗分层(不溶于二氯甲烷的液相可直接进行遗传毒理学检测。)

其后程序与7.1.3相同。

25.4 提取液浓缩:将25.3中所得各组分按7.2所述方法浓缩。

25.5 溶剂置换:与7.3相同。

26 样品量计算结果的表示

26.1 样品总量以g计。

26.2 25.4浓缩后的样品重以g计。

26.3 提取的各有机组分的量以mg计。

27 质量控制

27.1 设置溶剂对照,即不用样品,仅用所需溶剂完成样品制备全过程,所得浓缩物的遗传毒性检测结果为阳性,则应更换溶剂,重复溶剂空白试验,至合格为止。

27.2 设置平行样。

27.3 设置阳性对照,见9.2。

28 安全性

与10相同。

第四篇 土壤及沉积物样品前处理

29 适用范围

本规范适用于土壤及沉积物中的非挥发性有机物。

30 定义

土壤:本规范中为颗粒直径小于 2 mm,且能支持植物生长,结合成一体物质。

沉积物:本规范中为在水生环境中淤积和残留的土壤类物质。

31 仪器、设备

31.1 采样瓶:棕色、广口、瓶盖带聚四氟乙烯衬垫的螺口玻璃瓶。

31.2 采样勺或铲。

31.3 索氏提取器。

31.4 研磨机。

31.5 超声波清洗器:500 W 功率。

31.6 分液漏斗。

31.7 4.6~4.10 所列仪器设备。

31.8 一般实验室器具及玻璃器皿,处理方法与 4.11 相同。

32 试剂

32.1 纯水:与 5.1 相同。

32.2 溶剂:等级不得低于分析纯,且皆应在玻璃容器中重蒸馏后方可使用。

32.2.1 二氯甲烷。

32.2.2 二甲基亚砜(DMSO)。

32.3 无水硫酸钠。

32.4 氢氧化钠: $c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$ 。

32.5 盐酸: $c(\text{HCl})=1 \text{ mol/L}$ 。

33 样品采集

将样品装入采样瓶中,样品应充满容器。如采集水下样品,应用水样将表面覆盖物冲去。沉积物样品上面应覆盖水样后再旋上瓶盖。样品于 4℃ 保存、运输,如超过 48 h,应 -10℃ 保存。一般在油或其他有机物污染情况下采样量约 500 g,污染不严重或含水量大的土壤采样量应 2~3 kg。采样时要注意样品对采样地的代表性,应在采样地范围内不同方位的采样点上采集 5~10 个样品,混合均匀为一个样品。样品采集后应尽快进行样品制备。

34 样品制备

34.1 有机物分离提取

34.1.1 有机物分离提取前的样品预处理

将样品风干,压碎样品的团粒,40~60 目过筛。采样用四分法缩分,直至选取适宜量的样品为止。应留取 2 份样品,其中 1 份用于测量含水量。

沉积物样品需经离心去除样品中的水分,去除水分前后都应测量样品重量。然后同土壤一样留取另一份样品测量含水量。

34.1.2 索氏提取

可用索氏提取法提取样品中有机物。

将 10 g 土壤沉积物样品与 10 g 无水硫酸钠混合,放入索氏提取器。用 300 mL 二氯甲烷在溶剂沸点条件下提取 16 h(每小时回流 5~10 次)使提取液冷却,过滤,然后使其通过无水硫酸钠柱去除水分。

34.1.3 研磨提取

也可用研磨提取法。

将 25 g 土壤或沉积物样品与 25 g 无水硫酸钠混合,放入研磨罐中。加入约 150 mL 二氯甲烷,旋紧研磨器盖,研磨 30 min,滗出溶剂。再用 75 mL 二氯甲烷重复提取,共两次,或直到提取液无色时为止。将提取液合并,过滤,并使其通过无水硫酸钠柱去除水分。

34.1.4 超声提取

索氏提取及研磨提取都不适宜的样品可选用超声提取法。

将 25 g 土壤或沉积物样品与 50 g 无水硫酸钠混合,放入 250 mL 烧杯中。在超声器中用 150 mL 二氯甲烷提取两次,或直到提取液无色时为止。将提取液合并,过滤,并使其通过无水硫酸钠柱去除水分。

34.1.5 不同有机组分的提取

必要时,按下述方法进行不同有机组分的提取。首先,将前述几种方法中得到的提取物 10 g 溶于 30 mL 二氯甲烷中,放入分液漏斗。其后程序与 7.1.3 相同。

34.2 提取液浓缩

将 34.1 所得提取液按 7.2 所述方法浓缩。

34.3 溶剂置换

与 7.3 相同。

35 样品量计算结果的表示

35.1 样品总量以 g 表示。

35.2 土壤样品干重为土壤样品总量与含水量的差,以 g 表示;沉积物样品干重为沉积物样品总量与水样重量及含水量的差,以 g 表示。

35.3 提取的各有机物及各有机组分的量以 mg 计。

36 质量控制

36.1 设置溶剂对照,与 27.1 相同。

36.2 设置平行样。

36.3 设置阳性对照,参见 9.2。

37 安全性

与 10 相同。

第五篇 固体废弃物样品前处理

38 适用范围

本规范适用于固体废弃物中的非挥发性有机物。

39 定义

固体废弃物:本规范中为含水量低于 50%,由有一定硬度、粘着的颗粒物或 25℃ 条件下保持不呈液态或气态的物质组成的废弃物。

40 仪器、设备

40.1 样品容器:棕色、大口、瓶盖具聚四氟乙烯衬垫的螺口玻璃瓶,如样品对玻璃有腐蚀性,可使用聚四氟乙烯容器。

40.2 采样勺或铲。

- 40.3 索氏提取器。
- 40.4 研磨机。
- 40.5 分液漏斗。
- 40.6 4.6~4.10 所列仪器设备。

41 试剂

与 32 相同。

42 样品采集

用采样勺或铲将适量样品采集至样品容器中,采样操作应在弱光条件下进行。样品应于 4℃ 或低于 4℃ 保存、运输,一般在采样后即刻进行样品制备。

43 样品制备

43.1 去除液相及降低样品粒度方法

选用下述适当物理学方法去除样品中的液相和降低样品粒度。

- a. 于 4℃ 静置 24 h,将液相与固相分离;
- b. 油性或粘着废弃物可用无水硫酸钠或硅胶处理;
- c. 研磨,40~60 目过筛;
- d. 油性或粘着废弃物可使其冷冻后再研磨,降低其粒度。

43.2 有机物分离提取

43.2.1 索氏提取

将 10 g 固体样品与 10 g 无水硫酸钠混合,放入索氏提取器,用 300 mL 二氯甲烷提取 16 h。使提取液流经无水硫酸钠去除水分。

43.2.2 研磨提取

将 10 g 固体样品与 10 g 无水硫酸钠混合,放入研磨器中,加入 300 mL 二氯甲烷。研磨 30 s,间歇 5 min,再研磨 15 s。重复上述操作。研磨结束后,用滤纸过滤提取液,并使其通过无水硫酸钠去除水分。

43.2.3 不同有机组分的提取:

与 7.1.3 相同。

43.3 提取液浓缩

将 43.2.1、43.2.2 和 43.2.3 所得提取液按 7.2 所述方法浓缩。

43.4 溶剂置换

与 7.3 相同。

44 样品量计算结果的表示

44.1 样品总量以 g 计。

44.2 提取的有机物及各有机组分的量以 mg 计。

45 质量控制

45.1 设置溶剂对照,与 27.1 相同。

45.2 设置平行样。

45.3 设置阳性对照,参见 9.2。

46 安全性

与10相同。

附加说明：

本标准由国家环境保护局科技标准司提出。

本标准由北京市环境保护科学研究所、中国环境科学院负责起草。

本标准主要起草人汪晶、阎雷生。

本标准由国家环境保护局负责解释。