ICS 13.080.99
CCS Z 18

T／GDKJ

广东省科技成果转化促进会团体标准

T/GDKJ XXXX—2023

土壤中铜、铅、镉的快速测定 酶联免疫法

Rapid determination of copper，lead， and cadmium in soil—enzyme linked immunosorbent assay

（征求意见稿）

2023-XX-XX 发布 2023-XX-XX 实施

广东省科技成果转化促进会 发布

目　次

前　　言 II
引　　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 试验原理 1
5 试剂和材料 2
6 仪器和设备 2
7 样品 3
8 试验步骤 3
9 结果判定 4
10 检出限 4
附录 A （资料性）镉离子胶体金免疫层析试纸试验 5
附录 B （资料性）铅离子胶体金免疫层析试纸试验 7
参考文献 8

前　　言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广东建研环境监测股份有限公司提出。

本文件由广东省科技成果转化促进会归口。

本文件主编单位：广东建研环境监测股份有限公司。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

引　　言

本标准的发布机构广东省科技成果转化促进会提请注意，使用者声明符合本文件时，将使用涉及本文件 8.1 条与土壤中重金属粒子前处理方法相关的专利的使用。

本文件的发布机构广东省科技成果转化促进会对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

专利权利人已按要求向广东省科技成果转化促进会提交承诺书。对使用本标准时涉及上述专利的任何机构和个人，专利权利人许可如下：

（1） 对于个人或机构使用本标准开展内部检测和研究开发等非直接盈利行为时，免费许可使用专利。

（2） 对于机构使用本标准开展第三方检测服务、认证等直接盈利行为时，收费许可使用专利。每次收费费率为服务额的 20%。

专利申请和专利权利人的信息如下：

申请号或专利号：ZL 2017 1 0799895.3。

专利名称：二氧化钛在酶联免疫法检测土壤中重金属离子的前处理中的应用。

专利权利人：广东建研环境监测股份有限公司。

联系人：马杜鹃。

邮　箱：jianyan_yyb@163.com。

地　址：广州市黄埔区南翔三路 52 号 2 栋 101 房。

请注意除上述已经识别出的专利外，本文件的某些内容有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

土壤中铜、铅、镉的快速测定 酶联免疫法

1 范围

本文件规定了采用胶体金免疫层析试纸条快速测定土壤中铜、铅、镉含量的方法。

本文件适用于土壤中铜、铅、镉的快速测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

HJ 605 土壤和沉积物 挥发性有机物的测定 吹扫捕集/气相色谱-质谱法

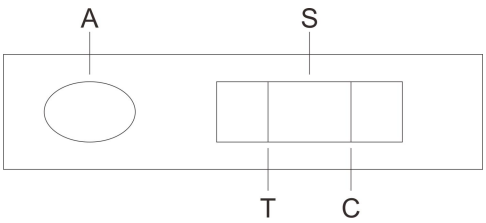
3 术语和定义

HJ 605界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

利用二氧化钛对土壤浸提液中的重金属离子进行吸附、解吸附操作，氨水调节pH值，富集得到的重金属离子可通过免疫学方法进行检测，也即应用胶体金试纸检测二级以下的土壤中的重金属离子。

胶体金免疫层析法试纸条结构见图1。当T线和C线同时出现红色带时，若T线颜色较C线深或者颜色相同，表示样品中待检物质浓度低于检测限，或不含待检物质，检测结果为阴性；若T线颜色较C线浅或T线未显色，则表示样品中待检物质浓度高于检测限，检测结果为阳性；若C线未显色，检测结果无效，可能是因为操作过程不正确或试纸条已失效。



说明：

A——加样孔；

S——检测区

T——检测线

C——质控线

图1 胶体金免疫层析法试纸条结构示意图

5 试剂和材料

除非另有说明，分析中仅使用符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 硝酸（HNO_3）：优级纯。

4M的硝酸溶液：用超纯水将26.88mL的浓硝酸稀释到100mL；分别配制0.5M、1M、2M、3M的稀硝酸溶液。

5.2 盐酸（HCL）：优级纯。

4M的盐酸溶液：用超纯水将33.12mL的浓盐酸稀释到100mL；分别配制0.5M、1M、2M、3M的稀盐酸。

5.3 硫酸：优级纯。

4M的硫酸溶液：用超纯水将18mL的浓硫酸稀释到100mL；分别配制0.5M、1M、2M、3M的稀硫酸溶液。

5.4 混合酸溶液。

按需要取各个浓度的稀盐酸、稀硝酸、稀硫酸溶液分别按1：3、1：1、3：1的体积比两两混合。

5.5 氯化钠：分析纯。

5.6 EDTA·2Na：分析纯。

0.1M EDTA·2Na：先配制0.15MPBST缓冲液，称取氯化钠8.0g、磷酸二氢钾0.2g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠2.9g、Tween-20 0.5mL，加蒸馏水至1.0L；用超纯水和氢氧化钠配制1M的EDTA·2Na溶液，然后用PBST缓冲液将其稀释10倍。

5.7 镉离子标准溶液：1000μg/mL。

5.8 铅离子标准溶液：1000μg/mL。

5.9 铜离子标准溶液：1000μg/mL。

5.10 标准土壤：GBW07407(GSS-7)。

5.11 二氧化钛：锐钛，5nm～10nm，纯度 99 .8%。

二氧化钛在使用前用5M的硝酸浸泡30min，然后于4000rpm下离心10min，去掉上清，用二次水进行洗涤，直至将上清液洗至中性，对沉淀物进行抽滤，然后于100℃下烘干，研磨过筛后于避光干燥处保存备用。

5.12 氨水：分析纯

浓度为22%氨水溶液：用超纯水和氨水配制。

5.13 胶体金免疫层析试纸条，不同金属离子试纸条不同。

市售有证胶体金免疫层析试纸条，也可以配制。

6 仪器和设备

6.1 样品瓶：带聚四氟乙烯-硅胶衬垫螺旋盖的 40mL 棕色宽口玻璃瓶。

6.2 采样器：一次性塑料注射器或不锈钢专用采样器。

6.3 离心机。

6.4 高速离心机。

6.5 超滤离心管。

6.6 便携式 pH 计。

6.7 混合振荡仪。

6.8 便携式 pH 计。

6.9 胶体金读数仪。

6.10 微量移液器：10μl～200μl、100μl～1000μl。

6.11　一般实验室常用仪器和设备。

7　样品

7.1　样品采集

土壤样品的采集参考 HJ/T 166 的规定。采样部位均为 0.0cm～20.0cm 的表层土壤，利用蛇形采样法进行，将 10 个取样点的土壤混合为一个土壤样品，除去土样中的石子和动植物残体，利用四分法取 1 kg 左右土壤于聚四氟乙烯密封袋中。将土壤样品于 90℃的鼓风干燥箱中烘干，利用四分法取 0.25kg 左右的土壤，用玛瑙棒碾碎，过 2mm 尼龙筛，混匀，继续研磨，过 0.154 mm(100 目)检验筛，于阴凉干燥处保存备用。

7.2　样品保存

样品采集后应冷藏运输。运回实验室后应尽快分析。实验室内样品存放区域应无有机物干扰，在4℃以下保存时间为10d。

8　试验步骤

8.1　样品处理

8.1.1　镉提取液

称取1.0000g±0.0005g土壤样品于50mL离心管中，加入5mL 4M的盐酸和15mL 4M的硫酸，振荡30s，40℃下反应20min，然后于8000rpm转速下离心10min，上清液待用。

将镉提取液转入50mL比色管中，用浓度25%氨水调节pH至8.5，并用超纯水定容至刻度。加入50mg纳米TiO_2，振荡5min，静置20min 后于4000rpm下离心8min，加入1 mL 0.1M的EDTA •2Na溶液，振荡15min，静置20min后于4000rpm下离心8min，取上清液待用。

8.1.2　铅提取液

称取1.0000g±0.0005g土壤样品于50mL离心管中，加入10mL 4M的盐酸和10mL 4M的硝酸，振荡30s，60℃下反应50min，然后于8000rpm转速下离心10min，上清液待用。

将铅提取液转入50mL比色管中，用浓度25%氨水调节pH至8.5，并用超纯水定容至刻度。加入50mg纳米TiO_2，振荡5min，静置20min 后于4000rpm下离心8min，加入1 mL 0.1M的EDTA •2Na溶液，振荡15min，静置20min后于4000rpm下离心8min，取上清液待用。

8.1.3　铜提取液

称取1.0000g±0.0005g土壤样品于50mL离心管中，加入1mL 4M的盐酸和3mL 4M的硫酸，振荡30s，80℃下反应60min，然后于8000rpm转速下离心10min，上清液待用。

将铜提取液转入50mL比色管中，用浓度25%氨水调节pH至8.5，并用超纯水定容至刻度。加入50mg纳米TiO_2，振荡5min，静置20min 后于4000rpm下离心8min，加入1 mL 0.1M的EDTA •2Na溶液，振荡15min，静置20min后于4000rpm下离心8min，取上清液待用。

8.2　试样测试

8.2.1　取出 2℃～8℃保存的胶体金试纸条，并恢复至 15℃～25℃。分别取 8.1 上清液 80μL 加入加样孔 A 中，水平放置 8min～15min，观察结果。

8.2.2　胶体金免疫层析法试样测试也可参考附录 A、附录 B 试验方法。

9 结果判定

胶体金免疫层析法结果判定见图2。当T线和C线同时出现红色带时，若T线颜色较C线深或者颜色相同，表示样品中待检物质浓度低于检测限，或不含待检物质，检测结果为阴性；若T线颜色较C线浅或T线未显色，则表示样品中待检物质浓度高于检测限，检测结果为阳性；若C线未显色，检测结果无效，可能是因为操作过程不正确或试纸条已失效。

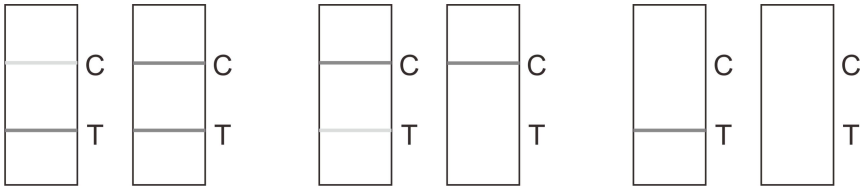


图2 胶体金免疫层析法结果判定示意图

10 检出限

以0.1 M的EDTA•2Na 溶液为溶剂，将1g/L重金属离子标准溶液稀释到150μg/L、300μg/L、600μg/L、900μg/L、1200μg/L等浓度，充分混匀后取80μL用试纸条检测，8min～15min内立即读值，观察结果并拍照，每个浓度重复5次，考察重金属离子胶体金免疫层析试纸条的检测限。

本文件定义胶体金免疫层析试纸条的定量下限：肉眼下能明显区别检测线（T）比控制线（C）颜色浅，此时的浓度为试纸条的定量下限。

镉离子：随镉离子浓度的增加，T线的颜色逐渐变浅，150μg/L时T 线颜色明显比C线颜色浅，6000μg/L时T线完全消失，确定胶体金试纸条的检出限为0.15mg/kg。

铅离子：铅离子胶体金免疫层析试纸条检测时间在15min内，检出限为0.041mg/kg，定量限为097mg/kg。

附录 A

（资料性）

镉离子胶体金免疫层析试纸试验

A.1 试剂和材料

A.1.1 硝酸（HNO_3）：优级纯。

A.1.2 盐酸（HCL）：优级纯。

A.1.3 硫酸：优级纯。

A.1.4 EDTA·2Na：分析纯。

0.1M EDTA·2Na：先配制0.15MPBST缓冲液，称取氯化钠8.0g、磷酸二氢钾0.2g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠2.9g、Tween-20 0.5mL，加蒸馏水至1.0L；用超纯水和氢氧化钠配制1M的EDTA·2Na溶液，然后用PBST缓冲液将其稀释10倍。

A.1.5 二氧化钛：锐钛，5nm～10nm，纯度 99 .8%。

A.1.6 氨水：分析纯

A.1.7 镉离子胶体金免疫层析试纸条。

A.2 仪器和设备

A.2.1 胶体金读数仪(BMZ 6 0 0 0北京美正生物科技有限公司)。

A.2.2 移液器：10μl～200μl。

A.2.3 离心机：

A.2.4 超滤离心管：

A.2.5 便携式 pH 计：

A.2.6 混合振荡仪：

A.2.7 一般实验室常用仪器和设备

A.3 测试步骤

B.3.1 样品处理

称取1.0000g±0.0005g土壤样品于50mL离心管中，加入5mL 4M的盐酸和15mL 4M的硫酸，振荡30s，40℃下反应20min，然后于8000rpm转速下离心10min，上清液待用。

将镉提取液转入50mL比色管中，用浓度25%氨水调节pH至8.5，并用超纯水定容至刻度。加入50mg纳米TiO2，振荡5min，静置20min 后于4000rpm下离心8min，加入1 mL 0.1M的EDTA·2Na溶液，振荡15min，静置20min后于4000rpm下离心8min，取上清液（待测样品）待用。

B.3.2 测试

将待测样品滴于免疫层析试纸加样孔中，由于毛细作用，液体向前移动；到达T线时，待测样品中的Cd-EDTA与包被在T线上的Cd-ITCBE-BSA偶联物竞争结合Cd单克隆抗体胶体金复合物。

当测定有效进行时，控制线(C线)总会显示红色；若不显色，则测试无效。当待测样品中Cd-EDTA质量浓度小于最低检测限浓度时，胶体金结合垫中的Cd单克隆抗体胶体金复合物与T线上Cd-ITCBE-BSA及C线上羊抗鼠IgG大量结合，T线呈色与C线相近，结果为阴性；反之，则抗Cd单克隆抗体胶体金复合物

基本上与检测试样中的Cd-EDTA结合，T线颜色将比C线浅或完全看不到颜色(样品中Cd-EDTA质量浓度越高，T线显色越浅)，结果为阳性。

附录 B

（资料性）

铅离子胶体金免疫层析试纸试验

B.1 试剂和材料

B.1.1 硝酸（HNO_3）：优级纯。
B.1.2 盐酸（HCL）：优级纯。
B.1.3 硫酸：优级纯。
B.1.4 EDTA·2Na：分析纯。
B.1.5 二氧化钛：锐钛，5nm～10nm，纯度 99 .8％。
B.1.6 氨水：分析纯
B.1.7 铅离子胶体金免疫层析试纸条。

B.2 仪器和设备

B.2.1 胶体金读数仪(BMZ 6 0 0 0北京美正生物科技有限公司)。
B.2.2 移液器：10μl～200μl。
B.2.3 离心管 。
B.2.4 离心机。
B.2.5 祸旋混合器。
B.2.6 一般实验室常用仪器和设备。

B.3 测试步骤

B.3.1 样品处理

称取1.0000g±0.0005g土壤样品于50mL离心管中，加入10mL 4M的盐酸和10mL 4M的硝酸，振荡30s，60℃下反应50min，然后于8000rpm转速下离心10min，上清液待用。

将铅提取液转入50mL比色管中，用浓度25%氨水调节pH至8.5，并用超纯水定容至刻度。加入50mg纳米TiO_2，振荡5min，静置20min 后于4000rpm下离心8min，加入1 mL 0.1M的EDTA •2Na溶液，振荡15min，静置20min后于4000rpm下离心8min，取上清液待用。

B.3.2 测试

a）在进行检测前先完整阅读使用说明书，从原包装中取出试剂桶，打开后取出所需数量的微孔试剂和试纸条，并做好标记，微孔试剂取出后，请立即盖好试剂桶盖；

b）使用前将试纸条微孔试剂和待检样品恢复至室温25℃，将所需微孔试剂置于加热器上的微孔中。一次检测样品数量不要超过4个，如果一次检测样品数量超过4个，请按照4个一组，分批检测；

c）用微量移液器移取200μL回温后的样品于微孔试中，缓慢抽吸至检测样品与微孔试剂充分混匀；使用计时器，开始计时；

d）40℃条件下孵育5min；孵育结束后，停止时，从试剂桶中取出所需数量的试纸条并插入微孔试剂中，使印有LOGO手柄端向上，另一端向下并充分浸入溶液中；再次按下计时器，开始第二次 5min孵育；

e）第二次5min孵育结束后，停止计时；取出试纸条，擦除下端样品垫，立即使用读数仪读取检测结果。注意不要接触或损坏测试条中部检测区域，并在1min内读取结果；

f）检验完毕剩余试纸条和微孔试剂放回试剂桶并盖紧桶盖，剩余所有的试剂盖紧瓶盖，一起放回试剂盒中，2℃～8℃保存。

参考文献

[1] 高东辉.适于胶体金检测蛋白类海产品与土壤重金属残留的样品前处理研究.暨南大学硕士学位论文.

[2] 刘 斌，唐 勇等.纳米钛富集水样重金属镉-胶体金免疫层析法快速检测方法的建立[J]. 分析测试学报，Vol.29 No.3 247～251

[3] 刘美辰，路宏博等.胶体金免疫层析法快速定量检测糙米中重金属离子铅[J]. 粮食科技与经济，VOL.43，NO.2 February.2018.

[4] 徐建云，黄启英，刘 娟等.胶体金试纸条法快速检测纺织品中总铅和总镉含量[J]. 合成纤维工业， 2022，45(2) 88～93.

[5] 李杨阳，曲文莉，杨庆范等.铅胶体金免疫层析试纸条研制及其在小龙虾中的应用[J]. 食品安全质量检测学报，Vol.13， No.8，Apr.，2022.

[6] 丁友超，何 欢等.纺织品中镉的胶体金免疫层析试纸条快速检测法[J]. 印 染，2014，No.20.

[7] 高东辉.适于胶体金检测蛋白类海产品与土壤重金属残留的样品前处理研究.暨南大学硕士学位论文.

[8] 王玉珍，周静清.快速检测镉离子的免疫层析分析法的建立及应用[J]. 化学研究与应用，Vol.29，NO.12，Dec.，2017.