

土壤及水中五氯酚篩檢方法－免疫分析法

中華民國95年7月13日環署檢字第0950055833D號公告
自中華民國95年10月15日起實施
NIEA M624.00C

一、方法概要

本方法採用已商品化的檢測試劑套組 (Immunoassay test kit)，操作時，須依循製造商說明書，對樣品進行五氯酚 (Pentachlorophenol) 定性及半定量的篩檢。

檢測時，以過濾後保存在黑暗低溫下的土壤萃取液或是水樣為樣品，將定量萃取液或水樣及酵素-五氯酚結合試劑 (Enzyme-PCP conjugate reagent) 加入已固定化的五氯酚抗體上，酵素-五氯酚結合體與樣品中的五氯酚，共同競爭與五氯酚抗體的結合。當酵素-五氯酚結合體與五氯酚抗體結合後，會將無色的酵素受質轉化成有色產物，本方法檢測結果，將由比較樣品組及標準品顏色變化之差異而得知。

樣品中的五氯酚會減少酵素-五氯酚結合試劑與抗體的鍵結量，反應後呈現較淺顏色。因此，五氯酚濃度與反應顏色呈負相關。

二、適用範圍

本方法是用來篩選土壤、污泥，或水樣如廢水或垃圾滲出水等中五氯酚含量。本方法可用來判斷樣品中其五氯酚之濃度，可能為低濃度、中濃度、及高濃度的污染 (在水中濃度 $5 \mu\text{g/L}$ ，固體樣品中濃度為 0.5, 10 或 100 mg/kg 就會有陽性反應)；也可藉由與五氯酚標準品比較而估計五氯酚的濃度。本法適用於污染場址調查、污染場址整治範圍規劃，可在野外現場執行，篩選高濃度或低濃度部分；但法規管制值附近之樣品，需送至實驗室執行定量分析。

當使用 $5 \mu\text{g/kg}$ 之篩選濃度，水樣中五氯酚含量小於或等於 $2 \mu\text{g/kg}$ 的樣品，有 95% 顯示為陰性；當使用 $5000 \mu\text{g/kg}$ 之篩選濃度，土壤中五氯酚含量小於或等於 $125 \mu\text{g/kg}$ 的樣品，有 95% 顯示為陰

性。

若要準確定量出樣品中五氯酚的濃度，則需使用進一步的分析技術，如氣相層析法（參考 NIEA M614 方法）或氣相層析質譜法（參考 NIEA M731 方法）。

二、本方法限由受過訓練之分析員，親自操作或在其監督下，才可執行。每一分析人員需證明具有使用本方法可產生可信之數據結果的能力。

三、干擾

(一) 具有與五氯酚相似化學性質之化合物，易產生偽陽性反應。本方法所採用的檢測套組以完成干擾物評估，表一 A 與表一 B 列出本方法對這些化合物造成偽陽性結果的最小濃度。可請試劑套組製造商，提供進一步的參考資料，以了解其他化合物間的交叉反應（cross reactivity）。

(二) 保存及操作之溫度，會影響檢測結果，使用時請務必依照製造商的指示進行。

四、設備與材料

免疫分析檢測試劑套組：PENTA RISc™ (EnSys,Inc.)，EnviroGard™ PCP in soil (Millipore,Inc.) 或具同等功效之產品。

五、試劑

請參考每一商品化的檢測試劑套組所提供或說明成功完成該試驗，所需之相關試劑。

六、採樣及保存

(一) 採樣方法請參考本署公告 NIEA S102。

(二) 由於土樣可能已遭受污染，因此必須以危害物質處理規範之要求處置。

七、步驟

請遵循檢測試劑套組製造商的說明書進行，這些檢測套組，必須符合或優於表二至表十所要求的成效。

八、結果處理

略

九、品質管制

- (一) 請遵循檢測試劑套組製造商的說明，進行品質管制措施。
- (二) 檢測結果若樣品濃度接近行動基準 (action level) 時，請利用重複分析來妥善處理樣品篩檢結果。
- (三) 切勿使用過期的檢測試劑套組。
- (四) 切勿使用其他檢測試劑套組所配備的試劑與試管。
- (五) 請依產品規範，控制檢測試劑套組保存與使用的溫度。
- (六) 本方法適用於室內及野外試驗，品質保證規範可透過良好的文件資料管理系統來建立。

十、精密度與準確度

- (一) 方法績效評估：本方法曾應用在地下水、加工水及使用五氯酚工廠的廢污水水樣及土壤樣品中的五氯酚檢測，並與氣相層析質譜法 (參考 NIEA M731 方法) 所檢測出之結果比較，其結果如表二、表三所示。
- (二) 方法靈敏度：利用 8 種不含五氯酚的土壤，應用分析物-專一性反應曲線 (analyte-specific response curve) 換算出負控制組土樣基質 (matrix) 的雜訊基準 (noise level)，所相對應的五氯酚濃

度。每一土樣重複萃取三次，重複檢驗三次後，計算出結果 %Bo ($\%Bo = [(\text{吸光度值}_{\text{樣品}} / \text{吸光度值}_{\text{負控制組}}) \times 100]$) 之平均檢測值及標準偏差。方法靈敏度估計為平均測值扣除兩倍標準偏差。在 95 % 信賴區間內，本方法的靈敏度為 80%Bo，參考表四五氯酚檢驗分析平均測值，得知此相對應濃度是 2 mg/kg。

- (三) 土壤水分含量之影響：採用經過乾燥處理的土壤樣品，分成四大類，乾燥、添加 30%(w/w) 水分及有加入家用燃油 (Home heating oil, HHO) 及不添加家用燃油的樣品，分別作添加五氯酚與不添加處理。由表五的數據結果得知，土樣水含量高達 30%，也不會對檢測結果產生明顯的影響。
- (四) 土壤 pH 值之影響：採用三種土壤樣品，分別利用 6 N HCl 與 12 N NaOH 調整土壤 pH 值，成為未調整、pH 2 至 4、pH 10 至 12 三類，隨之分別作添加五氯酚與不添加處理。由表六的數據結果推知，土樣 pH 值由 3 至 11，對檢測結果，都不會產生明顯的影響。
- (五) 五氯酚免疫分析法準確度：將三種不同土壤樣品分別加入兩個不同濃度的五氯酚 (10 及 100 mg/kg)。每一樣品萃取三次，每一萃取液分析三次。個別的回收率範圍為 60% 至 125%，個別萃取液的平均回收率範圍為 72% 至 101%，總平均回收率為 86%。結果如表七所示。
- (六) 共污染效應影響：就 EnviroGard™ 五氯酚土壤檢測套組的土壤樣品與油料的共污染效應作探討，三個土壤樣品都添加柴油，再添加五氯酚。將樣品萃取後，分析萃取液三次。當油料的污染程度到達 10% 時，都不會對分析結果造成影響，結果如表八所示。
- (七) 標準方法與免疫分析法比較：利用 EnviroGard™ 五氯酚土壤檢測套組在污染點作現場試驗。本方法是用來檢測在木材處理廠中，土壤是否受到五氯酚的污染。總共分析 33 個樣品，包括 5 個現場重複樣品。對現場重複樣品而言，參考方法顯示平均變異數為 16%。本方法的平均變異數為 31%。因為本方法無法定量，其濃度值只能以估計求得，其結果如表九所示。在 10 mg/kg 之

篩檢濃度，有 0/33 (0%) 呈偽陰性及 0/33 (0%) 呈偽陽性。在 100 mg/kg 之篩檢濃度，有 1/33 (3%) 呈偽陰性及 1/33 (3%) 呈偽陽性。結果如表十所示。

十一、參考資料

- (一) US EPA, SW-846, Method 4010A "Screening for Pentachlorophenol by Immunoassay", 1996.
- (二) J.P. Mapes, K.D. McKenzie, L.R. McClelland, S. Movassaghi, R.A. Reddy, R.L. Allen, and S.B. Friedman, "Rapid, On-Site Screening Test for Pentachlorophenol in Soil and Water – PENTARISc™", Ensys Inc., Research Triangle Park, NC 27709
- (三) J.P. Mapes, K.D. McKenzie, L.R. McClelland, S. Movassaghi, R.A. Reddy, R.L. Allen, and S.B. Friedman, "PENTA-RISc™ - An On-Site Immunoassay for Pentachlorophenol in Soil", Ensys Inc., Research Triangle Park, NC 27709
- (四) PENTA-RISc™ Instructions for Use, Ensys Inc.
- (五) EnviroGard™ PCP in Soil Test Kit Guide, Millipore, Inc.

表一A 不同化合物的交叉反應

化合物 ^註	在土壤樣品中，0.5 mg/kg 的有效範圍內，產生五氯酚偽陽性反應的濃度 (mg/kg)	在水樣中，5 µg/L 的有效範圍內，產生五氯酚偽陽性反應的濃度 (µg/L)
2,6-二氯酚 2,6-Dichlorophenol	700	600
2,3,4-三氯酚 2,3,4-Trichlorophenol	400	600
2,4,6-三氯酚 2,4,6-Trichlorophenol	16	100
2,4,5-三氯酚 2,4,5-Trichlorophenol	100	500
2,3,5,6-四氯酚 2,3,5,6-Tetrachlorophenol	1.2	7
Tetrachlorohydroquinone	500	>1500

註：除特別註明外，化合物濃度均為3.75 µM (相當於五氯酚1000 µg/L的當量濃度)。

檢測套組：PENTA RISC™

資料來源：EnSys, Inc. 產品文獻。

表一B 不同化合物的交叉反應

化合物		產生陽性反應所需之濃度 (mg/kg)
五氯酚	Pentachlorophenol	10
2,5-二氯酚	2,5-Dichlorophenol	1000
2,6-二氯酚	2,6-Dichlorophenol	1000
2,3,4-三氯酚	2,3,4-Trichlorophenol	1000
2,3,5-三氯酚	2,3,5-Trichlorophenol	500
2,3,6-三氯酚	2,3,6-Trichlorophenol	500
2,4,5-三氯酚	2,4,5-Trichlorophenol	500
2,4,6-三氯酚	2,4,6-Trichlorophenol	500
下列化合物濃度高達 1000 mg/kg 時仍呈現陰性反應的結果：		
2,3,5,6-四氯酚	2,3,5,6-Tetrachloronitrobenzene	多氯聯苯1248
3,5-二氯酚	3,5-Dichlorophenol	PCB (Aroclor 1248)
2,4-二氯酚	2,4-Dichlorophenol	三硝基甲苯 TNT
2,3-二氯酚	2,3-Dichlorophenol	滴滴涕 DDT
4-氯酚	4-Chlorophenol	多環芳香化合物 PAHs
		可氯丹 Chlordane

檢測套組：EnviroGard™

資料來源：Millipore, Inc. 產品文獻。

表二 PENTA RISC™ 檢測套組與氣相層析質譜儀檢測結果的比較- 基質為水

樣品類 型	免疫分析法 (mg/kg)							GC/MS測值 (mg/kg)	結果一致性
	0.005	0.05	0.1	0.5	1	5	50		
地下水					>	>	<	3.5	偽陽性
			>	<				0.35	是
	>	<						<0.1	是
						>	<	8.2	是
	>	>			>	<		2.8	是
	>	>			>	<		2.9	是
加工水	>	>	<	<				0.21	偽陰性
	>	>	<	<				0.17	偽陰性
			>	<				0.12	是
廢污水		>	>	<	<			0.6	偽陰性
					>	<		1.4	是
	>	>	<					<0.1	是
			>	<				0.17	是
逕流水	>	>	<					<0.1	是
	>	<						0.034	是
		>			<			0.098	是
		>			<			0.084	是
		>			<			0.086	是

表二 PENTA RISc™ 檢測套組與氣相層析質譜儀檢測結果的比較-基質為水

(續)

樣品類型	免疫分析法(mg/kg)							GC/MS測值 (mg/kg)	結果一致性
	0.005	0.05	0.1	0.5	1	5	50		
逕流水						>		2.1	偽陽性
		>			<			0.073	是
		>			<			0.026	偽陽性
	>	<						0.006	是
					>			0.169	偽陽性
		>			<			0.239	是
					>			0.190	偽陽性
					>			0.114	偽陽性
			>			<		0.346	是
						>		1.1	是
						>		19	是
					>		<	4.3	是

表三 PENTA RISC™ 檢測套件與氣相層析質譜儀檢測結果比較- 基質為土

壤

GC/MS測 值(mg/kg)	免疫分析法(mg/kg)			結果一致性
	0.5	5	50	
1100	>	>	>	是
88	>	>	<	偽陰性
0.31	<	<	<	是
0.72	<	<	<	偽陰性
315	>	>	>	是
1.5	>	<	<	是
6.4	>	>	<	是
9	>	>	<	是
1.9	>	<	<	是
46	>	>	>	偽陽性
<1	>	<	<	是
21	>	>	<	是
3.3	>	<	<	是
4	>	>	<	偽陽性
11	>	>	<	是
18	>	>	<	是
33	>	>	<	是
54	>	>	>	是
65	>	>	>	是
74	>	>	>	是

表三 PENTA RISC™ 檢測套件與氣相層析質譜儀檢測結果比較(續)

GC/MS測 值(mg/kg)	免疫分析法(mg/kg)			結果一致性
	0.5	5	50	
83	>	>	>	是
1.1	>	<	<	是
14.3	>	>	<	是
<1	<	<	<	是
<1	<	<	<	是
<1	<	<	<	是
3.9	>	<	<	是
<1	<	<	<	是
1.4	>	<	<	是
48	>	>	>	偽陽性
<1	<	<	<	是
142	>	>	>	是
108	>	>	<	偽陰性
117	>	>	>	是
56	>	>	>	是
2.5	>	<	<	是
3.5	>	>	<	偽陽性
143	>	>	>	是
ND	<	<	<	是
0.02	<	<	<	是
5	>	<	<	是

表四 EnviroGard™ 五氯酚土壤檢測套組的靈敏度

第一部分 – 陰性土壤的平均回應值

樣品編號	土壤種類	平均%Bo (n=8)	標準偏差
S1	壤土	97.6	3.0
S2	黏土	100.1	1.4
S3	砂	101.4	2.8
S4	壤土	99.4	4.9
S5	砂	100.2	3.1
S6	黏土	97.4	2.7
S7	壤土/砂	102.6	0.3
S8	砂/壤土	97.5	3.6
平均		99.5	5.2

第二部分 – 對五氯酚校正液的平均感應值

五氯酚濃度 (mg/kg)	平均吸收度	平均 %Bo
0	1.142	N/A
5	0.828	72.6
20	0.556	48.7
50	0.382	33.4
200	0.162	14.1

第三部分 – 方法靈敏度

根據以上:
平均 %Bo - 2 SD = 89.2 相當於五氯酚1.6mg/kg
平均 %Bo - 3 SD = 84.0 相當於五氯酚2.3 mg/kg

$$\%Bo = [(OD_{\text{sample}}/OD_{\text{negative control}}) \times 100]$$

表五 土壤樣品中含水量的影響^註

樣品編號	水 %	添加與否	樣品1	樣品2	樣品3	平均值	標準偏差	± 2個標準偏差範圍
S1	0	否	104.5*	106.5	99.7	103.6	3.5	96.6 - 111
S1	30	否	101.9	106.3	95.2	101.1	5.6	89.9 - 112
S1	0	是	38.9	47.2	40.2	42.1	4.4	33.3 - 50.9
S1	30	是	49.2	51.1	48.2	49.5	1.5	46.5 - 52.5
S2	0	否	97.8	105.7	96.7	100.1	4.9	90.3 - 110
S2	30	否	105.1	109.7	93.9	102.9	8.1	86.7 - 119
S2	0	是	40.2	47.5	42.7	43.5	3.7	36.1 - 50.9
S2	30	是	48.8	47.2	44.8	46.9	2.0	42.9 - 50.9
S3	0	否	98.3	107.1	99.7	101.7	4.7	92.3 - 111
S3	30	否	111.5	103.1	95.1	103.2	8.2	86.8 - 120
S3	0	是	43.3	47.2	43.2	44.6	2.3	40.0 - 49.2
S3	30	是	46.5	49.8	48.0	48.1	1.7	44.7 - 51.5

*所有的值為 $\%Bo = [(OD_{\text{sample}}/OD_{\text{negative control}}) \times 100]$

註：EnviroGard™五氯酚土壤檢測套組 (Millipore, Inc.)

表六 土壤樣品中 pH 值的影響^註

樣品編號	調整後 pH 值	添加與否	樣品1	樣品2	樣品3	平均值	標準偏差	± 2個標準偏差範圍
S1	無	否	103.1	98.6	98.6	100.1	2.6	94.9 - 105
S1	酸性	否	88.7	96.9	100.2	95.3	5.9	83.5 - 107
S1	鹼性	否	85.2	90.9	98.0	91.3	6.4	78.5 - 104
S1	無	是	52.7	44.8	45.8	47.8	4.3	39.2 - 56.4
S1	酸性	是	57.1	44.6	45.2	48.9	7.0	34.9 - 62.9
S1	鹼性	是	44.6	41.6	45.9	44.0	2.2	39.6 - 48.4
S2	無	否	105.6	93.9	102.5	100.7	6.1	88.5 - 113
S2	酸性	否	104.4	91.3	105.8	100.5	8.0	84.5 - 117
S2	鹼性	否	93.4	87.7	105.8	95.6	9.3	77.0 - 114
S2	無	是	47.8	45.1	44.3	45.7	1.8	42.1 - 49.3
S2	酸性	是	51.4	44.4	54.1	50.0	5.0	40.0 - 60.0
S2	鹼性	是	43.3	40.7	44.0	42.7	1.8	39.1 - 46.3
S3	無	否	92.3	101.8	100.4	98.2	5.2	87.8 - 109
S3	酸性	否	96.6	91.9	98.5	95.7	3.4	88.9 - 103
S3	鹼性	否	87.7	99.8	96.3	94.6	6.2	82.2 - 107
S3	無	是	55.2	49.5	55.9	53.6	3.5	46.6 - 60.6
S3	酸性	是	55.3	48.3	42.0	48.5	6.7	35.1 - 61.9
S3	鹼性	是	44.3	39.3	48.0	43.9	4.4	35.1 - 52.7

*所有的值為 %Bo = $[\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{negative control}}] \times 100$

註：EnviroGard™ 五氯酚土壤檢測套組 (Millipore, Inc.)

表七 檢測套組^註偏差

樣品編號	添加 (mg/kg)	萃取編號	回收濃度(mg/kg)*	%回收率
S1	10	1	9	91
S1	10	2	9	86
S1	10	3	9	88
S1	100	1	84	84
S1	100	2	78	78
S1	100	3	76	76
		平均值		84
S2	10	1	10	100
S2	10	2	8	76
S2	10	3	8	76
S2	100	1	101	101
S2	100	2	98	98
S2	100	3	88	88
		平均值		90
S3	10	1	7	72
S3	10	2	8	76
S3	10	3	8	81
S3	100	1	95	95
S3	100	2	90	90
S3	100	3	87	87
		平均值		84
總平均回收率 = 86%				

註：EnviroGard™五氯酚土壤檢測套組 (Millipore, Inc.)

表八 柴油的共污染效應^註

樣品編號	攪雜與否	添加與否	樣品1	樣品2	樣品3	平均值
S1	否	否	103.2*	92.5	99.8	98.5
S1	是	否	93.4	99.4	106.2	99.7
S1	否	是	52.7	44.8	45.8	47.8
S1	是	是	50.9	49.7	44.6	48.4
S2	否	否	103.1	98.3	102.3	101.2
S2	是	否	85.4	95.1	99.9	93.5
S2	否	是	47.8	45.1	44.3	45.7
S2	是	是	44.6	50.8	49.0	48.1
S3	否	否	98.9	95.4	108.1	100.8
S3	是	否	103.8	99.7	101.4	101.6
S3	否	是	55.2	49.5	55.9	53.6
S3	是	是	50.4	50.6	56.7	52.6

*所有的值為 $\%Bo = [(OD_{\text{sample}}/OD_{\text{negative control}}) \times 100]$

註：EnviroGard™五氯酚土壤檢測套組 (Millipore, Inc.)

表九 現場重複樣品^註

氣相層析質譜法 (參考NIEA M731 方法)	樣品編號	059	073	074	086	087
	第一次檢測	9600	74.8	836	6.59	34.0
	第二次檢測	10300	78.2	1520	6.88	51.8
	平均值	9950	76.5	1178	6.74	42.9
	標準差	495	2.4	484	0.20	12.6
	% 變異係數	5.0	3.1	41	3.0	29
免疫分析法	第一次檢測	4480	79.5	604	2.4	36.0
	第二次檢測	3370	122	421	5.0	24.0
	平均值	3920	101	512	3.7	30.0
	標準差	785	30.0	129	1.8	8.5
	% 變異係數	20	30	25	50	28

* 為作比較，免疫分析法定量值由計算得來。

註：EnviroGard™五氯酚土壤檢測套組 (Millipore, Inc.)

表十 免疫分析法^註與氣相層析質譜法(參考 NIEA M731 方法)的比較

樣品編號	NIEA M731	免疫分析法	結果一致性
059	9600	>10	是
059D	10300	>10	是
060	1010	>10	是
061	2740	>10	是
063	1610	>10	是
064	1980	>10	是
065	1580	>10	是
066	57.8	>10	是
067	110	>10	是
068	47.7	>10	是
069	798	>10	是
070	2890	>10	是
071	289	>10	是
072	326	>10	是
073	74.8	>10	是
073D	78.2	>10	是
074	836	>10	是
074D	1520	>10	是
075	3690	>10	是
076	4590	>10	是
077	2040	>10	是
078	1720	>10	是
079	792	>10	是
080	2550	>10	是
081	125	>10	是
082	2400	>10	是
083	270	>10	是
084	1140	>10	是

表十 免疫分析法^註與氣相層析質譜法(參考NIEA M731方法)

的比較(續 一)

樣品編號	NIEA M731	免疫分析法	結果一致性
085	57.7	>10	是
086	6.59	<10	是
086D	6.88	<10	是
087	34.0	>10	是
087D	51.8	>10	是
059	9600	>100	是
059D	10300	>100	是
060	1010	>100	是
061	2740	>100	是
063	1610	>100	是
064	1980	>100	是
065	1580	>100	是
066	57.8	<100	是
067	110	>100	是
068	47.7	<100	是
069	798	>100	是
070	2890	>100	是
071	289	>100	是
072	326	>100	是
073	74.8	<100	是
073D	78.2	>100	偽陽性
074	836	>100	是
074D	1520	>100	是
075	3690	>100	是
076	4590	>100	是
077	2040	>100	是

表十 免疫分析法^註與氣相層析質譜法(參考NIEA M731方法)
的比較(續 二)

樣品編號	NIEA M731	免疫分析法	結果一致性
078	1720	>100	是
079	792	>100	是
080	2550	>100	是
081	125	<100	偽陰性
082	2400	>100	是
083	270	>100	是
084	1140	>100	是
085	57.7	<100	是
086	6.59	<100	是
086D	6.88	<100	是
087	34.0	<100	是
087D	51.8	<100	是

註：EnviroGard™五氯酚土壤檢測套組 (Millipore, Inc.)

五氯酚測試濃度為 10 mg/kg