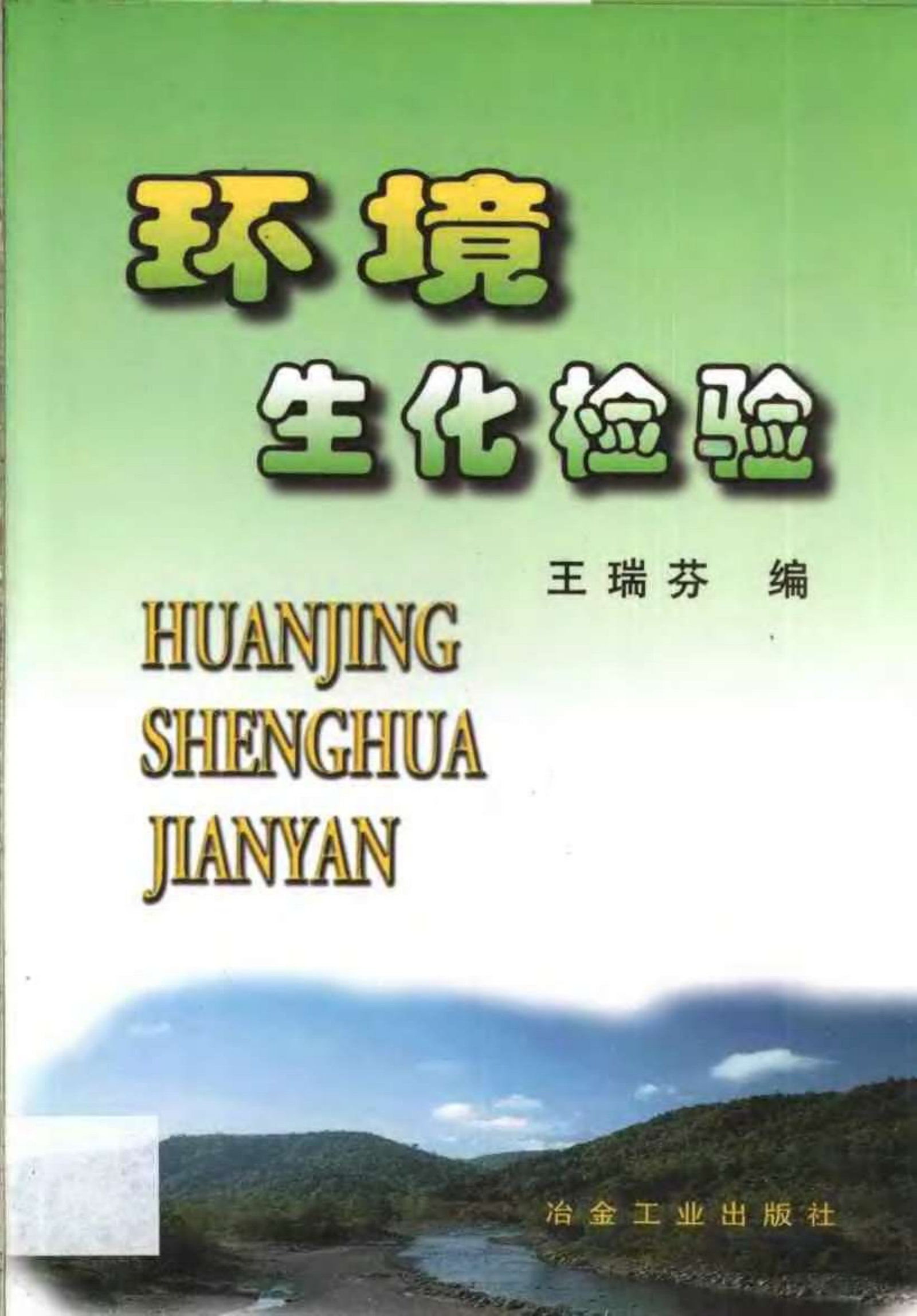
环境生化检验

王瑞芬 编

HUANJING SHENGHUA JIANYAN



冶金工业出版社



ISBN 7-5024-2732-5

9 787502 427320 >

ISBN 7-5024-2732-5
X·75 定价14.80元

608

环境生化检验

王瑞芬　编

A0948011

北　京
冶金工业出版社
2001

内 容 简 介

本书以国家、行业或企业标准为依据，分别介绍了因环境因素所致的生化检验项目的检验意义、检验方法要点、仪器、试剂、测定步骤、注意事项，并详细讨论了检验原理。

全书共分六章，内容包括：绪论，生物样品的采集、制备、保存和预处理，生物样品中污染物残留的检验，生物样品中污染物代谢产物的检验，生物污染所致血液细胞学改变的检验，酶法检验等。

本书可作为中等专业学校化工分析专业和环境类专业选修教材，也可作为其他大、中专院校相关专业和已从事石油、化工、食品、医药、卫生、冶金、海洋、环保等各行业分析工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

环境生化检验/王瑞芬编．—北京：冶金工业出版社，2001.5

ISBN 7-5024-2732-5

Ⅰ．环… Ⅱ．王… Ⅲ．生物样品分析 Ⅳ．X132

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2001）第 14781 号

出版人 卿启云（北京沙滩嵩祝院北巷 39 号，邮编 100009）

责任编辑 王之光 美术编辑 王耀忠 责任校对 杨 力 责任印制 李玉山

北京市顺义兴华印刷厂印刷；冶金工业出版社发行；各地新华书店经销

2001 年 5 月第 1 版，2001 年 5 月第 1 次印刷

850mm×1168mm 1/32；6.625 印张；178 千字；204 页；1 3000 册

14.80 元

冶金工业出版社发行部 电话：（010）64044283 传真：（010）64027893

冶金书店 地址：北京东四西大街 46 号（100711） 电话：（010）65289081

（本社图书如有印装质量问题，本社发行部负责退换）

前　言

目前，环境污染和生态环境破坏已引起全球的关注。无论是发达国家，还是发展中国家都在为保护地球这个人类共有的家园而努力，保护生态环境已成为世界许多国家指导经济发展的总体战略。

我国高度重视治理环境污染和保护生态环境。1996 年 7 月召开了第四次全国环境保护会议，将保护生态环境作为全党和全国人民必须长期坚持的基本国策，并提出“动员全社会力量向环境污染发起总攻”的号召，决心将我国环境保护工作提高到一个新水平。

本书所介绍的检验方法是继环境理化检验、环境生物检验的又一检验环境质量的新方法。它是人们利用生物的组织、器官、体液和毛发等作为检样来测定与生存环境密切相关的生化数据的方法，具备化学、物理、分析化学和广泛使用的仪器分析知识就可学会和掌握这些方法。测得的环境生化数据比环境理化数据能更准确的反映生物，特别是人类生存的环境质量，而又不像环境生物检验那样要求分析者必须懂得很多生物学和更高深的生物化学知识，非专业队伍不能进行。随着可持续健康发展的深入进行和人们对保护生存环境重要性认识的不断提高，相信本书会成为广大分析工作者们十分喜爱的一本书。

本书是在 1991 年我编写的山东省化工学校内部教材的基础上，经过几年的教学实践及与兄弟学校交流之后，根据 1996 年 5 月全国化工中专教学指导委员会下达的“环境生化检验教学大纲”的要求编写的，可作为中等专业学校化工分析和环境类专业选修教材，也可作为其他大、中专院校相关专业和已从事石油、化

工、食品、医药、卫生、冶金、海洋、环保等各行业分析工作者的参考书。

本书承蒙全国化工中专教学指导委员会分析学科组原组长、新疆化工学校高级讲师刘德生主审。刘德生同志提出了一些宝贵意见和建议，在此表示诚挚的感谢。同时也对曾给予大力支持的山东省化工学校和兄弟学校各级领导及专家们表示深深的感谢。

由于本人学识水平有限和经验不足，书中不妥之处，恳请广大读者和专家给予批评指正。

编　者

2000 年 6 月

目　录

第一章　绪论…… 1

第一节　环境检验的生化指示器系统…… 1

一、环境生化指示器系统的第一类…… 2

二、环境生化指示器系统的第二类…… 3

三、环境生化指示器系统的第三类…… 7

四、环境生化指示器系统的第四类…… 8

第二节　污染物在生物体内的积累和分布 …… 11

一、污染物在生物体内的积累 …… 11

二、污染物在生物体内的分布 …… 12

第二章　生物样品的采集、制备、保存和预处理 …… 14

第一节　生物样品的采集、制备和保存 …… 14

一、人类血、尿、头发和其他组织样品的采集、制备和保存 …… 14

二、动物样品的采集、制备和保存 …… 19

三、人和动物待检样品的取样 …… 24

四、植物样品的采集、制备和保存 …… 25

第二节　生物样品的预处理 …… 29

一、消解和灰化 …… 29

二、提取、分离和浓缩 …… 30

三、适用于酶法检验的生物样品的处理 …… 33

第三章　生物样品中污染物残留的检验 …… 37

第一节　汞的检验 …… 37

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中汞的检验 …… 37

二、尿中汞的检验 …… 41

第二节　铅的检验 …… 48

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铅的检验 …… 48

二、尿中铅的检验 …… 57

三、血中铅的检验 …… 65

第三节　镉的检验 …… 69

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中镉的检验 …… 69

二、尿中镉的检验 …… 76

三、血中镉的检验 …… 82

第四节　铬的检验 …… 85

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铬的检验 …… 85

二、尿中铬的检验 …… 88

三、血中铬的检验 …… 93

第五节　砷的检验 …… 96

一、粮食、蔬菜、水果、茶叶、水产品等生物样品中砷的检验 …… 96

二、尿中砷的检验 …… 106

三、头发中砷的检验 …… 113

第四章　生物样品中污染物代谢产物的检验 …… 117

第一节　酚的检验 …… 117

一、尿中苯酚（及对、邻、间位甲酚）的检验 …… 117

二、尿中酚的检验…… 120
三、尿中对硝基酚的检验…… 123
四、尿中对氨基酚的检验…… 127
第二节　马尿酸、甲基马尿酸的检验…… 131
一、尿中马尿酸的检验…… 131
二、尿中马尿酸或甲基马尿酸的检验…… 135
第三节　其他污染物代谢产物的检验…… 138
一、尿中δ-氨基乙酰丙酸的检验 …… 138
二、尿中硫氰酸盐的检验…… 142
三、尿中粪卟啉（尿棕色素）的检验…… 146
四、血清总胆固醇的检验…… 147
第五章　生物污染物所致血液细胞学改变的检验…… 152
第一节　苯的氨基、硝基化合物所致血液细胞学改变的检验…… 152
一、血中赫恩滋小体的检验…… 152
二、血中高铁血红蛋白的检验…… 153
第二节　一氧化碳和铅所致血液细胞学改变的检验…… 156
一、血中碳氧血红蛋白的检验…… 156
二、血中游离原卟啉的检验…… 159
第六章　酶法检验…… 163
第一节　基本知识…… 163
一、酶…… 163
二、酶的命名…… 163
三、酶的分类…… 164
四、酶的抑制剂和激活剂…… 165
五、酶催化反应的特点…… 166
六、酶的活性…… 167
七、酶活性的国际单位…… 167

八、酶活性的计算…… 168
九、酶法检验方法的分类…… 169
第二节　血清磷酸酶活性的检验…… 170
一、血清碱性磷酸酶活性的检验…… 170
二、血清酸性磷酸酶活性的检验…… 174
第三节　胆碱酯酶活性及无蛋白血清中尿素的检验…… 178
一、全血胆碱酯酶活性的检验…… 178
二、血清胆碱酯酶活性的检验…… 184
三、无蛋白血清中尿素的检验…… 187
第四节　空气中有机磷农药的检验…… 191
一、空气中对硫磷（1605）的检验…… 191
二、空气中敌敌畏（DDVP）的检验…… 196
三、空气中有机磷总量（以1059计）的检验…… 198
附录有关检验操作时的注意事项及说明…… 201
参考文献…… 203

第一章 绪 论

第一节 环境检验的生化指示器系统

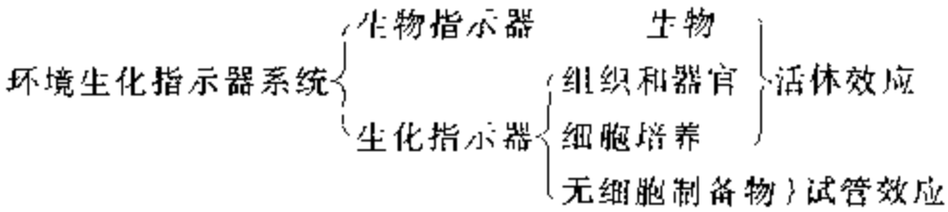
人类赖以生存的自然环境是由大气、水、土壤、生物等因素组成的。随着我国经济的高速发展和人民生活水平的不断提高，污染物排放量迅速增加，环境的组成或状态发生了变化，扰乱和破坏了生态系统及人们正常的生活条件，环境已成为一个非常复杂的体系，污染物种类繁多，各种污染因素之间存在着拮抗和加成作用，影响着环境的质量，使环境的毒性和单一毒物的毒性相比有较大的不同。单凭理化数据很难对环境质量作出准确的评价，而利用生物在该环境中的反映来确定环境的综合质量，无疑是最理想和最重要的手段。

环境生物检验是20世纪初在一些国家开展起来的，70年代以来水污染的生物检验成了活跃的研究领域。1977年以后，国外对于植物与大气污染的关系做了很多调查研究，选出了一些敏感的指示植物和抗性强的耐污染植物。我国近些年来在环境污染调查中也开展了生物检验工作，在利用植物检验大气污染方面也进行了大量研究。

利用指示生物检验环境质量的优点是指示生物直接测定环境的性质，可以直接指示出水和空气中是否存在着一些危害生命的物质。

环境生化检验也是检验环境质量的重要方法。

有用的环境生化指示物的种类和数量确实很多，为了方便起见，也是为了减少生化指示物的复杂性，可将他们分为四类，即活体生物、组织和器官、细胞培养、无细胞制备物。环境生化指示器系统如下：



前三类的意义是清楚的，是活的有机系统，任何活动可在活体受作用的情况下合理地观察到。而最后一类是无细胞制备物，它包括着从非常复杂的混合物中全部可溶性成分到最简单的单一酶溶液的每一种物质，这些物质在试管内进行测定。

一、环境生化指示器系统的第一类

指示器是一种活生物体。这种活生物体是环境生物指示器。利用指示生物进行环境检验称为环境生物检验。生物也是环境生化指示器，可观测活体效应。

环境生物检验的主要内容是大气污染的生物检验和水体污染的生物检验。对土壤污染进行生物检验也是一种可行的途径，但目前国内外所做的工作还不多。

大气污染的生物检验手段主要有以下几个方面：

（1）利用指示植物检验大气污染，主要是根据各种植物在大气污染的环境中叶片上出现的伤害症状，对大气污染作出定性和定量的判断。

（2）利用某些敏感植物，例如，地衣、苔藓等，制成大气污染植物检验器，进行定点观测。

（3）检验植物体内污染物的含量，估测大气污染状况。

（4）观察植物的生理生化反应，例如，酶系统的变化、发芽率的降低等，对大气污染的长期效应作出判断。

（5）检验树木的生长量和年轮等，估测大气污染的现状和历史。

从上述检验手段可以看出一个问题，那就是大气污染的生物检验主要是大气污染的植物检验。这是因为植物生长受到大气污染物的危害程度要比动物严重得多。人和其他动物吸入氧气进行

气体代谢，氧气在空气中所含的体积分数为21%。绿色植物吸入二氧化碳，而二氧化碳在空气中的含量却低得多，仅有0.03%，因而植物与空气中有害物质的接触更加密切，所有能够刺激叶片气孔张开从而增强植物呼吸活动的环境条件，如光照、温度、热均增大了污染物的毒害作用。相比之下，动物对大气污染的敏感性一般比植物低，而且动物的活动性大，在环境质量恶化时，会迁移回避，所以通常情况下不多用动物来做大气污染指示物。但是有一些小动物对一氧化碳的反应比人和植物灵敏得多，例如，狗的嗅觉特别灵敏，经过训练可以用来检验煤气管道漏气和一氧化碳污染源。

水体污染的生物检验手段主要有以下几个方面：

（1）利用指示生物检验。例如，根据颤蚓、蛭等大型底栖无脊椎动物和摇蚊幼虫、以及某些浮游生物在水体中的出现和消失、数量的多少等来检验水体的污染状况。利用污水生物系统检验水体污染也是一种常用的手段。

（2）利用水生生物群落结构的变化来检验。水质状况发生变化，水生生物群落结构也会发生相应的改变。在有机物污染严重，溶解氧很低的水体中，水生生物群落的优势种只能由抗低溶解氧的种类组成；未受污染的水体，水生生物群落的优势种则必然是一些清水种类。在利用指示生物和群落结构检验水体污染时，还引用了生物指数和生物种的多样性指数等数学手段来简化检验的方法。

（3）水污染的生物测试，即利用水生生物受到污染物的毒害所产生的生理机能的变化，检验水质污染的状况，这种方法可以检验水体的单因素污染。对检验复合污染也能收到良好的效果。测试方法分为静水式生物测试和流水式生物测试。

二、环境生化指示器系统的第二类

指示器是生物的组织和器官以及体液等，即生物材料。例如，鱼脑、兔肝、鼠肝和动物的肺、脾、胃、肾以及血液、尿液、指

甲、毛发等；作物的根、茎、叶和果实等，这些均是环境生化指示器。应该指出，人的血液、尿液、头发和指甲等很容易取样，又不需要牺牲任何生物，因此，人类是最终的环境生化指示器。

利用生物组织和器官可以观察生物学的影响（如生长和死亡）或生物化学的影响（如酶或化学变化）。按照环境中的毒物对机体的作用以及它在体内吸收、分布、代谢和排泄情况，生物材料检验的内容可以分为以下三类：

（1）检验生物材料中有害物质的含量。例如，尿、血和头发中铅、汞、砷等的含量。

（2）检验生物材料中有害物质在体内的代谢产物的含量。例如，苯作业工人尿中酚的含量。

（3）检验生物材料中，因有毒物质的危害引起的生物化学变化或血液细胞学的改变。例如，铅作业工人红细胞游离原卟啉含量、尿中δ-氨基乙酰丙酸含量的检验；苯作业工人血中高铁血红蛋白含量及赫恩滋（又称赫恩氏）小体的检验等。由于环境污染使生物被污染，所以生物材料的检验是环境生化检验的重要组成部分。

用植物组织进行的环境生化检验工作较少。有人观察了接触过氧乙酰硝酸酯（PAN）、臭氧和氟化物影响后被分离的燕麦细胞壁部分的纤维素的生物合成，观察到的一切情况都受抑制，抑制的原因是由于在试管中葡萄糖磷酸变位酶和纤维合成酶受PAN作用而失去活性。虽然这些特殊试验在常规应用中很不方便，但是，它说明了分离的植物组织作为环境检验的可能性，反映出几种不同的污染物质和经过一个时期的积累作用。

用动物组织做了相当大量的工作。许多人用当地鱼脑乙酰胆碱酯酶的活性测定天然水域的农药。有机磷酸盐和氨基苯甲酸化合物能抑制胆碱酯酶的活性，鱼类和这些化合物质接触会降低鱼脑胆碱酯酶的活性，当其活性水平降低到未接触这些毒物的鱼脑胆碱酯酶活性的30%～60%时，鱼就会发生死亡。一些有机磷农药对不同鱼类的鱼脑胆碱酯酶活性的影响见表1-1。

表 1-1　农药对鱼脑胆碱酯酶的影响

鱼　类	农　药	质量浓度/mg·L^{-1}	接触时间	胆碱酯酶活性（正常的）/%
鲦鱼	对硫磷	0.1	7h	85
金鱼	对硫磷	0.1	7h	75
蓝鳃鱼	对硫磷	0.1	7h	15
蓝鳃鱼	对硫磷	0.001	15d	30
蓝鳃鱼	马拉硫磷	0.001	15d	80

表 1-1 前三行的数据表明鲦鱼、金鱼和蓝鳃鱼用 0.1mg·L^{-1}的对硫磷接触 7h 胆碱酯酶的活性受到抑制，仍然存活的鱼的残留胆碱酯酶的活性分别顺次为 85%、75%和 15%。很明显，对于敏感的鱼类，如蓝鳃鱼，0.1mg·L^{-1}的对硫磷是一个有毒的剂量。

表 1-1 中后两行的数据表明蓝鳃鱼对于 0.001mg·L^{-1}的对硫磷、马拉硫磷接触 15d，对蓝鳃鱼胆碱酯酶活性的影响，仍然存活的鱼的残留胆碱酯酶的活性分别是 30%、80%。这是慢性的、亚（次）致死的接触。

从表 1-1 的数据得出的结论是：这类农药的含量低于 0.0001mg·L^{-1}时，用一种适当敏感的鱼类接触 30d 就能检验出来。使用鱼脑胆碱酯酶来检验农药已成功地在实际中应用，并且把在该水体中土生的鱼脑胆碱酯酶的活性最多降低 10%作为一种水质指标。

除鱼脑以外，其他动物的组织也已被用来或者能够用来作环境生化指示器。这方面的例子见表 1-2。

表 1-2　作为环境生化指示器的动物组织

组　织	污染物、剂量和接触时间	观察到的影响
鱼肝	6 种金属（Ag、Cd、Be、Hg、Cu、Pb），0.04～188mg·L^{-1}，4d	碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化氢酶和黄质氧化酶的活性降低
鼠肝	DDT，5～10mg·L^{-1}，28d	6 磷酸葡萄糖脱氢酶活性降低
豚鼠的肺、肝、脾和肾	NO_2，15mg·L^{-1}，70d	乳酸脱氢酶和醛缩酶的活性在大部分组织中均升高

表 1-2 中第一例，鱼类接触 6 种有毒金属 4d 后检验几种肝脏酶的活性并且和未接触这些毒性金属的鱼类进行对照比较，结果是碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化氢酶和黄质氧化酶的活性均降低，特别是过氧化氢酶在所有的这些金属试验中活性均降低。这个试验是研究确定肝脏酶的活性是否能够用来作为毒性金属对于鱼类亚（次）致死剂量接触的生化指示器。

表 1-2 中第二例，是在 28d 以内给鼠喂含有不同数量的 DDT 的食物。然后检验鼠肝的 6 磷酸葡萄糖脱氢酶的活性。检验结果可以看到仅含 5mg·L^{-1}的 DDT 就能充分引起 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性严重降低。虽然在检验慢性中毒接触毒物时，5mg·L^{-1}DDT 含量太高，但是通过这个试验可以找到评价 DDT 和其他氯代烃类的慢性中毒所产生的生化影响，肝脏酶的活性可以作为生化指示器。

表 1-2 中最后一例，是使豚鼠，即荷兰猪连续 70d 接触 15mg·L^{-1}的 NO_2，然后检验肺、肝、脾和肾组织，结果是大多数组织中乳酸脱氢酶和醛缩酶的活性均升高。这个试验说明了吸入空气中污染物的慢性中毒能够引起组织中酶的活性的变化，这种变化能够检验并且可以用来作为敏感的环境生化指示器。

用血液这种人或其他动物的体液作为环境检验生化指示器的例子也有一些，下面举几例来说明人类在环境生化检验中是怎样使用血液化学的，见表 1-3。

表 1-3　用血液作环境生化指示器

血液来源	污　染　物	观 察 到 的 影 响
人血	有机磷和氨基甲酸酯农药	血液中胆碱酯酶的活性降低
人血	铅，5~50μg·（100mL）$^{-1}$	δ-氨基乙酰丙酸脱水酶的活性降低
海鱼血	艾 氏 剂，0.001mg·L^{-1}，4d	血清中的 K^+、Na^+、Ca^{2+} 离子和胆固醇的含量升高

表 1-3 中第一例，是测量人的血浆和红血球的胆碱酯酶的活性，作为有机磷和氨基甲酸酯农药接触的环境生化指示器，以此来控制职业接触。这是个使用多年的试验，已被认为如果个体红血球的胆碱酯酶的活性低于平均人的 20%，或者血浆胆碱酯酶的活性低于平均人的 30%时，就被认为可能是接触了胆碱酯酶的抑制剂。

表 1-3 中第二例，也是用人的血液的试验，是一个很早就被用来评价长期接触铅而对人体潜在影响的试验。

由于人和铅接触使人体吸进了铅，产生了生化效应，使 δ-氨基乙酰丙酸脱水酶的活性降低，已经证实血液中的铅浓度在 100mL 血中含 5～25μg 的低含量下，δ-氨基乙酰丙酸脱水酶的活性就可以被抑制。正好，这个血铅浓度值就是没有过职业接触铅的普通人体中的血铅含量值。这不仅提供了一个很好的接触铅的生化指示器，还表明了环境中存在铅污染时，对人所产生的可以检验的生化影响，这样的生化数据是非常有用的。

表 1-3 中的最后一例，是一种海鱼，即北方河豚接触 0.001mg·L^{-1}的艾氏剂（一种氯化烃农药）而引起的血液化学的变化。受试验的海鱼血液中的 K^+、Na^+、Ca^{2+}及胆固醇的含量比没有接触艾氏剂的鱼高，这说明了艾氏剂所引起的肝损害。虽然我们对于鱼类的正常血液化学值了解得很少，但是以比较为目的，它的对照鱼群很容易确定，这样可将鱼类血液试验用于海洋环境生化检验，从而监测海洋环境。

三、环境生化指示器系统的第三类

指示器是生物的细胞培养，也可以观察生物学的影响（如生长或死亡）或生物化学的影响，例如，酶或化学变化。作为环境生化指示器的细胞培养，见表 1-4。

表 1-4　作为环境生化指示器的细胞培养

污染物	细胞培养	观察到的影响
NO_2	小鼠肝、兔子和大鼠的肺	细胞死亡或降低耗氧量
SO_2	小鼠肝、人淋巴球	生长受抑制，淋巴球受损害
臭氧	人品系 L 细胞	生长受抑制
农药	人的肝、HeLa 细胞，小鼠的肝、结缔组织细胞	生长受抑制
锌	鲦鱼的表皮细胞	降低细胞分裂指数

应该指出，细胞培养方面已做的工作很少，虽然它作为环境生化指示器对许多环境污染物表明有反应，但是它们并没有真正被当作环境生化指示器来使用，因为一般情况下，总是把它们看成是生物学上的效应。所以在环境生化检验中基本上没有涉及到这方面的内容。

四、环境生化指示器系统的第四类

指示器是无细胞制备物。无细胞制备物是在试管内进行的生物测试，与用整体生物试验相比较，试管内的生物测试特别容易做。通过检查对于某种酶的活性的影响程度就可以知道环境污染到了什么程度。例如，在农业上长期使用农药对硫磷（或马拉硫磷），这种农药是胆碱酯酶的非竞争性的抑制剂，因此以乙酰胆碱为底物与胆碱酯酶进行反应时，如果有对硫磷存在，则胆碱酯酶的活性就会下降，根据其活性下降的程度可以进行对硫磷的定量。利用这种方法已进行土壤被对硫磷污染情况的调查。

无细胞制备物的酶法检验是环境生化检验的重要组成部分。下面介绍几例酶法检验在环境生物测试、环境生化检验方面的应用。

例如，酵母酒精脱氢酶可作为水中 Ag^{+} 和 Hg^{2+} 的指示器，而且不必担心其他元素在正常浓度 $c\ (mol \cdot L^{-1})$ 下的干扰问题，见表 1-5。

表 1-5　金属离子对酵母酒精脱氢酶的影响

金属离子	抑制 50%酵活性的浓度/mol·L^{-1}
Hg^{2+}	7.5×10^{-9}
Ag^{+}	6.5×10^{-8}
Cd^{2+}	1.0×10^{-7}
Cu^{2+}	7.5×10^{-6}
Co^{2+}、Bi^{3+}	1.3×10^{-4}
Be^{2+}、Pb^{2+}、Ca^{2+}、Sr^{2+}、Ba^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}	1.3×10^{-4}不抑制

表 1-5 列出了各种金属离子抑制 50%酵母酒精脱氢酶活性的必要浓度，此浓度范围大约从 7.0×10^{-9}mol·L^{-1}的 Ag^{+} 和 Hg^{2+}，到大约 10^{-4}mol·L^{-1}的 Co^{2+}和 Bi^{3+}，灵敏度有 5 个数量级的差距。而 10^{-4}mol·L^{-1}的 Be^{2+}、Pb^{2+}、Ca^{2+}、Sr^{2+}、Ba^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}的离子完全没有抑制此酶的活性的作用。

和阳离子一样有的酶能够被阴离子抑制。例如，S^{2-} 强烈地抑制过氧化物酶，在 Cl^{-}、NO_3^{-} 和大多数其他阴离子存在时，仍能够测得 $10^{-4}\sim10^{-5}$mol·L^{-1}的 S^{2-}。$10^{-3}\sim10^{-4}$mol·L^{-1}的 CN 也能抑制过氧化物酶。透明质酸酶是对氰更敏感的指示器，能测得低至 0.1μg 的氰。F^{-}对肝脏酶有极强的抑制作用，根据抑制作用的测试方法已应用于评价复杂样品，例如血液、尿液和牙齿珐琅质中 ng 量的氟，这是因为大多数别的阴离子对肝脏酶没有抑制作用。

阳离子和阴离子酶指示器见表 1-6 和表 1-7。

表 1-6　阳离子的酶指示器

酶	阳离子	浓度范围/mol·L^{-1}
碱性磷酸酶	Be^{2+}、Bi^{2+}	$10^{-5}\sim10^{-6}$
透明质酸酶	Fe^{2+}、Cu^{2+}	$10^{-5}\sim10^{-6}$
过氧化物酶	Mn^{2+}、Co^{2+}	$10^{-4}\sim10^{-5}$
	Cu^{2+}、Fe^{2+}、Pb^{2+}	$10^{-3}\sim10^{-4}$
尿素酶	Ag^{+}、Hg^{2+}	$10^{-7}\sim10^{-8}$
	其他重金属	$10^{-6}\sim10^{-7}$

表 1-7　阴离子的酶指示器

酶	阴离子	浓度范围/mol·L^{-1}
过氧化物酶	S^{2-}	10^{-5}～10^{-3}
	CN^-	10^{-3}～10^{-2}
透明质酸酶	CN^-	10^{-3}～10^{-5}
肝酯酶	F^-	10^{-4}～10^{-8}

表 1-8 所列出的 3 种酶已建议作为水污染的环境生化指示酶。

表 1-8　水质污染的生化指示器

指示酶	污染物质
胆碱酯酶	农药
过氧化氢酶	微生物的含量
磷酸单酯酶	浮游植物和细菌

表 1-8 中第一例，由于有机磷农药是可以分解的，在固定检测站几乎不能测出有机磷农药污染的真实程度，而用胆碱酯酶就可以作为水中农药的一种生化指示器。

表 1-8 中其他两例，不是间接检验而是直接检验水对酶的作用。酶总是和生命有联系的，一个没有植物和动物生命的灭菌体系必然也就没有酶存在。那么，水中的酶活性是否是微生物的表现呢？表 1-8 中第二例是有人曾经在生活污水和农业污水中检验过过氧化氢酶的活性，证明其活性和微生物的含量有着很密切的关系，这就有可能为水体细菌污染和营养状况提供一个简单快速的生化试验。表 1-8 中第三例，是在富营养的湖水中已经检验出有游离的磷酸单酯酶活性，并且证明与浮游植物和细菌数量有关。

关于空气污染物对无细胞体系的影响也有人进行过研究，主要目的是在对关于生化影响的生理反应，而不是作为检验环境污

染的。几种空气污染物的生化指示器见表 1-9。

表 1-9　空气污染的生化指示器

污染物	指示酶
过氧乙酰硝酸酯（PAN）	异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、6 磷酸葡萄糖脱氢酶
臭氧	木瓜酶（木瓜蛋白酶）、3-磷酸甘油醛脱氢酶
二氧化硫、臭氧	乙酰胆碱酯酶

表 1-9 中每一种试验，均将含有酶的溶液用污染物熏不同的时间，检验剩余的酶的活性和对照进行比较。

表 1-9 中第一例，是因为异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶中均含有巯基官能团，而用过氧乙酰硝酸酯熏几分钟后，过氧乙酰硝酸酯氧化了这些巯基，所以在几分钟之内使这类酶失去了生物学活性。

表 1-9 中第二例，臭氧也是一种强氧化剂，可能是由于同样的原因而使木瓜酶和 3-磷酸甘油醛脱氢酶失去了活性。

表 1-9 中第三例，大气中的二氧化硫和臭氧也能抑制乙酰胆碱酯酶的活性，但是对胆碱酯酶活性的影响不像有机磷农药那样敏感。

第二节　污染物在生物体内的积累和分布

进入生物体内的环境污染物会在生物体内积累并分布到不同的部位。

一、污染物在生物体内的积累

污染物进入生物体内后可以发生积累（残留）。污染物在生物体内并且随着生物的生长、发育不断被浓缩的现象称为生物积累。污染物含量的高低对生物积累的影响不大。

任何生物在任何时候，机体内某种元素或难分解化合物含量

的高低是由摄取或吸收过程的速率及消除过程的速率来决定的，如果摄取或吸收的量大于消除的量，就会发生生物积累，这就是污染物在生物体内迁移积累的原则。

二、污染物在生物体内的分布

污染物大多相对地集中在生物的某部位，对这些部位有的没有明显的损害作用，有的则可产生损害（毒）作用或成为有毒物质的来源，构成慢性中毒的条件，并在反复接触中缓慢加重毒性。

环境污染物在生物体中各部位之间的分布是不均匀的，而且与生物的种类有关。了解生物体中各种有毒害物质含量的分布情况，对于生物保护和选择生物污染检验方法是有益的。

污染物在人和动物体内的分布

接触机体的环境污染物通过多种途径透过细胞膜（即生物膜）进入血液的过程称为污染物的吸收。

环境污染物随血液或其他体液的流动，分散到全身各组织细胞的过程称为污染物的分布。

人和动物吸收有毒害物质后，主要通过血液和淋巴分布到全身各组织，按毒物性质及进入机体各种组织类型的不同，大概有下列几种分布情况：

（1）能溶于液体的物质，如钾、钠、锂和氟、氯、溴等离子，在体内分布较均匀。

（2）水解后成为胶体的物质，如锑、钍等三价或四价阳离子，主要积存在肝或其他网状的内皮系统中。

（3）与骨骼具有亲和性的物质，如铅、钙、锶、钡等二价阳离子，在骨骼中含量较高。

（4）与脂肪组织具有亲和性的脂溶性物质，如有机氯主要积存在脂肪中。

（5）对于某种器官具有特殊亲和性的物质，如碘在甲状腺中、汞在肾脏中积存较多。

以上5种类型的分布之间又是彼此交叉的，往往是一种污染

物对某一器官有特殊的亲和性，但同时也能分布到其他器官中去，如铅除分布在骨骼中以外，肝、肾等组织器官中也有；砷主要分布在骨骼、肝、肾中，皮肤、毛发和指甲内也有分布。所以上述规律只是各有侧重。

污染物在植物体内的分布

植物从土壤中吸取的污染物，积蓄（残留）在各部位的含量是不同的。一般的分布规律是按下列顺序递减的：根＞茎＞叶＞穗＞壳＞果瓤。

在 1979 年，中国科学院林业土壤研究所利用放射性同位素 Cd^{115} 进行水稻试验时，就将整个植株分为地上和根系两大部分，根系部分占整个植株含镉量的 84.8%，地上部分包括叶、茎、穗、米的总和则只占 15.2%。

有人用多种有机农药对糙米和不同水果作过分布试验，得出的结果是：糙米中有机农药的含量是糠皮中比白米中大得多；水果中有机农药的含量是果皮中比果肉中大得多。但是随着植物种类和具体污染物的不同，也有不符合上述规律的实例。如萝卜和胡萝卜中，根部含镉量就低于叶部；西维因（即有机农药胺甲萘）在苹果中的含量则是果肉中比果皮中大。

思 考 题

1. 请列表说明环境污染生化指示器系统。

2. 环境污染物在生物体内的积累原则是什么？污染物在动、植物体内是怎样分布的？

第二章　生物样品的采集、制备、保存和预处理

第一节　生物样品的采集、制备和保存

生物体内污染物的检验步骤，一般也要经过样品的采集、制备、保存和预处理（例如，检验无机物时的消解，检验有机物时的提取和分离等）以及待检样品测定三个阶段。由于生物体内污染物的含量一般在 10^{-7}～10^{-6}数量级范围内，为了得到准确无误的检验结果，除了选择灵敏度和准确度高的方法外，还要通过用正确的采集样品和预处理方法加以保证。

一、人类血、尿、头发和其他组织样品的采集、制备和保存

血液样品的采集、抗凝剂和血液样品的保存

1. 血液样品的采集法

(1) 采集时间。血液的化学成分常受饮食的影响而稍有改变，为了使检验结果不受饮食的影响，所以应空腹采血，即禁食 6h 以上，常在早餐之前空腹采血。受环境因素引起的急性中毒例外。职业接触者应在班末采血。

(2) 采血方法。通常采集静脉血或末梢血（如耳血或指血）。常用采样器械为一次性注射器和取血三棱针。如待测物是金属化合物，采血时应用体积分数为 1%的硝酸和去离子水先后清洗皮肤表面，然后再用酒精消毒。如待测物为有机物，应注意酒精的干扰。取末梢血时不能用力挤压采血部位。采血时应防止溶血，以免影响结果（因为血液内的各种物质在血球和血浆中分布不同）。采血量静脉血不少于 5mL，末梢血根据需要。

1) 全血。将注射器或取血管采集的血液注入装有抗凝剂的试管中，上下转动颠覆，使血液与抗凝剂充分混匀。

2）血清（或血浆）。将注射器或取血管采集的血液缓慢地注入干燥的试管中（采集血浆应在试管中加抗凝剂），于室温放置15～30min，在3000r·min^{-1}下离心10～15min，分离后的血清或血浆必须立即转入另一容器。为防止溶血，转移采集在注射器中的血液时应先取下针头，采集血浆时混合血液与抗凝剂的操作不能用力过猛。

2. 抗凝剂

血液是由血浆和有形成分（血细胞）组成的，约占体重的8%～9%。全血指血浆加有形成分，血浆是指全血减去有形成分，血清是血浆减去纤维蛋白元。当血液离开血管或组织损伤时，即能发生凝固，凝固过程是一连串的生物化学反应，一般可分为3个阶段．即凝血酶元激活物质，凝血酶和纤维蛋白的生成，最后纤维蛋白收缩形成血块、分离出的浅黄色液体就是血清。

血液抽取后，加入某种物质使血液不凝，这种物质就是抗凝剂。较常用的抗凝剂有以下几种：

（1）草酸钾抗凝剂（或草酸钠、铵盐）。草酸钾能与血液中钙离子结合生成不溶性草酸钙，使血液中缺乏钙离子而使血液不凝。一般2mg草酸钾抗凝1mL血。用此抗凝剂的血液不能检验钙和钾。草酸盐使乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶和淀粉酶的活性降低，有抑制作用。

草酸钾抗凝管的制备：先配制100g·L^{-1}的草酸钾溶液，然后分装于试管内，每管0.1mL，置60℃烘箱烘干（注意不能超过80℃，以免高温使草酸钾分解失效，$K_2C_2O_4 \xrightarrow{\triangle} K_2CO_3 + CO_2\uparrow$），烘干后待冷，加软木塞即可应用。

（2）氟化钠抗凝剂。一般需氟化钠6～10mg才能抗凝1mL血。也有与草酸钾或与麝香草酚混合组成抗凝剂的，它适用于全血血糖检验，因为氟化钠能防止葡萄糖分解。它也可作为肌肝、尿酸、非蛋白氮检验的抗凝剂。氟化钠对酶有抑制作用，故不能用于淀粉酶、转氨酶、磷酸酶等的检验。

（3）肝素抗凝剂。肝素抗凝剂能抑制凝血和防止血小板的破坏，阻止血液凝固。一般 0.2mg 肝素可抗凝 1mL 全血。它常用于血气检验。

另外，还有柠檬酸钠、EDTA 也可做抗凝剂。

3. 血液样品的保存

血液样品采取后，应立即检验，如不能及时检验，应在采血 30min 内分离血清，或制成无蛋白血滤液，或加入抗凝剂后置冰箱保存，检验期限为 14d。

尿液样品的采集和保存

定性检验尿液成分时，应采集晨尿。

定量检验尿液成分时，应采集 24h 总排尿量。收集时间准确，盛于清洁广口瓶中，可置冰箱冷冻保存，也可加防腐剂，例如，加 5～10mL 甲苯或二甲苯，或加小于（1＋1000）的麝香草酚结晶少许或加 10mL 盐酸。职业接触者一般不采集 24h 尿（住院病人除外），而采集班末尿。尿样采集量不少于 50mL，不能溅出。采样后应立即测量相对密度，相对密度小于 1.010 和大于 1.035 的尿样应弃去重采，测相对密度后的尿液必须弃去。

注意，贮存于低温冷冻的样品，如血、尿、骨和其他脏器组织应先自然解冻，放置室温后，混匀取样。

血、尿待检样品的制备

环境生化检验中常用血、尿作待检样品，现将制备这些样品的方法作一简要介绍。

1. 全血的制备

环境生化检验中所用的全血是经抗凝的，即在取出人（或动物）的血液后，必须立刻与适量的抗凝剂充分混合，以免血液凝固。抗凝剂预先加入准备好要承接血液的容器中，每 1mL 血液可加下列抗凝剂之一：草酸钾或草酸钠 1～2mg，氟化钠 5～10mg，柠檬酸钠 5mg，肝素 0.01～0.2mg。

通常先将抗凝剂配成水溶液，按所取血量的需要加入试管或其他合适的容器中，转动试管或容器使其成一薄层，在 100℃以下

烘干（如用肝素抗凝时，则应在30℃以内干燥）。为了使血液注入容器后均匀的与抗凝剂接触，必须使抗凝剂能在容器底部铺成薄层，这可在烘干时转动容器来实现。取血量为数毫升时一般用试管贮血。用上述方法准备的加有抗凝剂的试管称为抗凝试管。

一般检验中常用草酸盐作抗凝剂，因为草酸盐用量少、稳定而且价廉。这种抗凝血液中的钙离子可以成为草酸钙沉淀。柠檬酸盐与钙离子生成络合物，钙离子与氟化物形成氟化钙，也同样可以除去钙离子而防止血液凝固。由于柠檬酸盐对动物体无害，故如果需要将其回注射入动物体内时，宜用柠檬酸钠抗凝。氟化物有抑制糖醇解的作用，故检验血糖时可用氟化钠抗凝。但氟化物也能抑制脲酶的活性，故检验尿素时不能用氟化钠抗凝。肝素是生理抗凝剂，比较理想，但价格较高。

2. 血浆的制备

环境生化检验所用的血浆也是抗凝血浆。制备方法是将抗凝血在离心机中离心，使血细胞下沉而得到的上清液即为血浆。在制备血浆的过程中应防止溶血，故要求采取血液时所用的注射器、针头等都要求清洁干燥，取得全血后避免剧烈振动。

3. 血清的制备

血清是指血液凝固后自行析出的液体。制备方法是采取血液时不加抗凝剂，在室温下使血液凝固，通常经3h后血块收缩析出血清，离心分离，吸取上清液即为血清。制备血清也要防止溶血，故所用设备必须干燥，且在血块收缩后及早分出血清。检验酶的活性时常用血清样品，而不用草酸盐或柠檬酸盐抗凝血浆，以防这些物质影响酶的活性。

4. 无蛋白质血液的制备

在环境生化检验中有时须避免蛋白质的干扰（蛋白质常与试剂发生浑浊或沉淀），常用沉淀蛋白质的试剂来除去血液中的蛋白质。除去血液样品中的蛋白质而保留应检验的化学成分的操作称为无蛋白质血液的制备。制备的方法很多，其原理不外乎加酸、加盐、加金属离子，使蛋白质失去水化膜，改变蛋白质两性性质和

胶体性质，使其发生沉淀。常用的蛋白质沉淀剂有钨酸、三氯乙酸和硫酸锌等。血液在加入沉淀剂后，离心或过滤所得的上清液或滤液为无蛋白质滤液。无蛋白质血滤液实际上并不是绝对无蛋白，无论用哪种方法制备的血滤液，每100mL仍含有1～5mg蛋白。在去除蛋白质时，某些成分也被吸附而沉淀，无蛋白质血滤液的制备应根据具体检验要求选择沉淀蛋白质的试剂，具体方法不再详述。

5. 尿样品的制备

一般定性检验只收集一次尿即可，如立即检验不必加防腐剂。由于一天中各次排出的尿的成分随食物、饮水和昼夜的生理变化的影响而有很大差异，因此定量检验尿的各种成分都应收集24h尿。通常在早晨一定时间排去尿（不收集），以后每次排出的尿均收集于大玻璃瓶中，一直到第二天早晨同一时间收集最后一次尿，随即混匀，用1000mL大量筒量出24h尿的总量。收集24h尿必须防腐。常用的防腐剂有浓盐酸（5mL·L⁻¹尿）或甲苯（5mL·L⁻¹尿），按估计尿量预加于准备收集尿的玻璃瓶中，并且将所收集的尿置冰箱保存。

根据检验的不同需要，有时收集早晨第一次尿，称为晨尿，此尿较浓。有时收集夜尿（晚8时至早8时）。

头发和其他组织样品的采集和保存

1. 头发

用不锈钢剪刀在枕部紧贴头皮处采集距头皮2.5cm之内的发样。采样前两个月内禁止染发和使用待测化学品的洗发护发制品。由于目前尚无适宜的清洗发样的方法可以除去发样外部吸附或沾污的物质，因此应慎用头发做生物监测的样品，在评价监测结果时，也应特别慎重。目前，发铅、发汞、发砷、发锰等作为人体受环境污染影响的监测和职业中毒诊断的参考指标已被重视。

2. 其他组织

在某些情况下，可能采集肝、肾等组织。肝、肾等组织本身

的均匀性不佳，因不能取整个组织，所以应确定统一的采样部位，采样量不得少于8g。样品应用去离子水去除表面血液后，吸去表面水量，称量后置－20℃保存。

二、动物样品的采集、制备和保存

动物的各部分组织均可以分别作为检验对象，但通常是用尿、血液、毛发和指甲等。

动物的血液

动物一般多用耳缘静脉取血，先去毛，要去净毛，不伤皮肤，用体积分数为75%的酒精擦动物耳朵，例如兔耳朵，用灯泡照射加热使其血管充血，用大头针刺破静脉放血（先从远心端刺），将血液放入抗凝杯中（每1mL血约需2mg草酸钠），边收集边摇匀，以防凝固。用干棉球压迫血管止血。然后再将动物血制成血清、血浆、无蛋白质血滤液等。

血液可检验微量金属，如汞、铅等，也可检验微量非金属，如氟等。

动物的尿液

绝大多数毒物及其代谢产物主要由肾脏排出体外，收集尿液又比较方便，而且不伤害动物，所以尿液是最常见的环境生化检验对象。收集尿液的采样瓶要用硝酸浸泡、蒸馏水洗净、烘干后使用。为了收集动物的尿液，可将动物放在代谢笼中，使动物的尿液可经下漏斗流入采样瓶中。一般晨尿浓度较高，可一次收集，也可收集2h甚至24h的尿液。

急性中毒要求取呕吐物、胃内物、洗胃液，特别是在症状发作数小时或数天后，选择尿作检样。通常在非致死情况下得到少量血样。而慢性中毒，要用尿、头发、指甲屑作检样。

头发和指甲

头发是机体的一个组成部分，检验头发中微量元素含量可反映机体某些毒物的蓄积情况。

头发作为活体样品的主要优点是：采样时受检者无痛、无创

伤；样品容易贮存和运送，不需特殊容器；样品不易变质，可长期保存，必要时可重复检验；头发很像录像带，它能反映过去某个时期微量元素吸收和代谢的历史，这是其他生物样品不能比拟的。

头发不能仅取二三根，必须取大量的头发。如果头发正常含砷量为 $6\mu g \cdot g^{-1}$，则含 $3\mu g \cdot g^{-1}$的砷至少需要 500mg 头发，这是进行定量检验的最少数量。收集大量头发的简便方法是用绳将几个部位上的头发扎成一股，大约有一根火柴的两倍粗，尽可能贴着头皮将这股头发剪下来，大约需 200mg 重的头发，适合于辐射检验，此时能粗略地确定中毒发生的时间，为此，检验人员必须检验出头发中砷含量最高的那些节段，其砷含量往往是最高正常含量的许多倍。

积蓄在头发和指甲中的污染物保留时间较长，即使动物体已经脱离污染物或停止摄入污染食品，血液和尿液中的污染物含量已经下降时，头发和指甲中仍然容易检出污染物。另外，有些污染物，如砷在头发和指甲中的含量高。采集到的头发和指甲样品，要用中性洗涤剂处理，去离子水冲洗，再用乙醚或乙醇洗涤，在室温下充分干燥后装瓶备用。

关于人发的化学组成见表 2-1。

表 2-1　人发的化学组成

成分	质量分数/$\mu g \cdot g^{-1}$	成分	质量分数/$\mu g \cdot g^{-1}$	成分	质量分数/$\mu g \cdot g^{-1}$
常量元素		微量元素		硅	19.5
钙	188～212	铁	10.46～47.53	铅	5.31～29.07
磷	650～950	锌	151～220	锡	0.283～2.117
钾	149	锑	0.2	碘	0.015
硫	3.8%(质量分数)	锶	0.05	镉	1.8～2.8
钠	860	溴	2～7	硒	0.3～13
氯	2.0%(质量分数)	铜	7.28～45.75	汞	0.276～2.17
镁	10～75	铝	5	锰	0.34～3.67

续表 2-1

成分	质量分数/μg·g^{-1}	成分	质量分数/μg·g^{-1}	成分	质量分数/μg·g^{-1}
钡	0.419～4.77	铬	0.26～1.46	其他	
砷	0.06～1.0	钼	0.21	蛋白质	80%～90%
锑	6.5	钴	0.17～0.28	糖	800
铌	2.2	银	0.049～0.550	戊糖	300
钛	0.05	锂	0.025～0.083	水	4.0%～4.1%
镍	0.27～2.07	钒	0.056～0.588	灰分	0.23%～0.9%
硼	0.297～3.23	铀	0.127		

鱼类和其他水生生物

鱼类是人们常用的食物，也是水污染进入人体的途径之一，所以鱼体中污染物的检验对人类具有重要意义。

1. 试验材料

鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼、鳖鱼、铜锈环棱螺、圆背角无齿蚌、沼虾。

2. 鱼类检验样品

捕到的鱼要按种类、大小（体重和体长）和估计的年龄分类，并尽可能快地用冰冷冻起来。如果要进行全鱼检验，应立即深度冷冻保存。如果要检验鱼的某一部分，例如，肝脏或肌肉组织，可将鱼分离的器官、组织深度冷冻保存。冻鱼的最佳温度是－30℃以下，在此温度下鱼不易变质，而且可保持鱼的鲜味。

将鱼或鱼的一部分放在捣碎机内搅拌均匀，然后将一部分匀浆称量作为检验样品。如检验有机污染物，鱼组织需研磨并用有机溶剂提取。这些提取物的处理和净化方法在有机污染物检验中讨论。如检验无机污染物，样品需灰化，并使无机残渣溶解。灰化的方法有干式灰化和湿式灰化两种，可选择其中的一种方法。在干式灰化中，样品在敞开的器皿中（一般用瓷坩埚）加热到400～600℃，用周围的空气氧化。在湿式灰化中，样品可用各种氧化体系进行处理。例如，硝酸-硫酸、硝酸-硫酸 高氯酸、硫酸-高锰酸

钾及过氧化氢等。干式灰化的优点是化学试剂用量最少，所以减少了痕量金属的试剂空白值，但在敞开器皿中灰化时，某些金属可能结合在器皿上，而且挥发性的元素，如砷、硒和汞等可能会损失掉，故样品在敞开器皿中燃烧不如在氧气燃烧瓶中进行，即将样品与五氧化二磷共贮以脱水，然后在充满氧的燃烧瓶中点火灰化。在这个闭合系统中可不损失挥发性物质，这种技术在砷、硒、铅和汞的检验中已经应用。

3. 鱼类和其他水生生物的肌肉组织样品

采集鱼类样品时，对于鱼类体重在 1kg 以下的较小型的鱼，取其体长 1/10 的背部肌肉。如果是取混合鱼样品时，则从其中最小的鱼取其全部背部肌肉量为基准，其他的鱼均称取与之相等质量的背部肌肉，然后混匀。采集其他水生生物，如贝类、甲壳类等时，均应弃去外壳，取其全部可食用部分作为样品。

鱼类样品先用自来水洗净（开膛弃去内脏），然后用蒸馏水淋洗一遍，晾至不滴水，用不锈钢刀除去鱼鳞、鱼皮、用竹片刮刀刮下背部肌肉。其他水生生物同样洗净，控干至不滴水，挖取肌肉部分，切碎，用高速组织捣碎机捣碎后，装于洗净的塑料食品袋或玻璃培养皿中，置冰箱保存备用，即为待检样品。作好采样记录。

动物组织和器官待检样品的制备

离体不久的组织在适宜的温度和 pH 值条件下，可以进行一定程度的物质代谢，因此，在生化检验中常利用离体组织制成不同的组织样品，用来研究生物化学变化。常用的组织制品有组织糜、组织匀浆、组织提取液。

1. 组织糜

将新鲜组织用剪刀迅速剪碎，再与砂及适当的缓冲液磨碎或用绞肉机绞成糜状。

2. 组织匀浆

新鲜组织称量后剪碎，加入适当的匀浆制备液，用高速组织捣碎机搅碎组织制成匀浆。如果组织量较少，可在剪碎组织后用

组织匀浆器磨成匀浆。

组织匀浆器是由一种特制的厚壁毛玻璃管及一端带有磨砂玻璃杵头的玻璃杵组成，杵头的外壁与毛玻璃管内壁应紧密配合。应用时将玻璃杵与可调节速度的电动机相连，然后将剪碎的组织与适量的匀浆制备液装入毛玻璃管中，此毛玻璃管应放于冰水浴内冷却，调节电动机，使玻璃杵插入毛玻璃管中并转动，小心将组织磨碎制成匀浆。

3. 组织提取液

将组织匀浆经过细纱布过滤的液体或经离心除沉淀后的上清液，即为组织提取液。

以下举几个例子说明这三种组织制品的制备方法：

例 1，肌肉糜的制备：取新鲜大鼠肌肉 10g，加 30mL 9g·L^{-1} 的氯化钠，放些净砂研磨成细浆。过滤后即得肌肉糜提取液。

例 2，肌肉匀浆的制备：将动物处死后，立即取下肌肉，用台秤称取质量，然后置入匀浆器中，按每 1g 肌肉加入 3mL 生理盐水制成肌肉匀浆。

例 3，肌肉提取液的制备：用重物猛击大鼠或者家兔的头部使其昏迷，剪颈放血处死后，取约 3～5g 肌肉剪成小块，置烧杯中用冰冷的蒸馏水洗 3 次，洗去肌肉中的一些可溶物质和其他还原性物质，再用冰冷的 0.1mol·L^{-1}，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤 1 次，弃去液体，将小块肌肉移入四周装有冰块的研钵内研碎，然后按 1g 肌肉加入两倍容积的冰冷的 0.1mol·L^{-1}，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，混匀，用双层纱布或少许棉花过滤，取滤液置冰浴备用。

例 4，肝匀浆的制备：将饱食的小白鼠（荷兰猪）用断头术处死，取出 4 只小白鼠的全部肝脏，放在匀浆器中，加入 2mL Krebs-Ringer 缓冲液，在冷却的条件下磨碎，再加 4mL Krebs-Ringer 缓冲液，搅匀倒入离心管中，以 200r·min^{-1} 离心 2～5min，将上清液倒入另一支试管中待用，注意匀浆应保存在冰冷的条件下。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液、Krebs-Ringer 溶液

等掺的蔗糖液（0.25mol·L⁻¹）等。

Krebs-Ringer 磷酸缓冲液的制备方法：9g·L⁻¹氯化钠溶液（0.154mol·L⁻¹）100份、11.5g·L⁻¹氯化钾溶液（0.154mol·L⁻¹）4份、12.2g·L⁻¹氯化钙溶液（0.11mol·L⁻¹）3份（5mL此溶液相当于11mL 0.1mol·L⁻¹的硝酸银溶液）、38.2g·L⁻¹硫酸镁（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）溶液（0.154mol·L⁻¹）1份、pH=7.4的0.1mol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液20份，将上述溶液混合即可。

例5，肝匀浆离心液的制备：称取0.8g新鲜鼠肝，用剪刀剪碎，放入乳钵或匀浆器中，加入2mL 150g·L⁻¹三氯乙酸，研磨成乳糜状后，移入带刻度离心管中，再用1mL 150g·L⁻¹三氯乙酸洗乳钵或匀浆器，重复两次，前后洗涤液尽可能全部放入带刻度离心管中（洗涤3次后乳钵或匀浆器中不应再留有沉淀）。

例6，心肌匀浆的制备：称取1g新鲜大白鼠心肌，立即剪碎放入匀浆器中，加9mL pH=7.4的磷酸缓冲液，匀化后，即制成100g·L⁻¹匀浆液。注意匀化时需将匀浆器置于冰浴中，以防酶失去活性。

例7，组织浸出液：将组织切碎后，用生理盐水反复洗去组织上的血液，捣碎制成匀浆，悬浮在磷酸缓冲溶液中，离心沉淀。

三、人和动物待检样品的取样

人和动物待检样品的取样如下：

（1）血液、尿液及其他液体样品必须充分混匀后，再取样。

（2）骨和脏器样品应剔除异体组织，如脂肪、结缔组织等，彻底粉碎、充分混匀后，才可称取样品。

（3）贮存于低温冷冻的样品，例如，血、尿、骨和其他脏器组织，应先自然解冻，放至室温后，重新混匀取样。

（4）烘干、粉碎、磨细或剪碎的发、骨及其他脏器组织的干样，称样前必须干燥至恒重。如被测物具有挥发性，可与称样的同时，另称样测水分。

（5）称取样品的量应保证样品的代表性，其中待测物质的浓

度或量必须满足分析方法的检测下限。

四、植物样品的采集、制备和保存

一般情况下，称取检验的样品总是少量的，而检验结果则应对大量的研究对象给予客观的检定，所以，植物样品应按一定的规则采集与制备。

植物样品的采集和保存

根据研究目的，采集样品前应进行必要的调查，在了解环境因素影响后的基础上，选择出采集样区和对照采集样区。在采集样区内再划分和固定一些有代表性和生长类型的小区，预选株数或样段的数目。

1. 采集样品的注意事项

(1) 代表性。选择一定数量的能符合大多数情况的植株为样品。采集水生植物时应考虑排放污水的影响，离开排污口适当距离。蔬菜和作物不能采集离田埂 2m 以内以及田埂边上的样品。

(2) 典型性和适时性。采样的部位要能充分反映所了解的情况，这就是典型性。而适时性是根据研究目的和环境污染物对植物的影响，须按照植株的不同部位（如根、茎、叶和果实）、发育阶段及生长情况分别进行采样。为进行比较，不能将植株的不同部位随便混放。

2. 样品的采集

(1) 准备工作。采样前应事先准备好采集工具，如小铲、枝剪、剪刀、布和塑料袋等，还有标签、记录本、样品采集登记表等物品。

(2) 样品的采集量。采集多少样品主要考虑样品经处理后是否够检验用及其代表性。一般要求至少有 20～50g 干样品，最好有 1kg 干样。如果是新鲜的样品，以质量分数为 80%～90%的水分来计算，样品要比干样量多 5～10 倍，最好 5～10kg，总之应以不少于 0.5kg 新鲜样品为原则。对水生植物、水果、蔬菜等含水量高的植物，采样量还需酌情增加。

（3）样品的采集。在已选好的样区做成样方，草本及农作物样区为 1m×1m，灌木植物为 2m×2m，乔本群落为 10m×10m。在样方区内选择优势种的植物分别采集根、茎、叶。对于农作物、蔬菜及草本植物，在各种样区内采 5～10 个样品。对于灌木和乔本群落应该按草木、灌木、乔木分层采样并编号。在采集检验样品的同时，对优势种还应采集标本以作鉴定植物的科、属之用。

植株与植株之间，植株各部位之间的各种成分的含量差别很大，需要根据研究对象在选好的样区内采集多株，且应采集不同植株的不同部位（如根、茎、叶、果实等）或采集整株，带回实验室后，再按不同部位分别保存和处理。不能采集受昆虫伤害的、发病的、机械损伤的、带有很多灰尘或土粒的以及死亡的植物样品。采集蔬菜和农作物时，多是在各采样小区内，采集分散在 5～10 个采样点的 5～10 个样品的混合样，此混合样在各采样小区内具有代表性。采样点的布置方法以梅花形五点取样，或在小区内平行前进以交互间隔方式取样，如图 2-1 和图 2-2 所示。

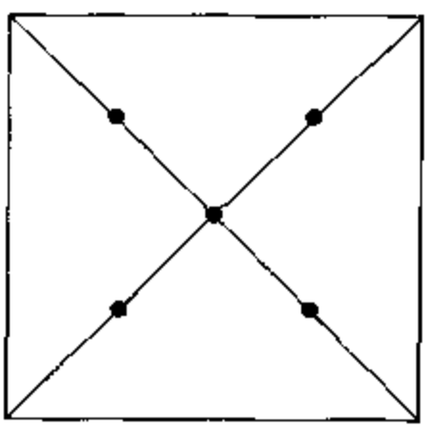


图 2-1　梅花形五点取样

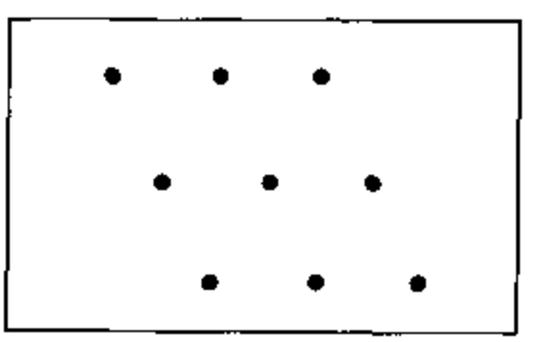


图 2-2　交互间隔取样

如果采集的样品为根部，在抖掉附着的泥土时，应尽量保持根部的完整。带回实验室后，要用清水洗净（注意不能浸泡）并用纱布擦干，不要损失根毛，尽量保持根毛完整。例如，水稻的根就须用清水将泥巴洗净，或带回实验室后立刻清洗干净并用纱布擦干；如果在高温炎热的夏天采集新鲜的蔬菜菜叶进行鲜样检验时，应考虑到高温干燥，水

分蒸发很快且量大，最好连根带泥一起挖出，或用湿布将样品包住，或装在塑料袋中不使其萎蔫；对于果树，在采样时要注意树龄、株型、长势、载果数量和果实着生部位及方位（向）。

水生植物，例如，藻类、浮萍、眼子菜等一般采集其全株，并用清水洗涤。如从污水中捞取样品，要用清水冲洗干净并去掉其他水草、小螺等杂物。

3. 样品的保存和预处理

将采集好的样品装入布口袋，并附上编写好样品号的标签两个。采集时必须做好野外调查记录和填写样品采集登记表，对一些特殊情况也应进行记录，以便查对和分析数据时参考。

采集好的样品应尽快送往实验室，运输时要注意通风干燥问题，以防样品发霉腐烂，最好是冷藏运输。检验样品用四分法或八分法选取。用新鲜样品进行检验时，应立即送往实验室，充分洗涤、捣碎处理和检验，如当天难以处理时，鲜检样品应该暂时冷藏在冷箱内，其余样品可在通风干燥处晾干，去掉灰尘、杂物、脱壳、磨碎后通过 1mm 筛孔，贮存在磨口广口玻璃瓶中备用。

植物待检样品的制备

一般将从现场采回来的还没进行检验的样品称为原始样品。应根据检验项目的要求，将各个种类的原始样品用不同的方法进行选取。如瓜果、块根、块茎等先清除污物以后，再切成 4 块或米字形块，然后，再各取 1/4 或 1/8；粮食应充分混合后平铺于木板或玻璃板上，用四分法或多点取样方法进行选样，即选取各个样品的平均样品，然后将所选取的各平均样品经过各种预处理后，即制成可供检验的样品，称为待检样品。

1. 新鲜样品的制备

检验植物中易转化或易降解的即易起变化的物质，如酚、氰、有机农药等，以及多汁的瓜果、蔬菜样品，应在新鲜状态下进行检验。制备这些样品时，先将各平均样品用清水、去离子水或二次蒸馏水洗净（受大气污染的样品还应先用洗涤剂洗），并用干净纱布轻轻擦洗，然后切碎、混匀。例如，蔬菜样品可称取 100g 放

入电动捣碎机的捣碎杯中，加同样质量的蒸馏水或去离子水，含水分多的样品，如熟透的西红柿也可以不加水，而含水少的样品可加2倍于样品的水，打碎1min左右制成均匀浆状，较硬的样品有时须打碎2min以上。含纤维较多或较硬的样品，如禾本科植物的茎杆、叶子等不能用捣碎机捣碎，可用不锈钢刀或剪刀切成小碎块或碎片，混合均匀备检验用。新鲜的待检样品按实际质量称量。

2. 烘干样品的制备

用干样进行检验的样品通常要经过以下处理：

（1）清除沾污物。样品表面沾有肥料、农药、泥土和灰尘等均降低检验结果的准确度，所以必须在烘样前擦、刷或用清水、0.1%～0.3%的去污剂和去离子水等清除样品上的沾污物，必须快速进行清洗工作，以免溶液和样品长时间接触空气而引起某些成分，如钾、钠、钙、镁等的损失。

（2）样品的烘干。如果不用鲜样进行检验，经擦净或洗净的样品，最好尽快在鼓风干燥箱或在低温真空干燥箱中烘干，以防发霉变质，并减少化学和生物的变化。烘干一般在60～70℃温度下即能除去水分，温度过高会引起汞等易挥发元素的损失。

（3）样品的研磨。为使样品容易处理及组成更加均匀，须将烘干的样品进行研磨粉碎并混合均匀，谷类的果实样品须先脱壳再进行粉碎。通常使用的磨具有石质或瓷质球磨、电动粉碎机、还有玛瑙研钵，通常要求粉碎后的粒度过1mm的筛孔，有的要求过0.25mm的筛孔，一般粉碎后通过0.35mm筛孔，也可根据检验项目的要求决定筛孔的大小。

用于检验金属元素的样品，在研磨时应注意金属器械对样品的污染问题。如检验样品中的铬、铜等含量时，应用玻璃研钵碾碎，且用尼龙筛过筛，不能用钢制粉碎机，以防有锰、镍等元素的污染。总之，在检验样品中的微量元素时，最好是使用玛瑙研钵，避免因再次受到污染引起误差。粉碎研磨好的样品贮存于聚乙烯瓶或磨口广口玻璃瓶中备用。

植物待检样品中水分含量的检验

检验结果的计算常用干样质量比较样品中某成分含量的高低，所以在制备鲜样或干样时，须同时称样检验水分含量，计算样品的干物质含量，以便换算检验结果。

常用烘干法检验植物样品的水分含量，即称取一定质量的新鲜待检样品，在100～105℃烘至恒重，用失重来计算水分含量。对于某些含有大量因加热至100～105℃条件下而分解的样品，可在真空干燥箱中用低温烘至恒重。

对于某些含水分高达质量分数为80%～95%的样品，例如，幼嫩的蔬菜和浆果，在采样后就有大量的水分被蒸发掉，这类样品不如用鲜样质量计算结果好，也可以附记水分含量作为参考。

对于已烘干的植物样品，在研磨和贮存过程中如密封不好也会吸收一些水分，须在称样前烘干除去。粉末状样品与原始样品的物理状态不同，易受高温而分解。所以根据各植物样品的特性，要严格控制温度的高低和烘干时间，一般在65℃烘干4～6h就可以使水分完全散失，取出置干燥器中冷却后，即可称其质量。

第二节　生物样品的预处理

在生物样品的检验中，根据检验项目的不同，首先要经过消解（或灰化），或提取和分离等项处理工作，然后才能进行待检组分含量的检验。

一、消解和灰化

消解法

消解法又称湿法氧化或消化法。它是将生物样品与一种或两种以上的强酸（如硫酸、硝酸、高氯酸等）共溶，将有机物分解成为二氧化碳和水除去。为加快氧化速度，常常加入过氧化氢、高锰酸钾、过硫酸钾和五氧化二钒等氧化剂和催化剂。常用的消解法有下列几种：

（1）硝酸-硫酸消解法。硝酸的氧化能力强，但沸点低，硫酸的沸点较高，将二者混合使用，既可利用硝酸的氧化能力，又可提高消解温度。两种酸的配合比可在较大的范围内变动，但以 2∶5 的配合比用的较多。

（2）硝酸-高氯酸消解法。硝酸-高氯酸系统的消解能力极强，是破坏有机物的较有效的方法。在消解过程中，硝酸与高氯酸分别被还原为氮氧化物和氯气（或氯化氢）从样品液中逸出。因为高氯酸能与有机物中羟基生成稳定的高氯酸酯，有爆炸的危险，所以操作时，应先加硝酸将醇类和酯类中的羟基氧化，冷却后，在有一定量硝酸的情况下加入高氯酸处理，就可避免爆炸。

（3）硫酸-过氧化氢消解法。在检验氮、磷、硼、砷等元素时，常用硫酸-过氧化氢消解法。一般是先加过氧化氢浸没试样，再加浓硫酸进行消解。因为生物样品中有机物的含量很高，在加热消解时，总要产生大量的泡沫，容易使被测物损失。如果在加热消解前先加些硝酸，常温下放置 24h，再加热消解，泡沫的产生就会大大减少。

灰化法

灰化法又称燃烧法或高温分解法。根据待检成分的不同要求，选用铂、石英、银、镍、铁或瓷坩埚盛放样品，将其置于高温电炉中，温度一般控制在 450～500℃就可以灰化（烧除有机物）。灰化完全后，将残渣溶解供检验用。对于易挥发的元素，如磷、砷、汞等，为避免高温灰化时所引起的损失，可用氧燃烧法进行灰化。此法是将待检样品包在无灰滤纸中，滤纸包悬挂于烧结在磨口瓶塞的铂丝钩上，瓶内事先充入氧气和溶解液，将滤纸点燃后，迅速盖严瓶塞使其燃烧灰化，所得溶液供检验用。

二、提取、分离和浓缩

检验生物样品中的有机物或农药时，首先要将待检物从样品中提取出来，为避免提取液中各组分的相互干扰，还要将不同的组分加以分离，然后才能进行检验。

提取

提取有机物的方法有以下几种：

（1）振荡提取。在切碎的样品中加入适当的溶剂，于振荡器上振荡提取，滤出溶剂后，再重复提取一次，合并提取液供分离使用。蔬菜、水果、小麦、水稻等均适用。

（2）组织捣碎。将样品适当切碎后，放入组织捣碎机中，加入适当的提取剂，快速捣碎 3～5min 后，过滤，滤渣再重复提取一次，合并提取液备用。此法效果较好，比较常用，特别是从动物组织中进行提取时很方便。

（3）索氏提取器提取。索氏提取器又称为脂肪提取器，是提取有机物的高效仪器。提取时，先将滤纸卷成直径略小于提取筒样的纸筒，一端用线扎紧，将研细的试样装入滤纸筒中，上面盖以滤纸后，放入提取筒中。在蒸馏瓶中加入适当的溶剂，连接好回流装置，加热提取。当提取筒中的溶液面超过虹吸管的上端时，提取液就自动流回蒸馏瓶中，如此反复进行。因每次提取时，试样均能与纯净的溶剂接触，所以提取效率高，且溶剂用量较少，得到的提取液的含量较高，有利于下一步的检验。但此法费时，故常作为标准法使用。

作为提取剂的物质均是有机溶剂，要根据“极性相似相溶”的原则进行选择。例如，极性弱的有机氯农药用极性弱的己烷等溶剂提取；而极性强的有机磷农药、含氧除草剂等选用二氯甲烷、氯仿、丙酮等极性强的溶剂提取。所选择溶剂的沸点一般在 45～80℃之间。沸点太低易挥发；沸点太高难以浓缩，而且会导致热稳定性差的有机物分解。除选择溶剂的沸点外，还应考虑其毒性、价格和在检验中有无干扰。

分离

利用有机溶剂提取残留在样品中有机农药时，能够将样品中脂肪、蜡质和色素一起提取出来。因此，必须将农药与杂质分离开，才能对农药进行检验。分离方法有以下几种：

（1）柱层析法。柱层析法是一种应用最普遍的提纯方法，基

本原理是先使提取液通过装有吸附剂的吸附柱，农药和杂质均被吸附在吸附剂上，然后用适当的溶剂进行淋洗。只要淋洗剂选得合适，一般均是农药先被淋洗出来，而脂肪、蜡质和色素则滞留在吸附剂上，从而达到分离的目的。分离农药时，最常用的吸附剂是在650℃下活化过的硅酸镁担体，而用乙醚-石油醚作淋洗剂。

(2)液-液萃取法。液-液萃取法是以分配定律为基础的分离方法，即用两种互不相溶的溶剂，根据农药与杂质在不同溶剂中溶解度的差别将它们分离。例如，将农药与含有杂质的已烷提取液与极性溶剂乙腈混合振荡后，极性弱的脂肪、蜡质和色素大部分留在已烷层中，经几次萃取后，就可将农药净化。

(3)磺化法。磺化法是利用脂肪、蜡质等与浓硫酸发生磺化反应的特性，在农药与杂质的提取液中加入浓硫酸时，脂肪、蜡质等与浓硫酸反应，生成极性很强的物质，从而将农药与杂质分离。

(4)低温冷冻法。不同物质在同一溶剂中的溶解度。除了与它们的本性有关外，还随温度的不同而不同。例如，在－70℃的低温下，用干冰-丙酮作致冷剂，可使生物组织中的脂肪和蜡质在丙酮中的溶解度大大降低，并以沉淀形式析出，而农药则残留在冷的丙酮中，经过滤就可将其分离。

浓缩

经提取、分离后所得的溶液，虽然是纯净的待测溶液，但因含量很低，一般还不能用于检验，通常要用蒸发或减压蒸发的方法浓缩以后，才能进行检验。

实践证明，在样品的制备、消解（或灰化）、提取、分离等步骤中，损失均是很小的，较大的损失主要发生在浓缩过程中，特别是溶剂接近蒸干时损失最大。所以在蒸发过程中，温度一般应控制在50℃以下，最高不能超过80℃。应该注意在这种温度下，不能将溶液蒸发至干涸，而是蒸发至剩几毫升时，就应该停止加热。如果进一步缩小溶液的体积，就需要用低温蒸发或在室温下

任其自然挥发。

生物样品经过以上处理后，就可以进行污染物及其代谢产物等含量的检验。检验方法是多种多样的，要根据待检物质的性质和实验室的条件进行选择。一般检验生物样品中重金属时，可用比色法、分光光度法、原子吸收光谱法或其他电化学检验法。而检验有机物时，则可用荧光光度法、气相色谱法或高效液相色谱法等。有条件也可以采用质谱法或气-质联用法。

三、适用于酶法检验的生物样品的处理

比较适用于酶法检验的物质是生物样品。动物死亡以后，他体内保存的酶，只要继续保持其可以进行作用的条件，其作用就可以继续下去。谷物的特征是即使在收获和贮藏以后，也仍然保持着生命。一般植物的种子均含有大量的酶，特别是在发芽时酶的种类和活性均会发生很大的变化。为了检验某种状态下的酶的活性或者中间代谢物质的含量，从采取生物样品到进行检验的过程必须尽量防止一切变化，在这方面采用最普遍的是冰冻法。但应注意待检物质可能在冰冻过程中不发生变化，而在融解时却可能难以避免发生变化。冻肉解冻的最佳温度是 10～15℃，这样的温度可使冻肉解冻时成分不被破坏。

生物材料或生物机体中的酶活性检验与体液中酶的活性检验不同。对于肝、肾等生物组织有两种检验方式：一是根据需要做成冰冻切块或用蜡包埋后，用组织化学方法检验组织内酶的分布。这种检验方式在本书中不使用。二是将组织直接匀浆，然后检验每克湿重样品质量中具有的酶活性。

酶法检验除了极特殊的情况以外，一般均是以溶液状态进行的。所以当检验的样品是生物材料时，例如肝、肾、肺、胃等脏器或植物种子等组织的固体形状的物质时，必须进行抽提或研磨等处理，使它们转变成液体状态。但也有另外一些情况是待检的化合物或酶，看上去虽然处于溶液状态，但它们实际上是包含在细胞里边的小颗粒中，这样就只能进行部分定量检验了；还有些

化合物或酶，它们从天然存在状态被破坏以后，往往会发生改变或失效。所以在进行酶法检验时，应根据待检物的状态，它是什么化合物、待检验的是什么样的酶，在处理待检物质的样品时所采用的方法也是不同的，应使待检物质或酶在进行检验时不发生质或量的变化。这就要充分了解待检物质或酶的性质，才能正确的处理。例如，当待检验的化合物在碱性条件下容易分解时，就绝对不应该使用碱性的溶剂进行抽提。再如，当待检验的酶在低温条件下容易失效时，就绝对不应该在冰库中处理待检物。如果不了解这些，就很可能会作出相反的处理。

在进行生物样品中酶活性检验时，遇到的问题是有蛋白酶共存。解决的办法是：如果待检的酶比其蛋白酶的热稳定性强时，就可通过选择热失活的办法来破坏蛋白酶；如果知道某种抑制剂可抑制蛋白酶时，就可以利用抑制剂来抑制蛋白酶的作用。

在检验中间代谢产物含量时，如果是对热稳定的物质，就可以用加热抽提的方法使它不受其中酶的作用；如果是对酸稳定的物质，就可以在过氯酸中进行过滤研磨；如果是易被氧化的物质，为了避免被空气中的氧所氧化，一方面在无氧条件下处理；另一方面也可以通过加入硫基乙醇以防止氧化；如果是对光敏感的物质，可以根据它对光敏感的程度而避免直射日光照射，在暗室中处理。为了使其易于溶解，一般可以使用表面活性剂，但它的残留可能影响定量检验。

所遇到的最困难的情况是待检样品中含有两种以上的待检化合物或酶，而且它们的稳定条件又不同。例如，腺苷-5′-三磷酸酯（即 ATP）和辅酶 A（即 COA—SH）稳定的 pH 值不同，前者在 pH＝9 最稳定，后者在 pH＝7 最稳定。因此，从生物样品到待检样品的制备中的各种处理均应兼顾到这一点。在这种情况下，必须从必要的阶段将待检物与它的处理物分开，然后再根据各种物质的要求加以适当的处理，制备相应的待检验的样品溶液。

辅酶 A 的化学名称是磷酸腺苷二磷酸泛酸氨基乙硫醇，此酶几乎存在于每一个活细胞里，是极重要的辅酶，与乙酰基转移有

关，它参与许多反应，其中一些适于它本身进行检验。它如果保存于冷干处避免潮湿是相当稳定的，6 个月里损失约 20%。它的巯基（—SH 基）对氧化剂（包括对碱性 pH 值条件下的 O_2）很敏感，纯辅酶 A 溶液在 1 星期内稳定，在中性溶液中稳定几天，最适宜 pH＝7。

检验酶的活性，首先应该了解影响酶活性的因素，正确处理、保存和操作，以便在较长时间内保持酶的活性稳定，不失活。影响酶活性的因素如下：

（1）温度。一般酶应在 0～4 C低温条件下使用、处理和保存。但有些酶在低温下易失活。有些酶溶液可在－20℃冻结，但不同的酶会有不同的效果。有的酶引起不可逆失活，应注意不能反复地冰冻和融化。

（2）氧。有很多酶在空气中不稳定而慢慢失活，这是因为巯基等的反应使基因受到空气中氧分子的氧化，可加入二巯基苏糖醇（DTT）、二巯基赤藓糖醇（DTE）等—SH 基化合物，常可使失活的酶复活。但当各种 -SH 基保护剂均不起保护作用时，酶必须在厌气条件下处理。

（3）pH 值缓冲溶液。大多数酶蛋白只有在某个限定的 pH 值范围内稳定，否则就失活，不同的酶有不同的 pH 值范围。缓冲溶液的种类也会影响酶的活性，例如，有些酶在磷酸缓冲溶液中冻结会失活。

（4）各种稳定剂。大多数酶即使是保存在最适宜的条件下也会逐渐失活，所以有必要采用添加底物、抑制剂、辅酶、离子和有机溶剂等试剂，以使酶稳定不失活。

（5）酶试剂的保存。如果酶试剂冰冻融解不会引起失活，就可以保存在冰冻状况，或者经冰冻干燥成粉末状况保存。在这种情况下，为较长期保存，应完全隔绝潮湿空气，因为潮湿水气多数容易导致物理变化、着色、长霉等，最终会使酶失活。

（6）操作。在了解影响酶稳定性的因素后，在进行酶法检验时，必须正确操作才能保持酶活性的稳定，不失活。

1）在调节 pH 值时，酶溶液应充分搅拌，酸或碱溶液应沿着瓶壁 1 滴 1 滴地加入，要小心仔细，千万不能在添加试剂的周围造成一个破坏性的区域，防止出现任何变性作用，否则将导致溶液中某一部分的酶失活。

2）有些酶因位于溶液的表层而引起变性，所以在溶解过程中不应剧烈摇动酶溶液，同时也应避免使用能够甩打表面层的搅拌器，这样可免泡沫的形成。

3）有机溶剂，即乙醇、丙酮、乙醚等能引起酶失活（浓度小于 3%时不失活），所以当溶液成分从含水的变成非水的过程中应特别小心。而且所用容器洗净后应置于适当温度烘干备用，绝对不能用丙酮或其他有机溶剂冲洗吹干。

（7）酶试剂的使用。在使用酶以前，应该对此酶的最适宜 pH 值、缓冲溶液、稳定性等物理化学性质有所了解。可以查阅酶手册和酶试剂等书籍和资料。

思 考 题

1. 植物样品的采集原则是什么？
2. 怎样采集发样、尿样和血样？
3. 生物样品有哪些预处理方法？
4. 影响酶活性的因素有哪些？
5. 为什么生物样品较适用于酶法检验？

第三章　生物样品中污染物残留的检验

第一节　汞的检验

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中汞的检验

双硫腙分光光度法

1. 检验意义

汞是剧毒物质。汞具有挥发性，汞蒸气可被人和动物经呼吸道进入肺部，也可经毛孔进入皮肤，汞蒸气中毒可使人易兴奋、易怒、健忘、动作震颤等。

环境中汞进入食物链后，经胃肠道进入人体，汞可在体内积蓄、逐渐富集、浓缩，长期摄入可引起慢性中毒。

汞急性中毒一般出于事故，症状是恶心、呕吐、腹泻、肾损害以至死亡。

汞慢性中毒主要损害神经系统、心脏、肾脏和胃肠道。汞慢性中毒需要一段时间的积累才显示出毒性，不像汞急性中毒那样容易被人们察觉，所以引起了世界各国的高度重视。

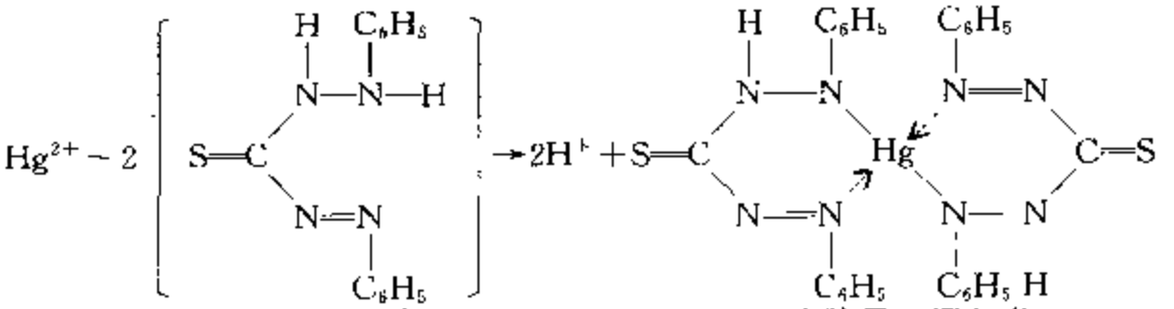
检验动、植物、水生生物等生物样品中汞的残留含量作为生物食品限量指标，以便控制进入食物链的汞对人类的毒害。

我国在食品卫生标准中规定了对汞的限量（以汞计）：粮食（成品粮）$\leqslant 0.02mg \cdot kg^{-1}$；蔬菜、水果$\leqslant 0.01mg \cdot kg^{-1}$；鱼类$\leqslant 0.3mg \cdot kg^{-1}$；肉$\leqslant 0.05mg \cdot kg^{-1}$。

2. 检验原理

样品经消解后，汞离子在酸性溶液中可与双硫腙生成橙红色络合物，溶于三氯甲烷，在三氯甲烷中呈橙黄色，其颜色深浅与汞离子浓度成正比，于波长490nm处有最大吸光度，以此定量汞。

主要反应式如下：



双硫腙，绿色　　双硫腙汞，橙红色

干扰及消除：溶液中可能存在的离子有 Ca^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Pb^{2+}、Sn^{4+}、Zn^{2+}和 Hg^{2+}。其中 Ca^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+}仅在碱性或中性溶液中与双硫腙配合。Sn^{4+}、Fe^{3+}被盐酸羟胺还原成 Sn^{2+}、Fe^{2+}，且在酸性溶液中与双硫腙生成的络合物不稳定。加入 EDTA 可掩蔽 Cu^{2+}。

3. 检验方法

A　方法要点

将生物样品用硝酸、硫酸湿法消解，在酸性溶液中汞离子与双硫腙生成橙红色络合物，溶于三氯甲烷，经脱脂棉将三氯甲烷层滤入 1.0cm 吸收池中，以三氯甲烷作参比调零，在波长 490nm 处测量吸光度。同时测量试剂空白管及各标准管的吸光度。以标准管中汞的质量为横坐标，标准管吸光度减去空白管吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。按下式计算汞的质量分数：

$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \tag{3-1}$$

式中　w——样品中汞的质量分数，$mg \cdot kg^{-1}$；

m_1——样品消解液中汞的质量，μg；

m_2——试剂空白液中汞的质量，μg；

m_3——样品质量，g。

B　试剂

（1）硝酸　$\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

（2）硫酸　$\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

（3）氨水　$\rho_{20}=0.88g \cdot mL^{-1}$。

(4) 三氯甲烷 不应含有氧化物。

(5) 溴麝香草酚蓝乙醇指示液（1g·L^{-1}）。

(6) 硫酸（1∶35） 量取5mL硫酸，缓缓倒入150mL水中，冷后加水至180mL。

(7) 硫酸（1+19） 量取5mL硫酸，缓缓倒入水中，冷后加水至100mL。

(8) 盐酸羟胺溶液（200g·L^{-1}） 吹清洁空气，除去溶液中含有的微量汞。

(9) 双硫腙-三氯甲烷溶液（0.5g·L^{-1}） 置冰箱保存，必要时用下述方法纯化。

称取0.5g研细的双硫腙，溶于50mL三氯甲烷中，如不全溶，可用滤纸过滤于250mL分液漏斗中，用（1+99）氨水提取3次，每次100mL，将提取液用棉花过滤至500mL分液漏斗中，用（1+1）盐酸调至酸性，将沉淀出的双硫腙用三氯甲烷提取2～3次，每次20mL，合并三氯甲烷层，用等量水洗涤2次，弃去洗涤液，在50℃水浴上蒸去三氯甲烷。精制的双硫腙置硫酸干燥器中，干燥备用，或将沉淀出的双硫腙用200mL、200mL、100mL三氯甲烷提取3次，合并三氯甲烷层为双硫腙溶液。

(10) 双硫腙应用液 吸取1.0mL双硫腙溶液，加三氯甲烷至100mL，混匀。用1.0cm吸收池，以三氯甲烷作参比，于波长510nm处测吸光度，用下式算出配制100mL双硫腙应用液（70%透光率）所需双硫腙溶液的mL数（V）。

$$V = \frac{10(2 - \lg 70)}{A} - \frac{1.55}{A}$$

式中 A——吸光度。

(11) 汞标准贮备溶液 准确称取0.1354g经干燥过的二氯化汞，加（1+35）硫酸使其溶解后，移入100mL容量瓶中，并稀释至刻度，此溶液每1mL含1.0mg汞。

(12) 汞标准应用液 吸取1.0mL汞标准溶液，置于100mL容量瓶中，加（1+35）硫酸稀释至刻度，此溶液每1mL含10.0μg

汞。再吸取此液 5.0mL 于 50mL 容量瓶中，加（1＋35）硫酸稀释至刻度，此溶液每 1mL 含 1.0μg 汞。

C 仪器

（1）消解装置。

（2）可见分光光度计。

D 测定步骤

（1）样品消解。

1）粮食或水分少的样品。称取 20.00g 样品，置于消解装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及 80mL 硝酸、15mL 硫酸，转动锥形瓶，防止局部炭化。装上冷凝管后，低温加热，待开始发泡即停止加热，发泡停止后加热回流 2h。如加热过程中溶液变棕色，再加 5mL 硝酸，继续回流 2h，放冷，用适量水洗涤冷凝管，洗液并入消解液中，取下锥形瓶，加水至总体积为 150mL。按同一方法做试剂空白液。

2）蔬菜、水果、薯类、豆制品。豆制品直接取样，其他样品取可食部分，洗净、晾干。将样品置于消解装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及 45mL 硝酸、15mL 硫酸，转动锥形瓶，防止局部炭化。装上冷凝管后，以下按 1）自“低温加热”起依法操作。

3）肉、蛋、水产品。称取 20.00g 捣碎混匀样品，置于消解装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及 45mL 硝酸、15mL 硫酸，装上冷凝管后，以下按 1）自“低温加热”起依法操作。

4）牛乳。称取 50.00g 牛乳、酸牛乳，置于消解装置锥形瓶中，加玻璃珠数粒及 45mL 硝酸，15mL 硫酸，装上冷凝管，以下按 1）自“低温加热”起依法操作。

（2）样品测定。

1）取消解液全量，加 20mL 水，在电炉上煮沸 10min，除去二氧化氮等，冷却。

2）于样品消解液及试剂空白液中各加 50g·L^{-1}高锰酸钾溶液至溶液呈紫色，然后再加 200g·L^{-1}盐酸羟胺溶液使紫色褪去，加 2 滴溴麝香草酚蓝-乙醇指示液，用氨水调节 pH 值为 1～2，使

橙红色变为橙黄色。定量转移至125mL分液漏斗中。

3）吸取0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL汞标准应用液（相当于0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0μg汞），分别置于125mL分液漏斗中，加10mL（1+19）硫酸，再加水至40mL，混匀。再加1mL 200g·L^{-1}盐酸羟胺溶液，放置20min，并时时振摇。

4）于样品消解液、试剂空白液及标准液振摇放冷后的分液漏斗中加5.0mL双硫腙应用液，剧烈振摇2min，静置分层后，经脱脂棉将三氯甲烷层滤入1.0cm吸收池中，以三氯甲烷作参比测定吸光度。

4. 注意事项

（1）样品消解必须完全，否则残存的有机物会与汞结合，妨碍双硫腙提取。

（2）加硝酸和硫酸消解前，应将样品用水冷却，以防止甲基汞挥发。

（3）消解后的样品如不及时测定，可暂时不加盐酸羟胺，以防止汞吸附在器皿上。一旦还原应立即测定。

（4）汞是非常容易挥发的金属，在样品消解过程中，必须保持氧化状态，也就是要加入过量的硝酸，以防损失。

（5）本法的最低检测限为25μg·kg^{-1}。在本法消解条件下测得的结果是无机汞和有机汞的总量。

（6）因为消解时留在消解液中的氮氧化合物影响测定，所以在取样品消解液全量进行测定时，需加入20mL蒸馏水并煮沸10min，将氮氧化合物除去。

二、尿中汞的检验

碱性氯化亚锡还原-冷原子吸收光谱法

1. 检验意义

汞急性中毒时可引起尿中汞含量升高，检验尿中汞的含量可反映机体接触汞的情况，对判断汞中毒有重要意义。另外此项检

验也是观察汞中毒疗效的一项重要指标。目前规定尿中汞的正常值为 0.05mg·L^{-1}。

2. 检验原理

尿中的无机汞和有机汞在镉离子的存在下，于 pH=14 的强碱条件下，用氯化亚锡将汞离子还原成自由态元素汞，即汞原子，然后以空气作载气，将汞蒸气送至测汞仪的检测管中，加入磷酸三丁酯防止通气时产生气泡，测定对汞空心阴极灯所发射的汞的特征谱线 253.7nm 的吸光度，定量。

冷原子吸收光谱法的仪器工作原理属于无火焰原子吸收效应，汞蒸气原子对波长 253.7nm 的紫外光具有强吸收，吸光度与汞蒸气原子浓度的关系符合朗伯-比尔定律，测定吸光度以此定量汞。主要反应式如下：

$$Hg^{2+} + HSnO_2^- + 3OH^- + H_2O \longrightarrow Hg + Sn(OH)_6^{2-}$$

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：检查测汞仪与汞蒸气发生瓶衔接部位是否漏气，按说明书要求调整好仪器。

此法首先配制汞标准系列，以汞质量为横坐标，以 2～6 号管吸光度减去 1 号管吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后将测定相对密度后的尿样，经在氢氧化钠溶液中，用稳定剂 DL-半胱氨酸稳定无机汞不致因吸附或挥发损失，稳定有机汞不致分解后，按照绘制标准曲线的操作步骤测定尿样吸光度。由测得的吸光度减去 0 号管的吸光度，从标准曲线上查得样品中汞的质量。按下式计算尿中总汞的质量浓度：

$$\rho = \frac{m \times 1000}{V} k \qquad (3\text{-}2)$$

式中 ρ——尿中总汞的质量浓度，μg·L^{-1}；

m——从标准曲线上查得的尿样中汞的质量，μg；

V——测定时所取尿样体积，mL；

1000——将毫升换算为升的换算系数；

k——尿样换算成标准相对密度（1.020）下的浓度校正系数。$k=\frac{1.020-1.000}{\text{实测相对密度}-1.000}$

B 试剂

（1）盐酸 $\rho_{20}=1.19g\cdot mL^{-1}$。

（2）硝酸 $\rho_{20}=1.42g\cdot mL^{-1}$。

（3）氢氧化钠 优级纯。

（4）磷酸三丁酯（抗泡剂）。

（5）氢氧化钠溶液（$500g\cdot L^{-1}$）。

（6）DL-半胱氨酸溶液（$10g\cdot L^{-1}$） 称取 1g DL-半胱氨酸，加 5mL 水，1mL 盐酸（$\rho_{20}=1.19g\cdot mL^{-1}$），溶解后用水稀释至 100mL。

（7）氯化亚锡 硫酸镉试剂。

1）甲液。溶解 50g 氯化亚锡（$SnCl_2\cdot H_2O$）于 15mL 盐酸（$\rho_{20}=1.19g\cdot mL^{-1}$）中，加热助溶，用水稀释至 50mL，加入数粒锡粒，置 4℃冰箱保存。

2）乙液。溶解 5g 硫酸镉于 50mL 水中。

3）临用前将甲、乙两液等体积混合。

（8）重铬酸钾溶液（$0.5g\cdot L^{-1}$） 溶解 0.5g 重铬酸钾于 50mL 硝酸（$\rho_{20}=1.42g\cdot mL^{-1}$）中，用水稀释至 1000mL（汞保存液）。

（9）汞标准贮备液 称取 0.1354g 二氯化汞，溶于 $0.5g\cdot L^{-1}$ 重铬酸钾溶液，在容量瓶中稀释至 1000mL，此溶液每 1mL 含 100μg Hg^{2+}。

（10）汞标准应用液 用 $0.5g\cdot L^{-1}$ 重铬酸钾溶液将汞标准贮备溶液稀释成为每 1mL 含 0.5μg Hg^{2-}，现用现配。

（11）基体尿液 用两个正常人尿样（浓、稀）调节成相对密度为 1.015±0.002。

C 仪器

（1）测汞仪。

（2）汞蒸气发生瓶。

（3）聚乙烯塑料瓶　100mL，采尿样用。

（4）具塞试管　10mL。

（5）尿相对密度计。

玻璃仪器和塑料器皿均用（1+1）硝酸浸泡过夜，冲洗干净，晾干后备用。

D　测定步骤

（1）采样、运输和保存。用聚乙烯塑料瓶收集一次尿样，尽快测量尿相对密度后，加入氢氧化钠，使其浓度达 40g·L^{-1}尿样。置 4℃冰箱中可保存两周。尿样在检验前要彻底摇匀。

（2）样品处理。吸取 5.0mL 尿样于 10mL 具塞试管中，加入 5mL 水，2mL 500g·L^{-1}氢氧化钠溶液，0.5mL 10g·L^{-1}DL-半胱氨酸溶液，混匀。

（3）标准曲线的绘制。

1）取 7 个具塞试管，按表 3-1 配制标准系列。

表 3-1　汞标准系列的配制

管号	汞标准应用液量/mL	基体尿液/mL	水/mL	氢氧化钠溶液/mL	DL 半胱氨酸溶液/mL	汞质量/μg
0	0	0	10.0	2	0.5	0
1	0	5.0	5.0	2	0.5	0
2	0.1	5.0	4.9	2	0.5	0.05
3	0.2	5.0	4.8	2	0.5	0.10
4	0.3	5.0	4.7	2	0.5	0.15
5	0.4	5.0	4.6	2	0.5	0.20
6	0.5	5.0	4.5	2	0.5	0.25

2）将配制好的标准系列分别倒入汞蒸气发生瓶中，加 1 滴磷酸三丁酯，1mL 氯化亚锡-硫酸镉试剂，立即盖紧发生瓶瓶塞，接

通抽气路，读取最大吸光度。待指针回零后再测定下一个样品。

（4）样品测定。将处理后的样品，按（3）中 2）的操作步骤测吸光度。

4. 注意事项

（1）本方法适用正常人和接触汞蒸气及无机汞和有机汞的人尿中总汞的测定。最低检测限为 0.5μg·L^{-1}。

（2）接触者尿样采集时间不限。采样时要脱离现场环境，换下工作服，洗手，以防污染。

（3）温度对此法测汞有明显的影响，被测溶液的温度由 15℃升高到 40℃时，测定结果增加 1 倍。所以，标准与样品必须控制在同一温度下测定。

（4）尿中大量的有机物质与反应时生成的氢氧化物产生共沉淀，使反应溶液变稠，影响了汞蒸气的析出速度。所以，必须用基体尿液代替蒸馏水来配制标准系列。

酸性氯化亚锡还原-冷原子吸收光谱法

1. 检验意义

同“碱性氯化亚锡还原-冷原子吸收光谱法”检验尿中汞含量。

2. 检验原理

尿样用硫酸、高锰酸钾于 50℃消解，破坏尿中有机物质，使结合态的汞转变为汞离子，用氯化亚锡将汞离子还原成元素态汞，然后被空气流送入测汞仪的检测管内测量吸光度，以此定量尿中的汞。主要反应式如下：

$$5Hg + 2MnO_4^- + 16H^+ \longrightarrow 5Hg^{2+} + Mn^{2+} + 8H_2O$$

$$Hg^{2+} + Sn^{2+} \longrightarrow Hg + Sn^{4+}$$

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：检查测汞仪与汞蒸气发生瓶衔接部位是否漏气，按说明书要求调整好仪器。

此法首先配制汞标准系列，以各系列中汞质量为横坐标，以测得的吸光度减去空白管吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后将处理好的尿样，按绘制标准曲线的操作步骤测定吸光度，由尿样管吸光度减去空白管的吸光度，从标准曲线查得样品管中汞的质量。按下式计算汞的质量浓度：

$$\rho = \frac{m}{V}k \tag{3-3}$$

式中 ρ——尿中总汞的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m——从标准曲线查得样品管中汞的质量，μg；

V——测定时所取尿样体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 硫酸 $\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

(2) 硝酸 $\rho_{20}=1.42g \cdot mL^{-1}$。

(3) 高锰酸钾溶液 ($50g \cdot L^{-1}$)。

(4) 盐酸羟胺溶液 ($200g \cdot L^{-1}$)。

(5) 酸性氯化亚锡溶液 ($200g \cdot L^{-1}$) 临用前用 (1+99) 硫酸溶液配制。

(6) 汞保存液 称取 0.1g 重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$)，溶于 (11.5+95) 硝酸中。

(7) 汞标准贮备液 称取 0.1354g 氯化汞 ($HgCl_2$) 溶于 100mL 汞保存液中，此溶液每 1mL 含 $1mg\ Hg^{2+}$。

(8) 汞标准应用液 用汞保存液将汞标准贮备液稀释成每 1mL 含 $0.2\mu g\ Hg^{2+}$ 的溶液，置冰箱内可保存 1 个月。

C 仪器

同“碱性氯化亚锡还原-冷原子吸收光谱法”。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用聚乙烯瓶收集 1 次尿样，当天测量相对密度后检验。

(2) 样品处理：

1) 尿样振摇均匀后，取 2.5mL，加至大型气泡吸收管中。

2) 加入 2mL $50g \cdot L^{-1}$ 高锰酸钾溶液，加 1mL 硫酸 ($\rho_{20}=$

1.84g·mL^{-1}）混匀，放置5min，置于45～50℃水浴或恒温箱中保温2h；取出，振摇下滴加200g·L^{-1}盐酸羟胺溶液至褪色，敞口放置20min。

（3）标准曲线的绘制。

1）取4个大型气泡吸收管，按表3-2配制标准系列。

表3-2 汞标准系列的配制

管 号	汞标准应用液量/mL	水/mL	汞 质 量/μg
0	0	2.5	0
1	0.5	2.0	1.0
2	1.0	1.5	2.0
3	1.5	1.0	3.0

2）按（2）中2）操作。

3）将各管依次连接到测汞仪上，用滴管迅速加入1mL 200g·L^{-1}酸性氯化亚锡溶液，立即连通抽气路，读取最大吸光度。待指针回零后，再进行下一管样品测定。

（4）样品测定。将按照（2）中2）处理好的尿样按（3）中3）测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触汞蒸气及无机汞和有机汞的人尿中总汞的测定。最低检测限为0.0008mg·L^{-1}。

（2）为使气路处于还原气氛，可在反应瓶内加入2mL 200g·L^{-1}酸性氯化亚锡溶液和适量的蒸馏水，抽气5min净化气路系统。

（3）干燥气体用的氯化钙粒度应均匀，吸湿后应及时更换。

（4）当尿样消耗完高锰酸钾时，必须及时补加以维持氧化状态，或取较少尿样测定。

（5）收集尿样前3d受检者不能服用维生素U，否则会使测得

结果偏低。

（6）苯、丙酮等有机溶剂吸收波长 253.7nm 的紫外光，干扰测定。

（7）标准曲线需要每月检查其可靠性。

（8）如遇到尿样中汞含量高，吸光度超出线性范围时，可重测一份尿样，在过剩高锰酸钾被羟胺还原后，加水稀释到 10mL，取出一部分测定。计算时乘以稀释倍数。

思 考 题

1. 用双硫腙分光光度法检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中汞含量时，为什么样品消解必须完全？为什么在消解过程中必须保持氧化状态？

2. 用双硫腙分光光度法检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中汞含量时，为什么样品全消解液需要加水煮沸 10min？为什么要在样品消解液中加入盐酸羟胺？

3. 用碱性氯化亚锡还原-冷原子吸收光谱法检验尿中汞含量时，为什么处理尿样要加入稳定剂 DL-半胱氨酸？此项检验有什么意义？

4. 基体尿液怎样调配？

5. 怎样计算尿样换算成标准相对密度（1.020）下的浓度校正系数 k？

6. 用酸性氯化亚锡还原-冷原子吸收光谱法检验尿中汞含量时，怎样使气路处于氧化气氛？此法尿样采用什么方法进行消解？

7. 检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中汞含量有什么意义？

第二节 铅的检验

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铅的检验

火焰原子吸收光谱法

1. 检验意义

铅和其化合物主要以粉尘、烟或蒸气的形式，经呼吸道进入人和动物体中。环境中的铅进入食物链后，经胃肠道进入人体并

在体内积累、富集达一定量造成铅中毒。

铅中毒主要损害神经系统、造血器官和肾脏，出现口腔金属味、齿龈铅线、肾损伤、胃肠道疾病、神经衰弱，骨骼变化、肌肉酸痛、贫血等，严重时休克，甚至死亡。

检验动、植物、水生生物等生物样品中铅的残留含量作为生物食品限量指标，可控制进入食物链的铅对人类的毒害。

我国食品卫生标准中规定了对铅的限量(以铅计)：粮食≤0.4 $mg \cdot kg^{-1}$；蔬菜、水果≤0.2$mg \cdot kg^{-1}$；鱼、虾≤0.5$mg \cdot kg^{-1}$；肉类≤0.5$mg \cdot kg^{-1}$。

2. 检验原理

样品经处理后，铅离子在一定pH值条件下(用酸碱指示剂溴百里酚蓝指示酸度，其变色范围pH为6.2～7.6，酸性为黄色，碱性为蓝色，用氨水调节，由黄色变为蓝色）与二乙基二硫代氨基甲酸钠（DDTC）形成络合物，经4-甲基戊酮-2（MIBK）（又名甲基异丁酮）萃取分离。加入柠檬酸铵可掩蔽碱金属及铁、铝等金属离子，防止其水解。加入盐析剂硫酸铵可促进萃取快速分层，导入原子吸收光谱仪中，经火焰原子化后，吸收光源发射的波长283.3nm共振线，其吸光度与铅含量成正比，与标准系列比较来定量铅。主要反应式如下：

$$Pb^{2+} + 2NaSCSN(C_2H_5)_2 \longrightarrow$$

二乙基二硫代氨基甲酸钠

$$Pb[NaSCSN(C_2H_5)_2]_2 + 2Na^{+}$$

二乙基二硫代氨基甲酸铅

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：铅空心阴极灯电流，8mA；共振线283.3nm；光谱通带0.4nm；空气-乙炔焰，空气流量8$L \cdot min^{-1}$；燃烧器高度6mm。参照这些条件将仪器调节到最佳测定状态。

此法是络合萃取-原子吸收光谱法。生物样品中铅的含量很低，共存的无机盐类如氯化钠等，干扰铅的测定，用二乙基二硫代氨基

甲酸钠（DDTC）与二价铅离子生成络合物后，再用 4 甲基戊酮-2（MIBK）萃取，即可与干扰离子分离，并达到浓缩的目的。然后取萃取液用原子吸收光谱法测定吸光度，用标准曲线法定量。按下式计算铅的质量浓度（或用质量分数 w 表示，单位为 $mg \cdot kg^{-1}$）：

$$\rho \text{ 或 } w = \frac{m_1 - m_2}{m_3(V_2/V_1)} \tag{3-4}$$

式中 ρ ——样品中铅的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m_1——测定用样品液中铅的质量，μg；

m_2——试剂空白液中铅的质量，μg；

m_3——样品质量或体积，g 或 mL；

V_1——样品处理液的总体积，mL；

V_2——测定用样品处理液的总体积，mL。

B 试剂

（1）硝酸-高氯酸（1＋4）。

（2）氨水（1＋1）。

（3）4-甲基戊酮-2（MIBK），又名甲基异丁酮。

（4）溴百里酚蓝指示液（$1g \cdot L^{-1}$）。

（5）硫酸铵溶液（$300g \cdot L^{-1}$） 称取 30g 硫酸铵〔$(NH_4)_2SO_4$〕，用水溶解并加水至 100mL。

（6）磷酸（1＋10）。

（7）柠檬酸铵溶液（$250g \cdot L^{-1}$） 称取 25g 柠檬酸铵，用水溶解并加水至 100mL。

（8）盐酸（1＋11）。

（9）二乙基二硫代氨基甲酸钠（DDTC）溶液（$50g \cdot L^{-1}$） 称取 5g 二乙基二硫代氨基甲酸钠，用水溶解并加水至 100mL。

（10）铅标准贮备溶液 准确称取 1.000g 金属铅（99.99%），分次加少量（1＋1）硝酸，加热溶解，总量不超过 37mL，移入 100mL 容量瓶，加水至刻度，混匀。此溶液 1mL 含 1.0mg 铅。

（11）铅标准应用溶液 吸取铅标准贮备溶液 1.0mL 于 100mL 容量瓶中，加 $0.5mol \cdot L^{-1}$ 硝酸或 $1mol \cdot L^{-1}$ 硝酸至刻度，

混匀。此溶液每 1mL 含 10μg 铅。

C 仪器

(1) 原子吸收分光光度计，具火焰原子化器。

(2) 高温恒温电炉。

(3) 干燥恒温箱。

(4) 瓷坩埚。

(5) 可调式电热板。

(6) 压力消解器、压力消解罐或压力消解弹。

D 测定步骤

(1) 样品预处理。

1) 谷类。去除其中杂物及尘土，必要时除去外壳，碾碎，过 0.589mm 筛，混匀。称取 5.00～10.00g 样品置于 50mL 瓷坩埚中，低温炭化，然后移入高温恒温电炉中，500℃以下灰化 1.5h 后，取出坩埚，放冷后再加少量混合酸，低温加热，不要干涸，必要时再加少许混合酸，如此反复处理，直至残渣中无炭粒。待坩埚稍冷，加 10mL (1+11) 盐酸，溶解残渣并移入 50mL 容量瓶中，再用水反复洗涤坩埚，洗液并入容量瓶中，并稀释至刻度，混匀备用。

取与样品相同量的混合酸和 (1+1) 盐酸，按相同操作方法作试剂空白液。

2) 蔬菜、瓜果及豆类。取可食部分洗净晾干，充分切碎混匀。称取 10.00～20.00g 样品置于瓷坩埚中，加 1mL (1+10) 磷酸，低温炭化，以下按 1) 自“然后移入高温恒温电炉中”起依法操作。

3) 禽、蛋、水产品及乳制品。取可食部分充分混匀。称取 5.00～10.00g 样品置于瓷坩埚中，低温炭化，以下按 1) 自“然后移入高温恒温电炉中”起依法操作。

乳类经混匀后，量取 50mL，置于瓷坩埚中，加 (1+10) 磷酸，在水浴上蒸干，再用低温炭化，以下按 1) 自“然后移入高温恒温电炉中”起依法操作。

(2) 萃取分离。视样品情况，吸取 25～50mL 上述制备的样液

及试剂空白液，分别置于125mL分液漏斗中，补加水至60mL。加2mL 250g·L^{-}柠檬酸铵溶液，3～5 lg·L^{-1}滴溴百里酚蓝指示液，用(1+1)氨水调pH值至溶液由黄变蓝，加10mL 300g·L^{-1}硫酸铵溶液，10mL DDTC溶液，摇匀，放置5min左右，加入10.0mL MIBK，剧烈振摇提取1min，静置分层后，弃去水层，将MIBK层放入10mL具塞刻度管中，待测。

分别吸取铅标准应用液0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00mL(相当0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0μg铅)于125mL分液漏斗中，与样品同样操作。

(3) 样品测定。萃取液进样，仪器条件中的乙炔气流量可适当减小，测定吸光度。

4. 注意事项

(1) 本法的最低检测限为0.1mg·kg^{-1}。

(2) 所使用的玻璃仪器均需以硝酸(1+1)浸泡过夜，用蒸馏水反复冲洗，最后用去离子水冲洗干净。

(3) 二乙基二硫代氨基甲酸钠在酸性介质中不稳定，需用氨水调节使溴百里酚蓝由黄色变为蓝色后添加，且尽快用4-甲基戊酮-2萃取。

双硫腙分光光度法

1. 检验意义

检验意义同火焰原子吸收光谱法。

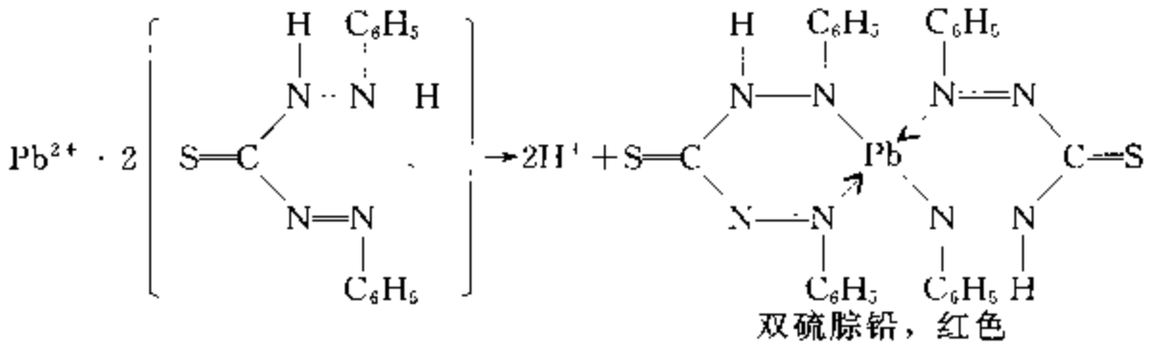
2. 检验原理

样品经消解后，在pH=8.5～9.0时，铅离子与双硫腙反应生成红色络合物，溶于三氯甲烷，其颜色深浅与铅离子浓度成正比。在波长510nm处测定吸光度，与标准系列比较来定量铅。

干扰及消除：溶液中可能共存的干扰离子有Fe^{3-}、Sn^{2+}、Cd^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}等，这些离子均能与双硫腙反应生成有色化合物，但加入掩蔽剂柠檬酸铵和氰化钾后，即能消除干扰。另外，加入柠檬酸铵也能防止这些离子在碱性溶液中生成沉淀。

特别指出的是，Fe^{3+}在加入氰化物的碱性溶液中能生成高铁

氰化物，可以氧化双硫腙，因此需加入盐酸羟胺将 Fe^{3+} 还原成为 Fe^{2-}。主要反应式如下：



双硫腙铅，红色

3. 检验方法

A 方法要点

经消解处理后的样品消解液、试剂空白液和铅标准应用液，在盐酸羟胺溶液、氰化钾溶液存在下，用氨水调节使酚红指示液（变色范围 pH＝6.4～8.0，酸性为黄色，碱性为红色）由黄色变为红色，达到 pH＝8.5～9.0，铅离子与双硫腙生成红色络合物，被三氯甲烷萃取，三氯甲烷层经脱脂棉滤入 1.0cm 吸收池中，以三氯甲烷作参比调零，在波长 510nm 处测定吸光度。以标准管中铅的质量浓度为横坐标，各管吸光度减去零管吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。按下式计算铅的质量浓度（或质量分数 w，单位为 $mg \cdot kg^{-1}$）：

$$\rho \text{ 或 } w = \frac{m_4 - m_5}{m_6(V_4/V_3)} \qquad (3\text{-}5)$$

式中 ρ——样品中铅的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m_4——测定用样品消解液中铅的质量，μg；

m_5——试剂空白液中铅的质量，μg；

m_6——样品质量或体积，g 或 mL；

V_3——样品消解液的总体积，mL；

V_4——测定用样品消解液体积，mL。

B 试剂

（1）氨水（1＋1）。

（2）盐酸（1＋1） 量取 100mL 盐酸，加入 100mL 水中。

（3）酚红指示液（1g·L^{-1}） 称取0.10g酚红，用少量多次乙醇溶解后移入100mL容量瓶中并稀释至刻度。

（4）盐酸羟胺溶液（200g·L^{-1}） 称取20g盐酸羟胺，加水溶解至50mL，加2滴酚红指示液，加（1+1）氨水调pH值至8.5～9.0（由黄变红，再多加2滴），用双硫腙-三氯甲烷溶液提取至三氯甲烷层绿色不变为止，再用三氯甲烷洗2次，弃去三氯甲烷层，水层加（1+1）盐酸呈酸性，加水至100mL。

（5）柠檬酸铵溶液（200g·L^{-1}） 称取50g柠檬酸铵，溶于100mL水中，加2滴酚红指示液，加（1+1）氨水调pH值至8.5～9.0，用双硫腙-三氯甲烷提取数次，每次10～20mL，至三氯甲烷层绿色不变为止，弃去三氯甲烷层，再用三氯甲烷洗2次，每次5mL，弃去三氯甲烷层，加水稀释至250mL。

（6）氰化钾溶液（100g·L^{-1}） 称取10.0g氰化钾，用水溶解后稀释至100mL。

（7）三氯甲烷 不应含氧化物。

1）检验方法。量取10mL三氯甲烷，加25mL新煮沸过的水，振摇3min，静置分层后，取10mL水液，加数滴150g·L^{-1}碘化钾溶液及5g·L^{-1}淀粉指示液，振摇后应不显蓝色。

2）处理方法。于三氯甲烷中加入1/10～1/20体积的200g·L^{-1}硫代硫酸钠溶液洗涤，再用水洗后，加入少量无水氯化钙脱水后进行蒸馏，弃去最初及最后的1/10馏出液，收集中间馏出液备用。

（8）淀粉指示液（5g·L^{-1}） 称取0.5g可溶性淀粉，加5mL水搅匀后，慢慢倒入100mL沸水中，随倒随搅拌，煮沸，放冷备用。临用时配制。

（9）硝酸（1+99） 量取1mL硝酸，加入99mL水中。

（10）双硫腙-三氯甲烷溶液（0.5g·L^{-1}） 配制方法同第一节汞的检验。

（11）双硫腙应用液 配制方法同第一节汞的检验。

（12）硝酸-硫酸混合液（4+1）。

（13）铅标准贮备溶液　准确称取0.1598g硝酸铅，加10mL（1+99）硝酸，全部溶解后，移入100mL容量瓶中，加水稀释至刻度。此溶液每1mL含1.0mg铅。

（14）铅标准应用液　吸取1.0mL铅标准贮备溶液，置于100mL容量瓶中，加水稀释至刻度。此溶液每1mL含10.0μg铅。

C　仪器

（1）分光光度计。

（2）高温恒温电炉。

所用玻璃仪器均用体积分数为10%～20%硝酸浸泡24h以上，用自来水反复冲洗，最后用去离子水冲洗干净。

D　测定步骤

（1）样品预处理。

1）在采样和制备过程中，应注意不使样品污染。

2）粮食、豆类去杂质后，磨碎，过0.589mm筛，贮于塑料瓶中，保存备用。

3）蔬菜、水果、鱼类、肉类及蛋类等水分含量高的鲜样，用匀浆机打成匀浆。贮于塑料瓶中。保存备用。

（2）样品消解。

1）硝酸-硫酸法：

①粮食、干豆、茶叶等含水分少的样品。称取5.00g或10.00g的磨碎样品，置于250～500mL定氮瓶中，先加少量水湿润，加数粒玻璃珠，10～15mL硝酸，放置片刻，低温缓慢加热，待作用缓和，放冷。沿瓶壁加入5mL或10mL硫酸，再加热，至瓶中液体开始变成棕色时，不断沿瓶壁滴加硝酸至有机质分解完全。升高温度，至产生白烟，待瓶口白烟冒净后，瓶内液体再产生白烟为消解完全，该溶液应透明无色或微带黄色，放冷。在操作过程中应注意防止爆沸或爆炸。加20mL水煮沸，除去残余的硝酸至产生白烟为止，如此处理两次，放冷。将冷后的溶液移入50mL或100mL容量瓶中，用水洗涤定氮瓶，洗液并入容量瓶中，放冷，加水至刻度，混匀。定容后的溶液每10mL相当于1g样品，相当加

入 1mL 硫酸。

取与消解样品相同量的硝酸和硫酸，按同一方法做试剂空白试验。

②蔬菜、水果。称取 25.00g 或 50.00g 洗净打成匀浆的样品，置于 250～500mL 定氮瓶中，加数粒玻璃珠，10～15mL 硝酸，以下按①项自“放置片刻”起依法操作，但定容后的溶液每 10mL 相当于 5g 样品，相当加入 1mL 硫酸。

③水产品。取可食部分样品捣成匀浆，称取 5.00g 或 10.00g（海产藻类、贝类可适当减少取样量），置于 250～500mL 定氮瓶中，加数粒玻璃珠，5～10mL 硝酸，混匀后，以下按①项自“沿瓶壁加入 5mL 或 10mL 硫酸”起操作。

2）灰化法：

①粮食及其他含水分少的样品。称取 5.00g 样品，置于石英或瓷坩埚中，加热至炭化，然后移入高温恒温电炉中，500℃灰化 3h，放冷，取出坩埚，加（1＋1）硝酸，润湿灰分，用低温蒸干，在 500℃灼烧 1h，放冷，取出坩埚。加 1mL（1＋1）硝酸，加热，使灰分溶解，移入 50mL 容量瓶中，用水洗涤坩埚，洗液并入容量瓶中，加水至刻度，混匀备用。

②含水分多的或液体样品。称取 5.0g 或吸取 5.00mL 样品，置于蒸发皿中，先在水浴上蒸干，再按①自“加热至炭化”起依法操作。

（3）样品测定。

1）吸取 10.0mL 消解后的定容溶液和等量的试剂空白液，分别置于 125mL 分液漏斗中，各加水至 20mL。

2）吸取 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50mL 铅标准应用液（相当 0、1、2、3、4、5μg 铅），分别置于 125mL 分液漏斗中，各加 1mL（1＋99）硝酸至 20mL。

3）于样品消解液、试剂空白液和铅标准应用液中各加 2mL 20g·L^{-1}柠檬酸铵溶液，1mL 200g·L^{-1}盐酸羟胺溶液和 2 滴 1g·L^{-1}酚红指示液，用（1＋1）氨水调至红色，再各加 2mL 100

$g \cdot L^{-1}$氰化钾溶液，混匀。各加 5.0mL 双硫腙应用液，剧烈振摇 1min，静止分层后，三氯甲烷层经脱脂棉滤入 1.0cm 吸收池中，以三氯甲烷作参比，测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法的最低检测限为 $0.25mg \cdot kg^{-1}$。

（2）在样品采集和制备过程中，应注意不使样品污染。

（3）氰化钾是剧毒物质，必须在碱性条件下使用，以防止在酸性条件下生成氢氰酸逸出。测定结束后的废液，应加入氢氧化钠和硫酸亚铁溶液处理，使其生成亚铁氰化钠后倒掉。

（4）样品消解过程中，加硝酸的量应适当，补加硝酸的时间也应恰当，如没变黑就补加硝酸，则不起作用；如变黑时间太长再加硝酸，则析出的烧结成块，不易被氧化。

二、尿中铅的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

铅主要随尿排出，检验尿中铅的含量可以反映人体接触铅的情况，对铅中毒有重要意义，是铅作业者普查、铅中毒诊断及观察疗效的一项重要指标。

通常认为尿铅的质量浓度最高值是 $0.06mg \cdot L^{-1}$，但长期接触铅的人尿铅在 $0.08 \sim 0.15mg \cdot L^{-1}$之间没有病状，所以一般认为长期接触铅的人尿铅的质量浓度最高限量是 $0.15mg \cdot L^{-1}$。

2. 检验原理

尿样加基体改正剂稀释后，在波长 283.3nm 下，直接用石墨炉原子吸收光谱法测定铅的质量浓度。

当试液中共存的 Na^+、Cl^-、K^+和 SO_4^{2-} 质量浓度为 $8000\mu g \cdot mL^{-1}$，Ca^{2+}和 Mg^{2+}质量浓度为 $2500\mu g \cdot mL^{-1}$，Al^{3+}质量浓度为 $250\mu g \cdot mL^{-1}$时，对本法无干扰。

干扰及消除：如基体效应对测定有干扰时，可使用含有与实际样品基体组成类似的标准系列绘制标准曲线或使用标准加入法

定量，即可消除干扰。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：原子吸收分光光度计，具石墨炉和背景校正装置；波长 283.3nm；光谱通带 1.3nm；灯电流 7.5mA；进样量 10μL；载气（Ar）150mL·min^{-1}（原子化时停气）；背景校正，塞曼效应或自吸效应或氘灯；干燥 45～70℃/40s；灰化 450℃/30s；原子化 1950℃/7s；清洗 2050℃/5s。

参照上述仪器条件，将原子吸收分光光度计调节到最佳测定状态。

此法首先取正常人混合尿、蒸馏水、铅标准系列溶液和经加基体改进剂处理后的样品溶液，分别测得对照管、空白管、标准系列和样品管的吸光度。以标准系列的铅质量浓度为横坐标，以标准系列的吸光度减去对照管的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后由样品管吸光度减去空白管的吸光度后，从标准曲线查得稀释尿样中铅的质量浓度。按下式计算铅的质量浓度：

$$\rho = \rho_x dk \tag{3-6}$$

式中 ρ——尿中铅的质量浓度，μg·L^{-1}；

ρ_x——从标准曲线查得的稀释尿样中铅的质量浓度，μg·L^{-1}；

d——尿样稀释倍数；

k——见公式 3-2。

B 试剂

（1）硝酸 ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}，高纯。

（2）氨水 ρ_{20}=0.88g·mL^{-1}。

（3）抗坏血酸。

（4）磷酸二氢铵（$NH_4H_2PO_4$） 光谱纯。

（5）钼酸铵〔$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$〕。

（6）金属铅 光谱纯。

（7）基体改正剂 称取 4.0g 磷酸二氢铵溶于约 20mL 水中，

加入 6.0g 抗坏血酸溶解后，用水稀释至 100mL，摇匀，贮存于细口聚乙烯塑料瓶中。

(8) 钼溶液 (100g·L^{-1})　称取 18.4g 钼酸铵溶于 50mL 水中，加入 8mL 氨水 (ρ_{20}=0.88g·mL^{-1})，用水稀释至 100mL，摇匀。贮存于细口聚乙烯塑料瓶中。

(9)铅标准贮备溶液　称取 0.1000g 金属铅。加入约 10mL 水和 1mL 硝酸 (ρ_{20}=1.42g·mL^{-1})，加热溶解后，用水稀释至 100mL。此溶液每 1mL 含 1.0mg 铅。

(10) 铅标准应用液　临用前，以基体改进剂将铅标准贮备液逐级稀释成每 1mL 含 0.2μg 铅的标准应用溶液。贮存于聚乙烯塑料瓶中。

C　仪器

(1) 原子吸收分光光度计，具石墨炉和背景校正装置。

(2) 铅空心阴极灯。

(3) 普通石墨管。

(4) 微量移液管　10μL、20μL、50μL。

(5) 具塞塑料离心管　1.5mL。

(6) 聚乙烯塑料瓶　250mL (广口)、100mL (细口)。

(7) 具塞聚乙烯塑料平底管　5mL。

(8) 尿相对密度计。

玻璃和塑料器皿的处理方法同汞的检验。

D　测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用广口聚乙烯塑料瓶收集 1 次尿样约 100mL，尽快测量相对密度后，取 5mL 尿置于 5mL 聚乙烯塑料平底管中。加 0.05mL 硝酸 (ρ_{20}=1.42g·mL^{-1})，摇匀。可在室温下尽快运输，夏季运输时最好冷藏。于普通冰箱中可保存两周。检验前要将尿样彻底摇匀。

(2) 石墨管处理。在普通石墨管中加入 20μL 钼溶液，在载气流量为 100mL·min^{-1}，温度为 45～70℃下干燥 50s，在 450℃灰化 30s，在 1950℃原子化 7s，重复此操作共 10 次。经涂钼处理后

的石墨管内壁底部呈灰白色。

（3）对照试验、空白试验和质量控制。取正常人混合尿、水和质控样，按仪器操作条件与样品同时进行测定。测得值分别为对照、空白和质控样的吸光度。

（4）样品处理。采集的尿样放置室温后，充分混匀，吸取0.20mL置具塞塑料离心管中，加入0.20mL基体改进剂，混匀后即可直接测定。

（5）标准曲线的绘制

取6个塑料离心管，按表3-3配制标准系列。

表3-3 铅标准系列的配制

管号	铅标准应用液/mL	基体改进剂/mL	正常人混合尿/mL	铅质量浓度/μg·L⁻¹
0	0	0.20	0.20	0
1	0.03	0.17	0.20	15
2	0.06	0.14	0.20	30
3	0.09	0.11	0.20	45
4	0.12	0.08	0.20	60
5	0.15	0.05	0.20	75

按仪器操作条件，用微量进样器取10μL各标准系列溶液进样，测定吸光度。

（6）样品测定。按仪器操作条件测定样品管吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触铅的人尿中铅含量的检验。最低检测限为1μg·L^{-1}。

（2）尿样的采集时间不限。

（3）所用试剂应为优级纯以上规格，以降低空白值，提高测定灵敏度。

（4）所用的仪器和石墨管的性能和其使用的次数均对测定有影响，必须将仪器操作条件调整到最佳测定状态。

(5) 经过涂钼处理的石墨管，原子化的温度为1950℃，7s。没经涂钼处理的普通石墨管也可以用，但原子化的温度为2000℃，7s。

(6) 铅标准应用溶液在4℃可保存1个月以上。

(7) 基体改进剂因为含有容易被氧化的抗坏血酸，需要避光保存，在4℃可保存1个月以上。

双硫腙分光光度法

1. 检验意义

检验意义同石墨炉原子吸收光谱法。

目前用双硫腙分光光度法检验尿中铅的正常值为0.008 $mg \cdot L^{-1}$。

2. 检验原理

尿样经混合消解液-钼的催化氧化，有机物被迅速破坏，使铅呈离子状态，然后在pH值为8.5～11.0的条件下与双硫腙反应，生成可溶于三氯甲烷的红色络合物，在波长510nm处测定吸光度，以此定量铅。

样品溶液中共存物的影响：在1L尿样中，Zn、Al、As、Cr、Sn、Se、Cu、Cd、Ni、Mn、V、Hg、Mg、Tl、Fe，相应值不超过12.0、8.0、2.4、1.0、1.0、1.0、0.60、0.32、0.24、0.20、0.20、0.10、400、0.40、20.0mg，均不干扰测定。

干扰及消除：同本节一、中双硫腙分光光度法2. 检验原理。

3. 检验方法

A 方法要点

此法将尿样经混合消解液处理后，与标准管一起，用酚红指示液（变色范围是pH＝6.4～8.0，酸性为黄色，碱性为红色），滴加氨水调至溶液呈红色，铅离子与双硫腙反应后生成的配合物被三氯甲烷萃取，将三氯甲烷层经脱脂棉过滤到1.0cm吸收池中，以三氯甲烷作参比调零，在波长510nm处测定吸光度。以铅质量为横坐标，标准管吸光度减去空白管吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

由测得的经预处理后尿样的吸光度从标准曲线上查得样品溶液中铅的质量。按下式计算铅的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \qquad (3\text{-}7)$$

式中 ρ——尿中铅的质量浓度，mg·L^{-1}；

m——从标准曲线上查得的样品溶液中铅的质量，μg；

V——测定时所取尿样体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 硝酸 ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}，优级纯。

(2) 高氯酸 ρ_{20}=1.67g·mL^{-1}，优级纯。

(3) 硫酸 ρ_{20}=1.84g·mL^{-1}。

(4) 氨水 ρ_{20}=0.90g·mL^{-1}，优级纯。

(5) 钼酸铵〔$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$〕溶液（5g·L^{-1}）。

(6) 无水亚硫酸钠。

(7) 柠檬酸三铵。

(8) 氯化钾溶液（100g·L^{-1}）。

(9) 混合消解液 将硝酸（ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}）、高氯酸（ρ_{20}=1.67g·mL^{-1}）、硫酸（ρ_{20}=1.84g·mL^{-1}）和 5g·mL^{-1}钼酸铵溶液按（10+2+1+1）比例混合。

(10) 硝酸溶液 1%。

(11) 酚红指示液（0.4g·L^{-1}）。

(12) 缓冲液 在 1000mL 水溶液中含有 10g 无水亚硫酸钠（或用 50mL 浓度为 200g·L^{-1}的溶液）、250g 柠檬酸三铵、300mL 氨水（ρ_{20}=0.90g·mL^{-1}）和 100mL 100g·L^{-1}氯化钾溶液，如长时间放置，氯化钾不必配入，在测定样品时另加 1mL 100g·L^{-1}氯化钾溶液。

(13) 双硫腙-三氯甲烷贮备溶液（0.160g·L^{-1}） 称取 0.0160g 经纯化的双硫腙固体（避光保存期 1 年），以三氯甲烷溶解，然后在 100mL 棕色容量瓶中加三氯甲烷至刻度。置冰箱中保存，至少可使用 2 个月。

(14) 双硫腙-三氯甲烷应用液 (0.0160g·L^{-1}) 使用时，将贮备液用三氯甲烷稀释 10 倍（此时，如用 1.0cm 吸收池，在 510nm 波长处，以三氯甲烷作参比液调零，测其透光度约为 40%），置棕色瓶于冰箱中，可保存 1 星期以上。

(15) 洗除液 1000mL 水溶液中含有 20g 无水亚硫酸钠（或用 100mL 浓度为 200g·L^{-1}的溶液）、60mL 100g·L^{-1}氯化钾溶液、150mL 氨水 (ρ_{20}=0.90g·mL^{-1})。

(16) 铅标准贮备溶液 称取 0.1598g 在 105℃下烘干至恒重的硝酸铅（优级纯）于烧杯中，用少量水溶解，定量转入 100mL 容量瓶中，加 1mL 硝酸 (ρ_{20}=1.42g·mL^{-1})，用水稀释至刻度。此溶液每 1mL 含 1.0mg 铅。

(17) 铅标准应用溶液 使用时，以体积分数为 1%的硝酸溶液将铅标准贮备溶液逐级稀释成每 1mL 含 2.0μg 铅。

C 仪器

(1) 分光光度计。

(2) 锥形瓶 250mL。

(3) 定量加液器 10mL。

(4) 电热板（或其他热源）。

(5) 抽液装置。

(6) 聚乙烯瓶 200mL。

(7) 尿相对密度计。

(8) 锥形分液漏斗 60mL。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。收集一次尿样至少 50mL 于聚乙烯瓶中，常温下带回实验室，测量相对密度。如不立即测定，置冰箱 4℃可存放两星期〔也可按尿体积 1%加入硝酸 (ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}) 防腐〕。检验前尿样须充分混匀。

(2) 样品处理。取 25mL 上述尿样置于 250mL 锥形瓶中，同时取 25mL 水作试剂空白，各加 7mL 混合消解液，混匀，在电热板（或其他电热源）上消解至无色透明（或有黄白色沉淀物），取

下稍冷，趁温热时，加入 20mL 体积分数为 1%的硝酸溶液，摇匀后，移入 60mL 锥形分液漏斗中。

（3）标准曲线的绘制。

1）取 7 个 60mL 分液漏斗，按表 3-4 配制标准系列。

表 3-4　铅标准系列的配制

管号	铅标准应用溶液/mL	硝酸溶液/mL	铅的质量/μg
0	0	5	0
1	1.0	5	2.0
2	2.0	5	4.0
3	3.0	5	6.0
4	4.0	5	8.0
5	5.0	5	10.0
6	7.5	5	15.0

2）各漏斗中加入 1 滴 0.4g·L^{-1}酚红指示液，滴加氨水（ρ_{20}=0.90g·mL^{-1}）至溶液呈红色。然后加入 10mL 缓冲液，摇匀，冷却后加 5mL 双硫腙-三氯甲烷应用液，摇 100 次，分层，抽弃水相，再加入 10mL 洗除液，摇 50 次，分层后抽弃水相，重复洗涤一次。将三氯甲烷层经脱脂棉过滤到 1.0cm 吸收池中，以三氯甲烷作参比调零，测定吸光度。

（4）样品测定。取预处理后的样品溶液，按（3）中 2）操作，测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于接触铅的人尿中铅含量的测定。最低检测限，取 25mL 尿样时为 0.012mg·L^{-1}。

（2）尿样采集时间不限。

（3）玻璃仪器与塑料容器均用体积分数为 10%的硝酸浸泡过夜，最后用蒸馏水冲洗后使用，新的或久置不用的器皿需用体积

分数为50%的硝酸浸泡1星期，冲洗干净后再用。

(4) 双硫腙试剂应作质量鉴定，具体方法是将0.0160g·L^{-1}双硫腙-三氯甲烷溶液用三氯甲烷稀释1倍，置冰箱中1d后不褪色，表明合格。

(5) 其他试剂的质量也需经过鉴定，具体方法是所用的试剂(除双硫腙外)可根据空白试验的结果，决定是否需要作去铅处理，如空白试验的吸光度明显高于0.02，可对所用的试剂溶液逐个进行检查：在所用溶液加好后，均加入1滴酚红指示液，显红色，再加入5mL 0.0160g·L^{-1}双硫腙-三氯甲烷溶液，摇数十次，三氯甲烷层应仍显绿色，则证明试剂无铅。

1) 10mL缓冲液（不可含氰化钾）。

2) 2mL 100g·L^{-1}氰化钾溶液+10mL缓冲液。

3) 1mL 5g·L^{-1}钼酸铵溶液+1mL氰化钾溶液+10mL缓冲液。

(6) 标准系列经消解或不经消解操作，所绘制的标准曲线，得到的结果是一致的，因此绘制标准曲线可不经过消解操作直接进行。

(7) 加入10mL缓冲液到消解后的样品液中，可以保证pH值在8.5～11.0之间，因此在绘制标准曲线的操作过程中，省去加酚红指示液和滴加氨水的步骤，而对测定结果没影响。

三、血中铅的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验血中铅含量可以反映机体接触铅的情况，对判断铅中毒具有重要意义。血铅含量是铅作业工人普查、铅中毒诊断和疗效观察的一项重要指标。

血铅正常值为0.35～0.50mg·L^{-1}。

铅中毒时血铅含量大于0.60mg·L^{-1}，当血铅的质量浓度为0.60～0.80mg·L^{-1}时，会损害内脏。

2. 检验原理

血样用 Triton X-100(即辛烷基酚聚氧乙烯醚)溶液作基体改进剂，溶血后用硝酸处理，在波长 283.3nm 下，用石墨炉原子吸收光谱法测定铅的含量。

血中共存物的影响：NaCl、K^-、Ca^{2-}、Mg^{2+}的含量是正常值的 3 倍的量和治疗量的 3 倍的 EDTA 时，对测定没影响。

干扰及消除：用标准加入法可消除基体的干扰。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长 283.3nm；光谱通带 1.3nm；灯电流 7.5mA；载气（Ar）150mL·min $^{-1}$；背景校正，氘灯或塞曼效应；干燥 70～110℃/70s；灰化 400～500℃/30s，保持 10s；原子化 2400℃/70s；清洗 2400℃/3s。

参照上述仪器条件，将原子吸收分光光度计调整到最佳测定状态。

此法首先要配制铅标准系列，按仪器操作条件测定各系列吸光度。以加入标准铅的质量浓度为横坐标，以 1～6 号的吸光度减去 0 号管的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后按仪器操作条件测定稀释血样管及试剂空白管的吸光度，血样管吸光度减去试剂空白吸光度，由标准曲线查得稀释血样中铅的质量浓度。按下式计算：

$$\rho = 10\rho_x \tag{3-8}$$

式中 ρ ——血中铅的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

ρ_x——由标准曲线查得的铅的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

10——稀释倍数。

B 试剂

(1) 硝酸 $\rho_{20}=1.42 g \cdot mL^{-1}$，优级纯。

(2) 硝酸铅 优级纯或金属铅，光谱纯。

(3) 硝酸溶液体积分数 1%。

(4) 硝酸溶液体积分数 0.1%。

(5) 肝素钠溶液　5g·L^{-1}。

(6) Triton X-100 溶液体积分数　0.1%。

(7) 铅标准贮备溶液　购买国家级铅标准贮备液（每 1mL 含 1mg 铅）或称取 0.1000g 金属铅，溶于 1.0mL 硝酸（ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}），加水稀释到 100mL，此溶液每 1mL 含 1mg 铅。或称取 0.1598g 硝酸铅（105℃干燥 2h）用 1mol·L^{-1}硝酸溶解并稀释至 100mL，此溶液每 1mL 含 1mg 铅。贮于聚乙烯塑料瓶中。

(8) 铅标准应用液　临用前用 0.1%硝酸溶液将铅标准贮备溶液逐级稀释成每 1mL 含 0.4μg 铅的中间液，然后用 Triton X 100 溶液稀释成每 1mL 含 0.1μg 铅应用液 Ⅰ 和每 1mL 含 0.2μg 铅应用液 Ⅱ 的标准应用液。

C　仪器

(1) 原子吸收分光光度计，具石墨炉和背景校正装置。

(2) 铅空心阴极灯。

(3) 自动进样装置。

(4) 石墨杯。

(5) 聚乙烯加盖离心管。

(6) 容量瓶　25mL。

(7) 微量取液器。

所用容量器皿均用（1+3）硝酸浸泡过夜，冲洗干净，晾干后备用。

D　测定步骤

(1) 采样、运输和保存。可用下述两种方式：

1) 常规采集耳垂或手指血（严格控制污染和组织液稀释，去掉第一滴）。

用微量取液器抽取血样 40μL，置于盛有 0.32mL 0.1% Triton X-100 溶液的具塞离心管中，充分振摇，然后加入 1%硝酸溶液，混匀。冰瓶运输，4℃下至少可保存 5d。

2) 早晨空腹采集静脉血，置入事先加好 5g·L^{-1}肝素钠溶液（用量为每 1mL 血 20～40μL）的管中混匀。冰瓶运输，于 4℃下

可保存3星期。

（2）空白试验。取0.36ml.0.1% Triton X-100溶液，加入0.04mL.1%硝酸溶液，混匀，与样品同时测定。

（3）标准曲线的绘制。

1）取7个具塞离心管，按表3-5配制标准系列。

表3-5 铅标准系列的配制

管号	铅标准应用液（Ⅰ）/mL	铅标准应用液（Ⅱ）/mL	Triton X-100/mL	正常人血/mL	铅质量浓度/μg·L⁻¹
0	0	0	0.32	0.04	0
1	0.02	0	0.30	0.04	5
2	0.04	0	0.28	0.04	10
3	0.08	0	0.24	0.04	20
4	0.16	0	0.16	0.04	40
5	0.32	0	0	0.04	80
6	0	0.20	0.12	0.04	100

2）各管加0.04mL1%硝酸溶液，混匀。按仪器操作条件测定吸光度。

（4）样品测定。

1）将盛有按D中（1）1）法采集的稀释血样的具塞离心管和D中（2）试剂空白按仪器操作条件测定吸光度。

2）或将抗凝的按D中（1）2）法采集的静脉血由冰瓶中取出，放至室温，振摇均匀，取40μL，按D中（1）1）法采集的血样稀释法稀释后，进样10μL，按仪器操作条件测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触铅的人血中铅的测定。最低检测限为3μg·L⁻¹。

（2）血样采集时间不限。采血时必须离开操作环境，防止污染，局部采血前顺次用肥皂、稀硝酸擦洗，用酒精消毒。

（3）每只石墨管的阻值不同，更换石墨管后需要重新作标准曲线。

（4）如血样含铅量超出测定范围，可增加稀释倍数。

思 考 题

1. 用火焰原子吸收光谱法检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铅含量时，在制备的样品液中加入柠檬酸铵和硫酸铵分别有什么作用？此法中二乙基二硫代氨基甲酸钠与铅离子反应时的 pH 值是多少？怎样控制 pH 值？

2. 用双硫腙分光光度法检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品铅含量时，铅离子与双硫腙的反应 pH 值是多少？怎样控制 pH 值？此法在样品消解液中加入氰化钾有什么作用？使用后的氰化钾溶液应怎样处理？

3. 用石墨炉原子吸收光谱法检验尿中铅含量时，在尿样中加入基体改正剂有什么作用？此法怎样消除基体效应对测定的干扰？

4. 用双硫腙分光光度法检验尿中铅含量的原理是什么？铅离子与双硫腙反应所需的 pH 值是怎样控制的？

5. 用石墨炉原子吸收光谱法检验血中铅含量的原理是什么？此项检验有什么意义？

6. 用石墨炉原子吸收光谱法检验尿中铅含量的原理是什么？此项检验有什么意义？

7. 检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铅含量有什么意义？

第三节 镉的检验

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中镉的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

进入食物链的镉通过生物传递进入人体，并在体内积蓄，主要积蓄在肾脏，引起镉中毒。镉的毒性很大，可使肾功能衰退、肝损害、骨痛病。

检验动物、植物、水生生物等生物样品中镉的残留含量作为生物食品限量指标，可控制进入食物链的镉对人类的毒害。

我国在食品卫生标准中规定了对镉的限量（以镉计）：大米≤0.2mg·kg^{-1}；玉米、小麦、高粱等杂粮≤0.05mg·kg^{-1}；面粉≤0.1mg·kg^{-1}；蔬菜≤0.05mg·kg^{-1}；水果≤0.03mg·kg^{-1}；鱼类≤0.1mg·kg^{-1}；肉类≤0.1mg·kg^{-1}。

2. 检验原理

样品经灰化或酸消解后，注入原子吸收分光光度计的石墨炉中，经电加热原子化后吸收波长228.8nm的共振线，在一定浓度范围内，其吸光度与镉含量成正比，与标准曲线比较来定量镉。

干扰及消除：对有干扰的样品，可注入适量的基体改进剂（20g·L^{-1}磷酸铵），一般不少于5μL，即能消除干扰。在绘制标准曲线时也要加入样品测定时等量的基体改进剂。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长228.8nm；光谱通带0.5～1.0nm；灯电流8～10mA；背景校正，氘灯或塞曼效应；干燥120℃/20s；灰化350℃/15～20s；原子化1700～2300℃/4～5s。

按上述参考条件将仪器调整到最佳状态。

此法首先配制铅标准系列，测定各系列的吸光度，绘制吸光度与镉的质量浓度关系的标准曲线。

然后将经干式或湿式消解法处理过的样品溶液和空白溶液分别注入石墨炉，测其吸光度。按下式计算镉的质量浓度（或质量分数w，μg·kg^{-1}）：

$$\rho \text{ 或 } w = \frac{(\rho_1 - \rho_2)(V_2/V_1)V_3}{m_1} \qquad (3\ 9)$$

式中 ρ——样品中镉的质量浓度，μg·L^{-1}；

ρ_1——测定样品消解液中镉的质量浓度，ng·mL^{-1}；

ρ_2——空白液中镉的质量浓度，ng·mL^{-1}；

V_1——实际进样品消解液体积，mL；

V_2　　进样总体积，mL；

V_3——样品消解液总体积，mL；

m_1——样品质量或体积，g 或 mL。

B　试剂

（1）硫酸。

（2）硝酸。

（3）高氯酸。

（4）盐酸。

（5）过氧化氢（30%），即 9.8mol·L^{-1}。

（6）硝酸（1+1）　取 50mL 硝酸，慢慢加入 50mL 水中。

（7）硝酸（0.5mol·L^{-1}）　取 3.2mL 硝酸，加入 50mL 水中，稀释至 100mL。

（8）盐酸（1+1）　取 50mL 盐酸，慢慢加入 50mL 水中。

（9）磷酸铵溶液（20g·L^{-1}）　称取 2.0g 磷酸铵，用水溶解并稀释至 100mL。

（10）混合酸　取 4 份硝酸与 1 份高氯酸混合。

（11）镉标准贮备溶液　准确称取 1.000g 金属镉（99.99%），分次加 20mL（1+1）盐酸溶解，加 2 滴硝酸，移入 1000mL 容量瓶，加水至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 1.0mg 镉。

（12）镉标准应用溶液　每次吸取 10.0mL 镉标准贮备溶液于 100mL 容量瓶中，加 0.5mol·L^{-1}硝酸至刻度。如此经多次稀释成每 1mL 含 100.0ng 镉。

所用化学试剂均为优级纯以上。

C　仪器

（1）原子吸收分光光度计，具石墨炉和镉空心阴极灯。

（2）恒温干燥箱。

（3）压力消解器、压力消解罐。

（4）可调式电热板、可调式电炉。

（5）瓷坩埚。

所用玻璃容器均需用（1+5）硝酸浸泡过夜，用水反复冲洗，

最后用去离子水冲洗干净。

D 测定步骤

(1) 样品预处理。同本章第二节铅的检验一、中的双硫腙分光光度法中的样品预处理。

(2) 样品消解。

1) 压力消解罐消解法。称取 1.00～2.00g 样品（干样、含脂肪高的样品小于 1.00g，鲜样小于 2.0g 或按压力消解罐使用说明书称取样品）于聚四氟乙烯内罐，加 2～4mL 硝酸浸泡过夜。再加 2～3mL30%过氧化氢（总量不能超过罐容积的 1/3）。盖好内盖，旋紧不锈钢外套，放入恒温干燥箱，120～140℃保存 3～4h，在箱内自然冷却至室温，用滴管将消解液洗入或过滤入（视消解后样品的盐分而定）10～25mL 容量瓶中，用少量水多次洗涤罐，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

2) 干法灰化。称取 1.00～5.00g（根据铅含量而定）样品于瓷坩埚中，先低温在可调式电热板上炭化至无烟，移入高温恒温电炉 500℃灰化 6～8h，冷却。若个别样品灰化不彻底，则加 1mL 混合酸在可调式电炉上低温加热，反复多次直到消化完全，放冷，用 0.5mol·L^{-1}硝酸将灰分溶解，用滴管将样品消解液洗入或过滤入（视消解后样品的盐分而定）10～25mL 容量瓶中，用水少量多次洗涤坩埚，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

3) 过硫酸铵灰化法。称取 1.00～5.00g 样品于瓷坩埚中，加 2～4mL 硝酸浸泡 1h 以上，先低温炭化，冷却后加 2.00～3.00g 过硫酸铵盖于上面，继续炭化至不冒烟，转入高温恒温电炉，500℃恒温 2h，再升温至 800℃，保持 20min，冷却，加 2～3mL 1.0mol·L^{-1}硝酸，用滴管将样品消解液洗入或过滤入（视消解后样品的盐分而定）10～25mL 容量瓶中，用水少量多次洗瓷坩埚，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

4) 湿式消解法。称取 1.00～5.00g 样品于锥形瓶或高脚烧杯中，放数粒玻璃珠，加 10mL 混合酸（或再加 1～2mL 硝酸），加

盖浸泡过夜。加一小漏斗，电炉上消解，若变棕黑色，再加混合酸，直至冒白烟，消解液呈无色透明或略带黄色，冷却，用滴管将样品消解液洗入或过滤入（视消解后样品的盐分而定）10～25mL 容量瓶中，用少量水多次洗涤锥形瓶，或高脚烧杯，洗液合并于容量瓶中并定容至刻度，混匀备用；同时作试剂空白。

以上几种消解方法可根据实验条件任选一种。

（3）标准曲线的绘制。吸取镉标准应用液 0、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0mL 于 100mL 容量瓶中稀释至刻度，相当于 0、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0ng·mL^{-1}，各吸取 10μL 注入石墨炉，测得其吸光度。

（4）样品测定。分别吸取 10μL 样液和试剂空白液注入石墨炉，测得其吸光度值。

4. 注意事项

（1）本法的最低检测限为 0.1μg·kg^{-1}。

（2）原子吸收分光光度计的型号不同时，测定条件也不同，应根据具体情况将仪器调节到最佳操作状态。

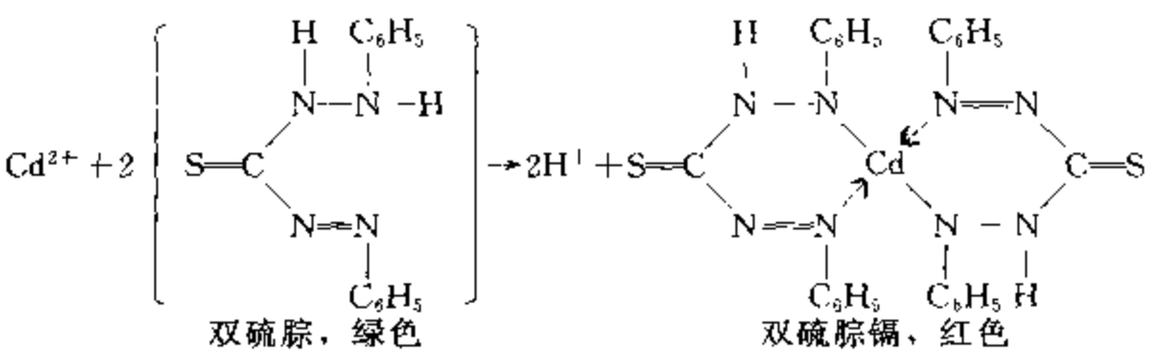
双硫腙-乙酸丁酯萃取-火焰原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验意义同本节一、中石墨炉原子吸收光谱法。

2. 检验原理

样品经处理后，在 pH=6 左右的溶液中，镉离子与双硫腙生成络合物，并被乙酸丁酯萃取分离后，导入原子吸收分光光度计中，经火焰原子化以后，吸收波长 228.8nm 共振线，其吸光度与镉含量成正比，以此定量镉。主要反应式如下：



3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：灯电流 6～7mA；波长 228.8nm；光谱通带 0.15～0.2nm；空气流量 5L·min^{-1}；灯头高度 1mm；背景校正，氘灯。

参照上述条件将仪器调整至最佳状态。

此法用有机溶剂萃取镉后，再用原子吸收光谱法测定，具有更高的灵敏度和良好的再现性。

首先将经过预处理的样品进行消解，同时取与处理样品相同量的硝酸-高氯酸混合酸、硝酸，按同一方法进行消解，即做试剂空白试验。

然后取样品消解液、试剂空白液、镉标准应用溶液，在柠檬酸钠缓冲液中，用氨水调节 pH＝5～6.4，使铅离子与双硫腙 乙酸丁酯中的双硫腙生成双硫腙铅络合物，此络合物被乙酸丁酯溶液萃取至有机相中，弃去下层水相。将有机相导入火焰原子化器测定吸光度。

以镉的质量分数为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。样品吸光度与标准曲线比较，以此定量隔。按下式计算隔的质量分数：

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_4} \tag{3-10}$$

式中 w——样品中镉的质量分数，mg·kg^{-1}；

m_2——测定用样品液中镉的质量，μg；

m_3——试剂空白液中镉的质量，μg；

m_4——样品质量，g。

B 试剂

(1) 氨水。

(2) 柠檬酸钠缓冲液（2mol·L^{-1}） 称取 226.3g 柠檬酸钠及 48.46g 柠檬酸，加水溶解，必要时，加温助溶，冷却后加水稀释至 500mL，临用前用 1g·L^{-1}双硫腙-乙酸丁酯溶液处理以降低空白值。

(3)双硫腙-乙酸丁酯溶液(1g·L⁻¹)　称取0.1g双硫腙，加10mL三氯甲烷溶解后，再加乙酸丁酯稀释至100mL，临用时配制。

(4) 混合酸　硝酸＋高氯酸（4＋1）。

(5) 镉标准贮备溶液及镉标准应用溶液的配制同本节一、中的石墨炉原子吸收光谱法。镉标准贮备溶液每1mL含1.0mg镉，镉标准应用溶液每1mL含100.0ng镉。

C　仪器

(1) 原子吸收分光光度计。

(2) 镉、空心阴极灯。

D　测定步骤

(1) 样品预处理。

1) 谷类。去除其中杂物及尘土，必要时除去外壳。

2) 蔬菜、瓜果及豆类。取可食部分洗净晾干，切碎充分混匀。

3) 肉类及水产品。取可食部分，切碎充分混匀。

(2) 样品消解。称取5.00g上述样品。置于250mL高型烧杯中，加15mL混合酸，盖上表面皿，放置过夜，再于电热板或砂浴上加热。消解过程中，注意勿使干涸，必要时可加少量硝酸，直至溶液澄清无色或微带黄色。冷却后加25mL水煮沸，除去残余的硝酸至产生大量白烟为止，如此处理两次，放冷。以25mL水分数次将烧杯内溶物洗入125mL分液漏斗中。

(3) 空白试验。取与处理样品相同量的混合酸、硝酸，按同一操作方法做试剂空白。

(4)萃取分离。吸取0、0.25、0.50、1.50、2.50、3.50、5.00mL镉标准应用溶液（相当0、0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0μg镉）。分别置于125mL分液漏斗中，各加（1＋11）盐酸至25mL。

于样品预处理溶液、试剂空白液及镉标准应用溶液各分液漏斗中各加5mL 2mol·L⁻¹柠檬酸钠缓冲液，以氨水调节pH值5～6.4，然后各加水至50mL，混匀。再各加5.0mL 1g·L⁻¹双硫腙-乙酸丁酯溶液，振摇2min，静置分层，弃去下层水相，将有机相

放入具塞试管中，备用。

(5) 样品测定。将有机相导入火焰原子化器测定吸光度。

4. 注意事项

(1) 本法最低检测限为 5.0μg·kg^{-1}。

(2) 本法使用乙酸丁酯作为双硫腙镉的萃取液，此萃取液在火焰中能完全燃烧，提高其灵敏度，并有良好的再现性。不能使用双硫腙分光光度法最常用的三氯甲烷和四氯化碳这两种有机溶剂作萃取液，因为它在火焰中不能燃烧，使火焰不稳定，灵敏度下降，再现性也不好。

二、尿中镉的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验尿中镉的含量可以反映机体接触镉的情况，对镉中毒的诊断有重要意义。

2. 检验原理

尿样加基体改进剂和稀硝酸溶液稀释后，直接进样，在波长 228.8nm 下，用石墨炉原子吸收光谱法测定镉的含量。

Cr^{6+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Pb^{2+}等离子不干扰测定。

干扰及消除：如基体效应对测定有影响时，可使用含有与实际样品基体类似的标准系列进行标准曲线的绘制或用标准加入法消除干扰。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长 228.8nm；光谱通带 0.3nm；灯电流 6mA；进样量 10μL；氩气 0.5L·min^{-1}（原子化停气）；干燥 0～100℃/30s（斜坡），100～200℃/20s（斜坡）；灰化 400℃/10s；原子化 1800℃/5s；清洗 2000℃/3s（阶梯）；背景校正，氘灯或塞曼效应。

首先取镉标准管、试剂空白管和尿样，用硝酸溶液稀释，并加入基体改进剂，按仪器条件将原子吸收分光光度计调节到最佳

测定状态，测定各管的吸光度。以标准管的质量浓度为横坐标，以标准管的吸光度减去空白管的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后将样品管的吸光度减去空白管的吸光度后，从标准曲线查得尿中镉的质量浓度。按下式计算尿中镉的质量浓度：

$$\rho = \rho_r k \tag{3-11}$$

式中 ρ——尿中镉的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

ρ_r——从标准曲线查得的镉质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 硝酸 $\rho_{20}=1.42 g \cdot mL^{-1}$，高纯。

(2) 磷酸氢二铵 分析纯。

(3) 金属镉 光谱纯。

(4) 硝酸溶液 1%（体积分数）。

(5) 基体改进剂 称取 1g 磷酸氢二铵，加 1%硝酸溶液溶解，并稀释至 100mL。

(6) 空白尿样 取不接触镉的正常人尿，按体积的 1%比例加入硝酸（$\rho_{20}=1.42 g \cdot mL^{-1}$），混匀。

(7) 镉标准贮备溶液 称取 0.5000g 金属镉，加 20mL 硝酸（$\rho_{20}=1.42 g \cdot mL^{-1}$），加热溶解后，将溶液移入 500mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，此溶液每 1mL 含 1.0mg 镉。

(8) 镉标准应用溶液 临用前，用 1%硝酸溶液将镉标准贮备溶液稀释成 0、30.0、50.0、100.0、200.0、300.0、400.0$\mu g \cdot L^{-1}$ 的标准应用溶液。

C 仪器

(1) 原子吸收分光光度计，具石墨炉和背景校正装置。

(2) 镉空心阴极灯。

(3) 微量移液管 10μL。

(4) 具塞试管 10mL。

(5) 聚乙烯塑料瓶 500mL。

(6) 尿相对密度计。

玻璃和塑料器皿均用体积分数为20%硝酸浸泡过夜，用去离子水冲洗干净，避尘晾干备用。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用塑料瓶收集尿样，混匀后，尽快测量相对密度和体积。在尿中按1%的比例加入硝酸（$\rho_{20}=1.42\ g\cdot mL^{-1}$），室温下运输，于4℃下可保存两个月。检验前将尿充分混匀。

(2) 样品处理。取1.0mL上述尿样于具塞试管中，加1.0mL基体改进剂，8.0mL1%硝酸溶液，混匀。即为样品管。

(3) 空白试验。取1.0mL基体改进剂，9.0mL1%硝酸溶液，混匀，作为试剂空白管。

(4) 标准曲线的绘制。

1) 取7个具塞试管，按表3-6配制标准系列。

表3-6 镉标准系列的配制

管号	不同浓度的标准应用溶液/mL	空白尿样/mL	1%硝酸溶液/mL	基体改进剂/mL	镉的质量浓度/μg·L⁻¹
0	1.0	1.0	7.0	1.0	0
1	1.0	1.0	7.0	1.0	3.0
2	1.0	1.0	7.0	1.0	5.0
3	1.0	1.0	7.0	1.0	10.0
4	1.0	1.0	7.0	1.0	20.0
5	1.0	1.0	7.0	1.0	30.0
6	1.0	1.0	7.0	1.0	40.0

2) 按照最佳仪器操作条件，测定镉标准系列的吸光度。

(5) 样品测定。按照仪器最佳条件测定样品管、试剂空白管的吸光度。

4. 注意事项

(1) 本法适用于正常人和接触镉的人尿中镉的测定。本法最

低检测限为 0.28μg·L^{-1}。

(2) 所使用的仪器和石墨管的性能对镉的测定有影响，故仪器各项条件应调节到最佳测定状态。

火焰原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验意义同本节二、中的石墨炉原子吸收光谱法。

2. 检验原理

尿中镉在 pH＝5.0～6.0 的弱酸性条件下，被巯基棉吸附、富集后，经盐酸溶液解吸，在波长 228.8nm 下。用乙炔-空气火焰原子吸收光谱法测定镉的含量。

5.2mg·L^{-1}的锌不干扰尿中镉的富集。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长 228.8nm；光谱通带 0.4nm；灯电流 2mA；乙炔流量 0.9L·min^{-1}；空气流量 5.5L·min^{-1}。

参照上述仪器条件将原子吸收分光光度计调节到最佳测定状态。

此法首先将尿样经盐酸酸化，用氢氧化钠和盐酸调节至 pH＝5.0～6.0 弱酸性，经活塞下装有巯基棉的漏斗过滤（巯基棉起吸附、富集作用），用蒸馏水洗涤巯基棉，待滤尽后，再用稀盐酸解吸液洗涤巯基棉并以与过滤、富集相同的速度收集解吸液于容量瓶中，作为样品管。

然后测定镉标准管、试剂空白管和样品管的吸光度。以各标准管中镉质量浓度为横坐标，以各标准管吸光度减去空白管吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

样品管吸光度减去空白管吸光度后。从标准曲线查得镉的质量浓度。计算公式同式 3-11。

B 试剂

(1) 盐酸 ρ_{20}＝1.19g·mL^{-1}，优级纯。

(2) 硝酸 ρ_{20}＝1.42g·mL^{-1}，高纯。

(3) 硫酸　$\rho_{20}=1.84g\cdot mL^{-1}$，优级纯。

(4) 硫代乙醇酸。

(5) 乙酸酐。

(6) 乙酸。

(7) 金属镉　光谱纯。

(8) 解吸液　0.2mol·L^{-1}盐酸溶液。

(9) 氢氧化钠。

(10) 盐酸溶液（1mol·L^{-1}）。

(11) 氢氧化钠溶液（10mol·L^{-1}）。

(12) 精密 pH 试纸　4.6～7.0。

(13) 巯基棉　取 100mL 硫代乙醇酸，70mL 乙酸酐，32mL 乙酸，0.3mL 硫酸混合，冷却后加入 30g 优质脱脂棉，浸泡，密封后于 40℃保温 3d，耐酸抽滤漏斗抽滤，用水冲至中性，35℃烘干，置棕色瓶中保存。

(14) 镉标准贮备溶液　同本节二、中的石墨炉原子吸收光谱法中镉标准贮备溶液的配制。

(15)镉标准应用溶液　临用时用水将镉标准贮备溶液稀释成质量浓度分别为 3.0、10.0、20.0、40.0μg·L^{-1}的标准溶液。

C　仪器

(1) 原子吸收分光光度计，具乙炔-空气燃烧装置。

(2) 镉空心阴极灯。

(3) 分液漏斗　250mL（活塞下端管长约 9cm，直径约 0.5cm）。

(4) 聚乙烯塑料瓶　500mL。

(5) 尿相对密度计。

玻璃和塑料器皿用体积分数为 10%硝酸浸泡过夜，用去离子水冲洗干净，避尘晾干备用。

D　测定步骤

(1) 采样、运输和保存。

1)用塑料瓶收集尿样，混匀后准确量取体积和测量相对密度，

按尿样总体积加入1%盐酸(ρ_{20}=1.19g·mL^{-1})，室温下运输，于4℃下可保存两个月。

2）或按（2）样品处理方法，用巯基棉富集尿中镉，取富集后的巯基棉于一定体积的解吸液中，室温下运输，于4℃下可保存1个月。

（2）样品处理。取100mL经（1）1）项酸化后的尿液样品，加入活塞下装有0.1g巯基棉的分液漏斗中，用10mol·L^{-1}氢氧化钠和1mol·L^{-1}盐酸调pH5.0～6.0，以小于6mL·min^{-1}的速度过滤，用5mL水洗涤巯基棉，待滤尽后加入10mL解吸液，过滤速度与富集速度相同，收集解吸液于10mL容量瓶中，混匀，供测定用。

（3）空白试验。取100mL水代替尿样，加1mL盐酸（ρ_{20}=1.19g·mL^{-1}），按（2）样品处理操作。

（4）标准曲线的绘制。

1）取5个分液漏斗，按表3-7配制标准系列。

表3-7　镉标准系列的配制

管号	不同浓度的标准应用液/mL	水/mL	盐酸（ρ_{20}=1.19g·mL^{-1}）/mL	镉质量浓度/μg·L^{-1}
0	0	100	1	0
1	100	0	1	3
2	100	0	1	10
3	100	0	1	20
4	100	0	1	40

2）各分液漏斗按（2）样品处理操作。按照最佳仪器条件测量各管的吸光度。

（5）样品测定。将样品管及空白管按仪器最佳条件测定吸光度。

4. 注意事项

(1) 本法适用于正常人和接触镉的人尿中镉的测定。本法的最低检测限为 0.22μg·L^{-1}。

(2) 本法的火焰必须保持贫燃状态。

(3) 巯基棉的吸附酸度为 pH=5.0～6.0，超出 pH 范围将明显影响测定的准确度。巯基棉的吸附容量为每 1L 500μg 镉。

(4) 尿样通过消解后富集与直接富集的方法所测定的结果没有明显差异。

三、血中镉的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验血中镉含量可反映机体镉的接触情况，对镉中毒的诊断有重要意义。

血清中镉的质量浓度小于 30μg·L^{-1}。

2. 检验原理

血中镉被一定浓度的酸溶液溶出，离心除去蛋白，制得血清直接进样，在波长 228.8nm 下，用石墨炉原子吸收光谱法测定镉的含量。

Sn^{2+}、Sb^{3+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}等离子不干扰测定。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长 228.8nm；光谱通带 0.8nm；灯电流 7mA；进样量 10μL；载气流量 1.5L·min^{-1}，原子化时停气；背景校正，氘灯或塞曼效应；干燥 25～150℃/30s，保持 10s；灰化 250℃/20s；原子化 1700℃/5s；清洗 2000℃/2s。

按上述参考条件将仪器调整到最佳状态。

首先将血样用肝素抗凝，用稀硝酸溶解血样中镉后，再离心沉降蛋白质，制得的上清液即是血清，作为样品管。

用稀硝酸溶液溶解牛血中的镉混合均匀，作为空白管(0 号管)。

然后取镉-血标准管、试验空白管、样品管，分别测得其吸光度。以镉的质量浓度为横坐标，以标准管的吸光度减去零管的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

样品管吸光度减去零管的吸光度，从标准曲线查得血样中镉的质量浓度。不需要计算，从标准曲线上查得的镉的质量浓度即为血样中镉的质量浓度（$\mu g \cdot L^{-1}$）。

B 试剂

（1）硝酸 ρ_{20}—1.42g·mL^{-1}，高纯。

（2）金属镉 光谱纯。

（3）乙醇 75%，分析纯。

（4）硝酸溶液（4+96）。

（5）肝素钠水溶液（10g·L^{-1}）。

（6）牛血 肝素抗凝。

（7）镉标准贮备溶液 同本节二、中的石墨炉原子吸收光谱法。

（8）镉标准应用溶液 临用前，用水将镉标准贮备溶液稀释成每1mL含0.1、0.2、0.4、0.8、1.6μg镉的标准应用溶液。

（9）镉-血标准溶液 取0.1mL各系列镉标准应用溶液，加4.9mL经肝素抗凝的牛血，混匀，—8℃保存。血中镉的质量浓度分别为2.0、4.0、8.0、16.0、32.0$\mu g \cdot L^{-1}$。

C 仪器

（1）原子吸收分光光度计 具石墨管和背景校正装置。

（2）镉空心阴极灯。

（3）离心机 4000r·min^{-1}或10000r·min^{-1}。

（4）旋涡混合器。

（5）聚乙烯塑料离心管 1.5mL。

（6）微量加液器 10μL。

玻璃和塑料器皿均用10%硝酸浸泡过夜，用去离子水冲洗干净，晾干后备用。

D 测定步骤

（1）采样、运输和保存。

1）采末梢血。用（4+96）硝酸和75%乙醇先后清洗和消毒手指或耳垂皮肤，用不锈钢三棱针刺破皮肤，用经10g·L^{-1}肝素钠水溶液清洗过内壁的吸管采血0.1mL。另取0.4mL（4+96）硝酸溶液于聚乙烯塑料离心管中，在旋涡混合的状况下加入血样，于4℃下可保存两星期。

2）采静脉血。在硬质玻璃试管中加入0.5mL10g·L^{-1}肝素钠水溶液，置于60℃烘箱中烘干，加约1mL静脉血，混合，然后取0.1mL肝素抗凝血样，按1）末梢采血处理。

（2）样品处理。将上述血样混匀，放置10min，于4000r·min^{-1}离心20min（或10000r·min^{-1}离心10min），取上清液供测定用。即为样品管。

（3）标准曲线的绘制。

1）取6个聚乙烯塑料离心管，在旋涡混合器上混合的状况下按表3-8配制标准系列。

表3-8 镉标准系列的配制

管号	（4+96）硝酸溶液/mL	牛血/mL	不同浓度的镉·血标准溶液/mL	镉的质量浓度/μg·L^{-1}
0	0.4	0.1	0	0
1	0.4	0	0.1	2
2	0.4	0	0.1	4
3	0.4	0	0.1	8
4	0.4	0	0.1	16
5	0.4	0	0.1	32

2）按照最佳的仪器操作条件，测定各管的吸光度。

（4）样品测定。按（3）中2）项测量样品管的吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触镉的人血中镉的测定。本法的

最低检测限为 0.66μg·L^{-1}。

（2）采集血样时要严防污染，要脱离工作环境，换下工作服，洗净取血部位，所用的刺针应是不锈钢或塑料用具。

（3）所用的仪器和石墨管的性能对测定有明显影响，应将仪器调至最佳测定状态。

（4）肝素是一种含硫酸的粘多糖，常用其钠、钾、锂盐，能阻止凝血酶原转化为凝血酶，肝素是一种很贵又很好的抗凝剂。

思 考 题

1. 用石墨炉原子吸收光谱法检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中镉含量时，为什么要加入基体改进剂？基体改进剂是怎样配制的？

2. 用萃取-火焰原子吸收光谱法检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中镉含量时，用什么作萃取液？这种萃取液对测定结果有什么影响？为什么不能用三氯甲烷或四氯化碳作此法的萃取液？

3. 用石墨炉原子吸收光谱法检验尿中镉含量时，怎样消除基体效应对测定的影响？

4. 用火焰原子吸收光谱法检验尿中镉含量时，巯基棉有什么作用？其吸附作用的 pH 值应为多少？

5. 用石墨炉原子吸收光谱法检验血中镉含量时，使用什么作空白试验管？

6. 肝素是什么？有什么作用？

7. 检验尿中镉含量的原理是什么？此项检验有什么意义？

8. 检验血中镉含量的原理是什么？此项检验有什么意义？

第四节 铬的检验

一、粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铬的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

铬的毒性与其存在的价态有关，通常认为六价铬比三价铬的毒性大 100 倍，六价铬更易被人们吸收并在体内积蓄，对皮肤有

刺激作用，能使皮肤溃疡。体内铬过多会得白血病。

长期接触铬化合物，会引起铬慢性中毒，导致胃肠溃疡病及胃、肝病等。铬已确定是致癌物。

检验动、植物、水生生物等生物样品中铬的残留含量作为生物食品的限量指标，可控制进入食物链的铬对人类的危害。

我国在食品卫生标准中规定了对铬的限量（以铬计）：粮食≤1.0mg·kg^{-1}；蔬菜≤0.5mg·kg^{-1}；水果≤0.5mg·kg^{-1}；鱼贝类≤0.2mg·kg^{-1}；肉类（包括肝、肾）≤1.0mg·kg^{-1}。

2. 检验原理

样品经消解后，用去离子水溶解，并定容到一定体积。吸取适量样液于石墨炉原子化器中原子化，在最佳操作条件下，铬原子吸收波长 357.9nm 的共振线，其吸光度与铬含量成正比，与标准系列比较，以此定量铬。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长 357.9nm；干燥 110℃/40s；灰化 1000℃/30s；原子化 2800℃/5s；背景校正，氘灯或塞曼效应。

按照上述仪器参考条件将原子吸收分光光度计调节到最佳操作状态。

首先测定与样品铬含量相当的标准系列的吸光度，绘制标准曲线。

然后测定经处理、消解、水溶解后的样品溶液的吸光度，对有干扰的样品应注入与样品液同样量的 20g·L^{-1}磷酸铵溶液（标准系列也加）。由测得的吸光度查标准曲线得样品溶液中铬的质量分数。按下式计算：

$$w = \frac{\rho_x - \rho_0}{m/V} \tag{3-12}$$

式中 w——样品中铬的质量分数，μg·kg^{-1}；

ρ_x——样品溶液中铬的质量浓度，ng·mL^{-1}；

ρ_0——试剂空白溶液中铬的质量浓度，ng·mL^{-1}；

V——样品消解液定容体积，mL；

m——样品质量，g。

B 试剂

(1) 硝酸。

(2) 高氯酸。

(3) 过氧化氢。

(4) 重铬酸钾。

(5) 硝酸溶液 ($1.0mol \cdot L^{-1}$)。

(6) 铬标准贮备溶液 称取 1.4135g (置 110℃烘干 2h) 重铬酸钾溶于水，定容于 500mL 容量瓶中，混匀。此溶液每 1mL 含 1.0mg 铬。

(7) 铬标准应用溶液 临用时，将铬标准贮备溶液用 $1.0 mol \cdot L^{-1}$硝酸稀释成为每 1mL 含 100ng 铬的标准应用溶液。

C 仪器

(1) 原子吸收分光光度计，具石墨炉。

(2) 铬空心阴极灯。

(3) 高压消解罐。

(4) 高温炉。

(5) 恒温电烤箱。

所用玻璃仪器及高压消解罐的聚乙烯内筒均需在每次使用前用 (1+1) 盐酸浸泡 1h，再用去离子水冲洗干净后使用。

D 测定步骤

(1) 样品预处理。

1) 粮食、干豆类去壳去杂物，粉碎，过 0.833mm 筛，置塑料瓶中保存备用。

2) 蔬菜、水果等洗净晾干，取可食部分捣碎、备用。

3) 鱼类、肉类等用水洗净，取可食部分捣碎、备用。

(2) 样品的消解。

1) 高压消解罐消解法。称取 0.300～0.500g 样品，于具有聚四氟乙烯内筒的高压消解罐中。加入 1.0mL 硝酸、4.0mL 过氧化

氢液，轻轻摇匀，盖紧消解罐的上盖，放入恒温箱中，从温度升高至 140℃时开始记时，保持恒温 1h，同时做试剂空白。取出消解罐待自然冷却后打开上盖，将消解液移入 10mL 容量瓶中，用水将消解罐洗净，合并洗液于容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。即为样品溶液。

2）干式消解法。称取 0.500～1.000g 样品于瓷坩埚中，加入 1～2mL 优级纯硝酸，浸泡 1h 以上，将坩埚置于电热板上，小心蒸干，炭化至不冒烟为止，转移至高温炉中，550℃恒温 2h，取出冷却后，加数滴浓硝酸于坩埚内的样品灰中，再转入 550℃高温炉中，继续灰化 1～2h，到样品呈白灰状，从高温炉中取出放冷后，用体积分数为 1%硝酸溶解样品灰，将溶液定量移入 5 或 10mL 容量瓶中，定容后充分混匀，即为样品溶液。

以上两种消解方法可根据实验条件任选一种。

（3）标准曲线的绘制。

1）分别吸取 0、0.10、0.30、0.50、0.70、1.00、1.50mL 铬标准应用液于 10mL 容量瓶中，用 1.0mol·L^{-1}硝酸稀释至刻度，混匀。

2）将原子吸收分光光度计调试到最佳状态后，测定与样品铬含量相当的标准系列的吸光度，进样量为 20μL。绘制标准曲线。

（4）样品测定。将原子吸收分光光度计调试到最佳状态后，测定样品溶液的吸光度，进样量为 20μL。

4. 注意事项

（1）本法最低检测限为 0.2ng·mL^{-1}。

（2）盛铬所用的玻璃器皿，不能用重铬酸钾洗液洗涤。

二、尿中铬的检验

二苯碳酰二肼分光光度法

1. 检验意义

检验尿中的铬含量可作为一项接触指标，对诊断铬中毒有重要意义。

2. 检验原理

尿样经酸消解后，在酸性条件下，用高锰酸钾将三价铬氧化为六价铬，在二价锰离子存在下，六价铬与二苯碳酰二肼生成紫红色络合物，在波长 540nm 处测定吸光度，用分光光度法测定三价铬和六价铬的总量。主要反应式如下：

$$10Cr^{3+} + 6MnO_4^- + 11H_2O \rightleftharpoons 5Cr_2O_7^{2-} + 6Mn^{2+} + 22H^+$$

$$2CrO_4^{2-} + 2H^+ \rightleftharpoons 2HCrO_4^- \rightleftharpoons Cr_2O_7^{2-} + H_2O$$

$$2Cr_2O_7^{2-} + 3\left\{\begin{array}{l} C_6H_5-NH-NH \\ C_6H_5-NH-NH \end{array}\right\}C=O + 16H^+ \longrightarrow$$

二苯碳酰二肼，黄色

$$3\left\{\begin{array}{l} C_6H_5-N=N \\ C_6H_5-N=N \end{array}\right\}C=O + 4Cr^{3+} + 14H_2O$$

二苯偶氮碳酰，紫红色

共存离子中微量的汞、镉、铜与二苯碳酰二肼的反应不灵敏，不干扰铬的测定。

干扰及消除：铁的含量高时，对测定有干扰，可用二乙基二硫代氨基甲酸钠（铜铁试剂）处理。

3. 检验方法

A 方法要点

用硫酸-高氯酸将尿样消解后，用甲基橙指示液（变色范围 pH 值为 3.1～4.4，酸性为红色，碱性为黄色），经氨水调至溶液变为黄色，再用稀硫酸调至溶液刚变红色，在磷酸酸性条件中，用高锰酸钾溶液氧化三价铬成为六价铬（铬酸），在酸性溶液中铬酸可变成重铬酸，此时因稍过量的高锰酸钾使溶液显淡紫色，用叠氮化钠还原过剩的高锰酸钾至淡紫色刚好消失，得到的无色透明溶液即为样品溶液。

然后，在铬标准系列中加入高氯酸，再与样品管溶液一起，分别加入二苯碳酰二肼溶液（此时溶液显黄色），与重铬酸反应生成紫红色络合物。用 3.0cm 吸收池，以 0 管（空白管）作参比调零，在波长 540nm 处测量吸光度。以铬的质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

由测得的样品溶液的吸光度，从标准曲线上查出样品溶液中铬的质量。按下式计算铬的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \qquad (3\text{-}13)$$

式中 ρ——尿中铬的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m——从标准曲线上查得的铬的质量，μg；

V——测定时所取尿样的体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 硫酸 $\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

(2) 高氯酸 $\rho_{20}=1.67g \cdot mL^{-1}$。

(3) 磷酸 $\rho_{20}=1.68g \cdot mL^{-1}$。

(4) 氨水 $\rho_{20}=0.90g \cdot mL^{-1}$。

(5) 硫酸溶液 (1+3)、(1+9)。

(6) 高锰酸钾溶液 ($30g \cdot L^{-1}$)。

(7) 叠氮化钠溶液 ($5g \cdot L^{-1}$)。

(8) 甲基橙指示液 ($1g \cdot L^{-1}$)。

(9) 二苯碳酰二肼溶液 ($0.4g \cdot L^{-1}$) 称取 0.1g 二苯碳酰二肼溶于 50mL 体积分数为 95%乙醇中，再加入 200mL(1+9)硫酸，摇匀。贮于棕色瓶中，置冰箱保存，可使用 1 个月。

(10) 铬标准贮备溶液 称取 0.1415g (置 120℃干燥至恒重的)基准重铬酸钾溶于水，移入 500mL 容量瓶中并稀释至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 0.1mg 铬。

(11)铬标准应用溶液 临用时将铬标准贮备溶液逐级稀释成每 1mL 含 10.0μg 铬标准应用溶液。

C 仪器

(1) 分光光度计，3.0cm 吸收池。

(2) 具磨口塞比色管 50mL。

(3) 锥形瓶 200mL。

(4) 电热板。

(5) 聚乙烯塑料瓶。

(6) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用聚乙烯广口瓶收集接触者尿样150mL以上，常温下带回实验室（夏季运输时，最好冷藏），测相对密度后于4℃可保存1星期。

(2) 样品处理。

1) 取50mL相对密度为1.010～1.030尿样，置于锥形瓶中，同时取50mL水做试剂空白，加5mL硫酸（ρ_{20}=1.84g·mL^{-1}），于电热板上消解至刚炭化时取下，冷却，加2mL高氯酸（ρ_{20}=1.67g·mL^{-1}）。

2)继续消解至液体剩下1mL左右。取下冷却后加30mL水及1滴1g·L^{-1}甲基橙指示液，用氨水（ρ_{20}=0.90g·mL^{-1}）调至黄色，再用(1+3)硫酸调到刚变红色，加0.15mL磷酸（ρ_{20}=1.68g·mL^{-1}），1滴30g·L^{-1}高锰酸钾溶液，于电炉上煮沸约10min。溶液应保持淡紫色，如溶液呈棕色可补加30g·L^{-1}高锰酸钾溶液，趁热滴加5g·L^{-1}叠氮化钠溶液使溶液无色透明，再煮沸2min。冷却后移入50mL比色管中，加水至刻度，混匀。即为样品溶液。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取6个200mL锥形瓶按表3-9配制标准系列。

表3-9 铬标准系列的配制

管号	铬标准应用溶液/mL	水/mL	硫酸（ρ_{20}=1.84g·mL^{-1}）/mL	铬的质量/μg
0	0	50	5	0
1	0.1	49.9	5	1
2	0.3	49.7	5	3
3	0.5	49.5	5	5
4	0.7	49.3	5	7
5	1.0	49.0	5	10

2）各锥形瓶放在电热板上消解至液体剩下约 10mL，冷却，加 2mL 高氯酸（ρ_{20}=1.67g·mL^{-1}），然后按 D（2）中 2）项继续操作。

3）加 1mL0.4g·L^{-1}二苯碳酰二肼溶液、混匀。20min 后用 3.0cm 吸收池，以 0 管作参比调零，测量吸光度。

（4）样品测定。取 D（2）中 2）项制备的稀释至 50mL 的样品溶液，按 D（3）中 3）项操作，测量吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于接触铬及铬盐的人尿中铬含量的检验。本法最低检测限，取 50mL 尿样时为 0.008mg·L^{-1}。

（2）接触者尿样采集时间不限。

（3）铬与二苯碳酰二肼显色时，硫酸浓度应控制在 0.05～0.30mol·L^{-1}。酸度低，显色慢，但酸度高于 0.30mol·L^{-1}，也会使显色减弱。本法在最后的 50mL 测定溶液中酸度为 0.20mol·L^{-1}，在上述操作条件下，15min 显色完全，颜色在 30min 内稳定不变。

（4）铬与二苯碳酰二肼显色反应的适宜温度为 15℃，2～3min 后反应完全、稳定，直射光可使生成的紫红色络合物分解，故显色后应置暗处，操作应迅速。

（5）用高锰酸钾将三价铬离子氧化成铬酸盐后，过剩的高锰酸钾必须全部还原，否则影响测定。

（6）用叠氮化钠将过剩的高锰酸钾还原分解，但叠氮化钠不能过量，否则六价铬又还原成为三价铬离子。还应注意叠氮化钠易爆炸。

（7）盛铬的玻璃器皿不能用重铬酸钾洗液洗涤。

（8）用高锰酸钾将三价铬氧化成六价铬的过程中，七价锰有可能被还原成为棕色的二氧化锰，为防止其产生，应加高锰酸钾至淡紫色。

三、血中铬的检验

石墨炉原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验血中铬含量作为一项接触指标，对诊断铬中毒有重要意义。

2. 检验原理

血样加水稀释后，在波长 357.9nm 下，直接用石墨炉原子吸收光谱法测定铬的浓度，用标准加入法定量。

Cu^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2-}、Co^{2-}、Mn^{2+}、Fe^{3+}、Ti^{4+}、V^{5+}等离子不干扰测定。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长 357.9nm；光谱通带 0.2nm；灯电流 20mA；进样量 20μL；氩气流量 $1L \cdot min^{-1}$（原子化时停气）；干燥 15～17A/60s（阶梯）；灰化 100A/70s（阶梯）；原子化 230A/4s（阶梯）；清洗 300A；背景校正，氘灯或塞曼效应。

参照上述仪器条件，将原子吸收分光光度计调节到最佳测定状态。

首先测定各标准管、试剂空白管（盛 $0.5g \cdot L^{-1}$肝素钠溶液）、样品管（不经预处理的肝素抗凝血液）的吸光度，以铬质量浓度为横坐标，以各管的吸光度减去空白管的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后，由标准曲线外推（延）与横坐标相交，交点与原点的距离所相当的浓度，即为血样中铬的浓度。按下式计算原血样中铬的质量浓度：

$$\rho = 20\rho_1 \tag{3-14}$$

式中 ρ——血样中铬的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

ρ_1——从标准曲线查得的铬质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

20—— 血样稀释倍数。

检验大批样品时，可采用标准加入计算法定量。即分别取两份 0.1mL 按 D（1）项采集的血样，置于 5mL 试管中，其中一份加入一定量的标准溶液（加入铬产生的吸光度应接近血样吸光度的一半），两份同时补加水至 2mL，按最佳仪器操作条件测定吸光度，同时做空白试验。由两样品的吸光度减去空白的吸光度，按下式计算出血样中铬的质量浓度：

$$\rho = 20\rho_2 \frac{A_r}{A_0 - A_r} \tag{3-15}$$

式中 ρ ——血样中铬的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

A_0——样品加标的吸光度减去空白的吸光度；

A_r—— 样品加水的吸光度减去空白的吸光度；

ρ_2——样品加标后铬的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$。

B 试剂

（1）重铬酸钾 分析纯。

（2）肝素钠 $0.5g \cdot L^{-1}$。

（3）铬标准贮备溶液 准确称取 2.8288g 预先在 120℃干燥 2h 的重铬酸钾，用水溶解，转移入 1000mL 容量瓶中，稀释至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 $1mgCr^{6+}$。

（4）铬标准应用溶液 临用前，用水稀释成每 1mL 含 $0.1\mu gCr^{6+}$。

C 仪器

（1）原子吸收分光光度计，具石墨炉。

（2）铬空心阴极灯。

（3）热解石墨管。

（4）具塞刻度试管 5mL。

（5）微量移液管 20μL。

（6）聚乙烯塑料瓶 10mL。

玻璃和塑料器皿均用体积分数为 10%硝酸浸泡过夜，用去离子水冲洗干净，晾干后避尘保存备用。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。将采集的静脉血置于预先加入肝素钠（1mg·mL⁻¹血）的聚乙烯塑料瓶中，充分振摇。可在常温下运输。带回实验室立即检验，或于冰箱中约−8℃下保存，至少可稳定两星期。

(2) 空白试验。取0.05%肝素钠溶液，按最佳仪器操作条件测定。

(3) 样品处理。将血样从冰箱中取出，放至室温，充分振摇混合后，取出1mL，加9mL水，混匀后，供测定用。

(4) 标准曲线（标准加入法）的绘制。取4个5mL具塞刻度试管，按表3-10配制标准系列。

表3-10 铬标准系列的配制

管号	铬标准应用溶液/mL	水/mL	经处理的血样/mL	铬质量浓度/μg·L⁻¹
0	0	1.00	1.0	0
1	0.08	0.92	1.0	4
2	0.16	0.84	1.0	8
3	0.24	0.76	1.0	12

按最佳仪器操作条件测定各管和空白管的吸光度。

(5) 样品测定。采用标准加入法进行样品测定。

4. 注意事项

(1) 本法适用于接触铬的人血中铬的测定。本法最低检测限为0.54μg·L⁻¹。

(2) 采样前，应将采样部位依次用稀硝酸、EDTA水溶液、去离子水、酒精彻底清洗，以防污染。

(3) 本法采集的血样不经预处理，直接进行检验，依靠选择样品灰化条件，清除样品基体干扰，如有必要可使用背景校正。本法中仪器条件适用于早期进口仪器和国产仪器。

思 考 题

1. 检验粮食、蔬菜、水果、鱼类、肉类等生物样品中铬的含量有什么意义？

2. 用二苯碳酰二肼分光光度法检验尿中铬含量的原理是什么？

3. 用二苯碳酰二肼分光光度法检验尿中铬含量时，过量的高锰酸钾用什么还原？铬的显色反应酸度怎样控制？

4. 检验血中铬含量时，采集的血样用什么抗凝？

第五节 砷的检验

一、粮食、蔬菜、水果、茶叶、水产品等生物样品中砷的检验

二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷分光光度法

1. 检验意义

元素砷的毒性低，砷的氧化物和盐类多数有剧毒，以三价砷的毒性最大，砷是致癌物。

砷通过消化道、呼吸道或皮肤接触进入人体，并在体内积累，砷的排泄缓慢，甚至在停止摄入，脱离接触后，砷仍可在体内残留数年之久，砷积累在体内引起慢性中毒。

砷慢性中毒，使人患消化系统、神经系统和皮肤病，使人脱发、脱指甲、四肢麻木，甚至偏瘫。

砷急性中毒，使人乏力、烦躁不安、头痛、头晕、咽部红肿、咳嗽、恶心、呕吐、胸痛、呼吸困难、痉挛、甚至昏迷而死亡。砷急性中毒是少见的，一般是由于事故。

检验动物、植物、水生生物等生物样品中砷的残留含量作为生物食品限量指标，可控制进入食物链的砷对人类的毒害。

我国食品卫生标准中对食品中总砷的限量规定为：蔬菜、水果、肉类、淡水鱼$\leqslant 0.5mg \cdot kg^{-1}$；海产食品中无机砷限量为：鱼类$\leqslant 0.5mg \cdot kg^{-1}$；贝类、甲壳类、其他海产品$\leqslant 1.0mg \cdot kg^{-1}$。

藻类（干重计）、甲壳类干制品（以干重计）$\leqslant 0.2mg \cdot kg^{-1}$。

2. 检验原理

样品经消解后，砷全部转化为五价砷，用碘化钾、氯化亚锡将五价砷还原成三价砷，由锌粒和酸反应生成的新生态氢将三价砷还原成砷化氢，用乙酸铅棉花吸除硫化氢后，砷化氢用二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷溶液吸收被还原成红色胶状的银，在520nm处测定吸光度，与标准系列比较，以此进行定量。

吸收反应生成的游离二乙基二硫代氨基甲酸，即HDDC需要与有机碱（以NR_3代表），如三乙醇胺或吡啶、马钱子碱等吸收，使反应向右进行，提高颜色的稳定性和灵敏度，本法中使用三乙醇胺，三氯甲烷为溶剂。主要反应式如下：

$$3As+5HNO_3+2H_2O=\!=\!=3H_3AsO_4+5NO$$

$$2As+3H_2SO_4=\!=\!=As_2O_3+3SO_2+3H_2O$$

$$3As_2O_3+4HNO_3+7H_2O=\!=\!=6H_3AsO_4+4NO$$

$$Zn+H_2SO_4=\!=\!=ZnSO_4+H_2\uparrow$$

$$FeS+H_2SO_4=\!=\!=FeSO_4+H_2S\uparrow$$

$$H_3AsO_3+3H_2\uparrow=\!=\!=AsH_3\uparrow+3H_2O$$

$$4H_3AsO_3+6SnCl_2+6H_2SO_4=\!=\!=4As+3SnCl_4+3Sn(SO_4)_2+12H_2O$$

$$2As+3Zn+3H_2SO_4=\!=\!=2AsH_3\uparrow+3H_2SO_4$$

$$H_3AsO_4+2KI+H_2SO_4=\!=\!=H_3AsO_3+K_2SO_4+I_2+H_2O$$

$$H_3AsO_4+SnCl_2+2HCl=\!=\!=H_3AsO_3+SnCl_4+H_2O$$

$$H_2S\uparrow+Pb(CH_3COO)_2=\!=\!=PbS\downarrow+2CH_3COOH$$

$$AsH_3+6Ag(DDC)=\!=\!=\underbrace{AsAg_3\cdot 3AgDDC+3HDDC}_{\text{红色溶胶}}$$

$$AsAg_3\cdot 3AgDDC+3HDDC+3NR_3=\!=\!=3(NR_3H)(DDC)+\underbrace{6Ag+As(DDC)_3}_{\text{棕红色胶状银}}$$

干扰及消除：0.5mg的铜、钴、镍、铅、铬及0.1mg锰不干扰砷化氢的生成。铜、钴、镍、铬、银、汞、铂的质量浓度高达5mg·L^{-1}时，不干扰测定。三价铁能抑制砷化氢的产生，用盐酸羟胺还原可除干扰。硫化氢、磷化氢、锑化氢、铋化氢也能与银

盐吸收液作用生成红色胶体银而干扰砷的测定，但硫化氢可用乙酸铅棉花除去，而硫、磷在处理样品时，已被氧化成硫酸盐和磷酸盐，锑化氢和铋化氢可加入碘化钾和氯化亚锡抑制其放出，从而消除干扰。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是将生物样品经湿法或灰化法消解，并按同一方法做试剂空白试验。消解将有机物转化成二氧化碳和水除去，使砷全部转化为砷酸，砷酸被碘化钾和氯化亚锡还原为亚砷酸，亚砷酸又被酸与锌粒反应产生的氢还原成为砷化氢，用乙酸铅棉花吸除硫化氢后，砷化氢被溶于三乙醇胺-三氯甲烷中的二乙基二硫代氨基甲酸银吸收生成红色胶状的银。

取标准管，用 1.0cm 吸收池，以 0 管作参比调零，在波长 520nm 处测定吸光度。以砷质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

按湿法消解液绘制标准曲线的操作方法测定样品和空白液的吸光度，查标准曲线可分别得到样品消解液中砷的质量和空白液中砷的质量。按下式计算砷的质量浓度（或质量分数 w，$mg \cdot kg^{-1}$）：

$$\rho \text{ 或 } w = \frac{m_1 - m_2}{m(V_1/V_2)} \tag{3-16}$$

式中 ρ——样品中砷的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m_1——测定用消解液中砷的质量，μg；

m_2——试剂空白液中砷的质量，μg；

m——样品质量或体积，g 或 mL；

V_1——样品消解液的总体积，mL；

V_2——测定用样品消解液的体积，mL。

B 试剂

（1）硝酸。

（2）硫酸。

（3）盐酸。

(4) 氧化镁。

(5) 无砷锌粒。

(6) 硝酸-高氯酸混合酸溶液 (4+1)　量取 80mL 硝酸，加 20mL 高氯酸，混匀。

(7) 硝酸镁溶液 (150g·L^{-1})　称取 15g 硝酸镁〔$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$〕，溶于水中并稀释至 100mL。

(8) 碘化钾溶液 (150g·L^{-1})　贮于棕色瓶中。

(9) 酸性氯化亚锡溶液　称取 40g 氯化亚锡 ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$)，加盐酸溶解并稀释至 100mL，加入数颗金属锡粒。

(10) 盐酸 (1+1)　量取 50mL 盐酸，加水稀释至 100mL。

(11) 乙酸铅溶液 (100g·L^{-1})。

(12) 乙酸铅棉花　用 100g·L^{-1}乙酸铅溶液浸透脱脂棉后，压除多余溶液，并使疏松，在 100℃以下干燥后，贮于玻璃瓶中。

(13) 氢氧化钠溶液 (200g·L^{-1})。

(14) 硫酸 (6+94)　量取 6.0mL 硫酸，加于 80mL 水中，冷后再用水稀释至 100mL。

(15) 二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷溶液　称取 0.25g 二乙基二硫代氨基甲酸银〔$(C_2H_5)_2NCS_2Ag$〕，置于乳钵中，加少量三氯甲烷研磨，移入 100mL 量筒中，加入 1.8mL 三乙醇胺，再用三氯甲烷分次洗涤乳钵，洗液一并移入量筒中，再用三氯甲烷稀释至 100mL，放置过夜。滤入棕色瓶中贮存。

(16) 砷标准贮备溶液　准确称取 0.1320g 在硫酸干燥器中干燥过的或在 100℃干燥 2h 的三氧化二砷，加 5mL200g·L^{-1}氢氧化钠溶液，溶解后加 25mL (6+94) 硫酸，移入 1000mL 容量瓶中，用新煮沸冷却的水稀释至刻度，混匀，贮于棕色玻璃瓶中。此溶液每 1mL 含 0.10mg 砷。

(17) 砷标准应用溶液　吸取 1.0mL 砷标准贮备溶液，置于 100mL 容量瓶中，加 1mL (6+94) 硫酸，用水稀释至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 1.0μg 砷。

C　仪器

（1）可见分光光度计。

（2）测砷装置。

D　测定步骤

（1）样品消解。

1）硝酸-高氯酸-硫酸消解法。

①粮食、干豆、茶叶等含水分少的样品。称取5.00g或10.00g的磨碎样品，置于250～500mL定氮瓶中，先加少量水湿润，加数粒玻璃珠，10～15mL（4＋1）硝酸-高氯酸混合酸，放置片刻，低温缓慢加热，待作用缓和，放冷。沿瓶壁加入5mL或10mL硫酸，再加热，至瓶中液体开始变成棕色时，不断沿瓶壁滴加（4＋1）硝酸-高氯酸混合液至有机质分解完全。升高温度，至产生白烟，待瓶口白烟冒净后，瓶内液体再产生白烟为消解完全，该溶液应透明无色或微带黄色，放冷。在操作过程中应注意防止爆沸或爆炸。

加20mL水煮沸，除去残余的硝酸至产生白烟为止，如此处理两次，放冷。将冷后的溶液移入50mL或100mL容量瓶中，用水洗涤定氮瓶，洗液并入容量瓶中，放冷，加水至刻度，混匀。定容后的溶液每10mL相当于1g样品，相当加入1mL硫酸。

取与消解样品相同量的(4＋1)硝酸-高氯酸混合液和硫酸，按同一方法做试剂空白试验。

②蔬菜、水果。称取25.00g或50.00g洗净打成匀浆的样品，置于250～500mL定氮瓶中，加数粒玻璃珠，10～15mL（4＋1）硝酸-高氯酸混合液，以下按①项自“放置片刻”起操作，但定容后的溶液每10mL相当于5g样品，相当加入1mL硫酸。

③水产品。取可食部分样品，捣成匀浆，称取5.00g或10.00g（海产藻类、贝类可适当减少取样量），置于250～500mL定氮瓶中，加数粒玻璃珠，5～10mL（4＋1）硝酸-高氯酸混合液，混匀后，以下按①项自“沿瓶壁加入5mL或10mL硫酸”起操作。

2）硝酸-硫酸消解法。以硝酸代替（4＋1）硝酸-高氯酸混合液进行操作。

3）灰化法。

①粮食、茶叶及其他含水分少的样品。称取5.00g磨碎样品，置于坩埚中，加1g氧化镁及10mL 150g·L^{-1}硝酸镁溶液，混匀，浸泡4h。于低温或置水浴锅上蒸干，炭化至无烟后移入高温恒温电炉中加热至550℃，灼烧3～4h，冷却后取出。加5mL水湿润后，用细玻棒搅拌，再用少量水洗下玻棒上附着的灰分至坩埚内，置水浴上蒸干后移入高温恒温电炉550℃灰化2h，冷却后取出。

加5mL水湿润灰分，再慢慢加入10mL（1+1）盐酸，然后将溶液移入50mL容量瓶中，坩埚用（1+1）盐酸洗涤3次，每次5mL，再加水洗涤3次，每次5mL，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀。定容后的溶液每10mL相当于1g样品，其加入盐酸量不少于（中和需要量除外）1.5mL。全量供银盐法测定时，不必再加盐酸。

按同一操作方法做试剂空白试验。

②水产品。取可食部分样品，捣成匀浆，称取5.00g置于坩埚中，加1g氧化镁及10mL 150g·L^{-1}硝酸镁溶液，混匀，浸泡4h。以下按①项自“于低温或置水浴锅上蒸干”起依法操作。

（2）标准曲线的绘制。

1）吸取0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL砷标准应用溶液（相当0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0μg砷），分别置于150mL锥形瓶中，加水至40mL，再加10mL（1+1）硫酸。

2）用湿法消解时，于砷标准应用溶液中各加3mL 150g·L^{-1}碘化钾溶液，0.5mL酸性氯化亚锡溶液，混匀，静置15min，各加入3g锌粒，立即分别塞上装有乙酸铅棉花的导气管，并使管尖端插入盛有4mL银盐溶液的离心管中的液面下，在室温下反应45min后，取下离心管，加三氯甲烷补足4mL。用1.0cm吸收池，以0号管作参比调零，在波长520nm处测定吸光度。

3）用灰化法消解时，吸取0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL砷标准应用溶液（相当0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0μg砷），分别置于150mL锥形瓶中，加水至43.5mL，再加6.5mL盐酸，以下按2）项中“于砷标准应用溶液中”起依法操作。

(3) 样品测定。

1) 吸取一定量的消解后的定容溶液（相当于 5g 样品）及同量的试剂空白液，分别置于 150mL 锥形瓶中，补加硫酸至总量为 5mL，加水 50～55mL。按湿法消解绘制标准曲线的操作方法测定样品和空白液的吸光度，查标准曲线分别得测定用样品消解液中砷的质量和空白液中砷的质量。

2) 取灰化消解后的溶液及试剂空白液分别置于 150mL 锥形瓶中，以下按用灰化法消解绘制标准曲线的操作方法测定样品和空白液吸光度。

4. 注意事项

(1) 本法最低检测限为 0.2mg·kg $^{-1}$（测定用样品相当 5g）。

(2) 砷化氢有剧毒，产生此气前应严格检查发生器是否漏气。制气操作应在通风橱中进行并保持通风良好，反应温度以 40℃为宜。

(3)砷化氢发生器及所有与砷化氢接触的器皿均应分别用酸、碱、水煮沸处理。

(4) 试剂常含有微量砷，必须用同样的操作步骤进行空白试验，对测定结果进行校正。

硼氢化物还原分光光度法

1. 检验意义

检验意义同二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷分光光度法。

2. 检验原理

样品经湿法消解，使其中的砷以五价形式存在。当溶液中氢离子浓度大于 1.0mol·L $^{-1}$时，加入碘化钾-硫脲 [$SC(NH_2)_2$]，在抗坏血酸 ($C_6H_8O_6$) 存在下，并结合加热，能将五价砷还原为三价砷。在酸性条件下，用硼氢化钾将三价砷还原为负三价，形成砷化氢气体，用硝酸银-聚乙烯醇-乙醇混合溶液吸收砷化氢气体呈黄色溶液，黄色的深浅与溶液中砷含量成正比，与标准系列比较，用分光光度计在波长 400nm 处测量吸光度，定量。主要反

应式如下：

$$H_3AsO_4-2KI+H_2SO_4+SC(NH_2)_2 \xrightarrow[\triangle]{C_6H_8O_6}$$

$$H_3AsO_3+I_2+K_2SO_4+H_2O+SO_2\uparrow+2NH_3\uparrow+CO_2\uparrow$$

$$BH_4^-+H^++3H_2O=8[H]+H_3BO$$

$$As^{3+}+3[H]=AsH_3\uparrow$$

其他反应参见本节一、中银盐法。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是将生物样品经湿法消解，使砷以五价形式存在，同时作试剂空白消解。

在标准管、样品管、空白管的砷化氢发生瓶中，在强还原剂抗坏血酸存在下，用碘化钾-硫脲在加热条件下，将五价砷还原成三价砷。用甲基红指示液（变色范围 pH=4.4～6.2，酸性显红色，碱性显黄色），经氢氧化钠溶液调节至溶液刚显黄色，在柠檬酸-柠檬酸铵酸性缓冲溶液中，用硼氢化钾将三价砷还原成砷化氢气体，通过乙酸铅棉花吸除硫化氢气体，砷化氢气体被吸收液吸收形成黄色物质。用 1.0cm 吸收池，以标准管 0 号管作参比调零，在波长 400nm 处测定各管吸光度。以标准系列，各管砷质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

取样品管按绘制标准曲线的操作步骤测定吸光度，由样品管吸光度查标准曲线得测定用消解液中砷质量。按下式计算砷的质量浓度（或质量分数 w，$mg \cdot kg^{-1}$）：

$$\rho \text{ 或 } w = m_1/m \tag{3-17}$$

式中 ρ——样品中砷的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m_1——测定用消解液从标准曲线查得的砷质量，μg；

m——样品质量或体积，g 或 mL。

B 试剂

（1）碘化钾（$500g \cdot L^{-1}$）+硫脲溶液（$50g \cdot L^{-1}$）混合液（1+1）。

(2) 氢氧化钠溶液（400g·L^{-1}）和氢氧化钠溶液（100g·L^{-1}）。

(3) 硫酸（1+1）。

(4) 吸收液。配制的方法如下：

1) 硝酸银溶液（8g·L^{-1}） 称取4.07g硝酸银于500mL烧杯中，用适量水溶解后加入30mL硝酸，加水至500mL，贮于棕色瓶中。

2) 聚乙烯醇溶液（4g·L^{-1}） 称取0.4g聚乙烯醇（聚合度1500～1800）于小烧杯中，加入100mL水，沸水浴中加热，搅拌至溶解，保温10min，取出放冷备用。

3) 吸收液 取1）和2）溶液各1份，加入2份体积分数为95%的乙醇，混匀。使用时现配。

(5) 硼氢化钾片 将硼氢化钾与氯化钠按（1+4）质量比混合磨细，充分混匀后在压片机上制成直径为10mm，厚为4mm的片剂，每片为0.5g。避免在潮湿天气时压片。

(6) 乙酸铅（100g·L^{-1}）棉花 将脱脂棉浸于100g·L^{-1}乙酸铅溶液中，数分钟后挤去多余溶液，摊开棉花，80℃烘干后贮于广口玻璃瓶中。

(7) 柠檬酸（1.0mol·L^{-1}）-柠檬酸铵（1.0mol·L^{-1}） 称取192g柠檬酸、243g柠檬酸铵，用水溶解后稀释至1000mL。

(8) 砷标准贮备溶液 称取0.1320g经105℃干燥1h并置干燥器冷却至室温的三氧化二砷于100mL烧杯中，加入10mL2.5mol·L^{-1}氢氧化钠溶液，溶解后加5mL高氯酸、5mL硫酸，置电热板上加热至冒白烟，冷却后移入1000mL容量瓶中，并用水稀释至刻度。此溶液每1mL含0.100mg五价砷。

(9) 砷标准应用溶液 吸取1.00mL砷标准贮备溶液于100mL容量瓶中，用水稀释至刻度。此溶液每1mL含1.00μg五价砷。

(10) 甲基红指示液（2g·L^{-1}） 称取0.1g甲基红溶解于50mL体积分数为95%乙醇中。

C 仪器

同本节（一）法。

D 测定步骤

（1）样品处理。

1）粮食类样品。称取 5.00g 样品于 250mL 锥形瓶中，加入 5.0mL 高氯酸、20mL 硝酸、2.5mL（1＋1）硫酸，放置数小时后（或过滤），置电热板上加热，如溶液变为棕色，应补加硝酸使有机物分解完全，取下放冷，加 15mL 水，再加热至冒白烟，取下，用 20mL 水分数次将消解液定量转移入 100mL 砷化氢发生瓶中。同时作空白消解。

2）蔬菜、水果类样品。称取 10.00～20.00g 样品于 250mL 锥形瓶中，加入 3mL 高氯酸、20mL 硝酸、2.5mL（1＋1）硫酸。以下按 D（1）中 1）项操作。

3）动物性样品（海产品除外）。称取 5.00～10.00g 样品于 250mL 锥形瓶中，以下按 D（1）中 1）项操作。

4）海产品。称取 0.100～1.00g 样品于 250mL 锥形瓶中，加入 2mL 高氯酸、10mL 硝酸、2.5mL（1＋1）硫酸，以下按 D（1）中 1）项操作。

（2）标准曲线的绘制。

1）取 6 个 100mL 砷化氢发生瓶，依次加入砷标准应用溶液 0、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0mL（相当于 0、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0μg 砷），分别加水至 3mL，再加 2.0mL（1＋1）硫酸。

2）于标准砷化氢发生瓶中，分别加入 0.1g 抗坏血酸，2.0mL 500g·L^{-1}碘化钾-50g·L^{-1}硫脲溶液，置沸水浴中加热 5min（此时瓶内温度不得超过 80℃），取出放冷，加入 1 滴 2g·L^{-1}甲基红指示液，加入约 3.5mL 400g·L^{-1}氢氧化钠溶液，用 100g·L^{-1}氢氧化钠溶液调至溶液刚呈黄色，加 1.5mL 1.0mol·L^{-1}柠檬酸-1.0mol·L^{-1}柠檬酸铵溶液，加水至 40mL，加入 1 粒硼氢化钾片剂，立即通过塞有乙酸铅棉花的导管与盛有 4.0mL 吸收液的吸收管相连接，不时振摇砷化氢发生瓶，反应 5min 后再加入 1 粒硼氢

化钾片剂，继续反应 5min。取下吸收管，用 1.0cm 吸收池，在 400nm 波长下，以标准管 0 号管作参比调零，测定各管吸光度。

（3）样品测定。取样品管按 D（2）中 2）项操作，测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法最低检测限为 0.05mg·kg $^{-1}$（测定用样品相当 5g）。

（2）抗坏血酸 $C_6H_8O_6$ 是强还原剂，其中的烯二醇基具有还原性，反应产生的 I_2 能将其定量地氧化成二酮基，促使五价砷还原为三价砷的反应进行。但 $C_6H_8O_6$ 在空气中，特别是在碱性条件下极易被氧化，故应使溶液呈酸性，以防抗坏血酸受 I_2 以外的其他氧化剂的影响。

二、尿中砷的检验

二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷分光光度法

1. 检验意义

进入体内的砷主要随尿排出体外，检验尿中砷的含量作为砷中毒的一项参考指标，可以反映机体接触砷的情况。

正常尿中含砷有时可达 200μg·L $^{-1}$。

2. 检验原理

尿样经硫酸-硝酸-高氯酸消解后，在碘化钾和酸性氯化亚锡存在下，使五价砷还原成三价砷，然后与新生态氢反应，生成砷化氢气体，砷化氢被二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷溶液吸收，生成红色溶胶，在波长 520nm 处测定吸光度，与标准系列比较定量。主要反应式参见本节一、粮食、蔬菜、水果、茶叶、水产品等生物样品中砷的检验。

干扰及消除：锑对砷的测定干扰明显，当锑的量高于 50μg 时，结果明显增高；六价铬的量高于 30μg 时，会产生负干扰，但一般不会达到这么高的含量。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是将尿样经湿法消解，有机物转变成二氧化碳和水除去，砷变成五价。在消解后期，用草酸铵溶液为还原剂（产生新生态氢气）可消除微量的硝酸，可防砷挥发损失。

尿样与标准管、空白管溶液，用1.0cm吸收池，以0号管作参比调零，在波长520nm处测定吸光度。以砷质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

由样品吸光度从标准曲线查得砷的质量。按下式计算砷的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \tag{3-18}$$

式中 ρ—— 尿中砷的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m ——从标准曲线查得砷的质量，μg；

V ——测定时所取尿样体积，mL；

k ——见公式3-2。

B 试剂

（1）硫酸 $\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

（2）硝酸 $\rho_{20}=1.42g \cdot mL^{-1}$。

（3）高氯酸 $\rho_{20}=1.67g \cdot mL^{-1}$。

（4）硫酸溶液（1+1）。

（5）三氯甲烷。

（6）无砷锡粒 过1.651～0.833mm筛，蜂窝状。

（7）饱和草酸铵溶液。

（8）碘化钾溶液（$150g \cdot L^{-1}$）。

（9）氯化亚锡溶液 溶解40g氯化亚锡（$SnCl_2 \cdot 2H_2O$）于40mL盐酸（$\rho_{20}=1.19g \cdot mL^{-1}$）中，用水稀释至100mL。

（10）乙酸铅棉花 将脱脂棉浸入$100g \cdot L^{-1}$乙酸铅溶液中，沥干后烘干备用。

（11）二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷吸收液 溶解0.25g二乙基二硫代氨基甲酸银于约20mL三氯甲烷中，加1mL三乙醇胺，再用三氯甲烷稀释至100mL，放置过夜，过滤，保存于棕色瓶中。

(12) 砷标准贮备溶液　溶解 1.3200g 预先在 105 C烘干 2h 的三氧化二砷于 5mL 200g·L^{-1}氢氧化钠溶液中，用水稀释至 1000mL，混匀。此溶液每 1mL 含 1mg 三价砷。

(13) 砷标准应用溶液　临用前，将砷标准贮备溶液稀释成每 1mL 含 0.01mg 三价砷的标准应用溶液。

C　仪器

(1) 砷化氢发生装置。

(2) 分光光度计，具 1.0cm 吸收池。

(3) 聚乙烯塑料瓶或玻璃瓶，100mL。

(4) 尿相对密度计。

D　测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用洁净的塑料瓶或玻璃瓶收集接触砷化物工人班末尿至少 100mL，测量相对密度，在 4 C冰箱中可保存两星期。测定前将尿样混匀。

(2) 样品处理。取 25mL 尿样（相对密度 1.010～1.030）于锥形瓶中，加 2mL 硫酸（ρ_{20}=1.84g·mL^{-1}）和 3mL 硝酸（ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}），加热至液体出现棕黄色，冷却后加入 1mL 硝酸（ρ_{20}=1.42g·mL^{-1}）和 0.5mL 高氯酸（ρ_{20}=1.67g·mL^{-1}）加热至冒白烟，溶液应无色透明，否则补加硝酸，继续加热处理。冷却后，加 2mL 水和 4mL 饱和草酸铵溶液，加热至冒白烟，持续数分钟，但不得蒸干。冷却。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 6 个 150mL 锥形瓶，按表 3-11 配制标准系列。

表 3-11　砷标准系列的配制

管号	砷标准应用溶液/mL	水/mL	砷的质量/μg
0	0	30	0
1	0.10	29.90	1
2	0.30	29.70	3

续表 3-11

管号	砷标准应用溶液/mL	水/mL	砷的质量/μg
3	0.50	29.50	5
4	1.00	29.00	10
5	1.50	28.50	15

2)加 2mL 150g·L^{-1}碘化钾溶液，混匀，放置 5min，再加 1mL 氯化亚锡溶液，混匀后放置 15min，加 4g 无砷锌粒，立即塞上装有乙酸铅棉花的导气管，使产生的砷化氢气体通入盛有 5mL 吸收液的离心管中，反应 45min 后，取下离心管，用三氯甲烷补足至 5mL。用 1.0cm 吸收池，以 0 号管作参比调零，测定吸光度。

（4）样品测定。样品经消解处理后冷却，加 30mL 水，3mL（1＋1）硫酸溶液，按 D（3）中 2）项操作，测定吸光度。

4. 注意事项

(1)本法适用于正常人和接触砷化物人尿中砷含量的检验。最低检测限为 0.025mg·L^{-1}。

(2) 取样容器要用（1＋9）硝酸溶液浸泡 12h，以去除离子干扰并防止污染。

(3)反应中适应的酸度范围较宽，含 0.75～1.6mol·L^{-1}硫酸均可，但在 1.25mol·L^{-1}时结果最佳。

(4) 尿样消解时，温度应保持无泡沫溢出，防止液体溅到瓶壁上，并防止炭化。

(5) 尿液在消解过程中，如出现褐色物，表明开始炭化，可滴加少许硝酸继续加热，即可防止炭化。消解完全的尿液应无色透明。另外在加高氯酸前，必须待消解液稍冷至不烫手时加入，以防发生爆炸。

(6) 金属锌的表面积与砷的还原效果有很重要的关系，锌粒比锌片、锌粉好，粒度为 1.651～0.883mm 时反应平稳。

氢化物发生-火焰原子吸收光谱法

1. 检验意义

检验尿中砷含量的意义同二、中的二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷分光光度法。

2. 检验原理

尿样用混合酸消解，破坏有机物后，加入硼氢化钠，产生砷化氢气体，被载气输送到火焰燃烧器上的石英管中，在波长193.7nm下用原子吸收光谱法测定砷的含量。主要反应式如下：

$$BH_4^- + H^- + 3H_2O \longrightarrow 8\,[H] + H_3BO_3$$

$$As^{3+} + 3\,[H] \longrightarrow AsH_3\uparrow$$

干扰及消除：1倍量以上的Se^{4+}、10倍量以上的Cr^{6+}有明显干扰。但一般尿样中干扰元素的含量均未达到干扰水平，用尿样加标制备的标准曲线足以消除存在的干扰。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：波长193.7nm；光谱通带0.7nm；灯功率8W；乙炔流量2.5L·min^{-1}；氩气流量1.1L·min^{-1}；空气流量11.5L·min^{-1}。按以上条件将仪器调节至最佳状态。

尿样经硝酸-硫酸-高氯酸湿法消解，同时以相同的方法处理空白（水）和标准管。

以加入标准的砷质量浓度为横坐标，以测得标准管的吸光度减去0号管的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

取经消解处理的尿样于氢化物发生反应瓶中，在盐酸溶液中，用硼氢化钠（$NaBH_4$）溶液还原三价砷成为砷化氢，被氩气（载气）输送到乙炔-空气火焰燃烧器上的石英管中，按仪器操作条件测定吸光度，测得的吸光度减去空白吸光度后，从标准曲线查得尿中砷的质量浓度。按下式计算：

$$\rho = \rho_x k \tag{3-19}$$

式中 ρ——尿中砷的质量浓度，mg·L^{-1}；

ρ_x——从标准曲线查得砷的质量浓度，mg·L^{-1}；

k——见公式3-2。

B 试剂

(1) 硝酸　$\rho_{20}=1.42g \cdot mL^{-1}$，超纯。

(2) 硫酸　$\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$，高纯。

(3) 高氯酸　$\rho_{20}=1.75g \cdot mL^{-1}$，高纯。

(4) 盐酸　$\rho_{20}=1.19g \cdot mL^{-1}$，高纯。

(5) 氢氧化钠　高纯。

(6) 硼氢化钠（$NaBH_4$）　分析纯。

(7) 三氧化二砷　高纯。

(8) 盐酸溶液（3—97）。

(9) 氢氧化钠溶液（$10g \cdot L^{-1}$）。

(10) 还原剂　称取 3g 硼氢化钠，溶解于 $10g \cdot L^{-1}$ 氢氧化钠溶液中，加至 100mL。

(11) 硝酸-硫酸-高氯酸混合酸（3+1+1）。

(12) 砷标准贮备溶液　称取 1.3200g 三氧化二砷，溶于 50mL（3+97）盐酸溶液中，用水稀释至 1000mL，混匀。此溶液每 1mL 含 1.0mg 砷。

(13) 砷标准应用溶液　临用前，将砷标准贮备溶液逐级稀释成每 1mL 含 0.001mg 砷。

C　仪器

(1) 原子吸收分光光度计。

(2) 氢化物发生系统。

(3) 砷无极放电灯。

(4) 记录仪。

(5) 电热板　1000W。

(6) 聚乙烯塑料瓶　50mL、500mL。

(7) 容量瓶　25mL。

(8) 锥形瓶　100mL。

(9) 尿相对密度计。

玻璃和塑料器皿均用（1+1）硝酸浸泡过夜，冲洗干净，晾干后备用。

D　测定步骤

（1）采样、运输和保存。用塑料瓶收集班后尿，混匀后，尽快测量相对密度。取 20mL 尿，放入 50mL 塑料瓶中，可在室温下尽快运输，于 4℃下保存，不加任何保存剂，至少可保存两星期，测前混匀。

（2）样品处理。取 5mL 尿样于锥形瓶中，加入 1mL 混合酸，置电热板上，在较低温度下加热消解（必要时加少量硝酸防止炭化）至冒尽白烟，溶液无色为止，不得蒸干。冷却后用水溶解，定量转移到 25mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。

（3）空白试验。取 5mL 水代替尿样，按（2）项处理，然后再按（5）项进行测定。

（4）标准曲线的绘制。

1）取 6 个锥形瓶按表 3-12 配制标准系列。

表 3-12　砷标准系列的配制

管号	砷标准应用溶液/mL	正常人混合尿/mL	砷的质量浓度/mg·L^{-1}
0	0	5.0	0
1	0.05	5.0	0.010
2	0.10	5.0	0.020
3	0.20	5.0	0.040
4	0.30	5.0	0.060
5	0.40	5.0	0.080

2）按（2）样品处理的步骤进行处理，然后按（5）项测定吸光度。

（5）样品测定。取 5mL 经消解处理的样品于氢化物发生系统的反应瓶中，加 20mL（3+97）盐酸溶液，置氢化物发生系统上，自动加入还原剂硼氢化钠溶液，产生砷化氢，用氩气输送到乙炔-空气火焰上的石英管中，按最佳仪器操作条件测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触砷的人尿中砷的测定。最低检

测限为 0.002mg·L^{-1}。

（2）盐酸溶液和还原剂的浓度对氢化反应的影响很大，同一批样品要严格控制一致。

（3）尿样含砷量超出线性范围时，可将经处理后的样品溶液增加稀释倍数，计算结果再乘上稀释倍数。

（4）因硼氢化钠的溶液仅在数小时内使用，故应按半天用量配制，如将不溶物迅速过滤除去，可延长稳定时间，还可提高精密度。

（5）为降低火焰的噪声，除仪器上方排风设备造成由下而上的气流外，应控制室内其他空气对流。

三、头发中砷的检验

二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶分光光度法

1. 检验意义

砷在头发中积蓄能引起慢性中毒，潜伏期可达几年甚至几十年。检验头发中砷的含量可反映机体对毒物砷的接触和蓄积情况，发砷含量可作为诊断砷中毒的参考指标。

正常头发中砷的质量分数为 0.20～0.60μg·g^{-1}。

2. 检验原理

头发中的有机物质经硫酸、硝酸、高氯酸破坏后，砷被氧化为五价。以下除吸收液改用二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶液以外，其他同尿中砷的检验（银盐法）。

3. 检验方法

A 方法要点

此法首先用不锈钢剪刀将发样剪成 2cm 左右，分别用丙酮和乙醚洗涤，用中性洗涤剂洗涤，然后用水洗涤至无洗涤剂，最后再用丙酮和乙醚各淋洗一次。

然后取洗涤、干燥的头发用硝酸、硫酸、高氯酸消解。破坏有机物，使砷成为五价，溶液呈无色或淡黄色，冷却后加入饱和草酸铵溶液。以下同尿中砷的检验（银盐法），即为样品管溶液。

吸收液改为二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶吸收产生的砷化氢气体，绘制砷标准曲线同尿中砷的检验（银盐法）。

按绘制标准曲线时测定吸光度的操作步骤，测定样品管的吸光度，由吸光度查标准曲线得样品中砷质量。按下式计算砷的质量分数：

$$w = m_1/m_2 \tag{3-20}$$

式中 w——头发中砷的质量分数，$\mu g \cdot g^{-1}$；

m_1——从标准曲线查得样品管中砷质量，μg；

m_2——测定时所取头发的质量，g。

B 试剂

除吸收液外，其他同尿中砷的检验（银盐法）。

二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶吸收液 称取 0.25g 二乙基二硫代氨基甲酸银，溶于 100mL 吡啶中，贮于棕色瓶中可保存 1 星期。

C 仪器

同尿中砷的检验（银盐法）。

D 测定步骤

（1）样品处理。

1）发样清洗。用不锈钢剪刀，先将头发剪成 2cm 左右，取 2g 分别放在丙酮和乙醚中，搅拌洗涤 10min，然后用体积分数为 10% 中性洗涤剂，在 35℃不断搅拌洗涤 20min。再用水洗涤至无洗涤剂，最后再用丙酮和乙醚各淋洗一次，于 60℃干燥，备用。

2）样品消解。称取 0.5g 洗涤干燥的头发于 150mL 锥形瓶中，加 7mL 硝酸（$\rho_{20}=1.42g \cdot mL^{-1}$），5mL 硫酸（$\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$）。于电炉上加热至刚出现褐色时，取下稍冷，滴加约 10 滴硝酸（$\rho_{20}=1.42g \cdot mL^{-1}$）继续加热消解，并重复 2～3 次，待溶液呈无色或淡黄色时，取下冷却。加 2mL 高氯酸（$\rho_{20}=1.67g \cdot mL^{-1}$），加热至冒白烟，取下稍冷，加 4mL 饱和草酸铵溶液，以下同尿中砷的检验。即为样品管溶液。

（2）标准曲线的绘制

1）取 7 个砷化氢发生瓶，按表 3-13 配制标准系列。

表 3-13 砷标准系列的配制

管 号	砷标准应用溶液/mL	水/mL	砷 质 量/μg
0	0	25.0	0
1	0.50	24.5	0.5
2	1.00	24.0	1
3	3.00	22.0	3
4	5.00	20.0	5
5	7.00	18.0	7
6	10.00	15.0	10

2）加 4mL（1＋1）硫酸溶液，摇匀。

3）各标准管分别加入 2mL150g·L^{-1}碘化钾溶液，0.5mL 二氯化锡溶液（约 10 滴），摇匀，放置 15min。在气体导管中，分别预先装入松紧适度的乙酸铅脱脂棉。于 10mL 刻度离心管中各加入 4mL 二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶吸收液。向砷化氢发生瓶中，分别加入 5g 无砷锌粒，以下同尿中砷检验。

（3）样品测定。取样品管，按 D（2）中 2）项操作，测定吸光度。

4. 注意事项

（1）用吡啶配制二乙基二硫代氨基甲酸银吸收液吸收产生的砷化氢气体显色效果好，红色溶胶的颜色至少稳定 8h 不变。但吡啶具有恶臭、毒性大，使用应注意。

（2）二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶吸收液在吸收管内的高度应保持 10cm 左右，否则 AsH_3 不易吸收完全。

思 考 题

1. 用二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷分光光度法检验生物样品中砷含量时，用什么吸收砷化氢气体？其中三乙醇胺和三氯甲烷有什

么作用？

2. 用硼氢化物还原分光光度法检验粮食、蔬菜、水果、茶叶、水产品等生物样品中砷含量时，加入抗坏血酸有什么作用？为什么保持溶液呈酸性？

3. 用二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺 三氯甲烷分光光度法检验尿中砷含量时，处理尿样为什么加入饱和草酸铵溶液？

4. 用氢化物发生-火焰原子吸收光谱法检验尿中砷含量的原理是什么？

5. 用二乙基二硫代氨基甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷分光光度法检验生物样品中砷含量的原理是什么？

6. 用银盐法检验头发中砷含量时，吸收液改用二乙基二硫代氨基甲酸银-吡啶液有什么优点？

第四章　生物样品中污染物代谢产物的检验

第一节　酚的检验

一、尿中苯酚（及对、邻、间位甲酚）的检验

气相色谱法

1. 检验意义

不接触苯的人尿中主要有酚或对甲酚，很少人尿中有邻甲酚。苯进入人体后的主要转化产物之一是苯酚，而甲苯进入人体后的主要转化产物是对、邻、间位甲酚，均随尿排出。

检验尿中苯酚及对、邻、间位甲酚的含量可反映接触苯、甲苯、苯酚和甲酚的程度，反映环境状况。

2. 检验原理

尿样经加热酸解，用乙醚萃取出苯酚，经液晶 PBOB 柱将苯酚及邻、间、对位甲酚分离后，用氢火焰离子化检测器检测，以保留时间定性，内标法峰高定量。

3. 检验方法

A　方法要点

此法的固定液用液晶-双-（对-辛氧基苯甲酸）对苯二酚酯（PBOB），固定液的溶剂用二氯甲烷，担体用 Chromosorb W-AW-DMCS，0.175～0.147mm，即为经过硅烷化试剂二甲基二氯硅烷（DMCS）处理、酸洗处理的进口白色硅藻土担体。采用内标法定量。

色谱条件：色谱柱柱长 2m，内径 3mm，不锈钢或玻璃柱；固定相为固定液：磷酸：担体＝15：0.5：100，150℃通氮气老化 8h；柱温为每次检验开始，在 140℃恒温 1h，降至 112℃稳定后工

作；汽化室温度 180℃；氢焰离子化检测器检测室温度 160℃；载气为氮气，流速为 20mL·min^{-1}；内标物为硝基苯溶液。

首先取苯酚标准应用液的乙醚提取液进样测定。以苯酚质量浓度为横坐标，苯酚峰高与内标物峰高比为纵坐标，绘制标准曲线。

然后取经盐酸加热溶解、加入内标物溶液并用乙醚提取的样品乙醚液，注入气相色谱仪测定。在酚的混合样色谱图中各组分出峰的顺序为苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚。根据测得的苯酚峰高与内标物峰高比值查标准曲线。按下式计算苯酚的质量浓度：

$$\rho = (10\rho_z/V)k \qquad (4\text{-}1)$$

式中 ρ——尿中苯酚的质量浓度，mg·L^{-1}；

ρ_z——从标准曲线查得的苯酚质量浓度，mg·L^{-1}；

10——尿样处理时加水至体积，mL；

V——尿样体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 盐酸 (ρ_{20}=1.19g·mL^{-1})

(2) 无水乙醚

(3) 二氯甲烷（用作固定液溶剂）。

(4) 固定液 液晶-双-（对-辛氧基苯甲酸）对苯二酚酯(PBOB)。

(5) 担体 Chromosorb W-AW-DMCS，0.175～0.147mm。

(6) 苯酚标准贮备溶液 称取 0.0250g 苯酚，溶于少量水中，转移至 50mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 500μg 苯酚。

(7) 苯酚标准应用溶液 用水将苯酚标准贮备溶液稀释成每 1mL 含 100μg 苯酚。

(8) 内标（硝基苯）溶液 称取 0.0250g 硝基苯，溶于水中，转移至 50mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 500μg 硝基苯。

C 仪器

(1) 气相色谱仪，具氢焰离子化检测器。

(2) 电热恒温水浴。

(3) 冰壶。

(4) 容量瓶 50mL。

(5) 具塞离心管或具塞试管 10mL。

(6) 微量注射器 10μL。

(7) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1)采样、运输和保存。用聚乙烯塑料瓶收集约 50mL 班末尿，尽快测量比重，于室温下运输，夏季运输时最好冷藏，置 4℃冰箱中可保存两星期。

(2) 样品处理。取 5mL 经采集、运输和保存的尿样于具塞试管中，加入 1mL 盐酸，摇匀，加塞。于 90℃水浴恒温 1h 后，取出冷至室温，加 0.2mL 内标溶液，用水稀释至 10mL，放冰水浴冷至 0℃(约 5min)，加 3mL 乙醚，加塞振摇 1min。静置分层，必要时离心。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 7 个 10mL 具塞试管，分别加入 0、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、6.0mL 苯酚标准应用溶液，各加水至 6mL，然后分别加入 0.2mL 内标溶液，1.0mL 盐酸 (ρ_{20}=1.19g·mL^{-1})，加水至刻度，摇匀。此时标准管系列中苯酚的质量浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0mg·L^{-1}。

2) 上列标准管各加 3.0mL 无水乙醚，加塞振摇 1min 后，静置分层，取 5μL 乙醚萃取液进样测定。

(4) 样品测定。取 5μL 经处理的样品乙醚液，注入气相色谱仪测定。

4. 注意事项

(1) 本方法适用于正常人和接触苯、甲苯、苯酚和甲酚人尿中苯酚、对、邻、间位甲酚含量的测定，最低检测限为 0.1

$mg \cdot L^{-1}$，本书仅具体介绍了尿中苯酚的测定。

（2）正常人一般均取晨尿。接触者取班末尿为宜。

（3）乙醚作为萃取剂，它在水中有一定溶解度，且易挥发，萃取前后的样品及接触乙醚的器皿要置冰瓶中，并尽快测定。

（4）也可用外标法定量，标准系列和样品管中均不加内标液，直接以峰高定量。

二、尿中酚的检验

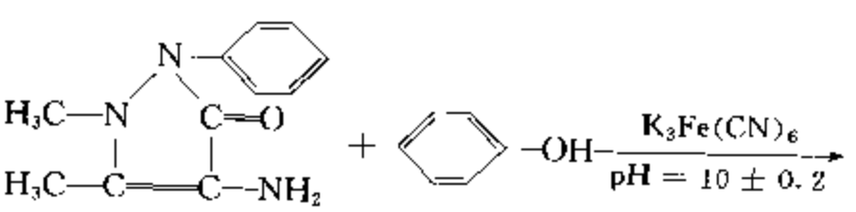
4-氨基安替比啉分光光度法

1. 检验意义

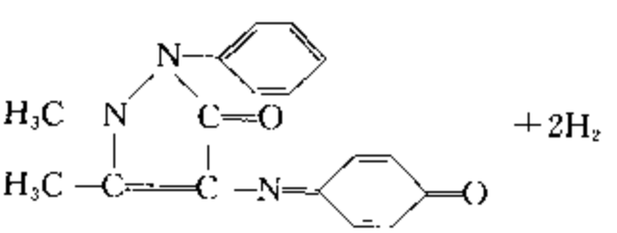
环境中的苯进入人体后主要转化为酚，并可以游离或结合状态随尿排出，检验尿中酚的含量可反映机体苯或酚吸收量的接触指标。

2. 检验原理

尿样在酸性条件下容易发生水解而产生游离酚，用水蒸气蒸馏的方法使游离酚随水蒸气一起蒸出，在碱性溶液中，在氧化剂铁氰化钾的存在下，游离酚容易与显色剂 4-氨基安替比啉发生显色反应，生成红色吲哚酚安替比啉染料，此产物在波长 510nm 处具有最大吸光度，用分光光度法测定，以此定量。主要反应式如下：



4-氨基安替比啉　　苯酚



红色吲哚酚安替比啉染料

正常人尿中含有的对甲酚基本不干扰显色。而邻甲酚和间甲

酚具有苯酚与显色剂类似的反应干扰显色，但一般人尿中不存在这两种酚。如受环境因素影响尿中含有这两种酚时，可用色谱法分离后测定。

3. 检验方法

A 方法要点

用水蒸气蒸馏将尿样经过水解产生的游离酚蒸馏出来，用4-氨基安替比啉作显色剂，在铁氰化钾共存的碱性溶液中，酚与显色剂生成红色吲哚酚安替比啉染料，用1.0cm吸收池，以空白溶液（蒸馏水）作参比调零，在波长510nm处测量吸光度。由吸光度查标准曲线得出酚质量。按下式计算酚的质量浓度：

$$\rho = (5m/V)k \qquad (4\text{-}2)$$

式中 ρ —— 尿中酚的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m —— 从标准曲线查得的酚质量，μg；

V —— 取经处理后的尿样体积，mL；

5 —— 取需要蒸馏的尿样体积，mL；

k —— 尿样换算成标准相对密度下的浓度校正系数，见公式3-2。

B 试剂

（1）硫酸 $\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

（2）冰乙酸。

（3）氢氧化钠溶液（1+14） 用前配制。

（4）4-氨基安替比啉溶液 $3g \cdot L^{-1}$。

（5）铁氰化钾溶液 （$10g \cdot L^{-1}$）。

（6）苯酚标准贮备溶液 称取0.5000g新蒸馏的苯酚，用少量水溶解，转入500mL容量瓶中，稀释至刻度，混匀。此溶液每1mL含1mg酚。

（7）苯酚标准应用溶液 临用时将苯酚标准贮备溶液稀释成每1mL含30μg酚。

C 仪器

（1）分光光度计，1.0cm吸收池。

(2) 全玻璃水蒸气蒸馏装置。

(3) 具塞比色管 25mL。

(4) 烧杯 50mL。

(5) 聚乙烯塑料管 100mL。

(6) 尿相对密度计。

D) 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。收集 150mL 以上班末尿于聚乙烯塑料瓶中，测量相对密度后，每 100mL 尿加入 1mL 冰乙酸，置 4℃冰箱中可保存两星期。

(2)样品处理。取 5mL 相对密度为 1.010～1.050 尿样置于蒸馏瓶中，加入 1.5mL 硫酸，摇匀后进行水蒸气蒸馏，收集 50mL 馏出液，取其中的 10mL 于试管中。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 6 个比色管，按表 4-1 配制标准系列。

表 4-1 酚标准系列的配制

管 号	酚标准应用溶液/mL	水/mL	酚质量/μg
0	0	10.0	0
1	0.5	9.5	15
2	1.0	9.0	30
3	2.0	8.0	60
4	3.0	7.0	90
5	5.0	5.0	150

2) 向各管中加入 1mL (1+14) 氢氧化铵溶液，1mL 3g·L^{-1} 4-氨基安替比啉溶液及 1mL 10g·L^{-1}铁氰化钾溶液。每加一种试剂后充分摇匀，再加另一种试剂，溶液混匀后，用 1.0cm 吸收池，以 0 号管作参比，于 510nm 波长处测定吸光度。以酚质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

（4）样品测定。取处理后的样品溶液按（3）中 2）项操作测定吸光度。

4. 注意事项

(1)本法适用于正常人和接触苯及酚的人尿中酚含量的检验，最低检测限为 2mg·l.$^{-1}$。

（2）应采集接触苯或酚的人班末尿，因为接触后尿中酚含量迅速增高，而脱离接触后尿中酚含量又很快下降，采样时间应严格控制。

（3）此法的显色产物不稳定，必须避光，吸光度的测定在 30min 内完成效果较好。

（4）空白试验的吸光度受 4-氨基安替比啉质量影响较大，必要时应提纯。

（5）蒸馏时，当水沸腾产生蒸汽后，应将火焰放低些，能维持蒸汽不断产生即可。这是为防蒸馏速度太快，酚蒸气不能充分冷凝而挥发散失，造成测定结果偏低。

（6）酚是对生物有毒害的物质，它能使农作物的可食部分有异味、减产、枯死，能使鱼类死亡，能使人和动物致癌，操作时应小心。

三、尿中对硝基酚的检验

邻甲酚分光光度法

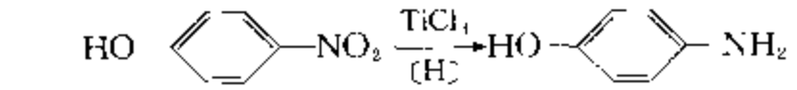
1. 检验意义

一般正常人尿中不含对硝基酚，当含有对硝基苯基的化合物或有机磷农药（对硫磷）进入人体后，可以转化为对硝基酚并很快随尿排出，接触愈多，进入体内的量愈多，尿中排出的量愈多。所以检验尿中对硝基酚的含量能反映接触这类物质的程度，了解环境状况。

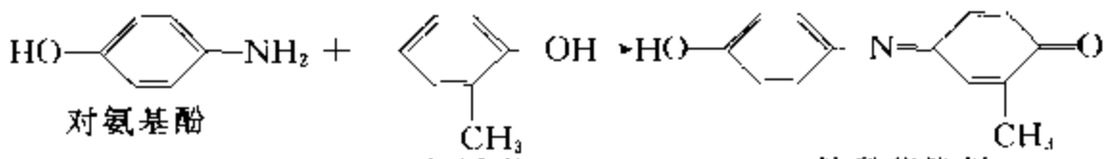
2. 检验原理

尿中对硝基酚以游离形式或与葡萄糖醛酸、硫酸等结合存在，尿样经水解后，结合的对硝基酚转化为游离形式，用有机溶剂萃

取对硝基酚，再反萃取至氨水中，用三氯化钛将对硝基酚还原成对氨基酚，与显色剂邻甲酚反应生成靛酚蓝染料，在波长 620nm 处测定吸光度，与标准系列比较，以此定量。主要反应式如下：



对硝基酚　　对氨基酚



对氨基酚　　邻甲酚　　靛酚蓝染料

3. 检验方法

A　方法要点

此法是用邻甲酚作显色剂。首先配制对硝基酚标准管，显色后，用 2.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，在波长 620nm 处测定吸光度。以对硝基酚质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后测定经处理后的尿样吸光度，由吸光度查标准曲线得样品溶液中对硝基酚质量。按下式计算对硝基酚的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \qquad (4\text{-}3)$$

式中　ρ——尿中对硝基酚的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m——从标准曲线查得的对硝基酚质量，μg；

V——测定时所取尿样体积，mL；

k　见公式 3-2。

B　试剂

(1) 盐酸　$\rho_{20}=1.19g \cdot mL^{-1}$。

(2) 氨水 ($3mol \cdot L^{-1}$)　取 50mL 浓氨水 ($\rho_{20}=0.88g \cdot mL^{-1}$)，用水稀释至 250mL。

(3) 有机溶剂萃取液　体积分数为 1% 的异戊醇溶液〔溶剂为 (4+1) 石油醚和乙醚的混合物〕。

(4) 邻甲酚溶液 ($20g \cdot L^{-1}$)　称取 2g 邻甲酚，溶于 100mL $0.2mol \cdot L^{-1}$氢氧化钠溶液中。

(5) 三氯化钛溶液　取 1mL 150～200g·L^{-1} 三氯化钛溶液，加水至 8mL，临用前配制。

(6) 对硝基酚标准贮备溶液　称 0.1000g 对硝基酚置于小烧杯中，用 3mol·L^{-1} 氨水溶解，转移至 100mL 容量瓶中，加 3mol·L^{-1} 氨水至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 1mg 对硝基酚。

(7) 对硝基酚标准应用溶液　用 3mol·L^{-1} 氨水将对硝基酚标准贮备溶液稀释成每 1mL 含 10μg 对硝基酚的标准应用溶液。

C　仪器

(1) 分光光度计，2.0cm 吸收池。

(2) 具磨口塞比色管　10mL，25mL。

(3) 分液漏斗　100mL。

(4) 聚乙烯塑料瓶　50mL 以上。

(5) 尿相对密度计。

D　测定步骤

(1) 采集、运输和保存。用聚乙烯瓶采集接触者班末尿 50mL 以上，测量相对密度后，每 100mL 加 3 滴甲醛，或将尿样置 4℃ 冰箱中可保存 3d。

(2) 样品处理。

1) 吸取 5.0mL 已经测量相对密度的尿样于 25mL 具塞比色管中，加 5mL 水，加 2mL 盐酸（ρ_{20}=1.19g·mL^{-1}），混匀，加塞，置沸水浴中加热 1h（加热不久，应松开塞一次），冷至室温。

2) 将样液倒入 100mL 分液漏斗中，加入 25mL 有机萃取液，置振荡器上强烈振摇 10min，静置分层，弃去水层。用 5.0mL 3mol·L^{-1} 氨水将有机层强烈振摇 3min，静置分层，将氨水层放入干燥的比色管中。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 6 个比色管，按表 4-2 配制标准系列。

2) 各加 2mL 盐酸（ρ_{20}=1.19g·mL^{-1}），混匀，加塞，于沸水浴中加热 1h，放冷。按（2）中 2）项继续操作。

表 4-2　对硝基酚标准系列的配制

管　号	标准应用溶液/mL	水/mL	对硝基酚质量/μg
0	0	10.0	0
1	0.1	9.9	1
2	0.2	9.8	2
3	0.6	9.4	6
4	1.0	9.0	10
5	1.5	8.5	15
6	2.0	8.0	20

3）于比色管中加入 1.0mL 20g·L^{-1}邻甲酚溶液，混匀，加入 1mL 三氯化钛溶液，立即振摇至黄色沉淀变成浅黄色沉淀为止，将显色液用滤纸滤入 10mL 比色管中，30min 后，用 2.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，测定吸光度。

（4）样品测定。将按 D（2）中 2）项制备的氨水层样品溶液按 D（3）中 3）项操作测定吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于接触硝基苯类化合物的人尿中对硝基酚含量的测定，最低检测限为 0.2mg·L^{-1}。

（2）采样时要脱离现场环境，换工作服，洗手，防止尿样污染。

（3）不含对硝基酚的尿样，当相对密度在 1.012～1.025 之间时，尿样本身空白值对测定的影响可忽略不计。

（4）加入三氯化钛溶液后，一定要振摇至黄色沉淀变成浅黄色沉淀为止，显色后的溶液经滤纸过滤后，在 3mol·L^{-1}碱度条件下，30min 显色完全，颜色在 120min 内稳定不变。

（5）有机磷农药因品种不同，代谢产物不同，而对硫磷在肝脏氧化成对氧磷，最后分解成为对硝基酚随尿排出。因此本法也适用于接触对硫磷农药的人尿中对硝基酚含量的测定。

四、尿中对氨基酚的检验

盐酸萘乙二胺分光光度法

1. 检验意义

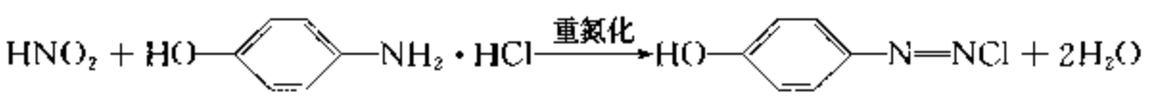
当硝基苯和苯胺类化合物进入人体后，会转化为对氨基酚并随尿排出。检验尿中对氨基酚的含量可作为机体吸收此类物质的辅助指标，反映接触此类物质的情况。

2. 检验原理

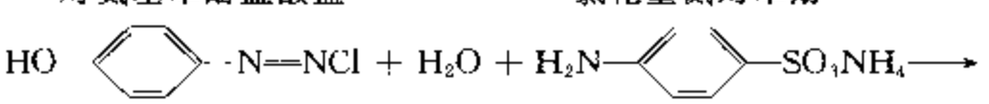
尿样加盐酸水解后，在中性溶液中，用乙酸乙酯萃取对氨基酚，再酸化反萃取到盐酸溶液中，经重氮化后，用盐酸萘乙二胺法显色。在波长 582nm 处测定吸光度，与标准系列比较，定量对氨基酚的含量。主要反应式如下：

$$NaNO_2 + HCl = HNO_2 + NaCl$$

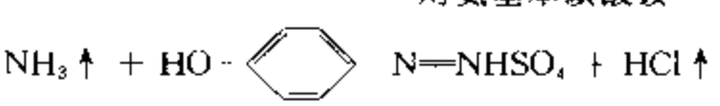
亚硝酸钠　盐酸　亚硝酸　氯化钠



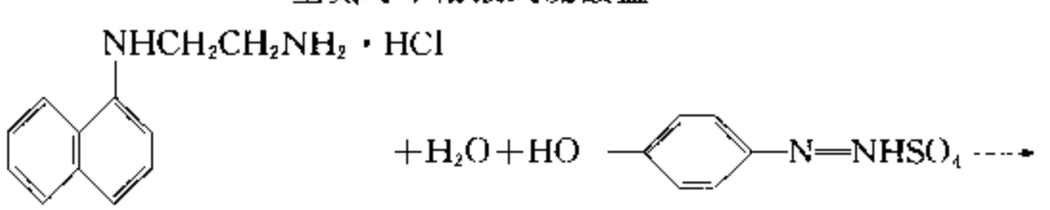
对氨基苯酚盐酸盐　　氯化重氮对苯酚



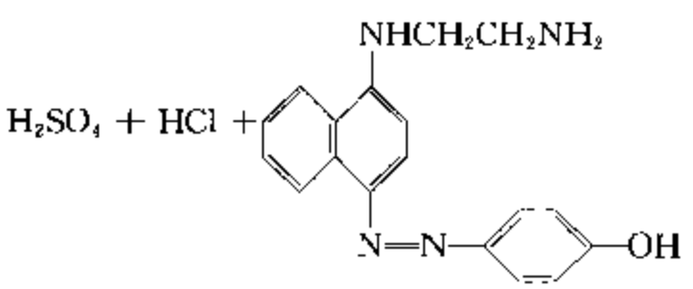
对氨基苯磺酸铵



重氮对苯酚酸式硫酸盐



盐酸 α- 萘乙二胺



4- 重氮苯酚 α- 萘乙二胺

3. 检验方法

A 方法要点

此法是用盐酸萘乙二胺作显色剂。首先配制对氨基酚标准管，显色后，用2.0cm吸收池，以尿空白管作参比调零，在波长582nm处测量吸光度。以对氨基酚质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后将尿样处理制备成酸性萃取液，按照绘制标准曲线的操作步骤测量吸光度。由吸光度查标准曲线得样品中对氨基酚的质量。按下式计算尿中对氨基酚的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \qquad (4\text{-}4)$$

式中 ρ —— 尿中对氨基酚的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m—— 从标准曲线查得的对氨基酚质量，μg；

V—— 测定时所取尿样体积，mL；

k——见公式3 2。

B 试剂

(1) 乙酸乙酯。

(2) 盐酸溶液 ($1.0mol \cdot L^{-1}$)。

(3) 盐酸溶液 ($0.1mol \cdot L^{-1}$)。

(4) 磷酸二氢钾溶液 ($0.067mol \cdot L^{-1}$)。

(5) 磷酸氢二钠溶液 ($0.067mol \cdot L^{-1}$)。

(6) 磷酸盐缓冲液 (pH=7.3) 取2份$0.067mol \cdot L^{-1}$磷酸二氢钾溶液和8份$0.067mol \cdot L^{-1}$磷酸氢二钠溶液混合。

(7) 氨基磺酸铵溶液 ($20g \cdot L^{-1}$)。

(8) 亚硝酸钠溶液 ($10g \cdot L^{-1}$) 临用时配制。

(9) 盐酸萘乙二胺溶液($10g \cdot L^{-1}$) 于冰箱中可保存1星期。

(10)对氨基酚标准贮备溶液 称取0.1000g对氨基酚置于小烧杯中，用$0.1mol \cdot L^{-1}$盐酸溶液溶解，转移至1000mL容量瓶中，加$0.1mol \cdot L^{-1}$盐酸溶液至刻度，混匀。此溶液每1mL含100μg对氨基酚。

(11)对氨基酚标准应用溶液 临用时取对氨基酚标准贮备溶

液，用 0.1mol·L⁻¹盐酸溶液稀释成每 1mL 含 20μg 对氨基酚的标准应用溶液。

C 仪器

(1) 分光光度计，2.0cm 吸收池。

(2) 具磨口塞比色管 10mL。

(3) 分液漏斗 100mL。

(4) 电动振荡器。

(5) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用 100mL 玻璃瓶收集接触者班末尿样，常温下带回实验室，测相对密度后于 4℃可保存 3d。

(2) 样品处理。

1) 取 2mL 测量相对密度后的尿样，于 10mL 比色管中，加 0.5mL 1.0mol·L^{-1}盐酸溶液，于沸水浴中加热水解 1h，放冷。

2) 用 0.1mol·L^{-1}氢氧化钠溶液调至中性，加 2mL 磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.3)，转移至 100mL 分液漏斗中，加 20mL 乙酸乙酯，于康氏振荡器上强烈振摇萃取 20min，静置分层，取有机相用 5mL 0.1mol·L^{-1}盐酸溶液反萃取 10min，弃去有机相。将酸性水相移入 10mL 比色管中。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 6 个比色管，按表 4-3 配制标准系列。

表 4-3 对氨基酚标准系列的配制

管 号	标准应用溶液 /mL	非接触者尿 /mL	1.0mol·L^{-1} 盐酸溶液/mL	对氨基酚质量 /μg
0	0	2.0	0.5	0
1	0.25	2.0	0.5	5
2	0.50	2.0	0.5	10
3	0.75	2.0	0.5	15
4	1.00	2.0	0.5	20
5	1.25	2.0	0.5	25

2）各管置沸水浴中煮沸 1h，放冷。按（2）中 2）项继续操作。

3）加入 0.4mL 10g·L^{-1}亚硝酸钠溶液，摇匀，静置 10min，加 0.4mL 20g·L^{-1}氨基磺酸铵溶液，充分振摇至无气泡发生为止，静置 10min，加 3mL 10g·L^{-1}盐酸萘乙二胺溶液，加水至刻度，混匀，在 60℃水浴中保温 1h，取出冷至室温，测量吸光度。

（4）样品测定。取 D（2）中 2）制备的酸性萃取样品溶液，按 D（3）中 3）项操作测量吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于接触苯胺类和硝基苯类化合物人尿中对氨基酚含量的测定，最低检测限为 0.5mg·L^{-1}。

（2）用玻璃瓶采集接触者班末尿样，采样时应脱离现场环境，防污染。但尿样不易久存，最好当天测定完毕。

（3）在采样前要对是否服用磺胺类药物进行记录，磺胺类药物会使测定结果偏高。

（4）对氨基酚的氨基重氮化后与盐酸萘乙二胺显色的深度与酸度有关，酸度影响测定结果，此反应酸度应控制在 0.05mol·L^{-1}为宜。

（5）因为对氨基酚的氨基受羟基的影响，与亚硝酸钠反应后，与盐酸萘乙二胺在常温下显色较慢而不稳定，所以本法选择在 60℃水浴保温 1h 立即测定，其颜色在 30min 内保持稳定。

（6）应该使用盐酸 α-萘乙二胺与重氮盐偶合，偶合反应在 4 位上发生，如 4 位被占，在 2 位上发生。而盐酸 β-萘乙二胺与重氮盐偶合时，反应在 1 位上发生，如 1 位被占，则不发生反应。

思 考 题

1. 用气相色谱法检验尿中苯酚含量时，用什么作固定液？用什么方法定量？

2. 用 4-氨基安替比啉分光光度法检验尿中酚含量时，为什么要采集接触苯或酚人的班末尿？

3. 蒸馏出尿中挥发酚（随水蒸气一起蒸馏出来的酚）时应注意什么？

4. 写出邻甲酚分光光度法检验尿中对硝基酚含量的主要反应式？

5. 用盐酸萘乙二胺分光光度法检验尿中对氨基酚时，显色反应为什么选择在 60℃ 水浴保温 1h 立即测定吸光度？

6. 用 4-氨基安替比啉分光光度法检验尿中酚含量时，使用的显色剂是什么？在什么条件下显色？

7. 检验尿中酚、对硝基酚和对氨基酚的含量有什么意义？

第二节　马尿酸、甲基马尿酸的检验

一、尿中马尿酸的检验

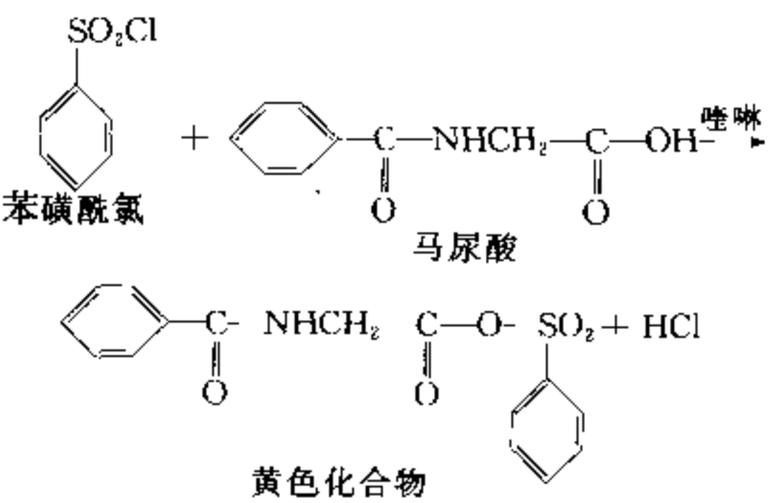
苯磺酰氯分光光度法

1. 检验意义

正常人尿中含有马尿酸。环境中的甲苯被吸入体内后，大部分转化为马尿酸并随尿排出体外，检验尿中马尿酸的含量可以反映机体甲苯吸收量的程度。

2. 检验原理

马尿酸在喹啉的存在下可以加快与苯磺酰氯的显色反应速度，生成黄色的化合物，即马尿酸苯磺酸酯，此化合物见光易分解，在乙醇溶液中显色反应更加完全，显色产物更稳定，在波长 470nm 处有最大吸光度，可用分光光度法定量。主要反应式如下：



苯磺酰氯　　马尿酸

黄色化合物

3. 检验方法

A 方法要点

此法是在喹啉和乙醇共存的情况下，用苯磺酰氯作显色剂。首先配制马尿酸标准系列，显色后，用 1.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，在波长 470nm 处测定吸光度。以马尿酸质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后将尿样显色，用 1.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，在波长 470nm 处测定吸光度，以乙醇作参比调零，测定尿样底色吸光度。以样品管吸光度减去尿样底色的吸光度，从标准曲线查得马尿酸的质量。按下式计算马尿酸的质量浓度：

$$\rho = \frac{mV_1}{0.5V_2}k \tag{4-5}$$

式中 ρ——尿中马尿酸的质量浓度，$g \cdot L^{-1}$；

m…样品吸光度减去尿底色吸光度后从标准曲线查得的马尿酸质量，mg；

V_1——尿样稀释后的总体积，mL；

V_2——取尿样体积，mL；

0.5——测定时所取稀释尿液体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 马尿酸 优级纯。

(2) 苯磺酰氯。

(3) 喹啉。

(4) 无水乙醇。

(5) 三氯甲烷。

(6) 马尿酸标准贮备溶液 称取 0.1000g 马尿酸，用水溶解，转移入 100mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 1.0mg 马尿酸。置 4℃冰箱保存备用。

(7) 马尿酸标准应用溶液 取 20.0mL 马尿酸标准贮备溶液于 50mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含

0.4mg 马尿酸。置 4℃冰箱内可保存 7d。

C 仪器

(1) 分光光度计，1.0cm 吸收池。

(2) 旋涡混合器。

(3) 具塞比色管 10mL。

(4) 容量瓶 50mL 100mL。

(5) 聚乙烯塑料瓶或玻璃瓶 100mL。

(6) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1) 采集、运输和保存。用塑料瓶或玻璃瓶收集 100mL 接触两天后的班末尿，尽快测量相对密度后按 (100+1) 的体积比加入三氯甲烷防腐，充分振摇混合，密闭瓶口，运至实验室，于 4℃冰箱内可保存两星期。

(2) 样品处理。取 5.0mL 尿样，用水稀释 1～5 倍，稀释备数视马尿酸的浓度而定。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 8 个比色管按表 4-4 配制标准系列。

表 4-4 马尿酸标准系列的配制

管 号	马尿酸标准应用溶液 /mL	水 /mL	马尿酸质量 /mg
0	0	0.5	0
1	0.05	0.45	0.02
2	0.10	0.40	0.04
3	0.15	0.35	0.06
4	0.20	0.30	0.08
5	0.25	0.25	0.10
6	0.30	0.20	0.12
7	0.40	0.10	0.16

2）各管加入 0.6mL 喹啉，混匀后再加入 0.2mL 苯磺酰氯，立刻盖紧管塞，在旋涡混合器上混合 20s（或用手强烈振摇 25～30 次），在 30℃±2℃条件下避光放置 30min。各管加入 3.7mL 乙醇，混匀，继续避光放置 30min。

3）用 1.0cm 吸收池，以试剂空白（0 号管）作参比调零测定吸光度。

（4）样品测定。

1）取 0.5mL 处理后的稀释尿液两份，分别加入两个比色管内，其中 1 个比色管按 D（3）中 2）项操作，另一个比色管只加 4.5mL 乙醇，作尿样底色测定。如加乙醇后溶液发生混浊，转入离心管，以 4000r·min $^{-1}$速度离心 10min。

2）用 1.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，测定样品吸光度。以乙醇作参比调零，测定尿样底色吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触甲苯人尿中马尿酸含量的检验，最低检测限为 0.006mg·L $^{-1}$。

（2）对于接触甲苯的人其尿样应采集接触两天的班末尿，尿样不易久存。

（3）根据尿样感观颜色确定是否需要配制尿样底色管，如果颜色正常又经多倍稀释，可不必配制。

（4）加苯磺酰氯后，显色反应时间不要少于 30min，吸光度的测定在 1h 内完成效果较好。

（5）测定步骤中的试剂加入顺序不能颠倒，加入苯磺酰氯后应立即振摇，各管的振摇强度和时间应保持一致。

（6）显色后的各项操作应尽量避光进行。

（7）尿样应新鲜，其颜色深浅不影响测定结果，如太混浊，可加乙醇离心分离。

（8）苯磺酰氯易挥发，刺激眼睛，又易分解，使用和保存时应注意。

二、尿中马尿酸或甲基马尿酸的检验

高效液相色谱法

1. 检验意义

甲苯被吸入体内后，大部分可以转化为马尿酸（HA）并随尿排出体外，测定尿中马尿酸的含量可以反映机体甲苯吸收量的接触指标。

二甲苯作为工业稀薄剂的代用品，其中间位、对位二甲苯被吸入体内后，氧化成甲基苯甲酸，最后形成甲基马尿酸（MHA）随尿排出体外，测定尿中甲基马尿酸的含量可以反映机体吸收间、对位二甲苯程度的指标，也可以作为检验空气中二甲苯污染水平的依据。

2. 检验原理

尿液经酸化后，用乙酸乙酯萃取其中的马尿酸和甲基马尿酸，用反相C_{18}键合多孔硅胶液相色谱柱分离，紫外检测器检测，以保留时间为定性检测，峰面积为定量检测。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是反相液相色谱法。

色谱条件：色谱柱柱长 150mm，内径 4.6mm，不锈钢柱；柱填料C_{18}键合多孔硅胶，5μm；柱温 35℃；流动相，甲醇＋水＋冰乙酸＝20＋80＋0.01；流速 1mL·min^{-1}；紫外检测器，波长 254nm，灵敏度 0.08AUFS。

首先绘制以马尿酸或甲基马尿酸的质量为横坐标，马尿酸或甲基马尿酸的峰面积为纵坐标的标准曲线。

然后取 10μL 处理好的样品注入色谱仪，按仪器条件测定，以保留时间定性，峰面积定量。从标准曲线上查出马尿酸或甲基马尿酸的质量。按下式计算：

$$\rho = \frac{m \times 1000}{V} k \qquad (4\text{-}6)$$

式中 ρ——尿中马尿酸或甲基马尿酸的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m——从标准曲线上查得的马尿酸或甲基马尿酸的质量，μg；

V——进样体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 盐酸 $\rho_{20}=1.19g \cdot mL^{-1}$。

(2) 冰乙酸 $\rho_{20}=1.05g \cdot mL^{-1}$。

(3) 氯化钠。

(4) 甲醇。

(5) 乙酸乙酯。

(6) 盐酸溶液 (1+1)。

(7) 马尿酸 色谱纯。

(8) 甲基马尿酸 色谱纯。

(9) 马尿酸 (HA) 和甲基马尿酸 (MHA) 标准溶液 各称取 50.00mg 马尿酸 (HA) 和甲基马尿酸 (MHA)，加水溶解，移入 50mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 1mgHA 或 MHA，4℃保存备用。

C 仪器

(1) 高效液相色谱仪，具紫外检测器。

(2) 离心机 $3000r \cdot min^{-1}$。

(3) 恒温水浴锅。

(4) 旋涡混合器。

(5) 具塞离心管 10mL。

(6) 具塞试管 5mL。

(7) 微量取样器 10μL。

(8) 聚乙烯塑料瓶 100mL。

(9) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用聚乙烯塑料瓶收集接触甲苯或二

甲苯人的班末尿，尽快测量相对密度，按体积分数为0.1%的比例加入盐酸（$\rho_{20}=1.19g\cdot mL^{-1}$），室温下运输。于4℃冰箱中可保存两星期，也可将样品提取、蒸干，于常温保存。

（2）样品处理。

1）取1.0mL尿样于离心管中。

2）加入0.1mL（1+1）盐酸溶液，0.3g氯化钠，4mL乙酸乙酯，于旋涡混合器上混合1min，以1000r·min^{-1}速度离心5min。取0.4mL乙酸乙酯于具塞试管中，置低于70℃水浴挥发至干。加1mL水溶解残留物。

（3）标准曲线的绘制。

1）取4个离心管，按表4-5配制标准系列。

表4-5 HA和MHA标准系列的配制

管　号	HA和MHA标准溶液/mL	水/mL	HA质量/mg	MHA质量/mg
0	0	1.00	0	0
1	0.10	0.90	0.1	0.1
2	0.20	0.80	0.2	0.2
3	0.50	0.50	0.5	0.5

2）以下按D（2）中2）项进行操作，得到溶解的残留物。

3）取10μL溶解的残留物注入色谱仪，将仪器调到最佳条件进行测定，以保留时间进行定性测定，峰面积进行定量测定。每个浓度重复测定3次，取峰面积平均值。以HA或MHA的质量（按上述条件操作，最后进样10μL，相当于0、0.1、0.2、0.5μg）为横坐标，以HA或MHA的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

（4）样品测定。取10μL处理好的样品注入色谱仪进行样品测定。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触甲苯、二甲苯人尿中马尿酸、甲

基马尿酸含量的测定。最低检测下限为马尿酸 0.015mg·L^{-1}，甲基马尿酸 0.03mg·L^{-1}。

（2）尿样除按体积分数为 0.1%的比例加入盐酸外，也可按 0.1%（质量分数）的比例加入百里酚，于 4℃保存，至少可以稳定 15d。尿样酸化，用乙酸乙酯提取，提取液蒸发干后保存，至少可以稳定半年。

思 考 题

1. 为什么加入苯磺酰氯后的各项操作应避光进行？

2. 用本法测定尿中马尿酸含量时，加入喹啉起什么作用？

3. 为什么检验接触甲苯、二甲苯人尿中马尿酸、甲基马尿酸的含量？

4. 此法用什么作色谱柱的填充物？用什么作流动相？什么是反相液相色谱法？

第三节 其他污染物代谢产物的检验

一、尿中 δ-氨基乙酰丙酸的检验

乙酸乙酯提取-对二甲氨基苯甲酸分光光度法

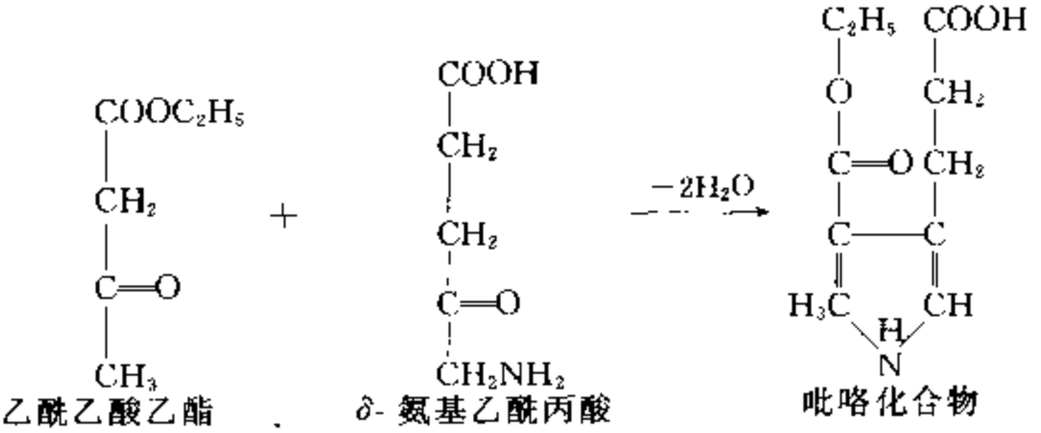
1. 检验意义

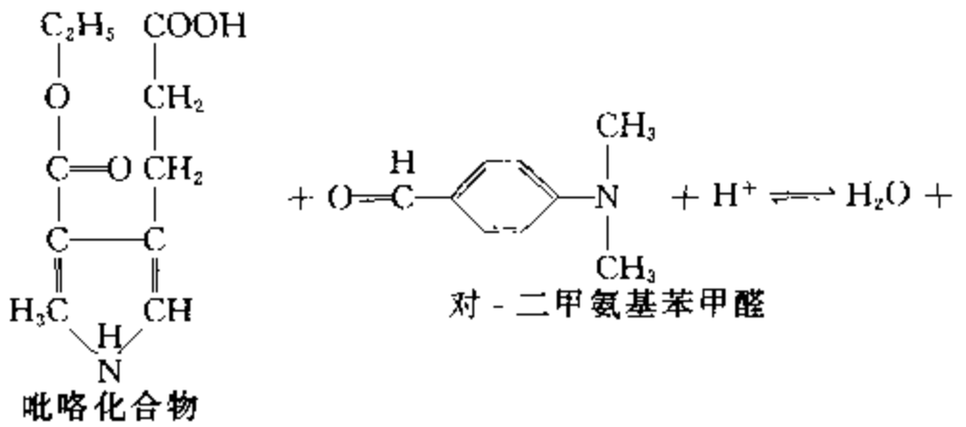
δ-氨基乙酰丙酸（δ-ALA）是正常人尿中的一种有机酸，当机体受到铅的作用时，会使尿中 δ-氨基乙酰丙酸的含量增高，而且这种增高出现比较早，具有特异性，其含量增高的程度与环境中铅的含量有明显关系，检验尿中 δ-氨基乙酰丙酸的含量有助于了解机体铅吸收和铅中毒的情况。

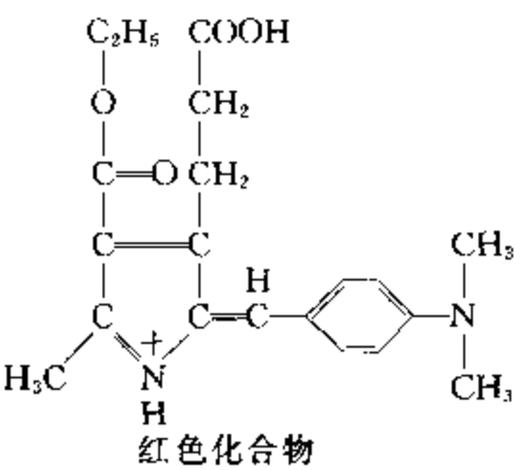
2. 检验原理

在 pH=4.6 的缓冲溶液中及温度为 100℃的条件下，尿中的 δ-氨基乙酰丙酸与乙酰乙酸乙酯缩合生成吡咯化合物，此化合物用乙酸乙酯提取，被提取的吡咯化合物与显色剂对-二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物，在波长 554nm 处用分光光度计测量吸光

度，定量。其他能与显色剂反应的物质，因为不被乙酸乙酯提取，所以不干扰测定。主要反应式如下：







3. *检验方法*

A　*方法要点*

此法用对-二甲氨基苯甲醛作显色剂。首先配制δ-氨基乙酰丙酸标准管，显色后，用1.0cm吸收池，以0号管（试剂空白）作参比调零，在波长554nm处测量吸光度。以δ-氨基乙酰丙酸的质量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后测定经处理后的样品溶液的吸光度，将样品管吸光度减去空白管吸光度，从标准曲线上查得样品管中 δ-氨基乙酰丙酸的质量。按下式计算 δ-氨基乙酰丙酸的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \tag{4-7}$$

式中 ρ—— 尿中 δ-氨基乙酰丙酸的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m——样品管中 δ-氨基乙酰丙酸的质量，μg；

V—— 测定时所取尿样的体积，mL；

k——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 冰乙酸 $\rho_{20}=1.05g \cdot mL^{-1}$。

(2) 高氯酸 $\rho_{20}=1.67g \cdot mL^{-1}$。

(3) 无水乙酸钠。

(4) 对-二甲氨基苯甲醛。

(5) 乙酰乙酸乙酯。

(6) 乙酸乙酯。

(7) 乙酸盐缓冲溶液(pH=4.6) 于 700mL 水中加入 57mL 冰乙酸 ($\rho_{20}=1.05g \cdot mL^{-1}$)，82g 无水乙酸钠，溶解后加水至 1000mL。

(8) 显色剂 于 30mL 冰乙酸中加入 1g 对-二甲氨基苯甲醛，5mL 高氯酸 ($\rho_{20}=1.67g \cdot mL^{-1}$)，5mL 水，溶解后用冰乙酸稀释至 50mL，混匀，置冰箱保存。

(9) δ-ALA 标准贮备溶液 称取 0.01280g δ-ALA·HCl，用水溶解后，移入 100mL 容量瓶中，稀释至刻度，混匀。此溶液每 1mL 含 0.10mg δ-ALA。

(10) δ-ALA 标准应用溶液 用水将 δ-ALA 标准贮备溶液稀释成每 1mL 含 10μg δ-ALA 溶液。

C 仪器

(1) 分光光度计，1.0cm 吸收池。

(2) 具塞比色管 10mL。

(3) 离心机。

(4) 聚乙烯塑料瓶 100mL。

(5) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用塑料瓶收集铅接触人尿样 50mL，尽快带回实验室（夏季运输最好冷藏），测相对密度后，置 4℃冰箱可保存两星期。

(2) 样品处理。

1) 各取 1mL 尿样于两个 10mL 具塞比色管中，各加 1mL 水，2mL pH=4.6 的乙酸盐缓冲溶液，混匀。其中一个为样品管，另一个为空白管。

2) 向样品管中加入 0.4mL 乙酰乙酸乙酯，向空白管中加入 0.4mL pH=4.6 的乙酸盐缓冲溶液，充分混匀。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 6 个 10mL 具塞比色管，按表 4-6 配制标准系列。

表 4-6 δ-ALA 标准系列的配制

管 号	δ-ALA 标准应用溶液 /mL	水 /mL	δ-ALA 质量 /μg
0	0	2.0	0
1	0.1	1.9	1.0
2	0.3	1.7	3.0
3	0.5	1.5	5.0
4	0.7	1.3	7.0
5	1.0	1.0	10.0

2) 向各管中加入 2mL pH=4.6 的乙酸盐缓冲溶液，0.4mL 乙酰乙酸乙酯，混匀。

3) 于沸水浴中加热 12min，取出冷至室温。

4) 各加入 4mL 乙酸乙酯，加塞振摇 100 次，离心 5min，静置分层。

5) 各取 2mL 乙酸乙酯提取液于 6 个 10mL 具塞比色管中，各

加 2mL 显色剂，混匀，静置 10min，以 0 号管作参比，测量吸光度。

（4）样品测定。取经处理后的样品溶液，按 D（3）中 2）～5）项操作，测量吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触铅的人尿中 δ-氨基乙酰丙酸含量的检验，最低检测限为 0.3mg·L^{-1}（取 0.5mL 尿样）。

（2）接触者的尿样采集时间不限，采样时不存在污染问题。因尿样很容易腐败，可使 pH 增高而影响测定结果，如不能及时测定，应将尿液置 4℃冰箱保存。

（3）用乙酰乙酸乙酯提取 δ-氨基乙酰丙酸的操作是在沸水浴中进行的，煮沸时间应从比色管放进水浴后，水重新沸腾开始计算时间，不得少于 12min。

（4）乙酰乙酸乙酯、乙酸乙酯最好是近期产品，乙酰乙酸乙酯如变成黄色即不能使用。

（5）显色剂易新鲜配制，并置冰箱保存。

（6）尿中 δ-氨基乙酰丙酸的含量高或颜色较深时，可减少取样量。加入显色剂混匀后，应静置 10min，显色完全后，生成的红色化合物在 1h 内稳定。

二、尿中硫氰酸盐的检验

吡啶-巴比妥酸分光光度法

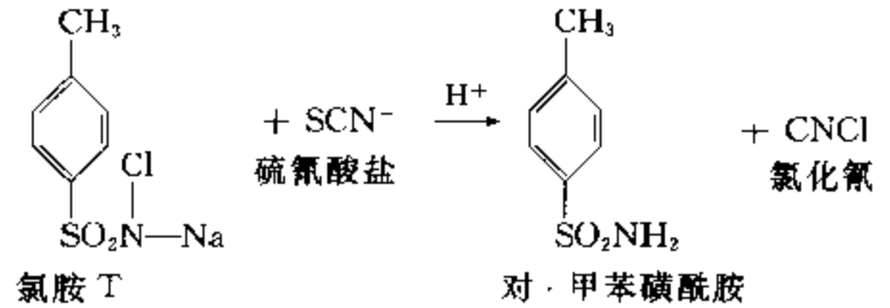
1. 检验意义

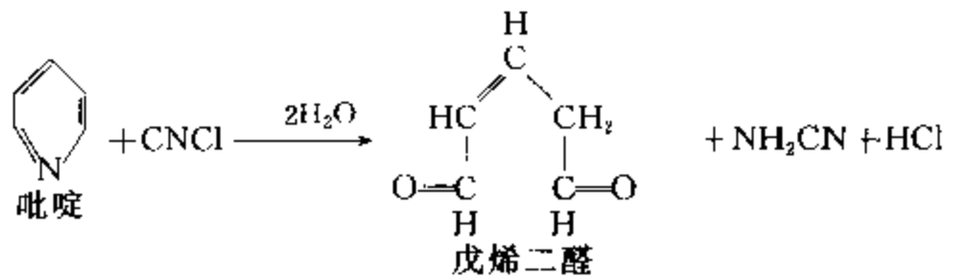
氰化物是剧毒物质，进入人体内的氰化物大部分与体内的硫结合为硫氰酸根随尿排出，测定尿中硫氰酸盐的含量可作为无机氰和有机氰化物的接触指标，也可作为判断急性氰化物中毒的辅助指标。

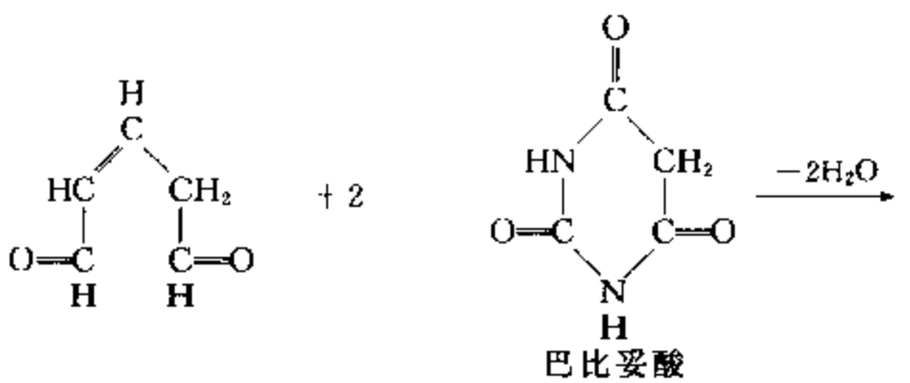
2. 检验原理

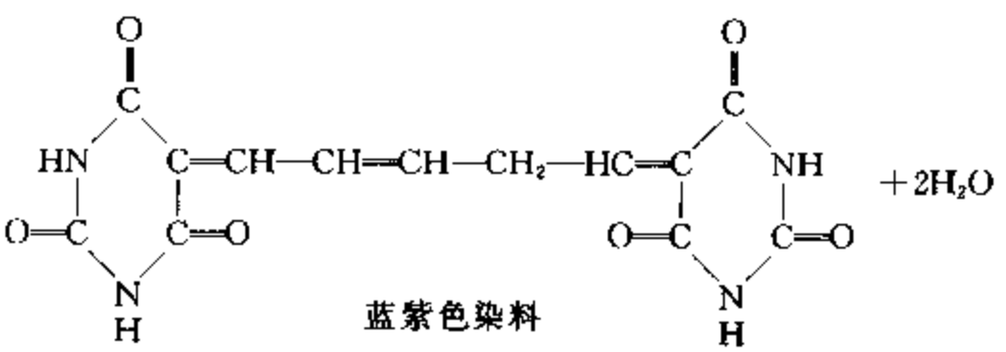
在微酸性条件下，尿中硫氰酸盐和氯胺 T 反应生成氯化氰。氯化氰使吡啶环断裂开，产生戊烯二醛。戊烯二醛与巴比妥酸作

用生成紫红色染料，此染料的色度与硫氰酸盐含量成正比，在波长 580nm 处测定吸光度，以此定量。主要反应式如下：









3. 检验方法

A 方法要点

此法是用吡啶-巴比妥酸作显色剂。首先配制硫氰酸盐标准管，显色后，用 1.0cm 吸收池，以 0 号管（试剂空白）作参比调零，在波长 580nm 处测定吸光度。以 SCN^- 的质量为横坐标，以 2～6 号管的吸光度减去 1 号管的吸光度为纵坐标，绘制标准曲

线。

然后测定新鲜尿样的吸光度，由吸光度从标准曲线上查得硫氰酸盐的质量。按下式计算硫氰酸盐的质量浓度：

$$\rho = (m/V)k \tag{4-8}$$

式中 ρ——尿中硫氰酸盐的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

m——从标准曲线查得的硫氰酸盐质量，μg；

V——测定时所取尿样体积，mL；

k ——见公式 3-2。

B 试剂

(1) 盐酸溶液 (1+3)。

(2) 硫氰酸钾 优级纯。

(3) 氯胺 T 溶液 ($10g \cdot L^{-1}$)。

(4) 磷酸盐缓冲溶液 (pH=7) 称取 2.79g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 和 4.14g 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 溶于少量水中，用水稀释至 1000mL。

(5) 吡啶-巴比妥酸溶液 称取 0.18g 巴比妥酸溶于 3mL 吡啶及 10mL (1+3) 盐酸溶液中，用水稀释至 100mL (临用前配制)。

(6) 硫氰酸盐标准贮备溶液 称取 0.1673g 已烘干的硫氰酸钾 (KSCN) 溶于少量水中，用水稀释至 100mL，混匀。此溶液每 1mL 含 1mg SCN^-，置冰箱中可保存 1 个月。

(7) 硫氰酸盐标准应用溶液 用水将硫氰酸盐标准贮备溶液分别稀释为(A)每 1mL 含 2μg SCN^-和(B)每 1mL 含 10μg SCN^-的标准应用溶液 (当天配制)。

C 仪器

(1) 分光光度计，1.0cm 吸收池。

(2) 吸量管 0.5mL、2.0mL、5.0mL、10.0mL。

(3) 容量瓶 100mL。

(4) 聚乙烯塑料瓶或玻璃瓶 50mL 或 100mL。

(5) 尿相对密度计。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。用聚乙烯瓶或玻璃瓶收集接触者班末尿，在 4h 内检验。

(2) 样品处理。样品不需处理，直接按 D (4) 项进行测定。

(3) 标准曲线的绘制。

1) 取 7 个 10mL 比色管，按表 4-7 配制标准系列。

表 4-7 硫氰酸盐标准系列的配制

管 号	标准应用液 (A) /mL	标准应用液 (B) /mL	非接触者尿 /mL	SCN^- 质量 /μg
0	0	0	0	0
1	0	0	0.1	0
2	0.10	0	0.1	0.2
3	0.25	0	0.1	0.5
4	0	0.10	0.1	1.0
5	0	0.15	0.1	1.5
6	0	0.20	0.1	2.0

2) 各管分别加入 2mL pH=7 的磷酸盐缓冲溶液，混匀，加 0.2mL 10g·L^{-1}氯胺 T 溶液，立即盖塞，混匀，放置 5min。加 2mL 吡啶-巴比妥酸溶液，混匀，当室温低于 25℃时，置 25℃恒温箱中放置 20min，加水至 5mL，混匀。用 1.0cm 吸收池，以试剂空白 (0 号管) 作参比调零，测量吸光度。

(4) 样品测定。吸取 0.1mL 新鲜尿样于 10mL 比色管中，按照 D (3) 中 2) 项操作，测量吸光度。

4. 注意事项

(1) 本法适用于正常人和接触无机氰化物和有机氰化物人尿中硫氰酸盐含量的检验，最低检测限为 1mg·L^{-1}。

(2) 尿样必须是新鲜的，置 4℃冰箱第 2 天后测定结果偏低。夏季运输最好冷藏。

(3) 显色温度应保持在 25℃以上。显色剂吡啶-巴比妥酸溶液

放置时间太长会影响吸光度，所以应临用前配制。

（4）进入人体内的氰化物大部分与体内的硫结合为 SCN^- 随尿排出，一小部分仍以 CN^- 的形式随尿排出。CN 也同样显色，故测出的结果是 CN^- 和 SCN^- 的总量。

三、尿中粪卟啉（尿棕色素）的检验

荧光比色法

1. 检验意义

正常人尿中含有少量的粪卟啉（尿棕色素）和粪卟啉原，在定性检验时，一般多呈阴性。铅吸收和铅中毒时，使尿中粪卟啉和粪卟啉原增多并随尿排出。如尿中粪卟啉呈阳性，可作为判断铅吸收和铅中毒的参考指标。

2. 检验原理

尿液中粪卟啉原经过氧化氢氧化成粪卟啉，粪卟啉在弱酸性尿中，用乙醚提取，含有粪卟啉的醚层在紫外灯下呈现红色荧光，根据荧光强弱进行半定量测定。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是荧光比色法。在尿样中加入过氧化氢和乙酸乙醚混合液，混匀后，放置暗处 12～24h，于紫外灯下观察检验结果。检验结果判断如下：

正常人阴性：醚层蓝、绿或紫色。

阳性：＋，醚层淡红色荧光；

＋＋，醚层明显红色荧光；

＋＋＋，醚层深红色荧光；

＋＋＋＋，醚层砖红色荧光。

B 试剂

（1）过氧化氢溶液 $9.8mol \cdot L^{-1}$（30%）。

（2）乙酸-乙醚混合液 1 份冰乙酸与 3 份乙醚混合，密塞贮存。

C 仪器

(1) 紫外光灯（波长 350～410nm）。

(2) 具塞比色管 25mL。

(3) 吸量管 20mL。

(4) 滴管。

D 测定步骤

取 20mL 尿样于 25mL 具塞比色管中，加 1 滴 9.8mol·L^{-1} (30%) 过氧化氢溶液，5mL 乙酸-乙醚混合液，加塞颠倒混匀数次，放气，塞紧再振摇数 10 次，放置暗处 12～24h，于紫外灯下观察。

4. 注意事项

(1) 本法适用于接触铅烟或铅尘而引起的慢性中毒，但不能仅凭一次检验结果即下结论。

(2) 因为粪卟啉易被日光和高温破坏，故用棕色瓶收集尿，置暗处，严禁受日光照射并避高温。

(3) 取新鲜尿液尽快测定，如置冰箱存放不能超过 6d，腐败的尿不能用。

(4) 粪卟啉的吸收光带为波长 350～410nm。

四、血清总胆固醇的检验

异丙醇抽提，高铁-硫酸分光光度法

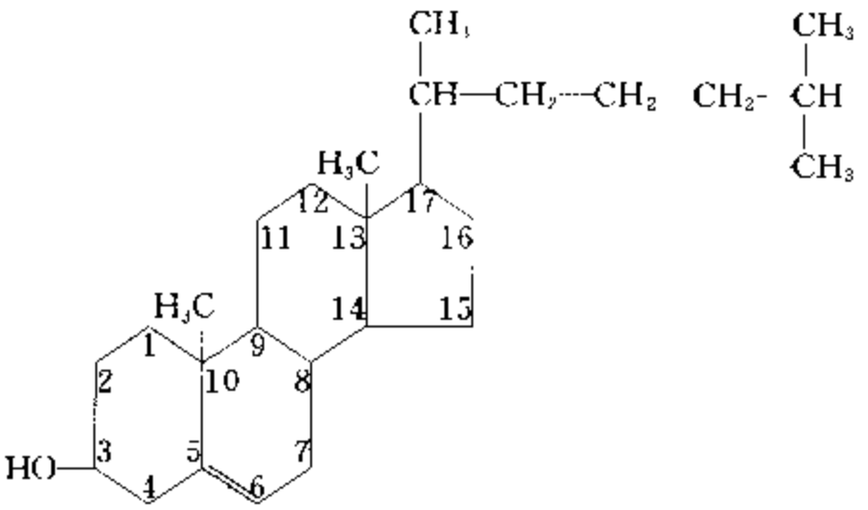
1. 检验意义

接触氯化烃农药艾氏剂可以使血液中胆固醇的含量增高，检验血清总胆固醇的含量能了解接触艾氏剂的情况。

2. 检验原理

甾醇是含有羟基的固体化合物，又称为固醇。固醇常以游离状态或以酯的形式广泛存在于动物和植物的体内。存在于植物体内的叫植物固醇，存在于动物体内的叫动物固醇。动物固醇中最常见的是胆固醇，存在于脑和脊髓中，也存在于胆石中。胆固醇的分子式为 $C_{27}H_{45}OH$，是无色晶体，熔点 150℃。它的结构式可

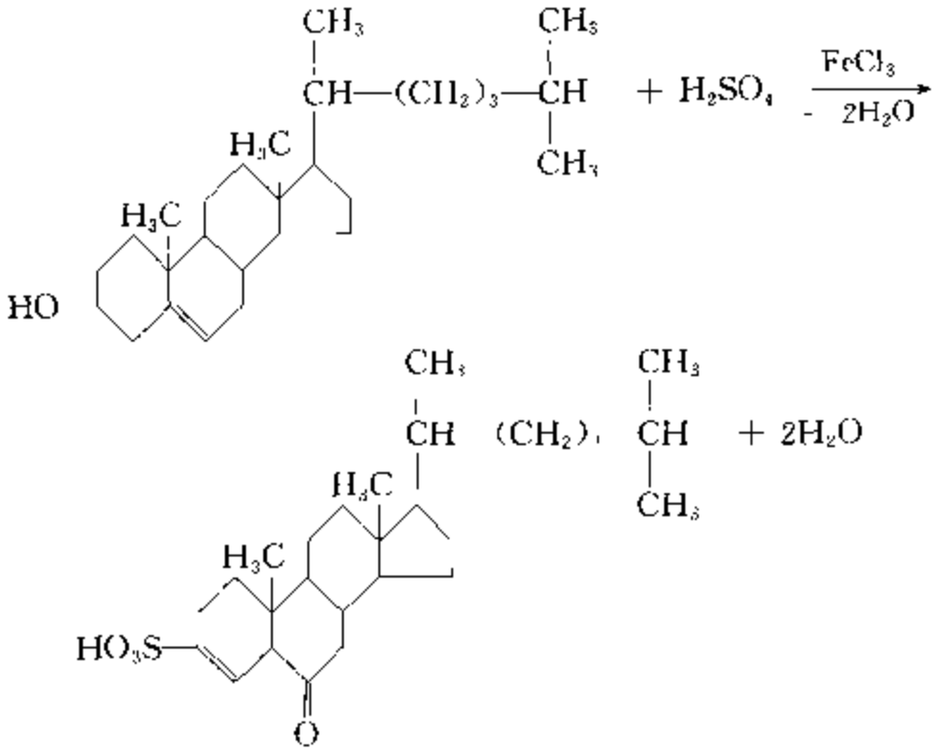
以表示如下：



从胆固醇的结构式表明在 3 位上有一个仲醇基，在 10 和 13 位上都连有一个甲基，在 17 位上连着一个带支链的长链烷基，分子中除了 5、6 两位置之间有一个双键外，其他部分都是饱和的。胆固醇不是芳香族化合物，而是脂环族化合物，它具有氢化了的菲的碳环，而且在一边还骈合着一个饱和的五元环，它是一个高氢化菲的衍生物。

此法的原理是用异丙醇沉淀血清蛋白，同时抽提胆固醇，抽提时用氧化铝吸附干扰物，离心分离后，取上清液并在上清液中加入显色剂高铁-硫酸试剂，生成紫红色产物，此显色产物颜色的深度或者说吸光度与胆固醇的浓度成正比。紫红色产物的最大吸收波长为 536nm，测量吸光度，以此定量血清中总胆固醇的含量。此显色反应的机理未明，但可根据有机化学推断如下，仅供参考。

高铁是指三氯化铁中的三价铁离子，Fe^{3+} 在酸性溶液中能与 α 或 β—OH 基的有机酸生成稳定的络合物，所以溶于乙酸中的三氯化铁非常稳定。三氯化铁在有机化学中常作为载氯体，使菲与氯发生取代反应，但此处无卤素氯存在，因此它不是作为载氯体使用，而是作为催化剂。浓硫酸是作为脱水剂、氧化剂、磺化剂使用，可使胆固醇的 3 位脱—OH、脱 H，4 位脱 H，在 3 位被磺化加—SO_3H，在 6 位被氧化加 O。主要反应式如下：



3-磺基 6-酮基脱水胆固醇（紫红色）

$$FeCl_3 \cdot CH_3COOH \longrightarrow FeCl_3 \cdot CH_3COO$$

$$FeCl_3 \cdot CH_3COO \xrightarrow{H^+} FeCl_3 + CH_3COOH$$

3. 检验方法

A　方法要点

此法是将血清及胆固醇标准溶液分别放入具塞离心试管中，分别向管底吹入异丙醇冲散血清，使蛋白质沉淀或成为细颗粒，加塞振摇均匀后，置 60℃水浴中 1min，加入氧化铝，加塞，将离心试管置旋涡混合器中，离心分离。

分别吸取相应的上清液加入到测定管及标准管中，在空白管中加入异丙醇。置 60℃水浴 1min，分别沿各管壁加入显色剂高铁-硫酸，充分混匀后，在 60℃水浴中再保温 15min，取出置室温冷却。用 1.0cm 吸收池，以空白管作参比调零，在波长 530～550nm 处测量各管的吸光度。按下式计算血清总胆固醇的质量浓度：

$$\rho = \frac{A_1}{A_2} 2000 \qquad (4\text{-}9)$$

式中　ρ——血清总胆固醇的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$；

A_1——测定管吸光度；

A_2——标准管吸光度；

2000——胆固醇标准溶液的质量浓度，$mg \cdot L^{-1}$。

B 试剂

(1) 异丙醇。

(2) 硫酸 ($\rho_{20}=1.84g \cdot L^{-1}$) 优级纯。

(3) 氧化铝 层析用中性氧化铝，用水洗数次，倾去不易下沉的细颗粒，吸滤干后，在110℃烘箱中活化至少8h，贮存在密闭容器或干燥器内。

(4) 三氯化铁贮备溶液 称取0.1g三氯化铁 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)，溶于100mL冰乙酸中，可长期保存。

(5) 显色剂 ($1g \cdot L^{-1}$) 三氯化铁贮备溶液与浓硫酸（优级纯）按（1+1）体积混合，室温放置可稳定两个月左右。

(6) 胆固醇标准溶液 ($2000mg \cdot L^{-1}$) 称取200mg纯度为99.5%以上的胆固醇，用异丙醇配成100mL，置4℃冰箱中，临用时达到室温才可吸取。

C 仪器

(1) 分光光度计，1.0cm吸收池。

(2) 水浴箱，60℃。

(3) 振荡器。

(4) 具塞离心管。

D 测定步骤

(1) 吸取200μL血清及胆固醇标准溶液，分别放入具塞离心管中，向管底吹入5.0mL异丙醇，冲散血清，使蛋白沉淀成细颗粒，加塞振摇均匀后放在60℃水浴中1min，加入1g氧化铝，加塞，将试管横卧固定在振荡器上摇10min（也可用旋涡混合器或手振）。离心。

(2) 向测定管及标准管中分别加入1mL相应的上清液，空白管加1mL异丙醇。置60℃水浴中1min，分别沿管壁加入3mL显色剂，充分混匀后继续置60℃水浴中15min，然后置室温冷却。测

定各管吸光度。

4. 注意事项

(1) 40 岁以上人群总胆固醇的正常值小于 2000mg·L^{-1}；轻度增高为 2000～2500mg·L^{-1}；高胆固醇血症不小于 2500mg·L^{-1}；严重高胆固醇血症不小于 3000mg·L^{-1}。

(2) 一般游离胆固醇占总胆固醇的 30%左右。但临床检验中不测游离胆固醇含量。

(3) 本法显色稳定。抽提液与显色剂混合时产生热量，发热程度与显色产物颜色深浅有关系，故操作时应注意以下几点：

1) 为便于快速混合，应选用口径大些的试管，而且同一批样品需用同样口径和厚度的试管。

2) 显色剂沿管壁加入，不能边加边摇，必须使显色剂与异丙醇抽提液分成两层，然后迅速混合。否则显色不完全。而且不能成批加完显色剂后一起混合，必须加一管混合一管，混合的方法也应相同。

3) 使用的浓硫酸必须是优级纯，密闭保存以防吸水。试管和吸收池也应是洁净干燥的。

思 考 题

1. 本法中乙酸乙酯有什么作用？

2. 用本法测定尿中 δ-氨基乙酰丙酸的含量选用什么作显色剂？显色产物能稳定多长时间？

3. 在可见分光光度法中是怎样选择最佳酸度的？

4. 检验尿中 δ-氨基乙酰丙酸的含量有什么意义？

5. 用吡啶-巴比妥酸分光光度法测定尿中硫氰酸盐含量时，为什么尿样必须新鲜？

6. 为什么此法测定的结果是氰酸盐和硫氰酸盐的总量？

7. 检验尿中粪卟啉的原理是什么？

8. 检验尿中粪卟啉有什么意义？

第五章　生物污染物所致血液细胞学改变的检验

第一节　苯的氨基、硝基化合物所致血液细胞学改变的检验

一、血中赫恩滋小体的检验

耐尔蓝直接推片法（镜检法）

1. 检验意义

正常人血红细胞中一般没有赫恩滋（又称赫恩氏）小体，当受到苯的氨基、硝基化合物的危害中毒后，在血红细胞中可以找到这种小体。检验血中赫恩滋小体的含量可作为苯的氨基、硝基化合物的接触指标。

2. 检验原理

赫恩滋小体是一种血红细胞内变性珠蛋白的沉淀物，能被多种染料染成不同颜色，经耐尔蓝染色后，在血红细胞边缘出现蓝紫色或蓝绿色小体，直径 0.3～2μm，圆形或椭圆形带有折光性小体（周围可见到色泽较淡的苍白带）。

3. 检验方法

A　方法要点

此法是耐尔蓝染色直接推片镜检法。取 1 滴受检者新鲜血，滴于已干的染液中，用推片的一角轻轻地将血液与染液混合均匀 30s 左右，然后推成薄片，干燥后镜检，用油镜检查。检验结果如下：

全片没检出赫恩滋小体，可报告“未检出”。如发现有赫恩滋小体，应观察 1000 个血红细胞中所含赫恩滋小体的细胞数，以百

分数报告。

B 试剂

耐尔蓝染液（5g·L⁻¹） 称取0.5g耐尔蓝溶于无水乙醇中研磨，再将溶液加至100mL，完全溶解后过滤备用。

C 仪器

（1）无脂玻璃片、推片。

（2）显微镜（油镜）。

D 测定步骤

（1）取1～2滴5g·L⁻¹耐尔蓝染液，滴在无脂玻璃片中央，干燥后备用。

（2）取1滴受检者新鲜血，滴于已干的染液中，用油镜检查。

4. 注意事项

（1）染色液必须临用前经过滤后使用，以防染色液残粒污染样品。

（2）如服用磺胺嘧啶、非那西丁等药物也能产生赫恩滋小体，这种原因造成的检验结果呈阳性，应排除其他环境因素。

二、血中高铁血红蛋白的检验

高铁氰化钾分光光度法

1. 检验意义

正常人的红细胞血红蛋白分子中主要含有二价铁，含三价铁的高铁血红蛋白分子一般不超过血红蛋白总量的0.50%～2%。接触苯的氨基、硝基化合物可将红细胞血红蛋白氧化成为高铁血红蛋白，使血中高铁血红蛋白含量升高。检验血中高铁血红蛋白的含量可作为判断苯的氨基、硝基化合物中毒的一项指标。

2. 检验原理

高铁血红蛋白在波长630nm处有一个特有的吸收峰，当加入氰化物后，高铁血红蛋白即转化为高铁氰化血红蛋白，此吸收峰也随即消失。因此用分光光度计测定加入氰化物前、后吸光度之差，可以计算高铁血红蛋白的含量。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是取2个小试管，在磷酸盐缓冲溶液中，使被检者末梢血在非离子表面活性剂Triton X-100(即辛烷基酚聚氧乙烯醚)溶液的作用下，防止血红蛋白沉淀。其中“1”管用1.0cm吸收池，以磷酸盐缓冲溶液或蒸馏水作参比调零，在波长630nm处测定加入氰化钾（钠）溶液前、后的吸光度 A_1、A_2。

“2”管，在高铁氰化钾溶液中，在波长630nm处测定加入氰化钾（钠）溶液前、后的吸光度 A_3、A_4。按下式计算：

$$X = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100 \qquad (5\text{-}1)$$

式中 X——高铁血红蛋白/总血红蛋白，%；

A_1——1号管的吸光度；

A_2——1号管加入氰化钾溶液后的吸光度；

A_3——2号管的吸光度；

A_4——2号管加入氰化钾溶液后的吸光度。

B 试剂

(1) 氰化钾（钠）溶液（50g·L^{-1}）。

(2) 高铁氰化钾溶液（50g·L^{-1}）。

(3) Triton X-100（辛烷基酚聚氧乙烯醚）溶液（体积分数为1%）。

(4) 磷酸氢二钠溶液（1/15mol·L^{-1}） 准确称取23.87g磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$），用水溶解并稀释至1000mL。

(5) 磷酸二氢钾溶液（1/15mol·L^{-1}） 准确称取9.07g磷酸二氢钾（KH_2PO_4），用水溶解并稀释至1000mL。

(6) 磷酸盐缓冲溶液（1/60mol·L^{-1}，pH=6.6） 量取3.75mL 1/15mol·L^{-1}磷酸氢二钠溶液，6.25mL 1/15mol·L^{-1}磷酸二氢钾溶液，30mL水，混合后即可使用（用时现配制）。

C 仪器

(1) 分光光度计，1.0cm吸收池。

（2）小试管。

（3）吸量管　5mL 和 10mL。

（4）血红蛋白吸管。

D　测定步骤

（1）取 2 个小试管，编号为“1”、“2”，各加 4.5mL 1/60mol·L^{-1}，pH＝6.6 磷酸盐缓冲溶液，加 40μL 被检者末梢血，0.5mL 1% Triton X-100。“1”管用 1.0cm 吸收池，以磷酸盐缓冲溶液或水作参比调零，在波长 630nm 处测得吸光度为 A_1 后，加入 50μL50g·L^{-1}氰化钾（钠）溶液。混匀，放置 2min，以同样波长测得吸光度为 A_2。

（2）“2”管加入 50μL 50g·L^{-1}高铁氰化钾溶液，在 2～5min 后，在波长 630nm 处测得吸光度为 A_3 后，加入 50μL 50g·L^{-1}氰化钾（钠）溶液，混匀，放置 2min，在波长 630nm 处测得吸光度为 A_4。

4. 注意事项

（1）高铁血红蛋白形成后，由于红细胞中存在还原酶，可使高铁血红蛋白逐渐被还原消退，所以必须立即采样检验。如现场不能检验，可将抗凝血直接采于 pH＝6.6 的磷酸盐缓冲溶液中，贮存在 2～4℃冰壶内，保存期不能超过 10h，运回实验室检验。抗凝剂禁用草酸盐，因其会导致高铁血红蛋白生成，所以肝素为最佳抗凝剂。

（2）本法必须使用分辨能力强的分光光度计，使用前必须校正分光器的波长。

（3）全血在加入试剂后，血红细胞破坏。因为少量碎片的存在，使溶液发生混浊，影响吸光度，尤其是正常人会出现负值，使用非离子表面活性剂 Triton X-100 稀释液，或经过离心步骤可以克服血红蛋白的混浊。

（4）要检测大批样品时，应先测全部 1 号管的 A_1，再测全部 2 号管的 A_3，然后将吸收池洗净后，再测 1 号管的 A_2 和 2 号管的 A_4，而且 A_1 和 A_2、A_3 和 A_4 均应用 1 个吸收池，以防止污染。

（5）注意氰化物有剧毒！

思 考 题

1. 检验血中赫恩滋小体有什么意义？

2. 用耐尔蓝染色直接推片法检验血中赫恩滋小体的原理是什么？

3. 用高铁氰化钾分光光度法检验高铁血红蛋白含量时，加入非离子表面活性剂 Triton X-100 有什么作用？

4. 用高铁氰化钾分光光度法检验血中高铁血红蛋白含量的原理是什么？

第二节 一氧化碳和铅所致血液细胞学改变的检验

一、血中碳氧血红蛋白的检验

连二亚硫酸钠分光光度法

1. 检验意义

正常人血液中碳氧血红蛋白（HbCO）的含量仅占血红蛋白总量的 0.4%～0.8%，吸烟者血液中碳氧血红蛋白的含量可达 5%～10%。一氧化碳经呼吸道进入血液后，与血红蛋白结合成碳氧血红蛋白，一氧化碳中毒时，血液中碳氧血红蛋白的含量升高，而且一氧化碳中毒的严重程度与血液中碳氧血红蛋白的含量有一定的关系，所以检验血中碳氧血红蛋白的含量能够了解周围环境是否有一氧化碳，对判断一氧化碳中毒提供有参考价值的生化数据。

2. 检验原理

利用还原剂连二亚硫酸钠将血液中含有的四种成分，即碳氧血红蛋白（HbCO）、还原血红蛋白（Hb）、氧合血红蛋白（HbO_2）、微量高铁血红蛋白（MetHb）（又称微量变性血红蛋白）中的氧合血红蛋白和微量高铁血红蛋白还原成为还原血红蛋白，使血液中只含有碳氧血红蛋白和还原血红蛋白两种成分。碳氧血

红蛋白在波长 420nm 处有一个最大吸收峰，还原血红蛋白在波长 430nm 处有一个最大吸收峰，测出被检血样在这两个波长的吸光度值，代入含有预先测得的碳氧血红蛋白和还原血红蛋白在这两个波长下的摩尔吸光系数（又称吸光常数）的公式中，则可计算出碳氧血红蛋白的质量分数。

3. 检验方法

A 方法要点

此法首先测定用同一浓度的血样制得的还原血红蛋白（Hb）及碳氧血红蛋白（HbCO）的摩尔吸光系数。由于摩尔吸光系数不易测定，在本法的计算中实际是用测得的还原血红蛋白及碳氧血红蛋白在 420nm、430nm 波长下的吸光度来代替摩尔吸光系数，并作为常数，称它为吸光常数。

然后取混匀的两个平行的血样，经还原剂亚硫酸钠处理后，使血样中只含有还原血红蛋白和碳氧血红蛋白，轻轻混匀后放置 10min，用 1.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，在波长 420nm 和 430nm 处测量吸光度。按下式计算血中碳氧血红蛋白的质量分数：

$$w = \frac{A_{430}k_2 - A_{420}k_4}{A_{420}(k_2 - k_4) - A_{430}(k_1 - k_3)} \times 100 \qquad (5\text{-}2)$$

式中 w——血中碳氧血红蛋白的质量分数，%

A_{420}——血样在 420nm 的吸光度；

A_{430}——血样在 430nm 的吸光度；

k_1——血中碳氧血红蛋白在 420nm 的吸光常数；

k_2——血中碳氧血红蛋白在 430nm 的吸光常数；

k_3——血中还原血红蛋白在 420nm 的吸光常数；

k_4——血中还原血红蛋白在 430nm 的吸光常数。

B 试剂

（1）硫酸 $\rho_{20}=1.84g \cdot mL^{-1}$。

（2）甲酸 85%（质量分数）。

（3）连二亚硫酸钠（$Na_2S_2O_4$）。

(4) 氮气　高纯。

(5) 氧气　高纯。

(6) 氢氧化钠溶液 ($20g \cdot L^{-1}$)。

(7) 一氧化碳纯气　钢瓶装或自制。制备方法：在装有滴液漏斗和气体导管的烧瓶中，加入质量分数为85%甲酸，自滴液漏斗滴加浓硫酸 ($\rho_{20}=1.84g \cdot L^{-1}$)，产生的一氧化碳通过内装 $20g \cdot L^{-1}$ 氢氧化钠水溶液的洗气瓶及缓冲瓶后通入样品液中。操作应在良好的通风橱内进行。

(8) 血液稀释液 ($0.02mol \cdot L^{-1}$)　三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液。

(9) 肝素溶液 ($5g \cdot L^{-1}$)。

C　仪器

(1) 分光光度计，1.0cm 吸收池。

(2) 液体快速混合器。

(3) 采血吸管。

(4) 带帽小玻璃管　25mm×4mm。

(5) 具塞试管　10mL 或 15mL。

D　测定步骤

(1) 采样、运输和保存。取约 10μL 末梢血，直接注入到预先加入 $40\mu L 5g \cdot L^{-1}$ 肝素溶液的小玻璃瓶中，立即加帽，旋转混匀以防凝血。于保温瓶中加冰运输，置冰箱冰盒内，−8℃保存，7d 内检验完毕。

(2) 摩尔吸光系数的测定。用同一浓度的血样制得 Hb 及 HbCO，测其在 420nm、430nm 波长下的吸光度来代替摩尔吸光系数，作为常数。测定方法如下：

取不吸烟健康人血（肝素抗凝）用水稀释 5 倍。然后取 0.3mL 加 $0.02mol \cdot L^{-1}$ 的血液稀释液 (Tris 溶液) 稀释至 90mL，通氧气 30min。从中取 4 份，每份 15mL 于具塞试管中。其中两份通氮气 10min 以除去过剩的氧，得到 HbO_2 液。另两份通纯一氧化碳气 10min，得到 HbCO 液。立即将 HbO_2、HbCO 制备液分别转入内

盛 60mg 连二亚硫酸钠的具塞试管中，混匀，放置 10min 测量。读取 430nm 和 420nm 波长处的吸光度，代替摩尔吸光系数（以下简称吸光常数）。

（3）样品处理。经冷藏的血样于室温放置，用液体混合器混匀。

（4）样品测定。迅速吸取 10μL 放置室温混匀的血样（两个平行样），加入内盛 15mL Tris 溶液的具塞试管中（如采样后立即测定，可直接取 10μL 血样放入内盛 15mL Tris 溶液的试管中），加入 60mg 连二亚硫酸钠，轻轻混匀放置 10min，用 1.0cm 吸收池，以试剂空白作参比调零，在 420nm 和 430nm 波长处测量吸光度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触一氧化碳的人血中碳氧血红蛋白含量的测定。

（2）含碳氧血红蛋白的血样及制成的待测液应尽量避免接触空气，以防被氧化，否则测定结果偏低。

（3）连二亚硫酸钠不但易被空气中的氧所氧化失去还原能力，而且遇水易分解，因此应避光密封保存，以小瓶分装使用，临用现配。

（4）使用非高纯级的钢瓶氧气和氮气制备氧合血红蛋白时，应先除去钢瓶气中含有的微量一氧化碳气。

二、血中游离原卟啉的检验

荧光光度法

1. 检验意义

铅的毒性可抑制血红素合成酶的活性，而使血红细胞中游离原卟啉（FEP 一种荧光物质）增多，一般正常人红细胞中游离原卟啉多在 50μg/100mL 以下。血中游离原卟啉的含量与空气中铅的含量有很好的剂量关系。检验血中游离原卟啉的含量可作为铅接触调查和诊断铅中毒的一个特异的监测指标。

2. 检验原理

用乙酸乙酯-乙酸混合液破坏血红细胞。使原卟啉溶出，再用盐酸萃取此溶液中的游离原卟啉，在激发光 403nm，发射光 605nm 处有荧光谱峰，通过测定荧光强度进行定量。

3. 检验方法

A 方法要点

仪器条件：选用 42 号（581 型光电比色计滤光片，420nm）为激发光滤光片和 55 号（550±10nm）为荧光滤光片，1.0cm 荧光吸收池。

首先将游离原卟啉标准应用溶液先、后溶于乙酸乙酯-乙酸混合液中及盐酸溶液中，吸去上层有机溶剂，取下层盐酸溶液于荧光光度计上，用 1.0cm 荧光吸收池，以 0 号管作参比调零，测量荧光强度，以游离原卟啉的质量为横坐标，以荧光强度为纵坐标，绘制标准曲线。

然后从冰箱中取出血样，按绘制标准曲线的操作步骤测定荧光强度，从标准曲线上查得血样中游离原卟啉的质量。按下式计算游离原卟啉的质量浓度：

$$\rho = (m/V) \times 1000 \qquad (5\text{-}3)$$

式中 ρ— 血中游离原卟啉的质量浓度，$\mu g \cdot L^{-1}$；

m——从标准曲线上查得的血样中游离原卟啉的质量，μg；

V —检验时所取血样量，mL；

1000 —将 mL 换算为 L 的换算系数。

B 试剂

（1）盐酸 $\rho_{20}=1.19 g \cdot mL^{-1}$。

（2）乙酸乙酯-乙酸混合液（4+1）。

（3）盐酸溶液（$0.5 mol \cdot L^{-1}$）。

（4）生理盐水 氯化钠（$8.5 g \cdot L^{-1}$）。

（5）硅藻土生理盐水悬浮液（$25 g \cdot L^{-1}$）。

（6）原卟啉标准贮备溶液 用十万分之一天平准确称取 1.25mg 原卟啉，加约 2.5mL 浓盐酸（$\rho_{20}=1.19 g \cdot L^{-1}$），待原卟

啉溶解后，转入25mL容量瓶中，用水淋洗称量瓶，洗液并入容量瓶并稀释至刻度，混匀。此溶液每1mL含50μg原卟啉（如为原卟啉钠盐或原卟啉二甲基酯则分别应称取1.35mg和1.28mg）。

(7)原卟啉标准应用溶液　取0.1mL原卟啉标准贮备溶液置50mL容量瓶中，用乙酸乙酯-乙酸混合液稀释至刻度，混匀。此溶液每1mL含0.1μg原卟啉。

C　仪器

(1) 930型荧光光度计，1.0cm荧光吸收池。

(2) 旋涡混合器。

(3) 离心机。

(4) 十万分之一天平。

(5) 刻度吸量管　1mL、2mL、5mL、10mL。

(6) 血红蛋白吸管。

(7) 具塞试管　10mL。

(8) 微型称量瓶。

(9) 容量瓶　25mL、50mL。

(10) 水泵或毛细吸管。

D　测定步骤

(1)采样、运输和保存。取20μL末梢血，直接注入到有0.1mL生理盐水的试管内，加塞，混匀，置冰瓶中运送，于4℃冰箱内保存。

(2) 标准曲线的绘制。

1) 取6个10mL具塞试管，按表5-1配制标准系列。

表5-1　游离原卟啉标准系列的配制

管　号	生理盐水/mL	原卟啉标准应用液/mL	乙酸乙酯-乙酸混合液/mL	游离原卟啉质量/μg
0	0.1	0	1.0	0
1	0.1	0.1	0.9	0.01
2	0.1	0.3	0.7	0.03
3	0.1	0.5	0.5	0.05
4	0.1	0.7	0.3	0.07
5	0.1	1.0	0	0.10

2）各管混匀后，各加 0.15mL 2.5%硅藻土悬浮液，3mL 乙酸乙酯-乙酸混合液。各管分别置旋涡混合器上混合 10～15s（或振荡 30s）后，于 2000r·min^{-1}离心 15min，将上清液分别倒入另一清洁的 10mL 具塞试管中，各加 4mL0.5mol·L^{-1}盐酸，加塞，于旋涡混合器上混合 20～30s（或振荡 3min），待分层后，用水泵（或毛细吸管）吸去上层有机溶剂，取下层盐酸溶液，以 0 号管作参比调零，用荧光光度计测量荧光强度。

（3）样品测定。将血样从冰箱中取出，摇匀，加 1.0mL 乙酸乙酯-乙酸混合液，以下按 D（2）中 2）项操作测定荧光强度。

4. 注意事项

（1）本法适用于正常人和接触铅的人血液中游离原卟啉含量的测定。最低检测限为 5μg·（100mL）$^{-1}$。

（2）使用过的吸收池，需要用 0.5mol·L^{-1}盐酸溶液洗涤至吸收池的读数不高于原空白时测得的读数才能使用。

（3）在本法中要求将荧光光度计的满刻度旋钮扭到最大处，灵敏度倍率转换开关放在第四或第五挡，使空白管读数在 4 格左右。

思 考 题

1. 血液中含有哪四种血红蛋白？检验血中碳氧血红蛋白含量时，血液中只存在哪两种血红蛋白？

2. 检验血中碳氧血红蛋白中连二亚硫酸钠起什么作用？

3. 采集后的抗凝血液怎样运输和保存？

4. 检验血中碳氧血红蛋白的含量有什么意义？

5. 本法检验血中游离原卟啉的原理是什么？

6. 检验血红细胞中游离原卟啉的含量有什么意义？

第六章　酶法检验

第一节　基本知识

利用酶的催化反应和高度专一性作为基础，以酶作用后物质的变化为依据来对物质进行定性、定量的方法称为酶法检验。酶法检验的一个很重要的应用领域就是在环保。

一、酶

酶是生物体产生的并且能在体内和体外同样可以发挥作用的生物催化剂，酶的化学本质是蛋白质（酶蛋白）。酶的明显特点是其催化作用的高度专一性，即特异性。

二、酶的命名

酶的命名有习惯命名和系统命名两种方法。

习惯命名法根据以下两个原则：

第一个原则是根据受酶催化的物质（底物）的名称，在底物名称后面加一个“酶”字。例如，水解淀粉酶称为淀粉酶，水解蛋白酶称为蛋白酶。有的还指出酶的来源，用以区别不同来源的同一类酶，例如，胃蛋白酶，尿淀粉酶等。

第二个原则是根据酶所催化的反应物质的类型命名。例如，水解酶、氧化酶、脱氢酶、变位酶、转移酶等。

也有根据上述两种原则综合命名或指出酶特点命名。例如，酸性磷酸酶、碱性磷酸酶。

系统命名法是包括底物的名称、反应性质，加一个“酶”字，如果这个酶催化两种底物起反应，则必须将两种底物列出，并用“：”隔开。例如，酶催化的反应是醇＋NAD^+——→醛或酮＋NADH

$+H^+$，此酶的习惯命名是醇脱氢酶，系统命名是醇：NAD 氧化还原酶，反应中的 NAD 是辅酶Ⅰ。

三、酶的分类

酶有两种分类方法。

第一种分类方法是根据酶所催化的反应性质，将酶大体上分为六大类，即氧化还原酶、水解酶、转移酶、裂解酶、异构酶、合成酶。

氧化还原酶类是能够催化底物氧化或还原的酶类。氧化是对底物起增加氧或脱去氢的作用，起脱氢作用的酶称为脱氢酶。还原是对底物起增加氢或是脱去氧的作用。另外，脱羧（指脱去 CO_2）、脱氨（指从氨基酸或胺脱去基团—NH_2）也是常见的氧化反应。例如，过氧化氢酶、过氧化物酶、乳酸脱氢酶等。

水解酶类是能够催化水解反应的酶类。例如，淀粉酶、蛋白酶、胆碱酯酶、尿素酶等。

转移酶类是能够催化不同物质分子之间某种化学基团的转移或交换的酶类。例如，转氨酶、转甲基酶等。

裂解酶类是能催化一种化合物分裂成两种化合物或由两种化合物合成一种化合物的酶类。例如，碳酸酐酶、醛缩酶等。

异构酶类是能够催化异构体转化的酶类。例如，磷酸葡萄糖异构酶、丙氨酸消旋酶等。

合成酶类是能催化两个分子化合物互相结合，同时能使高磷酸化合物中的高能磷酸根断裂的酶类。例如，谷氨酰胺合成酶等。

第二种分类方法是根据酶的化学成分，将酶分为单纯酶和结合酶两大类。

单纯酶水解后只产生氨基酸。例如，水解酶类就属于单纯酶。

结合酶分子中除了蛋白质（酶蛋白）以外，还含有非蛋白质物质。例如，许多氧化还原酶类、转移酶类就属于结合酶。结合酶分子中的非蛋白质部分称为酶的辅助因子，辅助因子可以是一种金属离子，也可以是一种有机化合物，也可以是二者兼有。例如，全酶就是结合酶。

全酶由什么组成？在结合酶中，由酶蛋白和辅助因子一起构成的复合物称为全酶。全酶分子中的非蛋白质部分称为辅基，有些辅基与酶蛋白结合的很牢固，但多数情况下，辅基与酶蛋白的结合是很疏松的，这样的辅基又称为辅酶。但辅基和辅酶这两个概念又趋向于只用辅酶。请注意，只有全酶才具有催化活性，酶蛋白与辅酶因子单独存在时均没有催化活性。

辅酶的种类很多，在生化检验中应用最多的辅酶有辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ，它们的化学功能就是催化化学反应，它们又有氧化型和还原型两种形式。辅酶Ⅰ简称NAD，因为NAD的分子中所含的N带有正电荷，所以氧化型NAD应写成NAD^+，NAD^+被加氢还原时N的正电荷消失，在N的对位C原子上加上一个H原子，所以还原型NAD应写成NADH。辅酶Ⅱ的作用与辅酶Ⅰ很相似，所以用$NADP^+$表示氧化型辅酶Ⅱ，用NADPH表示还原型辅酶Ⅱ。辅酶Ⅰ的化学名称是尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸，辅酶Ⅱ的化学名称是尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，它们的化学结构式很复杂。

四、酶的抑制剂和激活剂

酶的抑制剂是能够使催化反应速度降低的一种化合物。它能抑制酶催化活性的原因之一是因为它与酶发生反应，而生成了一种酶与抑制剂的配合物；原因之二是因为它与其中的一种反应物发生了反应。如果酶的抑制剂是不可逆的，那么酶的催化活性的抑制则是不可逆的。在这种情况下，酶的活性是不能恢复的。对于酶的不可逆抑制剂来说，它抑制酶活性的作用是随着抑制剂浓度的增大而逐渐增大的，当抑制剂的浓度增大到足以使所有的酶均与它结合时，将会出现酶活性完全被抑制；如果酶的抑制剂是可逆的，那么酶的催化活性的抑制则是可逆的。在这种情况下，如果解除酶的抑制剂后，酶即能恢复其催化活性。对子可逆性抑制来说，它对酶活性的抑制作用也是随着抑制剂浓度的增大而逐渐增大的，但是很快即达到一个平衡值，这个平衡值是由抑制剂的浓度来决定的。

酶的激活剂是能够使一个已经有催化作用的酶的催化效率提高的一种物质，是一种能够促使酶成为活泼的催化剂所必需的物质：

酶（不活泼）＋激活剂⇌酶（活泼的）

酶（活泼的）＋底物⇌产物

例如，Mg^{2+}对碱性磷酸酯酶有激活作用。

五、酶催化反应的特点

酶和一般的催化剂一样，能够加速化学反应的速度，而本身在反应前后并不发生质和量的变化。酶只能催化本来就能进行的反应，而不能催化那些本来就不能进行的反应，酶对于顺逆两个方向的催化作用是相同的。酶与底物的反应式如下所示：

$$\underset{\text{酶}}{E} + \underset{\text{底物}}{S} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{络合物}}{[ES]} \xrightarrow{k_3} \underset{\text{酶}}{E} + \underset{\text{产物}}{P}$$

反应机理是底物S与酶E结合形成中间络合物[ES]，随后分解出产物P并释放出酶E。因为酶仅使底物转化为产物，而本身在反应过程中并不消耗，所以酶是一种真正的催化剂。

由于酶是生物催化剂，它与一般的催化剂是不同的，酶催化反应的特点如下：

酶催化反应的第一个特点是酶很不稳定。它对环境条件的变化非常敏感，很容易受外界条件的影响而发生结构的变化，引起性质变化而失去催化反应的能力。例如，温度、酸度、湿度、重金属盐、空气中氧气等均能使酶破坏而失去活性。

酶催化反应的第二个特点是酶催化作用的特异性。在酶学中，将受酶催化的物质称为底物或基质，酶的特异性是指酶对底物的严格选择性，一种酶只能催化一类化合物，生成一定的产物，这种现象称为酶催化作用的特异性。一般的催化剂是没有这么严格的选择性的。

酶催化反应的第三个特点是催化效率很高。酶的催化效率比一般催化剂高出10^6～10^{10}倍，远远超出一般催化剂的催化能力，只需要少量的酶即可以使大量的底物发生变化。

六、酶的活性

酶是生物催化剂，酶加速化学反应的能力称为酶的活力或称为酶的活性。检查是否有酶存在必须检查是否有催化活性。所以酶类测定与其他测定不同，一般不是以质量表示，而是以活性表示酶的含量。

因为酶是蛋白质，在样品中含量甚微，又不易提纯分离，所以难以测定其实际含量。除了少数几种因具有特殊的化学结构而能直接用化学法或光谱法检测定量的酶以外，大多数的酶均不能直接测定其绝对的含量，但在一定条件下，酶的催化活性与其浓度成正比，故可以根据酶的催化效果来测定酶的含量，即在最适宜的条件下，使酶与底物共同保温一定时间，然后来测定产物生成的量或测定底物减少的量，由此间接推算出酶的含量。这种方法实际上是测定酶催化反应的速度，即单位时间内产物的生成量。当然，只有具有活性的酶才能有催化作用，如果酶已经变性或已被破坏，则一定测不出酶的催化作用，也就测不出酶的含量，所以酶含量的测定就称为酶活性或活力的测定。

七、酶活性的国际单位

大多数酶均不像常用的无机或有机分析试剂那样具有 90%～100%的含量，其含量通常在 1%～5%之间变动。应该给酶规定一个合适的单位，用来定量地表示酶的含量和活性。这个单位与所使用的方法有关。由于一种酶往往有多种测定方法，而且不同的方法所规定的酶活性单位的含义不同，正常值也不同，而使得同一个酶用不同的方法测定的结果不能相互比较。在 1959 年国际生物化学协会酶学委员会和国际纯化学与应用化学协会采用了一个“国际单位”，即是指在 25℃，以最合适的底物浓度、最合适的缓冲液离子强度、以及最适合的 pH 值等条件下，每分钟能转化 1μmol 底物的酶量定为一个活性单位。这个单位称为酶的国际单位（IU），简写为 U。

使用国际酶活性单位 U，就可以将那些不同种的或来源不同的同一种酶制剂进行比较。但也有一些缺陷，例如，从惯用单位换算成国际单位时很麻烦；某些相对分子质量不明的大分子底物无法计算其减少的 μmol 数；同一种酶用不同的方法测定的酶活性值换算成国际单位后，活性值仍不相同。所以酶的活性单位仍很难统一表示，有用国际单位的，也仍有用惯用单位的。

八、酶活性的计算

酶活性的计算是以某一种反应物（底物、辅酶或反应产物）浓度的增加或减少作为基础的。计算是通过制备一个准确知道浓度的底物或反应产物的标准来进行的。取部分标准溶液与样品同样处理。按下述方法中的一种计算酶活性。

第一种方法是以一个标准浓度为根据的计算法。

$$Y = \frac{A_x}{A_s} c_s \frac{V}{V_x} \times \frac{1}{t} \times 1000 \qquad (6\text{-}1)$$

式中 Y——酶的活性，$U \cdot L^{-1}$；

A_x——样品溶液的吸光度；

A_s——标准溶液的吸光度；

t——催化反应时间，min；

1000——将 mmol 换算成为 μmol 的换算系数；

c_s——吸收池中标准溶液的物质的量浓度，$mmol \cdot L^{-1}$；

$$c_s = c_0 \frac{V_x}{V}$$

c_0——标准溶液原液的物质量浓度，$mmol \cdot L^{-1}$；

V_x——样品溶液的体积，mL；

V——参加反应溶液的总体积，mL。

例如，对硝基苯酚磷酸盐被碱性磷酸酶催化分解，产生对硝基苯酚和磷酸盐。已知标准对硝基苯酚原液物质的量浓度为 $1mmol \cdot L^{-1}$，吸收池中标准对硝基苯酚溶液的物质的量浓度为 $0.009mmol \cdot L^{-1}$；参加反应溶液的总体积为 0.555mL，样品溶液

的体积为 0.005mL，反应时间为 30min，样品溶液的吸光度为 0.080，标准溶液吸光度为 0.169，则活性为：

$$Y = \frac{0.080}{0.169} \times 0.009 \times \frac{0.555}{0.005} \times \frac{1}{30} \times 1000 = 15.7\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$$

第二种方法是以一个反应产物的摩尔吸光系数为基础的计算法（吸光度法）。

$$Y = \frac{A_r}{\varepsilon b} \times \frac{V}{V_s} \times \frac{1}{t} \times 1000 \qquad (6\text{-}2)$$

式中 ε——对硝基苯酚的摩尔吸光系数，$\text{L} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{cm})^{-1}$；

b——吸收池内溶液的光路长度，cm。

式中其他符号同公式 6-1。

例如，对硝基苯酚在波长 400nm 处的摩尔吸光系数为 $18.81\text{L} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{cm})^{-1}$，吸收池内溶液的光路长度为 1.0cm，则活性单位为：

$$Y = \frac{0.080}{18.81 \times 1} \times \frac{0.555}{0.005} \times \frac{1}{30} \times 1000 = 15.7\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$$

九、酶法检验方法的分类

酶法检验的方法通常分为三大类：

第一类方法是测定在一定条件下，一定时间内底物减少的量或产物生成的量，这一类测定方法必须同时测定样品中原来有的某种化合物的量，称为对照管。

第二类方法是根据酶的活性与反应所需要的时间成反比的关系，测定酶所催化的一定量底物的减少量或者生成一定量产物所需要的时间。

第三类方法是直接测定酶催化反应的速度，即测定单位时间内底物变化的量或产物变化的量，称为动力学测定法。这一类方法是酶类测定的发展方向。

近些年来酶法检验有一些改进，其中较重要的有三个方面：

第一个方面是新合成了多种带有色原的物质，经过酶作用后释放出色原，稍加处理即可显色测定。例如，碱性磷酸酶、淀粉

酶等均已采用此法。

第二个方面是利用还原型辅酶Ⅰ和还原型辅酶Ⅱ在波长340nm处有光吸收特性，而氧化型辅酶Ⅰ和氧化型辅酶Ⅱ在波长340nm处无吸光特性，所以凡是有辅酶Ⅰ或辅酶Ⅱ参加的氧化还原酶类反应时，可以利用波长340nm处光吸收的变化计算酶的活性单位。例如，常用以每分钟在340nm处吸光度变化0.001称为一个单位。利用这种方法可以测定一大批脱氢酶和转氨酶等。有些酶反应的时候没有辅酶Ⅰ或辅酶Ⅱ参加反应，但是如果产物中有可以被氧化还原的物质，则另外加入可以使此产物氧化还原的酶以及辅酶Ⅰ或辅酶Ⅱ作为试剂，就可以根据340nm处吸光度的变化来间接表示那些酶的活性。

第三个方面是利用自动检测仪器进行测定，使工作效率得到很大提高。

酶法检验的测定结果怎样表示？酶法检验的测定结果常用酶的活性单位表示。酶的活性单位就是在一定条件下，单位时间内底物的消耗量或产物的生成量。

思 考 题

1. 酶有哪两种命名方法？怎样命名？
2. 酶有哪两种分类方法？怎样分类？
3. 酶催化反应有什么特点？什么是酶法检验？
4. 酶活性的国际单位是什么？怎样计算？

第二节 血清磷酸酶活性的检验

一、血清碱性磷酸酶活性的检验

磷酸苯二钠分光光度法

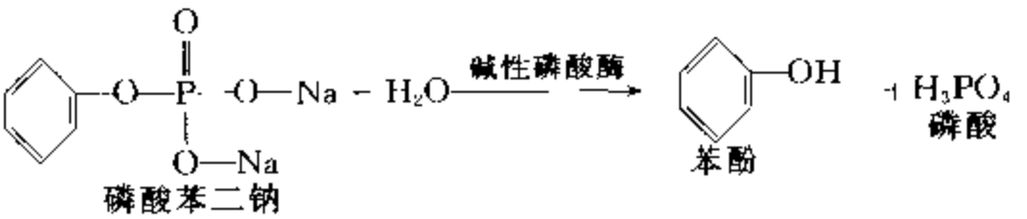
1. 检验意义

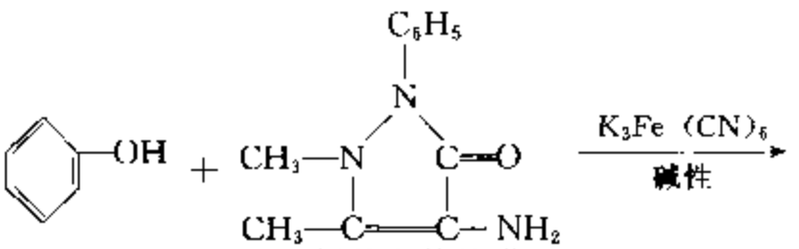
环境中有毒金属，即铅、铜、汞、铍、镉、银进入机体后，因

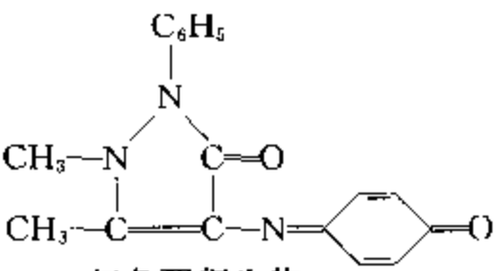
中毒而使血清碱性磷酸酶的活性降低，检验血清碱性磷酸酶的活性可作为这几种毒物的接触指标。

2. 检验原理

在 pH＝10 的碱性反应液中，碱性磷酸酶催化底物磷酸苯二钠水解，生成游离酚和磷酸。酚在碱性溶液中与 4-氨基安替比啉结合，并经铁氰化钾氧化生成红色的醌衍生物，在波长 510nm 处测定吸光度，查标准曲线得碱性磷酸酶活性单位。主要反应式如下：







3. 检验方法

A　方法要点

此法是在碳酸盐缓冲溶液中，底物磷酸苯二钠和血清（血清是指血液凝固后自行析出的黄色液体）在 37℃水浴中准确保温 15min，磷酸苯二钠被水解产生酚，酚与 4-氨基安替比啉反应的产物再经铁氰化钾氧化成红色化合物，用 1.0cm 吸收池，以水作参比调零，在波长 510nm 处测量吸光度，测定管吸光度减去对照管

吸光度后，查标准曲线得碱性磷酸酶活性单位，即金氏单位。金氏单位是酶活性的惯用单位。

金氏单位定义：100mL 血清在 37℃，与底物作用 15min，产生 1mg 酚为 1 个金氏单位。

B 试剂

(1) 碳酸盐缓冲溶液 (0.1mol·L^{-1}，pH=10) 溶解 6.36g 无水碳酸钠、3.36g 碳酸氢钠、1.5g 4-氨基安替比啉于 800mL 水中，转入 1000mL 容量瓶中，加水至刻度，置棕色瓶中贮存。

(2) 磷酸苯二钠溶液 (20mmol·L^{-1}) 先将 500mL 水煮沸，消灭微生物，迅速加入 2.54g 含 2 分子结晶水的磷酸苯二钠（或 2.18g 不含结晶水的磷酸苯二钠），冷却后加 2mL 三氯甲烷防腐，置冰箱保存，称为底物溶液。

(3) 铁氰化钾溶液 分别称取 2.5g 铁氰化钾、17g 硼酸，各自溶于 400mL 水中，然后将两液混合，加水至 1000mL，置棕色瓶中避光保存，如出现蓝绿色即弃去。

(4) 酚标准贮备溶液 称取 1.0g 重蒸苯酚于 0.1mol·L^{-1}盐酸溶液中，并用 0.1mol·L^{-1}盐酸稀释至 1000mL，混匀。此溶液每 1mL 含 1mg 酚。

(5) 酚标准应用溶液 取 5mL 酚标准贮备溶液，加水至 100mL 混匀。此溶液每 1mL 含 0.05mg 酚，只能保存 2～3d。

C 仪器

(1) 分光光度计 1.0cm 吸收池。

(2) 恒温水箱 (37℃±0.5℃)。

(3) 试管 16mm×100mm。

(4) 离心机。

D 测定步骤

(1) 标准曲线的绘制。取 6 个试管按表 6-1 配制标准系列。

表 6-1　标准系列的配制

管　号	酚标准应用溶液/mL	水/mL	碳酸盐缓冲溶液/mL	铁氰化钾溶液/mL	相当金氏单位
0	0	1.1	1.0	3.0	0
1	0.2	0.9	1.0	3.0	10
2	0.4	0.7	1.0	3.0	20
3	0.6	0.5	1.0	3.0	30
4	0.8	0.3	1.0	3.0	40
5	1.0	0.1	1.0	3.0	50

立即混匀，用 1.0cm 吸收池，以 0 号管作参比调零，在 510nm 波长处测量吸光度，并和相应酶活性单位绘制标准曲线。

（2）样品测定。取 2 个 16mm×100mm 试管按表 6-2 操作。

表 6-2　血清碱性磷酸酶操作步骤

顺序	加入试剂	管　号		操作条件
		测定管	对照管	
(1)	血清/mL 碳酸盐缓冲溶液/mL	0.1 1.0	0 1.0	置 37℃水浴 5min
(2)	底物溶液（预温 37℃）/mL	1.0	1.0	混匀，置 37℃水浴，准确保温 15min
(3)	铁氰化钾溶液/mL 血清/mL	3.0 0	3.0 0.1	立即混匀，用 1.0cm 吸收池，以水作参比调零，测量吸光度

血清碱性磷酸酶活性可按下式计算：

$$X = \frac{A_x - A_0}{A_s - A_0} \rho_s V_s \frac{100}{V_x} \qquad (6\text{-}3)$$

式中　X——血清碱性磷酸酶活性金氏单位，金氏单位 $100mL^{-1}$；

A_x——测定管吸光度；

A_s——标准管吸光度；

A_0——对照管吸光度；

ρ_s ——标准管中酚标准溶液的质量浓度，mg·mL^{-1}；

V_s ——标准管中酚标准溶液的体积，mL；

V_x ——血清的用量，mL。

4. 注意事项

(1) 血清碱性磷酸酶活性金氏单位成人为 3～13，儿童为 5～28。

(2) 加入铁氰化钾溶液后必须迅速混匀，否则显色不充分。

(3) 铁氰化钾溶液中加入硼酸有稳定显色的作用。

(4) 在酶法检验中常用血清为样品，为防止血清破坏，应尽快测定，否则必须置冰箱保存。

(5) 血清碱性磷酸酶一般不是单一的酶，而是一组酶，在碱性条件下具有较高的活性，特异性较低，所以测定此酶活性时底物多达十几种。

(6) 磷酸苯二钠底物液在保存过程中应避免其分解，所用蒸馏水应煮沸除微生物，冷却后加入氯仿防腐，置冰箱可保存 1 个月。

(7) 因血清很少有酚或酚类化合物，故常用试剂空白代替血清对照管。试剂空白可检查底物是否分解，吸光度增大，呈红色时不能用。

(8) 血清酸性磷酸酶活性的检验也可用此法，但应在酸性缓冲溶液中进行酶催化反应。

二、血清酸性磷酸酶活性的检验

磷酸麝香草酚酞分光光度法

1. 检验意义

铅、铜、汞、铍、镉、银重金属进入机体后，可使血清酸性磷酸酶的活性降低，检验血清酸性磷酸酶的活性可作为这几种重金属的接触指标。

2. 检验原理

在 pH＝5.4 的酸性条件下，血清酸性磷酸酶催化底物磷酸麝

香草酚酞水解，产生麝香草酚酞和无机磷酸，加入氢氧化钠-碳酸钠碱性缓冲溶液改变反应溶液的 pH 值，由酸性变为碱性而使酶催化反应中止，同时使水解产物游离麝香草酚酞显蓝色（麝香草酚酞又名百里香酚酞，是酸碱指示剂，变色范围在 pH 值为 9.0～10.2，酸性为无色，碱性为蓝色），在波长 595nm 处测量吸光度，测定麝香草酚酞的生成量，由此计算出酸性磷酸酶的活性单位。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是在乙酸盐缓冲溶液中，底物磷酸麝香草酚酞和血清在 37℃水浴中准确保温 30min，加入氢氧化钠-碳酸钠碱性缓冲溶液中止催化反应并使游离麝香草酚酞呈蓝色溶液，用 1.0cm 吸收池，以水作参比调零，在波长 595nm 处测量吸光度，测定管吸光度减去对照管吸光度，查标准曲线得出酸性磷酸酶的活性单位。此法用酶活性的国际单位表示，即 $U \cdot L^{-1}$。

B 试剂

(1) 乙酸盐缓冲溶液 ($0.3mol \cdot L^{-1}$, pH＝5.4) 称取 4.08g 含 3 分子结晶水的乙酸钠，溶于约 80mL 水中，于 25℃，在 pH 计上用 $0.5mol \cdot L^{-1}$ 乙酸调节至 pH＝5.4，再加水至 100mL。

(2) Brij-35 溶液 ($3.24g \cdot L^{-1}$) 取 10.8mL $300g \cdot L^{-1}$ Brij-35 原液，加水至 1000mL，于 4℃保存可稳定数年。

(3) 磷酸麝香草酚酞溶液 ($1.1mmol \cdot L^{-1}$) 称取 82.8mg 含 11 分子结晶水的磷酸麝香草酚酞二钠盐，溶于 50mL $3.24g \cdot L^{-1}$ Brij-35 溶液中，加 $0.3mol \cdot L^{-1}$ 乙酸盐缓冲溶液 (pH＝5.4) 至 100mL，必要时再用 $0.1mol \cdot L^{-1}$ 乙酸或 $0.1mol \cdot L^{-1}$ 氢氧化钠调节 pH 至 5.4，置冰箱中保存，约可稳定 1 个月。此为底物缓冲液。

(4) 氢氧化钠-碳酸钠溶液 ($0.1mol \cdot L^{-1}$) 称取 10.6g 无水碳酸钠和 4g 氢氧化钠，溶于 1000mL 水中，置塑料瓶中保存，室温中至少可稳定 3 个月。此为碱性缓冲溶液。

(5) 麝香草酚酞标准溶液 准确称取 129.2mg 于 100℃烘 2h

并置干燥器中保存的麝香草酚酞，溶于100mL70%正丙醇（正丙醇＋水＝70＋30）中，置冰箱保存。

C　仪器

同血清中碱性磷酸酶活性的检验。

D　测定步骤

（1）标准曲线的绘制。取6个试管按表6-3配制标准系列。

以上各管混匀，分别吸出0.1mL，按（2）样品测定进行显色，测定各管的吸光度，绘制吸光度与相应的酶活性单位的标准曲线。

表6-3　标准系列的配制

管　号	3mmol·L^{-1}麝香草酚酞溶液/mL	70%正丙醇溶液/mL	相当于酸性磷酸酶活性/U·L^{-1}
0	0	10	0
1	1.0	9.0	10
2	2.0	8.0	20
3	3.0	7.0	30
4	4.0	6.0	40
5	5.0	5.0	50

（2）样品测定。

1）测定管。吸取0.1mL血清，加1.0mL已预温的底物缓冲溶液，37℃准确保温30min，加2.0mL碱性缓冲溶液，混匀。

2）对照管。吸取0.1mL血清，加2.0mL碱性缓冲溶液，加1.0mL底物缓冲溶液，混匀。

3）用1.0cm吸收池，以水作参比调零，测定各管吸光度。

血清酸性磷酸酶活性可按下式计算：

$$X = \frac{A_x - A_0}{A_s - A_0} c_s V_s \frac{1}{t} \times \frac{1000}{V_x} \qquad (6\text{-}4)$$

式中　X——血清酸性磷酸酶活性单位，U·L^{-1}；

A_x——测定管吸光度；

A_s——标准管吸光度；

A_0——对照管吸光度；

c_s——标准管中麝香草酚酞标准溶液的浓度，$\mu mol \cdot L^{-1}$；

V_s——标准管中麝香草酚酞标准溶液的用量，mL；

t——酶催化反应时间，min；

1000——将 $mmol \cdot L^{-1}$ 换算为 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的换算系数；

V_s——血清用量，mL。

4. 注意事项

(1) 健康成年人血清酸性磷酸酶的活性为 0.5～1.9U·L^{-1}。

(2) 本法简便、准确、试剂易保存，麝香草酚酞溶液的蓝色稳定，在 24h 内吸光度不变，显色强度与酶催化反应线性关系很好。所以当血清样品的酶活性很高时，可以缩短酶催化反应的时间，测定结果应乘以缩短时间的倍数。

(3)血清酸性磷酸酶不稳定，尤其是在 37℃和 pH 大于 7.0 的条件下，活性很快丧失，血清放在室温 1～2h 酶活性可丧失 50%。

(4) 采血后应尽快分离血清，如不能及时测定，应将血清管加紧塞冰冻保存，或每 1mL 血清中加 50μL5mol·L^{-1} 乙酸，使 pH 值降至 5.4，酸化后血清置室温可稳定数小时，置冰箱内可稳定 7d。

(5) EDTA 不干扰测定，草酸盐有抑制酸性磷酸酶活性的作用。

(6) 血清碱性磷酸酶活性的检验也可用此法，但应在碱性缓冲溶液中进行酶催化反应。

(7)血清不能溶血，因为红细胞比血清中的酸性磷酸酶高 100 倍左右。

思 考 题

1. 在血清碱性磷酸酶活性的检验中，加入铁氰化钾后，为什么必须迅速混匀？

2. 在血清酸性磷酸酶活性的检验中，加入氢氧化钠-碳酸钠碱性缓冲溶液有什么作用？

3. 用磷酸麝香草酚酞分光光度法检验血清碱性磷酸酶活性时，应在酸性还是碱性缓冲溶液中进行酶催化反应？

4. 在血清碱性磷酸酶活性的检验中，于铁氰化钾溶液中加入硼酸有什么作用？

5. 麝香草酚酞在碱性溶液中显什么色？

第三节　胆碱酯酶活性及无蛋白血清中尿素的检验

一、全血胆碱酯酶活性的检验

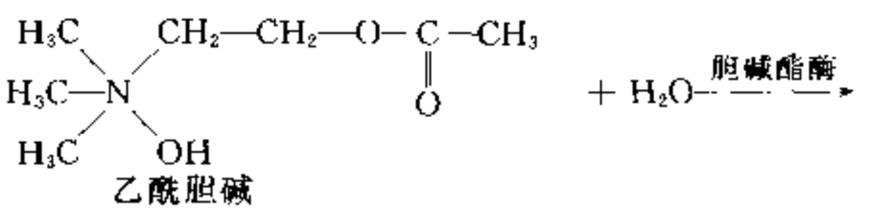
羟胺三氯化铁分光光度法

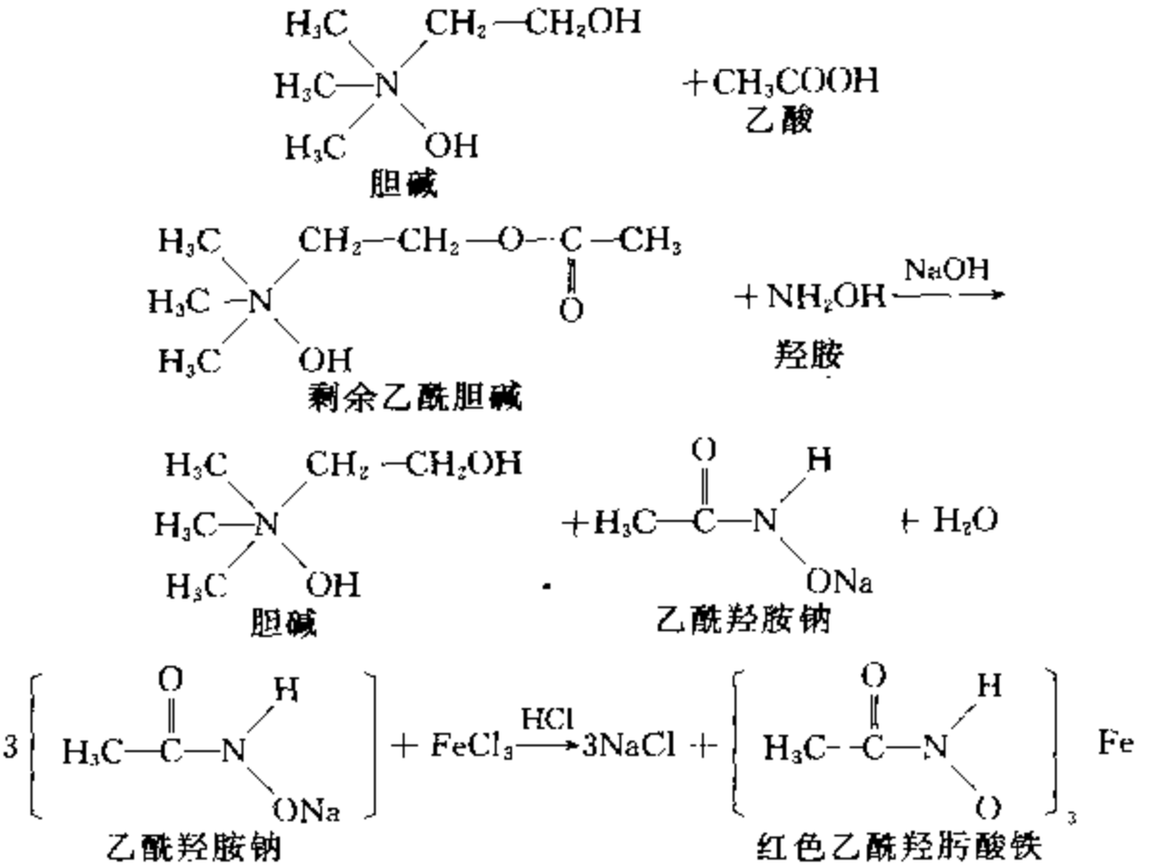
1. 检验意义

血液中胆碱酯酶的活性是判断有机磷农药急性中毒的一项很重要的指标；也可以作为接触有机磷农药和氨基甲酸酯类农药人健康状况的一项观察指标。有机磷毒剂对胆碱酯酶活性有强烈抑制，全血胆碱酯酶活性的检验是帮助诊断有机磷中毒及预后估计的重要手段。

2. 检验原理

血液中胆碱酯酶使乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸。未被胆碱酯酶水解而剩余的乙酰胆碱与碱性羟胺反应，生成乙酰羟胺钠，然后与三氯化铁在酸性溶液中反应，生成红色乙酰羟肟酸铁络合物，其吸光度与剩余乙酰胆碱的量成正比，在波长 520nm 处用分光光度计测量吸光度计量剩余乙酰胆碱的量。原有的乙酰胆碱的量与经胆碱酯酶水解后剩余的乙酰胆碱的量之差为胆碱酯酶水解的乙酰胆碱的量，由水解的乙酰胆碱的量计算胆碱酯酶的活性。主要反应式如下：





3. 检验方法

A 方法要点

此法是取用草酸钾抗凝的全血（血浆加有形成分），在磷酸盐缓冲溶液中，37℃水浴预温 5min，并准确在 37℃保温 30min，血液中的乙酰胆碱被胆碱酯酶催化水解，剩余的乙酰胆碱与碱性羟胺在酸性溶液中反应生成乙酰羟胺，乙酰羟胺在酸性溶液中与三氯化铁反应生成有色络合物。用 1.0cm 吸收池，在波长 520nm 处，以试剂空白作参比调零，用分光光度计测量吸光度，用公式 6-5 和式 6-6 计算出胆碱酯酶活性的绝对值和相对值，这就是公式计算法。

如果同时检验大批血样，可采用标准曲线法，按公式 6-7 计算出被水解乙酰胆碱的吸光度，由此查标准曲线求出胆碱酯酶活性的绝对值，这就是标准曲线法。

（1）公式计算法。按下式计算全血胆碱酯酶活性的绝对值：

$$X_s = \frac{A_s + A_B - A_U}{A_s} \times 7 \qquad (6\text{-}5)$$

式中 X_s——水解乙酰胆碱的浓度，即被测血样中胆碱酯酶活性的绝对值，μmol（0.02mL，37℃，30min）；

A_s——标准管的吸光度；

A_B——对照管的吸光度；

A_C——样品管的吸光度。

按下式计算全血胆碱酯酶活性的相对值：

$$Y = (X_s/X_C) \times 100 \qquad (6\text{-}6)$$

式中 Y——被测血样中胆碱酯酶活性的相对值，%；

X_s——被测血样中胆碱酯酶活性的绝对值，μmol（0.02mL，37℃，30min）

X_C——正常人血样中胆碱酯酶活性的绝对值，μmol（0.02mL，37℃，30min）

（2）标准曲线法。按下式计算被水解乙酰胆碱的吸光度：

$$A_x = A_s - (A_H - A_B) \qquad (6\text{-}7)$$

式中 A_x——被水解乙酰胆碱的吸光度；

A_s——标准管的吸光度；

A_C——样品管的吸光度；

A_B——对照管的吸光度。

由被水解乙酰胆碱的吸光度查乙酰胆碱标准曲线，得相应的被水解乙酰胆碱的μmol。此值是0.02mL血液在37℃反应30min条件下，胆碱酯酶活性的绝对值。

B 试剂

（1）盐酸 $\rho_{20}=1.19g \cdot mL^{-1}$。

（2）盐酸溶液（1+2）。

（3）碱性羟胺溶液 临用前将139g·L^{-1}盐酸羟胺溶液和140g·L^{-1}氢氧化钠溶液等体积混合。

（4）磷酸盐缓冲溶液（pH=7.20） 准确称取8.36g磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）和1.36g磷酸二氢钾（KH_2PO_4），用水溶解并稀释至500mL，置冰箱保存。

（5）三氯化铁溶液 称取10g三氯化铁（$FeCl_3 \cdot 6H_2O$），加

0.84mL 盐酸（$\rho_{20}=1.19g \cdot mL^{-1}$），然后加水 100mL，贮于棕色瓶中。

（6）氯化乙酰胆碱标准贮备溶液　准确称取 1.2716g 乙酰胆碱，用 pH=7.20 磷酸盐缓冲液溶解并稀释至 100mL。此溶液每 1mL 含 70μmol 乙酰胆碱，为贮备溶液。

（7）氯化乙酰胆碱标准应用溶液　临用前，取氯化乙酰胆碱标准贮备溶液稀释 10 倍。此溶液每 1mL 含 7μmol 乙酰胆碱，为应用溶液。

C　仪器

（1）分光光度计，1.0cm 吸收池。

（2）恒温水浴箱，控温 ±0.5℃。

（3）比色管 10mL。

（4）采血针头。

（5）血色素吸管，有 20μL 刻度。

D　测定步骤

（1）采样、运输和保存。用血色素吸管，取 20μL 耳垂血，注入事先加入 0.98mL 磷酸盐缓冲液的比色管中，立即进行测定。

如不能立即测定，可取 0.5mL 静脉血，注入含肝素或草酸钾抗凝剂的玻璃管中，混匀，于保温瓶中加冰运送，置 4℃冰箱中可保存 1 星期。

（2）样品测定。取 4 个比色管按表 6-4 进行操作。

表 6-4　全血胆碱酯酶操作步骤

顺序	加入试剂	管号				操作条件
		样品管	对照管	标准管	空白管	
(1)	磷酸盐缓冲溶液/mL 混匀全血（草酸钾抗凝）/mL	0.98 0.02	0.98 0.02	1.00 0	1.00 0	置 37℃水浴中预热 5min
(2)	乙酰胆碱标准应用液/mL 水/mL	1.00 0	0 1.00	1.00 0	0 1.00	混匀，置 37℃水浴 30min（准确时间），取出

续表 6-4

顺序	加入试剂	管号				操作条件
		样品管	对照管	标准管	空白管	
(3)	碱性羟胺溶液/mL	4.00	4.00	4.00	4.00	充分振摇 2min
(4)	(1+2) 盐酸溶液/mL	2.00	2.00	2.00	2.00	充分振摇 2min
(5)	三氯化铁溶液/mL	2.00	2.00	2.00	2.00	充分振摇，用滤纸过滤后，测定各管的吸光度

如同时检验大批样品，可用标准曲线法。

4. 注意事项

(1) 本法适用于正常人和接触有机磷农药人血中胆碱酯酶活性的测定。最低检测限为 2.4μmol·L^{-1}。

(2) 采血时不应过度挤压耳垂。因为人和动物的胆碱酯酶有两类，一类是真胆碱酯酶，另一类是假（拟）胆碱酯酶，本法是同时测定血清中假性胆碱酯酶和血球细胞中真性胆碱酯酶，选用的底物乙酰胆碱的浓度对真性胆碱酯酶最适宜，此时测得的血液胆碱酯酶的活性值，真性胆碱酯酶占 85%，测定结果基本上只代表血球细胞真性胆碱酯酶的活性值。如果采血时过度挤压耳垂，采得的血液中血清和组织液所占的比例过多，会使结果偏低。

(3) 测定血液中原有的乙酰胆碱的量时，需要对照管。

(4) 加碱性羟胺和盐酸时，必须严格掌握振摇时间，使其充分反应，否则影响结果。

(5) 显色完全后，必须在 20min 内测定完毕。如检验大批样品时，可分批加入三氯化铁溶液显色，否则会使测得结果有较大误差。

(6) 氯化乙酰胆碱不太稳定，每次测定需做标准管。

(7) 滤液一定要澄清，如混浊会使吸光度升高，而使胆碱酯酶活性偏低。

(8) 玻璃器皿洗净后，在（1＋3）硝酸中浸泡 24h，用水冲洗干净后，再用蒸馏水洗三次，干燥后备用。

(9) 计算胆碱酯酶活性百分数时，应以本地区正常人全血胆碱酯酶活性为基准。

溴麝香草酚蓝比色法（纸片法）

1. 检验意义

检验意义同羟胺三氯化铁分光光度法。

2. 检验原理

将适量乙酰胆碱和溴麝香草酚蓝浸于纸片上干燥，在血液胆碱酯酶作用下，将乙酰胆碱水解产生胆碱和乙酸，可引起 pH 值发生改变，经过一定时间保温后，致使纸片上酸碱指示剂溴麝香草酚蓝的颜色发生变化，与标准色板比较，即可读出酶活性的百分数。主要反应见羟胺三氯化铁分光光度法中的第一个反应，即血液胆碱酯酶将乙酰胆碱水解产生胆碱和乙酸。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是于手指或耳垂取血一滴，置纸片中央，在光线充足的地方对光观察血斑中央部分的颜色，与标准色板比较，判断酶活性百分数。由此百分数判断全血胆碱酯酶活性是否被抑制。

(1) 正常 80%以上；

(2) 可疑 70%～80%；

(3) 明显抑制 60%以下。

B 试剂

(1) 溴代乙酰胆碱。

(2) 溴麝香草酚蓝。

C 仪器

(1) 标准色板。

(2) 载玻片及橡皮圈。

(3) 浸有溴代乙酰胆碱和溴麝香草酚蓝（B·T·B）的纸片。

D　测定步骤

于手指或耳垂取血一滴，置纸片中央，用两块干净的载玻片夹紧，使血滴均匀扩散成一圆形斑点。两边紧缚橡皮圈，贴身保温 30min。在光线充足的地方对光观察血斑中央部分的颜色。

4. 注意事项

(1) 血斑直径在 0.6～0.8cm 为宜。

(2) 灯光下观察时，血片不能与灯光太近，不要直接对着光源。

(3) 纸片避免受潮和见光，忌酸碱。所用玻璃器皿洗净后，应避免酸碱污染。

(4) 标准色板是用有机玻璃制成的，见光会逐渐褪色，不比色时应置暗处。比色时，适宜在自然光线下进行。

(5) 采血后应立即测定，否则应置冰箱中可保存数天。血样不能有凝血现象，否则应另采血。

(6) 溴麝香草酚蓝又名溴百里香酚蓝，变色范围 pH 为 6.2～7.6，酸性显黄色，碱性显蓝色。

二、血清胆碱酯酶活性的检验

羟肟三氯化铁分光光度法

1. 检验意义

血清胆碱酯酶活性的检验意义同全血胆碱酯酶活性的检验。

2. 检验原理

血清中胆碱酯酶催化乙酰胆碱水解成胆碱和乙酸。未被水解的剩余乙酰胆碱与碱性羟胺作用，生成乙酰羟胺。乙酰羟胺在酸性溶液中与高铁离子作用，生成棕色络合物。用分光光度法测定，计算剩余乙酰胆碱含量，从而推算出胆碱酯酶的活性。主要反应式见全血胆碱酯酶活性的检验中羟胺三氯化铁分光光度法。

3. 检验方法

A 方法要点

此法首先配制一系列不同胆碱酯酶活性的标准管，将各管分别混匀后，放置 5min，用 1.0cm 吸收池，以空白管作参比调零，在 540nm 波长处测定各管的吸光度，以吸光度为纵坐标，以相应的酶活性单位为横坐标绘制标准曲线。

然后配制测定管（U）、标准管（S）、空白管（B），将各管分别混匀后，置 37℃水浴 60min，加入碱性羟胺溶液后，将各管混匀，待 1min 后，加入盐酸溶液，将各管混匀，加入三氯化铁溶液，再将各管混匀后，离心沉淀，取上清液，用 1.0cm 吸收池，以空白管作参比调零，在 540nm 波长处测定各管吸光度。由标准管吸光度减去测定管吸光度的差值，从标准曲线上查得酶活性单位，不用再计算。

单位定义：1mL 血清中胆碱酯酶在 37℃水浴与底物作用 1h，每水解 1μmol 乙酰胆碱为 1 个酶活性单位。

B 试剂

(1)缓冲乙酰胆碱溶液 检验前准确取下述 16mL A 液、2mL B 液及 2mL C 液，混合。

A 液 称取 10.3g 巴比妥钠，溶于 300mL 水中，慢慢加入 60mL 1mol·L^{-1}盐酸（可引起结晶形成），再加入 5.3g 无水碳酸钠，加热至结晶消失为止，加水至 500mL。

B 液 称取 1.13g 溴化乙酰胆碱或 0.91g 氯化乙酰胆碱，用水溶解并稀释至 10mL。

C 液 称取 4.2g 氯化镁（或 9g 含 6 分子结晶水的氯化镁）、0.2g 氯化钾，用水溶解并稀释至 100mL。

(2) 碱性羟胺溶液 临用前取 140g·L^{-1}盐酸羟胺与 140g·L^{-1}氢氧化钠溶液等量混合。

(3) 三氯化铁溶液（10g·L^{-1}） 称取 10g 三氯化铁（$FeCl_3 \cdot 6H_2O$），用 0.02mol·L^{-1}盐酸溶解并稀释至 1000mL。溶解后过滤，贮于棕色瓶中，可长期保存。

(4) 盐酸溶液 ($4mol \cdot L^{-1}$)。

C 仪器

同血清中碱性磷酸酶活性的检验。

D 测定步骤

(1)标准曲线的绘制。取 6 个试管按表 6-5 进行胆碱酯酶标准系列配制前的操作。

表 6-5 胆碱酯酶标准系列配制前的操作

顺序	加入试剂	管号						操作条件
		B	1	2	3	4	5	
(1)	缓冲乙酰胆碱溶液/mL	0	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	37℃水浴 60min
	水/mL	0.5	0	0.1	0.2	0.3	0.4	
(2)	碱性羟胺溶液/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	混匀，放置 1min
(3)	$4mol \cdot L^{-1}$盐酸溶液/mL	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	混匀，待用

另取 6 个试管按表 6-6 配制胆碱酯酶标准系列。

表 6-6 胆碱酯酶标准系列的配制

管号	取上述混合液/mL	氯化高铁溶液/mL	终反应液中含乙酰胆碱 μmol 数	相当于酶活性单位
B	0.5	10.0	0	
1	0.5	10.0	5	
2	0.5	10.0	4	100
3	0.5	10.0	3	200
4	0.5	10.0	2	300
5	0.5	10.0	1	400

混匀，放置 5min 后，测定各管吸光度，绘制标准曲线。

(2) 样品测定。取 6 个试管按表 6-7 进行操作。

表 6-7　样品测定的操作步骤

顺序	加入试剂	管号			操作条件
		测定管(U)	标准管(S)	空白管(B)	
(1)	缓冲乙酰胆碱溶液(37℃预温 5min)/mL 血清/mL 水/mL	0.5 0.05 0	0.5 0 0.05	0 0 0.55	混匀，37℃水浴 60min
(2)	碱性羟胺溶液/mL	0.5	0.5	0.5	混匀，放置 1min
(3)	4mol·L⁻¹盐酸溶液/mL	1.5	1.5	1.5	混匀，另取管进行下一步操作
(4)	取上述混合液/mL 氯化高铁溶液/mL	0.5 10.0	0.5 10.0	0.5 10.0	

混合后离心沉淀，取上清液，测定各管吸光度。

4. 注意事项

(1) 血清中胆碱酯酶的活性在 130～310U 为正常值。

(2) 加入碱性羟胺后，放置 1min 以上再加酸，以保证与乙酰胆碱充分作用。

(3) 国内有一些相同反应的方法，单位是 37℃反应 20min 计算，因此，参考值约为本法的 1/3，即（130～310）/3U。

三、无蛋白血清中尿素的检验

脲酶-波氏分光光度法

1. 检验意义

随着工、农业的发展及氮肥大量的使用，使环境和生物受到污染。通过测定无蛋白血清（或尿）中尿素的含量，可以了解环境中氨氮量或接触氨的情况。

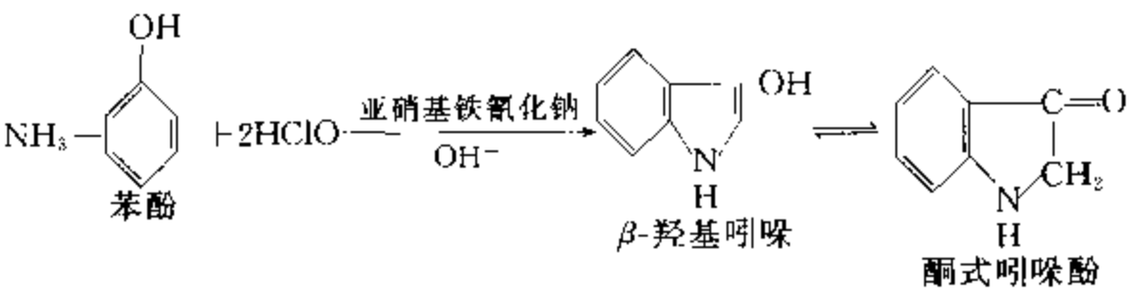
2. 检验原理

首先用脲素酶催化水解无蛋白血清中的尿素，产生 2 分子氨和 1 分子二氧化碳。然后，氨在碱性介质中与显色剂苯酚溶液和

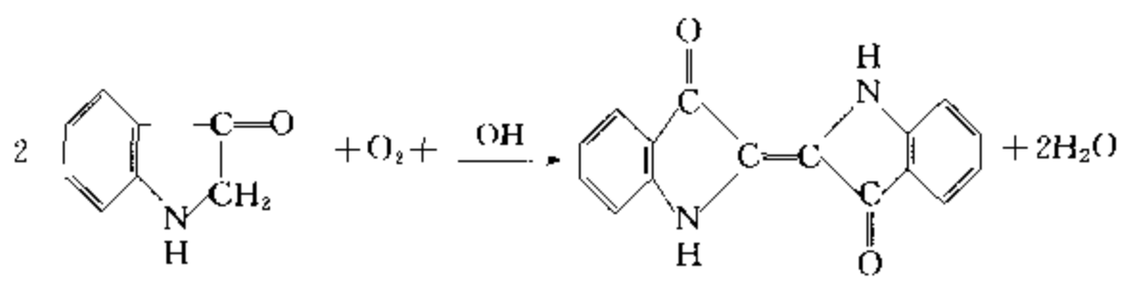
次氯酸钠溶液反应，生成β-羟基吲哚，即吲哚酚，这个反应过程需要用亚硝基铁氰化钠催化进行。β-羟基吲哚能发生互变异构，与酮式异构体同时存在。吲哚酚溶于碱，在碱性溶液中被空气中的氧所氧化而生成靛蓝，即蓝色吲哚酚，氧化时是酮式异构体参加反应。靛蓝的生成量与尿素含量成正比，在波长 630nm 处测量吸光度，以此定量。主要反应式如下：

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \xrightarrow{\text{脲酶}} 2NH_3 + CO_2$$

尿素



苯酚　　β-羟基吲哚　　酮式吲哚酚



靛蓝

3. 检验方法

A　方法要点

此法首先配制测定管、标准管和空白管，然后将各管分别混匀，置 37℃水浴向各管加入显色剂苯酚溶液和次氯酸钠溶液，混匀，水浴 20min，使显色完全。用 1.0cm 吸收池，以空白管作参比，在 560nm 波长处测得各管的吸光度。按下式计算无蛋白血清中尿素的浓度：

$$c = (A_U/A_S) \times 5 \qquad (6\text{-}8)$$

式中　c——尿素浓度，mmol·L^{-1}；

A_U——测定管吸光度；

5——稀释倍数；

A_S——标准管吸光度。

B 试剂

(1) 酚显色剂 称取 10g 苯酚，0.05g 亚硝基铁氰化钠（含 2 分子水），溶于 1000mL 去氨水中，置冰箱中可保存 60d。

(2) 碱性次氯酸钠溶液 称取 5g 氢氧化钠溶于去氨水中，加 8mL“安替福民”（相当于 0.42g 次氯酸钠），再加水至 1000mL，置棕色瓶内冰箱贮存，稳定两个月。

(3) 尿素酶贮备溶液 称取 0.2g 尿素酶（比活性 3000～4000U·g^{-1}）悬浮于 20mL 体积分数为 50%甘油中，置冰箱内可保存 6 个月。

(4) 尿素酶应用溶液 取 1mL 尿素酶贮备溶液，加 10g·L^{-1} pH=6.5 的 EDTA 溶液至 100mL，置冰箱保存可稳定 1 个月。

(5) 尿素标准贮备溶液 (100mmol·L^{-1}) 称取 0.6g 干燥纯尿素溶于水，并稀释至 100mL，加 0.1g 叠氮钠防腐，置冰箱内可稳定 6 个月。

(6) 尿素标准应用溶液 (5mmol·L^{-1}) 取 5.0mL 尿素标准贮备溶液用去氨水蒸馏稀释至 100mL。

C 仪器

(1) 分光光度计，1.0cm 吸收池。

(2) 试管 16mm×150mm。

D 测定步骤

(1) 取 3 个试管按表 6-8 进行操作。

表 6-8 尿素测定操作步骤

加入试剂	测定管	标准管	空白管
尿素酶应用溶液/mL	1.0	1.0	1.0
血清/mL	10	0	0
尿素标准应用溶液/mL	0	10	0
水/mL	0	0	10

(2) 混匀，置 37℃水浴 15min，迅速向各管加入 5mL 酚显色剂，混匀，加入 5mL 碱性次氯酸钠溶液，混匀。各管置 37℃水浴 20min，使显色反应完全后，测量各管的吸光度。

4. 注意事项

(1) 血清中尿素浓度的正常值为 2.86～8.2mmol·L^{-1}。

(2) 空气中的氨气会污染试剂或玻璃仪器使结果偏高，使用铵盐抗凝剂也可使结果偏高，氟化物的浓度高时可抑制尿素酶的活性，使测定结果偏低。

(3) 酸、碱及重金属盐均会影响或破坏脲酶的活性，脲酶催化作用最适合 pH 值近中性。

(4) 车间空气中有害物质的最高容许浓度(mg·m^{-3})：氨 30；氧化氮（换算成 NO_2）5；氟化氢及氟化物（换算成 F）1；二氧化硫 15；苛性碱（换算成 NaOH）0.5。

(5) 本法也能测定尿液中尿素，方法为：1mL 尿样，加 0.5g 人造沸石（需预处理），加去氨水至 25mL，反复振摇数次，吸附尿中的游离铵盐，静置后吸取 1.0mL 稀释尿液，按无蛋白血清中尿素的检验方法测定，所测结果乘以稀释倍数 25。

思 考 题

1. 用羟胺三氯化铁分光光度法检验全血胆碱酯酶活性的原理是什么？写出检验原理中主要反应式？

2. 检验全血胆碱酯酶活性时，为什么不能过度挤压耳垂？

3. 用羟胺三氯化铁分光光度法检验全血胆碱酯酶活性时，为什么每次测定均需做标准管？

4. 用羟胺三氯化铁分光光度法检验大批全血胆碱酯酶活性时，为什么要分批加入三氯化铁？

5. 用溴麝香草酚蓝比色法（纸片法）检验全血胆碱酯酶活性时，为什么纸片要忌酸碱？

6. 用脲酶-波氏分光光度法检验无蛋白血清的原理是什么？

7. 蓝色吲哚酚是什么物质？

第四节　空气中有机磷农药的检验

一、空气中对硫磷（1605）的检验

胆碱酯酶分光光度法

1. 检验意义

空气中的有机磷农药进入人和动物的机体后可引起中毒，其毒作用的机理主要是抑制胆碱酯酶的活性，使胆碱酯酶失去分解乙酰胆碱的能力，乙酰胆碱积聚会引起神经功能紊乱，导致昏迷等中毒症状，常因呼吸衰竭死亡。用酶法检验空气中有机磷农药的含量可作为生产、生活环境中一项接触指标。

2. 检验原理

对硫磷（1605）经溴氧化后，对胆碱酯酶有抑制作用。胆碱酯酶可催化乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸，未被水解的剩余乙酰胆碱与碱性羟胺作用生成乙酰羟胺，乙酰羟胺与三氯化铁在酸性溶液中形成棕红色羟肟酸铁络合物，在波长 520nm 处测量吸光度，再由此换算成对硫磷的含量。主要反应式同全血胆碱酯酶活性的检验，羟胺三氯化铁分光光度法。

3. 检验方法

A　方法要点

此法需要用健康的马血清为酶原，取一定量马血清于 25mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲溶液稀释至刻度，配成活性为 70%～80%的胆碱酯酶溶液，置冰箱保存。马血清的取用量通过酶活性的检验来选取，计算酶活性的公式如下：

$$X = (A_0 - A_x)/A_0 \qquad (6\text{-}9)$$

式中　X——胆碱酯酶活性，%；

A_0——零管吸光度；

A_x——各管吸光度。

氯化乙酰胆碱在 37℃被胆碱酯酶催化水解 30min 的水解百

分数，即为胆碱酯酶的活性。取酶活性为70%～80%的马血清管作标准管，根据其中马血清的量（25mL溶液中含纯马血清的毫升数）来配制成活性为70%～80%的胆碱酯酶溶液。

以对硫磷的质量为横坐标，以胆碱酯酶活性的百分抑制率为纵坐标绘制标准曲线。用1.0cm吸收池，以水作参比调零，在波长520nm处测定吸光度，按下式计算胆碱酯酶被对硫磷抑制的百分数（或百分抑制率）：

$$Q = \left(1 - \frac{A_B - A}{A_B - A_0}\right) \times 100\% \qquad (6\text{-}10)$$

式中 Q——胆碱酯酶被对硫磷抑制的百分数，%；

A_B——B管的吸光度；

A——含对硫磷标准管和样品管的吸光度；

A_0——0号管，即空白管的吸光度。

按照绘制标准曲线时，测定各管吸光度的步骤，测定样品管的吸光度，计算出样品管的胆碱酯酶百分抑制率，再从标准曲线查出对硫磷质量。按下式计算空气中对硫磷的质量浓度：

$$\rho = 2m/V_0 \qquad (6\text{-}11)$$

式中 ρ——空气中对硫磷（1605）的质量浓度，$mg \cdot m^{-3}$；

m——从标准曲线查得样品管中对硫磷的质量，μg；

V_0——换算成标准状态下的采集空气样品的体积，L。

B 试剂

（1）吸收液（体积分数为5%） 吸取5mL甲醇，用水稀释至100mL。

（2）磷酸盐缓冲溶液（pH=7.20） 配制方法同全血胆碱酯酶活性的检验。

（3）氯化乙酰胆碱溶液（$1g \cdot L^{-1}$） 称取0.100g氯化乙酰胆碱，溶于100mL磷酸盐缓冲溶液中，置冰箱保存。如出现混浊，应重新配制。

（4）盐酸羟胺溶液（$139g \cdot L^{-1}$） 称取13.9g盐酸羟胺，用水溶解并稀释至100mL，置冰箱保存。

(5) 氢氧化钠溶液（140g·L^{-1}） 称取 14g 氢氧化钠，用水溶解并稀释至 100mL。

(6) 碱性羟胺溶液 配制方法同全血胆碱酯酶活性的检验。

(7) 三氯乙酸溶液（100g·L^{-1}） 称取 10g 三氯乙酸，溶于 100mL（1+2）盐酸溶液中。

(8) 三氯化铁溶液（100g·L^{-1}） 配制方法同全血胆碱酯酶活性的检验。

(9) 溴水 临用前，将 0.4mL 饱和溴水用水稀释至 100mL。

(10) 对硫磷标准贮备溶液 准确称取 0.2g 对硫磷纯品，用甲醇溶解后，转移到 100mL 容量瓶中，并用甲醇稀释至刻度，摇匀。贮于冷暗处或冰箱中。此溶液每 1mL 含 2mg 对硫磷。

(11) 对硫磷标准应用液甲 临用前，吸取 0.01mL 对硫磷标准贮备溶液，用 5%甲醇溶液稀释至 200mL 容量瓶刻度，摇匀。此溶液每 1mL 含 0.1μg 对硫磷。

(12) 对硫磷标准溶液乙 吸取 1mL 对硫磷标准溶液甲，用 5%甲醇溶液稀释至 100mL 容量瓶刻度，摇匀。此溶液每 1mL 含 0.01μg 对硫磷。

(13) 胆碱酯酶溶液 以健康马血清为酶原，取一定量马血清于 25mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲溶液稀释至刻度，配成活性为 70%～80%的溶液，置冰箱保存。马血清的取用量通过下述酶活性的检验选取。

取 3.0mL 新鲜健康的马血清，置于 25mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲溶液稀释至刻度，以此马血清溶液配制酶活性标准系列，见表 6-9。

表 6-9 酶活性标准系列的配制

管 号	马血清溶液/mL	磷酸盐缓冲溶液/mL	相当于每 25mL 纯马血清的毫升数
0	0	1.00	0
1	0.10	0.90	0.3

续表 6-9

管　号	马血清溶液/mL	磷酸盐缓冲溶液/mL	相当于每 25mL 纯马血清的毫升数
2	0.30	0.70	0.9
3	0.50	0.50	1.5
4	0.70	0.30	2.1
5	0.80	0.20	2.4
6	0.90	0.10	2.7
7	1.00	0	3.0

各管分别加 1mL 水。置于 37℃恒温水浴中预热 10min，然后每管加 1mL 氯化乙酰胆碱溶液（每隔 1min 加一管）。准确在 37℃温度下反应 30min，不时振摇，30min 后，按顺序从水浴中取出。各管分别加入 2.0mL 碱性羟胺溶液（每隔 1min 加一管），剧烈振摇 4min。向各管各加 1.0mL100g·L^{-1}三氯乙酸溶液，混匀，过滤。

滤液中各加 1.0mL 100g·L^{-1}三氯化铁溶液，混匀，用 1.0cm 吸收池，以水作参比调零，在 520nm 波长处测定吸光度，然后按式 6-9 计算酶活性。

C　仪器

（1）气体采样器。

（2）多孔玻璃砂滤板吸收管。

（3）恒温水箱（37℃±0.5℃）。

（4）分光光度计。

（5）秒表。

（6）具塞比色管 10mL、25mL。

（7）吸量管 1～10mL。

D　测定步骤

（1）采样、运输和保存。用一只 U 形多孔玻砂滤板吸收管，加入 2mL 5%甲醇吸收液，以 0.3～0.5L·min^{-1}的速度抽取 1～

10L 空气样品。记录采样的气温和气压。现场采样应避光保存并在 24h 内检验。

(2) 样品处理。将吸收管的进气口反复用管内吸收液洗涤，使吸附在进气口玻璃壁上的对硫磷溶于吸收液中，然后倒入 10mL 具塞比色管中，从中取出 1mL，置于 25mL 具塞比色管中，加 0.1mL 溴水，摇匀。此为样品管。

(3) 标准曲线的绘制。取 8 个比色管按表 6-10 配制标准系列。

表 6-10　标准系列的配制

管　号	标准应用液乙 /mL	标准应用液甲 /mL	5%甲醇溶液 /mL	溴水 /mL	对硫磷质量 /μg
0	0	0	1.00	0.1	0
1	0.50	0	0.50	0.1	0.005
2	1.00	0	0	0.1	0.01
3	0	0.20	0.80	0.1	0.02
4	0	0.40	0.60	0.1	0.04
5	0	0.60	0.40	0.1	0.06
6	0	0.80	0.20	0.1	0.08
B	0	0	1.00	0.1	0

1) B 管加 1mL 磷酸盐缓冲溶液。

2) 将样品管、标准管（包括 B 管）置于 37℃恒温水箱中，预热 10min，然后向各管加 1.0mL 胆碱酯酶溶液（每隔 1min 加一管，B 管不加），混匀。

3) 在 37℃恒温水箱中，准确反应 30min，再向各管加 1.0mL 氯化乙酰胆碱溶液（每隔 1min 加一管），再继续加温反应 30min（不时振摇）。

4) 每隔 1min 从恒温水箱中取出一管，加 2mL 碱性羟胺溶液，剧烈振摇 4min。然后每管各加 1mL 100g·L^{-1}三氯乙酸溶液，摇匀，过滤。滤液中各加 1.0mL 100g·L^{-1}三氯化铁，剧烈振摇。

5）用1.0cm吸收池，以水作参比调零，测定吸光度。再按式6-10计算胆碱酯酶被对硫磷抑制的百分数（或百分抑制率）。

（4）样品测定。按照（3）中2）～5）测定样品管的吸光度。

4、注意事项

（1）现场采样应避光保存并在24h内检验。

（2）对硫磷标准应用溶液必须临用前稀释，当天使用，放置24h左右会部分水解使其含量降低。

（3）反应温度和时间对测定结果有很大影响，所以必须准确控制温度在37℃±0.5℃、时间在30min±0.5min内，加碱性羟胺后，剧烈振摇4min。

（4）每用一批马血清，必须测定其胆碱酯酶的活性。血清在冰箱内保存时间不能超过1个月，否则必须重新测定酶的活性。

（5）为使血清中蛋白质沉淀完全后过滤，在加入三氯乙酸后，必须振摇均匀并放置。滤液须澄清，如有混浊，必须进行过滤，才可测定。

（6）在滤液中加入三氯化铁后，必须剧烈振摇，否则产生大量气泡能够影响测定结果。显色后，必须在30min内测定完毕，否则颜色减褪。三氯化铁可在过滤前加入，但从加入起到测定不能超过30min。

（7）空气中的共存污染物，例如，硫化物、硫化氢、氯化物等的含量大于1μg时，对本法有干扰。

（8）空气中农药甲基对硫磷和苯硫磷的含量也可用此酶法检验。

（9）本法的最低检测限为0.005μg·mL^{-1}。

二、空气中敌敌畏（DDVP）的检验

胆碱酯酶分光光度法

1. 检验意义

检验空气中敌敌畏含量的意义与检验空气中有机磷农药（1605）的含量相同。

2. 检验原理

空气中敌敌畏（DDVP）的检验原理与空气中对硫磷（1605）的酶法检验相同。

3. 检验方法

A 方法要点

此法是用敌敌畏的标准溶液，绘制以敌敌畏的质量为横坐标，以胆碱酯酶活性的百分抑制率为纵坐标的标准曲线，按式 6-11 计算空气中敌敌畏的质量浓度。其余操作均同空气中对硫磷（1605）的酶法检验。

B 试剂

(1)敌敌畏标准贮备溶液 准确称取 0.2g 敌敌畏(DDVP)纯品，溶于甲醇中，转移至 100mL 容量瓶中，并用甲醇稀释至刻度，摇匀。置暗处或冰箱中保存。此溶液每 1mL 含 2mg 敌敌畏。

(2)敌敌畏标准应用溶液 取 0.01mL 敌敌畏标准贮备溶液，用 5%甲醇溶液稀释至 100mL 容量瓶刻度，摇匀。此溶液每 1mL 含 0.2μg 敌敌畏。

其余试剂同空气中对硫磷的检验。

C 仪器

同空气中对硫磷的检验。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。同空气中对硫磷的检验。

(2) 样品处理。同空气中对硫磷的检验。

(3) 标准曲线的绘制。取 8 个具塞比色管按表 6-11 配制标准系列。

表 6-11 标准系列的配制

管 号	敌敌畏标准应用液 /mL	5%甲醇溶液 /mL	敌敌畏质量 /μg
0	0	1.00	0
1	0.1	0.90	0.02

续表 6-11

管　号	敌敌畏标准应用液 /mL	5%甲醇溶液 /mL	敌敌畏质量 /μg
2	0.2	0.80	0.04
3	0.3	0.70	0.06
4	0.4	0.60	0.08
5	0.5	0.50	0.10
6	0.7	0.30	0.14
B	0	1.00	0

操作步骤和所加试剂同空气中对硫磷的检验。

（4）样品测定。同空气中对硫磷的检验。

4. 注意事项

（1）空气中敌敌畏的检验，注意事项与空气中对硫磷的酶法检验相同，但（9）项除外。

（2）本法的最低检测限为 0.02μg·mL $^{-1}$。

三、空气中有机磷总量（以 1059 计）的检验

1. 检验意义

空气中有机磷总量（以 1059 计）的检验意义与空气中有机磷农药（1605）的检验相同。

2. 检验原理

空气中有机磷农药总量（以 1059 计）的检验原理与空气中对硫磷的酶法检验相同。

3. 检验方法

A　方法要点

此法是用 1059 标准溶液，参照空气中对硫磷的酶法检验配制标准管并按其操作步骤进行，绘制以 1059 的质量为横坐标，以胆碱酯酶活性的百分抑制率为纵坐标的标准曲线。按式 6-11 计算空气中有机磷总量（以 1059 计）的质量浓度。其余试剂、仪器和操

作同空气中对硫磷的检验。

B 试剂

(1) 1059 标准贮备溶液 准确称取 0.2g 内吸磷 (1059) 纯品于 100mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，置冰箱保存。此溶液每 1mL 含 2mg1059。

(2) 1059 标准应用溶液甲 使用时吸取 1mL 标准贮备溶液用 5%甲醇稀释至 200mL 容量瓶刻度，摇匀。此溶液每 1mL 含 10μg1059。

(3) 1059 标准应用溶液乙 吸取 10mL 标准应用溶液甲，用 5%甲醇稀释至 100mL 容量瓶刻度，摇匀。此溶液每 1mL 含 1μg1059。

其余试剂同空气中对硫磷的检验。

C 仪器

同空气中对硫磷的检验。

D 测定步骤

(1) 采样、运输和保存。采 2～5L 空气，其他同空气中对硫磷的检验。

(2) 样品处理。同空气中对硫磷的检验。

(3) 标准曲线的绘制。取 8 个比色管，参照空气中对硫磷的检验配制标准管并按其操作步骤进行。

(4) 样品测定。同空气中对硫磷的检验。

4. 注意事项

(1) 1059 是一种高效内吸性有机磷农药，与其他有机磷农药有类似的作用，此法测得的实际上是空气中有机磷农药的总量，以 1059 计算。如配制甲基 1059 标准溶液，也可按此法操作步骤绘制以甲基 1059 的质量为横坐标，以胆碱酯酶活性的百分抑制率为纵坐标的标准曲线，计算甲基 1059 的含量。

(2) 有机磷农药抑制胆碱酯酶的速度与其化学结构有一定关系。磷酸酯类化合物，例如，敌敌畏，其 P═O 键直接与胆碱酯酶共价结合，能快速抑制胆碱酯酶的活性，是直接抑制剂。而硫

代磷酸酯类化合物，例如，对硫磷，其 P═S 必须通过氧化脱硫成为 P═O 键(称为活化作用)，才能提高抑制胆碱酯酶活性的能力，是间接抑制剂，这类有机磷农药的抑制作用慢，但持续时间长。注意有机磷农药为剧毒物。

(3) 其他注意事项同空气中对硫磷的检验，但 (9) 项除外。

思 考 题

1. 胆碱酯酶分光光度法检验空气中对硫磷含量的原理是什么?
2. 对硫磷标准应用溶液为什么临用前稀释并当天使用。

附　录

有关检验操作时的注意事项及说明

在各检验方法的操作中需要说明的几点如下：

(1) 常用的各种玻璃容量器在使用之前，必须校正容量。20℃是玻璃容量器的标准温度，其标准容量值是该标准温度下的体积。

(2) 检验用水，未注明者均为一次蒸馏水或同等纯度的去离子水。

(3) 所用试剂的纯度，未注明者均为分析纯，并应在使用前检查试剂空白，在痕量检验中必须把空白值降至可忽略的程度。为了降低空白值，必须做到：采用高纯度的水、酸、有机溶剂和试剂，并减少它们的用量，必要时预先精制和纯化；应在采取局部或整个的防尘与净化措施的环境下进行操作，以防环境污染；使用以适宜的惰性材料制成的器皿，并采用合适的清洗技术，防止器皿的污染；检验工作者必须避免自身(化妆品、外敷药物等)对样品的沾污。

(4) 本书执行法定计量单位。浓度 c 仅指物质的量浓度。

(5) 求方法的精密度用平均值加标准差 ($\overline{X}\pm S$) 或变异系数〔$CV=(S/\overline{X})\times 100\%$〕。一般被测物的浓度不小于 $10^{-9}g\cdot g^{-1}$ (或 $g\cdot mL^{-1}$) 时，CV (包括连续精密度和重现性精密度) 小于 10%；如果测定浓度小于 $10^{-9}g\cdot g^{-1}$ (或 $g\cdot mL^{-1}$)，CV 小于平行样最大允许误差为附表中规定的 1/2。

附表　平行样的最大允许误差

测定结果所在数量级/$g\cdot mL^{-1}$	相对偏差最大允许值/%
10^{-6}	5
10^{-7}	10
10^{-8}	15

续附表

测定结果所在数量级/g·mL^{-1}	相对偏差最大允许值/%
10^{-6}	20
10^{-10}	30

注：平行样的最大允许误差（%）$=\frac{\text{两个平行结果之差}}{\text{两个平行结果之和}}\times 100$

（6）表示准确度用加标回收率。在试样中加入定量待测物的标准溶液，从测定结果中减去试样中被测物的含量后，计算加入量（预期值）回收的百分率。回收率的计算如下式：

$$P=\frac{J-Y}{B}$$

式中 P ——加入量回收的百分率，%；

J——加标样品的测定值；

Y——样品含量的测定值；

B ——加入标准的量。

加标的量及加标待测物的化学形式应尽量与试样中待测物的含量相近。加标后的测定值不能超过方法的检测上限。当被测物质量分数不小于 10^{-8}g·g^{-1}（或质量浓度不小于 10^{-9}g·mL^{-1}）时，回收率必须在 85%～105%之间。

（7）虽然根据 GB/T 16126-1995 生物监测质量保证规范的要求，继续保留使用尿比重计测量尿比重，但法定计量单位已取消了比重，所以本书将比重改为密度。

（8）尿质控样，用加标模拟尿、接触者混合尿或加标的正常人混合尿作质控样。

（9）血质控样，用标准血样、接触者混合血样或加标的正常人混合血样作质控样。

（10）尿或血样的检验，在测定前后以及每测定 10 个样品后，测定一次质控样。

（11）质控样用标准尿样或加标模拟尿时，可考察准确度和精密度。用接触者尿或加标正常尿时，只能考察精密度，但人尿不

易久存，模拟尿含人尿的大量成分。

（12）质控样如使用标准血样时，可考察准确度及精密度。如使用接触者血或加标的正常血时，只考察精密度。

参 考 文 献

1 Gerald Goldstein. 环境污染的生化指示物．朱新源译自"Indicators of environmental quality" P. 109～119 赵振华校．见：中国科学技术情报研究所编辑，环境污染分析译文集，第三集．北京：科学技术文献出版社，1976；143～149

2 奚旦立，刘秀英，郭安然．环境监测．北京：高等教育出版社，1986

3 环境污染分析方法科研协作组．环境污染分析方法．第一卷无机物分析．北京：科学出版社，1980

4 顾学箕，王移兰．劳动卫生学．北京：人民卫生出版社，1985

5 GB/T 16126—1995 生物监测质量保证规范

6 WS/T 68－1996 研制生物样品监测检验方法指南

7 GB/T 5009·17—1996 食品中总汞的测定方法

8 WS/T 25－1996 尿中汞的冷原子吸收光谱测定法，（一）碱性氯化亚锡还原法

9 WS/T 26－1996 尿中汞的冷原子吸收光谱测定法，（二）酸性氯化亚锡还原法

10 GB/T 5009·12 1996 食品中铅的测定方法

11 WS/T 17－1996 尿中铅的双硫腙分光光度测定法

12 WS/T 18－1996 尿中铅的石墨炉原子吸收光谱测定法

13 WS/T 20－1996 血中铅的石墨炉原子吸收光谱测定法

14 GB/T 5009·15—1996 食品中镉的测定方法

15 WS/T 32—1996 尿中镉的石墨炉原子吸收光谱测定法

16 WS/T 31—1996 尿中镉的火焰原子吸收光谱测定法

17 WS/T 34—1996 血中镉的石墨炉原子吸收光谱测定法

18 GB/T 14962－1994 食品中铬的测定方法

19 WS/T 36－1996 尿中铬的分光光度测定法

20 WS/T 38－1996 血中铬的石墨炉原子吸收光谱测定法

21 GB/T 5009·11－1996 食品中砷的测定方法

22 WS/T 28－1996 尿中砷的二乙基二硫代氨基甲酸银 三乙醇胺分光光度测定法

23 WS/T 29－1996 尿中砷的氢化物发生-火焰原子吸收光谱测定法

24 生物化学及生物化学检验技术编写组．生物化学及生物化学检验技术．南

京：江苏科学技术出版社，1979
25 WS/T 49—1996 尿中苯酚气相色谱测定法，（一）液晶柱法
26 WS/T 48 1996 尿中酚的分光光度测定法
27 WS/T 57· 1996 尿中对硝基酚的分光光度测定法
28 WS/T 55—1996 尿中对氨基酚的分光光度测定法
29 WS/T 52—1996 尿中马尿酸的分光光度测定法
30 WS/T 53 1996 尿中马尿酸、甲基马尿酸的高效液相色谱测定方法
31 WS/T 23—1996 尿中 δ-氨基乙酰丙酸的分光光度测定法
32 WS/T 尿中硫氰酸盐的吡啶-巴比妥酸分光光度测定法
33 GB 11504—89 尿中粪卟啉（棕色素）的半定量测定
34 GB 8788—88 血中赫恩滋小体检查法
35 GB 8788—88 血中高铁血红蛋白含量的测定法
36 WS/T 42—1996 血中碳氧血红蛋白的分光光度测定法
37 GB 8781 88 血液碳氧血红蛋白测定法，分光光度法测定血液碳氧血红蛋白
38 WS/T 22 1996 血中游离原卟啉的荧光光度测定法
39 叶应妩，王毓兰．全国临床检验操作规程（第二版）．北京：中华人民共和国卫生部医政司，1997
40 WS/T 66 1996 全血胆碱酯酶活性分光光度测定法，（-）羟胺三氯化铁法
41 GB 7794 87 全血胆碱酯酶活性测定，羟肟酸铁比色法
42 GB 7794—87 全血胆碱酯酶活性测定 纸片法
43 ［美］G.G. 吉尔鲍特著．酶法分析．缪辉南译．北京：科学出版社，1977
44 ［联邦德国］波林格生化试剂公司编．酶法食品分析．胡学智，陆敬懿，张惠荪译．上海：科学技术文献出版社，1985

封面页
书名页
版权页
前言
目录
正文