前　言

本标准是《海洋监测规范》的第6部分，是在HY 003.6—91行业标准的基础上修订而成的。本标准规定了生物体分析的要求和分析方法。

《海洋监测规范》包括下列部分：

GB 17378.1—1998　海洋监测规范　第1部分：总则

GB 17378.2—1998　海洋监测规范　第2部分：数据处理与分析质量控制

GB 17378.3—1998　海洋监测规范　第3部分：样品采集、贮存与运输

GB 17378.4—1998　海洋监测规范　第4部分：海水分析

GB 17378.5—1998　海洋监测规范　第5部分：沉积物分析

GB 17378.6—1998　海洋监测规范　第6部分：生物体分析

GB 17378.7—1998　海洋监测规范　第7部分：近海污染生态调查和生物监测

本标准的附录A是标准的附录。

本标准由国家海洋局提出。

本标准由国家海洋标准计量中心归口。

本标准由国家海洋局第三海洋研究所负责起草。

本标准主要起草人：许昆灿、张春明、陈维岳、洪君超、陈邦龙。

中华人民共和国国家标准

海洋监测规范
第6部分:生物体分析

GB 17378.6—1998

The specification for marine monitoring
Part 6:Organisim analysis

1 范围

本标准规定了海洋生物(贻贝、虾及鱼)中13项有害物质含量的测定方法,并对样品采集、运输、贮存、预处理和测定结果的计算等提出技术要求。

本标准适用于大洋,近海和沿海水域的海洋生物污染调查与监测。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 17378.2—1998 海洋监测规范 第2部分:数据处理与分析质量控制

GB 17378.4—1998 海洋监测规范 第4部分:海水分析

GB 17378.5—1998 海洋监测规范 第5部分:沉积物分析

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 蒸至近干 evaporation to dryness

将溶剂蒸发至小体积(0.2 mL～0.3 mL),若有残渣时,残渣应湿润状。

4 一般规定

4.1 样品的采集与制备

4.1.1 采样对象

贻贝、虾和鱼类。

4.1.2 试剂

4.1.2.1 去离子水或等效蒸馏水,其痕量金属含量应低于分析方法的检出限。或用未受沾污的表层海水。

4.1.2.2 合成洗涤剂。

4.1.3 仪器和设备

——塑料冷冻箱:配有冰袋。用于贻贝贮存和运输时,底部必须具有栅板,以免样品浸入水中;

——冰箱;

——低温冰箱;

——聚乙烯袋;

国家质量技术监督局1998-06-22批准 1999-01-01实施

——塑料板和尺子：用于长度测量；
——塑料刀；
——玻璃或陶瓷碟(供制备样品用)；
——镊子：塑料制品或其他合适材料的制品；
——高密度聚乙烯袋和塑料容器：供速冻保存样品用，装样前，须用合成洗涤剂清洗，并用蒸馏水洗净；
——高密度聚乙烯膜：供罩工作台用；
——小张聚乙烯膜：供称重用；
——分析天平：感量 0.1 mg；
——塑料洗瓶；
——刮刀：供采集贻贝用；
——塑料桶：20～50 L；
——大号金属刀：无锈斑，供切取鱼组织用；
——匀浆器：不锈钢或其他适宜材料的制品；
——塑料刷：毛刷坚硬，用以去除贻贝外壳的附着物；
——称量瓶：50 mL；
——电热烘箱；
——干燥箱；
——冷冻干燥设备。

4.1.4 采样与运输

4.1.4.1 准备工作

用合成洗涤剂(4.1.2.2)清洗冷冻箱、高密度聚乙烯袋、塑料板及尺、大号金属刀、刮刀，再用蒸馏水或表层海水(4.1.2.1)漂洗干净。

4.1.4.2 贻贝采集

用清洁刮刀从其附着物上采集贻贝样。

选取足够数量的完好贻贝存于冷冻箱中。若需长途运输(炎热天超过 2 h)，应把贻贝样品盛于塑料桶中，将现场采集的清洁海水淋洒在贻贝上，样品保持润湿状但不能浸入水中。

若样品处理须在采样 24 h 后进行，可将贻贝样存于高密度塑料袋中，压出袋内空气，将袋口打结或热封，将此袋和样品标签一起放入聚乙烯袋中并封口，存于低温冰箱中。

4.1.4.3 虾与中小型鱼样采集

按一定要求选取足够数量的完好的生物样，放入干净的聚乙烯袋中，要防止刺破袋子。挤出袋内空气，将袋口打结或热封，将此袋和样品标签一起放入另一聚乙烯袋中，并封口，低温冷藏。只有在贮存期不太长时(热天不超过 48 h)，方可使用冰箱或冷冻箱存放样品。

4.1.4.4 大型鱼样采集

测量并记下鱼样的叉长、体重和性别。

用清洁的金属刀切下至少 100 g 肌肉组织，厚度至少 5 cm，以便在样品处理(4.1.5.5)时，切除沾污或内脏部分。存于清洁的聚乙烯袋中，挤出空气并封口，将此袋与样品标签一起放入另一聚乙烯袋中，封口，于低温冰箱中贮存。若保存时间不太长(热天不超过 48 h)，可用冰箱或冷冻箱贮放样品。

4.1.5 样品预处理

4.1.5.1 准备工作

若必要时将冷冻样在冰箱(－2～4℃)中放置过夜，使部分解冻以便切片。

用合成洗涤剂(4.1.2.2)清洗塑料刀、碟、镊子、塑料板及尺和称重塑料膜，用蒸馏水或清洁海水(4.1.2.1)漂洗干净。工作台用洗净的塑料膜罩上。用合成洗涤剂(4.1.2.2)仔细地洗手，后用蒸馏水或

清洁的海水(4.1.2.1)漂洗干净。

4.1.5.2 贻贝样的制备

用塑料刀或塑料刷除去贝壳外部所有的附着物。

用蒸馏水或清洁的海水(4.1.2.1)漂洗每一个贻贝,让其自然流干,拉出足丝。用天平称个体全重,并记下重量。

用另一把塑料刀插入足丝伸出口,切开闭合肌,打开贻贝(见图1)。

用蒸馏水或清洁的表层海水(4.1.2.1)洗贝壳内的软组织,用塑料刀和镊子取出软组织,让水流尽。

1) 单个体样品:将软组织放入已称重的塑料容器内,再称重,记下鲜重。盖紧,贴上标签。用尺子测量并记录贝壳长度(见图1)。

2) 多个体样品:按上述步骤将至少10个贻贝的软组织放于已知重量的塑料容器中,称重,记下鲜重。于匀浆器中匀化样品,将匀浆放回原塑料容器,再称重,并记录总重量,计算匀浆重。贴上样品标签。

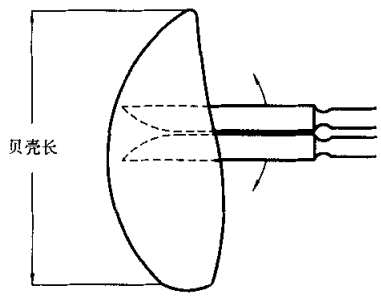


图1 切断闭合肌

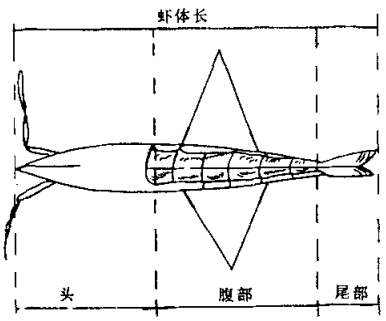
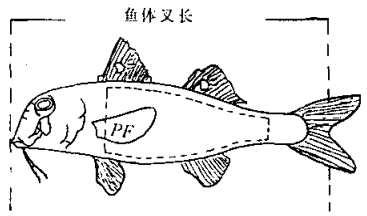


图2 虾体图



PF—胸鳍;DF—脊鳍,虚线表示刀切位置

图3 鱼体简图

各生物个体大小应相近,并在取出生物组织前分别测量其个体长度和总重量。

4.1.5.3 虾样制备

4.1.5.3.1 单个体样品

用尺子量虾体长(见图2),将虾放在聚乙烯称样膜上,称重,记下长度和鲜重。

用塑料刀将腹部与头胸部及尾部分开,小心将其内脏从腹部取出(图2)。腿全部切除。将腹部翻下,用塑料刀沿腹部外甲边缘切开,用塑料镊子取下内侧外甲并弃去。

用另一把塑料刀松动腹部肌肉,并用镊子取出肌肉。

检查性腺,记录所鉴别的性别。

用镊子将肌肉移入塑料容器中,称重并记录鲜重。盖紧容器,标上号码。将几个容器一起放入同一塑料袋中,并附一张样品清单,结紧袋口,低温冰箱中保存。

4.1.5.3.2 多个体样品:按上述方法制备样品,仔细地记录各个体长度、鲜重、腹部肌肉重和性别。每个样品须包括6个以上性别相同、大小相近的个体肌肉。将样品放入匀浆器中匀化腹部肌肉,转入已知重

量的塑料容器中盖紧，标上号码，称重，记下鲜重和其他数据。

将几个塑料容器放在同一塑料袋中，并附上样品清单，结紧袋口，在低温冰箱中保存。

4.1.5.4 中小型鱼样制备

4.1.5.4.1 单个体样品：测量鱼的叉长，并于聚乙烯称样膜上称重。记下叉长和体重。

用蒸馏水或清洁表层海水(4.1.2.1)洗涤鱼样，将它放在工作台上，用塑料刀切除胸鳍并切开背鳍附近自头至尾部的鱼皮(图3)。

在鳃附近和尾部，横过鱼体各切一刀；在腹部，鳃和尾部两侧各切一刀。四刀只切在鱼体一侧，且不得切太深，以免切开内脏，沾污肉片。最好在切片时，由另一人帮助按住鱼的头尾。

用镊子将鱼皮与肉片分离，谨防外表皮沾污肉片。

用另一把塑料刀将肌肉与脊椎分离，并用镊子取下肌肉。将组织盛于塑料容器中，称重并记录重量。

若一侧的肌肉量不能满足分析用量，取另一侧肌肉补充。

盖紧容器，贴上标签或记号，记录各所有数据，于低温冰箱中保存。

鉴定性腺性别。

4.1.5.4.2 多个体试样：制备方法如下。仔细记下各个体体长、鲜重、肌肉重。鉴定性别。个体数不应少于6个，且性别应相同，大小相近。

用匀浆器匀化鱼组织，将匀浆转入已知重量的塑料容器中，盖紧，贴上标签并称重，记下匀浆重和其他数据。置于低温冰箱中存放。

4.1.5.5 大型鱼样制备

若必要，将现场采集的样品(4.1.4.4)放在−2～4℃冰箱中过夜，使部分解冻以便于切片。

用蒸馏水或清洁海水(4.1.2.1)洗涤鱼样，置于清洁的工作台上。剔除残存的皮和骨，用塑料刀切去表层，再用另一把塑料刀重复操作一次，留下不受污染的均匀的肌肉组织。将肌肉组织放入塑料容器中，盖紧，贴上标签，称重，将全部数据记入记录表，样品存于低温冰箱中。

4.1.5.6 干样制备

将部分新鲜试样按4.1.6.1或4.1.6.2步骤烘干，计算干/湿比，以校正水分含量。干燥后的样品用玛脑研钵磨碎，全部筛过80～100目(尼龙筛)，供痕量元素分析用。

4.1.6 干重测定

4.1.6.1 烘干

半开称量瓶的磨口盖，放入105℃烘箱中。2 h后，取出称量瓶，置于干燥器中冷却30 min。

盖好瓶盖，用分析天平称重，记下重量。取5～10 g生物制备样(4.1.5)于称量瓶中，盖好瓶盖，再称重(±0.5 mg)并记下重量。

将盛样品的称量瓶半开盖放入105℃烘箱中。24 h后取出，置于干燥器中冷却30 min。盖好瓶盖后称重并记录所称重量。

重复烘干操作，至前后两次烘干后的重量差小于总重量的0.5%。计算干重和干/湿比。

4.1.6.2 冷冻干燥

对类脂物含量高的生物样品，不能烘干至恒重，则须用冷冻干燥。

准确称取1～2 g生物制备样(4.1.5)于干净的冷冻干燥的样品容器中，冷冻干燥24 h，再称重一次。再次冷冻干燥24 h，再称重。两次称重的重量差应小于总重量的0.5%。否则，应继续干燥至符合要求。

计算干重和干/湿比(F)。

4.1.7 注意事项

4.1.7.1 在实验室附近采集贻贝，不存在特殊的运输和贮藏问题。运往实验室时，仅须使贻贝样通风并用海水保持润湿。采自潮间带的贻贝，在空气中可生存24 h。浸在海水中的贻贝，会吸水并排泄废物。贻贝在空气中，贝壳闭合，代谢速度大大降低，故运输时，不应将贻贝放在水中。

4.1.7.2 手洗净之后，不应接触解剖组织，最好带上手套；若条件许可，准备工作和样品制备均应在洁净条件下进行。

4.1.7.3 制备多个体样品时，应取性别相同、个体大小相近的生物。取出软组织之前，应分别测量各个体体长和重量。

4.1.7.4 样品消化前，将盛有样品的容器总重量与贮存时之重量进行比较，可发现贮存期间样品是否失重。

4.1.7.5 不同部位肌肉的痕量金属含量可能存在差别，故实际样品的有关资料应尽可能记录详细。

4.1.7.6 用于有机氯农药和石油烃测定的生物样品，样品采集和预处理的设备和试剂作适当的相应改变，应避免采用塑料器皿和含有卤代烃或石油烃的试剂。

4.1.7.7 生物体中总汞及有害有机物的测定，不宜用干燥后的样品。该时，用湿样测定，结果仍以干样中被测物的含量来表示。

4.2 要求

4.2.1 分析样品的烘干：未注明干燥温度及时间时，均指105℃±1℃，干燥2 h。

4.2.2 标准溶液配制中，所有的移液管均应事先进行容量校正。量瓶均用一级品。

4.2.3 所有容器的净化除另有注明外，均先用(1+3)硝酸浸泡2～3 d后，再用去离子水仔细淋洗干净，晾干后备用。

4.2.4 数据处理按GB 17378.2—1998要求执行。

4.2.5 文内pH值除注明测量方法外，均可用精密或广泛pH试纸测量。

表1 从分析样中抽取检查样的比例

分析样个数	<10	10～30	>30
检查样抽取百分数	50	40	30

4.2.6 为检查分析结果的质量，由业务主管部门从一批分析样中按表1任意抽取检查样，分别装袋并另编样号，将基本样与检查样交有关人员进行测定。

4.2.6.1 抽查样的测项与基本样相同。

4.2.6.2 当分析样数量较多时，基本样与检查样可不必安排在同批内进行测试。

4.2.6.3 测试所得的结果由业务主管部门汇总，按表2所列双样相对偏差值控制分析质量。当某测项双样检查结果超差率大于30%时，此批基本样中该测项要全部重新称样进行测定。若仍出现上述超差情况，主管部门应与分析人员认真检查分析原因(如标准溶液的配制，环境质量，所有仪器设备有无不正常情况等)后，再进行这批分析样(基本样与检查样)的测定。当某测项双样检查结果超差率小于30%时，超差的样品需重新称样进行测定，直至新测定结果合格为止。按平行双样的均值报出结果。

表2 平行双样相对偏差表

分析结果所在数量级	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
相对偏差容许限(%)	4	8	15	20	30	40	计算：$\frac{\lvert A-B\rvert}{A+B}\times 100\%$

每批分析的样品(20个左右)由业务主管部门插入2～3个标准生物样品(另行编号)，以检验有无系统误差。

4.3 说明

4.3.1 各种酸碱的密度(ρ)是指20℃时的g/mL。

4.3.2 干燥剂在不指明具体名称时，均指变色硅胶。

4.3.3 所配制的元素的标准溶液的浓度均指该元素的浓度。

4.3.4 没有指明溶剂的溶液都是水溶液。

5 测定项目、方法及检出限

测定项目方法及检出限见表3。

表3 测定项目方法检出限

项目	分析方法	检出限 $W(10^{-6})$	项目	分析方法	检出限 $W(10^{-6})$
总汞	冷原子吸收光度法	0.01	铬	二苯碳酰二肼分光光度法	0.40
	双硫腙分光光度法	0.01		无火焰原子吸收分光光度法	0.04
铜	无火焰原子吸收分光光度法	0.4	砷	砷钼酸-结晶紫分光光度法	2
	阳极溶出伏安法	1		氢化物原子吸收分光光度法	0.4
	火焰原子吸收分光光度法	2		催化极谱法	2
	二乙基二硫代胺基甲酸铵分光光度法	0.8			
铅	无火焰原子吸收分光光度法	0.04	镉	无火焰原子吸收分光光度法	0.005
	阳极溶出伏安法	0.3		阳极溶出伏安法	0.4
	火焰原子吸收分光光度法	0.6		火焰原子吸收分光光度法	0.08
	双硫腙分光光度法	0.5		双硫腙分光光度法	0.3
锌	火焰原子吸收分光光度法	0.4	硒	荧光分光光度法	0.2
	阳极溶出伏安法	2		二氨基联苯胺四盐酸盐分光光度法	0.5
	双硫腙分光光度法	0.1		催化极谱法	0.03
石油烃	荧光分光光度法	1(湿重)	多氯联苯	气相色谱法	43 pg
有机氯农药(666、DDT)	气相色谱法	α-666 5 pg γ-666 7 pg β-666 3 pg σ-666 9 pg pp′-DDE 5 pg op′-DDT 17 pg pp′-DDD 8 pg pp′-DDT 40 pg	狄氏剂	气相色谱法	3 pg

6 总汞

6.1 冷原子吸收光度法

6.1.1 适用范围和应用领域

本方法适用于海洋生物体中总汞的测定。对含碘量高的生物样品，应添加适量硝酸银消除碘对测定的干扰。

检出下限(W)：0.01×10^{-6}

6.1.2 方法原理

以五氧化二钒作催化剂，用硝酸-硫酸消化生物样品，将有机汞全部转化为无机汞，再用氯化亚锡将汞离子还原成金属汞，用气-液平衡开路吸气冷原子吸收测定系统于253.7 nm波长测定总汞含量。

6.1.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

6.1.3.1 五氧化二钒(V_2O_5)

6.1.3.2 无水氯化钙($CaCl_2$)，用于装填干燥管。

6.1.3.3 硝酸(HNO_3)：$\rho=1.42$ g/mL。

6.1.3.4 硫酸(H_2SO_4)：$\rho=1.84$ g/mL，工艺超纯。

6.1.3.5 硫酸溶液：0.5 mol/L

在不断搅拌下，将 28 mL 硫酸(6.1.3.4)徐徐加入 972 mL 水中。

6.1.3.6 盐酸溶液：1+1

将盐酸(HCl，ρ=1.19 g/mL)与等体积水混合。

6.1.3.7 硝酸溶液：1+19

用 1 份硝酸(6.1.3.3)与 19 份水混合。

6.1.3.8 氯化亚锡溶液：100 g/L

称取 10 g 氯化亚锡于烧杯中，加入 100 mL 盐酸溶液(6.1.3.6)，加热至溶解，冷却后装于棕色瓶内，使用时用等体积水稀释。若汞杂质含量高，可用鼓泡法去除，直至溶液中汞含量不能检出。

6.1.3.9 低汞海水：表层海水经滤纸过滤，向每升海水徐徐加入 28 mL 硫酸(6.1.3.4)酸化，海水汞含量应低于 0.005 μg/L。

6.1.3.10 汞标准贮备溶液：1.00 mg/mL

称取 0.135 4 g 氯化汞($HgCl_2$)(预先在硫酸干燥器中干燥)于 10 mL 烧杯中，用硝酸溶液(6.1.3.7)溶解。全量转入 100 mL 量瓶中，用硝酸溶液(6.1.3.7)稀释至标线，混匀。保存期一年。

6.1.3.11 汞标准中间溶液：10.0 μg/mL

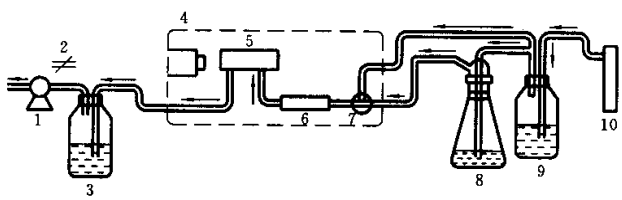
量取 1.00 mL 汞标准贮备溶液(6.1.3.10)于 100 mL 量瓶中，用硝酸溶液(6.1.3.7)稀释至标线，混匀。保存期一星期。

6.1.3.12 汞标准使用溶液：0.100 μg/mL

量取 1.00 mL 汞标准中间溶液(6.1.3.11)于 100 mL 量瓶中，用硫酸溶液(6.1.3.5)稀释至标线，混匀。当天配制。

6.1.4 仪器及设备

——测汞装置(图 4)；



1—抽气泵；2—空气流量调节阀；3—含汞废气吸收器；4—测汞仪；5—光吸收池；6—干燥管；
7—三通阀；8—汞蒸气发生瓶；9—空气净化装置；10—气体流量计

图 4 冷原子吸收测汞装置

——汞蒸气发生瓶：250 mL 锥形洗瓶改制，将洗瓶通气管下端截断，使管端刚离开待测溶液液面；

——电热板：铺上约 3 cm 厚细砂；

——实验室常备仪器及设备。

6.1.5 分析步骤

6.1.5.1 绘制标准曲线

6.1.5.1.1 取 6 个 250 mL 汞蒸气发生瓶，加 100 mL 低汞海水(6.1.3.9)，然后分别加入 0，0.10，0.20，0.30，0.40，0.50 mL 汞标准使用溶液(6.1.3.12)，混匀。

6.1.5.1.2 将测汞仪上的三通开关转至调零档，以 1～1.5 L/min 流速的空气流通过光吸收池。

6.1.5.1.3 将汞蒸气发生瓶依次连接于测汞仪上，加入 2 mL 氯化亚锡溶液(6.1.3.8)，迅速塞紧汞蒸气发生瓶的塞子，振摇 1 min。

6.1.5.1.4 调节测汞仪零点，将三通开关转到测定档，测其吸光值 A_i 及标准空白吸光值 A。

6.1.5.1.5 将数据填入表 GB 17378.4—1998 附录表 A5 中。以吸光值 A_i-A_0 为纵坐标，相应的汞含量(μg)为横坐标，绘制标准曲线。

6.1.5.2 样品消化

准确称取 2.5 g(±0.001 g)湿样,放入 100 mL 高型烧杯中,加入 40 mg 五氧化二钒(6.1.3.1),8 mL硝酸(6.1.3.3),盖上表面皿,置于 140～160℃电热板上加热 10 min。取下,稍冷后加入 15 mL 硫酸(6.1.3.4),继续加热 20 min。取下,稍冷后加 10 mL 水,再加热 30 min,取下,冷却后全量转入 100 mL 量瓶中,加水稀至标线,混匀,得样品消化液。同时制备分析空白试液。

6.1.5.3 样品测定

量取适量样品制备液于汞蒸气发生瓶中,加水至 100 mL。其余按 6.1.5.1.2～6.1.5.1.4 步骤测定吸光值(A_s)及分析空白吸光值(A_b)。以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应的汞的量(μg)。

6.1.6 记录与计算

将样品测定数据填入表 A1 中,按式(1)计算样品干样中汞的含量:

$$W_{Hg}=\frac{mV_1}{V_2MF} \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中:W_{Hg}——生物干样中总汞的含量质量比,10^{-6};

m——从标准曲线上查得的汞的量,μg;

V_1——样品消化液的体积,mL;

V_2——测定分样体积,mL;

M——样品的称取量,g;

F——样品的干/湿比。

6.1.7 精密度和准确度

平行测定 6 个样品,其汞含量(质量比)为 0.25×10^{-6},相对标准偏差为 4%,4 个实验室测定同一牡蛎互校样,其结果相对标准偏差为 9.1%。

6.1.8 注意事项

6.1.8.1 器皿均用(1+3)硝酸溶液浸泡 3 d 以上,洗净,并检查是否合格。

6.1.8.2 用过的汞蒸气发生瓶,须用酸性高锰酸钾溶液漂洗,用水洗净。

6.1.8.3 绘制汞标准曲线时,也可用氯化钠溶液代替低汞海水。

6.2 双硫腙分光光度法

6.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中总汞的测定。碘有干扰,故海藻中总汞的测定不宜直接用此法。

检出限:0.01×10^{-6}。

6.2.2 方法原理

样品经硝酸-过氧化氢-高锰酸钾消化,用氯化亚锡将汞离子还原为金属汞。用曝气法使汞蒸气吸收于高锰酸钾溶液中,汞离子与双硫腙反应后用四氯化碳萃取其生成的橙色螯合物,于 485 nm 波长处进行分光光度测定。

6.2.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂均为分析纯,水为无汞去离子水或等效纯水。

6.2.3.1 硝酸(HNO_3):$\rho=1.42$ g/mL,优级纯。

6.2.3.2 过氧化氢(H_2O_2):30%,优级纯。

6.2.3.3 硫酸溶液:1+1,1+40

在搅拌下,将 1 体积硫酸(H_2SO_4,$\rho=1.84$ g/mL,优级纯)徐徐加到 1 及 40 体积水中。

6.2.3.4 氢氧化铵溶液:$c(NH_4OH)=1$ mol/L。

6.2.3.5 高锰酸钾溶液:50 g/L。(盛于棕色试剂瓶中,暗处保存)。

6.2.3.6 氯化亚锡溶液:200 g/L

称取 100 g 氯化亚锡($SnCl_2\cdot2H_2O$)于 500 mL 烧杯中,加入 500 mL(1+1)盐酸溶液,加热至氯化亚锡完全溶解,冷却后,盛于棕色试剂瓶中若汞杂质含量高,可用鼓泡法去除之,直至溶液中汞检不出。

6.2.3.7 高锰酸钾吸收液：5 g/L

将10 mL(1+1)硫酸溶液(6.2.3.3)加到10 mL高锰酸钾溶液(6.2.3.5)中，加水至100 mL，混匀，(盛于棕色试剂瓶中，暗处保存)。

6.2.3.8 盐酸羟胺溶液：100 g/L

称取10 g盐酸羟胺($NH_2OH \cdot HCl$)，用水溶解，加水至100 mL。用5 mL双硫腙使用溶液(6.2.3.12)提取数次，至有机相呈绿色为止，弃去有机相，水相盛于试剂瓶中。

6.2.3.9 乙二胺四乙酸二钠溶液：50 g/L

称取5 g EDTA(二钠)，用水溶解，加水至100 mL。用5 mL双硫腙使用溶液(6.2.3.12)提取数次，至有机相呈绿色为止，弃去有机相，水相盛于滴瓶中。

6.2.3.10 四氯化碳(CCl_4)

6.2.3.11 双硫腙贮备溶液

称取100 mg双硫腙($C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$)溶于100 mL四氯化碳(6.2.3.10)中，盛于棕色试剂瓶中。置冰箱中保存。

6.2.3.12 双硫腙使用溶液：透光率70%

按下列方法确定双硫腙贮备溶液(6.2.3.11)的吸光值：

量取1.00 mL双硫腙贮备溶液(6.2.3.11)于10 mL量瓶中，加四氯化碳(6.2.3.10)至标线，混匀。以四氯化碳(6.2.3.10)调零，于500 nm处用1 cm测定池测定其吸光值A_1。根据稀释因子，得双硫腙贮备溶液(6.2.3.11)的吸光值为$10A_1$。

根据式(2)计算配制一定体积双硫腙使用溶液所需贮备溶液的体积：

$$V_2 = \frac{V_1 \lg \frac{1}{T}}{10A_1} \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：V_2——配制V_1体积双硫腙使用溶液时，所需双硫腙贮备溶液的体积，mL；

V_1——欲配制的双硫腙使用溶液的体积，mL；

A_1——双硫腙贮备溶液稀释10倍后的吸光值；

T——欲配制双硫腙使用溶液的透光率，%。本法采用70%透光率。

量取V_2体积双硫腙贮备溶液(6.2.3.11)，加四氯化碳(6.2.3.10)至V_1体积，混匀，得透光率为70%的双硫腙使用溶液(使用时配制)。

6.2.3.13 汞标准贮备溶液：100 μg/mL

称取0.135 4 g氯化汞($HgCl_2$，优级纯)于100 mL烧杯中，用5 mL(1+1)硫酸溶液(6.2.3.3)溶解后，全量转入1 000 mL量瓶中，加水至标线，混匀。

6.2.3.14 汞标准使用溶液：1.00 μg/mL

量取1.00 mL汞标准贮备溶液(6.2.3.13)于100 mL量瓶中，用(1+40)硫酸溶液(6.2.3.3)稀释至标线，混匀，使用时配制。

6.2.4 仪器及设备

——分光光度计；

——汞蒸气发生瓶：见6.1.4.2；

——吸收管：10 mL；

——抽气泵；

——气体流量计；

——电热恒温水浴锅；

——实验室常备仪器及设备。

6.2.5 分析步骤

6.2.5.1 样品消化

准确称取 10 g(±0.01 g)生物湿样于 150 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 硝酸(6.2.3.1),于室温下消化过夜,补加 5 mL 硝酸(6.2.3.1),于 90℃水浴中消化 1.5 h,每 20 min 摇动一次。滴加 2 mL 过氧化氢(6.2.3.2),继续消化半小时,取出稍冷后,加入高锰酸钾溶液(6.2.3.5)至有大量褐色沉淀产生,且半小时内不消失,否则再外加高锰酸钾溶液(6.2.3.5)。制得样品消化液,同时制备分析空白试液。

6.2.5.2 绘制标准曲线

6.2.5.2.1 取 6 支 25 mL 具塞比色管,加入.10 mL 高锰酸钾吸收液(6.2.3.7),分别移入 0,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00 mL 的汞标准使用溶液(6.2.3.14),加水至 20 mL,滴加盐酸羟胺溶液(6.2.3.8)至红色消失,再多加 2 滴。

6.2.5.2.2 加入 5.00 mL 双硫腙使用液(6.2.3.12),剧烈振荡 2 min(注意放气),静置分层。吸去上层水相。再用水洗涤有机相 2～3 次(每次用水 20 mL),吸去水相。

6.2.5.2.3 加入 2 滴 EDTA(二钠)溶液(6.2.3.9),用氢氧化铵(6.2.3.4)溶液洗涤 2 次,每次 10 mL,有机相移入 60 mL 锥形分液漏斗(管颈塞有脱脂棉)中。

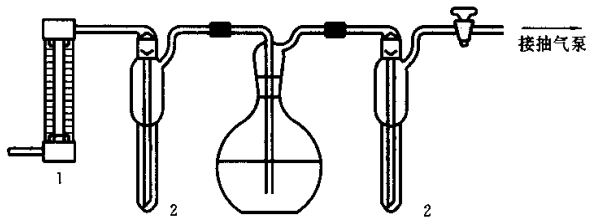
6.2.5.2.4 将有机相滤入 1 cm 测定池中,以四氯化碳(6.2.3.10)调零,于波长 485 nm 处测定吸光值 A_i 及标准空白吸光值 A_0。

6.2.5.2.5 将测定数值记入 GB 17378.4—1998 附录表 A4 中,以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标,相应的汞的量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

6.2.5.3 样品测定

6.2.5.3.1 滴加盐酸羟胺溶液(6.2.3.8)于样品制备液中,至红色完全消失,全量转入 250 mL 汞蒸气发生瓶中,用 100 mL 水分三次洗涤锥形瓶,洗涤液合并于汞蒸气发生瓶中。

6.2.5.3.2 取两支 10 mL 吸收管,各加入 10 mL 吸收液(6.2.3.7),一支作空气净化管,一支作样品汞蒸气吸收管。按曝气-吸收装置示意图将气路系统接好,空气净化吸收管不必每次更换。



1—气体流量计;2—活芯气体采样管;3—汞蒸气发生瓶

图 5 曝气-吸收装置图

6.2.5.3.3 加 2 mL 氯化亚锡溶液(6.2.3.6)于汞蒸气发生瓶中,立即塞紧瓶塞。接通气泵,以 1 500 mL/min空气流速曝气 15 min。

6.2.5.3.4 取下汞蒸气吸收管,将吸收液移入 25 mL 具塞比色管中,用 10 mL 水分三次洗涤吸收管,洗涤液并入比色管中。滴加盐酸羟胺溶液(6.2.3.8)至红色褪尽,再多加 2 滴,充分振荡,开盖放置 30 min。

6.2.5.3.5 以下按 6.2.5.2.2～6.2.5.2.4 步骤测定样品制备液的吸光值(A_s)。

同时,按上述步骤测定分析空白的吸光值 A_b。

6.2.6 记录与计算

将测得数据记入表 A1 中,按式(3)计算生物干样中总汞的含量:

$$W_{Hg}=\frac{m}{FM} \qquad \cdots\cdots(3)$$

式中:W_{Hg}——生物干样中总汞的含量质量比,10^{-6};

m——从标准曲线上查得的汞的量，μg；

F——样品的干湿比；

M——样品称取量，g。

6.2.7 精密度和准确度

五个实验室测定含汞的质量比为 0.29×10^{-6}的样品，重复性相对标准偏差为 0.95%。在 0.5 g 猪肝成分分析标准物质(GB W08 551)中加入 2 μg 汞，平均回收率为 95.9%。

6.2.8 注意事项

6.2.8.1 样品消化时，过氧化氢需逐滴加入，以防过氧化氢剧烈分解，消化液溅溢，造成汞损失。

6.2.8.2 样品测定步骤 6.2.5.3.4 中，开盖放置 30 min，是为消除反应产生的氯气及氮氧化物的影响。

6.2.8.3 样品测定步骤 6.2.5.2.2 中，水洗有机相是为了消除二价锰的干扰。

6.2.8.4 玻璃器皿均需用(1+3)硝酸溶液浸泡 1 天后洗净使用。

7 铜

7.1 无火焰原子吸收分光光度法

7.1.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物中铜的测定。

检出限(W)：0.4×10^{-6}。

7.1.2 方法原理

生物样品经硝酸-过氧化氢消化，于波长 324.7 nm 处直接进行石墨炉原子吸收分光光度测定。

7.1.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯，水为二次去离子水或等效纯水。

7.1.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，优级纯，经石英亚沸蒸馏器蒸馏。

7.1.3.2 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

7.1.3.3 铜标准贮备溶液：1.000 mg/mL

称取 0.200 0 g 金属铜粉(纯度 99.99%)于 50 mL 烧杯中，加入 5 mL(1+2)硝酸溶液，加热溶解，冷却后，全量转入 200 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

7.1.3.4 铜标准中间溶液：100 μg/mL

量取 10.0 mL 铜标准贮备溶液(7.1.3.3)于 100 mL 量瓶中，加(1+99)硝酸溶液至标线，混匀。使用时配制。

7.1.3.5 铜标准使用溶液：2.000 μg/mL

量取 2.00 mL 铜标准中间溶液(7.1.3.4)于 100 mL 量瓶中，加(1+99)硝酸溶液至标线，混匀。使用时配制。

7.1.4 仪器及设备

——石墨炉原子吸收分光光度计：配有自动进样装置；

——铜空心阴极灯；

——氩气钢瓶：纯度 99.99%；

——洁净工作台(洁净 100 级)；

——电热板。

7.1.5 分析步骤

7.1.5.1 样品消化

7.1.5.1.1 准确称取 0.1 g(±0.001 g)干样于 50 mL 烧杯中，用几滴水湿润样品，加入 2 mL 硝酸(7.1.3.1)，盖上表面皿，置于电热板上，低温加热至泡沫基本消失。

7.1.5.1.2 取下烧杯，徐徐地加入 0.5 mL 过氧化氢(7.1.3.2)，盖上表面皿，于电热板上加热(160～200℃)约 20 min，补加 1 mL 过氧化氢(7.1.3.2)，继续加热并蒸至约剩 1 mL。

7.1.5.1.3 再加 1 mL 硝酸(7.1.3.1)，1.5 mL 过氧化氢(7.1.3.2)，盖上表面皿，于电热板上加热(160～200℃)并蒸至约 0.5 mL，全量转入 10 mL 具塞比色管中，加水至标线，混匀，制成样品液。

同时制备分析空白试液。

7.1.5.2 绘制标准曲线

7.1.5.2.1 移取 0，0.50，1.00，1.50，2.00，2.50 mL 铜标准使用溶液(7.1.3.5)于 10 mL 具塞比色管中，加水至标线，混匀。移取 20 μL 试液，按选定的仪器技术参数测定标准系列溶液的吸光值(A_i)。及标准空白吸光值(A_0)。

7.1.5.2.2 将数值记入 GB 17378.4—1998 附录表 A5 中，以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标，相应的铜的浓度(μg/mL)为横坐标，绘制标准曲线。

7.1.5.3 样品测定

量取 20 μL 样品消化液，按选定的仪器技术参数测定铜的吸光值(A_s)；同时，测定分析空白试液吸光值(A_b)。以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应铜的浓度(μg/mL)。

7.1.6 记录与计算

将测得数据记入表 A1 中，按式(4)计算生物体干样中铜含量：

$$W_{Cu}=\frac{\rho_{Cu}V}{M} \qquad \cdots\cdots(4)$$

式中：W_{Cu}——生物体干样中铜含量，质量比，10^{-6}；

ρ_{Cu}——从标准曲线上查得铜的浓度，μg/mL；

V——样品消化液的体积，mL；

M——干样品称取量，g。

7.1.7 精密度

六个实验室测定同一互校生物样(牡蛎)，测定结果的再现性相对标准偏差为 1.6%。

7.1.8 注意事项

7.1.8.1 本测定方法中所用的器皿均先用(1+3)硝酸溶液浸泡 1 天以上，使用前用二次去离子水淋洗干净。

7.1.8.2 样品消化时，需始终盖上表面皿。

7.1.8.3 不同型号的石墨炉原子吸收分光光度计，自行选定仪器最佳技术参数，表 4 为 PE-703 型原子吸收分光光度计，HGA-500 型石墨炉的仪器技术参数。

表 4 PE-703 型仪器技术参数

元素	波长 nm	通带宽 nm	灯电流	干燥		灰化		原子化		烧净		原子化时内气流量，mL/min
				温度 ℃	时间 s	温度 ℃	时间 s	温度 ℃	时间 s	温度 ℃	时间 s	
Cu	324.7	0.7	12	111	10/15	850	10/15	2 650	1/6	2 760	1/3	10

7.2 阳极溶出伏安法

7.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中铜的测定。

检出限(W)：1×10^{-6}。

7.2.2 方法原理

生物样经硝酸-过氧化氢消化，用柠檬酸三铵掩蔽干扰离子。在 pH8.2±0.2 的乙二胺介质中，当在工作电极上施加一定电压进行电解时，铜被还原并沉积在悬滴汞电极上形成铜-汞齐，然后进行反向电

压扫描，汞中的金属铜被氧化溶出，所产生的氧化电流与溶液中铜的浓度呈正比关系，借以进行定量测定。

7.2.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯，水为无铜二次去离子水或等效纯水。

7.2.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，超纯。

7.2.3.2 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

7.2.3.3 盐酸(HCl)：ρ=1.19 g/mL，超纯。

7.2.3.4 柠檬酸三铵溶液：50 g/L

称取 5 g 柠檬酸三铵($C_6H_{17}N_3O_7$)于 150 mL 烧杯中，加水溶解后，转入 100 mL 量瓶，加水至标线，混匀。

7.2.3.5 乙二胺：($NH_2CH_2CH_2NH_2$)经等温扩散法提纯。

7.2.3.6 精密 pH 试纸：pH7.6～8.5。

7.2.3.7 汞(Hg)：超纯。

7.2.3.8 铜标准贮备溶液：1.000 mg/mL

见 7.1.3.3 条。

7.2.3.9 铜标准中间溶液：10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 铜标准贮备溶液(7.2.3.8)于 100 mL 量瓶中，加入 1.0 mL 盐酸(7.2.3.3)，加水至标线，混匀。

7.2.3.10 铜标准使用溶液：2.00 μg/mL

量取 20.0 mL 铜标准中间溶液(7.2.3.9)于 100 mL 量瓶中，加水至近 100 mL，用稀乙二胺溶液(7.2.3.5)调节 pH 值为 3～4，加水至标线，混匀。使用时配制。

7.2.4 仪器及设备

——极谱仪：它应具有向正电压方向扫描的功能。若用脉冲阳极溶出伏安法，需用脉冲极谱仪；

——记录仪：配用仪器自带的图形记录仪或 X-Y 函数记录仪；

——电极；

a) 工作电极：悬滴汞电极；

b) 参比电极：Ag/AgCl 电极；

c) 辅助电极：铂金电极；

——电解池：规格及形状须一致；

——恒速电磁搅拌器；

——电热板：温度可调，铺有薄型石棉板或 3 cm 厚细砂；

——电炉：铺有石棉网；

——精密微量移液管：100，400，1 000 μL；

——实验室常备仪器及设备。

7.2.5 分析步骤

7.2.5.1 样品消化

准确称取 0.25 g(±0.001 g)干样于 50 mL 烧杯中，用几滴水湿润，加入 2 mL 硝酸(7.2.3.1)，盖上表面皿，于电热板上低温加热，待泡沫基本消失后，徐徐地加入 1 mL 过氧化氢(7.2.3.2)，于 160～200℃蒸至近干，分别补加 0.5 mL 硝酸和过氧化氢，蒸至近干，再重复一次。用水洗净表面皿，洗涤液并入消化液中，移去表面皿。继续蒸干后移到电炉上(约 450℃)加热至不溶物呈白色(除尽有机物质)，加入 2 mL 盐酸(7.2.3.3)，于高温电热板上蒸干。取下冷却，加入 1 mL(1+1)盐酸溶液，于电热板上微热浸取不溶物，全量转入 50 mL 量瓶中，加水至标线，混匀，制成样品消化溶液，同时制备分析空白。

7.2.5.2 样品的测定

7.2.5.2.1 量取 10.0 mL 样品消化液于电解池中，加入 100 μL 柠檬酸三铵溶液(7.2.3.4)，混匀。用乙二胺溶液(7.2.3.5)调节 pH 值为 8.2±0.2 用精密 pH 试纸(7.2.3.6)检验。

7.2.5.2.2 接通仪器(测定前开机预热 20 min)。将三个电极插入电解池中，输入选定的仪器参数。

7.2.5.2.3 启动运转旋钮，待运转结束，记下峰电流值 I_{s1}。

7.2.5.2.4 在原溶液中加入 100 μL 铜标准使用溶液(7.2.3.10)，下同 3 操作，记下峰电流值 I_{s2}。

7.2.5.3 空白的测定

按 7.2.5.2 步骤测定分析空白试液，并记下空白峰电流值 I_{b1} 和添加铜标准溶液后的峰电流值 I_{b2}。

7.2.6 记录与计算

将所测得的峰电流值记入 GB 17378.4—1998 附录表 A7 中，按式(5)计算样品中铜的含量：

$$W_{Cu}=\left(\frac{I_{s1}}{I_{s2}-I_{s1}}-\frac{I_{b1}}{I_{b2}-I_{b1}}\right)\frac{V_2\rho_{Cu}V_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(5)$$

式中：W_{Cu}——生物体干样中铜的含量，质量比，10^{-6}；

I_{s1}——样品消化液的峰电流值，nA、mm 或格；

I_{s2}——样品消化液加入铜标准使用溶液后所得的峰电流值 nA、mm 或格；

I_{b1}——分析空白的峰电流值，nA、mm 或格；

I_{b2}——分析空白液添加铜标准使用液后的峰电流值，nA、mm 或格；

V_0——样品消化液的体积，mL；

V_1——测定时量取样品消化液的体积，mL；

V_2——加入铜标准使用溶液的体积，mL；

ρ_{Cu}——铜标准使用溶液的浓度，μg/mL；

M——样品的称样重量，g。

7.2.7 精密度和准确度

四个实验室测定同一生物互校样品(牡蛎)，测定结果平均值为 65.3×10^{-6}，再现性相对标准偏差 11%。

四个实验室测定铜含量(质量比)为 $(17.2\pm1.0)\times10^{-6}$ 的同一猪肝成分分析标准物质(GB W 08 551)，测定结果的相对误差平均为 3.0%。

7.2.8 注意事项

7.2.8.1 消化液中有机物质必须除尽，否则会导致铜的测定结果偏低，甚至出现不正常溶出峰。

7.2.8.2 为了确保好的精密度，悬汞滴体积须一致。

7.2.8.3 电解池的容积、几何形状及电极的位置应保持一致。

7.2.8.4 悬汞滴表面或毛细管口上部不能有气泡。

7.2.8.5 搅拌速率应恒定。

7.2.8.6 电解时间、扫描速率、脉冲高度等均影响峰电流应严加控制，力求一致。

7.2.8.7 表 4 中的“纯化时间”期间不通气体，仅作搅拌时间用，目的在于使溶液均匀。“控制时间”用于纯化汞滴。

7.2.8.8 毛细管沾污常会引起电流峰不重现，溶出曲线混乱或毛细管内汞线断开。毛细管不使用时，应在空气中干燥贮存。毛细管在浸入新的溶液之前应先挤出一滴汞。

7.2.8.9 所用玻璃器皿必须用硝酸浸泡 1 d 以上，用二次去离子水反复洗净，再用无铜蒸馏水淋洗一遍。精密微量移液管的吸头用同法浸泡及洗净后，于低温(低于 60℃)烘干，可反复使用。

7.2.8.10 使用不同型号的极谱仪，应另行选择最佳仪器工作条件，表 5 为 PAR 384-4 型极谱仪测定铜的技术参数。

表 5 PAR 384-4 型极谱仪测定铜的技术参数

起始电压	终止电压	控制电压	脉冲高度	扫描速度
V			mV	mV/s
−0.95	0.00	−0.05	50	8
纯化时间	控制时间	电解时间	静置时间	悬汞滴体积
s				
15	45	180	30	中等

7.3 火焰原子吸收分光光度法

7.3.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物中铜的测定。

检出限(W)2×10^{-6}。

7.3.2 方法原理

生物干样经硝酸-过氧化氢消化，于 324.7 nm 波长处直接进行火焰原子吸收分光光度测定。

7.3.3 试剂及其配制

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水均为二次去离子水或等效纯水。

7.3.3.1 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

7.3.3.2 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，优级纯。

7.3.3.3 硝酸溶液：1+99

1 体积硝酸(7.3.3.2)与 99 体积水混合。

7.3.3.4 铜标准贮备溶液：1.000 mg/mL

见 7.1.3.3 条。

7.3.3.5 铜标准中间溶液：100 μg/mL

量取 10.0 mL 铜标准贮备溶液(7.3.3.4)于 100 mL 量瓶中，加(1+99)硝酸溶液(7.3.3.3)至标线，混匀。

7.3.3.6 铜标准使用溶液：10.0 μg/mL

量取 10.0 mL 铜标准中间溶液(7.3.3.5)于 100 mL 量瓶中，加(1+99)硝酸溶液(7.3.3.3)至标线，混匀。

7.3.4 仪器及设备

——火焰原子吸收分光光度计；

——铜空心阴极灯；

——空气压缩机；

——乙炔钢瓶；

——洁净工作台(洁净 100 级)；

——实验室常备仪器及设备。

7.3.5 分析步骤

7.3.5.1 样品的消化

7.3.5.1.1 准确称取 0.2 g(±0.001 g)干样于 50 mL 烧杯中，用几滴水湿润样品，加入 2 mL 硝酸(7.3.3.2)，盖上表面皿，于电热板上低温加热至泡沫基本消失。

7.3.5.1.2 取下烧杯，徐徐地加入 0.5 mL 过氧化氢(7.3.3.1)，盖上表面皿，于电热板上加热(160～200℃)2 min 左右。补加 1 mL 过氧化氢(7.3.3.1)，继续加热并蒸至约 1 mL。

7.3.5.1.3 再加 1 mL 硝酸(7.3.3.2)，1.5 mL 过氧化氢(7.3.3.1)，盖上表面皿，于电热板上加热

(160～200℃)并蒸发至约 0.5 mL。冷却后,全量转入 10 mL 具塞比色管中,加水至标线,混匀,制得样品消化液,同时,制备分析空白试液。

7.3.5.2 绘制标准曲线

7.3.5.2.1 移取 0,0.40,0.80,1.20,1.60,2.00 mL 铜标准使用溶液(7.3.3.6)于 10 mL 具塞比色管中,加水至标线,混匀。按选定的仪器技术参数,用水调零,直接吸喷标准系列溶液测定吸光值(A_i)。

7.3.5.2.2 将数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中,以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标,相应的铜的浓度(μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。

7.3.5.3 样品测定

按选定的仪器技术参数,用水调零,直接吸喷,测定样品制备液的吸光值(A_s)和分析空白试液的吸光值(A_b)。以(A_s-A_b)值从标准曲线上查出相应的铜浓度(μg/mL)。

7.3.6 记录与计算

将测得的数据记入表 A1 中,按式(6)计算生物样品的铜含量:

$$W_{Cu}=\rho_{Cu}\frac{V}{M} \qquad \cdots\cdots(6)$$

式中:W_{Cu}——生物体干样中铜的含量质量比,10^{-6};

ρ_{Cu}——从标准曲线上查得的铜的浓度,μg/mL;

V——样品制备液的体积,mL;

M——样品称取量,g。

7.3.7 精密度

六个实验室测定同一互校生物样(牡蛎),测定结果,再现性相对标准偏差为 2.7%。

7.3.8 注意事项

7.3.8.1 所用的器皿均先用(1+3)硝酸浸泡 1 天以上,使用前用二次去离子水淋洗干净。

7.3.8.2 样品消化时,须始终盖上表面皿。

7.3.8.3 不同型号的原子吸收分光光度计,须自行选定仪器最佳技术参数。表 6 为 WFD-yz 型原子吸收分光光度计的技术参数。

表 6 WFD-yz 型原子吸收分光光度计的技术参数

元素	吸收波长 nm	灯电流 mA	空气流量 $L\cdot h^{-1}$	乙炔流量 $L\cdot h^{-1}$	燃烧器高度 mm	狭缝宽 mm
Cu	324.7	4	500	40	7	0.1

7.4 二乙基二硫代氨基甲酸钠分光光度法

7.4.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物组织中铜的测定。

检出限(W):0.6×10^{-6}。

7.4.2 方法原理

生物样品经硝酸-过氧化氢消化。在弱碱介质中,铜与二乙基二硫代氨基甲酸钠生成黄棕色络合物,经四氯化碳萃取分离后,在 440 nm 波长处进行分光光度法测定。

7.4.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂均为分析纯,水为无铜去离子水或等效蒸馏水。

7.4.3.1 硝酸(NHO_3):ρ=1.42 g/mL,优级纯。

7.4.3.2 过氧化氢(H_2O_2):30%,优级纯。

7.4.3.3 氨水(NH_4OH):ρ=0.90 g/mL。

7.4.3.4 四氯化碳(CCl_4)

7.4.3.5 二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液:10 g/L

称取 1.0 g 二乙基二硫代氨基甲酸钠($C_5H_{10}NS_2Na \cdot 3H_2O$),溶于水中并稀释至 100 mL,混匀,经砂芯漏斗过滤,移入棕色试剂瓶中,放至暗处可保存两星期。

7.4.3.6 乙二胺四乙酸二钠-柠檬酸三铵溶液

称取 20 g 柠檬酸三铵[$(NH_4)_3 \cdot C_6H_5O_7$]和 5 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA—2Na),溶于水中,加水至 100 mL,混匀。用砂芯漏斗滤去不溶物,将滤液转入试剂瓶中。

7.4.3.7 甲酚红溶液:1 g/L

称取 0.10 g 甲酚红($C_{21}H_{18}O_5S$)溶于 100 mL(1+4)乙醇(C_2H_5OH)溶液,转入棕色试剂瓶中。

7.4.3.8 铜标准贮备溶液:1.000 g/L

见 7.1.3.3。

7.4.3.9 铜标准使用溶液:10.0 μg/mL

见 7.3.3.5 和 7.3.3.6 条。

7.4.4 仪器及设备

——分光光度计;

——电热板:铺上 3 cm 厚细砂;

——实验室常备仪器及设备。

7.4.5 分析步骤

7.4.5.1 样品消化

7.4.5.1.1 准确称取约 3 g(±0.001 g)干样于 150 mL 锥形瓶中,用数滴水润湿。加入 20 mL 硝酸(7.4.3.1),先微热至不冒气泡,然后置于电热板砂浴上,于 160～200℃加热至泡沫基本消失。取下稍冷,加 5 mL 过氧化氢(7.4.3.2),蒸发至约 1 mL,取下稍冷。

7.4.5.1.2 再加入 5 mL 硝酸(7.4.3.1),2 mL 过氧化氢(7.4.3.2),继续加热(160～200℃),蒸发至近干。取下稍冷,加入约 10 mL 水,稍加热使盐类溶解。取下冷却,全量转入 100 mL 量瓶中,加水至标线,混匀。制成样品消化液,同时,制备分析空白试液。

7.4.5.2 绘制标准曲线

7.4.5.2.1 分别量取 0,2.00,4.00,6.00,8.00,10.0 mL 铜标准使用溶液(7.4.3.9)放入盛有 50 mL 水的 125 mL 锥形分液漏斗中,补加水至总体积为 100 mL,混匀。

7.4.5.2.2 加入 10 mL 乙二胺四乙酸二钠-柠檬酸三铵溶液(7.4.3.6),混匀。加入 2 滴甲酚红溶液(7.4.3.7),混匀。用氨水(7.4.3.3)调至溶液呈淡紫红色(pH8.0～8.5)。

7.4.5.2.3 加入 5 mL 二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液(7.4.3.5),混匀。放置 5 min,加入 10.0 mL 四氯化碳(7.4.3.4),振荡 2 min,注意放气,静置分层。

7.4.5.2.4 在分液漏斗管底塞进少量脱脂棉,将有机相滤入 2 cm 测定池中,在 440 nm 波长处以四氯化碳调零,测定吸光值(A_i)及标准空白吸光值(A_0)。

7.4.5.2.5 将数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中,以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标,相应的铜的量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

7.4.5.3 样品测定

量取 20.0 mL 样品消化液于 125 mL 分液漏斗中,加入 80 mL 水,混匀。以下按 7.4.5.2.2～7.4.5.2.4 步骤测定样品消化液的吸光值(A_s)及分析空白吸光值(A_b),以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应的铜的量(μg)。

7.4.6 记录与计算

将测得数据记入表 A1 中,按式(7)计算生物样品中铜的含量:

$$W_{Cu} = \frac{mV_1}{V_2M} \qquad \cdots\cdots(7)$$

式中:W_{Cu}——生物干样中铜的含量,质量比,10^{-6};

m——从标准曲线上查得的铜的量，μg；

V_1——样品消化液体积，mL；

V_2——测定时量取样品消化液的体积，mL；

M——样品的称取量，g。

7.4.7 精密度和准确度

五个实验室测定同一互校生物样(牡蛎)，测定结果，再现性相对标准偏差为2.9%。

五个实验室测定铜含量为17.2×10^{-6}的标准猪肝样品，测定结果相对误差为1.2%。

7.4.8 注意事项

7.4.8.1 所有玻璃仪器均需先用(1+3)硝酸浸泡1 d以上，然后用水洗净。

7.4.8.2 配制的甲酚红溶液在酸性条件下如不呈黄色则说明已失效，应重新配制。

7.4.8.3 调节样品试液pH值为8.0～8.5时，由于基体干扰，甲酚红指示剂颜色可能只呈淡玫瑰红色。

7.4.8.4 若样品含铁量较高，调节pH时会出现沉淀，应酌量增加乙二胺四乙酸二钠-柠檬酸三铵溶液用量。

8 铅

8.1 无火焰原子吸收分光光度法

8.1.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中铅的测定。

检出限(W)：0.04×10^{-6}。

8.1.2 方法原理

生物样品在高压罐中用硝酸消化，于283.3 nm波长处，用石墨炉原子吸收分光光度法测定铅的含量。

8.1.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯，水为市售蒸馏水经石英蒸馏器提纯或等效纯水。

8.1.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，超纯。

8.1.3.2 硝酸溶液：1+3及1+99

分别用1体积硝酸(8.1.3.1)与3和99体积水混匀。

8.1.3.3 铅标准贮备溶液：1.000 mg/mL

称取0.200 0 g铅(纯度99.9%)于50 mL烧杯中，加20 mL(1+3)硝酸溶液微热溶解后，全量转入200 mL量瓶中，加水稀释至标线，混匀。

8.1.3.4 铅标准使用溶液：0.200 μg/mL

量取100 μL铅标准贮备液(8.1.3.3)于500 mL量瓶中，用(1+99)硝酸溶液(8.1.3.2)稀释至标线，混匀后转入500 mL小口聚乙烯瓶中贮存。

8.1.4 仪器及设备

——原子吸收分光光度计，配有氘灯背景校正器和石墨炉附件；

——铅空心阴极灯或无极放电灯；

——记录仪；

——聚四氟乙烯高压罐，容积20～30 mL；

——洁净工作台；

——电热恒温干燥箱，最高温度300℃；

——氩气钢瓶，纯度99.99%；

——石英蒸馏器；

——石英试剂瓶：500 或 1 000 mL；

——聚乙烯杯：2 mL；

——微量注射器：20，50，100，500，1 000 μL；

——实验室常备仪器及设备。

8.1.5 分析步骤

8.1.5.1 样品消化

8.1.5.1.1 准确称取 0.2～0.4 g(±0.001 g)干样于高压罐中，加入 3 mL 硝酸(8.1.3.1)，将高压罐盖紧，置于电热恒温干燥箱，于 130℃消化 1.5 h。

8.1.5.1.2 取出高压罐，冷却至室温。打开盖子，将消化液全量转入 10 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。制得样品消化液。按相同操作步骤制备分析空白试液。

8.1.5.2 样品测定

取 3 个 2 mL 聚乙烯杯，各量入 400 μL 样品消化液，依次加入 100，50，0 μL 水和 0，50，100 μL 铅标准使用溶液(8.1.3.4)，混匀。各移取 20 μL 试液，按选定的仪器技术参数测定其吸光值(A_s，A_1 和 A_2)。

同时，量取 400 μL 分析空白消化试液，加入 100 μL 水测定分析空白吸光值(A_b)。

8.1.6 记录与计算

将测得的数据记入表 A1 中。

8.1.6.1 以测定的吸光值(A_s、A_1 及 A_2)为纵坐标，相应添加的标准铅的浓度(0，0.02，0.04 μg/mL)为横坐标绘制标准添加法短工作曲线，将曲线外推交于横坐标处即为相应的铅的浓度。

8.1.6.2 按式(8)计算样品中铅的含量：

$$W_{Pb}=\frac{\rho_{Pb}Vf}{M} \qquad \cdots\cdots(8)$$

式中：W_{Pb}——生物体干样中铅的含量，质量比，10^{-6}；

V——样品消化液体积，mL；

f——测定时样品消化液的稀释倍数(本方法为 1.25)；

M——样品的称取量，g；

ρ_{Pb}——外推法查出的铅的浓度，μg/mL。

8.1.7 精密度和准确度

分别平行 6 次测定三种生物样品，测定结果，相对标准偏差分别为 7.5%，6.4%和 2.7%。

五个实验室用本方法分析互校生物样品(牡蛎)测定结果，平均值为 1.68×10^{-6}，再现性标准偏差为 1.1%。

六个实验室用本方法测定铅含量质量比为$(0.54\pm0.04)\times10^{-6}$的猪肝成分分析标准物质(GB W 08 551)测定其结果的相对误差平均为 3.7%。

8.1.8 注意事项

8.1.8.1 所使用的塑料、石英和玻璃器皿，均应以(1+3)硝酸浸泡 3 d 以上，并用水洗净。

8.1.8.2 为避免分析过程中空气尘埃对样品的沾污，分析工作应在洁净实验室中或超净工作台上进行。

8.1.8.3 使用不同的仪器，尤其使用质地不同的石墨管时，灵敏度可能有较大的差别，应根据灵敏度和标准加入曲线线性范围，适当改变铅标准添加量。

8.1.8.4 根据原子吸收分光光度计的型号，选定最佳仪器技术参数。表 7 列出 PE-703 型原子吸收分光光度计技术参数。

表 7 PE-703 型原子吸收分光光度计技术参数

元素	积分时间 s	吸收波长 nm	灯电流 mA	光谱通带 nm	干燥		灰化		原子化		清洗	
					温度 ℃	升温/保持 s	温度 ℃	升温/保持 s	温度 ℃	升温/保持 s	温度 ℃	升温/保持 s
铅	5	283.3	8	0.7	100	10/20	700	10/15	2 500	1/5	2 500	1/2

8.2 阳极溶出伏安法

8.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中铅的测定。

检出限(W):0.3×10^{-6}。

8.2.2 方法原理

生物干样经硝酸-过氧化氢消化,在 pH2.0～2.5 介质中,当对工作电极施加一定电压进行电解时,铅被还原并沉积在悬滴汞电极上形成铅-汞齐。然后进行反向电压扫描,汞齐中的金属铅被氧化溶出,其氧化电流与溶液中铅的浓度呈正比关系,借以进行定量测定。

8.2.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂均为分析纯,水为无铅去离子水或等效纯水。

8.2.3.1 硝酸(HNO_3):$\rho=1.42$ g/mL,超纯。

8.2.3.2 过氧化氢(H_2O_2):30%。

8.2.3.3 盐酸(HCl):$\rho=1.18$ g/mL,超纯。

8.2.3.4 氨水(NH_4OH):用 $\rho=0.90$ g/mL 的氨水经等温扩散法提纯。

8.2.3.5 精密 pH 试纸:pH0.5～5.0。

8.2.3.6 铅标准贮备溶液:1.000 mg/mL

见 8.1.3.3 条。

8.2.3.7 铅标准中间溶液:10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 铅标准贮备溶液(8.2.3.6)于 100 mL 量瓶中,加入 1 mL 盐酸(8.2.3.3),加水至标线,混匀。

8.2.3.8 铅标准使用溶液:1.00 μg/mL

量取 10.0 mL 铅标准中间溶液(8.2.3.7)于 100 mL 量瓶中,加水至近 100 mL,用稀氨水(8.2.3.4)调节 pH 值为 2.0～2.5,加水至标线,混匀。

8.2.4 仪器及设备

见 7.2.4 条。

8.2.5 分析步骤

8.2.5.1 样品消化

见 7.2.5.1 条。

8.2.5.2 样品的测定

8.2.5.2.1 量取 10.0 mL 样品消化液于电解池中,用氨水(8.2.3.4)调节 pH 为 2.0～2.5[用精密 pH 试纸(8.2.3.5)检验]。

8.2.5.2.2 接通仪器(测定前开机预热 20 min)。将三个电极插入电解池中,输入选定的仪器技术参数。

8.2.5.2.3 启动仪器的运转旋钮,待运转结束后,记下峰电流值 I_{s1}。

8.2.5.2.4 在原溶液中加入 100 μL 铅标准使用溶液(8.2.3.8),以下操作同 3,记下峰电流值 I_{s2}。

8.2.5.3 空白的测定

按 8.2.5.2 步骤测定分析空白制备液峰电流值 I_{b1} 和添加铅标准后的峰电流值 I_{b2}。

8.2.6 记录与计算

将所测得的峰电流值记入表 GB 17378.4—1998 附录表 A7 中，按式(9)计算样品中铅的含量：

$$W_{Pb}=\left(\frac{I_{s1}}{I_{s2}-I_{s1}}-\frac{I_{b1}}{I_{b2}-I_{b1}}\right)\frac{V_2\rho_{Pb}V_0}{V_1M} \quad \cdots\cdots(9)$$

式中：W_{Pb}——生物体干样中铅的含量，质量比，$\times10^{-6}$；

I_{s1}——样品消化液的峰电流值，nA、mm 或格；

I_{s2}——样品消化液加入铅标准使用溶液后所得峰电流值，nA、mm 或格；

I_{b1}——分析空白试液的峰电流值，nA、mm 或格；

I_{b2}——分析空白试液加入铅标准使用溶液后所得峰电流值，nA、mm 或格；

V_0——样品消化液的体积，mL；

V_1——测定时量取样品消化液的体积，mL；

V_2——加入铅标准使用溶液的体积，mL；

ρ_{Pb}——铅标准使用溶液的浓度，μg/mL；

M——样品称取量，g。

8.2.7 精密度和准确度

四个实验室测定同一互校生物样(牡蛎)，测定结果(质量比)为 1.98×10^{-6}，平均值为 1.94×10^{-6}，再现性相对标准偏差为 5.2%。

五个实验室测定铅含量质量比为 $(0.54\pm0.04)\times10^{-6}$ 的猪肝成分分析标准物质(GB W08 551)，测定结果的相对误差平均为 5.8%。

8.2.8 注意事项

使用不同型号的极谱仪，应另行选择最佳仪器工作条件。表 8 列出 PAR 384—4 型极谱仪测定铅的技术参数，供参考。

表 8 PAR 384-4 型极谱仪测定铅的技术参数

起始电压	终止电压	控制电压	脉冲高度	扫描速率
V			mA	mA/s
−0.90	0.00	−0.05	50	8
纯化时间	控制时间	电解时间	静置时间	悬汞滴体积
s				
15	45	240	30	中等

其他均同 7.2.8 条。

8.3 火焰原子吸收分光光度法

8.3.1 适用范围和应用领域

本方法适用于海洋生物样品中铅的测定。

检出限(W)：0.6×10^{-6}。

8.3.2 方法原理

生物干样经硝酸-高氯酸消化，在酸性介质中，铅与碘化钾形成络合物，用甲基异丁酮萃取后于波长 217.0 nm 处进行铅的火焰原子吸收测定。

8.3.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯。所用水为市售蒸馏水经石英蒸馏器蒸馏或等效纯水。

8.3.3.1 硝酸(HNO_3)：$\rho=1.42$ g/mL，优级纯。

8.3.3.2 硝酸溶液：1+3 及 1+99

分别用 1 体积硝酸(8.3.3.1)与 3 和 99 体积的水混匀。

8.3.3.3 高氯酸($HClO_4$):ρ=1.67 g/mL,优级纯。

8.3.3.4 盐酸(HCl):ρ=1.19 g/mL,优级纯。

8.3.3.5 盐酸溶液:c(HCl)=1 mol/L

将 84 mL 盐酸(8.3.3.4)用水稀释至 1 L。

8.3.3.6 抗坏血酸($C_6H_8O_6$)。

8.3.3.7 甲基异丁酮($C_6H_{12}O$):简称 MIBK。

8.3.3.8 碘化钾溶液:4 mol/L

溶解 166 g 碘化钾(KI)于水中,加水至 250 mL,贮于棕色试剂瓶中,暗处保存。

8.3.3.9 铅标准贮备溶液:1.000 mg/mL

见 8.1.3.3 条。

8.3.3.10 铅标准使用溶液:10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 铅的标准贮备溶液(8.3.3.9)于 100 mL 量瓶中,加(1+99)硝酸溶液(8.3.3.2)至标线,混匀。

8.3.4 仪器及设备

——火焰原子吸收分光光度计;

——铅空心阴极灯;

——空气压缩机;

——乙炔钢瓶;

——精密微量移液管:100 μL(可调);

——实验室常备仪器及设备。

8.3.5 分析步骤

8.3.5.1 样品消化:

准确称取 2 g(±0.001 g)干样于 100 mL 烧杯中,加入 4 mL 硝酸(8.3.3.1),盖上表面皿,低温加热至无气泡产生,稍冷后加入 2 mL 硝酸(8.3.3.1)和 4 mL 高氯酸(8.3.3.3),在电炉上加热至溶液呈透明的淡黄色,移开表面皿,蒸发至白烟冒尽,残留物用 10 mL 盐酸(8.3.3.5)加热溶解,冷却后全量转入 50 mL 量瓶中,加水至标线,混匀,制得样品消化液。同时制备分析空白试液。

8.3.5.2 绘制标准曲线:

8.3.5.2.1 取 6 个 25 mL 量瓶,分别加入 0,60,120,180,240,300 μL 铅标准使用溶液(8.3.3.10),分别加入 15.0 mL 同种类生物样品消化液。

8.3.5.2.2 加入 2 mL 盐酸(8.3.3.4),2 mL 碘化钾溶液(8.3.3.8)和 0.2 g 抗坏血酸(8.3.3.6)混匀,加入 3.00 mL MIBK(8.3.3.7),振荡 2 min,待分层后,插一塑料管至瓶底,通过塑料管加水,使有机相上升至量瓶颈部。按选定的仪器技术参数,以 MIBK(用水饱和过)调零,测定有机相的吸光值(A_i 及 A_b)。

8.3.5.2.3 将测得的吸光值(A)记入 GB 17378.4—1998 附录表 A6 中。以吸光值(A_i-A_b)为纵坐标,相应添加的标准铅的量(0,0.20,0.60 μg)为横坐标,绘制工作曲线。

8.3.5.3 样品测定:

量取 15 mL 样品消化液于 25 mL 量瓶中,其余按绘制标准曲线 8.3.5.2.2 步骤测定吸光值 A_s。

同时按上述步骤测定分析空白试液的吸光值 A_b。以(A_s-A_b)的值从工作曲线上查出相应的铅的量(μg)。

8.3.6 记录与计算

将测得的数据记入表 8 中,按式(10)计算生物体中铅的含量:

$$W_{Pb}=\frac{mV_1}{V_2M} \qquad \cdots\cdots(10)$$

式中：W_{Pb}——生物体干样中铅的含量，质量比，10^{-6}；

m——从工作曲线上查得的相应的铅的量，μg；

V_1——样品制备液的体积，mL；

V_2——用于测定的样品消化液的体积，mL；

M——样品的称取量，g。

8.3.7 精密度

平行 6 次测定 1 个生物样品，其铅含量(质量比)为 $2.20\pm0.22\times10^{-6}$，相对标准偏差为 10.5%。

四个实验室用本方法分析同一互校生物样品(牡蛎)，测定结果，再现性相对标准偏差为 13.9%。

8.3.8 注意事项

8.3.8.1 所有玻璃器皿须经(1+3)硝酸溶液浸泡 3 d 以上，然后用水洗净。

8.3.8.2 生物样品消化时，初次加入浓硝酸后应静置至其大部分生物组织消解后再加热。

8.3.8.3 MIBK 萃取液应在 2 h 内测定完毕。

8.3.8.4 根据原子吸收分光光度计的型号，选定最佳仪器技术参数。表 9 列出 WFX-1B 型原子吸收分光光度计技术参数，供参考。

表 9 WFX-1B 型原子吸收分光光度计技术参数

元素	吸收波长 nm	灯电流 mA	狭缝 mm	燃烧器高度 mm	空气流速 L/h	乙炔流速 L/h	阻尼
铅（有机相）	217.0	1.2	0.2	5.5	300	25	2

8.4 双硫腙分光光度法

8.4.1 适用范围和应用领域

本法适用于生物体中铅的测定。

检出限：0.5×10^{-6}。

8.4.2 方法原理

生物干样经硝酸-过氧化氢消化。在碱性介质中(pH8.5～9.5)，铅离子与双硫腙反应生成樱红色螯合物，以四氯化碳萃取并于波长 520 nm 处进行分光光度测定。

8.4.3 试剂及其配制

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水均为去离子水或等效纯水。

8.4.3.1 硝酸(HNO_3)：$\rho=1.42$ g/mL，优级纯。

8.4.3.2 硝酸溶液：1+99。

8.4.3.3 过氧化氢(H_2O_2)：30%，优级纯。

8.4.3.4 盐酸溶液(HCl)：1+1

将盐酸(HCl，$\rho=1.19$ g/mL，优级纯)与等体积水混合。

8.4.3.5 氨水：等温扩散法提纯。

8.4.3.6 四氯化碳(CCl_4)，优级纯。

8.4.3.7 氰化钾溶液：100 g/L

称取 10 g 氰化钾(KCN)，溶于 100 mL 水中。

8.4.3.8 盐酸羟胺溶液：100 g/L

称取 10 g 盐酸羟胺($NH_2OH\cdot HCl$)于 200 mL 烧杯中，用 100 mL 水溶解后移入 250 mL 分液漏斗中，加 2 滴百里酚蓝指示剂(8.4.3.12)，滴加氨水(8.4.3.5)使呈蓝色，用 10 mL 双硫腙使用溶液(8.4.3.10)萃取，直至有机相无明显红色。弃去有机相，水相加(1+1)盐酸(8.4.3.4)使呈酸性，用四氯

化碳(8.4.3.6)洗提至有机相近无色为止，静置分层，弃去有机相。水相用水稀释至 100 mL。

8.4.3.9 双硫腙贮备溶液：0.5 g/L

称取 0.05 g 双硫腙($C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$)于 100 mL 四氯化碳(8.4.3.6)中，混匀。盛于棕色试剂瓶中，放冰箱中保存。其提纯方法见 GB 17378.4—1998。

8.4.3.10 双硫腙使用溶液：透光率 70%

首先按下列方法确定双硫腙贮备液(8.4.3.9)的吸光值 A：

量取 1.00 mL 双硫腙贮备溶液(8.4.3.9)于 10 mL 量瓶中，加四氯化碳至标线，混匀。以四氯化碳(8.4.3.6)调零，于 520 nm 处用 1 cm 测定池测定其吸光值 A_1。根据稀释因子，得双硫腙贮备溶液(8.4.3.9)的吸光值为 $10A_1$。

根据式(11)计算配制一定体积双硫腙使用溶液所需贮备液体积：

$$V_0 = \frac{V_1 \lg \frac{1}{T}}{10A_1} \qquad \cdots\cdots(11)$$

式中：V_0——配制 V_1 体积双硫腙使用溶液时，所需双硫腙贮备溶液体积，mL；

V_1——欲配制的双硫腙使用溶液体积，mL；

A_1——双硫腙贮备溶液稀释 10 倍后的吸光值；

T——欲配制的双硫腙使用溶液的透光率；本法采用 70%透光率。

量取体积为 V_0 的双硫腙贮备溶液(8.4.3.9)，加四氯化碳(8.4.3.6)至体积为 V_1，混匀。得透光率为 70%的双硫腙使用溶液(使用时配制)。

8.4.3.11 柠檬酸三铵溶液：500 g/L

称 50 g 柠檬酸三铵[$(NH_4)_3C_6H_5O_7$]，加水稀释至 100 mL。提纯方法同 8.4.3.8 条。

8.4.3.12 百里酚蓝指示剂：1 mg/mL

取 100 mg 百里酚蓝{$C_6H_4SO_2OC[C_6H_2CH_3OHCH(CH_3)_2]_2 \cdot H_2O$}，溶于 100 mL95%乙醇中，盛于滴瓶备用。

8.4.3.13 铅标准贮备溶液：1.000 g/L

见 8.1.3.3 条。

8.4.3.14 铅标准使用溶液：10.0 μg/mL

移取铅标准贮备溶液(8.4.3.13)1.00 mL 于 100 mL 量瓶中，加(1+99)硝酸溶液(8.4.3.2)至标线，混匀。

8.4.4 仪器及设备

——分光光度计；

——电热板：铺有 3 cm 厚细砂；

——锥形分液漏斗：125，250，500，1 000 mL；

——实验室常备仪器及设备。

8.4.5 分析步骤

8.4.5.1 样品消化

准确称取 1 g(±0.001 g)干样于 100 mL 高型烧杯中，加少许水湿润，加 10 mL 硝酸(8.4.3.1)，盖上表面皿，微热至泡沫基本消失，将烧杯置 160～200℃电热板上，加热 20 min，取下冷却后加 5 mL 过氧化氢(8.4.3.3)，加热至近干，再加适量硝酸(8.4.3.1)和过氧化氢(8.4.3.3)加热消化，蒸至消化液无明显黄色及近干为止。取下后加 10 mL 水，加热至沸，冷却，全量转入 25 mL 量瓶中，加水至标线，混匀，得样品消化液。同时，制备分析空白试液。

8.4.5.2 绘制标准曲线

8.4.5.2.1 取 6 个 125 mL 锥形分液漏斗，各加入 40 mL 水，分别量入 0，0.20，0.40，0.60，0.80，1.00

mL 铅标准使用溶液(8.4.3.14),混匀。

8.4.5.2.2 加入 10 mL 柠檬酸三铵溶液(8.4.3.11),5 mL 盐酸羟胺溶液(8.4.3.8)和 5 滴百里酚蓝指示剂(8.4.3.12),摇匀。滴加氨水(8.4.3.5)至蓝色,然后小心加入 1 mL 氰化钾溶液(8.4.3.7),混匀。

8.4.5.2.3 加入 10.0 mL 双硫腙使用溶液(8.4.3.10),振摇 2 min,静置分层。

8.4.5.2.4 用滤纸(经稀酸处理过)吸去分液漏斗管颈内的水分,再用卷柱状滤纸塞入管颈内,将有机相放入 1 cm 测定池中(弃去初滤出液数滴),用四氯化碳(8.4.3.6)调零,于 520 nm 波长处测定吸光值(A_i)及标准空白吸光值(A_0)。

8.4.5.2.5 将测得数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中,以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标,相应的铅的量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

8.4.5.3 样品测定

将 25.0 mL 样品制备液全量转入 125 mL 分液漏斗中,加 15 mL 水,混匀。8.4.5.2.2～8.4.5.2.4 步骤测定样品消化液的吸光值(A_s)及分析空白吸光值(A_b)。以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应的铅的量(μg)。

8.4.6 记录与计算

将测得的数据记入表 A1 中,按式(12)计算样品中铅含量:

$$W_{Pb}=\frac{m}{M} \qquad \cdots\cdots(12)$$

式中:W_{Pb}——生物体干样中铅的含量,质量比,10^{-6};

m——从标准曲线上查得的铅的量,μg;

M——样品的称取量,g。

8.4.7 精密度和准确度

六个实验室测定同一互校生物样(牡蛎),测定结果平均值为 0.57×10^{-6},再现性相对标准偏差为 35%。

六个实验室测定铅含量质量比为$(0.54\pm0.04)\times10^{-6}$的猪肝成分分析标准物质(GB W08 551),测定结果的相对误差平均为 5.6%。

8.4.8 注意事项

8.4.8.1 本测定所有玻璃器皿使用前均须用(1+3)硝酸浸泡 24 h 以上,然后用去离子水洗净。滤纸须用(1+9)硝酸浸泡过夜后用水洗净晾干。

8.4.8.2 氰化钾、四氯化碳均系有毒物品,操作时宜小心,避免与皮肤接触;含氰化钾废液用适量的 10%硫代硫酸钠和 30%硫酸亚铁处理后才能废弃。

8.4.8.3 双硫腙铅螯合物萃取液应在 60 min 内完成测定。避免阳光直射萃取液。

8.4.8.4 样品含铁盐高时,可多加盐酸羟胺。若样品制备液在调 pH 时呈暗褐色而影响百里酚蓝变色观测时,可用精密试纸检测 pH 值。

8.4.8.5 样品消化时,应尽量把硝酸和过氧化氢驱尽,以减少调 pH 时的氨水用量和避免过氧化氢氧化双硫腙。

8.4.8.6 氰化钾溶液放置过久可能因分解或聚合而变黄,应重新配制。

8.4.8.7 双硫腙溶液长期放置会发生氧化,所以使用前应做纯度试验,方法如下:

取 2 mL 贮备液于具塞试管中,加 2 mL(1+1)氨水,加塞振荡 1 min,若出现明显黄色或红色,测需重新配制。

8.4.8.8 若样品制备液混浊,需用滤纸过滤后测定。

9 镉

9.1 无火焰原子吸收分光光度法

9.1.1 适用范围和应用领域

本方法适用于海洋生物中镉的直接测定。

检出限(W):0.005×10^{-6}。

9.1.2 方法原理

生物干样在高压罐中用硝酸消化,于 228.8 nm 吸收波长下,用石墨炉原子吸收分光光度法测定镉含量。

9.1.3 试剂及其配制

9.1.3.1 水:市售蒸馏水经石英蒸馏器蒸馏提纯,或等效纯水。

9.1.3.2 硝酸(HNO_3):$\rho=1.42$ g/mL,超纯。

9.1.3.3 硝酸溶液:1+1,1+99

1 体积硝酸(9.1.3.2)与 1 和 99 体积水混匀。

9.1.3.4 镉标准贮备溶液:1.000 g/L

称取 1.000 g 金属镉(99.99%),用 5 mL 硝酸(9.1.3.2)溶解后,全量转入 1 000 mL 量瓶中,用(1+99)硝酸溶液(9.1.3.3)稀释至标线,混匀。

9.1.3.5 镉标准中间溶液:10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 镉标准贮备溶液(9.1.3.4),于 100 mL 量瓶中,用(1+99)硝酸(9.1.3.3)稀释至标线,混匀。

9.1.3.6 镉标准使用溶液:10.00 ng/mL

量取 200 μL 镉中间标准溶液(9.1.3.5)于 200 mL 量瓶中,用(1+99)硝酸(9.1.3.3)稀释至标线,混匀后转入 200 mL 聚乙烯瓶中贮存。

9.1.4 仪器及设备

——配有氘灯背景校正器和石墨炉附件的原子吸收分光光度计;

——镉空心阴极灯或无极放电灯;

——记录仪;

——聚四氟乙烯高压罐,20~30 mL;

——洁净工作台;

——电热恒温干燥箱,最高温度 300℃;

——氩气钢瓶,纯度 99.99%;

——石英蒸馏器;

——石英试剂瓶:500 或 1 000 mL;

——聚丙烯杯:2 mL;

——聚乙烯瓶:200 mL;

——微量注射器:20,50,100,500,1 000 μL。

9.1.5 分析步骤

9.1.5.1 样品消化

9.1.5.1.1 准确称取 0.2~0.4 g(±0.001 g)干样于高压罐中,加入 3 mL 硝酸(9.1.3.2),将高压罐盖紧,置于电热恒温干燥箱,于 130℃消化 1.5 h。

9.1.5.1.2 取出高压罐冷却至室温。打开盖子,将消化液全量转入 10 mL 量瓶中,加水(9.1.3.1)至标线。混匀。制得样品消化液。同时,制备分析空白试液。

9.1.5.2 测定步骤

取 3 个 2 mL 聚乙烯杯，各量入 400 μL 样品消化液，依次加入 100、50、0 μL 水(9.1.3.1)和 0、50、100 μL 镉标准使用溶液(9.1.3.6)，混匀。移取 20 μL 试液，按选定的仪器技术参数，测定吸光值(A_s、A_1 和 A_2)。

同时，取 400 μL 分析空白试液，加 100 μL 水(9.1.3.1)，测定吸光值 A_b。

9.1.6 记录与计算

将测得数据记入表 A1 中。

9.1.6.1 以吸光值 A_s、A_1 和 A_2(各减 A_b)为纵坐标，相应添加的镉浓度(μg/mL)为横坐标，绘制标准添加法短工作曲线。以外推法查出消化液中镉的浓度(μg/mL)。

9.1.6.2 按式(13)计算生物样品中镉的含量：

$$W_{Cd}=\frac{\rho_{Cd}Vf}{M} \qquad \cdots\cdots(13)$$

式中：W_{Cd}——生物体干样中镉的含量，质量比，10^{-6}；

ρ_{Cd}——外推法查出的镉的浓度，μg/mL；

V——样品消化液体积，mL；

f——测定时样品消化液的稀释因子(本方法为 1.25)；

M——样品的称取量，g。

9.1.7 精密度和准确度

平行 6 次测定三种生物样品，测得镉含量相对标准偏差分别为 13%、2.8%和 3.6%。

五个实验室用本方法分析镉含量(质量比)为(0.067±0.004)×10^{-6}的标准猪肝成分分析标准物质(GB W085 51)，测定结果的相对误差平均为 7.2%。

五个实验室分析同一生物互校样品(牡蛎)，其测定结果再现性相对标准偏差为 8.2%。

9.1.8 注意事项

9.1.8.1 所使用的塑料、石英和玻璃器皿，均应以(1+3)硝酸浸泡 2 天以上，并用水(9.1.3.1)洗涤干净。

9.1.8.2 为避免分析过程中空气尘埃对样品的沾污，分析工作应在洁净实验室中或超净工作台上进行。

9.1.8.3 使用不同的仪器，尤其使用质量不同的石墨管时，灵敏度可能有较大的差别。应根据灵敏度和标准加入曲线线性范围，适当改变镉标准使用溶液的添加量。

9.1.8.4 根据原子吸收分光光度计的型号，选定最佳仪器技术参数。表 10 列出 PE-703 型原子吸收分光光度计技术参数，供参考。

表 10 PE-703 型原子吸收分光光度计技术参数

元素	积分时间 s	吸收波长 nm	灯电流 mA	光谱通带 nm	干燥		灰化		原子化		清洗	
					温度 ℃	升温/保持 s	温度 ℃	升温/保持 s	温度 ℃	升温/保持 s	温度 ℃	升温/保持 s
镉	5	228.8	5	0.7	100	10/20	400	10/15	2 100	1/5	2 500	1/2

9.2 阳极溶出伏安法

9.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中镉的测定。

检出限：0.4×10^{-6}。

9.2.2 方法原理

生物干样经硝酸-过氧化氢消化，在 pH2.0～2.5 介质中，当在工作电极上施加一定电压进行电解时，镉被还原并沉积在悬滴汞电极上形成镉-汞齐。然后进行反向电压扫描，汞齐中的金属镉被氧化溶出，其氧化电流与溶液中镉的浓度呈正比关系，借以进行定量测定。

9.2.3 试剂及其配制

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

9.2.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，超纯。

9.2.3.2 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

9.2.3.3 盐酸(HCl)：ρ=1.19 g/mL，超纯。

9.2.3.4 氨水(NH_4OH)：经等温扩散法提纯。

9.2.3.5 精密 pH 试纸：pH0.5～5.0。

9.2.3.6 镉标准贮备溶液：1.00 mg/mL

见 9.1.3.4 条。

9.2.3.7 镉标准中间溶液：10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 镉标准贮备溶液(9.2.3.6)于 100 mL 量瓶中，加入 1 mL 盐酸(9.2.3.3)，加水至标线，混匀。

9.2.3.8 镉标准使用溶液：1.00 μg/mL

量取 10.0 mL 镉标准中间溶液(9.2.3.7)于 100 mL 量瓶中，加水至近 100 mL，用氨水(9.2.3.4)调节 pH 值为 2.0～2.5，加水至标线，混匀。

9.2.4 仪器及设备

见 7.2.4 条。

9.2.5 分析步骤

9.2.5.1 样品消化

见 7.2.5.1 条。

9.2.5.2 样品的测定

9.2.5.2.1 量取 10.0 mL 样品试液于电解池中，用氨水(9.2.3.4)调节 pH 为 2.0～2.5〔用精密 pH 试纸(9.2.3.5)检验〕。

9.2.5.2.2 接通仪器(测定前开机预热 20 min)。将三种电极插入电解池中，输入选定的仪器技术参数。

9.2.5.2.3 启动仪器的运转旋钮。待运转结束后，记下峰电流值 I_{s1}。

9.2.5.2.4 在原溶液中加入 100 μL 镉标准使用溶液(9.2.3.8)，下同 3 操作，记下峰电流值 I_{s2}。

9.2.5.3 空白的测定

按 9.2.5.2 步骤测定分析空白消化液的峰电流值 I_{b1}和添加镉标准后的峰电流值 I_{b2}。

9.2.6 记录与计算

将所测得的峰电流值记入 GB 17378.4—1998 的附录表 A7 中，按式(14)计算样品镉的含量：

$$W_{Cd}=\left(\frac{I_{s1}}{I_{s2}-I_{s1}}-\frac{I_{b1}}{I_{b2}-I_{b1}}\right)\frac{\rho_{Cd}V_2V_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(14)$$

式中：W_{Cd}——生物体干样中镉的含量，质量比，10^{-6}；

I_{s1}——样品消化液的峰电流值，nA、mm 或格；

I_{s2}——样品消化液中加入镉标准使用溶液后所得峰电流值，nA、mm 或格；

I_{b1}——分析空白消化液的峰电流值，nA、mm 或格；

I_{b2}——分析空白消化液中加入镉标准使用溶液后所得峰电流值，nA、mm 或格；

V_0——样品消化液的体积，mL；

V_1——测定时量取样品消化液的体积，mL；

V_2——加入镉标准使用溶液的体积，mL；

ρ_{Cd}——镉标准使用溶液的浓度，μg/mL；

M——样品的称取量，g。

9.2.7 精密度

五个实验室测定同一生物样品(牡蛎),测定结果再现性相对标准偏差为 8.4%。

9.2.8 注意事项

使用不同型号的极谱仪,应另行选择最佳仪器工作条件。表 11 列出 PAR 384-4 型极谱仪测定镉的仪器技术参数,供参考。

表 11 PAR 384-型极谱仪测定镉的仪器技术参数

起始电压	终止电压	控制电压	脉冲高度	扫描速度
V			mV	mV/s
−0.90	0.00	−0.05	50	8
纯化时间	控制时间	电解时间	静置时间	悬浮滴体积
s				
15	45	240	30	中等

其他注意事项均同 7.2.8。

9.3 火焰原子吸收分光光度法

9.3.1 适用范围和应用领域

本方法适用于海洋生物样品镉的测定。

检出限(W):0.08×10^{-6}。

9.3.2 方法原理

生物干样经硝酸-高氯酸湿法消化,于波长 228.8 nm 处进行镉的火焰原子吸收测定。

9.3.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂均为分析纯,水用市售蒸馏水经石英蒸馏器蒸馏或等效纯水。

9.3.3.1 硝酸(HNO_3):ρ=1.42 g/mL,优级纯。

9.3.3.2 硝酸溶液:1+1

将硝酸(9.3.3.1)与等体积水混合。

9.3.3.3 硝酸溶液:1+99

1 体积硝酸(9.3.3.1)与 99 体积水混合。

9.3.3.4 高氯酸:$HClO_4$,ρ=1.67 g/mL,优级纯。

9.3.3.5 盐酸溶液:1+1

1 体积盐酸(HCl,ρ=1.19 g/mL,优级纯)与等体积水混合。

9.3.3.6 镉标准贮备溶液:1.000 mg/mL

见 9.1.3.4。

9.3.3.7 镉标准使用溶液:10.0 μg/mL

见 9.1.3.5 条。

9.3.4 仪器及设备

——火焰原子吸收分光光度计;

——镉空心阴极灯;

——空气压缩机;

——乙炔钢瓶;

——电热板;

——调压变压器:1 kVA;

——实验室常备仪器及设备。

9.3.5 分析步骤

9.3.5.1 样品消化

称取 2 g(±0.001 g)干样于 100 mL 烧杯中,加入 4 mL 硝酸(9.3.3.1),盖上表面皿,在电热板上低温加热至无气泡产生,冷却后,加入 2 mL 硝酸(9.3.3.1)和 4 mL 高氯酸(9.3.3.4),再加热至溶液呈透明的淡黄色。移开表面皿蒸发至白烟冒尽,残留物用 10 mL 盐酸溶液(9.3.3.5)加热溶解,冷却后,全量转入 25 mL 量瓶中,用水稀释至标线。制得样品消化液,同时制备分析空白试液。

9.3.5.2 绘制标准曲线

分别量取 0,0.25,0.50,1.00,1.50,2.00,2.50 mL 的镉标准使用溶液(9.3.3.7)于 7 个 50 mL 量瓶中,用水稀释至标线,此标准系列浓度为 0,0.05,0.10,0.20,0.30,0.40,0.50 μg/mL。按选定的仪器技术参数,用水调零测定吸光值 A_i 及标准空白吸光值 A_0。

将测得吸光值记入 GB 17378.4—1998 附录表 A6 中。以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标,相应的镉的浓度(μg/mL)为横坐标绘制标准曲线。

9.3.5.3 样品测定

按选定的仪器技术参数,用水调零,直接测定样品制备液的吸光值 A_s,同时测定分析空白消化液的吸光值 A_b。

以 A_s-A_b 的值从标准曲线上查出相应的镉的浓度。

9.3.6 记录与计算

将测得的数据记入表 A1 中,按式(15)计算生物体样品的镉含量:

$$W_{Cd}=\frac{\rho_{Cd}V}{M} \qquad \cdots\cdots(15)$$

式中:W_{Cd}——生物体干样中镉的含量,质量比,10^{-6};

ρ_{Cd}——从标准曲线上查得的镉的浓度,μg/mL;

V——样品消化液的体积,mL;

M——样品的称取量,g。

9.3.7 精密度

平行 8 次测定 1 个生物样品,其镉含量(质量比)为 1.93×10^{-6},相对标准偏差为 1.1%。

六个实验室用本方法分析同一互校生物样(牡蛎),测量结果再现性相对标准偏差为 8.7%。

9.3.8 注意事项

9.3.8.1 所有玻璃器皿经(1+3)硝酸溶液浸泡 2 d 以上,然后用水洗净。

9.3.8.2 生物样消化时初次加入浓硝酸后最好放置至其大部分生物组织消解后再加热。

9.3.8.3 根据原子吸收分光光度计型号,选定最佳仪器技术参数,表 12 列出 WFX-1B 型原子吸收分光光度计技术参数。供参考。

表 12 WFX-1B 型原子吸收分光光度计技术参数

元素	吸收波长 nm	灯电流 mA	狭缝 mm	燃烧器高度 mm	空气流速 L/h	乙炔流速 L/h	阻尼
镉	228.8	1.0	0.1	6.0	320	80	2

9.4 双硫腙分光光度法

9.4.1 适用范围和应用领域

本法适用于污染海域的生物体中镉的测定。

检出限(W):0.3×10^{-6}。

9.4.2 方法原理

生物干样经硝酸-过氧化氢消化。在强碱性(pH=13)条件下,镉离子与双硫腙反应生成红色螯合

物，用四氯化碳萃取后，于 518 nm 波长处进行分光光度测定。

9.4.3 试剂及其配制

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

9.4.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，优级纯。

9.4.3.2 盐酸(HCl)：ρ=1.19 g/mL，优级纯。

9.4.3.3 氨水($NH_3 \cdot H_2O$)：ρ=0.90 g/mL，优级纯。

9.4.3.4 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

9.4.3.5 四氯化碳(CCl_4)：优级纯。

9.4.3.6 酒石酸溶液：20 g/L

称取 20 g 酒石酸〔$HOOC(CHOH)_2COOH$〕溶于水中，加水至 1 L，于冰箱中贮存。

9.4.3.7 酒石酸钾钠溶液：250 g/L

称取 25 g 酒石酸钾钠[$NaOOC(CHOH)_2COOK \cdot 4H_2O$]溶于 100 mL 水中，加 2 滴百里酚蓝，用氨水(9.4.3.3)调节 pH 为 8.5～9.0(蓝色)，以双硫腙四氯化碳使用溶液(9.4.3.12)提取至有机相显绿色为止，弃去有机相，水相用(1+1)盐酸中和至中性，再用四氯化碳(9.4.3.5)洗涤残余的双硫腙，直至有机相呈无色，水相加水至 200 mL。

9.4.3.8 氢氧化钠-氰化钾溶液(Ⅰ)

称取 200 g 氢氧化钠(NaOH，优级纯)和 5.0 g 氰化钾(KCN)溶于水中，加水至 1 L，贮存于聚乙烯瓶中。此溶液可稳定 1～2 个月。

9.4.3.9 氢氧化钠-氰化钾溶液(Ⅱ)

称取 400 g 氢氧化钠和 0.5 g 氰化钾溶于水中，加水至 1 L，混匀。贮于聚乙烯瓶中，此溶液可稳定 1～2个月。

9.4.3.10 盐酸羟胺溶液：200 g/L

称取 20 g 盐酸羟胺($NH_2OH \cdot HCl$)溶于 60 mL 水中，按(9.4.3.7)步骤提纯；加水至 100 mL，混匀。

9.4.3.11 双硫腙贮备溶液：0.4 mg/mL

称取 0.04 g 双硫腙($C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$)溶于 100 mL 四氯化碳(9.4.3.5)中，盛于棕色试剂瓶，于冰箱中保存。提纯方法见 GB 17378.4—1998。

9.4.3.12 双硫腙使用溶液：T=20%；T=50%

首先，按下列方法确定双硫腙贮备溶液(9.4.3.11)的吸光值 A：

量取 1.00 mL 双硫腙贮备溶液(9.4.3.11)于 10 mL 量瓶中，加四氯化碳至标线，混匀。以四氯化碳(9.4.3.5)调零，于 518 nm 波长处用 1 cm 测定池测定其吸光值 A_1。根据稀释因子，得双硫腙贮备溶液(9.4.3.11)的吸光值为 $10A_1$。

然后，根据式(16)计算配制一定体积双硫腙使用溶液所需双硫腙贮备溶液(9.4.3.11)体积：

$$V_0 = \frac{V_1 \lg \frac{1}{T}}{10A_1} \qquad \cdots\cdots(16)$$

式中：V_0——配制 V_1 体积双硫腙使用溶液时，所需双硫腙贮备溶液体积，mL；

V_1——欲配制的双硫腙使用溶液体积，mL；

A_1——双硫腙贮备溶液稀释 10 倍后的吸光值；

T——欲配制的双硫腙使用溶液的透光率。

取 V_0 体积双硫腙贮备溶液(9.4.3.11)，加四氯化碳(9.4.3.5)至 V_1 体积，混匀。得透光率为 20%(或 50%)的双硫腙使用溶液(使用时配制)。

9.4.3.13 镉标准贮备溶液：1.000 g/L。

见 9.1.3.4 条。

9.4.3.14 镉标准使用溶液：10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 镉标准贮备溶液(9.4.3.13)于 100 mL 量瓶中，加入 1 mL 盐酸(9.4.3.2)，加水至标线，混匀。

9.4.4 仪器及设备

——分光光度计；

——电热板：铺有 3 cm 厚细砂；

——锥形分液漏斗：125、500 mL；

——实验室常备仪器及设备。

9.4.5 分析步骤

9.4.5.1 样品消化

准确称取 1 g(±0.001 g)生物干样于 100 mL 高型烧杯中，加少许水润湿，加 10 mL 硝酸(9.4.3.1)，盖上表面皿，先微热至不冒泡，然后将烧杯置于 160～200℃电热板上加热 20 min，取下冷却后加 5 mL 过氧化氢(9.4.3.4)，加热至近干，再补加 适量硝酸(9.4.3.1)和过氧化氢(9.4.3.4)加热消化，直至样品黄色不明显为止。取下，加 10 mL 水，加热至沸，冷却后，全量移入 25 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。制得样品消化液。

同时，按上述步骤制备分析空白试液。

9.4.5.2 绘制标准曲线

9.4.5.2.1 取 6 个 125 mL 锥形分液漏斗，各加入 25 mL 水和 0，0.10，0.20，0.30，0.40 和 0.50 mL 镉标准使用溶液(9.4.3.14)。

9.4.5.2.2 加 10 mL 酒石酸钾钠溶液(9.4.3.7)，1 mL 盐酸羟胺溶液(9.4.3.10)和 5 mL 氢氧化钠-氰化钾溶液(Ⅰ)(9.4.3.8)。每加入一种试剂均须混匀。

9.4.5.2.3 加入 15 mL 透光率为 20%的双硫腙使用溶液(9.4.3.12)，振摇 2 min(此操作应迅速进行)。

9.4.5.2.4 将有机相放入盛有 25 mL 酒石酸溶液(9.4.3.6)的第二套 125 mL 锥形分液漏斗中，用 2 mL四氯化碳(9.4.3.5)洗涤第一套锥形分液漏斗，合并四氯化碳于第二套分液漏斗中，再重复一次。

9.4.5.2.5 振摇 2 min，静置分层，弃去有机相，再加入 5 mL 四氯化碳，振摇半分钟，静置分层后弃去有机相。

9.4.5.2.6 于分液漏斗中加入 0.25 mL 盐酸羟胺溶液(9.4.3.10)，15.0 mL 透光率为 50%的双硫腙使用溶液(9.4.3.12)，5 mL 氢氧化钠-氰化钾溶液(Ⅱ)(9.4.3.9)，立即振摇 1 min，静置分层。

9.4.5.2.7 用滤纸吸干分液漏斗管颈内壁水分，塞入少许处理过的脱脂棉，将有机相滤入 2 cm 测定池，以四氯化碳调零，于 518 nm 波长处测定吸光值 A_i 及标准空白吸光值 A_0。

9.4.5.2.8 将测得数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中，以吸光值 A_i-A_0 为纵坐标，相应的镉的含量(μg)为横坐标，绘制标准曲线。

9.4.5.3 样品测定

将样品制备液全量转入 125 mL 锥形分液漏斗中，其余按 9.4.5.2.2～9.4.5.2.7 步骤测定样品制备液的吸光值 A_s 及分析空白吸光值 A_b。

以 A_s-A_b 的值从标准曲线上查出相应的镉的量。

9.4.6 记录与计算

将测得的数据记入表 A1 中，按式(17)计算生物样品中镉的含量：

$$W_{Cd}=\frac{m}{M} \qquad \cdots\cdots(17)$$

式中：W_{Cd}——生物体干样中镉的含量，质量比，10^{-6}；

m——从标准曲线上查得的镉的量，μg；

M——样品的称取量，g。

9.4.7 精密度

六个实验室测定同一互校生物样(牡蛎)，测定结果，再现性相对标准偏差为 64.3%。

9.4.8 注意事项

9.4.8.1 本测定所有玻璃器皿使用前均须用(1+3)硝酸浸泡 24 h 以上，然后用去离子水洗净；过滤用的滤纸，脱脂棉均用(1+9)硝酸浸泡过夜，洗净烘干后备用。

9.4.8.2 氰化钾、四氯化碳均系有毒物品，操作时务必小心，避免与皮肤接触；含氰化钾废液用适量的10%硫代硫酸钠和 30%硫酸亚铁处理后才能弃去。

9.4.8.3 双硫腙溶液经提纯处理后，长期存放会发生氧化，所以使用时最好做纯度试验，方法如下：取 2 mL 贮备液于具塞试管中，加 2 mL(1+1)氨水，加塞振摇 1 min，静置分层后，四氯化碳层应无色或略带淡绿色；若出现明显黄色或红色，贮备液必须重新配制。

9.4.8.4 配制双硫腙的四氯化碳的纯度对测定结果影响较大。使用前，每批溶剂均应做稳定性试验。方法如下：取溶剂于比色管中，滴加提纯过的双硫腙溶液，溶液的蓝绿色应保持 24 h 不变。否则四氯化碳须经提纯。方法如下：每升溶剂中加 200 mL0.5%盐酸羟胺溶液，在分液漏斗中振摇洗涤，放置分层后，经滤纸过滤，再用水洗一次即可。

9.4.8.5 双硫腙与镉的螯合物在四氯化碳饱和的强碱性溶液中易分解，所以四氯化碳与强碱接触的时间应尽量短些。

9.4.8.6 若试液含镉量超过 5 μg，校准曲线按 0～10 μg 范围制作，用 1 cm 测定池测定吸光值。

9.4.8.7 冷的酒石酸溶液可减轻碱同酒石酸反应所产生的热影响，酒石酸溶液贮于冰箱中可延长使用时间。

9.4.8.8 气温较高时，氰化钾溶液配制后须放置一周才能使用，否则影响测定结果。

9.4.8.9 若样品制备液混浊，在测定前，先用滤纸过滤。

10 锌

10.1 火焰原子吸收分光光度法

10.1.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中锌的测定。

检出限(W)：4×10^{-6}。

10.1.2 方法原理

生物样品经硝酸-过氧化氢消化后，于 213.8 nm 波长处直接进行锌的火焰原子吸收分光光度测定。

10.1.3 试剂及其配制

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为二次去离子水或等效纯水。

10.1.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，优级纯。

10.1.3.2 盐酸溶液：1+99

用 1 体积盐酸〔(HCl)：1.19 g/mL，优级纯〕与 99 体积水混匀。

10.1.3.3 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

10.1.3.4 锌标准贮备溶液：1.000 g/L

称取 0.200 0 g 金属锌(纯度 99.99%以上)于 50 mL 烧杯中，加入 5 mL(1+1)硝酸溶液，盖上表面皿，加热溶解，冷却后，全量移入 200 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

10.1.3.5 锌标准使用溶液：20.0 μg/mL

量取 2.00 mL 锌标准贮备溶液(10.1.3.4)于 100 mL 量瓶中，加盐酸溶液(10.1.3.2)至标线，混匀。

10.1.4 仪器及设备

——火焰原子吸收分光光度计；

——锌空心阴极灯；

——空气压缩机；

——乙炔钢瓶；

——洁净工作台(洁净100级)；

——电热板；

——实验室常备仪器及设备。

10.1.5 分析步骤

10.1.5.1 样品消化

见7.1.5.1条。

10.1.5.2 绘制标准曲线

10.1.5.2.1 移取0,0.40,0.80,1.20,1.60,2.00 mL锌标准使用溶液(10.1.3.5)于10 mL具塞比色管中，加水至标线，混匀。按选定的仪器技术参数，用水调零，测定标准系列溶液的吸光值A_i及标准空白吸光值A_0。

10.1.5.2.2 将测得数据记入GB 17378.4—1998附录表A6中，以吸光值A_i-A_0为纵坐标，相应的锌的浓度(μg/mL)为横坐标，绘制标准曲线。

10.1.5.3 样品的测定

按选定的仪器技术参数，用水调零，测定样品消化液的吸光值A_s和分析空白消化液的吸光值A_b。以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应的锌的浓度。

10.1.6 记录与计算

将测得数据记入表A1中，按式(18)计算样品中锌含量：

$$W_{Zn}=\frac{\rho_{Zn}V}{M} \qquad \cdots\cdots(18)$$

式中：W_{Zn}——生物体干样中锌含量，质量比，10^{-6}；

ρ_{Zn}——从标准曲线上查得的锌的浓度，μg/mL；

V——样品制备液的体积，mL；

M——样品的称取量，g。

10.1.7 精密度

六个实验室测定同一生物样品(牡蛎)。测定结果，再现性相对标准偏差为4.9%。

10.1.8 注意事项

10.1.8.1 本方法中所用的器皿均先用(1+3)硝酸浸泡1 d以上，使用前用水淋洗干净。

10.1.8.2 样品消化时，须始终盖上表面皿。

10.1.8.3 不同型号的原子吸收分光光度计，自行选定仪器最佳技术参数，测定时如吸光值太高，可适当转动燃烧器角度。表13为WFD-Y_2型原子吸收分光光度计的仪器技术参数。供参考。

表13 WFD-Y_2型原子吸收分光光度计技术参数

元 素	吸收波长 nm	灯电流 mA	空气流量 L/h	乙炔流量 L/h	燃烧器高度 mm	狭 缝 mm
Zn	213.8	7	500	40	10	0.1

10.2 阳极溶出伏安法

10.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中锌的测定。

检出限(W)：2×10^{-5}。

10.2.2 方法原理

样品经硝酸-过氧化氢消化。在镓存在下，用氨水调节溶液pH为2.2～2.8，当对工作电极上施加一定电压进行电解时，锌被还原并沉积在悬滴汞电极上形成锌-汞齐。然后进行反向电压扫描，汞齐中的金属锌被氧化溶出，所产生的氧化电流与溶液中锌的浓度是正比关系，借以进行定量测定。

10.2.3 试剂及其配制

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

10.2.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，超纯。

10.2.3.2 盐酸(HCl)：ρ=1.19 g/mL，超纯。

10.2.3.3 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

10.2.3.4 氨水(NH_4OH)：经等温扩散法提纯。

10.2.3.5 精密pH试纸：pH0.5～5.0。

10.2.3.6 镓贮备溶液：100 μg/mL

称取0.0135 g氧化镓于烧杯中，用2 mL(1+1)盐酸溶液微热溶解，转入100 mL量瓶中，加水至标线，混匀。

10.2.3.7 镓使用溶液：5.0 μg/mL

量取5.0 mL镓贮备溶液(10.2.3.6)于100 mL量瓶中，加水近100 mL，用氨水(10.2.3.4)调节pH值为2.2～2.8，然后加水至标线，混匀。

10.2.3.8 锌标准贮备溶液：1.00 mg/mL

见10.1.3.4条。

10.2.3.9 锌标准中间溶液：100 μg/mL

量取10.0 mL锌标准贮备溶液(10.2.3.8)于100 mL量瓶中，加入1 mL盐酸(10.2.3.2)，加水至标线，混匀。

10.2.3.10 锌标准使用溶液：3.00 μg/mL

量取3.00 mL锌标准中间溶液(10.2.3.9)于100 mL量瓶中，加水到近100 mL，用氨水(10.2.3.4)调节pH为2.2～2.8，加水至标线，混匀。

10.2.4 仪器及设备

见7.1.4条。

10.2.5 分析步骤

10.2.5.1 样品消化

准确称取0.25 g(±0.001 g)干样于50 mL烧杯中，用几滴水润湿，加入2 mL硝酸(10.2.3.1)，盖上表面皿，于电热板上低温加热，待泡沫消失后，加入1 mL过氧化氢(10.2.3.3)，低温蒸至近干，补加0.5 mL硝酸(10.2.3.1)和0.5 mL过氧化氢(10.2.3.3)，蒸干，再重复两次。用水洗净表面皿，洗涤液并入消化液中，移去表面皿，继续蒸干，然后移到电炉上(约450℃)加热至不溶物呈白色(除尽有机物)，加入2 mL盐酸(10.2.3.2)，于高温电热板上蒸干，取下冷却，加入1 mL(1+1)盐酸溶液，于电热板上微热浸取不溶物。冷却后全量移入50 mL量瓶中，加水到标线，混匀，得样品消化液。

同时，制备分析空白试液。

10.2.5.2 样品的测定

10.2.5.2.1 量取2.00～5.00 mL样品消化液于电解池中，加入100 μL镓使用溶液(10.2.3.7)，加水至约10 mL，用氨水(10.2.3.4)调节pH为2.2～2.8〔用精密pH试纸(10.2.3.5)〕。

10.2.5.2.2 接通仪器(测定前开机预热20 min)。将三种电极插入电解池中，输入选定的仪器技术参数。

10.2.5.2.3 启动仪器运转旋钮，待运转结束后，记下峰电流值I_{s1}。

10.2.5.2.4 在原溶液中加入 100 μL 锌标准使用溶液(10.2.3.10),以下同 10.2.5.2.2～10.2.5.2.3 操作。记下峰电流值 I_{s2}。

10.2.5.3 空白测定

按 10.2.5.2 步骤测定分析空白制备液的峰电流值 I_{b1}添加锌标准后的峰电流值 I_{b2}。

10.2.6 记录与计算

将所测得的峰电流值记入 GB 17378.4—1998 附录表 A7 中,按式(19)计算样品中锌的含量:

$$W_{Zn}=\left(\frac{I_{s1}}{I_{s2}-I_{s1}}-\frac{I_{b1}}{I_{b2}-I_{b1}}\right)\frac{\rho_{Zn}V_2V_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(19)$$

式中:W_{Zn}——生物体干样中锌的含量质量比,10^{-6};

I_{s1}——样品消化液的峰电流值,nA、mm 或格;

I_{s2}——样品消化液加入锌标准使用溶液后的峰电流值,nA、mm 或格;

I_{b1}——分析空白消化液的峰电流值,nA、mm 或格;

I_{b2}——分析空白制备液加入锌标准使用溶液后的峰电流值,nA、mm 或格;

V_0——样品消化液的体积,mL;

V_1——测定时量取样品消化液的体积,mL;

V_2——加入锌标准使用溶液的体积,mL;

ρ_{Zn}——锌标准使用溶液的浓度,μg/mL;

M——样品的称取量,g。

10.2.7 精密度和准确度

四个实验室测定同一互校生物样(牡蛎),测定结果,平均值为 305×10^{-6},再现性相对标准偏差为 5.0%。

四个实验室测定锌含量质量比为$(172\pm8)\times10^{-6}$的同一猪肝成分分析标准物质(GB W085 51),测定结果,相对误差平均为 0.2%。

10.2.8 注意事项

10.2.8.1 使用不同型号的极谱仪,应另行选择最佳仪器技术参数,表 14 为 PAR 384-4 型极谱仪测定锌的仪器技术参数,供参考。

表 14 PAR 384-4 型极谱仪测定锌的仪器技术参数

起始电压	终止电压	控制电压	脉冲高度	扫描速度
V			mV	mV/s
−1.20	−0.80	−0.05	50	8
纯化时间	控制时间	电解时间	静置时间	悬汞滴体积
s				
15	45	60	30	中等

其他注意事项均同 7.2.8.1 条。

10.3 双硫腙分光光度法

10.3.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中锌的测定。

检出限:0.1×10^{-6}。

10.3.2 方法原理

生物样品经硝酸-过氧化氢消化后,锌离子与双硫腙反应生成可溶于四氯化碳的红色螯合物,于

538 nm 波长处进行分光光度测定。用硫代硫酸钠和盐酸羟胺排除铜、铅、镉等金属离子的干扰。

10.3.3 试剂及其配制

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

10.3.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL；优级纯。

10.3.3.2 盐酸溶液：1+1。

10.3.3.3 过氧化氢(H_2O_2)：30%，优级纯。

10.3.3.4 氨水

取 2 个 500 mL 烧杯，一个倒入 500 mL 浓氨水($NH_3 \cdot H_2O$，ρ=0.90 g/mL)，另一个倒入 500 mL 水，同时置于无干燥剂的干燥器中，静置 48 h，装水烧杯中的溶液即为精制的稀氨水。

10.3.3.5 乙酸-乙酸钠缓冲溶液

称取 136 g 乙酸钠($CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$)于 500 mL 烧杯中，加 400 mL 水溶解，加 60 mL 冰乙酸(CH_3CO_2H，ρ=1.05 g/mL)，混匀。转入 500 mL 锥形分液漏斗中，每次用 10 mL 双硫腙使用溶液(10.3.3.10)，萃取，直至双硫腙溶液呈绿色，再用 20 mL 四氯化碳(10.3.3.8)洗除水溶液中残留的双硫腙，弃去有机相，加水到 500 mL，盛于聚乙烯瓶中。

10.3.3.6 盐酸羟胺：200 g/L

称取 20 g 盐酸羟胺($NH_2OH \cdot HCl$)于 250 mL 烧杯中，加 50 mL 水溶解，滴加氨水(10.3.3.4)调节 pH 约为 5，转入 250 mL 锥形分液漏斗中，按(10.3.3.5)步骤提纯，弃去有机相，滴加盐酸溶液(10.3.3.2)至水相呈酸性，加水到 100 mL。

10.3.3.7 硫代硫酸钠溶液：250 g/L

称取 25 g 硫代硫酸钠($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$，优级纯)溶于水中，加水至 100 mL，混匀，贮存于棕色试剂瓶中。

10.3.3.8 四氯化碳(CCl_4)：优级纯。

10.3.3.9 双硫腙贮备溶液：0.5 mg/mL

称取 0.05 g 双硫腙($C_6H_5N{:}NCSNHNHC_6H_5$)溶于 100 mL 四氯化碳(10.3.3.8)中，盛于棕色试剂瓶中，于冰箱中保存。提纯方法见 GB 17378.4—1998 6.2.3.7 条。

10.3.3.10 双硫腙使用溶液：T=50%

首先，按下列方法确定双硫腙贮备溶液(10.3.3.9)的吸光值 A：

移取 1.00 双硫腙贮备溶液(10.3.3.9)于 10 mL 量瓶中，加四氯化碳至标线，混匀。以四氯化碳(10.3.3.8)调零，于 538 nm 波长处用 1 cm 测定池测定其吸光值 A_1。根据稀释因子，得双硫腙贮备溶液(10.3.3.9)的吸光值为 $10A_1$。

然后，根据式(20)计算配制一定体积双硫腙使用溶液所需双硫腙贮备溶液(10.3.3.9)体积：

$$V_0 = \frac{V_1 \lg \frac{1}{T}}{10A_1} \qquad \cdots\cdots(20)$$

式中：V_0——配制 V_1 体积双硫腙使用溶液时，所需双硫腙贮备溶液体积，mL；

V_1——欲配制的双硫腙使用溶液体积，mL；

A_1——双硫腙贮备溶液稀释 10 倍后的吸光值；

T——欲配制的双硫腙使用溶液的透光率。本方法为 50%。

取 V_0 体积双硫腙贮备溶液(10.3.3.9)，加四氯化碳(10.3.3.8)至 V_1 体积，混匀。得透光率为 50% 的双硫腙使用溶液，使用时配制。

10.3.3.11 甲基橙指示剂溶液：1 g/L

称取 0.1 g 甲基橙($C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$)溶于 100 mL 水中。

10.3.3.12 锌标准贮备溶液：100.0 μg/mL

称取 0.100 0 g 金属锌(99.99%)于 50 mL 烧杯中,用 10 mL 3 mol/L 硫酸溶液(10.3.3.14)溶解,全量移入 1 000 mL 量瓶中,加水至标线,混匀。

10.3.3.13 锌标准使用溶液:1.00 μg/mL

移取 1.00 mL 锌标准贮备溶液(10.3.3.12)于 100 mL 量瓶中,加水至标线,混匀。使用时配制。

10.3.3.14 硫酸溶液:$c(H_2SO_4)=3$ mol/L

1 体积硫酸〔$(H_2SO_4)\rho=1.84$ g/mL〕在搅拌下徐徐地加到 5 体积水中,混匀。

10.3.4 仪器及设备

——分光光度计;

——高压罐;

——锥形分液漏斗:60,125,500 mL;

——实验室常备仪器及设备。

10.3.5 分析步骤

10.3.5.1 样品消化

准确称取 0.1 g(±0.001 g)生物干样于高压罐中,用少量水润湿,加 5 mL 硝酸(10.3.3.1)和 2 mL H_2O_2(10.3.3.3),将高压罐盖拧紧,置于恒温干燥箱中,缓慢升温至 100℃,恒温 30 min。再继续升温至 150℃消化 2 h,取出冷却,打开盖,置于 150℃电热板上加热蒸至近干。取下稍冷后,加入 20 mL 水浸取,将浸取液全量转入 100 mL 量瓶中,加水至标线,混匀。制得样品消化液,同时制备分析空白试液。

10.3.5.2 绘制标准曲线

10.3.5.2.1 取 6 支 60 mL 锥形分液漏斗,分别量入 0,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00 mL 锌标准使用溶液(10.3.3.13)及 2 mL 盐酸羟胺溶液(10.3.3.6),加水至 20 mL,混匀。

10.3.5.2.2 加 1 滴甲基橙指示剂(10.3.3.11),用氨水(10.3.3.4)调节溶液刚变成黄色,加 5 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(10.3.3.5),混匀。加 1 mL 硫代硫酸钠溶液(10.3.3.7),混匀。

10.3.5.2.3 加 10.0 mL 双硫腙使用溶液(10.3.3.10),振摇 2 min,静置分层。

10.3.5.2.4 用滤纸吸干分液漏斗管颈内壁的水分,再塞入滤纸卷,将有机相放入 1 cm 测定池中(弃去数滴初滤液),以四氯化碳调零,于 538 nm 波长处测其吸光值 A_i 及标准空白吸光值 A_0。

10.3.5.2.5 将测得数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中,以吸光值 A_i-A_0)为纵坐标,相应的锌的量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

10.3.5.3 样品测定

移取 10.0 mL 样品消化液于 60 mL 锥形分液漏斗中,加 2 mL 盐酸羟胺溶液(10.3.3.6),加水至 20 mL,混匀。其余按 10.3.5.2.2～10.3.5.2.4 步骤测定样品制备液分样的吸光值 A_0。

同时,按上述步骤测定分析空白消化液分样的吸光值 A_b。以(A_i-A_b)的值从标准曲线上查出相应的锌的量。

10.3.6 记录与计算

将测得数据记入表 A1 中,并按式(21)计算样品中锌的含量:

$$W_{Zn}=\frac{mV_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(21)$$

式中:W_{Zn}——生物体干样中锌含量质量比,10^{-6};

m——从标准曲线上查得的锌的量,μg;

V_0——样品消化液的体积,mL;

V_1——用于测定的样品制备液的体积,mL;

M——样品的称取量,g。

10.3.7 精密度和准确度

三个实验室测定锌含量(质量比)为(172±8)×10^{-6}的猪肝成分分析标准物质(GB W085 51),测定

结果的再现性相对标准偏差为3.5%，相对误差平均为7.0%。

10.3.8 注意事项

10.3.8.1 四氯化碳有毒，操作时应在通风橱内进行。

10.3.8.2 玻璃器皿和塑料器皿使用前，均须用(1+3)硝酸浸泡24 h以上，最后用去离子水洗净。

10.3.8.3 螯合物萃取液应在萃取后1 h内完成吸光值测量。萃取液和双硫腙使用时应避免阳光直接照射。

10.3.8.4 甲基橙指示剂易被四氯化碳提取，影响吸光值，故其用量应保持一致。

10.3.8.5 吸水滤纸应用(1+4)硝酸溶液浸泡过夜，洗净烘干。

11 铬

11.1 二苯碳酰二肼分光光度法

11.1.1 适用范围和应用领域

本法适用于生物体中铬的测定。

检出限：0.4×10^{-6}。

三价铁离子对本方法有干扰，可用磷酸或焦磷酸钠消除。

11.1.2 方法原理

生物干样经硝酸-硫酸-高氯酸消化后，在一定酸度下，用高锰酸钾将铬(Ⅲ)氧化为铬(Ⅵ)，六价铬离子与二苯碳酰二肼生成紫红色络合物，于540 nm波长处进行分光光度法测定。

11.1.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂为分析纯，水为二次蒸馏水或等效纯水。

11.1.3.1 硫酸(H_2SO_4)：ρ=1.84 g/mL，优级纯。

11.1.3.2 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，优级纯。

11.1.3.3 高氯酸($HClO_4$)：ρ=1.67 g/mL，优级纯。

11.1.3.4 磷酸溶液：1+1

将磷酸(ρ=1.69 g/mL)与等体积水混合。

11.1.3.5 硫酸溶液：1+1

将1体积硫酸(11.1.3.1)慢慢加入等体积水中，混匀。

11.1.3.6 硫酸溶液 1+8

将1体积硫酸(11.1.3.1)慢慢加入8体积水中，混匀。

11.1.3.7 氢氧化铵(NH_4OH)：ρ=0.9 g/mL。

11.1.3.8 高锰酸钾溶液：5 g/L

称取0.5 g高锰酸钾($KMnO_4$)，溶于100 mL沸水中，冷却后，贮存于棕色瓶中。

11.1.3.9 亚硝酸钠溶液：100 g/L

称取10 g亚硝酸钠($NaNO_2$)，溶于水并稀释至100 mL。

11.1.3.10 尿素溶液：200 g/L

称取20 g尿素(CH_4N_2O)，溶于水并稀释至100 mL，盛于棕色瓶。放置时间不宜太长。

11.1.3.11 二苯碳酰二肼丙酮溶液：2.5 g/L

称取0.25 g二苯碳酰二肼($C_{13}H_{14}N_4O$)用少量丙酮(C_3H_6O)溶解，然后用丙酮溶液(11.1.3.15)稀释至100 mL，盛于棕色瓶中，置冰箱中保存。

11.1.3.12 酚酞指示剂：1 g/L

称取0.1 g酚酞，溶于100 mL乙醇中。

11.1.3.13 铬标准贮备溶液：100 μg/mL

称取0.282 9 g重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$，优级纯，预先于105～110℃烘干2 h)，溶于水中，全量转入

1 000 mL量瓶中，加水至标线，混匀。

11.1.3.14 铬标准使用溶液：5.00 μg/mL

量取 5.00 mL 铬标准贮备溶液(11.1.3.13)于 100 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

11.1.3.15 丙酮溶液：1+1

将丙酮与等体积水混合。

11.1.4 仪器及设备

——分光光度计；

——电热板；

——实验室常备仪器及设备。

11.1.5 分析步骤

11.1.5.1 样品的消化

11.1.5.1.1 准确称取 2 g(±0.001 g)干样于 150 mL 锥形瓶中，加 10 mL 硝酸(11.1.3.2)，再慢慢地加入 4 mL 硫酸(11.1.3.1)，摇匀，放置过夜。

11.1.5.1.2 加 2 mL 高氯酸(11.1.3.3)，瓶口放一小玻璃漏斗，置于电热板上，(勿超过 180℃)加热消化至白烟冒尽，溶液呈透明无色(或淡黄色)。在加热过程中，若出现样品碳化，颜色变深，需取下稍冷，补加 1～2 mL 硝酸(11.1.3.2)，再继续加热消化。

11.1.5.1.3 加约 10 mL 水稀释，用中速定量滤纸滤去残渣，并用热水洗涤残渣，滤液和洗涤液收集于 50 mL 量瓶中，用水稀释至标线，混匀。制得样品消化液。

同时，制备分析空白试液。

11.1.5.2 绘制工作曲线

11.1.5.2.1 取 6 个 150 mL 锥形瓶，加 5 mL 水，分别加入 0，0.50，1.00，2.00，3.00，4.00 mL 铬标准使用溶液(11.1.3.14)。

11.1.5.2.2 加入 10 mL 硝酸(11.1.3.2)并慢慢加入 4 mL 硫酸(11.1.3.1)和 2 mL 高氯酸(11.1.3.3)，放入数粒玻璃珠，瓶口放一小玻璃漏斗，置于电热板上(勿超过 180℃)加热至白烟冒尽。

11.1.5.2.3 冷却后，全量转入 50 mL 量瓶中，用水稀释至标线，混匀。

11.1.5.2.4 量取 10 mL 上述消化液于 50 mL 高型烧杯中，加数滴酚酞指示剂(11.1.3.12)，用氢氧化铵(11.1.3.7)中和至溶液呈淡粉红色，加数粒玻璃珠，加热微沸至无氨味(或放广泛 pH 试纸于瓶口，不变色)为止。

11.1.5.2.5 稍冷后，加入 0.5 mL 硫酸溶液(11.1.3.5)，0.5 mL 高锰酸钾溶液(11.1.3.8)，在电热板沙浴上(100℃左右)加热氧化 15 min。加热过程中，若紫红色消失，应补加高锰酸钾溶液使保持红色。

11.1.5.2.6 冷却后，加 5 mL 尿素溶液(11.1.3.10)摇匀，然后边摇边滴加亚硝酸钠溶液(11.1.3.9)至紫红色刚刚消失。加 2 mL 磷酸溶液(11.1.3.4)，混匀。

11.1.5.2.7 将溶液全量转入 25 mL 量瓶(或具塞比色管)中，加 1 mL 二苯碳酰二肼丙酮溶液(11.1.3.11)立即加水至标线并混匀。10 min 后，用 3 cm 测定池，以水为参比，于 540 nm 波长测定标准系列吸光值 A_i 及标准空白的吸光值 A_0。

11.1.5.2.8 将测定数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中。以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标，相应的铬的含量(μg)为横坐标绘制工作曲线。

11.1.5.3 样品测定

量取 10 mL 样品消化液于 50 mL 高型烧杯中，以下按绘制工作曲线 11.1.5.2.4～11.1.5.2.7 步骤测定样品制备液的吸光值(A_s)及分析空白吸光值(A_b)，以(A_s-A_b)的值从工作曲线上查出相应的铬含量。

11.1.6 记录与计算

将测定数据记入表 A1 中，按式(22)计算生物样品的铬含量：

$$W_{Cr}=\frac{mV_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(22)$$

式中：W_{Cr}——生物体干样的总铬的含量，质量比，$\times10^{-6}$；

m——从工作曲线上查得的铬的量，μg；

V_0——样品消化液的体积，mL；

V_1——测定时量取样品消化液的体积，mL；

M——样品重量，g。

11.1.7 精密度

平行测定二组生物样品，总铬含量(质量比)分别为 0.85×10^{-6}和 2.88×10^{-6}，相对标准偏差分别为 7.1%和 6.1%。

4 个实验室用本方法分析同一生物互校样品(牡蛎)测定结果，再现性相对标准偏差为 18%。

11.1.8 注意事项

11.1.8.1 实验所用玻璃器皿用稀王水洗涤，不得用重铬酸钾洗液，以免沾污。

11.1.8.2 过量高锰酸钾也可用叠氮化钠还原。滴加还原剂时，应充分摇匀，细心控制用量，防止六价铬被还原。

11.1.8.3 络合物颜色稳定性随温度升高而下降，一般应在 2 h 内测定完毕；当室温高于 30℃时，必须在半小时内测定完毕。

11.1.8.4 二苯碳酰二肼丙酮溶液若变黄或浑浊时，应重配。

11.2 无火焰原子吸收分光光度法

11.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物中铬的测定。

检出限(W)：0.04×10^{-6}。

11.2.2 方法原理

生物干样经硝酸-过氧化氢消化后，在 357.9 nm 波长处，直接进行铬的石墨炉原子吸收分光光度测定。

11.2.3 试剂及其配制

除非另作说明，所有试剂为分析纯，水为二次去离子水或等效纯水。

11.2.3.1 硝酸(HNO_3)：$\rho=1.42$ g/mL，优级纯，用石英亚沸蒸馏器蒸馏提纯或等效超纯。

11.2.3.2 过氧化氢(H_2O_2)：30%。

11.2.3.3 抗坏血酸($C_6H_8O_6$)溶液：100 g/L。

11.2.3.4 铬标准贮备溶液：100.0 μg/mL

见 11.1.3.13 条。

11.2.3.5 铬标准使用溶液：1.00 μg/mL

量取 1.00 mL 铬标准贮备溶液(11.2.3.4)于 100 mL 量瓶中，加(1+99)硝酸溶液〔1 体积硝酸(11.2.3.1)与 99 体积水混合〕至标线，混匀。

11.2.4 仪器及设备

——石墨炉原子吸收分光光度计，配有自动进样装置；

——氩气钢瓶；

——铬空心阴极灯；

——洁净工作台(洁净 100 级)；

——实验室常备仪器及设备。

11.2.5 分析步骤

11.2.5.1 样品的消化

11.2.5.1.1 准确称取 0.2 g(±0.001 g)干样于 50 mL 烧杯中,用几滴水湿润样品,加入 2 mL 硝酸(11.2.3.1),盖上表面皿,置于电热板,低温加热至泡沫基本消失。

11.2.5.1.2 取下烧杯冷却,慢慢地加入 0.5 mL 过氧化氢(11.2.3.2),盖上表面皿,在电热板上于 160～200℃加热约 20 min,补加 1.5 mL 过氧化氢(11.2.3.2),继续加热并蒸发至约 1 mL。

11.2.5.1.3 加 1 mL 硝酸(11.2.3.1),1.5 mL 过氧化氢(11.2.3.2),盖上表面皿,加热(160～200℃)并蒸发至约 0.5 mL,全量转入 10 mL 具塞比色管中,加 1 mL 抗坏血酸溶液(11.2.3.3),加水至标线,混匀。制成样品消化液。

同时,制备分析空白消化液。

11.2.5.2 绘制标准曲线

11.2.5.2.1 移取 0,0.50,1.00,1.50,2.00,2.50 mL 铬标准使用液(11.2.3.5)于 10 mL 具塞比色管中,加 1 mL 抗坏血酸溶液(11.2.3.3),加水至标线,混匀。量取 10 μL 溶液加入石墨管中,按选定的仪器技术参数测定标准系列溶液的吸光值(A_i)及标准空白吸光值(A_0)。

11.2.5.2.2 将测得数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A5 中,以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标,相应的铬的浓度(0,0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。

11.2.5.3 样品的测定

量取 20 μL 样品消化液加入石墨管中,按选定的仪器技术参数测定样品制备液的吸光值(A_s)。

按上述步骤测定分析空白制备液的吸光值(A_b)。以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应的铬的浓度。

11.2.6 记录与计算

将测定结果记录于表 A1 中,按式(23)计算生物样品铬含量:

$$W_{Cr}=\frac{\rho_{Cr}V}{M} \qquad \cdots\cdots(23)$$

式中:W_{Cr}——生物体干样品中铬的含量质量比,10^{-6};

ρ_{Cr}——从标准曲线上查出的铬的浓度,μg/mL;

V——样品消化液的体积,mL;

M——样品重量,g。

11.2.7 精密度

六个实验室测定同一生物样(牡蛎),测定结果,再现性相对标准偏差为 10%。

11.2.8 注意事项

11.2.8.1 本法中所用的器皿均先用(1+1)硝酸浸泡 1 d 以上,使用前用二次去离子水淋洗干净。

11.2.8.2 样品消化时须始终盖上表面皿。

11.2.8.3 若样品制备液铬的浓度超过标准曲线范围时,应作适当稀释并补加适量抗坏血酸(11.2.3.3),使其试液中铬的浓度在标准曲线浓度范围内。此时,分析空白制备液也应作相应处理。结果计算中应乘以稀释因数。

11.2.8.4 不同型号的石墨炉原子吸收分光光度计,自行选定仪器最佳技术参数,表 15 为 PE-703 型原子吸收分光光度计,HGA-500 型石墨炉的仪器技术参数。供参考。

表 15 PE-703 型原子吸收分光光度技术参数

元素	波长 nm	通带宽 nm	灯电流 mA	干燥		灰化		原子化		清洁		原子化时内气流流量 mL/min
				温度 ℃	时间 s	温度 ℃	时间 s	温度 ℃	时间 s	温度 ℃	时间 s	
Cr	357.9	0.7	18	110	10/15	1 150	10/15	2 650	1/5	2 700	1/3	10

12 砷

12.1 砷钼酸-结晶紫分光光度法

12.1.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中砷的测定。

检出限(W):2×10^{-6}。

12.1.2 方法原理

生物样品经硝酸-高氯酸-硫酸消化,在酸性介质中,用碘化钾、氯化亚锡和金属锌将砷还原为砷化氢,并被高锰酸钾-硝酸银溶液吸收。砷与钼杂多酸-结晶紫形成络合物,于波长 545 nm 处进行分光光度测定。

12.1.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂均为分析纯,水为二次去离子或等效纯水。

12.1.3.1 无砷锌粒:10～20 目。

12.1.3.2 硝酸(HNO_3):ρ=1.42 g/mL,优级纯。

12.1.3.3 高氯酸($HClO_4$):ρ=1.67 g/mL,优级纯。

12.1.3.4 硫酸(H_2SO_4):ρ=1.84 g/mL,优级纯。

12.1.3.5 硫酸溶液:1+1

在搅拌下,将 1 体积硫酸(12.1.3.4)缓缓地加到 1 体积水中,混匀。

12.1.3.6 硫酸溶液:1+17

在搅拌下,将 1 份硫酸(12.1.3.4)缓慢地加到 17 分水中,混匀。

12.1.3.7 氢氧化钠溶液:200 g/L

10 g 氢氧化钠(NaOH)溶于水中,加水至 50 mL,混匀。贮于聚乙烯瓶中。

12.1.3.8 过氧化氢溶液:1+99

量取 1 mL 过氧化氢(H_2O_2,30%)与 99 mL 水混合(当日配制)。

12.1.3.9 氯化亚锡溶液:400 g/L

称取 40 g 氯化亚锡($SnCl_2\cdot2H_2O$)溶于 50 mL 盐酸(HCl,ρ=1.19 g/mL,优级纯)中,加水至 100 mL,混匀。

12.1.3.10 碘化钾溶液:150 g/L

称取 15 g 碘化钾(KI,优级纯)溶于水中,加水至 100 mL,混匀。临用时配制。

12.1.3.11 硝酸银溶液:5 g/L

称取 0.5 g 硝酸银($AgNO_3$)溶于 100 mL 水中,加数滴硝酸(12.1.3.2)酸化,混匀。盛于棕色试剂瓶中。

12.1.3.12 钼酸铵溶液:4.0 g/L

称取 0.4 g 钼酸铵[$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot4H_2O$]于 100 mL 水中,加热溶解,冷却后盛于试剂瓶中。

12.1.3.13 聚乙烯醇溶液:5 g/L

称取 0.5 g 聚乙烯醇[$(C_2H_4O)_{124}$,PV-124]于 200 mL 烧杯中,加 100 mL 沸水,搅拌溶解至清亮,临用时配制。

12.1.3.14 结晶紫溶液:0.5 g/L

称取 50 mg 结晶紫($C_{25}H_{30}CN_3\cdot9H_2O$)于 250 mL 烧杯中,加入 100 mL 水,搅拌溶解,用脱脂棉过滤后使用。

12.1.3.15 砷标准贮备溶液:500.0 μg/mL

称取 0.330 1 g 三氧化二砷(As_2O_3)优级纯,预先在 105℃烘干 2 h,置于硅胶干燥器中保存)于 50 mL烧杯中,用 10 mL 氢氧化钠溶液(12.1.3.7)溶解后,以硫酸溶液(12.1.3.5)酸化至弱酸性,全量

移入 500 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

12.1.3.16 砷标准中间溶液：10.0 μg/mL

量取 1.00 mL 砷标准贮备溶液(12.1.3.15)于 50 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

12.1.3.17 砷标准使用溶液：1.00 μg/mL

量取 10.0 mL 砷标准中间溶液(12.1.3.16)于 100 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

12.1.3.18 乙酸铅棉花：

称取 10 g 乙酸铅〔$(CH_3COO)_2Pb \cdot 3H_2O$〕，加几滴乙酸，用水溶解后，加水至 100 mL，混匀。将脱脂棉浸于此溶液中，1 h 后取出，自然晾干(也可在低于 60℃处烘干)。贮于广口试剂瓶中。

12.1.3.19 高锰酸钾溶液：30 g/L

称取 3 g 高锰酸钾($KMnO_4$，优级纯)溶于 100 mL 水中，混匀。

12.1.4 仪器及设备

——分光光度计；

——砷化氢发生-吸收装置(见 GB 17378.5—1998 图 4)；

——实验室常备仪器及设备。

12.1.5 分析步骤

12.1.5.1 样品消化

12.1.5.1.1 称取 0.2～1 g(±0.001 g)生物干样放入砷化氢发生瓶中，用几滴水润湿，加入 10 mL 硝酸(12.1.3.2)。

12.1.5.1.2 将发生瓶置于电热板上，于 140℃左右加热至反应平缓后，然后逐渐升温，在 160～180℃下加热，并蒸发剩约 1 mL，取下冷却。

12.1.5.1.3 加入 3 mL 硝酸(12.1.3.2)，1 mL 高氯酸(12.1.3.3)和 2 mL 硫酸(12.1.3.4)，置于电热板上，加热蒸至冒大量白烟，取下冷却。用水冲洗瓶壁，继续加热并蒸发至冒大量白烟，此时消化液应透明清亮，取下冷却。加入 30 mL 水，加热溶解，冷却，制得样品消化液。同时制备分析空白试液。

12.1.5.2 绘制标准曲线

12.1.5.2.1 分别量取 0，1.00，2.00，3.00，4.00，5.00 mL 砷标准使用溶液(12.1.3.17)于砷化氢发生瓶中，加水至 50 mL。

12.1.5.2.2 加入 5 mL 硫酸溶液(12.1.3.5)，5 mL 碘化钾溶液(12.1.3.10)和 3 mL 氯化亚锡溶液(12.1.3.9)，混匀，放置 15 min。

12.1.5.2.3 加入 2 mL 硝酸银溶液(12.1.3.11)，3.75 mL 硫酸溶液(12.1.3.6)，0.2 mL 高锰酸钾溶液(12.1.3.19)于吸收管中，将一端塞有乙酸铅棉花(12.1.3.18)的导气管插入吸收管中。加 3 g 无砷锌粒(12.1.3.1)于砷化氢发生瓶中，立即按图 6 联接好砷化氢-吸收装置，吸收 40 min。

12.1.5.2.4 取出吸收管，将吸收液全量转入 25 mL 具塞比色管中，滴加过氧化氢溶液(12.1.3.8)使红色恰好消褪，加入 4 mL 钼酸铵溶液(12.1.3.12)，混匀，放置 15 min，加入 4 mL 聚乙烯醇溶液(12.1.3.13)，混匀，加入 4 mL 结晶紫溶液(12.1.3.14)，立即混匀，加水至 25 mL，混匀，放置 30～40 min。于 545 nm 波长处，用 1 cm 测定池，以标准空白调零测定吸光值(A)。将测得数据记入 GB 17378.4—1998附录表 A1 中。

12.1.5.2.5 在厘米方格纸上，以吸光值 A_i 为纵坐标，相应的砷的量(μg)为横坐标绘制标准曲线。

12.1.5.3 样品的测定

按绘制标准曲线 12.1.5.2.2～12.1.5.2.4 步骤测定样品消化液的吸光值(A_s)和分析空白试液的吸光值(A_b)。以(A_s-A_b)的值从标准曲线上查出相应的砷的量。

12.1.6 记录与计算

将测得数据记入表 A1 中，按式(24)计算生物体中砷含量：

$$W_{As}=\frac{m}{M} \qquad \cdots\cdots(24)$$

式中：W_{As}——生物体干样中砷的含量，质量比，10^{-6}；

m——从标准曲线上查得的砷的量，μg；

M——样品的称取量，g。

12.1.7 精密度

五个实验室用本方法测定同一生物样品（牡蛎），测定结果，再现性相对标准偏差为14.4%。

12.1.8 注意事项

12.1.8.1 玻璃器皿须用(1+3)硝酸浸泡过夜，再用二次去离子水洗净。

12.1.8.2 加入结晶紫溶液后必须立即混匀，否则结果的重现性不佳。结晶紫的纯度需预先检验，试剂空白的吸光值（以水作参比）一般应小于0.2为宜。

12.1.8.3 加入的试剂量应该一致，以得到良好的精密度。

12.1.8.4 对砷含量较低的生物样品，可适当增加称样量，并适当增加消化的酸用量。

12.1.8.5 玻璃导气管球部装填的乙酸铅棉花要松散均匀，使气体遇到的阻力基本一致。

12.1.8.6 砷化氢发生装置要十分严密，防止漏气。吸收液的液柱高度要求在8 cm以上。

12.2 氢化物原子吸收分光光度法

12.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物中砷的测定。

检出限(W)：0.4×10^{-6}。

12.2.2 方法原理

样品经硝酸-硫酸消化。在酸性介质中，用抗坏血酸将砷(Ⅴ)还原成砷(Ⅲ)，用硼氢化钾将砷(Ⅲ)转化成砷化氢，由载气将砷化氢导入原子化器，于193.7 nm波长处进行原子吸收分光光度测定。

12.2.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯，水为二次去离子水或等效纯水。

12.2.3.1 硝酸(HNO_3)：ρ=1.42 g/mL，优级纯。

12.2.3.2 硫酸(H_2SO_4)：ρ=1.84 g/mL，工艺超纯。

12.2.3.3 硫酸溶液：1+19

将1份硫酸(12.2.3.2)缓慢地加入19份水中，混匀。

12.2.3.4 盐酸(HCl)：ρ=1.19 g/mL。

12.2.3.5 盐酸溶液：1+11

将900 mL水和100 mL盐酸(12.2.3.4)加入2 000 mL广口聚乙烯瓶中，用刻度吸管将100 mL硼氢化钾溶液(12.2.3.7)由瓶底滴入瓶内，用氮气流(1.5 L/min)鼓泡3 min驱除砷化氢。重复加硼氢化钾溶液(12.2.3.7)再鼓泡1次。临用前，加3 g抗坏血酸(12.2.3.8)和5 g硫脲(12.2.3.9)。

12.2.3.6 氢氧化钠溶液：10 g/L，优级纯

10 g氢氧化钠(NaOH)溶于1 L水中，存于聚乙烯瓶中。

12.2.3.7 硼氢化钾溶液：15 g/L

称取15 g硼氢化钾(KBH_4)溶于100 mL氢氧化钠溶液(12.2.3.6)中，加水至1 L，经双层滤纸过滤混匀，冰箱内保存，一周有效（使用时，液温需与室温一致。）

12.2.3.8 抗坏血酸($H_6H_8O_6$)

12.2.3.9 硫脲(N_2H_4CS)优级纯。

12.2.3.10 混合还原剂：称取5 g硫脲(12.2.3.9)和3 g抗坏血酸(12.2.3.8)，溶于100 mL水中。

12.2.3.11 砷标准贮备溶液：0.500 mg/mL

见12.1.3.15条。

12.2.3.12 砷标准中间溶液：10.0 μg/mL

见 12.1.3.6 条。

12.2.3.13 砷标准使用溶液：0.100 μg/mL

移取 1.00 mL 砷标准中间溶液(12.2.3.12)于 100 mL 量瓶中，加水到标线，混匀。

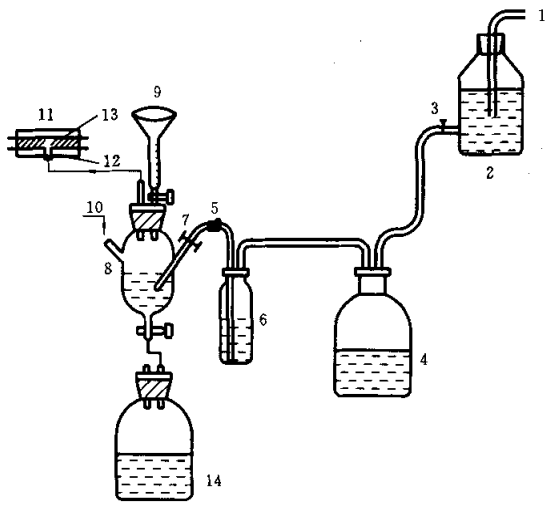
12.2.4 仪器及设备

——原子吸收分光光度计，配有氢化物原子化装置；

——氢化物发生装置(图 6)；

——砷空心阴极灯；

——高压罐：容积 30 mL。



1—马里奥特管；2—水槽；3—阀门；4—接水瓶；5—流速控制管；6—KBH_4 瓶；7—弹簧夹；8—反应瓶；9—进液漏斗；10—N_2 或 A_2 进口；11—吸收池；12—耐火砖；13—电炉丝；14—废液瓶

图 6 氢化物发生装置

12.2.5 分析步骤

12.2.5.1 样品的消化

12.2.5.1.1 准确称取 0.3 g(±0.001 g)生物干样，于高压罐中，加入 4 mL 硝酸(12.2.3.1)，放置 4 h，再加入 1 mL 硫酸(12.2.3.2)，拧紧高压罐盖。于 130℃恒温干燥箱中加热 1 h，再在 180℃下加热 2 h，取出冷却。

12.2.5.1.2 将高压罐的聚四氟乙烯容器置于 180～200℃电热板上加热蒸发，至消化液体积约为 1 mL，取下冷却。

12.2.5.1.3 将消化液全量转入 25 mL 量瓶中，加去砷盐酸溶液(12.2.3.5)至标线，混匀，此为样品消化液 D。

12.2.5.1.4 量取样品消化液 D5～10 mL(视砷含量高低可适当增减于 100 mL 量瓶中，加 10 mL 混合还原剂(12.2.3.10)，加去砷盐酸(12.2.3.5)至标线，混匀。放置 15 min 后待测。此为样品分析试液 D_1。

12.2.5.1.5 按同样步骤制备样品分析空白试液。

12.2.5.2 冲洗管路

12.2.5.2.1 接通仪器电源，将原子化器预热半小时。

12.2.5.2.2 调好载气流速。

12.2.5.2.3 加 10 mL 去砷盐酸溶液(12.2.3.5)于反应瓶中。

12.2.5.2.4 接通记录仪，松开弹簧夹，以 24 mL/min 流速滴加硼氢化钾溶液(12.2.3.7)，当吸收峰顶刚过，夹紧弹簧夹，关闭记录仪，放掉废液。按 12.2.5.2.3～12.2.5.2.4 两步反复操作，直至空白值稳定(以稳定后的空白值为标准空白吸收峰值 A_0)。

12.2.5.3 绘制标准曲线

12.2.5.3.1 依次量取 0.000，0.100，0.200，0.300，0.400，0.500 mL 砷标准使用溶液(12.2.3.13)于反应瓶中，加入 10 mL 盐酸溶液(12.2.3.5)。

12.2.5.3.2 按 12.2.5.2～12.2.5.4 步骤测定吸收峰值(A_i)，将此值连同空白值(A_0)记入 GB 17378.4—1998附录表 A5 中。

12.2.5.3.3 以吸光值(A_i-A_0)为纵坐标，相应的砷量(μg)为横坐标，绘制标准曲线。

12.2.5.4 样品测定

量取 10.0 mL 样品分析试液于反应瓶中，其余按绘制标准曲线 12.2.5.2 步骤测定样品分析试液的吸光值(A_s)及分析空白吸光值(A_b)，以(A_s-A_b)值从标准曲线上查出相应的砷量(μg)。

12.2.6 记录与计算

将测定数据记入表 A1 中，按式(25)计算生物样品中砷含量：

$$W_{As}=\frac{mV_0V_1}{V_2V_3M} \qquad \cdots\cdots(25)$$

式中：W_{As}——生物体干样中砷的含量，质量比，10^{-6}；

m——从标准曲线上查的砷的量，μg；

V_0——样品消化液“D”的体积，mL；

V_1——样品分析试液制备体积，mL；

V_2——配制样品分析试液“D”时，量取样品消化液“D”的体积，mL；

V_3——测定时，量取样品分析试液“D_1”的体积，mL；

M——样品的称取量，g。

12.2.7 精密度和准确度

六个实验室测定砷含量(质量比)为$(0.044\pm0.008)\times10^{-6}$的同一猪肝成份分析标准物质(GB W085 51)其结果，再现性相对标准偏差为 8.8%，相对误差平均为 5.7%。

12.2.8 注意事项

12.2.8.1 称样较多时，可适当增加硝酸用量。

12.2.8.2 原子化器加热温度对测定结果影响较大，因此

12.2.8.2.1 仪器须预热，温度达平衡后再正式工作。

12.2.8.2.2 加热电压要稳定。

12.2.8.2.3 每份样品分析间隔时间要尽量一致。

12.2.8.2.4 工作进行中，重做一条标准曲线与前曲线相比较，检查灵敏度是否一致。

12.2.8.3 硼氢化钾流速、浓度及反应液的温度，载气流速对结果都有影响，须保持条件一致。

12.2.8.4 增加样品称取量或减少消化溶液的定容体积，可提高测定灵敏度，降低检出限。

12.2.8.5 所用器皿均需用 1+6 硝酸溶液浸泡 2 d 以上，并用纯水冲洗 5 次，方可使用。

12.2.8.6 仪器技术参数(供参考)：

a) 灯电流 3～5 mA；

b) 波长 193.7 nm；

c) 光通带 1.0 nm；

d) 载气流速 600 mL/min；

e) 加热电压 145 V(800 VA 炉丝)。

12.3 催化极谱法

12.3.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中砷的测定。

检出限(W):2×10^{-6}。

12.3.2 方法原理

样品经硝酸-高氯酸分解,在硫酸介质中,用过氧化氢将砷(Ⅴ)还原成砷(Ⅲ),用硫酸钡共沉淀铅排除干扰。砷(Ⅲ)在碲-硫酸-碘化铵介质中能得到灵敏的催化波,其催化电流随砷浓度的增加而增加,以此进行砷的定量测定。

12.3.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂为分析纯,水为二次去离子水或等效纯水。

12.3.3.1 硝酸(HNO_3):$\rho=1.42$ g/mL。

12.3.3.2 高氯酸($HClO_4$):$\rho=1.67$ g/mL,优级纯,在不断搅拌下慢慢地加入1体积水中。

12.3.3.3 硫酸溶液:1+1,将1体积硫酸(H_2SO_4,$\rho=1.84$ g/mL,优级纯)慢慢加入1体积水中,混匀。

12.3.3.4 过氧化氢(H_2O_2):30%。

12.3.3.5 碲溶液:50 μg/mL

称取0.010 g碲粉(纯度99.99%)于50 mL烧杯中,加入1 mL硝酸(12.3.3.1),于电热板上加热溶解,加入5 mL(1+1)硫酸溶液(12.3.3.3),加热至刚冒白烟,取下冷却,转入200 mL量瓶中,加水至标线,混匀。

12.3.3.6 氯化钡溶液:7 mg/mL

称取0.7 g氯化钡($BaCl_2\cdot2H_2O$)溶于水中,加水至100 mL,混匀。

12.3.3.7 碘化铵溶液:$c_{NH_4I}=2.0$ mol/L

称取14.5 g碘化铵(NH_4I)于50 mL量瓶中,加水溶解并稀释至标线,混匀。

12.3.3.8 动物胶溶液:1 g/L

称取0.1 g动物胶溶于100 mL热水中。

12.3.3.9 砷标准溶液

12.3.3.9.1 砷标准贮备溶液:100.0 μg/mL

称取0.132 0 g三氧化二砷(As_2O_3,经105℃烘干2 h)于50 mL聚四氟乙烯烧杯中,加入8 mL氢氧化钠溶液(20 g/L,用优级纯NaOH配制)和2 mL过氧化氢(12.3.3.4),在沸水浴上加热溶解并蒸干。加入3 mL氨水(NH_4OH,$\rho=0.90$ g/mL),蒸干,重复一次。加入3 mL氨水和少量水,温热溶解盐类。加入6 mL硫酸溶液(12.3.3.3),全量转入1 000 mL量瓶中,加水至标线,混匀。

12.3.3.9.2 砷标准中间溶液:10.0 μg/mL

量取10.0 mL砷标准贮备溶液(12.3.3.9.1),放入100 mL量瓶中,加0.25 mL硫酸溶液(12.3.3.3),加水至标线,混匀。

12.3.3.9.3 砷标准使用溶液:0.20 μg/mL

量取2.00 mL砷标准中间溶液(12.3.3.9.2)放入100 mL量瓶中,加入0.25 mL硫酸溶液(12.3.3.3),加水至标线,混匀。

12.3.4 仪器及设备

——极谱仪:具有二次导数性能的示波极谱仪;

——三电极系统:滴汞电极、甘汞电极、铂电极;

——离心机:3 000 r/min,可调速;

——精密微量移液管:100,500,1 000 μL;

——实验室常备仪器和设备。

12.3.5 分析步骤

12.3.5.1 样品的消化

准确称取 0.1 g(±0.001 g)干样于 50 mL 烧杯中,加入 5 mL 硝酸(12.3.3.1)盖上表面皿,于电热板(140℃左右)加热消化至近干,取下稍冷,加 2 mL 硝酸(12.3.3.1)及 2 mL 高氯酸(12.3.3.2),升高温度至 180～200℃,蒸干,用水淋洗表面皿,并移去,加热蒸干。用水仔细地淋洗杯壁,蒸至白烟冒尽。加 0.5 mL 硫酸溶液(12.3.3.3),继续加热至刚冒白烟,取下冷却,加入 2～3 mL 水微热浸取残渣并全量转入 25 mL 具塞比色管中,加 1 mL 氯化钡溶液(12.3.3.6),加水至标线,塞紧塞子,剧烈振荡 2 min,放置澄清,制得样品消化液。

同时按上述操作步骤制备分析空白试液。

12.3.5.2 绘制工作曲线

12.3.5.2.1 取 6 支 10 mL 具塞比色管,各加入 3.0 mL 分析空白制备液,分别加入 0,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00 mL 砷标准使用溶液(12.3.3.9.3)。

12.3.5.2.2 加 1.5 mL 硫酸溶液(12.3.3.3),0.40 mL 碲溶液(12.3.3.5),加水至标线,混匀。加 1.0 mL碘化铵溶液(12.3.3.7)和 0.1 mL 动物胶溶液(12.3.3.8),混匀,放置半小时。

12.3.5.2.3 于起始电压－0.44 V 处,用二次导数极谱记录砷催化波的峰电流值 I_{P_i} 及标准空白峰电流值(I_{P_0})(波高×电流倍率)。

12.3.5.2.4 将测得数据记入 GB 17378.4—1998 的附录表 A8 中,以峰电流值 $I_{P_i}-I_{P_0}$ 为纵坐标,相应砷的量(μg)为横坐标,在厘米方格纸上绘制工作曲线。

12.3.5.3 样品的测定

量取 3.0 mL 样品消化液的上层清液于 10 mL 具塞比色管中,其余按 12.3.5.2.2～12.3.5.2.3 步骤测定样品制备液的峰电流值 I_{P_a} 和分析空白试液的峰电流值 I_{P_b},以 $I_{P_a}-I_{P_b}$ 的值从工作曲线上查出相应的砷的量及分析空白试液的峰电流值 I_{P_b}。

12.3.6 记录与计算

将测得数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A9 中,按式(26)计算生物体中砷含量。

$$W_{As}=\frac{mV_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(26)$$

式中:W_{As}——生物体干样中砷的含量,质量比,10^{-6};

m——从工作曲线上查得的砷的量,μg;

V_0——样品消化液的体积,mL;

V_1——用于测定的样品消化的体积,mL;

M——样品的称取量,g。

12.3.7 精密度

六个实验室用本方法分析同一互校生物样品(牡蛎),测定结果,再现性相对标准偏差 4.9%。

12.3.8 注意事项

12.3.8.1 消化样品时,务必使有机物彻底除尽,消化结束后,残渣不呈灰褐色,即表明有机物已被破坏殆尽。

12.3.8.2 硝酸及高氯酸要除尽,否则加入过氧化氢后不能将砷(Ⅴ)还原成砷(Ⅲ)。样品消化时,用水淋洗杯壁,然后蒸干,再加入硫酸蒸至刚冒白烟,目的在于驱尽硝酸和高氯酸。

12.3.8.3 测定时溶液中铁量如超过 1 mg 时,峰电流值会下降。本方法对含有 12 mg 砷的试液,当其铁含量高达 8.3%时,仍不影响测定。

12.3.8.4 配制好的极谱底液必须放置半小时后测定,否则极谱不稳定,无法测得准确的峰电流值。

12.3.8.5 起始电压必须固定,因为峰电流值随起始电压改变而改变。

12.3.8.6 测试时,室温必须高于 14℃,低于此温度时,波形不好,甚至得不到极谱波,温度最好控制在 20～28℃之间。温度过高时,易析出 I_2,因此,极谱室应有空调设备。

12.3.8.7 若样品中砷的质量比含量低于 5×10^{-6} 时,可在测定液中加入 0.100 μg 砷,测定后,再扣去

其添加的 0.100 μg 砷。这是因为标准曲线在砷浓度低于 5 ng/mL 时，曲线向下弯曲。

13 硒

13.1 荧光分光光度法

13.1.1 适用范围和应用领域

本法适用于生物样品中硒的测定。

检出限(W)：0.2×10^{-6}。

13.1.2 方法原理

生物样品经硫酸-高氯酸-钼酸钠消解，在酸性介质中，硒(Ⅳ)与 2,3-二氨基萘反应生成有绿色荧光的 4,5-苯并苤硒脑。用环己烷萃取，在激发波长 376 nm，发射波长 520 nm 下，进行荧光分光光度测定。

13.1.3 试剂及其配制

除非另作说明，本法中所用试剂为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

13.1.3.1 盐酸(HCl)：ρ=1.19 g/mL。

13.1.3.2 盐酸溶液：1+99。

13.1.3.3 高氯酸-硫酸-钼酸钠混合溶液

称取 7.5 g 钼酸钠($Na_2MoO_4\cdot7H_2O$)溶于水中，加入 200 mL 高氯酸($HClO_4$，ρ=1.67 g/mL)和 150 mL 硫酸(H_2SO_4，ρ=1.84 g/mL)混匀，贮于 500 mL 试剂瓶中。

13.1.3.4 硫酸-氢溴酸混合溶液

量取 200 mL 硫酸(H_2SO_4，ρ=1.84 g/mL)在搅拌条件下，徐徐加入 200 mL 水中，加 30 mL 氢溴酸(HBr，ρ=1.38 g/mL)，混匀。置砂浴上加热于冒白烟。

13.1.3.5 氨水溶液：1+1。

13.1.3.6 乙二胺四乙酸二钠溶液(EDTA-2Na)：74 g/L

称取 37 g EDTA-2Na($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8\cdot2H_2O$)于 250 mL 烧杯中，加适量水加热溶解，移入 500 mL 量瓶中，冷却后加水至标线，混匀。

13.1.3.7 盐酸羟胺溶液：100 g/L

称取 10 g 盐酸羟胺($NH_2OH\cdot HCl$)于 100 mL 烧杯中，用水溶解后加水至 100 mL，混匀。

13.1.3.8 EDTA-2Na-盐酸羟胺混合溶液：

量取 100 mL EDTA-2Na 溶液(13.1.3.6)和 10 mL 盐酸羟胺溶液(13.1.3.7)于 1 000 mL 量瓶中，加水至标线，混匀。

13.1.3.9 2,3-二氨基萘(DAN)溶液：1.0 g/L

称取 400 mg DAN($C_{10}H_{10}N_2$)于 500 mL 烧杯中，加 400 mL 盐酸溶液(13.1.3.2)溶解，转入 1 000 mL锥形分液漏斗中(漏斗颈部塞有脱脂棉)，在振荡器上振荡 15 min 使其全部溶解。加入 80 mL 环己烷(13.1.3.10)再振荡 5 min，静置分层后，收集水相，弃去有机相。再用环己烷(13.1.3.10)纯化水相数次。检查最后的有机相的荧光强度，至其荧光值降到接近纯环己烷(13.1.3.10)的荧光强度为止，将纯化后的 DAN 溶液贮于棕色瓶中，加入环己烷(13.1.3.10)使其覆盖液面约 1 cm 厚，置于冰箱中保存。有效期一个月。

13.1.3.10 环己烷(C_6H_{12})：

若含有荧光杂质，用重蒸馏提纯，用过的环己烷蒸馏后可再使用。

13.1.3.11 硒标准贮备液：400.0 μg/mL

称取 0.140 5 g 二氧化硒(SeO_2，纯度 99.99%)于 50 mL 烧杯中，用适量水溶解后，全量转入 250 mL量瓶中，加盐酸溶液(13.1.3.2)至标线，混匀。

13.1.3.12 硒标准中间溶液：4.00 μg/mL

量取 2.50 mL 硒标准贮备溶液(13.1.3.11)于 250 mL 量瓶中，加盐酸(13.1.3.2)至标线，混匀。

13.1.3.13 硒标准使用溶液：0.100 μg/mL

量取 2.50 mL 硒标准中间溶液(13.1.3.12)于 100 mL 量瓶中，加盐酸溶液(13.1.3.2)至标线，混匀。

13.1.3.14 甲酚红指示剂溶液：0.4 g/L

称取 40 mg 甲酚红($C_{21}H_{18}O_5S$)于 100 mL 烧杯中，加少量水及 2 滴氨水溶液(13.1.3.5)溶解，加水至 100 mL，混匀。

13.1.4 仪器及设备

——荧光分光光度计；

——电动振荡机；

——锥形分液漏斗：60，100 mL；

——实验室常备仪器及设备。

13.1.5 分析步骤

13.1.5.1 样品的消化

13.1.5.1.1 准确称取 0.05～0.20 g(±0.001 g)生物干样，放入 250 mL 锥形瓶中，加少量水湿润。

13.1.5.1.2 加入 5 mL 硫酸-高氯酸-钼酸钠混合溶液(13.1.3.3)，混匀。在电炉上低温加热，至冒浓白烟(烟不逸出瓶口)，溶液转为淡绿色。再升高电热温度加热，继续冒白烟 1 min，取下冷却，制得样品制备液。

同时制备分析空白试液。

13.1.5.2 绘制工作曲线

13.1.5.2.1 取 6 个 250 mL 锥形瓶分别加入 0，1.00，2.00，3.00，4.00 和 5.00 mL 硒标准使用溶液(13.1.3.13)加水至约 10 mL，混匀。

13.1.5.2.2 加 5 mL 硫酸-高氯酸-钼酸钠混合酸溶液(13.1.3.3)，混匀。在电炉上低温加热，至冒浓白烟(烟不逸出瓶口)，溶液转入淡绿色。然后升高温度，继续冒白烟 1 min，取下冷却。

13.1.5.2.3 加 10 mL EDTA-2Na-盐酸羟胺混合溶液(13.1.3.8)，加 4～5 滴甲酚红指示剂溶液(13.1.3.14)，用氨水溶液(13.1.3.5)或盐酸溶液(13.1.3.2)调节 pH，使溶液呈粉橙色(pH＝1.5～2.0)，加 3 mL DAN 溶液(13.1.3.9)，摇匀。置沸水浴中加热 5 min，取下冷却至室温。

13.1.5.2.4 将溶液全量转入 60 mL 分液漏斗中，加入 3 mL 环己烷(13.1.3.10)，振摇 2 min，分层后弃去水相。

13.1.5.2.5 将环己烷层从分液漏斗中倒入 1 cm 测定池中，以 376 nm 为激发波长，520 nm 为发射波长，环己烷(13.1.3.10)为参比，测定硒的荧光强度 I_i 及分析空白的荧光强度 I_b。

13.1.5.2.6 将测得荧光强度 I 记入 GB 17378.4—1998 附录表 A11 中，以荧光强度(I_i-I_b)为纵坐标，相应硒的量(μg)为横坐标绘制工作曲线。

13.1.5.3 样品测定

按照绘制工作曲线 13.1.5.2.3～13.1.5.2.5 步骤测定样品消化液和分析空白制备液的荧光强度 I_s 和 I_b。以(I_s-I_b)的值从工作曲线上查出相应的硒的量。

13.1.6 记录和计算

将测得数据记入表 A2 中，按式(27)计算生物样品中硒含量：

$$W_{Se}=\frac{m}{M} \qquad \cdots\cdots(27)$$

式中：W_{Se}——生物体干样中硒的含量质量比，10^{-6}；

m——从工作曲线上查得的硒的量，μg；

M——样品的称取量，g。

13.1.7 精密度

平行测定两种生物样，测得结果硒含量，质量比分别为 1.03×10^{-6}和 3.85×10^{-6}，相对标准偏差分别为 5.3%和 8.8%。5 个实验室测定同一互校生物样(牡蛎)，测得结果，再现性相对标准偏差为 15%。

13.1.8 注意事项

13.1.8.1 消化过程中粘附在锥形瓶壁的棕色物在较高温度的酸回流时可以消除。

13.1.8.2 生物样消解后无需用盐酸将六价硒还原，在此消解条件下，各种形态硒都可以转化为四价。

13.1.8.3 配制 DAN 时应在暗处进行。在沸水浴上加热 5 min 后，用冷水冷却，时间应控制在 10 min 内，否则结果会偏低。

13.1.8.4 甲酚红指示剂有两个变色范围，当 pH=2～3 时，由红变黄；pH=7.2～8.8 时，由黄变红。本方法中，当调节溶液 pH 使溶液呈粉橙色时，其 pH 为 1.5～2.0，当 pH<1.5 时，为桃红色，因此调节溶液 pH 时，要注意颜色变化，必要时可用精密 pH 试纸确证。

13.1.8.5 玻璃器皿均需用(1+3)硝酸浸泡 1 d 以上，洗净后使用。

13.2 二氨基联苯胺四盐酸盐分光光度法

13.2.1 适用范围和应用领域

本法适用于生物样品中硒的测定。

检出限(W)：0.5×10^{-6}。

13.2.2 方法原理

生物样品经硝酸-高氯酸消化，硒(Ⅵ)用盐酸还原为硒(Ⅳ)。在酸性介质中，硒(Ⅳ)与 3,3′-二氨基联苯胺四盐酸盐形成黄色络合物，在 pH6～8 条件下用甲基苯萃取，于波长 420 nm 处进行分光光度测定。

13.2.3 试剂及其配制

除非另作说明，所用试剂为分析纯。水为去离子水或等效纯水。

13.2.3.1 硝酸(HNO_3)：$\rho=1.42$ g/mL，优级纯。

13.2.3.2 高氯酸($HClO_4$)：$\rho=1.67$ g/mL，优级纯。

13.2.3.3 盐酸(HCl)：$\rho=1.19$ g/mL，优级纯。

13.2.3.4 盐酸溶液：1+1。

13.2.3.5 盐酸溶液：1+100。

13.2.3.6 氨水($NH_3\cdot H_2O$)：$\rho=0.90$ g/mL。

13.2.3.7 甲苯(C_7H_8)：用活性碳吸附，滤纸过滤。

13.2.3.8 无水硫酸钠(Na_2SO_4)：500℃灼烧 4 h。

13.2.3.9 活性碳：20～40 目，于 300℃高温炉中活化 4 h。

13.2.3.10 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液：74 g/L

称取 74 g EDTA-2Na($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2\cdot2H_2O$)，加适量水加热溶解，冷却后加水至 1 000 mL，混匀。

13.2.3.11 盐酸羟胺溶液：200 g/L

称取 20 g 盐酸羟胺($NH_2OH\cdot HCl$)，溶于 100 mL 水中，混匀。

13.2.3.12 3,3′-氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)溶液：5 g/L

称取 0.5 g(DAB)($C_{12}H_{18}Cl_4N_4\cdot2H_2O$)加水溶解，若有残渣时，需过滤除去不溶物。最后用水稀释至 100 mL，使用时配制。

13.2.3.13 硒标准贮备液：1 mg/mL

称取 0.140 5 g 二氧化硒(SeO_2)，溶于少量水中，全量移入 100 mL 量瓶中，用盐酸溶液(13.2.3.5)稀释至标线，混匀。

13.2.3.14 硒标准中间溶液：100 μg/mL

量取 10.0 mL 硒标准贮备溶液(13.2.3.13)于 100 mL 量瓶中，用盐酸溶液(13.2.3.5)稀释于标

线，混匀。

13.2.3.15 硒标准使用溶液：1.00 μg/mL

移取 1.00 mL 硒标准中间溶液(13.2.3.14)于 100 mL 量瓶中，用盐酸溶液(13.2.3.5)稀释至标线，混匀。

13.2.4 仪器及设备

——分光光度计；

——酸度计；

——离心机，附离心管 10 mL；

——控温仪；

——电热板：铺上 3 cm 厚细砂；

——实验室常备仪器及设备。

13.2.5 分析步骤

13.2.5.1 样品消化

13.2.5.1.1 准确称取 0.5～2 g(±0.001 g)生物干样，置于 50 mL 试管内。加 8 mL 硝酸(13.2.3.1)后，置于铝热块内在低于 100℃下加热消化。至红棕色氧化氮烟雾冒尽时，取下稍冷。加 2 mL 高氯酸(13.2.3.2)，再置于铝热块内缓慢升温至 150～180℃。试管内冒出浓密白烟后，再继续消化 20 min。此时消化液应透明无色。若呈黑褐色，需补加适量硝酸(13.2.3.1)继续消化至呈无色。取下冷却，制得样品消化液。同时，制备分析空白试液。

13.2.5.2 绘制工作曲线

13.2.5.2.1 于 5 支 50 mL 试管内，分别加入硒标准使用液(13.2.3.15)0，0.50，1.00，3.00，5.00 mL。加水至总体积 10 mL。加 8 mL 硝酸(13.2.3.1)后置于铝热块内，在低于 100℃下加热消化，至红棕色氧化氮烟雾冒尽时，取下稍冷。加 2 mL 高氯酸(13.2.3.2)，再置于铝热块内缓慢升温至 150～180℃，试管内冒出浓密白烟后，再继续加热 20 min，取下冷却。

13.2.5.2.2 加 1 mL 盐酸溶液(13.2.3.4)，置于 100℃铝热块内加热 10 min[将硒(Ⅵ)转化为硒(Ⅳ)]，取下冷却。

13.2.5.2.3 加 1 mL 水，0.5 mL 氨水(13.2.3.6)，2 mL 盐酸羟胺溶液(13.2.3.11)，2 mL EDTA-2Na 溶液(13.2.3.10)混匀。用氨水(13.2.3.6)和盐酸溶液(13.2.3.4)调节酸度至 pH1～2。加 2 mL DAB(13.2.3.12)混匀。室温下放置 1 h，再用氨水(13.2.3.6)调节溶液酸度至 pH6～8。

13.2.5.2.4 将溶液全量转入 125 mL 分液漏斗中，加入 5 mL 甲苯(13.2.3.7)，振荡 2 min，分层后弃去下层水相，有机相置于离心管内离心分离(或用适量无水硫酸钠脱水)。用 3 cm 测定池，以甲苯(13.2.3.7)调零，于 420 nm 处测定吸光值 A_i 及分析空白吸光值 A_b。

13.2.5.2.5 将测定数据记入 GB 17378.4—1998 附录表 A1 中，以吸光值(A_i-A_b)为纵坐标，相应硒的量(μg)为横坐标绘制工作曲线。

13.2.5.3 样品的测定

按绘制工作曲线的 13.2.5.1.2～13.2.5.1.4 步骤测定样品消化液的吸光值 A_s 和分析空白试液吸光值 A_b。以(A_s-A_b)值从工作曲线上查出相应的硒的量(μg)。

13.2.6 记录与计算

将测定数据记入表 A1 中，按式(28)计算生物样品中硒含量：

$$W_{Se}=\frac{m}{M} \qquad \cdots\cdots(28)$$

式中：W_{Se}——生物体干样中硒含量，质量比，10^{-6}；

m——从工作曲线上查得的硒的量，μg；

M——样品的称取量，g。

13.2.7 精密度和准确度

平行6次测定3种生物样品，其含量质量比分别为1.5×10^{-6}，2.54×10^{-6}，5.38×10^{-6}，相对标准偏差分别为12.2%，3.9%和3.5%。

五个试验室用本方法分析同一种互校生物样品(牡蛎)结果，平均值为3.15×10^{-6}，再现性相对标准偏差27%。四个实验室测定硒含量为$0.94\times10^{-6}\pm0.05\times10^{-6}$的猪肝成分分析标准物质(GBW085 51)，测定结果的平均相对误差为23%。

13.2.8 注意事项

13.2.8.1 玻璃器皿均须经(1+3)硝酸溶液浸泡1 d以上，洗净后使用。

13.2.8.2 3,3′-二氨基联苯胺四盐酸盐在空气及光照下易分解，须避光密封保存。

13.2.8.3 硒及其卤化物为易挥发物质，消化温度需控制低于180℃。长时间高温消化或消化液干涸均会造成挥发损失。

13.3 催化极谱法

13.3.1 适用范围和应用领域

本法适用于海洋生物体中硒的测定。

检出限(W)：0.03×10^{-6}。

13.3.2 方法原理

生物样品经硝酸-高氯酸分解，制备成盐酸溶液。然后于高氯酸中，以柠檬酸三铵、EDTA为掩蔽剂，硒(Ⅳ)被亚硫酸还原成单质硒。在氟化铵-氢氧化铵缓冲溶液中(pH=10)，Se与SO_3^{2-}生成$SeSO_3^{2-}$。在碘酸钾存在下，$SeSO_3^{2-}$产生一个很灵敏的硒极谱催化波。其峰电流值随硒浓度增加而增加，藉以定量测定硒。

13.3.3 试剂及其配制

13.3.3.1 硒标准溶液

13.3.3.1.1 硒标准贮备溶液：0.200 mg/mL

称取0.014 05 g二氧化硒(SeO_2，纯度99%)于50 mL烧杯中，溶于少量水中，全量转入500 mL量瓶中，加4 mL盐酸(HCl，ρ=1.19 g/mL)，加水至标线，混匀。

13.3.3.1.2 硒标准中间溶液(A)：4.00 μg/mL

量取5.00 mL硒标准贮备液(13.3.3.1.1)于250 mL量瓶中，加2 mL盐酸(HCl，ρ=1.19 g/mL)，加水至标线，混匀。

13.3.3.1.3 硒标准中间溶液(B)：0.100 μg/mL

量取5.00 mL硒标准中间溶液(13.3.3.1.2)于200 mL量瓶中，加5 mL盐酸溶液(13.3.3.6)，加水至标线，混匀。临用前配制。

13.3.3.1.4 硒标准使用溶液：5.00 ng/mL

量取5.00 mL硒标准中间溶液(13.3.3.1.2)于100 mL量瓶中，加2 mL(1+2)盐酸溶液(13.3.3.6)，加水至标线，混匀。临用前配制。

13.3.3.2 亚硫酸钠溶液：50 g/L

称取5 g亚硫酸钠($Na_2SO_3\cdot7H_2O$)于500 mL烧杯中，加水溶解并稀释至100 mL，混匀。

13.3.3.3 柠檬酸三铵-EDTA-2Na混合溶液

称取5 g柠檬酸三铵[$(NH_4)_3\cdot C_6H_5O_7$]和2 g乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na，优级纯)于100 mL烧杯中，加水溶解稀释至100 mL，混匀。

13.3.3.4 碘酸钾溶液：12 g/L

称取1.2 g碘酸钾(KIO_3，优级纯)加水溶解并稀释至100 mL，混匀。

13.3.3.5 氟化铵-氢氧化铵缓冲溶液：pH=10

称取20 g氟化铵(NH_4F)于100 mL烧杯中，加水溶解后转入200 mL量瓶中，加入60 mL氢氧化

铵(NH_4OH,ρ=0.90 g/mL,优级纯),加水至标线,混匀后转存于聚乙烯塑料瓶中。

13.3.3.6 盐酸溶液:1+2

1份体积盐酸(HCl,ρ=1.19 g/mL,超纯)与2份体积水混合。

13.3.3.7 硝酸(HNO_3):ρ=1.42 g/mL,优级纯。

13.3.3.8 高氯酸溶液:1+1

高氯酸($HClO_4$,ρ=1.67 g/mL,优级纯):缓缓地注入等体积水中,混匀。

13.3.4 仪器及设备

——示波极谱仪;

——三电极系统:滴汞电极、甘汞电极、铂电极;

——电热板:铺有3 cm厚的细砂;

——实验室常备仪器及设备。

13.3.5 分析步骤

13.3.5.1 样品消化

准确称取0.1 g(±0.001 g)干样于50 mL烧杯中,用几滴水润湿,加入2 mL硝酸,盖上表面皿,于电热板(140℃左右)上加热20 min左右,冒烟加入1.5 mL浓高氯酸,加热(150～180℃)至刚冒浓白烟,取下稍冷,补加2 mL硝酸,继续加热至溶液剩下约0.5 mL(不能蒸干),用少许水淋洗杯壁及表面皿,再蒸至刚冒浓白烟,取下冷却后,加入20 mL(1+2)盐酸,加盖于100℃的电热板上微热5 min,溶解残渣。用水洗去表面皿,全量转入25 mL量瓶中,加水至标线,混匀,放置澄清,制得样品消化液。同时,制备分析空白试液。

13.3.5.2 绘制标准曲线

13.3.5.2.1 分别量取0,0.20,0.40,0.60,0.80和1.20 mL硒标准使用溶液(13.3.3.1.4)于5 mL烧杯中,加入0.3 mL高氯酸溶液(13.3.3.8),于电热板上加热至刚冒浓白烟,取下冷却。

13.3.5.2.2 加入0.5 mL柠檬酸三铵-EDTA-2Na盐混合溶液(13.3.3.3),0.5 mL亚硫酸钠溶液(13.3.3.2),混匀,放置20 min。

13.3.5.2.3 加入1.0 mL氟化铵-氢氧化铵缓冲溶液(13.3.3.5),混匀。加入0.5 mL碘酸钾溶液(13.3.3.4),混匀后加盖放置10 min。

13.3.5.2.4 于起始电压−0.6 V处,用导数部分记录硒的催化波的峰电流值(I_{P_1})及标准空白峰电流值(I_{P_0})峰电位为−0.86 V。将测得数据记入GB 17378.4—1998附录表A8中。

13.3.5.2.5 用峰电流值$I_{P_1}-I_{P_0}$为纵坐标,相应的硒量(ng)为横坐标,绘制标准曲线。

13.3.5.3 样品测定

量取1～5 mL样品消化清液于5 mL烧杯中,加入0.2 mL(1+1)高氯酸,于电热板上蒸至刚冒浓白烟,取下冷却后,其余按绘制标准曲线(13.3.5.2)中加底液的步骤,测定峰电流I_p,并测定分析空白试液峰电流I_{P_b},以($I_{P_a}-I_{P_b}$)值在标准曲线上查出相应的硒量(ng)。

13.3.6 记录与计算

将测得数据记入GB 17378.4—1998附录表A9中,按式(29)计算生物样品中硒含量:

$$W_{Se}=\frac{mV_0}{V_1M} \qquad \cdots\cdots(29)$$

式中:W_{Se}——生物体干样中硒的含量,质量比,10^{-6};

V_0——样品消化液的体积,mL;

V_1——用于测定的样品消化液的体积,mL;

M——样品的称取量,g;

m——由标准曲线查得的硒的量,ng。

13.3.7 精密度和准确度

六个实验室测定同一互校生物样(牡蛎),测定结果硒的含量(质量比)分别为 3.20×10^{-6},3.58×10^{-6},3.51×10^{-6},3.35×10^{-6},3.63×10^{-6}和 3.34×10^{-6},平均含量为 3.44,再现性相对标准偏差为 4.7%。

六个实验室测定硒含量为$(0.94\pm0.05)\times10^{-6}$的猪肝成分分析标准物质(GB W085 51),测定结果的相对误差平均为 5.3%。

13.3.8 注意事项

见 GB 17378.5—1998 中 13.3.8 条。

14 石油烃

14.1 荧光分光光度法

14.1.1 适用范围和应用领域

本方法适用于海洋生物体中石油烃的测定。

检出限(W):1×10^{-6}(湿重)。

14.1.2 方法原理

生物样品经氢氧化钠皂化,用氟里昂萃取。将萃取液中的氟里昂蒸发后,残留物用环己烷溶解,于激发波长 310 nm,发射波长 360 nm 处进行荧光分光光度测定。

14.1.3 试剂及其配制

除非另作说明,所用试剂为分析纯,水为除油纯水。

14.1.3.1 氢氧化钠溶液:240 g/L

称取 240 g 氢氧化钠(NaOH,优级纯)溶于水中,加水至 1 L。

14.1.3.2 无水乙醇(C_2H_5OH):重蒸馏一次。

14.1.3.3 氯化钠(NaCl):饱和溶液。

14.1.3.4 氟里昂 F_{113}:见 GB 17378.4—1998 中 14.2.3.1。

14.1.3.5 活性炭:见 GB 17378.4—1998 中 14.1.3.1。

14.1.3.6 环己烷:见 GB 17378.4—1998 中 14.1.3.2。

14.1.3.7 油标准贮备溶液:1.00 mg/mL。见 GB 17378.4—1998 中 14.1.3.4。

14.1.3.8 油标准使用溶液:0.10 mg/mL。见 GB 17378.4—1998 中 14.1.3.5。

14.1.4 仪器及设备

——荧光分光光度计;

——浓缩装置,普通蒸馏器或真空干燥箱;

——样品皂化瓶:具塞圆底烧瓶或锥形瓶,60 mL;

——浓缩瓶:与蒸馏装置配套的平底烧瓶,60 mL;

——锥形分液漏斗:250 mL;

——玻璃层析柱:处理环己烷用;

见 GB 17378.4—1998 中 14.1.4.C。

14.1.5 分析步骤

14.1.5.1 样品皂化

准确称取 2～5 g(±0.01 g)新鲜生物样于 60 mL 皂化瓶中,加入 20 mL 氢氧化钠溶液(14.1.3.1),加 20 mL 无水乙醇(14.1.3.2)充分振荡,在室温下避光皂化 5～6 h,每隔 1～2 h 微微摇动皂化瓶数次,制得样品消化液。

同时,制备分析空白试液。

14.1.5.2 绘制工作曲线

14.1.5.2.1 分别量取 0,0.100,0.300,0.500,0.700 和 1.00 mL 油标准使用溶液(14.1.3.8)于 60

mL 皂化瓶中，加入 20 mL 氢氧化钠溶液(14.1.3.1)，20 mL 无水乙醇(14.1.3.2)，充分振摇。在室温下避光皂化 5～6 h，每间隔 1 h 振荡 1～2 min。

14.1.5.2.2 皂化液转入 250 mL 锥形分液漏斗中，用 10 mL 氟里昂(14.1.3.4)分 2 次洗涤皂化瓶，洗涤液并入分液漏斗中，加 25 mL 氯化钠溶液(14.1.3.3)和 80 mL 水，振摇 2 min(注意放气)，静置分层。

14.1.5.2.3 将有机相放入 60 mL 浓缩瓶。用 10 mL 氟里昂(14.1.3.4)重复萃取一次，有机相合并于浓缩瓶中。

14.1.5.2.4 将浓缩瓶与蒸馏装置联接，在 65℃水中蒸发氟里昂至干，取下浓缩瓶，冷却，加入10.0 mL 环已烷(14.1.3.6)溶解残留物。

14.1.5.2.5 将石油烃环已烷溶液倒入 1 cm 石英池内，以选定的仪器技术参数测定相对荧光强度 I_i 及分析空白相对荧光强度 I_b。

14.1.5.2.6 将测定数据记入表 GB 17378.4—1998 附录表 A11 中，以相对荧光强度(I_i-I_b)为纵坐标，相应的石油烃的量(μg)为横坐标，绘制工作曲线。

14.1.5.3 样品测定

按绘制工作曲线 14.1.5.2.2～14.1.5.2.5 步骤测定样品制备液相对荧光强度 I_s 和分析空白试液的相对荧光强度 I_b。以(I_s-I_b)值。从工作曲线上查出相应的石油烃的量。

14.1.6 记录与计算

将测得数据记入表 A2 中，按式(30)计算生物样品中石油烃含量：

$$W_{oil}=\frac{m}{FM} \qquad \cdots\cdots(30)$$

式中：W_{oil}——生物体干样品中石油烃的含量，质量比，10^{-6}；

m——从工作曲线上查得的石油烃的量，μg；

F——样品的干/湿比；

M——样品的称取量，g。

14.1.7 精密度

五个实验室分析同一样品，内含石油烃质量比 14.74×10^{-6}，重复性标准偏差为 1.09×10^{-6}，重复性相对标准偏差为 7.5%。

14.1.8 注意事项

14.1.8.1 氟里昂 F_{113} 的蒸除速度及残留物的干燥程度均影响石油烃的回收率(氟里昂 F_{113} 有淬灭荧光作用)，故条件应尽可能保持一致。

14.1.8.2 皂化萃取过程中，试剂加入的顺序，加入纯水的质量和数量对萃取分层有明显影响。

14.1.8.3 全部操作要仔细认真，称量贻贝样品时，不可沾于瓶口或瓶壁，以免与氢氧化钠溶液接触不充分，影响皂化效果。

15 666、DDT

15.1 气相色谱法

15.1.1 适用范围和应用领域

本方法适用于生物体中 666、DDT 和狄氏剂的测定。

检出限：

名 称	检出限,pg	名 称	检出限,pg
α-666	5	oρ′-DDT	17
γ-666	7	ρρ′-DDD	8
β-666	3	ρρ′-DDT	40
δ-666	9	狄氏剂	3
ρρ′-DDE	5		

15.1.2 方法原理

生物样品中的666、DDT和狄氏剂用索氏萃取法萃取于正己烷中,用佛罗里土吸附柱去除萃取液中的脂肪和色素,二氯甲烷-正己烷淋洗液供666气相色谱测定,此淋洗液再经活性炭吸附柱去除PCB_s,丙酮淋洗液供DDT和狄氏剂气相色谱测定。

15.1.3 试剂及其配制

除非另有说明,所用试剂为分析纯,水为去离子水或等效纯水。

15.1.3.1 氢氧化钠($NaOH$):粒状。

15.1.3.2 硫酸钠(Na_2SO_4):无水、粒状,于300℃处理2 h,冷至室温。用正己烷(15.1.3.4)于索氏抽提器中萃取2 h,冷却,待溶剂挥发后于130℃干燥。

15.1.3.3 月桂酸(十二碳酸 $CH_3(CH_2)_{10}CO_2H$)。

15.1.3.4 正己烷($H_3C(CH_2)_4CH_3$),用全玻璃蒸馏器蒸馏,收集69℃馏分。用气相色谱检测至无杂质峰出现。蒸馏时可加入几粒氢氧化钾去除氯化物。

15.1.3.5 二氯甲烷(CH_2Cl_2):用全玻璃蒸馏器蒸馏,收集38～39℃馏分,用气相色谱检测至无杂质峰出现。

15.1.3.6 苯(C_6H_6):用全玻璃蒸馏器蒸馏,收集80℃馏分。用气相色谱检测至无杂质峰出现,蒸馏时可加几粒氢氧化钾去除氯化物。

15.1.3.7 丙酮:(CH_3COCH_3):用全玻璃蒸馏器蒸馏,收集56℃馏分,用气相色谱检测至无杂质峰出现。

15.1.3.8 硅镁吸附剂(佛罗里土):100～200目。650℃处理2 h。使用前再在130℃恒温箱内活化4 h,冷至室温,每100 g吸附剂加3～5 mL水去活性。于具塞瓶中贮存,有效期7 d。

15.1.3.9 活性碳:色谱用活性碳经研细后,筛取40～180目粒分,置于滤纸筒内,于索氏抽提器中用丙酮(15.1.3.7)萃取4 h。冷却后,用烧结玻璃漏斗或布氏漏斗抽滤。残留物用冷丙酮洗两次,抽干。待丙酮挥发后于130℃恒温箱内活化2 h,冷却。保存在具塞瓶中备用。

15.1.3.10 标准贮存溶液:1.00 mg/mL

分别称取α-666,γ-666,β-666,δ-666,ρρ′-DDE,oρ-DDT,ρρ′-DDD,ρρ′-DDT,狄氏剂(纯度均为99%),各25.0 mg,分别于25 mL量瓶中,用正己烷(15.1.3.4)(β-666先用少量苯)溶解,并稀释至标线,混匀。

15.1.3.11 混合标准中间溶液

各量取1.00 mL α-666,γ-666,δ-666,5.00 mL,β-666,ρρ′-DDE,oρ′-DDT;10.0 mL ρρ′-DDD,ρρ′-DDT;2.00 mL狄氏剂标准贮备溶液(15.1.3.10),合并于100 mL量瓶中,以正己烷(15.1.3.4)稀释至标线,混匀。此溶液各组分含量见表16。

15.1.3.12 混合标准使用溶液A

量取1.00 mL混合标准中间溶液(15.1.3.11)于100 mL量瓶中,用正己烷(15.1.3.4)稀释至标线,混匀。此溶液各组分含量见表16。

15.1.3.13 混合标准使用溶液B

量取1.00 mL标准使用溶液A(15.1.3.12)于10 mL量瓶中,用正己烷(15.1.3.4)稀释至标线,混

匀。此溶液各组分含量见表 16。

表 16 标准溶液浓度

代号	名 称	贮备溶液		混合中间溶液		混合标准 A 液		混合标准 B 液	
		mg	mL	贮液 μg/mL	浓度 μg/mL	中间液 mL	浓度 μg/mL	A 液 mL	浓度 μg/mL
1	α-666	25	1.00	1.00	10.0		0.10		0.010
2	γ-666	25	1.00	1.00	10.0		0.10		0.010
3	β-666	25	1.00	5.00	50.0		0.50		0.050
4	δ-666	25	1.00	1.00	10.0		0.10		0.010
5	pp′-DDE	25	1.00	5.00	50.0	1.00	0.50	1.00	0.050
6	op′-DDT	25	1.00	5.00	50.0		0.50		0.050
7	pp′-DDD	25	1.00	10.0	100		1.00		0.10
8	pp′-DDT	25	1.00	10.0	100		1.00		0.10
9	狄氏剂	25	1.00	2.00	20.0		0.020		0.020
10	定容体积 mL	25	—	100	—	100	—	10.0	—
11	溶剂	正己烷		正己烷		正己烷		正己烷	

15.1.4 仪器及设备

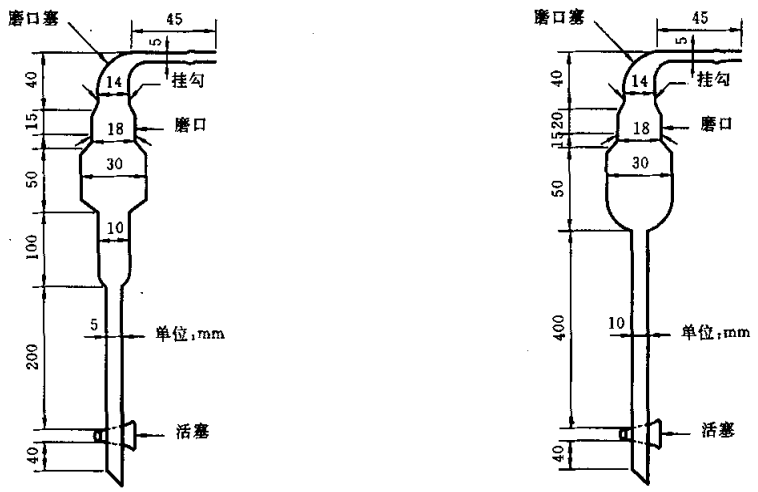
——气相色谱仪：具备 Ni^{63} 电子捕获检测器；

——索氏抽提器：300 mL 平底烧瓶；

——K-D 浓缩器：300 mL 烧瓶及下部有 1.0 mL、5.0 mL 或 10.0 mL 刻度磨口试管；

——佛罗里土玻璃层析柱(见图 7B)；

——活性碳玻璃层析柱：(见图 7A)；



A B

A—活性炭分离(玻璃)柱；B—佛罗里土净化(玻璃)柱

图 7 层析柱

——气相色谱材料：固定液 OV-17，OV-210，担体 80～100 目 Chromosorb W · AW · DMCS。

——玻璃棉：分别用正己烷和丙酮浸泡，洗涤，待溶剂挥发后，于200℃处理2 h。

——高温炉：最高温度1 000℃。

——全玻璃蒸馏器。

15.1.5 分析步骤

15.1.5.1 气相色谱仪的准备

15.1.5.1.1 色谱柱：长2 m，内径3 mm U形硬质玻璃管，填充2% OV-17+4% OV-210/80～100目，Chromosorb W·AW·DMCS固定相。

15.1.5.1.2 色谱柱的制备和老化

涂渍固定相：称取0.020 g OV-17和0.040 g OV-210于烧杯中加丙酮(15.1.3.7)溶解，再加适量丙酮(15.1.3.7)搅匀，加入10 g 80～100目Chromosorb W·AW·DMCS担体(15.1.4.f)，并使液面高于担体，轻轻搅拌。待溶剂自然挥发近干后，于50℃干燥。

装柱：将2 m×3 mm(内径)U形玻璃柱一端塞以玻璃棉(15.1.4.g)，外包纱布，接真空泵上，另一端与小漏斗相接，将涂好的固定相装入柱中，(边装边抽气，轻轻敲打填玻璃柱)，取下小漏斗及玻璃柱，塞入硅烷化玻璃棉。

老化：将色谱柱接于色谱仪柱炉中，一端与进样口连接，另一端暂不接检测器。通入高纯氮气，流速30 mL/min，炉温升至110℃处理1 h，然后升至200℃处理2 h，最后升至240℃老化16 h，冷至室温，将色谱柱连接检测器，载气流速60 mL/min，炉温升至操作温度冲洗8 h，直至基线漂移不大于规定值。稳定后，可用于分析。

15.1.5.1.3 色谱柱分离性能考查

按选定的色谱条件，注射标准使用液(15.1.3.12)绘制色谱图。若666四个异构体的谱峰能分开，$\rho\rho'$-DDE与狄氏剂两个相邻的峰在峰高一半处能分开，说明色谱柱分离性能良好，可用于分析。若两个相邻峰在峰高三分之一处才分开，说明分离性能差，则应重新制备色谱柱，直至达到上述要求。

15.1.5.2 样品萃取

准确称取10～20 g(±0.1 g)新鲜生物匀浆样品于烧杯内，加4～5倍重量的硫酸钠(15.1.3.2)，混匀，呈松散状态。装入预先用正己烷(15.1.3.4)处理过的圆形滤纸筒内，放入索氏抽提器中，加150 mL正己烷(15.1.3.4)，于75～80℃水浴中回流萃取8 h。冷至室温，制得样品萃取液"D"。

取同样重量的硫酸钠(15.1.3.2)，按同样方法进行空白萃取，萃取液用K-D浓缩器浓缩，定容至1.0 mL，随后，按15.1.5.3步骤净化和分离后用气相色谱法测定分析空白液有机氯组分的峰高h_b。

15.1.5.3 净化和分离

将样品萃取液通过装有5.0 g硫酸钠(15.1.3.2)的层析柱(mm：400×10玻璃柱)，收集于连接1 mL刻度接收管的K-D浓缩器中。置于75℃水浴中，通入氮气流，浓缩至0.5 mL，加入正己烷(15.1.3.4)定容至1.0 mL。

15.1.5.3.1 佛罗里土柱净化

装柱：在柱的底部放置少量玻璃棉，关闭活塞，加入20 mL正己烷(15.1.3.4)，依次加入10 mm高的硫酸钠(15.1.3.2)和5.0 g佛罗里土(15.1.3.8)轻敲柱子使之填充均匀无气泡。于佛罗里土上部再加10 mm高的硫酸钠(15.1.3.2)。排出过量正己烷至刚淹没硫酸钠界面，关闭活塞。

净化：将浓缩至1.0 mL的正己烷浓缩萃取液加入柱内，并用少量正己烷(15.1.3.4)洗涤K-D浓缩器，洗涤液也加入柱内。打开活塞，流出液收集于K-D浓缩器中。当液面降至刚淹没硫酸钠界面时，加入100 mL二氯甲烷-正己烷(30+70)混合溶剂进行淋洗，流速2～4 mL/min。将盛洗脱液的K-D浓缩器置于75～80℃水浴中，通入氮气，浓缩至约0.5 mL，加正己烷(15.1.3.4)定容1.0 mL。取1～5 μL进行色谱测定。在相同色谱条件下，注入与样品中666浓度接近体积相同的标准使用液(15.1.3.13)进行色谱分析。测定各666组分的峰高h_s。

15.1.5.3.2 微型活性碳柱分离

装柱：先于柱的底部放置少量玻璃棉，关闭活塞。加入 20 mL 丙酮(15.1.3.7)，随后边轻敲柱子边依次装入 10 mm 高的硫酸钠(15.1.3.2)和 1.0 g 活性碳(15.1.3.9)。为了填充均匀紧密无气泡，柱顶空气导管与双联橡皮球联接压入空气，同时打开活塞排出丙酮(如丙酮不够，应先加入 10～20 mL)。观察柱内填充物确无气泡后，在活性碳上部再加入 10 mm 高的硫酸钠(15.1.3.2)，排出过量丙酮至刚淹没硫酸钠界面，关闭活塞。

分离：将定容至 1.0 mL 的净化液(15.1.5.3.1)加入上述柱内，用 1～2 mL 正己烷(15.1.3.4)洗涤浓缩管，洗涤液合并于柱内。打开活塞，流出液收集于 K-D 浓缩器中。当液面下降至硫酸钠界面时，加入 100 mL 丙酮(15.1.3.7)淋洗，流速 2～4 mL/min，收集的洗脱液含有有机氯农药，而大部分多氯联苯吸附于柱中不被洗脱，将盛洗脱液的浓缩器置于 65～70℃水浴中，通入氮气，浓缩至 0.5 mL，加正己烷定容至 1.0 mL(15.1.5.3.2)。取 1～5 μL 进行色谱分析。在相同色谱条件下，注入与样品中有机氯农药浓度接近但体积相同的标准使用溶液(15.1.3.13)进行色谱分析。测量 DDT、狄氏剂色谱峰高 h_s。

15.1.6 记录与计算

将测得 666、DDT、狄氏剂的峰高数据记入表 A3 中，并按下述步骤定性和定量。

15.1.6.1 定性

对比样品谱图和标样中各相应组分的保留时间或相对于 ρρ′-DDE 的相对保留时间(ρρ′-DDE=100)定性。

$$RRT = \frac{RT \times 100}{RT_{\rho\rho'\text{-DDE}}} \qquad \cdots\cdots(31)$$

式中：RRT——相对保留时间；

RT——农药的保留时间，min；

$RT_{\rho\rho'\text{-DDE}}$——ρρ′-DDE 的保留时间，min。

15.1.6.2 定量

用外标法，根据峰高(h)按式(32)计算有机氯农药含量。

$$W_i = \frac{(h_s - h_b)KV_1}{FV_2M}1\,000 \qquad \cdots\cdots(32)$$

式中：W_i——生物体干样中农药各异构体的残留量质量比，10^{-9}；

K——农药的仪器响应系数，ng/mm；

h_s——样品提取浓缩液或分离浓缩液中待测物的峰高，mm；

h_b——分析空白浓缩液中该待测物的峰高，mm；

V_1——净化浓缩液或分离浓缩的定容体积，mL；

F——生物样的干/湿比；

V_2——注入待测溶液的体积，μL；

M——样品的称取量，g；

其中：$K=\frac{Q_i}{h}$

式中：Q_i——注入标准的农药组分的量，ng；

h——标准样的峰高，mm。

666，DDT 的含量等于各异构体含量之和。

15.1.7 精密度和准确度

四个实验室分析标准添加的贻贝样品，精密度，准确度列于表 17。

表 17　666、DDT、狄氏剂的精密度和准确度

农　药	加入量 μg/10 g	平均 μg/10 g	回收率 %	相对误差 %	相对标准差 %	重复性相对标准差
666	0.184	0.161	87.5	−12.5	7.06	3.85
	0.368	0.347	94.29	−5.71	4.19	2.31
	0.736	0.695	94.43	−5.57	6.14	3.25
DDT	1.574	1.242	78.90	−11.10	7.63	3.28
	3.148	2.798	88.88	−11.12	8.25	5.14
	6.296	6.104	96.95	−3.05	6.05	3.52
狄氏剂	0.076	0.060	78.55	−21.45	9.63	5.34
	0.152	0.133	87.50	−12.5	5.33	5.33
	0.304	0.288	94.86	−5.14	5.16	2.89

相对保留时间及出峰顺序 α-666，γ-666，β-666，δ-666，狄氏剂，ρρ′-DDE，oρ′-DDT，ρρ′-DDD，ρρ′-DDT，RRT 22、29、34、40、109、100、142、160、191。

15.1.8　注意事项

15.1.8.1　色谱仪在长时间使用时，需要经常注射标样检查电子捕获检测器污染情况，及由此而产生的响应和线性范围的变化。

15.1.8.2　标样和待测样品的注入体积应相同。

15.1.8.3　注意同一标样在实验开始和终了时峰高的变化，应不超过 5%。一般情况下注入待测样品净化液后，应接着注入标样，两者不能相隔太久。

15.1.8.4　根据具体仪器型号选择气相色谱的仪器参数。下面提供岛津 GC-7A 型气相色谱仪的仪器参数。

柱温：195℃；

进样室和检测室温度：240℃；

载气：氮气(99.99%)，柱后流速为 60 mL/min；

电流：1.0 nA；

衰减：8；

记录仪器程：1 mV；

记录仪纸速：2.5 mm/min；

C-R2B 微处理机：衰减×2^3；纸速 2.5 mm/min。

15.1.8.5　本方法系以贻贝和牡蛎为分析对象建立的，对其他海洋生物体中 666，DDT 和狄氏剂测定，前处理应作适当修改。用佛罗里土的柱净化萃取液时，要先试验二氯甲烷和正己烷淋洗剂(30+70，V/V)的用量和佛罗里土用量，确认脂肪，色素被完全除去后，才能用活性碳柱分离去除 PCB。

15.1.8.6　试剂、玻璃器皿沾污等均可能影响测定结果，故溶剂应经全玻璃蒸馏器蒸馏，玻璃器皿应洗净。

16　多氯联苯

16.1　气相色谱法

16.1.1　适用范围和应用领域

本方法适用于生物体样品中 PCB_s 的测定。

检出限(W)：43.1 pg。

16.1.2 方法原理

生物样品中的多氯联苯，用索氏提取法萃取于正己烷中，用佛罗里硅土和活性碳柱分离萃取液中的脂肪、色素、有机氯农药等干扰物后，进行多氯联苯的气相色谱测定。

16.1.3 试剂及其配制

除非另有说明，所用试剂为分析纯，水为去离子水或等效纯水。

16.1.3.1 PCB_n 标准贮备溶液：500.0 μg/mL

分别称取 12.50 mg 的 PCB_3 和 PCB_5 标准物，置于 2 个 25 mL 量瓶中，用正己烷溶解并稀释至标线，混匀。

16.1.3.2 PCB_n 标准中间溶液：10.0 μg/mL

分别量取 1.00 mL 标准贮备溶液(16.1.3.1)于 2 个 50 mL 量瓶中，加正己烷至标线，混匀。

16.1.3.3 PCB_n 标准使用溶液：1.00 μg/mL

分别量取 5.00 mL 标准中间溶液(16.1.3.2)于 2 个 50 mL 量瓶中，加正己烷至标线，混匀。

标准使用溶液分装于已净化的安瓿瓶中。每支约 0.5 mL。熔封后贴上标签，置于 4℃冰箱中，可长期保存，临用时打开。

16.1.3.4 $PCB_3 \cdot PCB_5$ 混合标准使用溶液：1.00 μg/mL

分别量取等体积的 PCB_3 和 PCB_5 标准使用溶液(16.1.3.3)置于同一个具塞玻璃容器中，混匀。

其他试剂同 15.1.3 条。

16.1.4 仪器及设备

见 15.1.4 条。

16.1.5 分析步骤

16.1.5.1 气相色谱仪的准备

见 15.1.5.1 条。

16.1.5.2 样品萃取

准确称取约 10～20 g(±0.1 g)新鲜生物匀浆样品于烧杯内，加 4～5 倍重量的硫酸钠，混匀，呈松散状态。装入预先用正己烷处理过的圆形滤纸筒内，放入索氏抽提器中，加 150 mL 正己烷，于 75～80℃水浴中回流萃取 8 h。冷至室温，制得样品萃取液。

取同样重量的硫酸钠，按同样方法进行空白萃取，萃取液用 K-D 浓缩器浓缩，定容至 1.0 mL，随后按 16.1.5.3 步骤净化分离，测定分析空白试液中 PCB_n 组分的峰高 h_b。

16.1.5.3 净化和分离

将样品萃取液，通过装有 5.0 g 硫酸钠的层析柱(400×10 mm 玻璃柱)，收集于连接 1 mL 刻度接收管的 K-D 浓缩器中。置于 75℃水浴中，通过氮气流，浓缩至 0.5 mL，加入正己烷定容至 1.0 mL。

16.1.5.3.1 佛罗里土柱净化

装柱：在柱的底部放置少量玻璃棉，关闭活塞，加入 20 mL 正己烷后，依次加入 10 mm 高的硫酸钠和 5.0 g 佛罗里土轻敲柱子使之填充均匀无气泡。于佛罗里土上部再加 10 mm 高的硫酸钠。排出过量正己烷至刚淹没硫酸钠界面，关闭活塞。

净化：将浓缩至 1.0 mL 的正己烷浓缩萃取液加入柱内，并用少量正己烷洗涤 K-D 浓缩器，洗涤液也加入柱内，打开活塞，流出液收集于 K-D 浓缩器中，当液面降至刚淹没硫酸钠界面时，加入 100 mL 二氯甲烷-正己烷(30+70)混合溶剂进行淋洗，流速 2～4 mL/min。将盛洗脱液的 K-D 浓缩器置于 75～80℃水浴中，通入氮气，浓缩至约 0.5 mL，加正己烷定容至 1.0 mL。此淋洗液的浓缩液中含有 666 各异构体。

16.1.5.3.2 微型活性碳柱分离

装柱：先于柱的底部放置少量玻璃棉，关闭活塞。加入 20 mL 丙酮，随后边轻敲柱子边依次装入 10 mm高的硫酸钠和 1.0 g 活性碳。为了填充均匀，紧密无气泡，柱顶空气导管与双联橡皮球联接压入

空气，同时打开活塞排出丙酮(如丙酮不够，应先加入10～20 mL)。观察柱内填充物确无气泡后，在活性碳上部再加入10 mm高的硫酸钠，排出过量丙酮至刚淹没硫酸钠界面关闭活塞。

分离：将定容1.0 mL净化液(16.1.5.3.1)加入上述柱内，用1～2 mL正己烷洗涤浓缩管，洗涤液合并于柱内。打开活塞，流出液收集于K-D浓缩器中。当液面下降至硫酸钠界面时，加入100 mL丙酮淋洗，流速2～4 mL/min，收集的洗脱液为第一馏分(含有机氯农药)；接着用100 mL苯按相同的流速淋洗柱子。淋洗液收集于另一个K-D浓缩器中，为第二馏分(含PCB)。将第一馏分置于65～70℃水浴中，第二馏分置于85～90℃水浴中，分别通入氮气浓缩至0.5 mL，加正己烷定容至1.0 mL。分别各取1～5 μL第一馏分和第二馏分的定容溶液作色谱分析。在相同色谱条件下注射与第二馏分样品多氯联苯浓度接近体积相同的PCB_n混合标准使用溶液(16.1.3.4)和ρρ′-DDE标准溶液进行色谱分析。根据样品谱图和PCB_n标准样谱图定量出第一馏分和第二馏分PCB的含量。第一馏分和第二馏分中PCB含量之和，即为生物体中PCB的残留量。

16.1.6 记录与计算

将数据记入表A4中。

16.1.6.1 定性

对比样品谱图和PCB_n标准谱图各相应组分峰的保留时间(RT)或相对于ρρ′-DDE的相对保留值(ρρ′-DDE=100)定性。

$$RRT = \frac{RT \times 100}{RT_{\rho\rho'\text{-DDE}}} \qquad \cdots\cdots(33)$$

式中：RRT——相对保留时间；

RT——样品PCB谱峰的保留时间，min；

$RT_{\rho\rho'\text{-DDE}}$——ρρ′-DDE的保留时间，min。

16.1.6.2 定量

用外标法按式(34)计算样品中PCB_n含量：

$$W_{PCB} = \frac{(h_s - h_b)KV_1}{FV_2M}1\,000 \qquad \cdots\cdots(34)$$

式中：W_{PCB}——生物体干样中PCB的残留量，质量比，10^{-9}；

K——PCB的仪器响应系数ng/mm，$K=\frac{Q}{h_1}$；

Q——注入标准PCB_n的量，ng；

h_1——注入标样PCB_n产生的峰高，mm；

h_s——样品提取浓缩液中PCB_n的峰高，mm；

h_b——试剂空白浓缩液中PCB_n的峰高，mm；

V_1——净化浓缩液或分离浓缩液的定容体积，mL；

F——生物样的干/湿比；

V_2——注入待测溶液的体积，μL；

M——样品的称取量，g。

16.1.7 精密度和准确度

四个实验室分析标准添加的贻贝样品，精密度，准确度列于表18。

表 18 准确度和精密度

农 药	加入量 μg	平均回收率 g(%)	相对误差 %	相对标准误差 %	重复性相对标准偏差%
PCB_8	1.04	72	−28	9.0	4.6
	2.09	88	−17	5.8	3.1
	4.18	82	−17	4.8	2.9

16.1.8 注意事项

本方法系以贻贝和牡蛎为分析对象建立的，对其他海洋生物 PCB 的分析，前处理应作适当的修改。用佛罗里土柱净化萃取液时，应先试验二氯甲烷和正己烷淋洗剂(30+70，V/V)的用量和佛罗里土用量，确认脂肪、色素被完全除去后，才能用活性碳柱分离出 PCB。

其他均同 15.1.8。

17 狄氏剂

17.1 气相色谱法

见 15.1 条

附 录 A
（标准的附录）
记 录 表

表 A1 生物样品____分析记录表
（ 分光光度法）

海区_____调查船_____采样日期：____年____月____日　　第____页
仪器型号_____分析日期：____年____月____日　　共____页

序号	站 号	名 称	取样部位	取样(干、湿) g	吸光值 A_s			$\overline{A}_s-\overline{A}_b$	样品含量比 W (10^{-6}，干、湿)
					1	2	平均		
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
备注				空白 A_b				定容	mL
								检出限	

表 A2　生物样品___分析记录表

（荧光分光光度法）

海区_____调查船_____采样日期：___年___月___日　　第___页

仪器型号_____分析日期：___年___月___日　　共___页

序号	站　号	名　称	取样部位	取样(干、湿) g	吸光值 I_s			$\bar{I}_s-\bar{I}_b$	样品含量比 W (10^{-6},干、湿)
					1	2	平均		
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
备注				空白 A_b				定容	mL
								检出限	

分析者_____计算者_____校对者_____

表 A3　生物样品666、DDT、狄氏剂分析记录表

（气相色谱法）

采样日期：___年___月___日至___月___日　第___页

海区___调查船___　　分析日期：___年___月___日至___月___日　共___页

序号	站号	样品名称	取样部位	取样（干、湿）g	浓缩液 mL		注样 mL		峰高 mm									样品浓度或含量 $\mu/L_H \times 10^{-9}$									
					佛罗里土净化液	活性碳分离液	佛罗里土净化液	活性碳分离液									狄氏剂					666总量				DDT总量	狄氏剂
1																											
2																											
3																											
4																											
5																											
6																											
7																											
8																											
9																											
10																											
备注	检出限 $W(10^{-9})$																										

标准液注样：　　μL　仪器型号：　柱温：　℃，气化室温度：　℃

检测室温度：　℃，柱前压力：　Pa

氮气流速：　mL/min，衰减：

分析者_____计算者_____校对者_____

表 A4　生物样品 PCB 分析记录表

（气相色谱法）

采样日期：___年___月___日至___月___日

海区___调查船___　　分析日期：___年___月___日至___月___日　共___页

序号	站号	样品名称	取样部位	取样（干、湿）g	浓缩液 mL			注样 μL		PCB 峰高 mm								样品含量比，10^{-9}							
					佛罗里土净化液	第一馏分	第二馏分	第一馏分	第二馏分	峰号（对 p,p′-DDE 的相对保留时间）							总量	峰号（对 p,p′-DDE 的相对保留时间）							总量
1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
备注	检出限 $W(10^{-9})$																								

标准液注样：　　μL　仪器型号：　柱温：　℃，气化室温度：　℃

检测温度：　℃，柱前压力：　Pa

氮气流速：　mL/min，衰减：

分析者_____计算者_____校对者_____

表 A5　海洋监测生物体分析结果报表

调查日期：____年____月____日至____月____日　第____页

海区____调查船____监测部门____　　分析日期：____年____月____日至____月____日　共____页

序号	站号	采样时间 d,h, min	生物种 学名 (拉丁文)	俗名 (中文)	年龄	平均体长	平均体重 (湿) g	分析部位	总汞 10^{-6}	铜 10^{-6}	铅 10^{-6}	镉 10^{-6}	砷 10^{-6}	硒 10^{-6}	666 10^{-9}	DDT 10^{-9}	
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
备注																	

制表人____　校对人____　复校人____　负责人____　制表日期____年____月____日