

淡水中氨氮高效快速测定方法的优化研究

卢勇杰, 孙巍*, 李嘉敬, 陈心如, 邝春议, 朱颖, 夏春雨

(广东石油化工学院, 生物与食品工程学院, 广东 茂名 525000)

摘要:基于氨氮与纳氏试剂进行显色反应的原理,建立反应体系为1 mL的小体系淡水中氨氮的测定方法。新方法的显色剂用量为20 μ L、显色时间为10~30 min、盐度<0.5%、pH值为3~11,纳氏试剂以6 000 r/min、5 min进行离心处理,采用酶标仪96孔板在420 nm波长下测定显色反应溶液的吸光度。将该方法与《水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法》(HJ 535—2009)(国标法)测定氨氮的吸光度进行正交验证,结果表明2种方法具有良好的拟合度。新方法的检测范围从国标法的0~2.0 mg/L提升到0~4.8 mg/L。方法测定淡水中氨氮的质量浓度具有简便、连续、快速、高批量的优点,适用于实地、实时地测定淡水中的氨氮。

关键词:淡水;氨氮;小体系;纳氏试剂分光光度法;酶标仪

中图分类号:X832

文献标志码:B

文章编号:1674-6732(2023)02-0056-06

Optimization of an Efficient and Rapid Method for the Determination of Ammonia Nitrogen in Fresh Water

LU Yong-jie, SUN Wei*, LI Jia-jing, CHEN Xin-ru, KUANG Chun-yi, ZHU Ying, XIA Chun-yu

(School of Biotechnology and Food Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming, Guangdong 525000, China)

Abstract: Based on the principle of color reaction between ammonia nitrogen and Nessler's reagent, a method for the determination of ammonia nitrogen in fresh water was established with a reaction system of 1 mL. The dosage of developer was 20 μ L, the color development time was 10~30 min, salinity was less than 0.5%, pH value was 3~11, and Nessler's reagent was centrifuged at 6 000 r/min for 5 min in this method. The absorbance of the color reaction solution was measured at 420 nm by using the 96-well plate of the enzyme marker. The orthogonal validation was carried out between the absorbance of the new method and the absorbance of ammonia nitrogen determined in Water Quality-Determination of Ammonia Nitrogen-Nessler's Reagent Spectrophotometry (HJ 535—2009) (national standard method). The result indicated that the new method showed a good fit with the national standard method. Moreover, the detection range was increased from 0~2.0 mg/L in the national standard method to 0~4.8 mg/L in the new method. The new method for the determination of ammonia nitrogen in fresh water showed the advantages of simplicity, continuity, rapidity and high volume, which was suitable for the field and real-time determination of ammonia nitrogen in fresh water.

Key words: Fresh water; Ammonia nitrogen determination; Small system; Nessler reagent spectrophotometry; Enzyme-labeling instrument

0 前言

水环境中的氨氮以游离氨(NH_3)或铵离子(NH_4^+)形式存在,是地表水与废水监测的重要指

标之一,同时也是国家实施节能减排及污染控制的主要监测指标之一^[1]。水体中氨氮的来源有2个:

(1)含蛋白质的物质经微生物的分解产生;(2)工

收稿日期:2022-05-18;修订日期:2022-09-12

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(42006137);广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A151010539);广东石油化工学院科研基金人才引进项目(2019rc108);高位池海水养虾尾水无害化处理示范项目;广东省重点领域研发计划项目(2018B020205002);广东石油化工学院2021年度教育教学改革研究项目(2021JY29);大学生创新训练项目(73321101,73322049,73322094)

作者简介:卢勇杰(1998—),男,本科,从事环境微生物研究工作。

*通讯作者:孙巍 E-mail:weiyu2005@126.com

业生产及农业生产过程中产生的含氮废水,如合成氨化肥厂生产和农业施肥等^[2]。氨氮浓度过高会造成淡水水体富营养化,对水中生物的危害极为严重,如造成水中生物急、慢性中毒,中毒表现为水生生物的摄食频率降低,生长发育迟缓,生物产生精神亢奋、严重缺氧等,甚至会导致水生生物死亡。生物中毒的机理是氧在生物细胞间的输送速率降低,造成组织损伤。若水中碱性越强,游离氨的数量越多,则毒性越强^[3-4]。

目前氨氮测定方法较多,主要有四大类:分光光度法(纳氏试剂分光光度法^[5]、水杨酸-次氯酸盐分光光度法^[6]、靛酚蓝分光光度法^[7]和次溴酸盐氧化法^[8]),电化学法(氨气敏电极法^[9]、离子选择性电极法^[10]、蒸馏-电位滴定法^[11]和蒸馏-中和滴定法^[12]),仪器分析法(离子色谱法^[11]、连续流动分析法^[13]、气相分子吸收光谱法^[14]、荧光法^[15]和固相显色-反射光谱法^[16]),酶法^[17]。以上方法在不同方面还有一定的不足,其中分光光度法,如国家标准《水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法》(HJ 535—2009)(以下简称“国标法”)需要清洗大量的玻璃仪器,存在工作量大、耗时较长,且反应体系大、废液量大等问题;电化学法需要对样品进行预处理;蒸馏-中和滴定法的精密度较低;仪器分析法设备较昂贵、维护成本较高。

酶标仪与紫外分光光度计具有相同的理论基础,均利用所测物质在一定波长下的吸光度与物质浓度间的线性关系,从而对所测物质进行定量^[18]。紫外分光光度计测定所需试剂用量较大、操作烦琐,测定样品较多时所需时间较长。酶标仪测定所需试剂少、方便简单、准确性与稳定性高^[19]。针对河流、溪流、污染水体等淡水中氨氮的分析,现采用酶标仪代替紫外分光光度计测定氨氮质量浓度,探究了影响小体系氨氮测定过程的影响因素,通过统计学方法验证其准确度与精密度,建立一种简便、连续、快速且成本低、废液量少的氨氮浓度测定方法(以下简称“新方法”)。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

BIORAD imark 酶标仪(美国伯乐公司); DRAGONLAB 移液器(北京大龙兴创实验仪器股份有限公司)。

1.1.2 试剂

氢氧化钠(NaOH, AR)、碘化钾(KI, AR)、碘化汞(HgI_2 , AR)均购自西陇科学股份有限公司;酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AR)、氯化铵(NH_4Cl , AR)均购自天津市大茂化学试剂厂。

1.1.3 试剂配制

溶液配制参照国标法,具体配制过程如下。

(1)纳氏试剂(HgI_2 -KI-NaOH):称取 16.0 g NaOH 于 50 mL 超纯水中溶解待用,称取 7.0 g KI 和 10.0 g HgI_2 于少量超纯水中溶解待用,将混合液体与 NaOH 溶液混合,稀释至 100 mL 后保存。

(2)酒石酸钾钠溶液($\rho = 500 \text{ g/L}$):称取 50.0 g 酒石酸钾钠于 100 mL 超纯水中搅拌溶解,将烧杯放置在加热炉上加热至沸腾以去除氨,静置冷却至室温,用超纯水稀释至 100 mL 后保存。

(3)氨氮标准贮备液($\rho_{\text{N}} = 1\,000 \text{ mg/L}$):称取 3.819 0 g NH_4Cl 于少量超纯水中溶解,用 1 000 mL 容量瓶稀释定容,冷藏保存。

(4)氨氮标准工作液($\rho_{\text{N}} = 10 \text{ mg/L}$):吸取 1.00 mL 氨氮标准贮备液于 100 mL 容量瓶中稀释定容。临用前配制使用。

1.2 实验设计

1.2.1 影响因素优化实验

为了准确建立小体系测定氨氮的方法,优化改进方法的最佳反应条件,对显色剂用量、显色时间、盐度、pH 值进行优化实验,均设置 2 个平行。

(1)显色剂用量的优化:在室温下,配制质量浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 和 2.0 mg/L 的氨氮工作溶液,各氨氮质量浓度设置 4 组,每组 2 个平行,在各质量浓度的氨氮工作液中分别加入酒石酸钾钠 10, 15, 20 和 25 μL ,以及纳氏试剂 10, 15, 20 和 25 μL 进行显色反应,以确定纳氏试剂的最佳使用量。

(2)显色时间的优化:纳氏试剂投入量相同,在室温条件下对氨氮标准工作液分别以 5, 10, 20, 30, 60, 90 和 120 min 进行显色反应,以确定氨氮显色反应的最佳时间。

(3)盐度的优化:在氨氮工作液中加入氯化钠(NaCl)改变水体盐度为 0, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.5% 和 3.5%,在纳氏试剂投入量与显色时间一致的前提下,进行氨氮显色反应实验。

(4)pH 值的优化:在氨氮标准工作液中加入盐酸(HCl)或 NaOH,调节水体 pH 值为 1, 3, 5, 7,

9, 11 和 13, 在纳氏试剂投入量与显色时间一致的前提下, 进行氨氮显色反应实验。

1.2.2 标准工作曲线绘制

参照国标法, 绘制标准工作曲线, 具体步骤为: (1) 在 8 个圆底离心管 (2 mL) 中分别加入氨氮标准工作液 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160 和 200 μL , 用超纯水稀释至 1 mL; (2) 加入 20 μL 酒石酸钾钠溶液后混匀; (3) 加入 20 μL 纳氏试剂后混匀放置 10 min; (4) 颜色稳定后, 以空白为参照, 用酶标仪在波长 420 nm 下测量并记录吸光度; (5) 以氨氮质量浓度为 x , 吸光度为 y , 绘制标准工作曲线, 求出回归方程。

1.2.3 纳氏试剂优化实验

纳氏试剂在配置时会出现部分沉淀, 在对水体氨氮质量浓度测定实验中, 带沉淀的纳氏试剂会使测定吸光值偏高。本实验通过对纳氏试剂进行离心处理 (6 000 r/min, 5 min), 取上清液保存, 保证其他反应条件不变, 将原反应条件中的纳氏试剂更改为经离心处理后取上清液保存的纳氏试剂进行实验。对经过离心处理和未经离心处理的纳氏试剂的实验结果建立标准曲线, 确定离心处理是否会对新方法结果造成影响。为进一步验证纳氏试剂离心处理的准确度, 采用正交验证法, 以纳氏试剂未经离心处理组标准曲线中各点的吸光值为横坐标, 纳氏试剂经过离心处理组标准曲线中各点的吸光值为纵坐标, 进行线性拟合。再对 2 组标准曲线中各点的吸光值结果进行置信度为 95% 的 t 检验, 确定 2 组是否具有显著性差异。

1.2.4 线性范围优化实验

在显色剂用量、显色时间、盐度、pH 值的优化条件下, 设置标准样品质量浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.4 和 4.8 mg/L, 用新方法分别测定各质量浓度样品的吸光度, 绘制标准曲线, 确定具有良好线性关系的质量浓度测定范围。

1.2.5 小体系测定氨氮的可行性验证

在显色剂用量、显色时间、盐度、pH 值的优化条件下, 进行新方法和国标法标准曲线的绘制, 对 2 种方法进行线性拟合, 确定线性回归关系。为进一步验证新方法测定氨氮的准确性及可靠性, 采用正交验证法, 以国标法标准曲线中各点的吸光值为横坐标, 新方法标准曲线中各点的吸光值为纵坐标, 进行线性拟合, 确定 2 种测定方法的拟合程度。

再对 2 种标准曲线中各点的吸光值结果进行置信度为 95% 的 t 检验, 确定 2 种方法是否具有显著性差异。

1.2.6 环境样品测定结果的准确性验证

实验样品采集于广东省茂名市茂南区田头屋附近 3 个淡水养殖池塘和小东江河流。每个点位采集 2 个水深约 0.1 m 的表层水体样品。

为验证新方法测定样品的可行性, 用新方法与国际法同时分别测定淡水养殖池塘及河流样品中氨氮的质量浓度, 对 2 种测定结果进行 F 检验与 t 检验, 确定 2 种方法是否具有显著性差异。新方法测定样品步骤见 1.2.2 节, 根据回归方程计算样品氨氮质量浓度。有基体干扰时需要在水样进行预处理, 预处理方法参考国标法。

2 结果与讨论

2.1 显色剂用量的确定

水体中的氨氮质量浓度与纳氏试剂显色反应产生的络合物的色度成正比关系, 所以显色剂用量是影响实验结果的一个重要因素。显色剂用量对小体系氨氮质量浓度测定的影响见图 1。由图 1 可见, 在不同的氨氮质量浓度条件下, 显色剂用量为 10 ~ 25 μL , 吸光度随显色剂用量的增加而提高。显色剂用量为 10 μL 时, 吸光度较低, 其原因为纳氏试剂用量不足, 不能与水体中的氨氮完全反应。显色剂用量为 25 μL 时, 吸光度偏高, 其原因为过量的纳氏试剂会与氨氮反应生成颜色更深的沉淀物使液体色度加深。显色剂用量为 15 和 20 μL 时, 吸光度在同一氨氮质量浓度下没有明显差异, 但显色剂用量为 20 μL 的数据重复性更好, 误差更低。因此, 新方法选择纳氏试剂用量为 20 μL 。

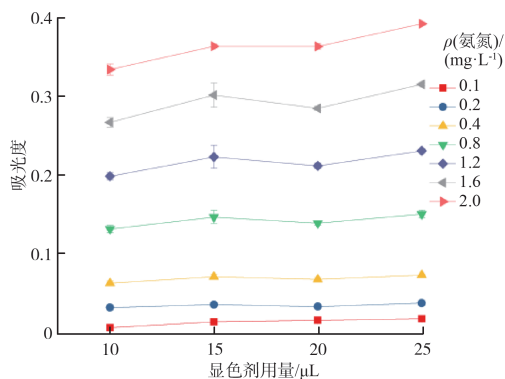


图1 显色剂用量对小体系氨氮质量浓度测定的影响

2.2 显色时间的确定

显色时间是决定氨氮与纳氏试剂反应程度的一个重要因素。显色时间对小体系氨氮质量浓度测定的影响见图2。由图2可见,在不同的氨氮质量浓度条件下,显色时间为5 min时,吸光度偏低,其原因为水体中氨氮与纳氏试剂反应还在进行,水体中氨氮与纳氏试剂反应不充分。显色时间为10~30 min时,吸光度较为稳定,其原因为水体中氨氮与纳氏试剂反应充分,此时吸光度的结果较为准确。显色时间为30 min后,吸光度在低氨氮质量浓度下呈下降趋势,在高氨氮质量浓度下呈上升趋势,吸光度表现为不稳定的状态。因此,新方法选择显色反应时间为10~30 min。

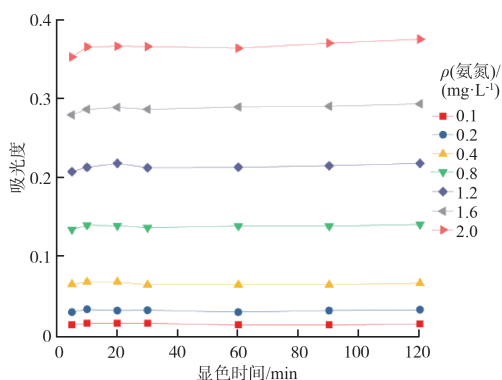


图2 显色时间对小体系氨氮质量浓度测定的影响

2.3 盐度的确定

水体盐度对新方法测定海水和淡水水样的适用性均有影响。盐度对小体系氨氮质量浓度测定的影响见图3。

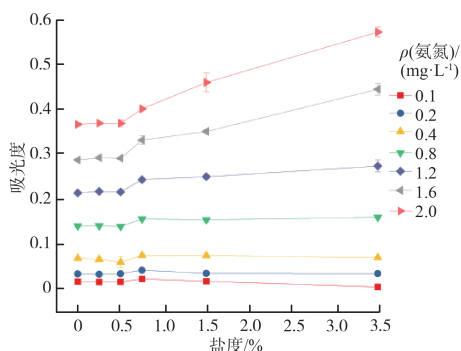


图3 盐度对小体系氨氮质量浓度测定的影响

由图3可见,在不同的氨氮质量浓度条件下,水体盐度<0.5%时,吸光度较稳定。水体盐度>

0.5%时,吸光度随盐度的提高而提高,且氨氮质量浓度越高,盐度对显色反应的影响越明显。因此,新方法仅适用于盐度<0.5%的淡水水样。

2.4 pH值的确定

由于氨氮与纳氏试剂反应需要在碱性条件下进行,所以pH值是影响氨氮与纳氏试剂反应的一个重要因素。pH值对小体系氨氮质量浓度测定的影响见图4。

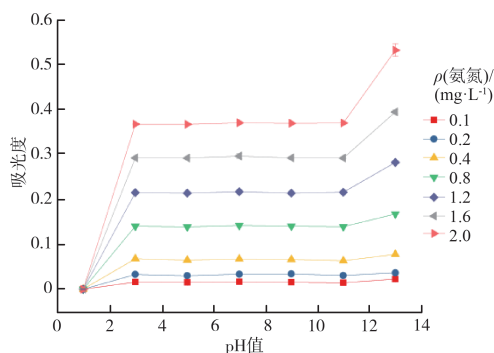


图4 pH值对小体系氨氮质量浓度测定的影响

由图4可见,在不同的氨氮质量浓度条件下,水体pH值为3~11时,吸光度没有明显变化。在水体pH值=1时,吸光度均趋于0。在水体pH值为13时,吸光度偏高,且氨氮质量浓度越高,pH值对其影响越明显。因此,新方法适用于测定pH值为3~11的水样。

2.5 纳氏试剂离心处理的影响

纳氏试剂离心和未离心2种处理条件下测定氨氮质量浓度的标准曲线见图5。

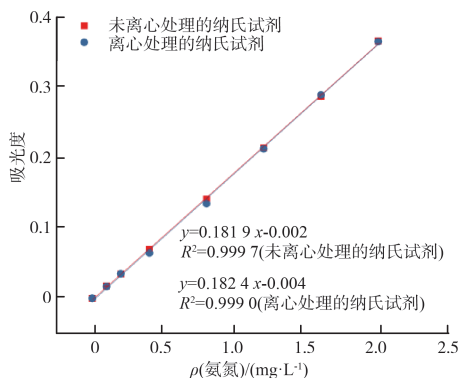


图5 纳氏试剂离心和未离心2种处理条件下测定氨氮质量浓度的标准曲线

由图5可见,吸光度与氨氮质量浓度具有很好

的线性回归关系。纳氏试剂不进行离心处理的条件下,吸光度与氨氮质量浓度的线性回归方程为 $y = 0.1819x - 0.002$, 决定系数 (R^2) = 0.9997; 纳氏试剂经过离心处理的条件下,吸光度与氨氮质量浓度的线性回归方程为 $y = 0.1824x - 0.004$, $R^2 = 0.9990$ 。

为了进一步说明纳氏试剂经过离心处理对测定结果的影响,采用正交验证法,横坐标为未离心处理的纳氏试剂体系测定的吸光度,纵坐标为离心处理的纳氏试剂体系测定的吸光度,线性拟合结果见图6。由图6可见,2种方法的线性方程为 $y = 1.0034x - 0.002$, $R^2 = 0.9996$ 。结果表明,2种处理方式下的测定结果拟合度较高,经置信度为95%的t检验, $\text{sig.} = 0.168 > 0.05$,说明2种处理方式的测定结果不存在显著性差异。因此,配制纳氏试剂后,可经过离心处理后再使用,可避免纳氏试剂沉淀造成的假阳性实验误差。

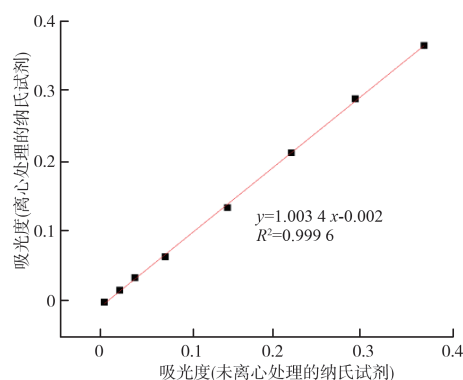


图6 纳氏试剂离心和未离心2种处理条件下测定氨氮质量浓度的正交验证曲线

2.6 线性检测范围

新方法测定氨氮质量浓度的检测范围见图7。

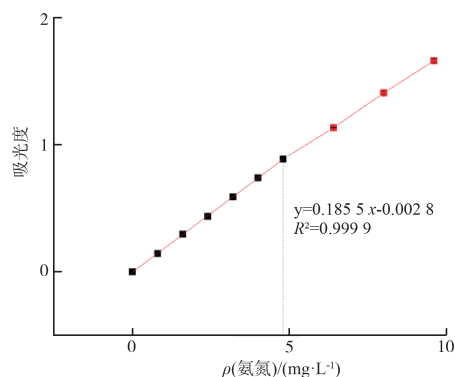


图7 新方法测定氨氮质量浓度的检测范围

由图7可见,当氨氮质量浓度为0~4.8 mg/L,其与吸光度有较好的线性关系,线性回归方程为 $y = 0.1855x - 0.0028$, $R^2 = 0.9999$ 。当氨氮质量浓度 > 4.8 mg/L 时,吸光度增加幅度降低。相对于国标法中氨氮的测定范围(0~2.0 mg/L),新方法的测定范围扩大了2.4倍,可对高质量浓度的氨氮样品进行准确有效的测定。

2.7 优化条件下标准工作曲线的绘制

使用质量浓度范围为0~2.0 mg/L的氨氮标准工作液,按照上述确定的实验条件(纳氏试剂使用量为20 μL,反应时间为10 min,盐度 < 0.5%, pH值为3~11),进行1 mL小体系氨氮测定标准曲线的绘制,同时根据国标法绘制50 mL体系的标准曲线,结果见图8。由图8可见,2种方法具有很好的线性回归关系。

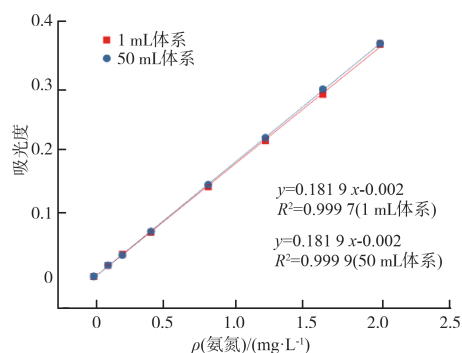


图8 新方法与国标法测定氨氮标准曲线的线性拟合

新方法与国标法测定氨氮标准曲线的正交验证曲线见图9。

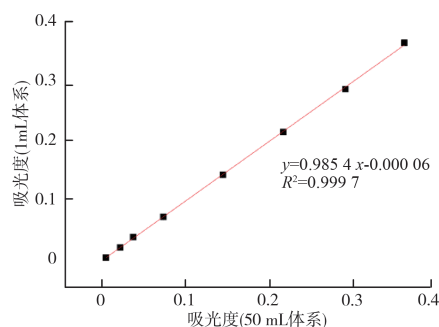


图9 新方法与国标法测定氨氮标准曲线的正交验证曲线

由图9可见,2种方法的线性方程为 $y =$

$0.9854x - 0.00006$, $R^2 = 0.9997$, 表明2种方法的拟合度较高。经置信度为95%的t检验, 2种方法测定结果的 $\text{sig.} = 0.390 > 0.05$, 2种方法的测定结果不存在显著性差异, 说明新方法具有可行性, 可信度较高。

2.8 新方法 with 国标法的交叉验证

对实际水样进行氨氮质量浓度测定, 结果见表1。由表1可见, 经置信度为95%的F检验, 新方法与国标法对测定实际样品氨氮质量浓度结果的F值(1.124) < 4.96 (查F值表所得, df_1 为1, df_2 为10), 说明2种方法的精密度无显著性差异。经置信度为95%的t检验, 2种方法测定结果的 $\text{sig.} = 0.394 > 0.05$, 2种测定方法的测定结果不存在显著性差异, 说明新方法具有可行性。

表1 新方法 with 国标法测定实际水样氨氮的质量浓度

方法	淡水养殖池塘			河流	
	点位1	点位2	点位3	点位1	点位2
新方法	0.8219	0.9758	1.1820	1.1627	1.3057
国标法	0.8266	0.9919	1.1572	1.1491	1.2791

3 结语

建立了小体系(1 mL)测定淡水中氨氮的新方法, 补充了国标法大体系(50 mL)在小体系测定上的空缺。新方法的显色剂用量为20 μL , 显色时间为10~30 min, 盐度 $< 0.5\%$, pH值为3~11, 在6 000 r/min、5 min条件下离心处理纳氏试剂, 避免了因纳氏试剂沉淀造成的假阳性实验误差。利用酶标仪代替紫外分光光度计, 能够实现连续、快速地测定多个样品的目标。与国标法相比, 新方法可节省玻璃仪器的清洗时间, 提高工作效率; 减少纳氏试剂与酒石酸钾钠的使用量, 降低测定成本; 大大降低废液量, 减少二次污染的风险, 节约废弃液处理成本。新方法在测定氨氮质量浓度准确度较高的同时, 其检测范围从国标法大体系的0~2.0 mg/L提升到0~4.8 mg/L。综上所述, 新方法能够连续、快速地测定水中氨氮质量浓度, 节省了测定成本与测定时间, 提高了工作效率, 适用于实地、实时地测定淡水中氨氮的质量浓度。

[参考文献]

- [1] 李永红. 氨氮测定中质量控制分析[J]. 化工管理, 2020(24): 43-44.
- [2] 杜永. 水体中氨氮分析方法研究进展[J]. 环保科技, 2017, 23(5): 59-64.
- [3] 陈小丽. 水质监测中氨氮测定的影响因素分析[J]. 绿色科技, 2020(4): 68-69.
- [4] 王晨, 姜姗, 海燕, 等. 氨氮监测分析方法研究进展[J]. 资源节约与环保, 2015(10): 50.
- [5] 吕佳, 岳银玲, 张岚, 等. 微量纳氏试剂分光光度快速检测方法测定生活饮用水中的氨氮[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(22): 3815-3816.
- [6] 张勇慧, 马红, 陈红. 次氯酸钠-水杨酸分光光度法测氨的几点探讨[J]. 环境科学与管理, 2007, 32(3): 168-169.
- [7] 詹晓燕, 刘臣辉, 范海燕, 等. 水体中氨氮测定方法的比较——纳氏试剂光度法、靛酚蓝比色法[J]. 环境科学与管理, 2010, 35(11): 132-134.
- [8] 陈岚. 四种国标测定氨氮方法述评[J]. 福建分析测试, 2014, 23(4): 21-24.
- [9] 王维德, 于宝祥, 梁秀凤. 吹脱-电导法测定水中氨氮及其自动分析仪[J]. 环境监测管理与技术, 2003, 15(1): 30-31, 35.
- [10] 陈登美, 崔红梅, 黄绍洁. 电极法监测污水土地处理系统中氨氮[J]. 环保科技, 2013, 19(2): 33-35.
- [11] 穆季平, 李红娟. 蒸馏-滴定法测定废水中氨氮的方法研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2006, 36(3): 54-57.
- [12] 杨文英, 王艳春. 离子色谱法测定水中氨氮含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1338-1339.
- [13] 韩熔红. 间隔流动分析法测定水中的氨氮[J]. 环境保护科学, 2013, 39(4): 112-113.
- [14] 周珂, 贺静, 刘燕燕, 等. 改进测定水中氨氮分子吸收光谱法的试验研究[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(3): 147-150.
- [15] 严春梅, 刘鑫, 梁英, 等. 基于邻苯二甲醛-NH₃-Na₂SO₃反应的固相荧光分析方法测定水样中的氨氮[J]. 分析测试学报, 2015, 34(11): 1271-1275.
- [16] 张平. 水体中氨氮的固相显色-反射光谱测定[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2009, 8(2): 92-94.
- [17] 陈一辉, 李伟民, 伍培, 等. 氨氮测定方法的对比研究[J]. 环境工程, 2011, 29(S1): 234-236.
- [18] 余飞, 秦艳飞, 王洲, 等. 酶标仪法测定微孔板发酵液中林可霉素[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(1): 47-51.
- [19] 张国斌. 酶标仪检测技术应用分析[J]. 中国医疗器械信息, 2021, 27(21): 159-160.

栏目编辑 周立平