



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113959963 A

(43) 申请公布日 2022.01.21

(21) 申请号 202111052931.2

(22) 申请日 2021.09.09

(71) 申请人 南通大学

地址 226000 江苏省南通市啬园路9号

(72) 发明人 林娟 宁栋梁 姚佳雯 王东  
柳梦玲

(74) 专利代理机构 南京瑞弘专利商标事务所  
(普通合伙) 32249

代理人 徐激波

(51) Int. Cl.

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

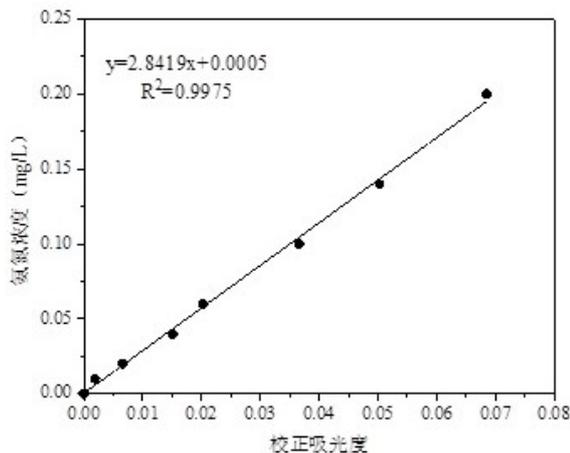
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,利用改进后的纳氏试剂光度法和水杨酸-次氯酸盐光度法将间隙水样品进行显色,采用酶标仪来批量测定间隙水氨氮浓度,优点在于可以实现水样氨氮的微量检测,将检测体系缩小为100微升,解决了高分辨-平衡式间隙水采集器(HR-Peeper)采集样品量仅为400微升的难题,同时也降低了检测成本;实现水样氨氮的批量检测,使用多孔酶标板可实现多个样品同时检测,方便操作,简化工序,大大降低了检测工作量。



1. 一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,其特征在于:利用改进后的纳氏试剂光度法和水杨酸-次氯酸盐光度法将间隙水样品进行显色,采用酶标仪来批量测定间隙水氨氮浓度;具体步骤如下:

步骤一、采集沉积物间隙水:

将平衡式孔隙水采样器提前充氮16小时,随后将装置垂直插入待测沉积物中,保留1~2 cm于界面之上,平衡一段时间后,将平衡式孔隙水采样器垂直取出,标记沉积物-水界面;用去氧水洗净装置表面后,立即将装置每个孔室中溶液取出,置于小离心管中待测;

步骤二、配置显色剂:

制备50%酒石酸钾钠溶液、纳氏试剂、水杨酸显色剂、次氯酸钠溶液、1%亚硝基铁氰化钠溶液;

步骤三、绘制标准曲线:

水杨酸-次氯酸盐光度法标准曲线:取酶标板在酶标仪中扫描空白吸光度;配置氨氮标准溶液,吸取氨氮标准溶液于酶标板不同孔中,加入水杨酸显色剂,用移液枪来回吸几下混匀,再加入次氯酸钠溶液和亚硝基铁氰化钠溶液,放入震荡仪中震荡后,酶标仪扫描吸光度,同时以去氧水做对照;以校正吸光度为横坐标,氨氮标准溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线;

纳氏试剂光度法标准曲线:取酶标板在酶标仪扫描空白吸光度;配置浓氨氮标准溶液,吸取浓氨氮标准溶液于酶标板不同孔中,加入酒石酸钾钠溶液,用移液枪来回吸几下混匀,再加入纳氏试剂,放入震荡仪中震荡20~30 min,酶标仪扫描吸光度,同时以去氧水做对照;以校正吸光度为横坐标,氨氮标准溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线;

四、样品显色和测定:

当样品氨氮浓度小于0.1 mg/L时,采用水杨酸-次氯酸盐光度法:取待测样品于酶标板中,加入水杨酸显色剂,用移液枪来回吸几下混匀,再加入次氯酸钠溶液和亚硝基铁氰化钠溶液,放入震荡仪中震荡1 h后,酶标仪扫描吸光度;同时以去氧水做对照;

当样品氨氮浓度大于0.1 mg/L时,采用纳氏试剂光度法:取稀释过适量倍数的待测样品于酶标板中,加入酒石酸钾钠溶液,混匀,再加入纳氏试剂,放入震荡仪中震荡20~30 min后,酶标仪扫描吸光度;同时以去氧水做对照;

步骤五、计算氨氮含量:将待测样品校正吸光度代入事先建立的氨氮浓度与吸光度的标准曲线,计算氨氮浓度。

2. 根据权利要求1中所述的一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,其特征在于:配置溶液所用的水均为去氧水,去氧水由蒸馏水充氮4 h得到。

3. 根据权利要求1中所述的一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,其特征在于:配置显色剂的具体步骤:

纳氏试剂:将碘化钾和碘化汞完全溶于去氧水中制备混合溶液,将制备后的混合溶液一边搅拌一边徐徐注入氢氧化钠溶液中制得含有16%氢氧化钠,7%碘化钾和10%碘化汞的纳氏试剂,并保存在聚乙烯瓶中;

水杨酸显色剂:将水杨酸和氢氧化钠完全溶解在去氧水中后,再加入酒石酸钾钠搅拌至完全溶解得到含有5%水杨酸,1.3%氢氧化钠和5%酒石酸钾钠的水杨酸显色剂;

次氯酸钠溶液:将次氯酸钠溶液用氢氧化钠溶液稀释为有效氯浓度为0.35%,得到氢氧

化钠浓度为0.75 mol/L的次氯酸钠溶液；

根据权利要求1中所述的一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法，其特征在于：所述酶标板为96孔透明酶标板；

根据权利要求1中所述的一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法，其特征在于：所述水杨酸-次氯酸盐光度法中样品、水杨酸显色剂、次氯酸钠、亚硝基铁氰化钠体积比为100:10:1:1；纳氏试剂光度法中样品、酒石酸钾钠、纳氏试剂体积比为100:2:3；

根据权利要求1中所述的一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法，其特征在于：所述水杨酸-次氯酸盐光度法中酶标仪在697nm下扫描吸光度，其中， $A_{校正} = A_{697nm} - A_{空白} - A_{对照}$ ；纳氏试剂光度法中酶标仪在420nm下扫描吸光度，其中， $A_{校正} = A_{420nm} - A_{空白} - A_{对照}$ 。

4. 根据权利要求1中所述的一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法，其特征在于：所述平衡式孔隙水采样器为智感推出高分辨平衡式孔隙水采样器。

## 一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法

[0001] 技术领域:

本发明涉及环境化学领域,尤其涉及一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法。

背景技术:

目前最常用的氨氮测定方法为《水和废水监测分析方法》中所述的纳氏试剂法和水杨酸-次氯酸盐光度法,采用分光光度计来测定。采用分光光度计所需要的水样量至少为3~5 mL。由于大多数研究需要将沉积物进行分层处理来分析沉积物剖面不同深度处氨氮的浓度,这样采集到的沉积物间隙水样品量较少,需要稀释较高的倍数才能满足分光光度法的要求。尤其在使用被动采样装置,如高分辨-平衡式间隙水采集器(HR-Peeper)时,样品体积仅为400微升,需要稀释十倍以上。因此,采用分光光度计来测定沉积物间隙水氨氮浓度会产生较大的误差。

[0002] 发明内容:

针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,优点在于可以实现水样氨氮的微量检测,将检测体系缩小为100微升,解决了高分辨-平衡式间隙水采集器(HR-Peeper)采集样品量仅为400微升的难题,同时也降低了检测成本;实现水样氨氮的批量检测,使用多孔酶标板可实现多个样品同时检测,方便操作,简化工序,大大降低了检测工作量。

[0003] 为解决上述技术问题,本发明通过以下方案进行实施;一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,利用改进后的纳氏试剂光度法和水杨酸-次氯酸盐光度法将间隙水样品进行显色,采用酶标仪来批量测定间隙水氨氮浓度;具体步骤如下:

步骤一、采集沉积物间隙水:

将平衡式孔隙水采样器提前充氮16小时,随后将装置垂直插入待测沉积物中,保留1~2 cm于界面之上,平衡一段时间后,将平衡式孔隙水采样器垂直取出,标记沉积物-水界面;用去氧水洗净装置表面后,立即将装置每个孔室中溶液取出,置于小离心管中待测;

步骤二、配置显色剂:

制备50%酒石酸钾钠溶液、纳氏试剂、水杨酸显色剂、次氯酸钠溶液、1%亚硝基铁氰化钠溶液;

步骤三、绘制标准曲线:

水杨酸-次氯酸盐光度法标准曲线:取多孔酶标板在酶标仪中扫描空白吸光度;配置氨氮标准溶液,吸取氨氮标准溶液于酶标板不同孔中,加入水杨酸显色剂,用移液枪来回吸几下混匀,再加入次氯酸钠溶液和亚硝基铁氰化钠溶液,放入震荡仪中震荡后,酶标仪扫描吸光度;同时以去氧水做对照;以校正吸光度为横坐标,氨氮标准溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线;

纳氏试剂光度法标准曲线:取多孔酶标板在酶标仪扫描空白吸光度;配置浓氨氮标准溶液,吸取浓氨氮标准溶液于酶标板不同孔中,加入酒石酸钾钠溶液,用移液枪来回吸几下混匀,再加入纳氏试剂,放入震荡仪中震荡20~30 min,酶标仪扫描吸光度;同时以去氧

水做对照;以校正吸光度为横坐标,氨氮标准溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线;

#### 四、样品显色和测定:

当样品氨氮浓度小于0.1 mg/L时,采用水杨酸-次氯酸盐光度法:取待测样品于多孔酶标板中,加入水杨酸显色剂,用移液枪来回吸几下混匀,再加入次氯酸钠溶液和亚硝基铁氰化钠溶液,放入震荡仪中震荡1 h后,酶标仪扫描吸光度;同时以去氧水做对照;

当样品氨氮浓度大于0.1 mg/L时,采用纳氏试剂光度法:取稀释过适量倍数的待测样品于多孔酶标板中,加入酒石酸钾钠溶液,混匀,再加入纳氏试剂,放入震荡仪中震荡20~30 min后,酶标仪扫描吸光度;同时以去氧水做对照;

步骤五、计算氨氮含量:将待测样品校正吸光度代入事先建立的氨氮浓度与吸光度的标准曲线,计算氨氮浓度。

[0004] 进一步的,配置溶液所用的水均为去氧水,去氧水由蒸馏水充氮4 h得到;

进一步的,配置显色剂的具体步骤:

纳氏试剂:将碘化钾和碘化汞完全溶于去氧水中制备混合溶液,将制备后的混合溶液一边搅拌一边徐徐注入氢氧化钠溶液中制得含有16%氢氧化钠,7%碘化钾和10%碘化汞的纳氏试剂,并保存在聚乙烯瓶中;

水杨酸显色剂:将水杨酸和氢氧化钠完全溶解在去氧水中后,再加入酒石酸钾钠搅拌至完全溶解得到含有5%水杨酸,1.3%氢氧化钠和5%酒石酸钾钠的水杨酸显色剂;

次氯酸钠溶液:将次氯酸钠溶液用氢氧化钠溶液稀释为有效氯浓度为0.35%,得到氢氧化钠浓度为0.75 mol/L的次氯酸钠溶液;

进一步的,所述多孔酶标板为96孔透明酶标板;

进一步的,所述水杨酸-次氯酸盐光度法中样品、水杨酸显色剂、次氯酸钠、亚硝基铁氰化钠体积比为100:10:1:1;纳氏试剂光度法中样品、酒石酸钾钠、纳氏试剂体积比为100:2:3;

进一步的,所述水杨酸-次氯酸盐光度法中酶标仪在697nm下扫描吸光度,其中, $A_{校正}=A_{697nm}-A_{空白}-A_{对照}$ ;纳氏试剂光度法中酶标仪在420nm下扫描吸光度,其中, $A_{校正}=A_{420nm}-A_{空白}-A_{对照}$ 。

[0005] 进一步的,所述平衡式孔隙水采样器为智感推出高分辨平衡式孔隙水采样器。

[0006] 有益效果:本发明与现有技术相比具有如下有益效果:

(1)可以实现水样氨氮的微量检测,将检测体系缩小为200  $\mu$ L,解决了高分辨-平衡式间隙水采集器(HR-Peeper)采集样品量为几百微升的难题,同时也降低了检测成本;

(2)实现水样氨氮的批量检测,使用多孔酶标板可实现多个样品同时检测,方便操作,简化工序,大大降低了检测工作量。

#### 附图说明

[0007] 图1为水杨酸-次氯酸盐光度法氨氮浓度与校正吸光度的标准曲线图;

图2为为纳氏试剂光度法氨氮浓度与校正吸光度的标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0008] 结合实施例和附图来详细说明本发明,但本发明并不仅限于此。

[0009] 一种用酶标仪微量和批量测定沉积物间隙水氨氮的方法,其特征在于:利用改进后的纳氏试剂光度法和水杨酸-次氯酸盐光度法将间隙水样品进行显色,采用酶标仪来批量测定间隙水氨氮浓度;具体步骤如下:

#### 步骤一、采集沉积物间隙水:

将平衡式孔隙水采样器提前充氮16小时,随后将装置垂直插入待测沉积物中,保留1~2 cm于界面之上,平衡48小时后,将装置垂直取出,标记沉积物-水界面。用去氧水洗净装置表面后,立即将装置每个孔室中溶液取出,置于1.5 mL的小离心管中待测。

#### [0010] 步骤二、配置显色剂。

[0011] 酒石酸钾钠溶液:5 g酒石酸钾钠溶于10 mL去氧水。纳氏试剂:称取8 g氢氧化钠,溶于25 mL去氧水中,另称取3.5 g碘化钾和5 g碘化汞溶于去氧水,将此溶液在搅拌下徐徐注入氢氧化钠溶液中,定容至50 mL,保存在聚乙烯瓶中;水杨酸显色剂:称取5 g水杨酸和1.3 g氢氧化钠溶解于25 mL去氧水中,加入5 g酒石酸钾钠,搅拌溶解,定容至100 mL;次氯酸钠溶液:将市售次氯酸钠溶液用氢氧化钠溶液稀释为有效氯浓度为0.35%,氢氧化钠浓度为0.75 mol/L的次氯酸钠溶液。亚硝基铁氰化钠溶液:将0.1 g亚硝基铁氰化钠溶于去氧水,定容至10 mL;

#### 步骤三、绘制标准曲线:

水杨酸-次氯酸盐光度法标准曲线:取96孔透明酶标板在酶标仪697nm下扫描空白吸光度;配置浓度为0.01、0.02、0.04、0.06、0.1、0.14、0.2 mg/L的氨氮标准溶液,吸取200  $\mu$ L于酶标板不同孔中,加入20  $\mu$ L水杨酸显色剂,用移液枪来回吸几下混匀,再加入2  $\mu$ L次氯酸钠溶液和2  $\mu$ L的亚硝基铁氰化钠溶液,放入震荡仪中震荡1 h,于697nm下扫描吸光度;同时以去氧水做对照; $A_{校正} = A_{697nm} - A_{空白} - A_{对照}$ 。以校正吸光度为横坐标,氨氮标准溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线,结果如图1所示;

纳氏试剂光度法标准曲线:取96孔透明酶标板在酶标仪420nm下扫描空白吸光度;配置浓度为0.25、0.5、1、1.5、2.5、3.5、4、5 mg/L的氨氮标准溶液,吸取200  $\mu$ L于酶标板不同孔中,加入4  $\mu$ L酒石酸钾钠溶液,用移液枪来回吸几下混匀,再加入6  $\mu$ L纳氏试剂,放入震荡仪中震荡20 min,于420 nm下扫描吸光度;同时以去氧水做对照; $A_{校正} = A_{420nm} - A_{空白} - A_{对照}$ ;以校正吸光度为横坐标,氨氮标准溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线,结果如图2所示;

#### 步骤四、样品显色和测定:

当样品氨氮浓度小于0.1 mg/L时,采用水杨酸-次氯酸盐光度法:取200  $\mu$ L待测样品于96孔酶标板中,加入20  $\mu$ L水杨酸显色剂,用移液枪来回吸几下混匀,再加入2  $\mu$ L次氯酸钠溶液和2  $\mu$ L的亚硝基铁氰化钠溶液,放入震荡仪中震荡1 h后,在697nm下扫描吸光度;同时以去氧水做对照;样品吸光度减空白吸光度减对照吸光度即为校正吸光度;

当样品氨氮浓度大于0.1 mg/L时,采用纳氏试剂光度法:取200  $\mu$ L稀释过适量倍数的待测样品于96孔酶标板中;加入4  $\mu$ L酒石酸钾钠溶液,混匀,再加入6  $\mu$ L纳氏试剂,放入震荡仪中震荡20~30 min后,于420nm下扫描吸光度。同时以去氧水做对照;样品吸光度减空白吸光度减对照吸光度即为校正吸光度;

步骤五、计算氨氮含量:将待测样品校正吸光度代入事先建立的氨氮浓度与吸光度的标准曲线,如图1-2,计算氨氮浓度。

[0012] 上述中的平衡式孔隙水采样器为智感推出高分辨平衡式孔隙水采样器(HR-

Peeper),清洗和配置溶液所用水均为充氮4小时的去氧水。

[0013] 需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

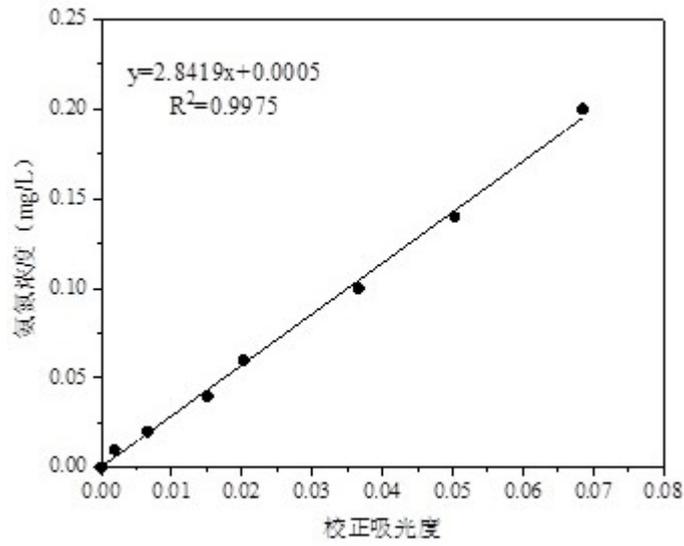


图1

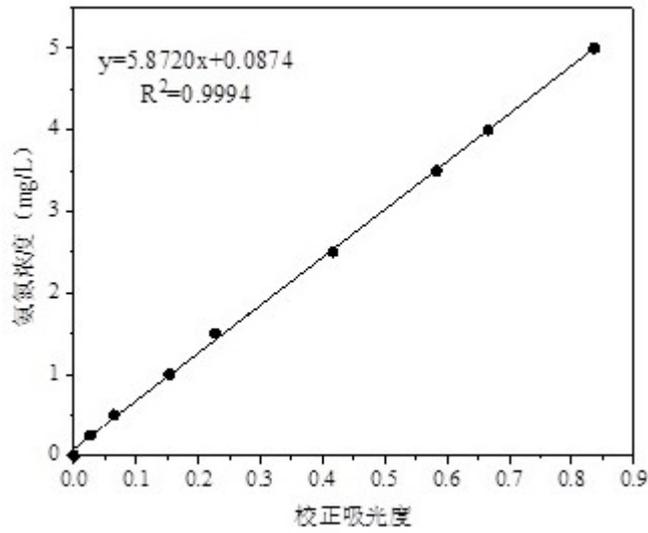


图2