

显色液组成对二氧化氮检测结果的比较分析

罗曦芸

(上海博物馆文物保护与考古科学实验室 上海 200231)

摘要: 用吸收采样法分析检测空气中二氧化氮时,亚硝酸根离子的显色反应直接关系到检测结果的灵敏度和检测下限。显色液的主要成分为重氮化试剂和偶合试剂。为了提高检测灵敏度和寻找优化的显色体系,本工作比较了对氨基苯磺酰胺和 N-1-萘乙二胺盐酸盐组成的显色液在不同浓度比和不同酸性介质中(磷酸 pH=1.5 和 1:1 盐酸 pH<0.5)对 NO₂⁻ 的显色情况。实验结果表明,当显色剂浓度适量,用磷酸为酸性介质(pH=1.5)时,短时间显色更快速灵敏。合适的显色液组成为:对氨基苯磺酰胺 4g/L, N-1-萘乙二胺盐酸盐 0.06g/L, 磷酸 28ml/L。本工作还比较了 Salzman 显色剂对同一标准系列亚硝酸根的测定结果,经线性回归分析得出:Salzman 显色剂具有显色稳定等优点,但用于二氧化氮固体吸收剂的分析时,显色灵敏度偏低。

关键词: 二氧化氮;亚硝酸根;分光光度法;显色剂

中图分类号: X510.2 **文献标识码:** A

1 前言

空气中二氧化氮除仪器检测之外,通常采用各种吸收剂吸收,用分光光度法分析定量。吸收剂按物理状态可分为液体吸收剂和固体吸收剂。我国二氧化氮检测的标准方法-Salzman 法就采用含有显色剂的水溶液为吸收剂。固体吸收剂是指将对二氧化氮气体具有特定吸收或起化学反应的试剂涂渍在固体载体上,通过动力或气体扩散作用富集二氧化氮气体。无论液体吸收剂或固体吸收剂,气相 NO₂ 通常在吸收剂中转化为 NO₂⁻ 离子,亚硝酸根离子进一步与显色剂作用生成红色偶氮化合物,在一定波长下用分光光度法分析检测。显色反应是二氧化氮检测中的主要方面之一。显色液的主要成分为重氮化试剂和偶合试剂。其中 N-1-萘乙二胺盐酸盐在 NO₂⁻ 检测中被广泛用作偶合剂,常用的重氮化试剂有:对氨基苯磺酸和对氨基苯磺酰胺。Salzman 法采用对氨基苯磺酸为重氮化试剂,而一些采用固体吸收剂的研究报道^[1-3]中,则采用对氨基苯磺酰胺为重氮试剂,在不同的酸性介质如磷酸或盐酸中显色定量。为了得到优化的显色条件,本工作采用因子分析法比较不同显色剂配比、酸性介质对分析结果的影响,通过制作标准曲线,比较不同显色剂对二氧

化氮的检测限和检测灵敏度的影响。

2 材料和方法

2.1 试剂

分析时均采用分析纯试剂和高纯水。

试剂 1: N-1-萘乙二胺盐酸盐水溶液, 1.0g/L。

试剂 2: 对氨基苯磺酸 5.0g/L, N-1-萘乙二胺盐酸盐水溶液 0.05g/L; 冰乙酸 50mL/L (Salzman 显色剂)。

试剂 3: 对氨基苯磺酰胺 10.0g/L; 浓磷酸 50mL/L。

试剂 4: 对氨基苯磺酰胺 10.0g/L; 1:1 盐酸 50mL/L。

试剂 5: 亚硝酸钠标准储备液 250mg NO₂⁻/L。

试剂 6: 亚硝酸钠标准工作液 5mg NO₂⁻/L。

试剂 7: 亚硝酸钠标准工作液 1mg NO₂⁻/L。

试剂 8: 亚硝酸钠标准工作液 0.25mg NO₂⁻/L。

2.2 仪器

Cary 50 Scan UV - visible Spectrophotometer, 1cm 比色皿, 检测波长: 540nm。

2.3 标准曲线的绘制

取 25mL 具塞比色管, 各加 0.9g 固体吸收剂, 依次加入试剂 6 为 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL,

收稿日期: 2003-04-15; 修回日期: 2003-05-22

国家文物局课题(200113)的一部分

作者信息: 罗曦芸, 女, 1962年生, 1993年毕业于华东理工大学, 应用化学专业, 硕士, E-mail: Lab_shmuseum@eastday.com.

各加纯水为 10.0, 9.0, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0mL, 盖好塞子, 强烈震荡 1min, 放置 20min, 待固体下沉后, 从各管中心吸取 2mL 于另一组比色管中, 分别依次加入不同显色剂。配制成的标准系列含 NO₂⁻ 的浓度分别 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mL。混匀, 暗处放置 20min(室温 18℃), 用 1cm 比色皿在波长 540nm 处以纯水为参比测定吸光度, 以 NO₂⁻ 浓度(μg/mL) 为横坐标, 以各管的吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

3 结果与讨论

3.1 以对氨基苯磺酰胺为重氮试剂的显色条件比较

实验中主要考虑了对氨基苯磺酰胺、N-1-萘乙二胺盐酸盐的用量以及酸性介质的选择, 利用因子设计分别对 0.05mg NO₂⁻/L 和 0.2mg NO₂⁻/L (分别吸取 2ml 试剂 8 和试剂 7 于 25mL 具塞比色管中作为样品, 按配比设计加入显色剂, 用与显色剂对应浓度酸稀释样品至 10mL, 分析显色液中各因素对样品吸光度测定值的影响, 结果如表 1 所示。

表 1 分光光度法测定 NO₂⁻ 的因子设计表

Table 1 Factor design of detecting NO₂⁻ by spectrophotometer

吸收液 配比	S		N	C		A	A'
	试剂 3	试剂 4	试剂 1	P	H	0.05mgNO ₂ ⁻ /L	0.2mgNO ₂ ⁻ /L
1	-	-	-	-	-	0.0562	0.2370
2	+	-	-	-	-	0.0535	0.2346
3	-	-	+	-	-	0.0586	0.2403
4	+	-	+	-	-	0.0564	0.2323
5	-	-	-	-	+	0.0364	0.2070
6	-	+	-	-	+	0.0340	0.2024
7	-	-	+	-	+	0.0498	0.2236
8	-	+	+	-	+	0.0487	0.2228

注:S(对氨基苯磺酰胺):(-)表示用量为 4.0mL, 显色液中浓度为 4.0g/L; (+)表示用量为 6.0mL, 显色液中浓度为 6.0g/L, N(N-1-萘乙二胺盐酸盐):(-)表示用量为 0.4mL, 显色液中浓度为 0.04g/L, (+)表示用量为 0.6mL, 显色液中浓度为 0.06g/L; C(酸性介质):(-)磷酸, (+)1:1 盐酸, A, A' 分别表示 0.05 和 0.2mgNO₂⁻/L 时的吸光度值

主效应及交叉效应计算式如下:

$$\text{主效应}(S) = [(A_2 + A_4 + A_6 + A_8) - (A_1 + A_3 + A_5 + A_7)]/4$$

$$\text{主效应}(N) = [(A_3 + A_4 + A_7 + A_8) - (A_1 + A_2 + A_5 + A_6)]/4$$

$$\text{主效应}(C) = [(A_5 + A_6 + A_7 + A_8) - (A_1 + A_2 + A_3 + A_4)]/4$$

$$\text{交叉效应}(SN) = [(A_8 + A_5 + A_4 + A_1) - (A_7 + A_6 + A_3 + A_2)]/4$$

$$\text{交叉效应}(SC) = [(A_8 + A_6 + A_3 + A_1) - (A_7 + A_5 + A_4 + A_2)]/4$$

$$\text{交叉效应}(NC) = [(A_8 + A_7 + A_2 + A_1) - (A_6 + A_5 + A_4 + A_3)]/4$$

$$\text{三交叉效应}(SNC) = [(A_8 + A_5 + A_3 + A_2) - (A_7 + A_6 + A_4 + A_1)]/4$$

上式中, A 下的角码数字代表不同吸收液配比的序号。分析结果如表 2 和表 3 所示:

表 2 当 NO₂⁻ 为 0.05mg/L 时各种效应顺序排列表

Table 2 The effect seriation of different factor when NO₂⁻ is 0.05mg/L

效应名称	C	S	SN	SNC	SC	NC	N
效应数值(A)	-0.0140	-0.0021	-0.0005	0.0002	0.0004	0.0057	0.0084

表 3 当 NO₂⁻ 为 0.2mg/L 时各种效应顺序排列表

Table 3 The effect seriation of different factor when NO₂⁻ is 0.2mg/L

效应名称	C'	S'	SN'	SC'	SNC'	NC'	N'
效应数值(A')	-0.0221	-0.0040	-0.0005	0.0013	0.0024	0.0090	0.0095

为了进一步排除实验中的不定因素的干扰,本工作参照正态分布图构造步骤对这些效应进行统计估算,结果如图 1 所示。

对于有 T 个数据的系列,累积概率 $P_i = (i - 0.5) \times 100\% / T$ 。图中,---为 $\text{NO}_2^- / \text{L} = 0.05\text{mg/L}$ 时的效应分布,——为 $\text{NO}_2^- / \text{L} = 0.2\text{mg/L}$ 时的效应分布。

从图 1 看出,效应 S(对氨基苯磺酰胺)、SNC(对

氨基苯磺酰胺、N-1-萘乙二胺盐酸盐和不同酸性介质的三交叉效应)、SC(不同酸性介质与对氨基苯磺酰胺的交叉效应)、SN(对氨基苯磺酰胺与 N-1-萘乙二胺盐酸盐的交叉效应)正好落在一条直线上,说明它们对实验结果的影响很小,可以忽略。N(N-1-萘乙二胺盐酸盐),NC(不同酸性介质与 N-1-萘乙二胺盐酸盐的交叉效应)对实验结果具有正效应,C(不同酸性介质的效应)对实验结果具有负效应。

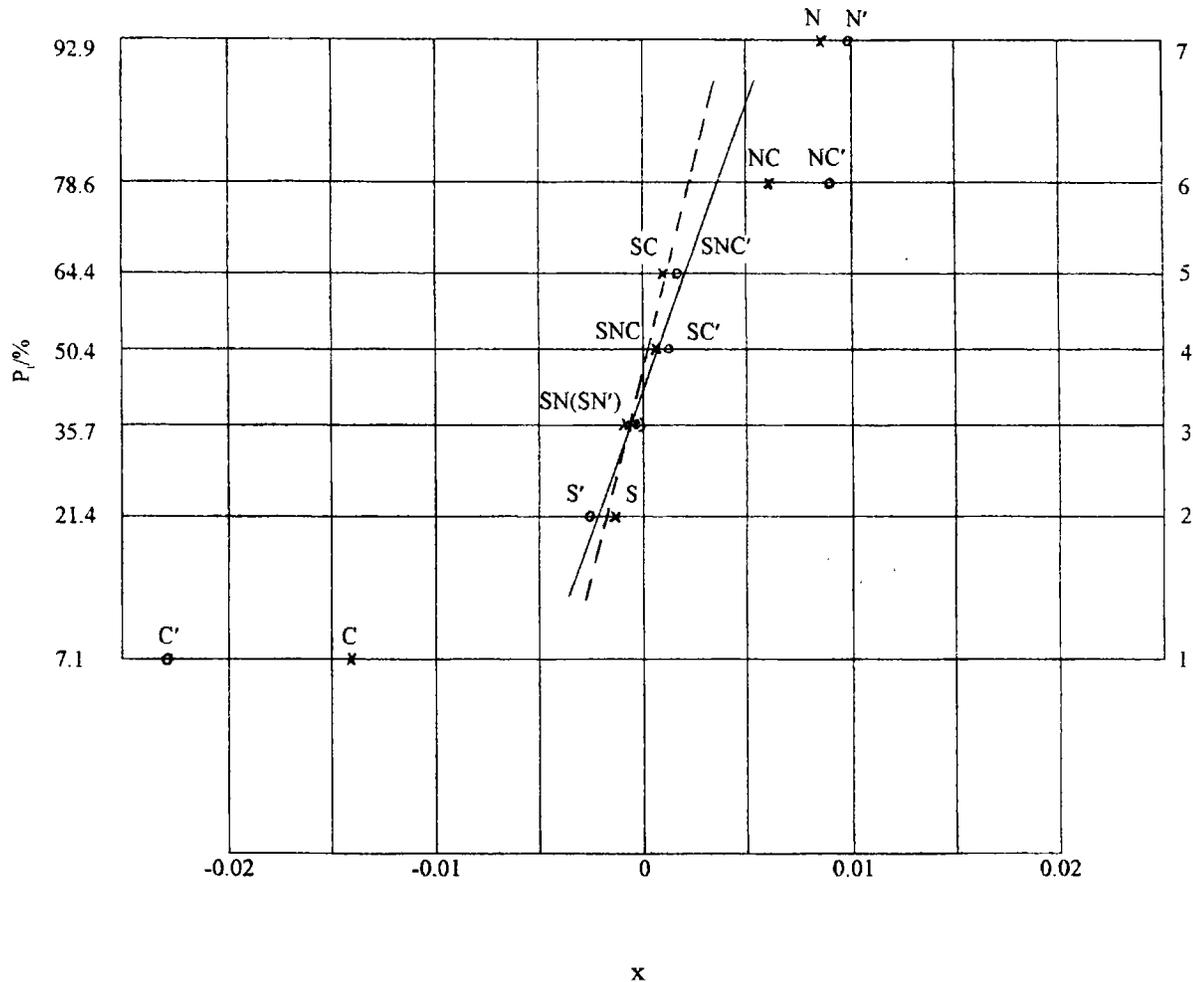


图 1 各种效应正态分布图

Fig.1 Normal school of different factors

从图 1 还可以看出,(1)当显色液中各组成的含量为:对氨基苯磺酰胺为 4g/L ,N-1-萘乙二胺盐酸盐为 0.06g/L ,以磷酸为介质时($\text{pH} = 1.5$),对同一浓度样品测定的灵敏度最高,而且显色速度快。(2)亚硝酸根与对氨基苯磺酰胺的重氮化反应虽然要求在强酸下进行,但若酸性过强,则不利于后续的显色反应,所以用 1:1 盐酸为酸性介质(pH 小于 0.5),在规定时间内显色,对同一浓度样品的测定结果偏低。

3.2 两种显色剂的比较

显色剂 1 组成:对氨基苯磺酰胺 4.0g/L ,N-1-萘乙二胺盐酸盐 0.04g/L ,磷酸 28ml/L 。

显色剂 2 组成:对氨基苯磺酰胺 4.0g/L ;N-1-萘乙二胺盐酸盐水溶液 0.04g/L ,冰乙酸 40ml/L 。

两种显色剂对不同 NO_2^- 浓度样品的测定结果如表 4 所示;以吸光度 A 为因变量,经线性回归得出标准曲线方程,检测灵敏度和检测下限,结果如表 5。

表4 显色剂对测定值(A)的影响

Table 4 The detection result influenced by different color reagent

显色剂	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	A					$A_{\text{平均}}$	sd	CV%	
1	0	0.0096	0.01	0.009	0.0098	0.011	0.0121	0.0103	0.00112	10.9
	0.1	0.1068	0.107	0.1037	0.1078	0.1198	0.1218	0.1112	0.00763	6.90
	0.2	0.2201	0.1939	0.2166	0.2091	0.2091	0.2197	0.2115	0.00988	4.70
	0.3	0.3145	0.3009	0.3103	0.3165	0.3062	0.3251	0.3123	0.00846	2.71
	0.4	0.4125	0.4013	0.4026	0.4118	0.4202	0.4248	0.4122	0.00932	2.30
	0.5	0.4973	0.4916	0.4908	0.5005	0.5105	0.5123	0.5005	0.00920	1.80
	斜率吸光度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.9708	0.9857	0.9713	0.9925	0.9986	1.0044	0.9872	0.01398	1.42
2	0	0.0085	0.0083	0.0063	0.0095	0.009	0.0089	0.0084	0.00112	13.3
	0.1	0.0812	0.0813	0.0805	0.0911	0.0858	0.0833	0.0839	0.00404	4.82
	0.2	0.1659	0.1639	0.1574	0.1789	0.1755	0.1738	0.1692	0.00816	4.83
	0.3	0.2662	0.2659	0.2597	0.2815	0.2804	0.2795	0.2722	0.00937	3.44
	0.4	0.3104	0.3098	0.3043	0.3189	0.3166	0.3087	0.3115	0.00538	1.72
	0.5	0.3976	0.3938	0.3897	0.4113	0.4068	0.4019	0.4002	0.00809	2.02
	斜率吸光度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.7810	0.7757	0.7688	0.7986	0.7961	0.7848	0.7842	0.01157	1.48

表5 两种显色剂对 NO_2^- 的显色灵敏度和检测限

Table 5 Sensitivity and limit of two kinds of color reagent

显色剂	回归方程和相关系数	灵敏度(吸光度)/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定性检测下限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量检测下限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	$A = 0.9872C + 0.0129$ $r = 0.999$	0.9872	0.0034	0.0113
2	$A = 0.7842C + 0.0115$ $r = 0.996$	0.7842	0.0043	0.0143

注:表中检测限按 IUPAC 推荐值计算^[4]。

表5结果显示:由显色剂1得到的标准曲线检测灵敏度高于显色剂2,虽然样品空白值略高,但由于灵敏度高,所以检测限仍较低。

4 结论

(1) 在由对氨基苯磺酰胺和N-1-萘乙二胺盐酸盐组成的显色液中,当显色剂适量时,用磷酸为酸性介质时,对 NO_2^- 的显色灵敏。显色液配比为:对氨基苯磺酰胺 4.0g/L, N-1-萘乙二胺盐酸盐 0.06g/L,磷酸 28ml/L。

(2) Salzman 显色液在用溶液作为吸收剂时,具有显色稳定等优点,但用作固体吸收显色中,灵敏度偏低。

参考文献:

- [1] Mullk j d, Lewis R G, McClenny W A. Modification of a High-efficiency passive sampler to determine nitrogen dioxide or formaldehyde in air[J]. Anal Chem, 1985, 61: 187.
- [2] 中国预防医学中心卫生研究所编. 大气污染监测方法[M]. 北京:化学工业出版社, 1985. 736.
The Hygiene Institute of the Preventive Medicine Center. The monitoring method of air pollution[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1985. 736.
- [3] 陈乐恬, 冬玉芹. 被动采样法测定环境空气中的二氧化氮[J]. 环境化学, 1994, 12(5): 460.
CHEN Le-tian, DONG Yu-qing. The study on measurements of ambient nitrogen dioxide by passive diffusion samplers[J]. Environ, Chem, 1994, 13(5): 460.
- [4] Analytical Methods Committee. Recommendations for the definition, Estimation and use of the detection limit[J]. Analyst, 1987, 112(2): 199-204.

The influence of the color reagent composition on the detecting result of nitrite ion

LUO Xi - yun

(The Research Laboratory for Conservation and Archaeology, Shanghai Museum, Shanghai 200231)

Abstract: In detection of NO_2 by absorbent, the reaction condition of nitrite ion with color reagent is very important. It directly influences the detection's sensitivity and detection lower limit. This experiment compared the color-developing situation of the color reagent composed by sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine in reaction with NO_2 under different concentration and acid medium like phosphoric or hydrochloride ($\text{pH} = 1.5, 1:1 \text{ HCl}$). The results show that the color developing is finished much more quickly and completely in phosphoric solution (pH near 1.5). The proper composition of color reagents is as follows: sulfanilamide 4g/L; N-1-naphthylethylenediamine 0.06g/L; phosphoric 28ml/L. This experiment also detected a series concentration of NO_2 by using different color reagents. The results showed that Salzman color reagent has low sensibility in reaction with NO_2^- , which exists in solid absorbent, although it is stable and sensitive when used in liquid absorbent.

Key words: Nitrogen dioxide; Nitrite ion; Spectrophotometer; Color reagent

· 文 摘 ·

分子技术在太平洋地区古代鱼骨分类上的最新应用

到目前为止,对于太平洋考古遗址出土的古代鱼类骨头的种属判别,通常还是依赖于相对有限数量的骨架构件的形态来分析。但是相较于其他物种而言,鱼类之间形态上的差异很有限,这就经常使对太平洋地区古代鱼骨的分类,只能精确到“科”的水平,有时偶尔能达到“属”。这种相对来说不太精确的分类,很有可能会把史前人类的捕鱼状况及其生存方式的某些重要信息给掩盖掉。新西兰奥克兰大学人类学系太平洋古生态研究实验室的 A. Nicholls 等人运用一种新的分子技术,解决了这个问题,成功地对库克岛南部 Aitutaki 岛上的考古出土鱼骨进行分类,精度达到了“种”。

此项技术最初是运用在对鲭科鱼的分类上。它通过对 16s 核糖体核糖核酸基因中的线粒体 DNA(mtDNA)的提取、放大、排序和分析来对古代鱼进行分类。根据现代文献资料中方法与基础理论方面的进度,该方法被应用于库克岛南部 Aitutaki 岛上的考古出土鱼骨。研究中,他们选择了 12s 和 16s 线粒体基因来进行分析,因为它们的变异率较低,而且在不同鱼种之间的保存状况基本相同,这些特性就使它们较易用来进行种类之间的比较。

实验首先采集了当地现存已知鱼种的样本,按照 Meyers(1989)的标准进行分类,并拍照存档。标本的软组织用消毒过的解剖刀和镊子去除并放在 70%乙醇中。

现代参照集的实验室处理:从现代组织样本中提取所有基因组 DNA,接着用多聚酶链式反应放大 16s 区段线粒体基因组。所有放大的 PCR 产物放在用溴乙非啶染色的 2%琼脂糖中,1×TA 缓冲凝胶(0.5μg/mL 溴乙非啶),透过紫外光可以被观察到。

所有 DNA 的排序都使用了应用生物系统 377 自动排序机,Sequencher v3.1.1 软件包(Gene Codes 公司)并用肉眼校正。

古代鱼骨样本选择:为了避免对相同个体重复采样,在实验分析中,最好采用相同的骨架构件,如果构件成对的情况下,要采用其中一边的构件。实验还考虑到了骨头密度对基因物质的保存影响巨大,所以在实验分析中采用了相对较理想的鱼的右上颌骨。实验发现骨头重量对核酸保留情况影响不大,而日照和风化对核酸保留状况影响巨大。

对古代鱼骨样本的实验室处理:在处理过程中要特别注意防止样品被现代物质污染。在提取基因前,所有考古样本表面用消毒过的细砂纸打磨,去掉所有表面污染物。然后用 100%乙醇清洗,用消毒过的研钵磨成细粉后放置在消毒过的 2mL Eppendorf 试管中。参照 Matisoo-Smith 的方法,采用胍基硫氰酸硅提取法,进行提取。然后,用多聚酶链式反应放大 16s 区段线粒体基因组。所有放大的 PCR 产物放在用溴乙非啶染色的 2%琼脂糖中,1×TA 缓冲凝胶(0.5μg/mL 溴乙非啶),透过紫外光可以被观察到。

所有 DNA 排序都使用了应用生物系统 377 自动排序机。从样本产生了多种序列,从而可粗略了解排序误差在产生序列变异中的作用。最后,所有成功测出的序列都用肉眼与现代标本的序列作比较,来确定鱼骨的种属。

潘晓通摘自《Archaeology》2003,45(1):133-148