

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2013.10.019

顺序注射亚硝酸盐检测仪的研制及应用*

吕颖^{1,2} 陈令新^{1**} 孙西艳¹ 付龙文¹ 冯巍巍¹

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 烟台, 264003;

2. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要 基于顺序注射分析与格里斯试剂比色法的原理, 研制了一台全自动检测环境水样中亚硝酸盐的仪器, 并成功应用于实际水样的检测. 该仪器经优化调试后的物理条件为管内径 0.8 mm、定量环长度 90 cm、反应时间 3.5 min; 格里斯化学试剂的改进结果为磷酸体积分数为 11%、磺胺(SA)浓度为 $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、N-(1-萘基)-乙二胺盐酸盐(NED 2HCl)浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 在最优化条件下, 亚硝酸盐的线性检测范围是 $10\text{--}1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 检出限为 $4.14 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 相对标准偏差 1.2%, 实际水样的加标回收率在 105.4%—122.1% 之间. 由于本仪器操作便捷、灵敏度高、抗干扰能力强, 因此适用于全自动在线实时检测.

关键词 顺序注射, 亚硝酸盐, 分光光度法, 在线监测, 水质分析.

亚硝酸盐广泛存在于水体、土壤^[1]和食品中, 被摄入人体之后, 它能与人体内胺类和酰胺化合物作用生成具有致癌作用的亚硝胺类化合物^[2], 危害人类的健康. 因此, 亚硝酸盐含量是水质和食品检测的重要指标之一. 国内外虽有仪器分析测定亚硝酸盐的报道, 如荧光法^[3-4]、离子色谱法^[2-3, 5]、高效液相色谱法^[3, 6]、分光光度法^[7-8]等, 但因仪器设备昂贵, 对操作人员的要求较高, 不适于仪器的普及. 因此, 目前亚硝酸盐检测多以手工操作为主, 国内已有关于亚硝酸盐分析装置研制成功的报道, 主要采用流动注射分析^[9-11]系统, 但这类装置易受气泡干扰.

顺序注射^[12](Sequential injection analysis, SIA)是第二代流动注射分析系统, 将顺序注射技术与分光光度法结合, 在很大程度上克服了手工操作的局限性. 常规的顺序注射主要部件是多通道选择阀和注射泵, 并需配备高精度的步进电机, 这使得仪器价格昂贵, 部件可选性差. 因此, 根据顺序注射的原理, 选取蠕动泵为动力装置, 六通阀为定量装置, 通过控制定量环的管径及长度来精确控制进样量, 实现与常规顺序注射相同的功能. 同时, 为了有效避免气泡, 本仪器将试剂泵入比色池中进行检测, 大大提高了仪器的重现性和稳定性.

本研究采用改进的顺序注射技术并结合格里斯试剂比色法^[13], 成功研制了一台全自动顺序注射仪器. 通过对该仪器的物理、化学参数等指标进行考察和优化, 成功将仪器应用于环境水样的在线实时监测. 该仪器成本低、准确度与灵敏度高, 在水质分析监测领域具有良好的应用前景.

1 材料与方法

1.1 主要部件与试剂

蠕动泵(PreFluidYZ15, 美国), 六通阀(PMF-L6, 南京南达仪器分析应用研究所), 电磁阀(DH-T-E, 海迪), 夹管阀(DIFF2, 上海), 流通池(Cuvette, 宜兴精锐光学), PLC 可编程控制器(Panasonic, 日本), 触摸屏(Panasonic, 日本), LED 光源(烟台), 所有管路均采用聚四氟乙烯(PTFE)管. 磷酸(H_3PO_4), 亚硝酸钠(NaNO_2), 磺胺(SA), N-(1-萘基)-乙二胺盐酸盐(NED 2HCl)均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司, 实验用水均为去离子水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的超纯水).

1.2 溶液的配制

载流液: 去离子水. 显色剂: 500 mL 烧杯中置入 250 mL 水和 55 mL 磷酸, 加入 22.5 g SA 和 0.025 g

2012 年 12 月 10 日收稿.

* 中国科学院“百人计划”项目资助.

** 通讯联系人, E-mail: lxchen@yic.ac.cn

NED 2HCl 溶于上述溶液中, 移至 500 mL 容量瓶, 用水稀释至标线, 混匀, 贮于棕色瓶中(2—5 °C 下保存). 亚硝酸盐的标准储备液 1($0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 去离子水. 亚硝酸盐的中间标准储备液($1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaNO_2 在 60 °C 下预先烘干 1 h, 准确称量 2.465 g, 将其溶于 500 mL 容量瓶中, 加水稀释后定容, 加入 1 mL 氯仿, 贮存于棕色玻璃瓶中(2—5 °C 下保存), 使用时根据需要逐级稀释, 至少稳定 2 个月. 亚硝酸盐的标准储备液 2($1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 取中间标准储备液 1 mL 于 1000 mL 容量瓶中, 加水稀释至标线, 摇匀.

1.3 样品采集

3 种环境水样分别采自湖泊、河流和水库, 所有水样用棕色玻璃瓶采集, 在 4 °C 下保存.

1.4 仪器的原理

仪器的流路示意图如图 1 所示, 水样中的 NO_2^- 与显色剂按一定的比例分别被蠕动泵泵入光电比色池中, 并在比色池中进行重氮和偶联显色反应, 所形成的玫瑰红色溶液在 540 nm 有最大吸收峰值^[14], 记录吸光度值, 该值与标准储备液的吸光度值进行比较, 从而得到水体中亚硝酸盐的含量.

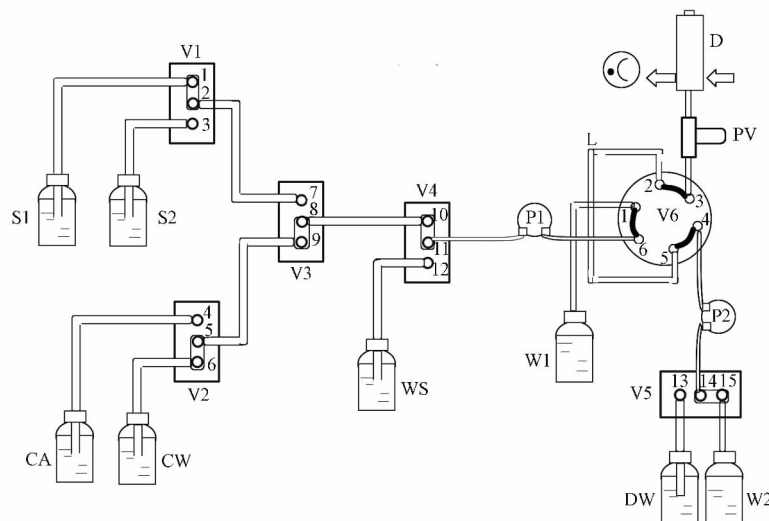


图 1 在线测定亚硝酸盐的 SIA 的流路图

V1、V2、V3、V4、V5: 电磁阀, P1、P2: 蠕动泵, V6: 六通阀, D: 光电检测装置, PV: 夹管阀, L: 定量环; S1: 标准储备液 1($0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), S2: 标准储备液 2($1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), CA: 显色剂, CW: 载流液, WS: 实际水样, W1、W2: 废液, DW: 去离子水

Fig. 1 SIA diagram of on-line nitrite determination

1.5 仪器的分析步骤

仪器采用可编程控制器 PLC 来控制各部件的动作, 同时接收、计算以及存储光电检测数据, 实现仪器的自动化运行. 具体步骤如下: (1) 清洗比色池: 电磁阀 V5 加电, 六通阀左转, 蠕动泵 P2 反转 2.1 s, 电磁阀 V5 断电, 等待 30 s, 蠕动泵 P2 正转 40 s, 如此重复以上步骤 4 次达到清洗比色池的目的. (2) 基值测量过程: 六通阀左转, 蠕动泵 P1 转动 40 s, 将载流液泵入定量环中; 六通阀右转, 蠕动泵 P2 正转 40 s, 将载流液泵入比色池. 切换电磁阀, 重复以上步骤, 分别泵入一定量环的显色剂和一定量环的载流液, 等待 3.5 min, 记录基值光电压, 然后排液清洗比色池. (3) 峰值测量过程: 六通阀左转, 蠕动泵 P1 转动 40 s, 将显色剂泵入定量环中; 六通阀右转, 蠕动泵 P2 正转 40 s, 将显色剂泵入比色池. 切换电磁阀, 重复以上步骤, 分别泵入一定量环的水样和一定量环的载流液, 等待 3.5 min, 记录水样的峰值光电压. (4) 计算过程: 根据以上所得数据, 通过朗伯比尔定律计算得到水样的吸光度值, 与标准曲线比较计算得到水样浓度.

2 结果与讨论

2.1 仪器物理参数的优化

2.1.1 进样管路的优化

仪器的流路部分用管路连接, 鉴于试剂中有酸性物质, 因此选择耐腐蚀的聚四氟乙烯管 (PTFE 管). 仪器的进样方式为顺序进样, 若管路中残存试样, 则会对下一个样的测定产生干扰, 因此, 分别选

择了 1.25、1.00、0.80 mm 内径的 PTFE 管对不同内径的进样管路进行实验. 结果表明, 选择内径为 0.80 mm 的 PTFE 管, 干扰程度最低.

2.1.2 定量环的优化

定量管是对进样液体的体积进行精确量定的, 较长的管路绕成圈使用, 防止管路弯曲折成死角, 所以定量管又称定量环^[15]. 在本仪器运行中, 试样在光电比色池中混合, 根据比色池的容积和进样试样的体积比, 最终选 90 cm 长的 PTFE 管(内径 0.80 mm) 做定量环.

2.1.3 反应时间的优化

在该仪器中, 试剂被泵入光电比色池后的等待时间就是反应时间. 反应时间与吸光度值的变化如图 2 所示, 当反应时间达到 3 min 时, 光电压值趋于稳定. 为保证反应完全使显色体系稳定, 兼顾样品检测的效率, 最终选定反应时间为 3.5 min.

2.2 化学参数的优化

影响仪器检测结果的主要化学因素包括显色剂中的磷酸的量、SA 和 NED 2HCl 的浓度. 为获得最佳检测结果, 采用单因素试验法对以上参数进行优化, 优化过程中亚硝酸盐的浓度均为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.2.1 显色剂中磷酸量的优化

在此反应体系中, 磷酸提供了反应所需的酸性介质条件, 磷酸加入量直接影响反应的酸碱度. 在 100 mL 的显色剂中加入磷酸的体积分别为 5、6、7、8、9、10、11、12 mL 时, 观察其对吸光度值的影响(图 3), 当磷酸体积小于 11 mL 时吸光度总体呈增长趋势, 达到 11 mL 时, 吸光度达到最大值, 而大于 11 mL 时, 吸光度略有下降. 因此选定磷酸的体积为 11 mL, 即磷酸体积分数为 11%.

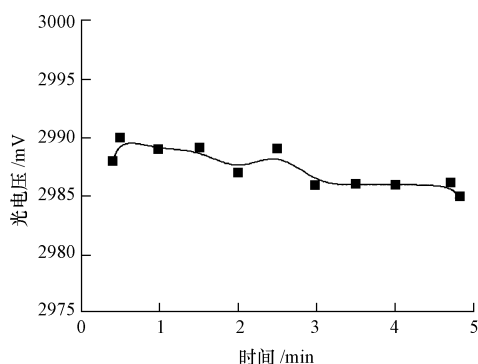


图 2 反应时间对吸光度值 A 的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on indicator absorbance

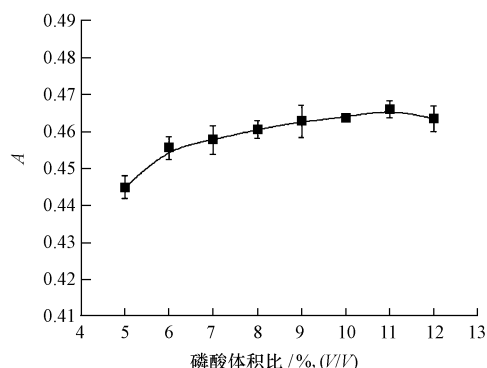


图 3 显色剂中磷酸用量对吸光度值 A 的影响

Fig. 3 Effect of phosphoric acid content in chromogenic reagent on indicator absorbance

2.2.2 SA 浓度的优化

SA 的浓度直接影响亚硝酸盐的重氮化反应效率. 改变 SA 的浓度, 观察其对实验的影响, 结果如图 4 所示, 吸光度值随着 SA 浓度的增加而增加, 而 SA 浓度达到 $50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时则很难完全溶解, 所以最终选定 SA 的浓度为 $45 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.2.3 NED 2HCl 浓度的优化

重氮化反应产物与 NED 2HCl 偶联反应形成玫瑰红色染料, NED 2HCl 的量会影响显色反应产物的量. 改变 NED 2HCl 的浓度, 观察其对实验的影响, 结果如图 5 所示, 当 NED 2HCl 浓度小于 $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时吸光度总体呈增长趋势, 达到 $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时吸光度达到最大值, 而大于 $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 吸光度略有下降. 因此最终选定 NED 2HCl 的浓度为 $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3 干扰实验

鉴于该仪器将用于实时在线监测, 因此需要考察实际水样中的常见离子对监测结果的影响. 对浓度为 $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NO_2^- 标准储备溶液进行干扰离子实验, 相对误差控制在 $\pm 5\%$ 范围内. 结果表明, 3000 倍的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- , 1000 倍的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- , 500 倍的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 SCN^- 、 I^- 、 $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5\text{COO}^-$,

以及 100 倍的 Pb^{2+} 、 CO_3^{2-} 对亚硝酸盐的测定均不产生干扰。若实际水样有颜色或悬浮物,在实际水样的管路进样口处加一个过滤装置进行过滤。对于呈碱性($\text{pH} \geq 11$)的实际水样,应先滴加磷酸溶液至中性后测定。

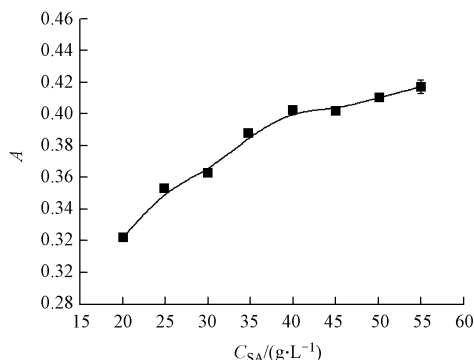


图 4 显色剂中 SA 的浓度对吸光度值 A 的影响

Fig. 4 Effect of concentration of sulfanilamide on indicator absorbance

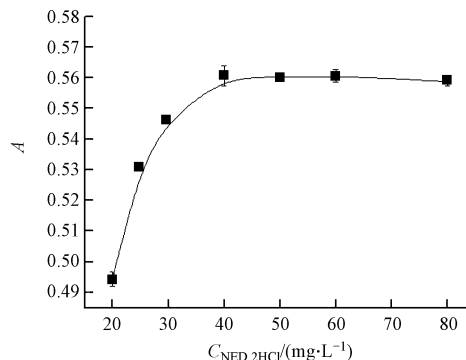


图 5 显色剂中 NED 2HCl 浓度对吸光度值 A 的影响

Fig. 5 Effect of concentration of NED 2HCl on indicator absorbance

2.4 工作曲线、精密度和检出限

配制系列浓度为 0(空白溶液)、10、40、50、100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚硝酸盐的标准工作液,按上述优化条件进行测定,以吸光度 $A(Y)$ 对亚硝酸盐的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (X) 作图,亚硝酸盐线性范围为 10—1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,线性回归方程为: $Y = 0.8917X + 0.0009$, $R^2 = 0.9999$ 。连续测定 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚硝酸盐标准溶液 10 次,相对标准偏差为 1.2%,表明仪器具有良好的精密度和稳定性。重复测定空白溶液 21 次,计算得出仪器较低的检出限为 4.14 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 实际水样分析

将仪器应用于实际水样中的亚硝酸盐的检测及回收率实验,并与水质亚硝酸盐氮的分光光度法(GB7493—87)进行对照,实验结果见表 1。本仪器测定结果与国标法手动测量结果基本一致,水样的加标回收率在 105.4%—122.1% 之间,具有较好的准确度。

表 1 水样测定结果和加标回收率实验($n = 8$)

Table 1 Results and recovery for water samples detection($n = 8$)

实际水样	本底浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$		加标量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	加标后测定结果/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/%
	本仪器检测	国标法				
样品 1	153.0	154.8	150.0	320.1	167.1	111.4
			200.0	387.1	234.1	117.1
样品 2	153.7	151.2	80.0	251.4	97.7	122.1
			180.0	354.7	201.0	116.7
样品 3	124.6	126.3	150.0	288.0	163.4	108.9
			180.0	314.3	189.7	105.4

2.6 在线实时水样的检测

将仪器安装于污水处理监测站,设定每 1 h 采样 1 次,实时数据如图 6 所示。亚硝酸盐浓度存在一定波动性,范围在 465—475 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,最高值出现在 9:00 左右,之后均呈现较高的水平,直至 22:00 开始降低并持续较低水平。生活污水排入量大,因此亚硝酸盐浓度较高,变化规律与居民生活起居规律也呈现一致的趋势。

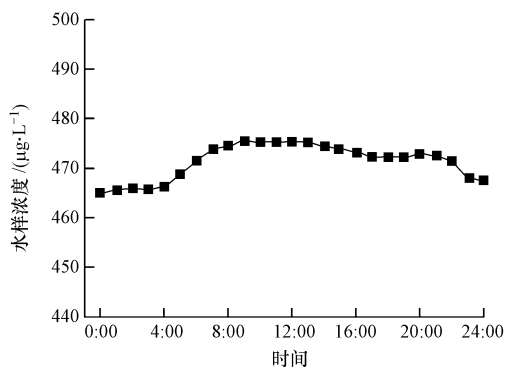


图 6 实际水样的在线实时检测

Fig. 6 On-line real-time determination of nitrite in water samples

3 结论

(1) 采用改进的顺序注射技术并结合格里斯试剂比色法, 研制了一台全自动顺序注射仪器. 该仪器使用可编程控制器 PLC 实现全自动控制; 使用六通阀定量环对试样进行精确定量, 降低成本、提高了精密密度; 在光电检测中将试剂泵入比色池中, 鼓泡混合之后检测, 克服了重现性差的缺点, 提高了稳定性.

(2) 本仪器的最佳实验条件是: 管内径为 0.8 mm, 定量环长度为 90 cm, 反应时间为 3.5 min, 磷酸体积分数为 11%, SA 浓度为 $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NED 2HCl 浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

(3) 本仪器线性范围为 $10\text{--}1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此完全能够满足常规监测的要求. 同时仪器还具有精密密度高 ($\text{RSD} = 1.2\%$)、检出限低 ($4.14 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、准确度高 (加标回收率在 105.4%—122.1% 之间) 的优点; 在实际应用中, 可进行全自动在线实时监测, 监控污染的实时状况, 符合当今监测仪器的自动化、智能化的发展方向, 在环境分析监测领域具有很好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Pasquali C E, Gallego-Pico A, Fernandez Hernando P, et al. Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples[J]. *Microchemical Journal*, 2010, 94(1): 78-82
- [2] 徐霞, 应兴华, 陈能, 等. 离子色谱法同时测定蔬菜中的亚硝酸盐与硝酸盐[J]. *环境化学*, 2005, 24(6): 733-734
- [3] Akyuz M, Ata S. Determination of low level nitrite and nitrate in biological, food and environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Talanta*, 2009, 79(3): 900-904
- [4] Wang X, Adams E, Van Schepdael A. A fast and sensitive method for the determination of nitrite in human plasma by capillary electrophoresis with fluorescence detection[J]. *Talanta*, 2012, 97(5): 142-144
- [5] Ito K, Nomura R, Fujii T, et al. Determination of nitrite, nitrate, bromide, and iodide in seawater by ion chromatography with UV detection using dilauryldimethylammonium-coated monolithic ODS columns and sodium chloride as an eluent[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(8): 2513-2517
- [6] Hord N G, Tang Y P, Bryan N S. Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 90(1): 1-10
- [7] Veena K, Narayana B. Spectrophotometric determination of nitrite using new coupling agents[J]. *Indian Journal of Chemical Technology*, 2009, 16(1): 89-92
- [8] 封永斌, 叶芝祥, 杨怀金. 孔雀石绿-溴酸钾催化分光光度法测量亚硝酸根[J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2012, 29(3): 1518-1522
- [9] Idris A M. An overview of the generations and recent versions of flow injection techniques[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2010, 40(3): 150-158
- [10] Grigoryan A A, Cornish S L, Buziak B, et al. Competitive oxidation of volatile fatty acids by sulfate- and nitrate-reducing bacteria from an oil field in Argentina[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14): 4324-4335
- [11] 苏荣国, 吴菁京, 屈锋, 等. 流动注射-化学发光流通池芯片及其在环境污染物测定中的应用[J]. *环境化学*, 2003, 22(3): 278-283
- [12] dos Santos A C V, Masini J C. Sequential injection analysis (SIA): Twenty years in a Brazilian perspective[J]. *Quimica Nova*, 2010, 33(9): 1949-1956
- [13] Senra-Ferreiro S, Pena-Pereira F, Lavilla I, et al. Griess micro-assay for the determination of nitrite by combining fibre optics-based

- cuvetteless UV Vis micro-spectrophotometry with liquid-phase microextraction[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 668(2): 195-200
- [14] Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research [J]. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and life Science*, 2007, 851(1-2): 51-70
- [15] 方肇伦. 流动注射分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 35-36

Development of a sequential injection analyzer and its application in the determination of nitrite in environmental water samples

LYU Ying^{1,2} CHEN Lingxin^{1*} SUN Xiyun¹ FU Longwen¹ FENG Weiwei¹

(1. Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

ABSTRACT

An automatic instrument based on sequential injection analysis technique and Griess reagent colorimetric method was developed and applied to the determination of nitrite in environmental water samples. The instrument's physical parameters were optimized as follow: the inner diameter of pipe, 0.8 mm; length of sample loop, 90 cm; reaction time, 3.5 min. The optimized composition of the colorimetric reagents were that the volume fraction of phosphoric acid was 11%, and concentrations of sulfonamides (SA) and N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride salt (NED 2HCl) were $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Under the optimized conditions, a linear range of 10—1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, detection limit of $4.14 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, relative standard deviation of 1.2% and recovery rate of 105.4%—122.1% were achieved. The instrument is simple, automatic, reliable and therefore applicable for on-line and real-time determination of nitrite in complex water samples.

Keywords: sequential injection analysis, nitrite, spectrophotometry, online monitoring, water quality analysis.