

0.05 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 RGD 肽作用 24h VEGF 含量变化

对照组及低、中、高剂量组 VEGF 含量分别为 (0.498 ± 0.012)、(0.624 ± 0.015)、(1.425 ± 0.015) 和 (1.868 ± 0.018) pg/ml 中、高剂量组与对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 不同浓度 RGD 肽作用 24h PKC 活性变化

由图 1 可见, RGD 肽作用 24h 后, 三个剂量组 PKC 活性显著升高, 其中, 中、高剂量组与对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

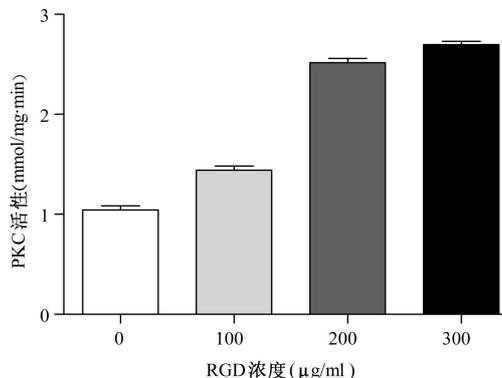


图 1 不同浓度 RGD 肽作用 24h 后 PKC 活性变化

## 3 讨论

RGD 作为一种可溶性小分子多肽, 能竞争细胞外基质中的基质蛋白, 刺激细胞表面的整联蛋白, 诱导细胞粘附和肥大<sup>[3]</sup>。VEC 功能很容易受到各种机械因素和心血管病危险因素的危害, 尤其在高血压病和高血脂症时。VEGF 为 VEC

分泌的生理活性因子之一, VEGF 特异性地作用于 VEC, 通过促进内皮细胞分裂, 诱发新血管形成, 增加血管通透性, 在心血管病中起重要作用<sup>[4]</sup>。

本研究结果表明, 100 ~ 300 mg/m RGD 肽作用于人大网膜动脉 VEC 24h 其 VEGF 分泌量明显增加。提示 RGD 能诱导 VEC 合成释放 VEGF。随着 RGD 肽浓度增加, VEGF 分泌量也增加, 说明该作用与 RGD 浓度呈正相关。

PKC 与细胞增殖有关, 介导细胞生长和增殖的信息, 调节核基因的表达。当胞浆中  $Ca^{2+}$  浓度升高时, PKC 从胞浆中转移到胞膜上并被激活, 对其底物蛋白磷酸化, 产生生理效应。本实验结果表明, RGD 肽可激活 VEC 的 PKC, 使细胞膜 PKC 活性明显升高, 该作用与 RGD 肽刺激的浓度有关。此时培养液中 VEGF 的表达也明显增加。上述结果提示 RGD 肽通过激活 PKC 使 VEGF 的表达上调。但调节 VEGF 表达升高的具体环节尚待进一步研究。

## 参考文献

- 1 WEBS M, CHERESH D A. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability [J]. Nature 2005; 437(9): 497-504.
- 2 孙黎光, 邢伟, 刘素媛, 等. 铅对大鼠海马神经细胞浓度及蛋白激酶 C 活性的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(3): 180-181
- 3 UMAR S, VAN DER VAIK E JM, SCHALIJM J et al. Integrin stimulation-induced hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes is NO-dependent [J]. Mol Cell Biochem, 2009, 320(1): 75-84
- 4 DOR Y, CAMENISCH T D, ITINA, et al. A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects [J]. Development 2001, 128(3): 1531-1538

收稿日期: 2009-07-20

文章编号: 1000-8020(2010)01-0094-03

• 实验报告 •

# 纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮试验条件的试验研究

岳银玲 樊荣涛 张岚 鄂学礼<sup>1</sup>

中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 北京 100050

**摘要:** 目的 探讨纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮试验条件与影响因素。方法 从外界氨影响、纳氏试剂稳定性、测定样品定容体积、纳氏试剂显色时间等条件对纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮的影响进行试验。结果 配制酒石酸钾钠试剂时, 使用除氨纯水并加热煮沸后测定结果可明显降低空白值; 纳氏试剂使用聚乙烯塑料瓶密封、避光保存, 可有效延长纳氏试剂的保存时间; 测试中减少一半试剂的使用量及样品取样量, 与未减少定容体积测定结果无明显差别。结论 正确选择试剂配制方法及保存条件, 控制适当的显色时间可提高测定结果的准确性及试剂的保存期; 减少样品定容体积, 可相应减少纳氏试剂中汞的使用量且对测定结果准确性无影响。

**关键词:** 纳氏试剂 水 氨氮 水检测

中图分类号: R 117

文献标识码: B

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目 (No. 2006BA D01 B06)

作者简介: 岳银玲, 女, 主管技师

<sup>1</sup> 通讯作者: 鄂学礼, 男, 研究员, E-mail: exuel@tm.com

氨氮普遍存在于地表水和地下水中, 地表水中的氨氮常常是微生物活动分解有机物的产物, 显示水体是否被有机物污染的重要指标, 水中氨氮含量可以通过分光光度法、滴定

法、流动注射法以及色谱法<sup>[1]</sup>等方法测定, 其中纳氏试剂分光光度法因其简便、准确、灵敏, 常被作为测定氨氮的首选方法。但是该方法测定水中氨氮很容易受到外界因素影响, 因此, 选择合适的实验条件, 有效降低试剂影响等因素是保证测定结果准确的关键。此外纳氏试剂中含有汞盐剧毒成份, 回收不当, 会严重污染环境, 汞可以通过呼吸和皮肤接触进入人体, 对人体健康造成极大威胁, 因此在保证试验结果准确的前提下, 尽量控制和减少纳氏试剂用量, 对操作者的健康和环境保护具有重要意义。本文通过对纳氏试剂分光光度法测试水中氨氮过程中酒石酸钾钠试剂的配制方式、纳氏试剂的保存方式、定容体积及显色时间等试验条件进行试验研究, 确定其最佳试验条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及设备

722 分光光度计、25m l 和 50m l 具塞比色管、可调移液器等。

### 1.2 主要试剂

纳氏试剂: 按照《生活饮用水标准检验方法》(GB5749—2006) 中纳氏试剂配制方法进行配制, 其中不同的是将棕色玻璃瓶容器改为聚乙烯塑料瓶密封, 避光储存方式; 酒石酸钾钠溶液 (500g/L);  $\text{NH}_4\text{-N}$  标准液: GBW 080220 100.0mg/L (国家标物中心提供);  $\text{NH}_4\text{-N}$  标准质控液: GBW 080421 20.0mg/L, 不确定度 3% (国家标物中心提供)。

### 1.3 方法

取 50m l 澄清水样于 50m l 比色管中, 另取比色管 7 支分别加入氨氮标准使用溶液, 并定容至 50m l 使其浓度分别为: 0.02, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00mg/L, 向水样及标准管内分别加入 1m l 酒石酸钾钠溶液, 混匀, 加入 1.0m l 纳氏试剂, 混匀后放置 10m in 于 420nm 波长下, 用 1cm 比色皿, 以纯水作参比, 测定其吸光度。并对其试验条件和影响因素进行探讨: 将经过处理和未经处理的酒石酸钾钠试剂对试验结果的影响进行比较; 将纳氏试剂使用聚乙烯塑料瓶密封、避光保存, 测定其稳定期; 测试中减少一半试剂的使用量及样品取样量, 与未减少定容体积测定结果经  $t$  检验比较其差别; 对显色时间和 pH 等试验条件进行测试。

## 2 结果

### 2.1 外界氨的影响

纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮试验结果容易受外界氨的影响, 在有氨存在的条件下试验, 会使试验空白偏高, 影响试验结果。氨污染来源来自多方面: 其一为空气污染, 因此要尽量避免空气中氨的影响, 远离氨污染的环境, 在洁净的实验室进行试验; 其二为试验用水和器皿污染, 因此要保证试验用水为无氨水, 试验器皿在使用前需经无氨水淋洗; 其三为试剂影响和污染, 纳氏试剂中用氯化汞代替碘化汞可降低实验结果空白值, 酒石酸钾钠试剂含有较高的氨, 不经处理会影响测定的灵敏度, 使空白值偏高, 为了降低酒石酸钾钠溶液中的氨含量, 可将试剂溶解到所需体积时加一粒 NaOH, 再经加热煮沸至不含氨为止, 用无氨水定容至所需体积。图 1 为用加 NaOH 煮沸除氨与未加 NaOH 不经煮沸过的酒石酸钾钠溶液测定氨氮时标准曲线的比较。

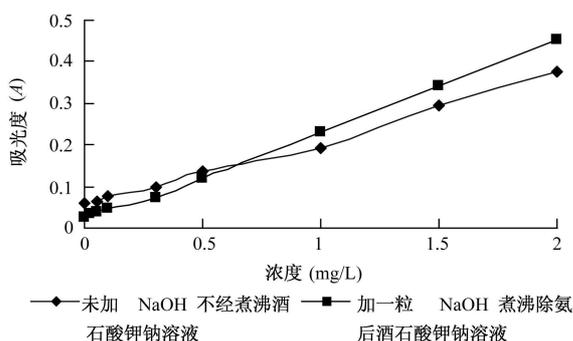


图 1 酒石酸钾钠中氨的影响

由图 1 可看出, 加 NaOH 煮沸除氨后的酒石酸钾钠溶液对氨氮进行测定, 有效降低了空白值, 曲线线性和灵敏度均优于不经煮沸的酒石酸钾钠溶液。

### 2.2 纳氏试剂稳定性

纳氏试剂是测定水中氨氮的显色剂, 国标方法是将其置于棕色玻璃瓶中, 密封、避光保存, 但该试剂 pH 范围在 11.8~12.8 属强碱性, 会严重腐蚀玻璃瓶, 约两个月后瓶底就会出现棕褐色鳞片状沉淀, 严重影响纳氏试剂的保存期以及测试结果重现性和灵敏度。为提高纳氏试剂储存过程中的稳定性, 采用聚乙烯塑料瓶代替玻璃瓶储存方式, 将其密封避光保存。现经过 12 个月的储存, 在聚乙烯塑料瓶中纳氏试剂依然澄清未出现任何沉淀。每月测定标准曲线, 线性相关系数在 0.9990~0.9998 之间, 斜率在 0.2017~0.2110 之间, 对部分曲线测定  $\text{NH}_4\text{-N}$  标准质控样品 (20.0mg/L)。结果为 19.97~20.25mg/L, 误差范围为 0.15%~1.25%, 均小于该质控样品的不确定度 (3%)。在测定曲线的同时对模拟水样和自来水加标试验, 相对标准偏差分别为 3.59%~9.41%, 自来水加标 0.50mg/L, 回收率为 98%~114% (见表 1)。

表 1 不同  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量模拟水样和自来水加标回收率测定结果

| 时间 (月)     | 模拟水样     |          |          | 自来水加标回收率 (%) |
|------------|----------|----------|----------|--------------|
|            | 0.05mg/L | 0.50mg/L | 1.00mg/L |              |
| 0          | 0.05     | 0.51     | 1.09     | 104          |
| 1          | 0.05     | 0.53     | 1.02     | 102          |
| 2          | 0.05     | 0.52     | 1.00     | 109          |
| 4          | 0.06     | 0.51     | 0.99     | 102          |
| 5          | 0.05     | 0.47     | 1.02     | 114          |
| 6          | 0.05     | 0.52     | 0.97     | 104          |
| 7          | 0.06     | 0.48     | 0.97     | 109          |
| 8          | 0.06     | 0.46     | 1.02     | 104          |
| 9          | 0.05     | 0.49     | 1.03     | 99           |
| 10         | 0.05     | 0.48     | 1.05     | 98           |
| 12         | 0.06     | 0.49     | 0.98     | 99           |
| 相对标准偏差 (%) | 9.41     | 4.62     | 3.59     | 5.76         |

由 12 个月对纳氏试剂的稳定性试验结果可以看出, 聚乙烯塑料瓶储存纳氏试剂的方式有效的延长了试剂出现沉淀的时间, 曲线线性良好, 结果准确, 重现性好, 避免了试剂的浪费。

### 2.3 样品定容体积影响

由于纳氏试剂中含有汞, 会影响操作者的健康并对环境

造成污染。为此在保证试验结果准确的条件下应尽量减少的纳氏试剂用量。本试验尝试缩小样品定容体积的方法,将标准方法中 50m l 比色管定容改成 25m l 比色管定容,测定过程中试剂、标准、样品都相应减少一半,按照《生活饮用水标准检验方法》(GB5749—2006)纳氏试剂分光光度法,对比 50m l 比色管定容和 25m l 比色管定容两种定容体积比色系列,线性

范围在  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量为 0~ 2mg/L 之间,分别进行 6 次测定,结果显示相关系数在 0.9990~ 0.9999 之间,均具有良好的线性关系。测定含量为 0.50mg/L  $\text{NH}_4\text{-N}$  模拟水样,经  $t$  检验分析,  $t = 0.013$ ,查表  $t_{0.05(6)} = 1.943$ ,  $t < t_{0.05}$ ,  $P > 0.05$ ,两种定容体积测定结果无明显差异。试验结果如表 2 所示。

表 2 50m l 比色管定容和 25m l 比色管定容测定  $\text{NH}_4\text{-N}$  标准曲线及 0.50mg/L  $\text{NH}_4\text{-N}$  结果

| 编号 | 50m l 体积定容             |        |               | 25m l 体积定容             |        |               |
|----|------------------------|--------|---------------|------------------------|--------|---------------|
|    | 回归方程                   | $r$    | 0.50mg/L 模拟水样 | 回归方程                   | $r$    | 0.50mg/L 模拟水样 |
| 1  | $Y = 0.2043X - 0.0048$ | 0.9995 | 0.49          | $Y = 0.2017X - 0.0018$ | 0.9999 | 0.51          |
| 2  | $Y = 0.2038X - 0.0039$ | 0.9995 | 0.48          | $Y = 0.2169X - 0.0059$ | 0.9998 | 0.48          |
| 3  | $Y = 0.2058X - 0.0002$ | 0.9990 | 0.48          | $Y = 0.2078X - 0.0016$ | 0.9991 | 0.49          |
| 4  | $Y = 0.2073X - 0.0009$ | 0.9990 | 0.46          | $Y = 0.2088X - 0.0028$ | 0.9995 | 0.52          |
| 5  | $Y = 0.2110X - 0.0032$ | 0.9990 | 0.47          | $Y = 0.2091X - 0.0022$ | 0.9991 | 0.52          |
| 6  | $Y = 0.2099X - 0.0050$ | 0.9995 | 0.52          | $Y = 0.2106X - 0.0016$ | 0.9994 | 0.50          |

用 25m l 体积定容代替 50m l 体积定容测定结果曲线线性良好,结果准确,同时节约了一半试剂、标准及样品的用量,对环保起到积极作用。

#### 2.4 显色时间的影响

显色时间对氨氮吸光度测定结果也有明显影响,在 25℃ 时,对  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量为 0.05、0.50 和 1.00mg/L 的样品加入纳氏试剂显色后,在不同时间测定其吸光度,结果见表 3。

由表 2 结果可以看出,加入纳氏试剂显色小于 5m in 时由于未完全反应,吸光度值偏低,10~ 30m in 显色较稳定,吸光度值最大,大于 40m in 逐渐褪色,吸光度值降低。因此纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮试验显色时间应控制在 10~ 30m in 内。

表 3 显色时间对吸光度的影响(A)

| 时间 (m in) | 0.05mg/L | 0.50mg/L | 1.00mg/L |
|-----------|----------|----------|----------|
| 5         | 0.036    | 0.128    | 0.237    |
| 10        | 0.041    | 0.130    | 0.241    |
| 30        | 0.041    | 0.131    | 0.242    |
| 40        | 0.035    | 0.126    | 0.231    |
| 60        | 0.030    | 0.120    | 0.220    |

#### 2.5 其它影响因素

纳氏试剂测定氨氮还受会 pH 的影响,水中氨氮很不稳定,采集水样后最好立即测定,否则需通过加酸、冷藏、过滤除菌等可靠措施来稳定样品。样品测定时,加入纳氏试剂显色后,水样 pH 范围应控制在 11.8~ 12.8<sup>[2]</sup> 之间,  $\text{pH} < 11.8$  不产生显色反应,  $\text{pH} > 12.8$  会使溶液变浑浊无法测定。此外纳氏试剂测定氨氮过程中还会受到温度等因素影响,温度升高时会使显色反应加快,因此测定过程中也要考虑以上几点因

素影响,以确保纳氏试剂比色法测定氨氮的准确。

### 3 讨论

通过对纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮试验条件的探讨表明:严格控制外界氨对实验的影响,试验过程中应远离有氨的环境,尽量降低试剂中氨的污染,配制酒石酸钾钠溶液时需要加 NaOH 煮沸除氨。试验过程中应把显色时间控制在 10~ 30m in,将 pH 范围控制在 11.8~ 12.8 之间,以保证试验的准确性。

纳氏试剂用传统棕色玻璃瓶储存,瓶底在 2 个月左右会出现棕褐色鳞片状沉淀,会影响到测试结果的重现性,在聚乙烯塑料瓶中贮存,现经过 12 个月实际依然澄清,没有任何沉淀,因此纳氏试剂应使用聚乙烯塑料瓶密封、避光保存,不仅保证了结果的准确性和重现性,还可有效延长纳氏试剂的保存时间。

为减少纳氏试剂对人体的危害和对环境的污染,尝试用 25m l 比色管定容体积进行试验,与 50m l 比色管定容体积对比均具有较好的线性,同时对 0.50mg/L  $\text{NH}_4\text{-N}$  模拟水样测定结果经  $t$  检验分析,没有显著差别,结果显示完全可以使用缩小样品定容体积的方法进行氨氮含量的检测。有效的节约了试剂和药品的使用量,从而减少了对环境的污染。

### 参考文献

- 张蓉,邓天龙,廖梦霞.水环境中氨氮的分析方法的进展[J].四川环境,2008,27(1):76-80
- 水和废水分析方法检测指南编委会.水和废水分析方法检测指南(上册)[M].北京:中国环境出版社,1990:138-139.

收稿日期:2009-04-13