

利用苯酚-次氯酸盐反应测定 铵离子方法的探讨

徐晨东 易蕴玉 全文海

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 对利用 Berthelot 反应测定铵离子浓度进行了细致的研究。对苯酚、NaOH 和 NaOCl 等影响因素进行了探讨, 通过正交实验确定了主次因素, 运用响应面分析方法对试剂的配比进行了优化, 并在尿素氮的测定中取得了满意的结果。

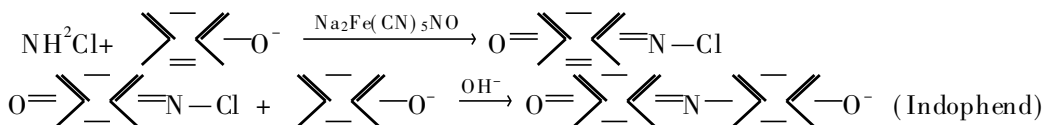
关键词 苯酚-次氯酸盐反应; 尿素; 测定方法

中图分类号 TS201.2

0 前言

苯酚-次氯酸盐方法(贝特路反应)^[1]为间接测定尿素氮或体液中的氨气氮毫克级铵离子提供了一个灵敏、可靠的方法。该法在尿素过量, 脲酶成为限速酶的条件下测定脲酶酶活。

Berthelot 反应原理:



由于贝特路反应是一个较为复杂的反应, 试剂的配方对测定结果的准确性和稳定性影响极大, 故作者对该测定方法作了进一步的探讨, 对试剂的配比进行了分析和优化, 并在尿素氮的测定中得到满意的结果。

1 材料与方法

1.1 试剂

所用苯酚、亚硝基铁氰化钠、次氯酸钠溶液(含5%活性氯)和氯化铵等试剂均为试剂纯。试剂均用超纯水配制, 以避免铵离子的影响。

1.2 试剂的配制

1.2.1 试剂 A 苯酚62 g 加0.25 g 亚硝基铁氰化钠定容至1 L, 置棕色瓶于冰箱保存, 有效期1个月。

1.2.2 试剂 B 氢氧化钠50 g 加43 ml 的含5% 活性氯的次氯酸钠溶液定容至1 L, 有效期1个月。

1.2.3 终止剂 10%的三氯乙酸。因本实验为脲酶酶活测定的预备实验, 故引入酶反应终止剂, 若是非酶促反应, 则可不用, 但试剂 A、B 的配方需作相应改变, 才能获得满意的显色反应。

1.2.4 NH_4^+ 标准溶液 5.35 g 氯化铵溶于 pH 4.0, 0.05 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液并定容至1 L, 配成0.1 mol/L NH_4^+ 溶液, 并以此溶液为母液, 用缓冲液配制0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol/L 的 NH_4^+ 标准溶液。

1.2.5 柠檬酸-柠檬酸钠 配制 pH 4.0, 0.05 mol/L 溶液。

1.3 仪器与设备

比色管, 水浴锅, 721分光光度计。

1.4 实验方法

1.4.1 最大吸收波长的确定^[2,4] 取1 ml NH_4^+ 标准溶液于试管中, 再加1 ml 缓冲液混匀于37°C水浴平衡10 min, 加入三氯乙酸1 ml 混匀, 加试剂 A 1 ml 混匀, 再加试剂 B 1 ml 混匀, 37°C保温20 min, 测 OD 值, 以确定最大吸收波长。见图1, Bertherlot 反应中最大吸收波长为625 nm。

1.4.2 显色时间的确定^[2,4] 步骤同上, 见图2, 显色时间为20 min。

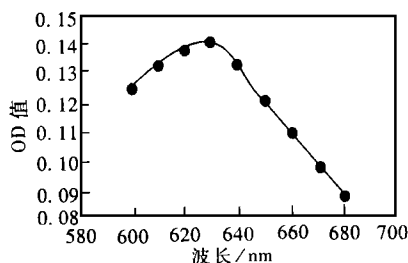


图1 最大吸收波长的确定

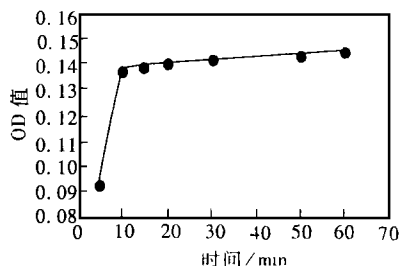


图2 显色时间的确定

1.4.3 苯酚、氢氧化钠、次氯酸钠对显色反应的影响(单因数分析)

1) 苯酚对显色反应的影响

保持试剂 B 不变, 称取12.5 mg 硝基盐 and 不同量的苯酚混合并定容至50 ml, 按上述步骤测量 OD 值的变化情况见图3。

2) 氢氧化钠对显色反应的影响

保持试剂 A 不变, 分别称取不同量的氢氧化钠和2.15 ml 的次氯酸钠溶液混合并定容至50 ml, 按上述步骤测量 OD 值的变化情况, 见图4。

3) 次氯酸钠对显色反应的影响

保持试剂 A 不变, 分别量取不同量的次氯酸钠溶液和2g 氢氧化钠混合并定容至50 ml, 按上述步骤测量 OD 值的变化情况, 见图5。

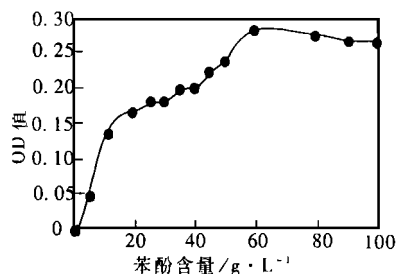


图3 苯酚对显色反应的影响

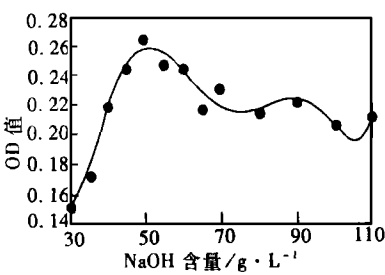


图4氢氧化钠对显色反应的影响

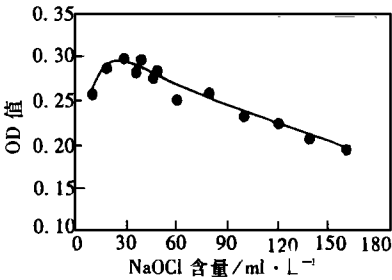


图5 次氯酸钠对显色反应的影响

2 结果与讨论

2.1 正交试验及分析

显色时间为20 min, 显色温度为37 ℃, 其中亚硝基铁氰化钠浓度为0. 25 g/L。水平与因素安排见表1。

从表2的方差分析中可以看出, 三因素对指标均无显著性影响, 即在对 OD 值无显著性影响的前提下, OD 值越高越好, 使显色反应更加完全, 即灵敏度越高。

表1 正交实验设计

水平因子	苯酚 /g·L ⁻¹	NaOH /g·L ⁻¹	NaOCl /ml·L ⁻¹
1	70	45	20
2	60	50	30
3	50	55	40

表2 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方差	F	显著性
苯 酚	140. 7	2	70. 35	0. 205	
NaOH	1652. 7	2	826. 35	2. 368	
NaOCl	184. 7	2	92. 35	0. 265	
误 差	697. 9	2	348. 95		

从直观分析中可以得出, 主次顺序为B→C→A, 最佳配比为A₂B₃C₁。

2.2 配方的优化

为了进一步探讨交互相对 OD 值的影响, 科学的优化显色剂配方, 作者采用响应面分析方法对配方进行优化。以苯酚、NaOH、NaOCl 三个因素为自变量, 以 OD 值为响应值, 设计三因素三水平的实验。见表3。

根据 Box 中心组合设计原理, 设计了三因素三水平的响应面分析实验。共有15个试验点, 其中12个是析因点, 3个为零点。零点试验重复3次, 用以估计试验误差。以 OD 值为响应值。根据表3中对实验因素与水平的安排, 进行了15次实验, 其结果见表4。

表3 三因素三水平试验

因素	编码	因素取值	水平
苯酚 /g·L ⁻¹	X ₁	- 1	50
		0	60
		1	70
NaOH /g·L ⁻¹	X ₂	- 1	45
		0	50
		1	55
NaOCl /ml·L ⁻¹	X ₃	- 1	20
		0	30
		1	40

表4 响应面分析结果

编号	X ₁	X ₂	X ₃	OD 值
1	- 1	- 1	0	0. 262
2	- 1	0	- 1	0. 304
3	- 1	0	1	0. 276
4	- 1	1	0	0. 270
5	0	- 1	- 1	0. 229
6	0	- 1	1	0. 252
7	0	1	- 1	0. 304
8	0	1	1	0. 272
9	1	- 1	0	0. 204
10	1	0	- 1	0. 262
11	1	0	1	0. 269
12	1	1	0	0. 297
13	0	0	0	0. 285
14	0	0	0	0. 284
15	0	0	0	0. 279

经回归拟合后, 各试验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3$$

由表4数据, 用 SAS PSREG 程序计算出回归方程中各系数, 见表5, 并对其进行回归方差分析以及回归各相的方差分析, 结果见表6和表7.

表5 回归方程各项系数

系数	a0	a1	a2	a3	a11	a22	a33	a12	a13	a23
值	82.66	- 10	24.5	- 3.75	- 5.46	- 18.96	0.54	21.25	8.75	- 13.75

表6 回归方程方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方差	F 值	相关系数
回 归	9	9989.266	1109.918	66.3295	0.9917
残 差	5	83.66699	16.7334		
总离差	14	10072.93			

表7 回归方程各项的方差分析

方差来源	自由度	均方差	F 值	显著性
一次项	3	1904.833	184.3387	* *
二次项	3	468.6721	45.35537	*
交互项	3	956.25	92.54033	*
失拟项	3	21.00011	2.032269	
误 差	2	10.33333		

$f_{0.01}(9, 5) = 10.2$

$f_{0.01}(3, 2) = 99.2; f_{0.05}(3, 2) = 19.2; f_{0.1}(3, 2) = 9.16$

3 结 论

从表6分析可得, 该回归模型的 F 值均大于 $f_{0.01}(9, 5)$, 线性相关系数达0.9917, 由此说明方程的应变量与全体自变量之间的线性关系明显. 根据表7, 方程的失拟项较小, 可以认为回归方程可信, 故可以用回归模型对试验结果进行分析和预测. 同时从表7方差分析还可以看出, 一次项、二次项、交互项均对OD值有显著影响. 图6为各水平下的响应曲面图,

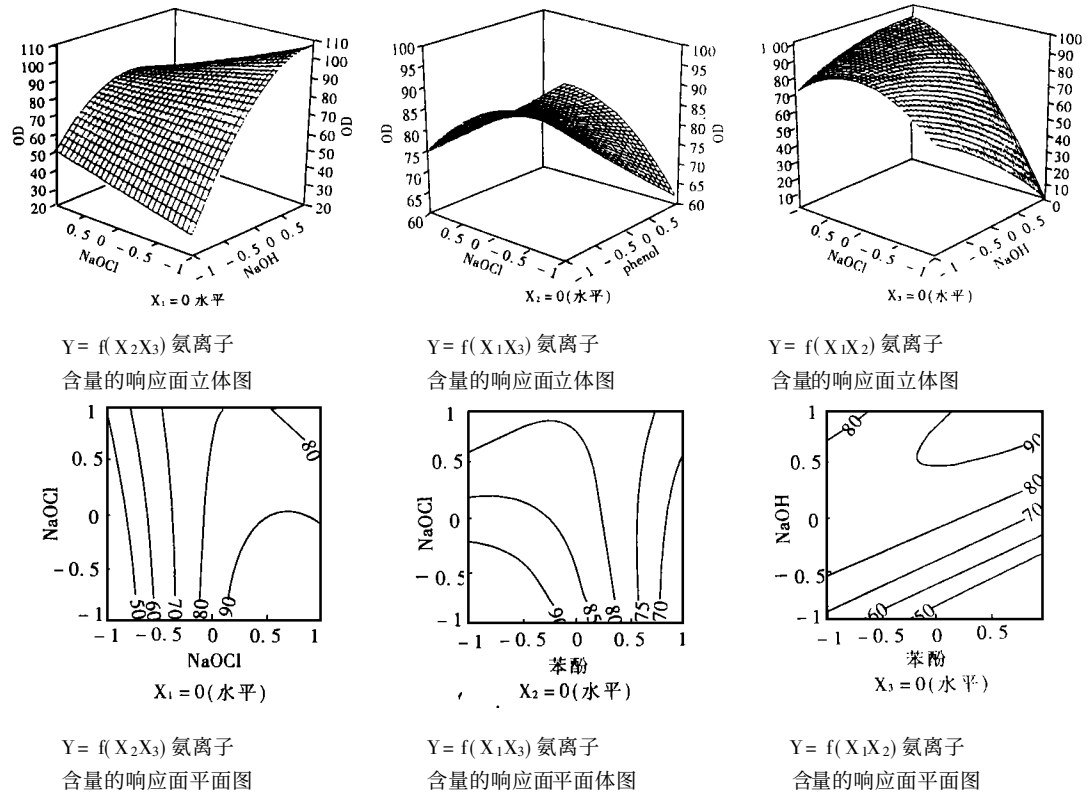


图6 各水平下的响应曲面图

由该图可知, 曲面较平滑且 OD 值较大的区域为最佳区域, OD 值在该区域波动不大, 同时显色反应完全, 灵敏度较高。

根据 RSA 分析, 确定最佳配方如下: (亚硝基铁氰化钠为 0.25 g/L)

苯酚 $X_1 = 60$ g/L; NaOH $X_2 = 52.5$ g/L; NaOCl $X_3 = 30$ ml/L.

根据上述配方, 我们得到了良好的 NH_4^+ 标准工作曲线, 其线性相关系数为 0.999 7, 并在发酵液中 NH_4^+ 的测定中均取得极其满意的结果。

参 考 文 献

- 1 Ngo T T, et al. Interference in Determination of Ammonia with the Hypochlorite Alkaline Phenol Method of Berthelot. Anal Chem, 1982, 54: 46~49.
- 2 Kaplan A. The Determination of Urea, Ammonia, and Urease. Methods of Biochemical Analysis, 1969, 17: 311~324
- 3 Weatherburn M W. Phenol Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. Analytical Chemistry, 1967, 39 (8): 971~974
- 4 Mahaboob B, Shaik M, et al. An Improved Method for the Detection and Preservation of Urease Activity in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry, 1980, 103: 140~143

Approach of Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia

Xu Chendong Yi Yunyu Quan Wenhai

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Determination of ammonium concentration by Berthelot reaction was studied in detail in this paper. The influences of Phenol, NaOH and NaOCl were investigated by single factor experiments. The importance of each factor was elucidated by orthogonal experiments and the composition of the reaction mixture was optimized by the Response Surface Analysis (RAS). The resultant reaction system was proven to be satisfactory in determining the nitrogen content of urea.

Key words phenol-hypochlorite reaction; urea; approach for determination

(责任编辑: 陈 娇)