

ICS 号

中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/ACEF □□□—20□□

基于酶标仪测定水中氨氮的试验方法

(Test method for determination of ammonia nitrogen in water based on enzyme marker)

(征求意见稿)

20□□-□□-□□发布

20□□-□□-□□实施

中 华 环 保 联 合 会 发 布

目 次

前 言	I
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	2
5 干扰和消除	2
6 试剂和材料	2
7 仪器和设备	4
8 样品	4
9 分析步骤	5
10 结果计算与表示	6
11 准确度	6
12 质量保证和质量控制	7
13 废物处理	8
14 注意事项	8

前 言

本标准在体例格式上遵循《标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则》(GB/T 1.1-2000)的规定,并参照《水利技术标准编写规定》(SL 1-2002)的要求。

本标准是对《水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法》的拓展,实现了纳氏试剂减量化,提高了测定效率。

本标准的主要内容包括:水样的保存、水样的预处理方法、酶标仪微量比色分析、方法的精密度和准确度。

本文件由中华环保联合会提出并归口。

本文件主编单位:长江水利委员会水文局

本文件参编单位:长江水利委员会水文局长江中游水文水资源勘测局、长江水利委员会水文局长江口水文水资源勘测局、上海水源地建设发展有限公司、深圳市环境科学研究院

本文件主要起草人:

基于酶标仪测定水中氨氮的试验方法

1 适用范围

本标准规定了测定水中氨氮的酶标仪微量比色法。

本标准适用于地表水、地下水、生活污水、工业废水和海水中氨氮（以N计）的测定。

当水样体积为200 μL ，使用96孔微孔板进行比色时，本方法的检出限为0.012 mg/L，测定下限为0.10 mg/L，测定上限为2.0 mg/L（均以N计）。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件中的条款。凡是不注明日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

HJ 535 水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法

GB 17378.3 海洋监测规范第3 部分：样品采集、贮存与运输

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 164 地下水环境监测技术规范

HJ 442.3 近岸海域环境监测技术规范第三部分近岸海域水质监测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 氨氮ammonianitrogen

以游离氨（ NH_3 ）或铵盐（ NH_4^+ ）形式存在于水中的氮。

3.2 酶标仪微量比色法microplate fluorimetric assay

酶标仪微量比色法的基本工作原理与光电比色计相似，它利用特定的光源照射样品，通过测量样品的吸光度或透光度来分析样品的成分和浓度。

4 方法原理

4.1 酶标仪工作原理

酶标仪工作原理与分光光度法类似。光源灯发出的光波经过滤光片或单色器变成一束单色光，进入塑料微孔板中的待测样品，该单色光一部分被样品吸收，另一部分则透过样品照射到光电检测器上。光电检测器将透射过待测样品后强弱不同的光信号转换成相应的电信号，电信号经处理后，转换成相应的浓度。

4.2 化学反应原理

以游离态的氨或铵离子等形式存在的氨氮与纳氏试剂反应生成淡红棕色络合物，该络合物的光密度与氨氮含量成正比，于波长420 nm处测量光密度。

5 干扰和消除

5.1 若样品中存在余氯，可加入适量的硫代硫酸钠溶液去除，用淀粉-碘化钾试纸检验余氯是否除尽。

5.2 若样品中存在钙镁等金属离子的干扰，可在显色时加入适量的酒石酸钾钠溶液。相对盐度为10~32的海水样品可加入适量的酒石酸钾钠-氢氧化钠溶液作为掩蔽剂。

5.3 若水样浑浊或有颜色，可用预蒸馏法或絮凝沉淀法处理。

6 试剂和材料

除非另有说明，分析时所用试剂均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为新鲜制备、电阻率大于10M Ω ·cm的无氨水。

6.1 轻质氧化镁 (MgO)

不含碳酸盐，在500℃下加热氧化镁，以除去碳酸盐。

6.2 盐酸： $\rho(\text{HCl})=1.18\text{ g/ml}$ 。

6.3 纳氏试剂，可选择下列方法的一种配制。

6.3.1 二氯化汞-碘化钾-氢氧化钾 ($\text{HgCl}_2\text{-KI-KOH}$) 溶液

称取15.0 g氢氧化钾 (KOH)，溶于50 ml水中，冷却至室温。

称取5.0 g碘化钾 (KI)，溶于10 ml水中，在搅拌下，将2.50 g二氯化汞 (HgCl_2) 粉末分多次加入碘化钾溶液中，直到溶液呈深黄色或出现淡红色沉淀溶解缓慢时，充分搅拌混合，并改为滴加二氯化汞饱和溶液，当出现少量朱红色沉淀不再溶解时，停止滴加。

在搅拌下，将冷却的氢氧化钾溶液缓慢地加入到上述二氯化汞和碘化钾的混合液中，并稀释至100 ml，于暗处静置24 h，倾出上清液，贮于聚乙烯瓶内，用橡皮塞或聚乙烯盖子盖紧，存放暗处，可稳定1个月。

6.3.2 碘化汞-碘化钾-氢氧化钠 ($\text{HgI}_2\text{-KI-NaOH}$) 溶液

称取16.0 g氢氧化钠 (NaOH)，溶于50 ml水中，冷却至室温。

称取7.0 g碘化钾 (KI) 和10.0 g碘化汞 (HgI_2)，溶于水中，然后将此溶液在搅拌下，缓慢加入到上述50 ml氢氧化钠溶液中，用水稀释至100 ml。贮于聚乙烯瓶内，用橡皮塞或聚乙烯盖子盖紧，于暗处存放，有效期1年。

6.4 酒石酸钾钠溶液： $\rho=500\text{ g/L}$ 。

称取50.0 g酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_6\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 溶于100 ml水中，加热煮沸以驱除氨，充分冷却后稀释至100 ml。

6.5 硫代硫酸钠溶液： $\rho=3.5\text{ g/L}$ 。

称取3.5 g硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 溶于水中，用水稀释至1000 ml。

6.6 硫酸锌溶液： $\rho=100\text{ g/L}$ 。

称取10.0 g硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 溶于水中，用水稀释至100 ml。

6.7 氢氧化钠溶液： $\rho=250\text{ g/L}$ 。

称取25 g氢氧化钠溶于水中，用水稀释至100 ml。

6.8 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1\text{ mol/L}$ 。

称取4 g氢氧化钠溶于水中，用水稀释至100 ml。

6.9 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 。

量取8.5 ml盐酸 (6.2) 于适量水中用水稀释至100 ml。

6.10 硼酸 (H_3BO_3) 溶液： $\rho=20\text{ g/L}$ 。

称取20 g硼酸溶于水，用水稀释至1000 ml。

6.11 溴百里酚蓝指示剂 (bromthymol blue) : $\rho = 0.5 \text{ g/L}$ 。

称取0.05 g溴百里酚蓝溶于50 ml水中，加入10 ml无水乙醇，用水稀释至100 ml。

6.12 淀粉-碘化钾试纸

称取1.5 g可溶性淀粉于烧杯中，用少量水调成糊状，加入200 ml沸水，搅拌混匀放冷。加0.50 g碘化钾 (KI) 和0.50 g碳酸钠 (Na_2CO_3)，用水稀释至250 ml。将滤纸条浸渍后，取出晾干，于棕色瓶中密封保存。

6.13 氨氮标准溶液

6.13.1 氨氮标准储备溶液: $\rho(\text{N}) = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 。

称取3.8190 g氯化铵 (NH_4Cl , 优级纯, 在100~105℃干燥2 h)，溶于水中，溶解后移入1000 ml容量瓶中，稀释至标线。该溶液在4℃下保存，可稳定6个月。或直接购买市售有证标准物质。

6.13.2 氨氮标准工作溶液: $\rho(\text{N}) = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 。

吸取5.00 ml氨氮标准储备溶液 (6.13.1) 于500 ml容量瓶中，用水稀释至刻度。该溶液4℃下保存，可稳定1个月。

7 仪器和设备

7.1 酶标仪: 具96孔微孔板。

7.2 天平: 精度为0.0001 g。

7.3 预蒸馏装置

由500 ml凯式烧瓶、氮球、直形冷凝管和导管组成，冷凝管末端可连接一段适当长度的滴管，使出口尖端浸入吸收液液面下。亦可使用500 ml蒸馏烧瓶。

7.4 一般实验室常用仪器和设备。

8 样品

8.1 样品采集与保存

按照GB 17378.3、HJ 91.1、HJ 91.2、HJ 164 和HJ 442.3 的相关规定采集样品，水样采集在聚乙烯瓶或硬质玻璃瓶内，应尽快分析。海水样品采集后在现场立即用0.45 μ m的微孔滤膜过滤，贮存于采样瓶中，-20℃以下冷冻可保存7d，冷冻保存时样品不宜过满，避免冻裂。其他类型的样品采集后贮存于采样瓶中，如需保存，应加硫酸使水样酸化至pH<2，4℃以下冷藏可保存7d。酸化样品分析前应将pH值调至中性。

8.2 样品的预处理

8.2.1 去除余氯

若样品中存在余氯，可加入适量的硫代硫酸钠溶液（6.5）去除。每加0.5 ml可去除0.25 mg余氯。用淀粉-碘化钾试纸（6.12）检验余氯是否除尽。

8.2.2 絮凝沉淀

100 ml样品中加入1 ml硫酸锌溶液（6.6）和0.1~0.2 ml氢氧化钠溶液（6.7），调节pH值约为10.5，混匀，放置使之沉淀，倾取上清液分析。必要时，用经水冲洗过的中速滤纸过滤，弃去初滤液20 ml。也可对絮凝后样品离心处理。

8.2.3 预蒸馏

将50 ml硼酸溶液（6.10）移入接收瓶内，确保冷凝管出口在硼酸溶液液面之下。分取250 ml样品，移入烧瓶中，加几滴溴百里酚蓝指示剂（6.11），必要时，用氢氧化钠溶液（6.8）或盐酸溶液（6.9）调整pH值至6.0（指示剂呈黄色）~7.4（指示剂呈蓝色），加入0.25 g轻质氧化镁（6.1）及数粒玻璃珠，立即连接氮球和冷凝管。加热蒸馏，使馏出液速率约为10 ml/min，待馏出液达200 ml时，停止蒸馏，加水定容至250 ml。

注：以上方式无法消除干扰时，应选择其他测定方法。

9 分析步骤

9.1 标准系列的制备

分别移取适量的氨氮标准使用液（6.13.2），用水稀释定容至100ml。氨氮浓度分别为：0.00 mg/L、0.10 mg/L、0.20 mg/L、0.40 mg/L、0.80 mg/L、1.20 mg/L、1.60 mg/L、2.00 mg/L。亦可用移液枪直接配制于96孔微孔板中。

9.2 标准曲线的绘制

分别移取200 μl标准系列（9.1）置于96孔微孔板中。加入4 μl酒石酸钾钠溶液（6.4），再加入纳氏

试剂6 μl (6.3.1) 或4 μl (6.3.2)。将96孔微孔板放置在酶标仪上, 振荡10 min后, 在波长420 nm下, 测量光密度。以空白校正后的光密度为纵坐标, 以其对应的氨氮含量为横坐标, 绘制标准曲线。

9.3 测定

按照与绘制标准曲线相同的条件, 进行样品的测定。

9.4 空白试验

用水代替水样, 按与样品相同的步骤进行前处理和测定。

10 结果计算与表示

水中氨氮的质量浓度按式 (1) 计算:

$$\rho_N = \frac{A_s - A_b - a}{b \times V} \quad (1)$$

式中: ρ_N ——水样中氨氮的质量浓度 (以N计), mg/L;

A_s ——水样的光密度;

A_b ——空白试验的光密度;

a ——标准曲线的截距;

b ——标准曲线的斜率;

V ——样品体积, ml。

11 准确度

11.1 精密度

6个实验室分别对氨氮浓度为0.183mg/L、0.310mg/L和0.734mg/L的统一有证标准样品重复测定6次: 实验室内相对标准偏差分别为1.8%~5.4%、1.0%~4.5%和0.8%~4.8%; 实验室间相对标准偏差分别为4.2%、3.5%和3.3%; 重复性限分别为0.020mg/L、0.027mg/L、0.068mg/L; 再现性限分别为0.022mg/L、0.031mg/L、0.068mg/L。

6个实验室分别对氨氮平均测定浓度为0.15mg/L、0.28mg/L和0.76mg/L的地表水统一样品重复测定6次: 实验室内相对标准偏差分别为1.5%~6.1%、1.9%~4.5%和1.2%~4.2%; 实验室间相对标准偏差分别

为6.5%、4.3%和2.8%；重复性限分别为0.021mg/L、0.023mg/L、0.048mg/L；再现性限分别为0.029mg/L、0.035mg/L、0.061mg/L。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为0.25mg/L的地下水统一样品重复测定6次：实验室内相对标准偏差为1.8%~5.1%；实验室间相对标准偏差为4.2%；重复性限为0.023mg/L；再现性限为0.030mg/L。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为1.02mg/L的生活污水统一样品重复测定6次：实验室内相对标准偏差为1.3%~4.4%；实验室间相对标准偏差为3.2%；重复性限为0.079mg/L；再现性限为0.092mg/L。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为7.23mg/L的工业废水统一样品重复测定6次：实验室内相对标准偏差为0.5%~4.4%；实验室间相对标准偏差为3.7%；重复性限为0.602mg/L；再现性限为0.770mg/L。

6个实验室对氨氮加标浓度为0.30mg/L的海水统一样品重复测定6次：实验室内相对标准偏差为1.0%~4.3%；实验室间相对标准偏差为3.0%；重复性限为0.033mg/L；再现性限为0.038mg/L。

11.2 正确度

6个实验室分别对氨氮浓度为0.183mg/L $\pm$ 0.009mg/L、0.310mg/L $\pm$ 0.013mg/L和0.734mg/L $\pm$ 0.037mg/L的统一有证标准样品重复测定6次：相对误差范围分别为-4.9%~4.9%、-4.2%~4.5%和-4.8%~4.9%；相对误差最终值分别为0.23% $\pm$ 8.5%、0.95% $\pm$ 7.0%和-0.44% $\pm$ 6.6%。

6个实验室分别对氨氮浓度为0.15mg/L、0.28mg/L和0.76mg/L，加标浓度分别为0.20mg/L、0.40mg/L、0.80mg/L的地表水统一样品重复测定6次：加标回收率范围分别为88.0%~111%、92.0%~108%和92.5%~108%；加标回收率最终值分别为102% $\pm$ 10%、99% $\pm$ 9.2和102% $\pm$ 9.6%。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为0.25mg/L，加标浓度为0.40mg/L的地下水统一样品重复测定6次：加标回收率范围为93.8%~109%；加标回收率最终值为101% $\pm$ 9.4%。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为0.89mg/L，加标浓度为0.80mg/L的生活污水统一样品重复测定6次：加标回收率范围为88.1%~110%；加标回收率最终值为101% $\pm$ 12%。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为0.72mg/L，加标浓度为0.80mg/L的工业废水统一样品重复测定6次：加标回收率范围为91.5%~111%；加标回收率最终值为101% $\pm$ 11%。

6个实验室对氨氮平均测定浓度为0.18 mg/L，加标浓度为0.30 mg/L 的海水统一样品重复测定6次：加标回收率范围为92.7%~110%；加标回收率最终值为101% $\pm$ 9.1%。

12 质量保证和质量控制

12.1 空白试验

每批样品需至少测定2个空白样，测定空白值不得超过方法检出限。否则应查明原因，重新分析至合格之后才能测定样品。

12.2 校准有效性检查

每批样品分析均须绘制标准曲线，标准曲线的相关系数 $r \geq 0.995$ 。

13 废物处理

实验过程中产生的废物应集中收集，分类保存，并做好相应标识，依法处置。

14 注意事项

14.1 为了保证纳氏试剂有良好的显色能力，配制时务必控制 HgCl_2 的加入量，至微量 HgI_2 红色沉淀不再溶解时为止。配制100 ml纳氏试剂所需 HgCl_2 与KI的用量之比约为2.3：5。在配制时为了加快反应速度、节省配制时间，可低温加热进行，防止 HgI_2 红色沉淀的提前出现。

14.2 应保持96孔微孔板的清洁，不要用手触碰微孔板底部。使用后可用纯水进行超声清洗。

14.3 海水样品测试前应测定盐度。相对盐度小于10的海水样品可采用本方法直接测定；相对盐度为10~32的海水样品可加入适量的酒石酸钾钠-氢氧化钠溶液作为掩蔽剂，或者采用预蒸馏法处理后，采用本方法测定。