

## 水土亚硝酸盐含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**注意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**测定意义：**

亚硝酸盐广泛存在于水体和土壤中，不仅是有机氮分解的重要中间产物，也可能来自污染。人体摄入过量后，可诱发消化系统癌变。

**测定原理：**

在酸性条件下，亚硝酸盐与对氨基苯磺酸反应生成重氮化合物，再与 N-1-萘基乙二胺形成紫红色偶氮化合物，在 540nm 处有特征吸收峰。

**自备实验用品及仪器：**

天平、常温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

**试剂组成和配制：**

提取液：液体 100mL×2 瓶，室温保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

**样品处理：**

- 土壤样品：**准确称取过筛后的土壤约 0.2g，加入 1.5 mL 提取液，室温震荡 1h，8000g，25℃离心 15min，静置，待其分层后，取上清液待测。
- 水样：**直接检测；如果浑浊，可以离心后再测定。

**测定步骤和操作表：**

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 操作表

	测定管	空白管
提取液 (μL)		70
样品 (μL)	70	
试剂一 (μL)	65	65
试剂二 (μL)	65	65
混匀，25℃静置 15min，于微量石英比色皿/96 孔板中检测 540nm 处吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

**注意：**空白管只需测定一次。

**亚硝酸盐含量计算：**

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为： $y = 0.234x + 0.0002$ ， $R^2 = 0.999$  x 为标准品亚硝酸钠浓度 (μg/ml) y 为吸光值 A。

$$\begin{aligned} (1) \text{ 土壤样品 } \text{NO}_2^- (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.234 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 0.6668 \\ &= (A - 0.086) \div 0.234 \times 1.5 \times 0.6668 \div W \\ &= 4.27 \times (\Delta A - 0.0002) \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (2) \text{ 水样 } \text{NO}_2^- (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.234 \times 0.6668 \\ &= 2.85 \times (\Delta A - 0.0002) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1.5 mL； V 样：反应中样品体积，0.07mL； W：样品质量，g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为： $y = 0.141x + 0.0002$ ， $R^2 = 0.9991$  x 为标准品亚硝酸钠浓度 (μg/ml) y 为吸光值 A。

$$\begin{aligned} (1) \text{ 土壤样品 } \text{NO}_2^- (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.141 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 0.6668 \\ &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.141 \times 1.5 \times 0.6668 \div W \\ &= 7.09 \times (\Delta A - 0.0002) \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (2) \text{ 水样 } \text{NO}_2^- (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.141 \times 0.6668 \\ &= 4.73 \times (\Delta A - 0.0002) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1.5 mL； V 样：反应中样品体积，0.07mL； W：样品质量，g。

注意事项：

1. 试剂盒 2-8℃ 保存。
2. 试剂对人体有一定的危害，请穿实验服，戴手套操作。
3. 若检测出得 OD 值在标准曲线范围外，请将样品进行适当的浓缩或稀释（ $A_{540} < 0.09$  浓缩， $A_{540} > 1.5$  适当稀释）。
4. 最低检出限为 0.5  $\mu\text{g/g}$ 。