

基于尤登设计评估纳氏试剂法测量氨氮稳健性的研究

张妮萍, 张玲, 严晓雨, 陆欣怡, 郭君霞

(中国铁路上海局集团有限公司上海铁路疾病预防控制所, 上海 200071)

摘要:基于尤登(Youden)稳健性测试,评价纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮的稳健性,考察反应时间、pH、波长、纳氏试剂加入量及反应温度五个因素在国标推荐值附近微小波动时对氨氮测定结果的影响,识别对测定结果影响显著的关键因素。结果显示,波长和纳氏试剂加入量对吸光度值的影响最为显著,其效应值均为0.016 25;反应时间、pH和反应温度在设定波动范围内影响不显著。因此,在日常氨氮监测中,应重点关注分光光度计的波长校准和纳氏试剂的准确加入,以确保检测结果的准确性和稳定性。

关键词:氨氮;纳氏试剂分光光度法;尤登稳定性实验;影响因素

中图分类号:O657.32 文献标识码:A 文章编号:1009-8143(2026)03-0053-05

Doi:10.3969/j.issn.1009-8143.2026.03.11

Evaluation of the Robustness of the Nessler's Reagent Method for Ammonia Nitrogen Measurement Based on Youden Design

Zhang Ni-ping, Zhang Ling, Yan Xiao-yu, Lu Xin-yi, Guo Jun-xia

(Shanghai Railway Disease Prevention and Control Institute, China Railway Shanghai Group Co., Ltd.,
Shanghai 200071, China)

Abstract:Based on the Youden robustness test, the robustness of the Nessler's reagent spectrophotometry for determining ammonia nitrogen in water was evaluated. The effects of minor variations in five factors—reaction time, pH, wavelength, Nessler's reagent dosage, and reaction temperature—around the values recommended by the national standard on the determination results were investigated to identify key factors with significant influence. The results showed that wavelength and Nessler's reagent dosage had the most significant effects on absorbance, each with an effect value of 0.016 25, while reaction time, pH, and reaction temperature showed no significant effects within the set variation ranges. Therefore, in routine ammonia nitrogen monitoring, attention should be paid to the wavelength calibration of the spectrophotometer and the accurate addition of Nessler's reagent to ensure the accuracy and stability of the test results.

Key words: Ammonia nitrogen; Nessler's reagent spectrophotometry; Youden robustness test; Influencing factors

引言

氨氮是环境水质监测的核心指标之一,《水质氨氮的测定纳氏试剂分光光度法》(HJ 535-2009)因其操作简便、成本低而被广泛应用。众多研究已表明在该方法中纳氏试剂加入量^[1]、反应时长^[2]、样品的pH^[3]、反应温度^[4]对测量的结果均有影响。上述研究多采用单因素法分别考察pH、温度等对氨氮测定的影响,而单因素法实验次数多、效率低。在

实际应用中,实验条件(如室温波动、试剂加入量、仪器波长偏差等)难免存在微小变化,这些变化是否会导致测定结果的显著偏差,目前尚缺乏系统性评价。

国标GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中表述稳健度可通过由实验室引入预先设计好的微小的合理变化因素,并分析其影响而得出。尤登稳健性实验(Youden's robustness test)是一种部分因子试验设计,可对分析程序

收稿日期:2026-04-01

第一作者简介:张妮萍(1987—),女,主管技师,主要从事理化检验工作。Email:nizi110351100@163.com

中各种重要的影响因素加以考察^[5],是通过对方法引入某些小的改变并检查其对结果的影响来测试的^[6]。它在较少实验次数内同时考察多个因素的微小波动对方法稳健性的影响,广泛应用于药物分析^[7]、食品检测^[6,8],和环境监测^[9]领域。

本研究采用尤登设计,围绕国标推荐值设置五个关键因素的微小波动,包括:反应时间、pH、波长、纳氏试剂加入量、反应温度,系统评价该方法对操作条件变化的敏感性。旨在识别对结果影响最大的因素,为实验室日常监测提供重点控制建议,同时为尤登设计在环境标准方法验证中的应用提供实例。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

紫外可见分光光度计:UV-2600型,岛津(上海)实验器材有限公司。

pH计:SD20型,梅特勒托利多国际有限公司。

恒温水浴锅:HH-6型,力辰科学仪器(浙江)有限公司。

纳氏试剂:碱性碘化汞钾试液,北方伟业计量集团有限公司。

氨氮标准溶液:浓度100 mg/L, $k=2$,北方伟业计量集团有限公司。

实验用水为无氨水。

1.2 实验方法

1.2.1 尤登稳健性实验设计

以国标方法(HJ 535-2009)推荐的条件作为目标值,采用尤登设计,选取5个因素A~E,分别为反

应时间、pH、波长、纳氏试剂加入量、反应温度,设置每个因素的高水平(A、B、C、D、E)和低水平(a、b、c、d、e),波动幅度模拟日常操作中的可能偏差。将上述5因素2水平按表1中8种组合方式测定,测量结果以吸光度表示,8个测定值分别用s、t、u、v、w、x、y、z表示,实验顺序随机变化进行。

1.2.2 测定步骤

配制1 mg/L的氨氮标准溶液,分装于8组50 mL比色管中。按表1的条件分别调整反应时间、pH、波长、纳氏试剂加入量和反应温度,以纯水为参比,依次测定吸光度。每个实验条件配制平行6份样品,独立测定6次,取平均值为最终测定值。

1.2.3 数据分析方法

在最终结果中,针对每个参数,将大写字母(高水平条件)对应的四个数值的均值与小写字母(低水平条件)对应的四个数值的均值进行比较。例如,为确定反应时间对吸光度值的影响,采用了以下公式(1):

$$d_{A/a} = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad (1)$$

$$d_{B/b} = \frac{s+t+w+x}{4} - \frac{u+v+y+z}{4} \quad (2)$$

$$d_{C/c} = \frac{s+u+w+y}{4} - \frac{t+v+x+z}{4} \quad (3)$$

$$d_{D/d} = \frac{s+t+y+z}{4} - \frac{u+v+w+x}{4} \quad (4)$$

$$d_{E/e} = \frac{s+u+x+z}{4} - \frac{t+v+w+y}{4} \quad (5)$$

由上述公式(1)可知,所有其他因素在上述两组1/4($s+t+u+v$)和1/4($w+x+y+z$)的每一组中两个水平都出现了两次,这样由B~E所带来的影响都被

表1 尤登实验因素与水平

Tab. 1 Factors and Levels in the Youden Experiment

因素	国标推荐值	高水平	低水平	因素组合							
				1	2	3	4	5	6	7	8
反应时间/min	10	12-A	8-a	A	A	A	A	a	a	a	a
pH	7.0	8.0-B	6.0-b	B	B	b	b	B	B	b	b
波长/nm	420	421-C	419-c	C	c	C	c	C	c	C	c
纳氏试剂加入量/mL	1.5	1.6-D	1.4-d	D	D	d	d	d	d	D	D
反应温度/℃	20	22-E	18-e	E	e	E	e	e	E	e	E
测定值	—	—	—	s	t	u	v	w	x	y	z

注:国标未详细标注纳氏试剂反应的温度,默认为室温下进行,本研究取20℃。

由b~e的影响抵消。以此类推,可求得各因素变化而引起影响的大小,分别用 $d_{A/a}$ 、 $d_{B/b}$ 、 $d_{C/c}$ 、 $d_{D/d}$ 、 $d_{E/e}$ 表示,计算过程见公式(1)~(5)。差值 d 若存在负数,则取绝对值。通过将差值 d 与该分析方法在相同条件下重复测定的标准偏差相比较,可判断该因素的影响是否显著。如果差值大于2倍标准偏差,则该因素的影响是显著的^[6]。

1.2.4 试剂空白测定

为评估纳氏试剂本底吸收对测定结果的影响,在尤登实验的相同条件下,以无氨水代替氨氮标准溶液,分别测定不同试剂加入量(1.4 mL、1.5 mL、1.6 mL)下的吸光度(选择420 nm波长,2 cm比色皿,以纯水为参比)。每个条件配制平行6份样品,独立测定6次,取均值作为试剂空白值。

1.2.5 吸收光谱扫描

为探究波长对吸光度的影响机制,在国标条件下进行了吸收光谱扫描。取50 mL 1 mg/L氨氮标准溶液,调节pH至7.0,加入1.5 mL纳氏试剂,摇匀后室温静置反应10 min。使用紫外可见分光光度计,以纯水为参比,在410~430 nm范围内以0.5 nm步长进行扫描。从加入试剂瞬间开始计时,反应至10 min整时启动扫描。

2 结果与讨论

2.1 尤登稳健性实验测定结果

8组实验的平均测定结果见表2。各因素效应值计算结果见表3,其中 $d_{C/c}=d_{D/d}>d_{A/a}>d_{B/b}>d_{E/e}$,说明波长和纳氏试剂加入量的显著性高于反应时间、pH和反应温度。

表2 尤登稳健性实验的各组测定值(n=6)

Tab. 2 Measured Values of Each Group in the Youden Robustness Test(n=6)

组别	1	2	3	4	5	6	7	8
结果表示	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>
吸光度平均值	0.462	0.485	0.448	0.458	0.435	0.454	0.450	0.463

表3 各因素效应值及显著性分析

Tab. 3 Analysis of Factor Effect Values and Significance

因素	反应时间	pH	波长	纳氏试剂加入量	反应温度
效应值 <i>d</i>	$d_{A/a}=0.012\ 75$	$d_{B/b}=0.004\ 25$	$d_{C/c}=0.016\ 25$	$d_{D/d}=0.016\ 25$	$d_{E/e}=0.000\ 25$
显著性	不显著 (<2S)	不显著 (<2S)	显著 (>2S)	显著 (>2S)	不显著 (<2S)

该方法在相同条件下平行6次重复测定的标准偏差 $S=0.007\ 98$ 。将各因素效应值与2倍标准偏差相比较,结果见表3:波长(效应值0.016 25)和纳氏试剂加入量(效应值0.016 25)的影响显著($d>2S$);其他因素(反应时间、pH、反应温度)的影响不显著($d<2S$)。

2.2 试剂空白分析

在420 nm处测定不同加入量下纳氏试剂本身的空白吸光度,结果见表4。1.4 mL与1.6 mL的空白吸光度差值为0.008。

2.3 吸收光谱特征

为探究波长对吸光度的影响机制,在410~430 nm范围内对不同纳氏试剂加入量(1.4 mL、1.5 mL、1.6 mL)

表4 不同纳氏试剂加入量下的空白吸光度
(420 nm,n=6)

Tab.4 Blank Absorbance Under Different Nessler's Reagent Addition Volumes(420 nm,n=6)

纳氏试剂加入量/mL	吸光度($\bar{x}\pm s$)
1.4	0.035 ± 0.002
1.5	0.038 ± 0.001
1.6	0.043 ± 0.002

下的样品溶液进行了吸收光谱扫描,结果见图1。在410~430 nm范围内,吸光度随波长增加呈单调递减趋势,且不同试剂加入量下的光谱形状基本一致,未观察到明显的吸收峰。在419~421 nm区间内,波长每增加1 nm,吸光度下降约0.008。

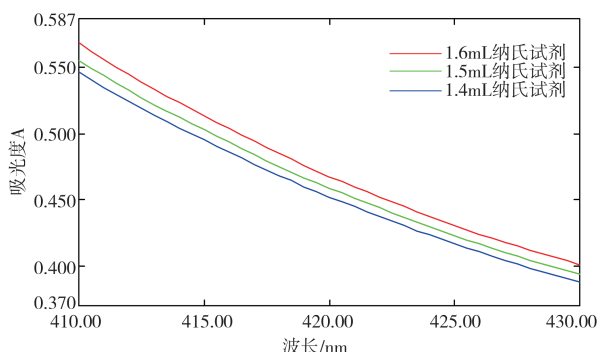


图1 不同纳氏试剂加入量下的吸收光谱(410~430 nm)

Fig.1 Absorption Spectra at Different Nessler's Reagent Addition Volumes (410~430 nm)

2.4 因素显著性分析

吸收光谱分析表明,纳氏试剂-氨氮配合物在410~430 nm范围内呈单调递减的斜线特征,因此,波长对测定结果的显著影响可归因于光谱的固有斜率。在419~421 nm区间内,波长每增加1 nm,吸光度下降约0.008。这一数值与尤登实验中波长效应值(0.016 25,对应 ± 1 nm总变化)相吻合,尤登效应值0.016 25相当于2 nm的总变化,平均每纳米变化0.008 125。这一结果解释了为何波长微小偏移(± 1 nm)会引起吸光度的显著变化:在419~421 nm这一线性区域内,吸光度对波长变化敏感。同时,不同试剂加入量下光谱形状基本一致,说明波长的敏感性是方法本身的固有特性,不受试剂加入量影响。因此,日常检测中应重点关注分光光度计的波长校准,建议定期使用标准滤光片进行验证,确保波长准确性。对于没有自动校准功能的仪器,可建立波长核查记录,掌握仪器漂移趋势,必要时进行校正。

试剂空白测定结果显示,1.4 mL与1.6 mL纳氏试剂本身的吸光度差异为0.008,占尤登实验中试剂加入量效应值(0.016 25)的49.2%。这表明试剂加入量的显著影响约一半来自试剂本底吸收的差异,另一半来自对显色反应的影响。这一发现提示,日常检测中必须保证标准曲线、样品和空白使用相同的试剂加入量,否则试剂本底的差异会引入系统误差。同时建议使用试剂空白作为参比,或在计算时扣除对应加入量的空白值。

2.5 与已有研究的联系与区别

与已有研究相比,本研究的结论在部分因素上

具有一致性,但在因素显著性的判断和实验设计方法上存在明显区别。

在纳氏试剂加入量方面,田松等^[1]研究表明增加试剂投加量可显著提升低浓度氨氮的显色灵敏度。本研究进一步证实,纳氏试剂的加入量即使在国标推荐值附近仅变化 ± 0.1 mL,吸光度变化仍显著(效应值0.016 25),并定量揭示约49%的效应来自试剂本底吸收差异,补充了现有文献对该机理的认识。

在pH和反应时间方面,田松等^[1]及周敬峰等^[2]指出pH偏低或反应时间不足会抑制显色反应。本研究在pH 6.0~8.0、反应时间8~12 min的波动范围内未观察到显著影响,表明该方法在国标推荐值附近对这两因素具有一定耐受性。在温度方面,欧瑞文^[4]研究发现15~40℃范围内温度对显色影响显著,而本研究在18~22℃的窄幅波动中未检出显著效应。上述差异源于研究目的不同:前者考察的是宽幅条件对显色完全性的影响,而本研究评估的是国标条件附近微小波动对方法稳健性的影响,二者结论互为补充。

在波长方面,周敬峰等^[2]虽关注色度等干扰,但未涉及波长本身的敏感性。本研究首次揭示纳氏试剂-氨氮显色体系在419~421 nm区间吸光度对波长变化高度敏感(每1 nm变化约0.008),为波长校准的重要性提供了直接原理证据。

在研究方法层面,已有研究多采用单因素实验或方法比对,难以在有限实验次数内同时评估多因素微小波动的综合影响。本研究引入尤登稳健性实验,仅通过8组实验即可同时考察五个因素的敏感性,为环境监测中标准方法的稳健性验证提供了可推广的范例。

3 结论

本研究采用尤登稳健性设计,系统评估了反应时间、pH、波长、纳氏试剂加入量及反应温度五个因素在国标推荐值附近微小波动时对氨氮测定结果的影响。结果表明,波长和纳氏试剂加入量对吸光度值的影响最为显著。因此,在采用纳氏试剂检测氨氮的过程中,应重点关注以下两方面质量控制要求:一是波长控制,需定期校准,确保波长准确性;建议记录波长校准数据,掌握仪器漂移趋势。二是试剂加入量控制,需确保标准曲线、样品、空白三者

加入量一致;建议使用校准过的移液器,并规范操作。对于非显著因素(pH、反应时间、温度),在设定波动范围内可适当放宽控制,节约检测成本。

此外,本研究的局限性在于仅考察了五个影响因素,实际中可能还有其他因素(如水样预处理、试剂批次等)的影响,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 田松, 沙漠, 刘志泉. 纳氏试剂法检测水中低浓度氨氮存在问题分析及方法改进探讨[J]. 中国环境监测, 2021, 39(4): 163-170.
- [2] 周敬峰, 朱红霞, 王婷, 等. 无特殊前处理条件下清洁水中低浓度氨氮测定方法的比对[J]. 中国环境监测, 2023, 39(05): 218-225.
- [3] 杨婧. pH值对废水中氨氮监测结果的影响探究[J]. 山西化工, 2023, 207(2): 185-186.
- [4] 欧瑞文. 水样温度对氨氮测定的影响[J]. 广东化工, 2017, 44(15): 242-243.
- [5] KARAGEORGOU E, SAMANIDOU V. Youden test application in robustness assays during method validation[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1353: 131-139.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则: GB 5009.295-2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- [7] Haque S M. Optimized Box-Behnken experimental design based response surface methodology and Youden's robustness test to develop and validate methods to determine nateglinide using kinetic spectrophotometry[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022, 268: 120712.
- [8] DEL NOZAL M J, LOMAS R, RUBIO L, et al. Robustness testing in the determination of seven drugs in animal muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2016, 151: 172-180.
- [9] VASILE G G, et al. An experimental design for the optimization of the extraction methods of metallic mobile fractions from environmental solid samples[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(10): 609.

《福建分析测试》启用科技期刊学术不端文献检测系统 (AMLC)

为进一步提高期刊的审稿效率、确保稿件质量;避免抄袭、一稿多投、伪造等学术不端行为,《福建分析测试》编辑部对所有来稿采用中国知网(www.cnki.net)的“科技期刊学术不端文献检测系统”(简称“AMLC”)进行自动检测,检测结果作为稿件录用的参考依据。该系统以《中国学术文献网络出版总库》为全文比对数据库,可检测抄袭与剽窃、伪造、篡改、不当署名、一稿多投等学术不端文献。

《福建分析测试》编辑部

2026年5月