

技术与方法 **Techniques and Methods****植物生理学实验中一类偶氮化合物的分光光度检测**刘少霞¹, 陈贵¹, 秦萍¹, 姚远^{2,*}沈阳农业大学¹生物科学技术学院, ²科技开发公司, 沈阳110866

摘要: 偶氮化合物在可见光特定波长下有最大吸收峰, 但对这一特定波长认定目前仍不统一。本试验利用分光光度计法测定了偶氮化合物的特定吸收峰。结果表明: NO_2^- 、对氨基苯磺酸(或磺胺)及 α -萘胺在酸性条件下形成偶氮化合物特定吸收峰在 $A_{520 \text{ nm}}$ 处, 并非 $A_{510 \text{ nm}}$ 、 $A_{530 \text{ nm}}$ 或 $A_{540 \text{ nm}}$ 。

关键词: 偶氮化合物; 吸光度; 磺胺; 对氨基苯磺酸; α -萘胺

Detection of a Kind of Azo Compound in Plant Physiology Experiment by SpectrophotometerLIU Shao-Xia¹, CHEN Gui¹, QIN Ping¹, YAO Yuan^{2,*}

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, ²Company of Sciences Technique and Development, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: It has been known that the absorption peak of azo compound will be observed under specified wavelength of visible light. However, the specified wavelength is inconsistent in different references to data. The visible absorption peak of azo compound was determined by spectrophotometry in this paper. The azo compound was generated by using the combination of naphthylamine with aminobenzene sulfonic acid, or sulfanilamide. The result shows that the absorption peak of azo compound is in $A_{520 \text{ nm}}$, rather than in $A_{510 \text{ nm}}$, $A_{530 \text{ nm}}$ or $A_{540 \text{ nm}}$ which are often used in the references.

Key words: azo compound; absorption; sulfanilamide; aminobenzene sulfonic acid; naphthylamine

当研究植物氮素代谢时, 通常要测定硝酸还原酶活性。硝酸还原酶在植物体内催化 NO_3^- 使其还原成 NO_2^- ; NO_2^- 可从植物体内渗透到体外。然后根据 NO_2^- 与对氨基苯磺酸(或磺胺)在酸性条件下生成重氮化合物, 重氮化合物和 α -萘胺反应, 形成稳定的红色偶氮化合物(对-苯磺酸-偶氮- α -萘胺)(图1)。

偶氮化合物在可见光特定波长下有最大吸收峰, 可用分光光度计来检测, 进而计算出硝酸还原酶活性。李合生(2004)书中指出在540 nm处有最大吸收峰; 而张志良和瞿伟菁(2004)、赵亚华(2005)实验指导书中则为520 nm; 另在萧浪涛和王三根(2005)书中用上述原理同样试剂测定植物根系活力和植物体内氧自由基的测定和清除时, 分别指出510 nm和530 nm为吸收峰。我们集几种对

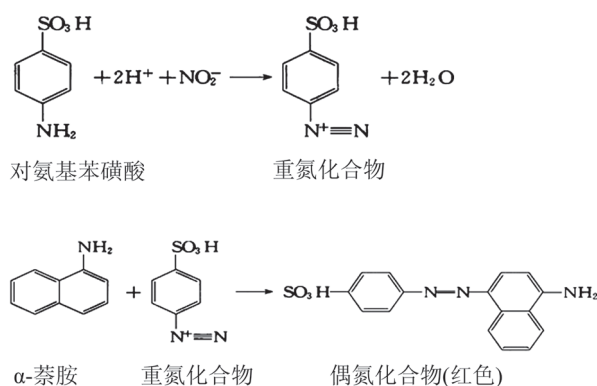


图1 偶氮化合物生成反应式

Fig.1 The reaction equation of azo compounds

本实验有关试剂配制方法, 在同等条件下进行了吸光度(A)的检验。

收稿 2011-01-17 修定 2011-03-16

* 通讯作者(E-mail: yaoyuanjane9296@sina.com; Tel: 024-88487093)。

材料与方法

1 试剂配制

本试验所用试剂及其配制方法见表1。

2 反应体系

对氨基苯磺酸与 α -萘胺以及磺胺与 α -萘胺组合的反应体系见表2、3。在表2、3的8种体系组

合中, 分别取表1中的 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对氨基苯磺酸(或 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磺胺) 4 mL、 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -萘胺4 mL、 $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaNO_2 0.4 mL, 蒸馏水1.6 mL, 使总反应体系为10 mL。此时反应体系内的对氨基苯磺酸(或磺胺)浓度为 $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 α -萘胺浓度为 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 NaNO_2 浓度为 $0.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表1 试剂配制

Table 1 The mixtures of reagent

试剂	配制法	配制过程
$10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对氨基苯磺酸溶液	盐酸溶解法 乙酸溶解法	取1 g对氨基苯磺酸加25 mL浓盐酸溶解后加水定容至100 mL。 取1 g对氨基苯磺酸加30%乙酸25 mL溶解后加水定容至100 mL。
$10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磺胺溶液	盐酸溶解法 乙酸溶解法	取1 g磺胺加25 mL浓盐酸溶解后加水定容至100 mL。 取1 g磺胺加30%乙酸25 mL溶解后加水定容至100 mL。
$2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -萘胺溶液	盐酸溶解法 乙酸溶解法 乙醇溶解法	取0.2 g α -萘胺加25 mL浓盐酸溶解后加水定容至100 mL。 取0.2 g α -萘胺加30%乙酸25 mL溶解后加水定容至100 mL。 取0.2 g α -萘胺用95%乙醇2 mL溶解后加水定容至100 mL。
$5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaNO_2 水溶液		取1 g NaNO_2 溶于1 L蒸馏水, 然后取5 mL加水稀释至1 L。
$100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对氨基苯磺酸溶液	盐酸溶解法 乙酸溶解法	取1 730 mg对氨基苯磺酸加25 mL浓盐酸溶解后加水定容至100 mL。 取1 730 mg对氨基苯磺酸加30%乙酸25 mL溶解后加水定容至100 mL。
$100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磺胺溶液	盐酸溶解法 乙酸溶解法	取1 720 mg磺胺加25 mL浓盐酸溶解后加水定容至100 mL。 取1 720 mg磺胺加30%乙酸25 mL溶解后加水定容至100 mL。
$10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -萘胺溶液	盐酸溶解法 乙酸溶解法	取0.143 g的 α -萘胺用25 mL浓盐酸溶解后加水定容至100 mL。 取0.143 g的 α -萘胺用30%乙酸25 mL溶解后加水定容至100 mL。

$10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对氨基苯磺酸溶液、 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磺胺溶液、 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -萘胺溶液和 $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaNO_2 水溶液用于继续配制反应体系中各组分。 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对氨基苯磺酸溶液、 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磺胺溶液和 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -萘胺溶液用于进一步配制不同浓度的处理。

表2 对氨基苯磺酸与 α -萘胺组合的反应体系

Table 2 Combination composition of aminobenzene sulfonic acid and naphthylamine

编号	体系组合				
	$4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对氨基苯磺酸		$0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -萘胺		
	浓盐酸	乙酸	乙酸	浓盐酸	乙醇
1	+	-	+	-	-
2	-	+	+	-	-
3	+	-	-	+	-
4	-	+	-	-	+

“+”表示此试剂参与反应,“-”表示此试剂未参与反应,下表中。

3 反应条件

上述反应体系在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴30 min后, 用上海尤尼柯仪器有限公司生产的分光光度计(UV-2000)和山东高密采虹分析仪器有限公司生产的紫外光栅分光光度计(752)比较检测吸光度($A_{500-560 \text{ nm}}$), 每隔10 nm为一测点, 并在特殊吸收峰附近每隔2 nm

表3 磺胺与 α -萘胺组合的反应体系

Table 3 Combination composition of sulfanilamide and naphthylamine

编号	体系组合			
	$4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磺胺		$0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -萘胺	
	浓盐酸	乙酸	乙酸	浓盐酸
1	+	-	-	+
2	+	-	+	-
3	-	+	-	+
4	-	+	+	-

为一测点, 以作吸收峰精细检测。

结果与讨论

1 对氨基苯磺酸与 α -萘胺组合反应体系生成偶氮化合物的吸光度检测

在表2体系组合中, 使用上海尤尼柯仪器有限公司生产的分光光度计(UV-2000)测定, 在相同条

件下生成偶氮化合物的特殊吸收峰在520 nm处(表4)。如用山东高密采虹分析仪器有限公司生产的紫外光栅分光光度计(752)测定结果趋势相似(数值略)。

2 对氨基苯磺酸与 α -萘胺组合反应体系生成偶氮化合物的吸光度精细性检测

在表4结果的基础上,用同种反应体系从514~528 nm每隔2 nm进行吸光度检测,以确定偶氮化合物吸收峰的幅度,测定数值见表5。结果表明偶氮化合物的特殊吸收峰值在518~522 nm处数值差异不明显。

3 磺胺与 α -萘胺组合反应体系生成的偶氮化合物的吸光度检测

表3体系组合中,在与表4结果相同条件下生成偶氮化合物的特殊吸收峰在520 nm处(表6)。

用两种分光光度计,在波长为500~560 nm范围中每隔10 nm和514~528 nm范围中每隔2 nm为一测点,分别测定磺胺与 α -萘胺生成偶氮化合物特殊吸收峰和对氨基苯磺酸与 α -萘胺生成偶氮化合物特殊吸收峰,其结果相比较二者趋势一致(数值略)。

4 不同浓度磺胺与 α -萘胺反应生成的偶氮化合物的吸光度

为了探讨不同浓度磺胺(或对氨基苯磺酸)与 α -萘胺反应对生成偶氮化合物特殊吸收峰的影响,本文设定浓度为1 mmol·L⁻¹的 α -萘胺(乙酸溶解法)与不同浓度磺胺(盐酸溶解法)反应生成偶氮化合物,测定结果表明:特殊吸收峰在520 nm处,但随着磺胺浓度增加,吸收峰值逐渐下降(表7)。 α -萘胺(盐酸溶解法)与磺胺(乙酸溶解法)反应结果趋势相同(数值略)。

表4 对氨基苯磺酸与 α -萘胺组合反应体系生成的偶氮化合物的吸光度

Table 4 Absorption of azo compound generated by reaction combination of aminobenzene sulfonic acid with naphthylamine

编号	吸光度($A_{500-560\text{ nm}}$)						
	500	510	520	530	540	550	560
1	0.188	0.207	0.210	0.198	0.177	0.141	0.108
2	0.222	0.236	0.242	0.230	0.218	0.175	0.135
3	0.187	0.189	0.203	0.195	0.189	0.181	0.172
4	0.245	0.259	0.264	0.254	0.242	0.199	0.157

表5 对氨基苯磺酸与 α -萘胺组合反应体系生成的偶氮化合物在514~528 nm吸光度

Table 5 Absorption in 514-528 nm of azo compound generated by reaction combination of aminobenzene sulfonic acid with naphthylamine

编号	吸光度($A_{514-528\text{ nm}}$)							
	514	516	518	520	522	524	526	528
1	0.207	0.208	0.210	0.210	0.209	0.207	0.207	0.200
2	0.237	0.239	0.242	0.242	0.241	0.239	0.235	0.233
3	0.190	0.193	0.202	0.203	0.203	0.200	0.198	0.197
4	0.261	0.263	0.263	0.264	0.264	0.260	0.257	0.255

表6 磺胺与 α -萘胺组合反应体系生成的偶氮化合物的吸光度

Table 6 Absorption of azo compound generated by reaction combination of sulfanilamide with naphthylamine

编号	吸光度($A_{500-560\text{ nm}}$)						
	500	510	520	530	540	550	560
1	0.141	0.160	0.169	0.164	0.143	0.109	0.075
2	0.140	0.161	0.168	0.163	0.147	0.108	0.074
3	0.207	0.226	0.234	0.223	0.200	0.147	0.098
4	0.330	0.371	0.386	0.366	0.314	0.253	0.168

表7 不同浓度磺胺与 α -萘胺反应生成的偶氮化合物的吸光度

Table 7 Absorption of azo compound generated by reaction combination of naphthylamine with different concentrations of sulfanilamide

磺胺/ mmol·L ⁻¹	α -萘胺/ mmol·L ⁻¹	吸光度($A_{500-560\text{ nm}}$)						
		500	510	520	530	540	550	560
0.1	1	0.122	0.134	0.136	0.126	0.117	0.109	0.053
0.2	1	0.121	0.132	0.135	0.125	0.113	0.108	0.048
0.4	1	0.117	0.128	0.129	0.120	0.109	0.105	0.041
0.6	1	0.115	0.127	0.127	0.117	0.103	0.102	0.037
0.8	1	0.114	0.126	0.124	0.114	0.007	0.003	0.031

如把磺胺换成对氨基苯磺酸其反应结果趋势相同(数值略)。

5 不同浓度 α -萘胺与磺胺反应生成的偶氮化合物的吸光度

为了探讨不同浓度 α -萘胺与磺胺(或对氨基苯磺酸)反应对生成偶氮化合物特殊吸收峰的影响,本文设定浓度为0.1 mmol·L⁻¹的磺胺(盐酸溶解法)

与不同浓度 α -萘胺(乙酸溶解法)反应生成偶氮化合物,测定结果表明:特殊吸收峰在520 nm处,但随着 α -萘胺浓度增加,吸收峰值逐渐增高(表8)。磺胺(乙酸溶解法)与 α -萘胺(盐酸溶解法)的反应结果趋势相同(数值略)。

表8 不同浓度 α -萘胺与磺胺反应生成的偶氮化合物的吸光度

Table 8 Absorption of azo compound generated by reaction combination of sulfanilamide with different concentrations of naphthylamine/

磺胺/ mmol·L ⁻¹	α -萘胺/ mmol·L ⁻¹	吸光度($A_{500-560\text{ nm}}$)						
		500	510	520	530	540	550	560
0.1	1	0.160	0.175	0.177	0.166	0.144	0.109	0.078
0.1	2	0.174	0.191	0.193	0.182	0.160	0.125	0.093
0.1	3	0.188	0.207	0.210	0.198	0.177	0.141	0.108
0.1	4	0.222	0.236	0.242	0.230	0.218	0.175	0.135
0.1	5	0.245	0.259	0.264	0.254	0.242	0.199	0.159

如把磺胺换成对氨基苯磺酸其反应结果趋势相同(数值略)。

本试验结果表明:对氨基苯磺酸(或磺胺)与 α -萘胺在酸性条件下生成的偶氮化合物的特定吸收峰为 $A_{520\text{ nm}}$,与张志良和瞿伟菁(2004)和赵亚华(2005)结果相一致。在518~522 nm处吸光度数值差异不明显。无论是在浓盐酸还是乙酸所处的酸性条件下,都不会改变偶氮化合物的特定吸收峰,但对氨基苯磺酸(或磺胺)和 α -萘胺都在乙酸溶解条件下,所生成的偶氮化合物的特定吸收峰值高于其他酸溶解;用乙酸溶解对氨基苯磺酸、用乙醇溶解 α -萘胺所生成的偶氮化合物特定吸收峰值较高,至于乙酸和乙醇在本试验中使偶氮化合物特定吸收峰值增高的机理不详?当磺胺(或对氨基苯磺酸)浓度固定时,逐渐增加 α -萘胺浓度,对偶氮化合物特定吸收峰没有影响,但吸收峰值逐渐增高,可能与 α -萘胺浓度增加有关;如果 α -萘胺浓度

固定,逐渐增加磺胺(或对氨基苯磺酸)浓度,对偶氮化合物特定吸收峰没有影响,但吸收峰值逐渐降低。至于萧浪涛和王三根(2005)书中指出特定吸收峰为510 nm和530 nm,而李合生(2004)书中在540 nm处有特定吸收峰,两者差异所在,有望同行做进一步检验,以确定偶氮化合物特殊吸收峰是520 nm,还是510 nm、530 nm或540 nm。

参考文献

- 李合生(2004). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 125~127
 萧浪涛, 王三根(2005). 植物生理学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 86~88, 68, 219
 张志良, 瞿伟菁(2004). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 41~43
 赵亚华(2005). 生物化学与分子生物学实验技术教程. 北京: 高等教育出版社, 110~112