

海水中低含量铵氮的高灵敏度荧光法测定

余翔翔, 郭卫东

(厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 提出了一种改进的、可测定海水中低含量铵氮的高灵敏度荧光分析方法。其原理是在硼酸缓冲溶液的作用下, 海水中的铵氮与邻苯二甲醛(OPA)发生衍生化反应, 通过测定生成的荧光产物来确定水体中铵氮的浓度。方法的检测限极低(0.002 5 $\mu\text{mol/L}$), 重现性好, 且水样用量少(10 mL), 适用于海水中溶解有机物的光铵化研究及其他低铵含量水样的测定。

关键词: 铵氮; 荧光法; 溶解有机物; 光铵化; 海水

中图分类号: P734.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)04-0037-05

铵氮($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)是海水中溶解无机氮的重要组成部分之一, 其含量受生物的新陈代谢、硝酸盐及亚硝酸盐的还原、海-气界面及海水-沉积物界面之间的交换等多种过程的影响。在紫外光照射下, 天然溶解有机物降解释放出铵, 这种在紫外光辐照下产生铵的作用, 被称为光铵化(photoammonification)^[1]。近年来, 光铵化作用作为水环境中活泼氮的一种来源以及在氮循环中所起的作用越来越受到人们的重视和关注。准确测定光铵化过程中微小铵含量变化对正确认识氮循环、评价海区富营养化以及揭示海洋生态学过程有着极为重要的意义。

测定铵氮的方法通常有靛酚蓝法和次溴酸钠氧化法, 此外还有溶剂萃取、HPLC、气敏电极及阳极溶出伏安法等特殊的处理手段和分析方法, 但都存在操作程序繁琐或灵敏度不高等缺点。

具有高灵敏度优点的荧光法在水环境中铵氮测定方面的应用使准确测定微量铵成为可能。荧光法的原理是基于邻苯二甲醛(OPA)与铵氮之间的荧光衍生化反应。

Goyal等^[2]较早采用OPA-2-巯基乙醇试剂组合, 大大提高了铵分析的选择性, 但基体效应显著。Genfa等^[3]随后用亚硫酸钠取代巯基乙醇试剂, 并将该方法成功运用于淡水。Holmes等^[4-6]将这种基于亚硫酸钠的荧光测定方法改进、简化, 使其适合于高盐度海水及河口环境铵的分析。作者对其方法加以改进, 提出了一种操作简便、适合于光铵化研究的小体积(10 mL水样)、可测定低含量铵的荧光分析方法。

1 材料与amp;方法

在硼酸缓冲溶液的作用下(主要起调节pH的作

用), 水样中的铵与OPA和亚硫酸钠发生选择性反应而形成荧光物质, 用荧光光谱分析手段进行检测。

1.1 仪器与试剂

Varian Eclipse 荧光分光光度计(配1 cm的石英测定池); 无铵水; 铵标准储备液(50 mmol/L); 铵标准使用液1(0.05 mmol/L); 铵标准使用液2(0.5 mmol/L); 硼酸缓冲溶液(40 g/L); 亚硫酸钠溶液(8 g/L); OPA溶液(40 g/L); 工作试剂为硼酸缓冲液: 亚硫酸钠溶液: OPA溶液(体积比) = 200: 1: 10。每10 mL标准或水样加入2.5 mL工作试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 工作曲线的制备

分别取不同体积的标准使用液1和标准使用液2, 加入10 mL MilliQ水, 配制成浓度为0~9.960 $\mu\text{mol/L}$ 的工作曲线系列。

1.2.2 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ - OPA 衍生物的荧光光谱特征

1.2.2.1 激发光谱

取浓度为2.499 $\mu\text{mol/L}$ 的铵标准溶液以及一个海水样品, 设发射波长为425 nm, 扫描测定其荧光激发光谱, 扫描范围为250~410 nm。结果表明, 激发峰的位置均在361~362 nm之间(图1), 最后选取360 nm作激发波长(λ_{ex})。

收稿日期: 2006-08-26; 修回日期: 2006-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(40676046, 40106007)

作者简介: 余翔翔(1984), 女, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物地球化学研究; 郭卫东, 通讯作者, E-mail:

wdguo@xmu.edu.cn

1.2.2.2 发射光谱

设定激发波长为 360 nm, 扫描上述样品的荧光发射光谱, 光谱扫描范围为 365~ 510 nm。结果表明, 荧光发射峰的位置均在 423~ 425 nm 之间(图 1b), 选取 425 nm 作发射波长(λ_{Em})。

1.2.2.3 仪器参数设定

根据光谱扫描结果, 仪器参数设置如下: $\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ 为 360/425; 激发和发射单色器的狭缝宽度均设为 5 nm, 光电倍增管电压设为 560 V, 采用单点测量模式 (Simple Mode)。每个样品连续读取 5 次, 取其平均值作为测定值。

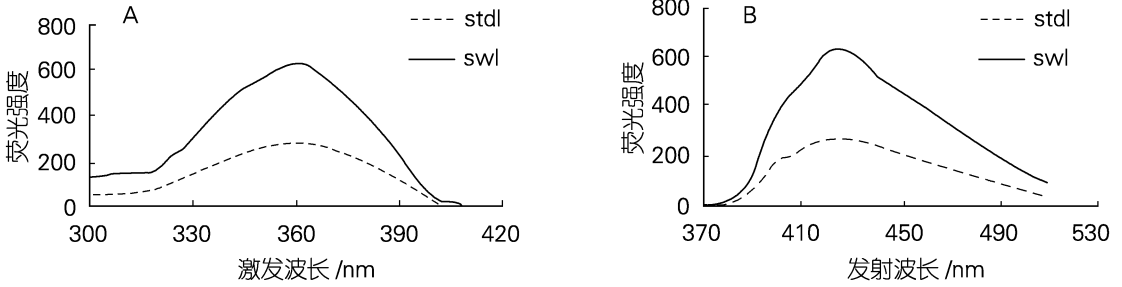


图 1 铵标准溶液和海水样品的 OPA 衍生物的激发和发射光谱

Fig. 1 Excitation emission spectra of OPA of ammonium standard solution and seawater sample

A: 激发光谱; B: 发射光谱; stdl 是浓度为 2.499 $\mu\text{mol/L}$ 的铵标准溶液; swl 是海水样品

A: excitation spectrum; B: emission spectrum; stdl: ammonium standard solution(2.499 $\mu\text{mol/L}$); swl: seawater

2 结果与讨论

2.1 样品加入工作试剂后反应时间的选取

分别测定浓度为 4.995 $\mu\text{mol/L}$ 的铵标准溶液 (std2) 以及一个海水样品 (sw2) 加入工作试剂后 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24h 的荧光强度, 以此绘制反应过程曲线(图 2)。从图中可见, 铵标准和海水样品呈现相同的反应过程特征, 在最初 3 h 内, 荧光强度都急剧上升, 之后趋于稳定, 因此选取加入工作试剂后 3~ 10 h 进行测定。为避免不同批次样品反应时间不一致带来的影响, 每批样品都同步制备工作曲线, 并与样品同步测定, 保证二者与工作试剂的反应时间和条件一致。

2.2 标准工作曲线

于配置后的 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 和 72 h 测定工作曲线。在 72 h 内工作曲线斜率变化很小(图 3), 其相对标准偏差小于 3%, 表明本方法稳定可靠。此外, 实验测得的工作曲线线性范围可达 0~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 背景荧光(background fluorescence, 简称 BF)

背景荧光由样品中自身存在的荧光物质产生, 通过往样品中加入硼酸缓冲溶液进行测定。因为荧光效率与 pH 有关, 所以加入缓冲溶液的主要作用是调节 pH。一个海水样品及其稀释 2 倍和 4 倍后的背景荧光, 以及与 MilliQ 空白的背景荧光比较见表 1。从表 1 可见, 海水的背景荧光值很低, 不及 MilliQ 水空白的 10%。

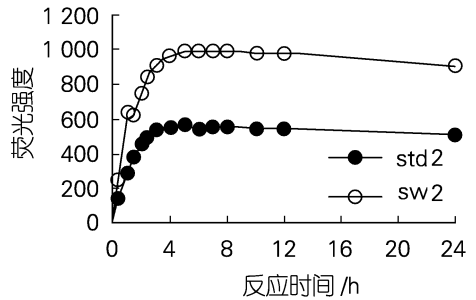


图 2 反应时间曲线

Fig. 2 Reaction time curve

Std2 为浓度为 4.995 $\mu\text{mol/L}$ 的铵标准溶液, SW2 为海水样品。

Std2: ammonium standard solution(4.995 $\mu\text{mol/L}$); SW2: seawater.

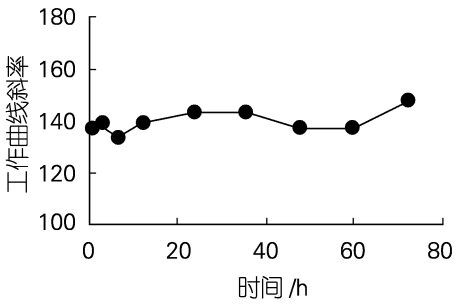


图3 72 h内工作曲线的斜率

Fig. 3 Variability of slope of calibration curve within 72 h

表1 海水样品与 MilliQ 的背景荧光比较

Tab. 1 Comparison of background fluorescence between seawater samples and MilliQ blank

样品名称	稀释倍数	荧光值		F_{blank}
		平均值	标准偏差	$F_{sample}(\%)$
sw F1	1	0.926	0.427	7.67
sw F2	2	0.494	0.125	4.09
sw F4	4	0.276	0.037	2.29
MilliQ 空白	12.074			

2.4 基体校正(matrix effect, 简称 ME)

海水中存在的盐分、溶解有机物等大量基体物质与 OPA 竞争,使得海水样中铵 OPA 衍生物的荧光强度低于纯水中同浓度铵的 OPA 衍生物的荧光强度,这种现象称为基体效应。该效应可通过同时往样品和某一标准溶液中添加相同浓度的铵标准溶液来校正^[6]。以浓度为 0.250 μmol/L 的标准溶液作参比,加标量为 0.5 μmol/L,6 个海水样品校正后的回收率接近 100%,而未校正的回收率只有 93%~97%。

2.5 方法检测限、精密度和重现性

在最佳条件下,对 MilliQ 水空白和浓度为 2.499 μmol/L 的铵标准溶液连续测定 10 次,由荧光信号标准偏差的 3 倍与工作曲线斜率之比,得到检测限分别

为 0.002 0 μmol/L 和 0.002 5 μmol/L。对 8 个不同的海水样品连续取样测定 10 次,相对偏差(RSD)均 < 1%,表明方法的重现性很好。

2.6 光铵化实验样品测定

从 Skagerrak 海 200 m 水深处采集 5 L 海水样品,先后经 0.7 μmGF/F 和 0.2 μm 聚碳酸酯滤膜过滤,并将采集的水样分成暗处对照和 UV-A 照射两组。于实验开始及其后 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 取样,测定两组样品的铵含量,结果见图 4。从图 4 可见,即使是铵浓度很低(0.14 μmol/L)的深海样品,该方法也能准确测定。与对照组相比,可以观测到虽然小(~0.2 μmol/L)但却十分明显的由紫外光降解溶解有机氮(DON)导致的铵含量的增加。这充分显示了荧光法测定低铵海水样品的极大优越性。

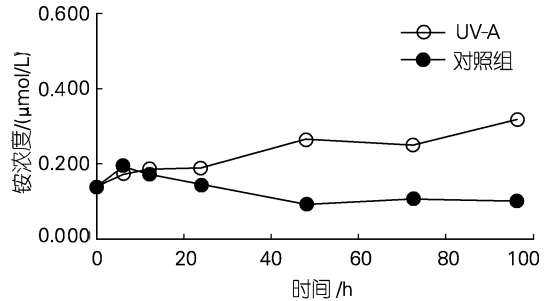


图4 光降解过程中铵浓度随时间变化曲线

Fig. 4 Content time curve of ammonium in photoammonification experiment

2.7 几种铵分析方法的比较

表 2 对几种铵分析方法进行了比较,其中次溴酸钠氧化法和靛酚蓝法的资料分别引自文献[7, 8]。

从表 2 可以看出,荧光分析法是一种测定海水中铵含量的极具灵敏性的手段。由于其检测限很低,可适用于寡营养海区极低铵含量水样的海上现场测定^[4]。此外,该方法重现性好,空白低,操作简便,所用试剂无毒,稳定,易保存。如果改变海水样与试剂的比例,该方法也可测定高浓度铵的海水样品,因此具有广泛的适用性^[6]。

表 2 几种铵分析方法的比较

Tab. 2 Comparison of several methods for ammonium determination

参数与条件	方法		
	次溴酸钠氧化法 ^[7]	靛酚蓝法 ^[8]	荧光法
检测下限($\mu\text{mol/L}$)	0.03	0.05	0.002-5
精密度(%)	± 7.0 ($1.00 \mu\text{mol/L}$) ± 3.0 ($7.0 \mu\text{mol/L}$)	± 4.0 ($0.70 \mu\text{mol/L}$) ± 2.5 ($3.20 \mu\text{mol/L}$)	± 1
选择性	受到氨基酸、尿素等含氮组分的影响	单一铵分析	单一铵分析
试剂保存	溴酸钾-溴化钾溶液, 1-萘替乙二胺二盐酸盐 溶液需低温保存	苯酚-亚硝基铁氰化钠 混合试剂,低温保存	常温暗处。OPA需存放 于冰箱中,在配制过程 中需避光
工作试剂稳定性	次溴酸钠氧化剂溶液需 临用前配制,在 35°C 以 下稳定8h	次氯酸钠碱性溶液,需低 温保存,有效期为2星期。	单一混合试剂,常温暗 处可稳定6个月
测定方式	间接测定。需同时测定 水样的亚硝酸盐浓度, 并予以扣除	直接测定	直接测定
测定仪器	分光光度计	分光光度计	荧光光谱仪

3 结论

作者改进的铵氮荧光分析方法,工作曲线线性范围可达 $0\sim 10 \mu\text{mol/L}$,72h内测定的工作曲线斜率变化不大,表明方法稳定可靠。由MilliQ水空白和浓度为 $2.499 \mu\text{mol/L}$ 的铵标准溶液得到的检测限分别为 $0.002 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.0025 \mu\text{mol/L}$,方差均小于1%。海水样品的基体效应可方便地通过加标法得到校正。实验结果表明,这种取样量小(10 mL)的荧光检测方法精密度高、重现性好,非常适用于光敏化研究及其他低铵含量海水样品的测定。

致谢:丹麦国家环境研究所的Colin Stedmon博士和Winne Martinsen女士提供实验协助。

参考文献:

[1] Bushaw K L, Zepp R G, Tarr M A, *et al*, Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter [J]. **Nature**, 1996, 381: 404-407.

[2] Goyal S S, Rains D W, Huffaker R C, Determination of ammonium ion by fluorometry or spectrophotometry

try after on line derivation with σ phthalaldehyde [J]. **Anal Chem**, 1988, 175-179.

[3] Genfa Z, Dasgupta P K. Fluorometric measurement of aqueous ammonium ion by in a flow injection system [J]. **Anal Chem**, 1989, 61: 408-412.

[4] K rouel R, Aminot A. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis [J]. **Mar Chem**, 1997, 57: 265-275.

[5] Aminot A, K rouel R, Birot D. A flow injection fluorometric method for the determination of ammonium in fresh and saline waters with a view to in situ analyses [J]. **Water Research**, 2001, 35 (7): 1777-1785.

[6] Holmes R M, Aminot A, K rouel R, *et al*. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems [J]. **Can J Fish Aquat Sci**, 1999, 56: 1801-1808.

[7] 海洋调查规范[S]. GB12763.4-91.

[8] Aminot A, Kirkwood D S, K rouel R. Determination of ammonia in seawater by the indophenol blue method: Evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire [J]. **Mar Chem**, 1997, 56: 59-75.

Sensitive spectrofluorimetric method for determination of low concentration ammonium in seawater

YU Xiang-xiang, GUO Weirong

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Aug., 26, 2006

Key words: ammonium; spectrofluorimetry; DOM; photoammonification; seawater

Abstract: This paper provided a revised sensitive spectrofluorimetric method for determination of low ammonium of seawater samples. The principle of the method is to detect the fluorometric product from reaction between orthophthalaldehyde and ammonium in boric acid buffer solution. The detection limit is 0.0025 $\mu\text{mol/L}$ and the repeatability is lower than 1%. This method, which required only a small volume (10 mL) of seawater samples, is suitable for photoammonification study of dissolved organic matter and determination of other low ammonium seawater samples.

(本文编辑:张培新)