顺序注射-化学发光法测定海水中皮摩尔级 Fe(Ⅱ)浓度

王乐全, 翁宇昂, 王文朋, 王　虎

(同济大学 海洋地质全国重点实验室, 上海 200092)

摘要: 基于碱性条件下 Fe(II)可催化鲁米诺氧化并产生化学发光的原理, 联合顺序注射技术和化学发光法, 建立了海水中 Fe(II)浓度的高灵敏度自动分析方法和系统。系统主要包括注射泵、选择阀、三通道反应池(自制)、光子计数器及控制模块, 在不需要预浓缩条件下, 可直接对酸化后海水样品中 Fe(II)浓度进行测定。经优化反应条件(包括鲁米诺溶液浓度和 pH、试剂与样品体积比、进样量、进样速度)和测定流程, 并采用窗口式检测方式, 每次分析所需样品和鲁米诺溶液体积仅分别为 80 和 400 μL, Fe(II)浓度范围为 0.01~ 8.0 nmol·L^{-1} 时, 发光信号强度与 Fe(II)浓度呈线性相关, 检测限低至 4.1 pmol·L^{-1}, 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液连续 11 次测定的相对标准偏差为 3.6%。研究了海水中主要重金属离子和有机配体对测定结果的干扰, 结果表明游离态 Cu(II)对发光信号强度影响较大, 但天然海水中 Cu(II)主要以有机络合态存在, 通过在样品中加入有机配体-水杨醛肟与 Cu(II)络合, 证实有机 Cu(II)络合物对 Fe(II)测定干扰较小; 有机配体[菲啰嗪、乙二胺四乙酸、1-(2-吡啶偶氮)-2-萘酚等]干扰实验表明有机配体与 Fe(II)络合将导致发光信号强度降低, 但当其浓度低于 Fe(II)浓度 50 倍时, 对发光信号强度的影响小于 9.5%。通过对标准海水样品的分析和实际样品的标准加入实验, 验证了方法的准确性。

关键词: 化学发光法; 顺序注射; 鲁米诺; Fe(II); 海水

中图分类号: O657.3; X832　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2025)7-0081-11

DOI: 10.11759/hykx20250411001

铁(Fe)是海洋中浮游植物进行光合作用必需的微量营养元素之一, 在全球约 40%的高营养盐低叶绿素(HNLC)海域, 正是由于 Fe 元素缺乏限制了海洋初级生产力, Fe 元素对海洋生态系统、碳循环及全球气候变化均具有重要影响[1-4]。海洋中溶解态 Fe 主要包括 Fe(II)和 Fe(III)两种价态, 在开阔大洋海水中, 主要以 Fe(III)为主, 其浓度一般为纳摩尔/升(nmol·L^{-1})级, Fe(II)的浓度相对更低, 为皮摩尔/升(pmol·L^{-1})级。在近岸或缺氧海水中, Fe(II)浓度可能较高, 甚至超过 Fe(III), 如秘鲁上升流缺氧水体中的 Fe(II)浓度最高可达 14.2 nmol·L^{-1}, 占溶解态 Fe 的 80%以上[5-8]。另外, 前期研究已经表明, 溶解度更高的 Fe(II)比主要以颗粒态和有机络合物形式存在的 Fe(III)更易被浮游生物吸收, 具有更高的生物可利用性[9-12]。

目前, 测定海水中 Fe 浓度的方法主要包括原子发射光谱法、质谱法、分光光度法、化学发光法等[13-16]。原子发射光谱法和质谱法需要将海水中盐分除去后方可进行测定, 而且无法区分不同氧化态的 Fe 元素, 不适用于测定海水中 Fe(II)浓度[17-18]。分光光度法基于络合试剂与 Fe(II)反应的原理, 通过测定生成络合物的吸光度分析 Fe(II)浓度, 该方法准确度高、操作简便, 但检测限相对较高, 一般需将海水中 Fe(II)富集后进行测定[19-21]; 化学发光法基于 Fe(II)可催化发光试剂(如鲁米诺)氧化反应并产生化学发光的原理, 在一定条件下, 发光强度与 Fe(II)浓度线性相关, 具有操作简便、反应迅速且灵敏度高的特点, 不需要预富集即可用于海水中痕量 Fe(II)浓度的测定, 但同时化学发光法易受海水中其他金属离子的干扰[22-25]。前期通常将化学发光法结合流动注射分析(Flow Injection Analysis, FIA)技术实现 Fe(II)浓度分析。FIA 技术是 20 世纪 70 年代发展起来的现代分析化学的重要技术之一, 该技术改变了传统进样方式, 使试剂混合和分析过程在流动中完成, 显著提高

收稿日期: 2025-04-11; 修回日期: 2025-06-27

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2805504); 国家自然科学基金项目(42376066)

[Foundation: National Key Research and Development Program of China, No. 2022YFC2805504; The National Nature Science Foundation of China, No. 42376066]

作者简介: 王乐全(1999—), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事海洋化学研究, E-mail: lqwang@tongji.edu.cn; 王虎(1975—), 通信作者, 男, 安徽安庆人, 教授, 主要从事海洋地球化学研究, E-mail: wanghu@tongji.edu.cn

了分析效率[26-28]。但流动注射分析中, 试剂或样品始终以一定的流速在管路中流动, 试剂或样品的消耗量相对较大[29-30]。为降低试剂和样品消耗量, Oliveira 等[31]建立了微顺序注射-阀上实验室(Micro-Sequential Injection Lab-On-Valve, μSI-LOV)分析系统, 每次分析所需试剂和样品体积仅分别为 100 和 50 μL, Fe(II)的最低检测限为 1 000 pmol·L^{-1}; Jones 等[32]采用有机配体掩蔽法, 通过测定添加 Fe(II)络合剂前后发光信号差值定量分析 Fe(II)浓度, 所需试剂和样品体积分别为 33 和 210 μL, 检测限为 110 pmol·L^{-1}。尽管上述分析系统已显著降低试剂和样品消耗量, 但其检测限仍然高于开阔大洋海水中的 Fe(II)浓度(约几至几百 pmol·L^{-1}), 一般不可直接应用于开阔大洋环境中 Fe(II)浓度的测定。另外, 前期研究对海水中重金属离子对鲁米诺和 Fe(II)发光反应的影响有较多研究, 但有机配体对该发光反应影响的研究较少, Ussher 等[33]研究了在 pH=5.5 条件下, 浓度为 100 nmol·L^{-1} 的有机配体对测定结果的影响。

本研究通过联合顺序注射(Sequential Injection Analysis, SIA)技术和化学发光法建立海水中 Fe(II)浓度自动分析系统, 该系统可有效降低试剂消耗量, 且经优化反应条件和测试流程后, 在未富集条件下可实现皮摩尔级 Fe(II)的测定。另外, 本研究将对多种重金属元素和有机配体对发光强度的影响进行探究。

1 材料与方法

1.1 试剂与样品

称取适量鲁米诺(5-氨基-2, 3-二氢-1, 4-邻苯二酮, Sigma-Aldrich 公司)溶解于 NH_3-NH_4Cl 体系中, 配制 pH=11.8 的 1.0 mmol·L^{-1} 鲁米诺溶液, 于 4℃条件下避光保存, 静置 12 小时后使用。

称取适量 $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2·6H_2O$(Sigma-Aldrich 公司)溶解于 0.01 M 盐酸, 配制浓度为 10.0 mmol·L^{-1} 的 Fe(II)储备溶液。采集于西南太平洋的表层海水预先经 Chelex 100 树脂柱过滤除去 Fe、Cu、Mn、Zn 等金属离子, 制得空白海水样品。由空白海水稀释上述 Fe(II)储备溶液配制所需浓度的 Fe(II)标准溶液, 并加入稀盐酸将其 pH 调至 2.0。分别用超纯水稀释 Mn(II)、Cu(II)、V(V)、Zn(II)、Ni(II)、Fe(III)和 Cr(III)标准物质(上海市计量测试技术研究院)配制所需浓度的金属离子标准溶液。

有机配体菲啰嗪(Ferrozine)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)和二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriamine pentaacetic acid, DTPA)标准溶液用超纯水配制, 水杨醛肟(salicylaldoxime, SA)和 1-(2-吡啶偶氮)-2-萘酚(1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol, PAN)标准溶液用甲醇配制, 上述试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与方法

顺序注射-化学发光分析系统包括注射泵(MSP1-CX, 保定兰格有限公司)、八位选择阀(EUA-26021, Valco Instruments Co. Inc.)、自制三通道反应池(4.5 mm×1 mm×0.5 mm, 自制)和光子计数器(H9319-01, 日本滨松光子株式会社)等部件, 系统组成如图 1 所示。自制反应池为石英材质且具有三通道结构, 上端两个通道用于分别注入鲁米诺溶液和样品, 其目的是避免二者在进入反应池之前混合发光, 下端为楔形通道, 目的是便于反应后溶液自反应池排出。光子计数器具有极低的暗计数率和噪音水平, 对极微弱的光信号具有较高的响应, 可探测单个光子的能量, 且有纳秒甚至皮秒级的时间分辨率, 本研究选用的 H9319-01 型号光子计数器在 420 nm 具有较高灵敏度($4.1×10^5$ s^{-1}·pW^{-1}), 与鲁米诺最大发光波长 425 nm 接近。光信号的检测方式采用窗口式, 即光子计数器直接放置于反应池前接收光信号, 相比于通过光纤传输检测光信号的方式, 窗口式检测灵敏度更高, 尽管其检测重复性可能有所降低。各部件之间连接管件为内径 0.8 mm 的聚四氟乙烯管, 将上述系统置于暗室内以避免环境背景光干扰。利用在 Keil5 环境中开发的嵌入式程序实现系统的自动化分析, 经优化后, 单次测定流程如表 1 所示。

2 结果与讨论

2.1 反应条件优化

2.1.1 试剂浓度

在本研究使用的化学发光体系中, 鲁米诺作为发光试剂, 其浓度高低将影响发光信号强弱。研究了鲁米诺浓度在 0.1 ~ 10.0 mmol·L^{-1} 范围内对发光信号强度的影响(图 2a)。结果表明当鲁米诺浓度小于 1.0 mmol·L^{-1} 时, 鲁米诺浓度增加将导致发光信号增强, 信噪比亦随之增加; 当鲁米诺浓度大于 1.0 mmol·L^{-1}, 发光信号强度略有增加, 但信噪比却有所降低, 因此选择 1.0 mmol·L^{-1} 作为鲁米诺溶液的浓度, 以获得更高灵敏度。

2.1.2 试剂、样品体积及进样速度

试剂和样品的体积及进样速度将影响试剂和样品之间相互混合和扩散的过程, 进而影响发光强弱。研究了鲁米诺溶液和样品按 3∶1 至 7∶1 的不同体积

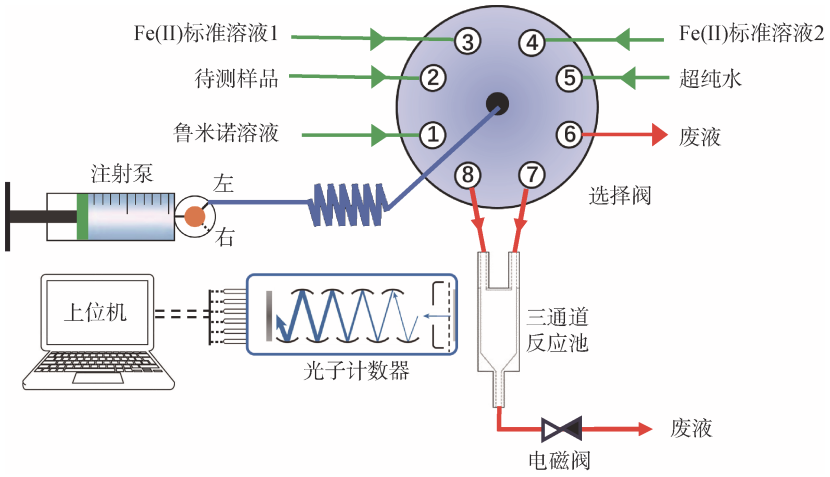


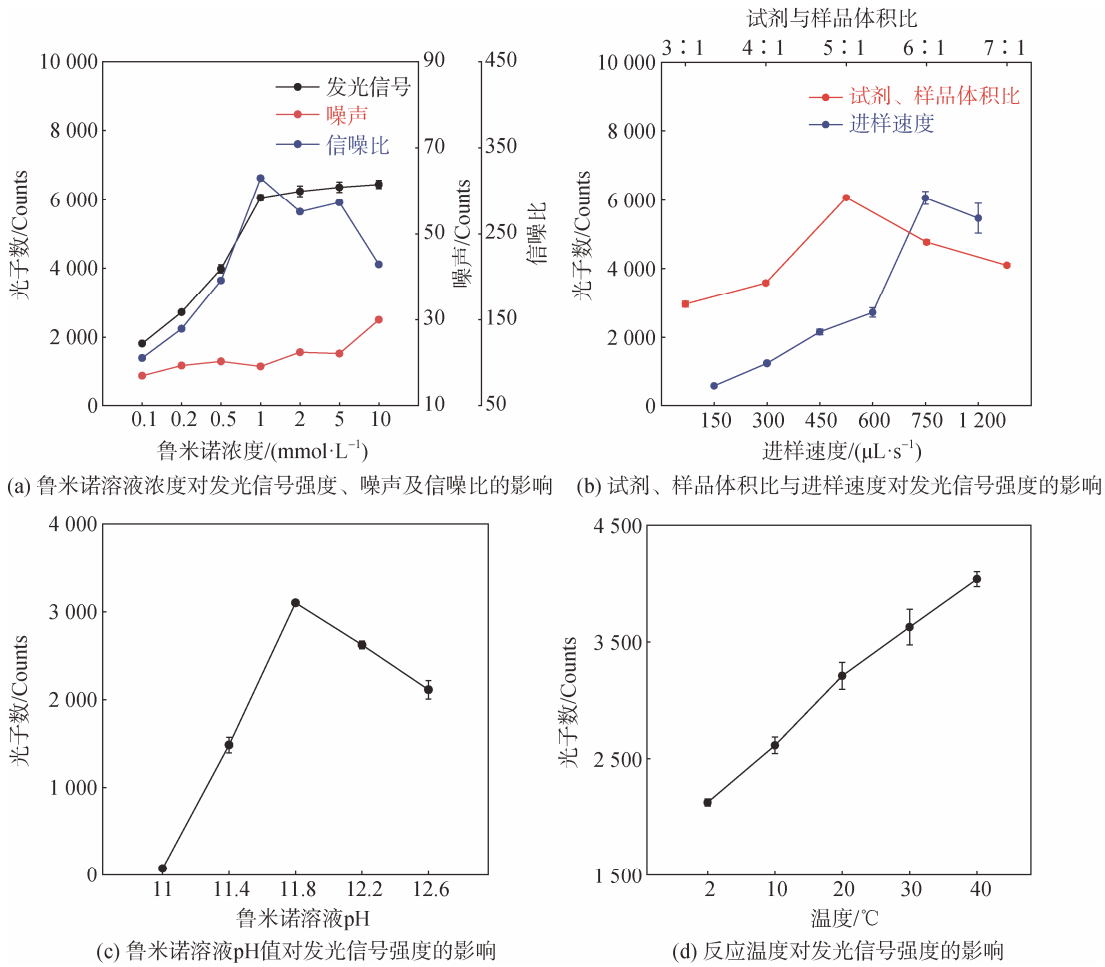
图 1　顺序注射-化学发光分析系统结构示意图

Fig. 1　Schematic of the sequential injection analysis system with the chemiluminescence method

表 1　顺序注射-化学发光分析系统测定海水中 Fe(II)浓度的流程

Tab. 1　Protocol sequence for determining Fe(II) concentration in seawater using the sequential injection analysis system with the chemiluminescence method

步骤	设备	指令	参数
系统初始化	注射泵	复位	
	选择阀	设置阀位置	1
启动光子计数器			
将鲁米诺试剂注入反应池	注射泵	设定流速	450 μL·s^{-1}
	注射泵	吸取试剂	400 μL
	选择阀	设置阀位置	8
	注射泵	注射试剂	400 μL
用超纯水清洗管路	选择阀	设置阀位置	6
	注射泵	吸取超纯水	600 μL
	选择阀	设置阀位置	5
	注射泵	排出超纯水	600 μL
将待测样品注入反应池	选择阀	设置阀位置	2
	注射泵	吸取待测样品	80 μL
	选择阀	设置阀位置	7
	注射泵	设定流速	750 μL·s^{-1}
	注射泵	注射待测样品	80 μL
保存测定结果，关闭光子计数器			
排出反应池中溶液	电磁阀	打开	
	电磁阀	关闭	
用超纯水清洗反应池	选择阀	设置阀位置	6
	注射泵	设定流速	450 μL·s^{-1}
	注射泵	吸取超纯水	600 μL
	选择阀	设置阀位置	8
	注射泵	排出超纯水	600 μL
排出反应池中溶液	电磁阀	打开	
关闭电磁阀，单次测定完成			



(a) 鲁米诺溶液浓度对发光信号强度、噪声及信噪比的影响　(b) 试剂、样品体积比与进样速度对发光信号强度的影响

(c) 鲁米诺溶液pH值对发光信号强度的影响　(d) 反应温度对发光信号强度的影响

图 2　反应条件对发光信号强度的影响

Fig. 2　Effect of different reaction conditions on the chemiluminescence intensity

注：误差线表示 ±1 倍标准偏差(n=3)

比混合产生的发光信号强度，结果如图 2b(红线)所示，当鲁米诺溶液与样品体积比为 5∶1(试剂与样品体积分别为 400 μL 和 80 μL)时产生的发光信号最强。进样速度对发光信号强度的影响如图 2b(蓝线)所示，进样速度增加，发光信号强度呈现先增加后降低的趋势，当进样速度为 750 μL·s^{-1}时，发光信号强度最大。由于鲁米诺的发光反应速度极快，通常在几十毫秒内完成，因此进样速度较慢会影响发光信号强度，但进样速度过快亦可能导致样品与试剂混合不均匀，进而影响发光信号强度。综合上述实验结果，选择 750 μL·s^{-1}作为分析时的进样速度。

2.1.3　鲁米诺溶液 pH

Fe(II)与鲁米诺发光反应的 pH 对发光信号强度亦有重要影响，前人研究表明，该化学发光反应的最佳 pH(试剂与样品混合后)约为 9.9~10.5[34-35]。一般用于测定 Fe(II)浓度的海水样品，为降低 Fe(II)氧化速率，样品被酸化至 pH≤2.0。在本研究中，样品在测定之前被酸化至 pH=2.0，因此需确定鲁米诺溶液的最佳 pH。分别配制 pH 在 11.0~12.6 之间、浓度为 1.0 mmol·L^{-1}的鲁米诺溶液，测定其与 pH=2、浓度为 1.0 nmol·L^{-1}的 Fe(II)标准溶液反应时的发光信号强度(图 2c)，结果表明 pH=11.8 的鲁米诺试剂作为发光试剂时反应产生的发光信号最强，此条件下反应后混合溶液的 pH 为 10.2。

2.1.4　反应温度

除上述条件外，反应温度对发光信号强度也具有一定影响，测定了 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液在反应温度分别为 2℃、10℃、20℃、30℃和 40℃时与鲁米诺发光反应的发光信号强度，结果如图 2d 所示。结果表明在 2~40℃范围内，发光信号强度随温度升高而增大，且与反应温度呈正相关关系，建议在分析时保持反应体系处于恒温(如室温)。

2.2 干扰实验

2.2.1 金属离子干扰实验

在上述最佳反应条件下，研究了海水中常见金属离子包括 Fe(III)、Mn(II)、Cu(II)、Zn(II)、Ni(II)、Cr(III)和 V(V))对 Fe(II)测定的干扰。在 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液中分别加入 Fe(III)、Mn(II)、Cu(II)、Zn(II)、Ni(II)、Cr(III)和 V(V)离子标准溶液，使各金属离子浓度分别为 Fe(II)浓度的 1、10、20、50 和 100 倍，测定其发光信号强度。图 3 显示，Zn(II)、Ni(II)、Fe(III)、Cr(III)、V(V)对 Fe(II)测定几乎不产生干扰，但 Mn(II)和 Cu(II)会降低发光信号，这与前期研究结果类似[35-37]。本研究结果表明当 Mn(II)浓度为 Fe(II)浓度 10 倍时，发光信号降低 3.4%，当 Mn(II)浓度为 Fe(II)浓度 20 倍时，发光信号降低 8.0%(图 3)，信号降低的原因可能是由于 Mn(II)在海水中易被氧化为 MnO_2，MnO_2 可将 Fe(II)氧化为 Fe(III)，从而导致发光信号强度降低[34]。一般来说，开阔大洋海水中 Mn(II)浓度通常为纳摩尔级，与 Fe(II)浓度接近或略高于 Fe(II)浓度，因此其对测定结果几乎不产生干扰[38-39]。在某些特定海域(如近岸或缺氧水体中)，海水中 Mn(II)浓度相对较高，可能超过 Fe(II)浓度数十倍[40-42]，可预先将样品通过 8-羟基喹啉柱[43]或 NTA 树脂柱[44]，将其中 Fe(II)和 Mn(II)分离后再进行测定。

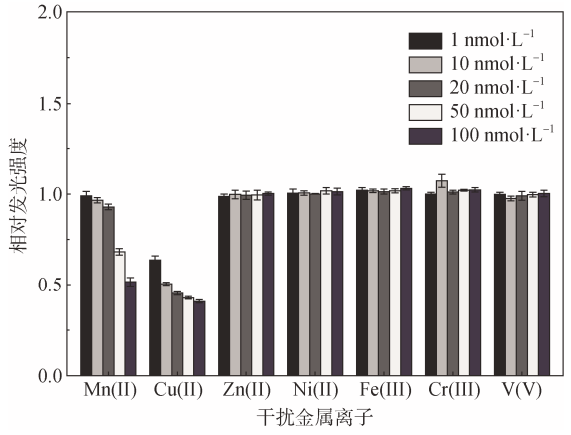


图 3 不同浓度金属离子对相对发光强度的影响

Fig. 3 Effect of metal ions with different concentrations on the relative chemiluminescence intensity

注：相对发光强度为溶液的发光信号强度与 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液产生的发光信号强度之比

Cu(II)亦具有氧化性，对发光反应的影响机制与 Mn(II)类似，通过加快 Fe(II)向 Fe(III)转化，使发光信号有所降低[34]。当 Cu(II)浓度与 Fe(II)浓度相当时，可使发光信号降低 32.7%，当 Cu(II)浓度为 Fe(II)浓度 10 倍时，发光信号降低 46.5%。Cu(II)在天然海水中主要以有机络合态存在(>99%)，游离态 Cu(II)浓度极低[45]，但将海水样品酸化至 pH=2.0 时，游离态 Cu(II)浓度可能有所增加，因此设计对比实验研究 Cu(II)对 Fe(II)测定的干扰：在 pH=2.0、1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液中分别加入 Cu(II)至浓度为 5.0 和 10.0 nmol·L^{-1}，测定其发光信号强度；再加入 10.0 nmol·L^{-1} 有机 Cu(II)配体-SA，对比测定 SA 加入前后发光信号强度的变化。测定结果如表 2 所示，表明在未加入 SA 的条件下，5.0 nmol·L^{-1} 和 10.0 nmol·L^{-1} 游离 Cu(II)可使发光信号强度显著降低，分别为原发光信号强度的 58.8%和 53.2%；但加入 SA 后，即使在 pH=2.0 条件下，发光信号强度几乎未降低，分别为原发光信号强度的 96.8%和 95.1%，表明在本研究条件下，海水中 Cu(II)对发光信号强度的影响可忽略。

表 2 Cu(II)及其有机络合物(SA)对发光信号强度的影响

Tab. 2 Effect of a Cu(II) and its organic ligand (salicylaldoxime) on the chemiluminescence signal intensity

SA/(nmol·L^{-1})	1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液		
	0 nmol·L^{-1} Cu(II)	5.0 nmol·L^{-1} Cu(II)	10.0 nmol·L^{-1} Cu(II)
0	100.0%	58.8%	53.2%
10.0	98.3%	96.8%	95.1%

注：以 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液的发光信号强度为 100%

2.2.2 有机配体干扰实验

前期研究中，Ussher 等[33]仅研究了在 pH=5.5 条件下，浓度为 100 nmol·L^{-1} [为 Fe(II)浓度 50 倍]的多种有机配体对化学发光法测定 Fe(II)浓度的干扰，结果表明，较强的 Fe(II)配体使发光信号降低超过 90%，而较弱的 Fe(II)配体也使发光信号强度降低了 10%~40%不等。但目前对于海水样品 pH=2.0 条件下，有机配体对测定结果的影响尚不明确。实验研究了在 pH=2.0 海水样品中，分别加入不同浓度的有机配体(包括 EDTA、DTPA、Ferrozine、SA 和 PAN)对 Fe(II)发光信号强度的影响。实验步骤为：配制 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II)标准溶液，分别加入 EDTA、DTPA、Ferrozine、SA 和

PAN 标准溶液，使其最终浓度为 Fe(II)浓度的 10、20、50、100、1 000、10 000 倍，分别测定其发光信号强度(图 4)。结果表明由于有机配体与 Fe(II)的络合作用，可导致 Fe(II)产生的发光信号强度降低，但不同配体影响程度有所不同。DTPA 和 PAN 浓度低于 Fe(II)浓度的 100 倍时，发光信号强度降低均小于 5%；EDTA、Ferrozine 和 SA 浓度低于 Fe(II)浓度 50 倍时，发光信号强度降低均小于 9.5%，但当其浓度为 Fe(II)浓度 100 倍时，3 种配体分别使发光信号降低了 13.3%、22.9%和 18.8%。当配体浓度超过 Fe(II)浓度 1 000 倍甚至更高时，所有配体均使发光信号显著降低。目前有关天然海水中 Fe(II)配体浓度的研究数据较少，仅 Statham 等[46]测定了英国 Itchen 河口 Fe(II)有机配体，发现其浓度与 Fe(II)浓度相当(约 1∶1)或低于 Fe(II)浓度，因此推测海水中天然配体对 Fe(II)浓度的测定干扰应较小。建议后期研究关注海水中 Fe(II)有机配体的分析(包括有机配体浓度和络合常数)，以便更为确切地认识天然配体对海水中 Fe(II)测定结果的影响。

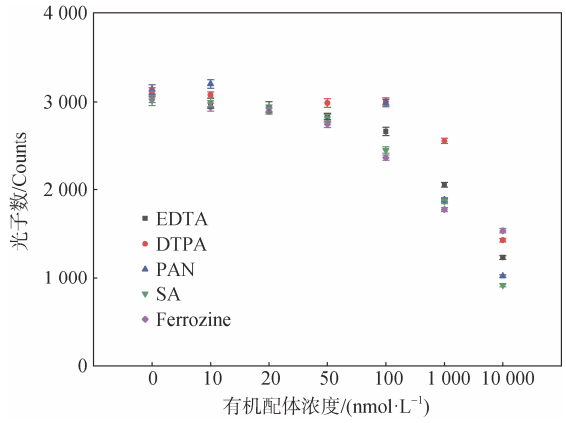
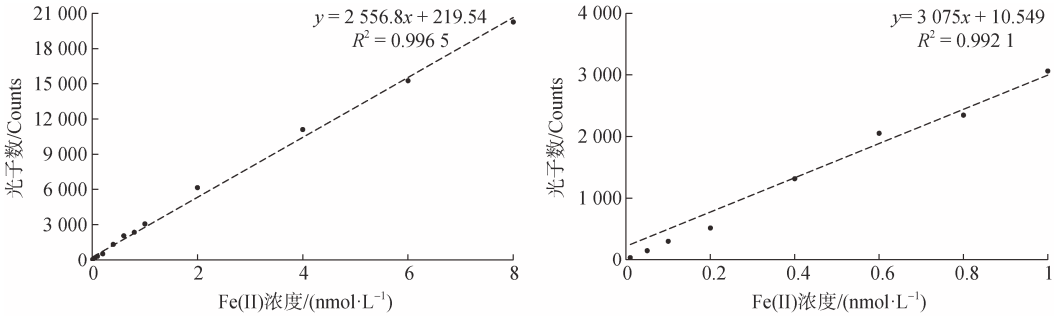


图 4　不同浓度有机配体对发光信号强度的影响

Fig. 4　Effect of organic ligands with different concentrations on the chemiluminescence signal intensity

2.3　分析性能评估及样品分析

在上述最佳反应条件下，对方法的分析性能进行了评估。以经 Chelex 100 树脂柱过滤除去金属离子的太平洋表层海水样品作为空白海水样品，测得空白发光信号强度(光子数 15.6±3.2，n=5)。依次测定不同浓度标准海水样品的发光信号强度，减去空白发光信号强度，以此值与对应的 Fe(II)浓度绘制工作曲线(图 5a)。在 Fe(II)浓度范围为 0.01~ 8.0 nmol·L^{-1}时，Fe(II)浓度与发光信号强度正相关，相关系数R^2=0.996 5，以 3 倍信噪比计算 Fe(II)的检测限为 4.1 pmol·L^{-1}，对浓度为 1.0 nmol·L^{-1}的 Fe(II)标准溶液进行 11 次连续测定，相对标准偏差为 3.6%。



(a) Fe(II)浓度范围0.01~8.0 nmol·L^{-1}　(b) Fe(II)浓度范围0.01~1.0 nmol·L^{-1}

图 5　不同浓度范围的 Fe(II)工作曲线

Fig. 5　Fe(II) calibration curve in different concentration ranges

为检验方法的准确性，我们用该方法分析了国际标准海水样品 NASS-6 和 NASS-7 中 Fe 浓度。首先在标准海水样品中加入 Na_2SO_3 溶液，将 Fe(III)全部还原为 Fe(II)，再利用上述方法测定 Fe(II)浓度。NASS-6 和 NASS-7 的测定结果分别为 8.67±0.24 nmol·L^{-1}和 5.99±0.21 nmol·L^{-1}(表 3)，与标准值 8.84±0.82 nmol·L^{-1} 和

表 3　标准海水样品 NASS-6 和 NASS-7 中 Fe 浓度分析结果

Tab. 3　Analytical results of Fe concentrations in reference seawaters (NASS-6 and NASS-7)

标准海水样品	测定值 1/(nmol·L^{-1})	测定值 2/(nmol·L^{-1})	测定值 3/(nmol·L^{-1})	测定平均值±2σ/(nmol·L^{-1})	标准值/(nmol·L^{-1})
NASS-6	8.76	8.71	8.53	8.67±0.24	8.84±0.82
NASS-7	5.89	6.10	5.98	5.99±0.21	6.27±0.46

6.27±0.46 nmol·L^{-1}接近。对 NASS-6 和 NASS-7 的测定结果和标准值进行 t 检验, 所得 t 值分别为 0.70(P=0.13)和 1.91(P=0.52), 均小于临界 t 值 2.78(a=0.05), 表明测定结果与浓度标准值之间无显著差异, 从而验证了方法的准确性。

分别在西太平洋和东海海水样品中定量加入 Fe(II)标准溶液, 应用上述方法测定其回收率(表 4)。结果表明西太平洋海水样品中 Fe(II)浓度较低, 为 0.012 nmol·L^{-1}, 东海海水样品中 Fe(II)浓度为 0.21 nmol·L^{-1}。标准加入的回收率介于 89.4%~110%之间, 仅在东海样品中加入 0.10 nmol·L^{-1} Fe(II)的回收率略低, 为 83.0%, 可能与东海样品含有更高浓度的重金属元素和有机配体有关。

表 4 西太平洋和东海海水样品 Fe(II)回收率测定结果

Tab. 4 Recovery rates of Fe(II) in seawater samples collected from the Western Pacific Ocean and East China Sea

Fe(II)加标浓度/(nmol·L^{-1})	测定 Fe(II)浓度/(nmol·L^{-1})	回收率/%
西太平洋海水样品测定结果		
0.00	0.012	—
0.025	0.034	89.4
0.05	0.064	105.0
0.10	0.11	99.8
0.20	0.23	110.0
0.40	0.42	102.5
0.60	0.63	103.3
0.80	0.84	103.7
1.50	1.58	104.6
2.00	1.91	95.0
东海海水样品测定结果		
0.00	0.21	—
0.10	0.29	83.0
0.25	0.46	92.6
0.50	0.72	100.1
0.75	1.02	108.2
1.00	1.26	105.1
2.00	2.26	102.2
4.00	4.16	98.9

3 与其他分析方法对比

表 5 总结了目前国际上海水中 Fe(II)分析方法和系统, 这些系统主要基于分光光度法和化学发光法, 并联合流动注射分析、顺序注射分析或微顺序注射-阀上实验室等技术实现 Fe(II)测定。其中, 分光光度法检测限较高, 通常需对样品进行预富集后进行测定。例如, Blain 等[19]设计的分光光度-流动注射分析系统, 以 Ferrozine 为显色剂, 通过 C18 柱去除干扰金属离子并富集 Fe(II), 检测限可低至 100 pmol·L^{-1}, 但单次测定需消耗约 20 mL 海水样品。Lohan 等[20]以 DPD 试剂作为显色剂设计的分光光度-流动注射分析系统, 通过 NTA 树脂柱富集 Fe(II), 其检测限降低至 24 pmol·L^{-1}, 样品消耗量为 4 mL。

表 5 海水中 Fe(II)浓度分析系统

Tab. 5 Analytical systems for determining Fe(II) concentrations in seawater

测定方法	所用试剂	流动分析技术	预浓缩	试剂消耗量/mL	样品消耗量/mL	检测限/(pmol·L^{-1})	参考文献
分光光度法	菲啰嗪	流动注射	是	2.0	50~400	600	King 等[47]
分光光度法	菲啰嗪	流动注射	是	1.0	20	100	Blain 等[19]
分光光度法	菲啰嗪	反向流动注射	否	—	—	300	Huang 等[30]

续表

测定方法	所用试剂	流动分析技术	预浓缩	试剂消耗量/mL	样品消耗量/mL	检测限/(pmol·L^{-1})	参考文献
化学发光法	鲁米诺	停流式流动注射	否	0.2	0.2	60~150	O'Sullivan 等[34]
化学发光法	鲁米诺	流动注射	是	4.8	1.5	40	Bowie 等[48]
化学发光法	鲁米诺	流动注射	否	5.9	1.2	25~133	Croot 等[35]
化学发光法	鲁米诺	流动注射	否	4	4	3~27	Hansard 等[25]
有机配体掩蔽-化学发光法	鲁米诺	流动注射	否	0.2	20	26	Bolster 等[49]
有机配体掩蔽-化学发光法	鲁米诺	顺序注射	否	0.03	0.21	110	Jones 等[32]
化学发光法	鲁米诺	微顺序注射	否	0.10	0.05	1 000	Oliveira 等[31]
化学发光法	鲁米诺	顺序注射	否	0.40	0.08	4.1	本研究

相比之下，化学发光法具有较低的检测限，无需预富集即可将检测限降低至<1.0 nmol·L^{-1}，如 Hansard 等[25]将化学发光法与流动注射技术结合，实现 3~27 pmol·L^{-1} 的低检测限。但流动注射技术存在试剂消耗量大，蠕动泵管易受酸碱腐蚀导致稳定性下降等缺点，限制了其在长期连续测定中的应用。Jones 等[32]和 Oliveira 等[31]通过将化学发光法与顺序注射技术和微顺序注射-阀上实验室技术结合，化学发光反应在阀的管道内进行，试剂消耗量极低，但同时也导致其发光信号强度较低，检测限较高(分别为 110 pmol·L^{-1} 和 1 000 pmol·L^{-1})，难以满足开阔大洋海水中皮摩尔级 Fe(II)的测定需求。

与上述系统相比，本系统化学发光反应在自主设计的三通道反应池中进行，相对于阀上实验室来说，消耗试剂量略有增加，但亦可使发光信号强度增加；另外，本研究采用窗口式检测方式，相较于通过光纤传输进行检测的方式，可有效增强所接收的光信号，且本研究采用高灵敏度光电检测器件-光子计数器，即使是对于极弱光信号亦可进行检测。上述因素使本系统具有较低检测限，在最佳反应条件下，检测限可低至 4.1 pmol·L^{-1}。

4 结论

以鲁米诺为发光试剂，联合顺序注射技术和化学发光法建立了一种海水中 Fe(II)浓度的分析方法和系统。确定了最佳测定流程和反应条件，包括鲁米诺溶液浓度(1.0 mmol·L^{-1})、鲁米诺溶液 pH 值(11.8)、试剂与样品体积比(5∶1)、进样速度(750 μL·s^{-1})等，在最佳反应条件下，采用窗口式检测方式，方法检测限可低至 4.1 pmol·L^{-1}，Fe(II)浓度在 0.01~8.0 nmol·L^{-1} 范围内时，发光强度与 Fe(II)浓度线性相关(R^2=0.996 5)。对 Fe(II)测定的干扰因素(重金属元素和有机配体)进行了研究，结果表明尽管游离态 Cu(II)对测定结果干扰较大，但天然海水中 Cu 元素主要以有机络合态存在，通过实验证实有机 Cu 络合物对测定结果干扰较小；有机配体干扰实验结果表明在海水样品 pH=2.0 条件下，当有机配体浓度低于 Fe(II)浓度 50 倍时，对测定结果干扰小于 9.5%。标准海水样品的分析结果和实际海水样品的加标实验结果，表明本方法可准确测定海水样品中皮摩尔级 Fe(II)浓度。

参考文献:

[1] JOHNSON K S, GORDON R M and COALE K H. What controls dissolved iron concentrations in the world ocean? Authors' closing comments[J]. Marine Chemistry. 1997, 57(3/4): 181-186.

[2] MILLERO F J, YAO W S and JENNIFER A. The speciation of Fe(II) and Fe(III) in natural waters[J]. Marine Chemistry. 1995, 50(1/4): 21-39.

[3] SUNDA W G and HUNTSMAN S A. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton[J]. Marine Chemistry. 1995, 50(1/4): 189-206.

[4] MARTIN J H, GORDON R M and FITZWATER S E. Iron in Antarctic waters[J]. Nature, 1990, 345: 156-158.

[5] BRULAND K W, ORIANS K J and COWEN J P. Reactive trace metals in the stratified central North Pacific[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1994, 58(15): 3171-3182.

[6] SHAKED Y. Iron redox dynamics in the surface waters of the Gulf of Aqaba, Red Sea[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2008, 72(6): 1540-1554.

[7] CHIVER F, Rouxel O J, Croot P L, et al. Total dissolvable and dissolved iron isotopes in the water column of the Peru upwelling regime[J]. Geochimica et

Cosmochimica Acta, 2015, 162(1): 66-82.

[8] KONDO Y, MOFFETT J W. Dissolved Fe(II) in the Arabian Sea oxygen minimum zone and western tropical Indian Ocean during the inter-monsoon period[J]. Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2013, 73: 73-83.

[9] GU Y, HOPWOOD M J, GLEDHILL M, et al. Spatial and temporal variations in the micronutrient Fe across the Peruvian shelf from 1984 to 2017[J]. Progress in Oceanography, 2024, 221: 103208.

[10] MOREL F M M, KUSTKA A B and SHAKED Y. The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton[J]. Limnology and Oceanography, 2008, 53(1): 400-404.

[11] KONDO Y, MOFFETT J W. Iron redox cycling and subsurface offshore transport in the eastern tropical South Pacific oxygen minimum zone[J]. Marine Chemistry, 2015, 168: 95-103.

[12] BEHRENFELD M J and KOLBERZ S. Widespread iron limitation of phytoplankton in the South Pacific Ocean[J]. Science, 1999, 283(5403): 840-843.

[13] WORSFOLD P J, LOHAN M, USSHER S, et al. Determination of dissolved iron in seawater: A historical review[J]. Marine Chemistry, 2014, 166(20): 25-35.

[14] LIN M Y, HU X P, PAN D, et al. Determination of iron in seawater: From the laboratory to in situ measurements[J]. Talanta, 2018, 188(1): 135-144.

[15] ACHTERBERG E P, HOLLAND T W, BOWIE A R, et al. Determination of iron in seawater[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 442(1): 1-14.

[16] 林舒, 鲁琛琛, 李绍卿. 化学发光法测定铁的进展[J]. 冶金分析, 2008, 28(5): 28-32.
LIN Shu, LU Chenchen, LI Shaoqin. Progress in the determination of iron by chemiluminescence[J]. Metallurgical Analysis, 2008, 28(5): 28-32.

[17] SADEGHI, ASHOORI V. Iron species determination by task-specific ionic liquid-based in situ solvent formation dispersive liquid-liquid microextration combined with flame atomic absorption spectrometry[J]. Journal of Agriculture and Food Sciences, 2017, 97(13): 4635-4642.

[18] WU J F. Determination of picomolar iron in seawater by double $Mg(OH)_2$ precipitation isotope dilution high-resolution ICPMS[J]. Marine Chemistry, 2007, 103(3/4): 370-381.

[19] BLAIN S, TREGUER R. Iron(II) and iron(III) determination in sea water at the nanomolar level with selective on-line preconcentration and spectrophotometric determination[J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 308(1/3): 425-432.

[20] LOHAN M C, AGUILAR-ISLAS A M, BRULAND K W. Direct determination of iron acidified (pH 1.7) seawater samples by flow injection analysis with catalytic spectrophotometric detection: Application and intercomparison[J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2006, 4(6): 164-171.

[21] ACHETERBERG E P, FELIX G, BEATON A D, et al. Evaluation of a ferrozine based autonomous in situ Lab-on-Chip analyzer for dissolved iron species in coastal waters[J]. Frontiers in Marine Science, 2017, 4: 322-335.

[22] ROSE A L, WAITE T D. Chemiluminescence of luminol in the presence of iron(II) and oxygen: Oxidation mechanism and implications for its analytical use[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(24): 5909-5920.

[23] POWELL R T, KING D W, LANDING W M. Iron distributions in surface waters of the south Atlantic[J]. Marine Chemistry, 1995, 36(1/4): 13-20.

[24] 曲胜路, 杨茹君, 耿倩倩, 等. 流动注射-化学发光法测定海水中的痕量 Fe(II)[J]. 海洋环境科学, 2019, 38: 809-816.
QU Shenglu, YANG Rujun, GENG Qianqian, et al. Flow injection-chemiluminescence method for determination of trace Fe(II) in seawater[J]. Marine Environmental Science, 2019, 38: 809-816.

[25] HANSARD S P, LANDING W M. Determination of iron(II) in acidified seawater samples by luminol chemiluminescence[J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2009, 7(3): 222-234.

[26] RUZICKA J and HANSEN E H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 1975, 78(1): 145-157.

[27] RUZICKA J and MARSHALLG D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays[J]. Analytica Chimica Acta, 1990, 237: 329-343.

[28] WANG J H. Lab-on-valve mesofluidic analytical system and its perspectives as a “world-to-chip” front-end[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2005, 381: 809-811.

[29] ARIGA T, IMURA Y, SUZUKI M, et al. Determination of ferric iron chelators by high-performance liquid chromatography using luminol chemiluminescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1014: 75-82.

[30] HUANG Y M, YUAN D X, DAI M H, et al. Reverse flow injection analysis method for catalytic spectrophotometric determination of iron in estuarine and coastal waters: A comparison with normal flow injection analysis[J]. Talanta, 2012, 93: 86-93.

[31] OLIVEIRA H M, GRAND M M, RUZICKA J, et al. Towards chemiluminescence detection in micro-sequential injection lab-on-valve format: A proof of concept based on the reaction between Fe(II) and luminol in seawater[J].

Talanta, 2015, 133: 107-111.

[32] JONES M R and LEE K. Sequential injection analysis Ferrozine spectrophotometry versus luminol chemiluminescence for continuous online monitoring of the concentration and speciation of iron[J]. Microchemical Journal, 2020, 157: 104881.

[33] USSHER S J, YAQOOB M, ACHTERBERG E P, et al. Effect of model ligands on iron redox speciation in natural waters using flow injection with luminol chemiluminescence detection[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(7): 1971-1978.

[34] O'SULLIVAN D W, HANSON A K and KESTER D R. Stopped flow luminol chemiluminescence determination of Fe(II) and reducible iron in seawater at subnanomolar levels[J]. Marine Chemistry, 1995, 49(1): 65-77.

[35] CROOT P L and LAAN P. Continuous shipboard determination of Fe(II) in polar waters using flow injection analysis with chemiluminescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 466(2): 261-273.

[36] HOPKINSON B M, BARBEAU K A. Organic and redox speciation of iron in the eastern tropical North Pacific suboxic zone[J]. Marine Chemistry, 2007, 106(1/2): 2-17.

[37] USSHER S J, MILNE A, LANDING W M, et al. Investigation of iron(III) reduction and trace metal interferences in the determination of dissolved iron in seawater using flow injection with luminol chemiluminescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 652(1/2): 259-265.

[38] VAN HULTEN M M P, DUTAY J C, MIDDAG R et al., Manganese in the world ocean: a first global model[J]. Biogeoscience. Discussions, 2016, 14(5): 1123-1152.

[39] 任景玲, 张桂玲, 刘素美, 等. 海洋中锰的生物地球化学循环研究[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(3): 432-440.
REN Jingling, ZHANG Guiling, Liu Sumei, et al. Review on the study of biogeochemical cycle of manganese in the oceans[J]. Advances in Marine Science, 2012, 30(3): 432-440.

[40] WANG Z W, REN J L, XUAN J L, et al. Distribution and off–shelf transport of dissolved manganese in the East China Sea[J]. Frontiers Marine Science, 2022, 9: 1110913.

[41] ZHANG Y, LI L, REN J L, et al., Distribution and influencing factors of dissolved manganese in the Yellow Sea and the East China Sea[J]. Marine Chemistry, 2021, 234: 104002.

[42] VEDAMATI J, CHAN C and MOFFETT J W. Distribution of dissolved manganese in the Peruvian upwelling and oxygen minimum zone[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2015, 156: 222-240.

[43] BOWIE A R, ACHTERBERG E P, SEDWICK P N, et al. Real-time monitoring of picomolar concentrations of iron(II) in marine waters using automated flow injection-chemiluminescence instrumentation[J]. Environment Science and Technology, 2002, 36(21): 4600-4607.

[44] LOHAN M C, AGUILAR-ISLAS A M, FRANKS R P, et al. Determination of iron and copper in seawater at pH 1.7 with a new commercially available chelating resin, NTA Superflow[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 530: 121-129.

[45] JACQUOT J E and MOFFETT J W. Copper distribution and speciation across the international GEOTRACES section GA03[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2015, 116: 187-207.

[46] STATHAM P J, JACOBSOON Y and VAN DEN BERG C M G. The measurement of organically complexed feii in natural waters using competitive ligand reverse titration[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 743: 111-116.

[47] KING D W, LIN J and KESTER D R. Spectrophotometric determination of iron(II) in seawater at nanomolar concentrations[J]. Analytica Chimica Acta, 1991, 247(1): 125-132.

[48] BOWIE A R, ACHTERBERG E P, MANTOURA R F C, et al. Determination of sub-nanomolar levels of iron in seawater using flow injection with chemiluminescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 361(3): 189-200.

[49] BOLSTER K M, HELLER M I and MOFFETT J W. Determination of iron(II) by chemiluminescence using masking ligands to distinguish interferences[J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2018, 16(11): 750-759.

Sequential injection–chemiluminescence detection of Fe(II) in seawater at picomolar levels

WANG Lequan, WENG Yuang, WANG Wenpeng, WANG Hu
(State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Received: Apr. 11, 2025
Key words: chemiluminescence method; sequential injection; luminol; Fe(II); seawater

Abstract: Herein, an automatic and sensitive method for the determination of Fe(II) at the picomolar level in seawater is presented. This method employs a sequential injection technique and the chemiluminescence analysis of luminol catalyzed by Fe(II) under alkaline conditions. The analysis system comprises an injection pump, a selector valve, a self-made three-channel reaction cell, a photon counter, a control module, and other components. Optimal conditions for the chemiluminescence reaction (including flow rates, pH, luminol reagent concentration, reagent and sample volumes, and reaction temperature) and protocol sequence were established. Under these optimal reaction conditions, the detection limit of the system for Fe(II) concentration was as low as 4.1 pmol·L^{-1} when using a window-detection strategy. Each analysis cycle consumed only 400 μL of the reagent and 80 μL of the sample. Chemiluminescence intensity showed a linear response to the Fe(II) concentration in the range of 0.01–8.0 nmol·L^{-1}, with a relative standard deviation of 3.6% for 11 consecutive measurements of a 1.0 nmol·L^{-1} Fe(II) standard solution. Interference studies indicated that free Cu(II) significantly influenced the analysis of Fe(II); however, in natural seawater, Cu(II) mainly exists as organic complexes. Adding salicylaldoxime to complex residual Cu(II) confirmed minimal interference from organic Cu(II). In addition, tests with organic ligands (e.g., ethylene diamine tetraacetic acid, diethylenetriamine pentaacetic acid, and ferrozine) showed that increasing organic ligand concentration decreased the chemiluminescence intensity. However, when the concentrations of organic ligands were less than 50 times the Fe(II) concentration, the decrease in the chemiluminescence intensity was no more than 9.5%. The accuracy of the method was validated using reference seawaters (NASS-6 and NASS-7) and standard addition experiments with seawater samples.

(本文编辑: 赵卫红)