

海水黄色物质荧光特性的初步研究*

夏达英 李宝华 吴永森 张绪琴 吴隆业 张士魁

(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003)

提要 用荧光测量方法,对被认为可作本底水样的几种水体进行了荧光特性的测量研究,确认了即时处理的 Milli-Q 水是无荧光效应的高纯度水,可作为本研究的本底水样。同时,对海水黄色物质 Milli-Q 水溶液、市售草炭腐殖质 Milli-Q 水溶液、青岛近岸海水和褐藻培养液样品进行了光谱特性测量研究。结果表明,海水黄色物质和培养液的黄色物质的激发光谱峰值波长在 340nm 附近、荧光光谱峰值波长在 435nm 附近;而草炭腐殖质的激发峰值波长在 320nm 附近,荧光峰值波长在 440nm 附近。测量得出了海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的荧光强度与其浓度的关系曲线。其最低检测浓度高达 $1 \times 10^{-9} \text{g/ml}$ 以上。同时也测量得出了青岛近岸海水样品不同稀释度的稀释液与对应的荧光强度的良好正相关关系。用荧光法测量得出青岛近岸海水的黄色物质浓度为 $3.2 \times 10^{-7} \text{g/ml}$ 。

关键词 海水黄色物质 荧光特性 激发光谱 荧光光谱

学科分类号 P733.3

由于黄色物质(腐殖质)是参与海洋中碳循环的动态分子,长期以来人们对它的化学结构尚不清楚。加之分离较困难,直至本世纪 30 年代才进行研究, Kalle(1937)用分光法发现海水中有黄色物质存在,称其为“Gelbstoff”。80 年代初期起,国内不少的海洋化学家对海水腐殖质的提取、分离及其化学结构解析方面做了大量工作(纪明侯等, 1982a, b; 曹文达等, 1987; 韩丽君等, 1991; 高洪峰等, 1996)。黄色物质在海洋过程中具有重要的作用,其稳定的光学性质,是一种性能较好的海水固有示踪物。研究海洋中黄色物质固有荧光场分布;可以进行海洋水团划分;有助于揭示大洋环流的显著特征;海洋中黄色物质含量与盐度的关系曲线提供了关于水团及其混合的极有用的资料(杰尔洛夫, 1976)。

对于海洋中黄色物质的检测,目前采用其它方法难以直接、快速从海洋中了解黄色物质的存在、浓度及分布状况。由于荧光测量法具有灵敏度高、简便、样品不需作处理即可现场检测及对荧光物质的鉴别性等优点(夏达英等, 1997a)。因此,倍受世界众多的海洋科学家重视,并被广泛地用于海水黄色物质特性的研究工作(Kalle, 1966; Eugene, 1969; Frank *et al*, 1993)。然而,国内少有人从事这一研究。本文报道了在国内首次从物理学的方法,对海水黄色物质的荧光特性所作的部分研究工作及取得的初步结果。

* 国家自然科学基金资助项目, 49786005号; 中丹国际合作项目, [97]国科金外字054号。夏达英, 男, 出生于 1940年5月, 副研究员, E-mail: isfio@public. qd. sd. cn

收稿日期: 1998-10-10; 收修改稿日期: 1999-04-25

1 原理与方法

1.1 原理

根据光激发荧光的原理,不同种类的荧光物质由于其分子结构和能量分布的差异,各自显示出不同的吸收光谱和荧光光谱。海水黄色物质是一类含有多种活性较高的化学功能团的无定形大分子聚合物,具有较高的荧光效率,对光的强吸收是在紫外光区。因此,用紫外光激发海水黄色物质时就会发出蓝色的荧光。

1.2 方法

采用荧光测量法和 Rf-540 荧光光度计,对海水中的黄色物质的荧光发射和激励特征进行了定量的测量和分析。在仪器操作中,使用激发单色仪在 200—700nm 之间人工选择激发波长,对黄色物质水溶液作照射,然后扫描荧光发射波长。一旦一个荧光发射峰被检测到,发射单色仪就置于这一峰值波长上。激发单色仪继续调节,确定最大激发波长。置激发单色仪在最大波长上,然后对荧光发射波长进行扫描,即得黄色物质的荧光发射光谱。在获得激发光谱时,则过程相反。图谱是按荧光相对强度与波长的关系记录的。

在测量实验过程中,需用高纯水作为基准,对海水作过滤处理,并选择合适的紫外发光波长和强度,以减少其它有机成分的影响和避免样品产生感光分解。

2 实验测量结果与讨论

2.1 本底水样的选择

在各种自然水体中普遍存在可溶性有色有机物质(黄色物质)。这些物质完全溶解在水体中,即使用常规的滤膜过滤方法多次处理,也难以将水体中的黄色物质处理干净。本研究通过对被认为可作本底水样的市售蒸馏水、多次过滤处理的海水等进行了荧光测量实验,仍有较高的荧光值。因此决定使用通过 Milli-Q 纯化系统处理的 Milli-Q 水作测量实验的本底水样。图 1 表示的是各种水样使用 Rf-540 荧光光度计测量的荧光光谱特性曲线,激发波长为 320nm,狭缝为 10nm,接收灵敏度增益为 7。

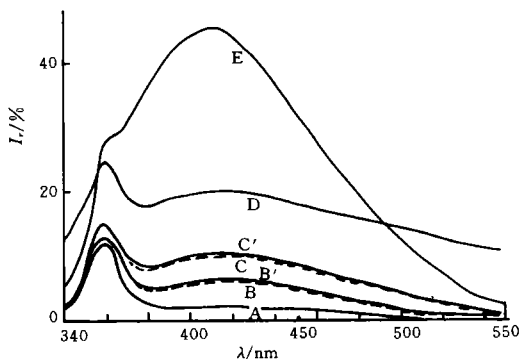


图1 各种水样的荧光光谱特性曲线

Fig.1 Fluorescence characteristic spectra of the various water samples

- A. Milli-Q水; B. 再处理市售蒸馏水; B'. 市售蒸馏水; C. 三次过滤海水; C'. 二次过滤海水; D. 一次过滤海水; E. 人造海水

图 1 曲线 A 显示了 Milli-Q 水只在波长 360nm 处出现明显的拉曼 (Raman) 散射峰,而在拉曼峰的右边无荧光峰出现。由激发光产生的杂散光的瑞利 (Rayleigh) 散射使拉曼峰在长波段的发射不为零值。而其他

水样除在 360nm 处出现明显的拉曼散射峰外,在其右边皆有明显的荧光峰。其峰值波长皆在 420nm 附近。这表明选用 Milli-Q 水作为本研究的本底水样是理想的。

2.2 海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的激发光谱和荧光光谱

本研究采用的海水腐殖质(黄色物质)干基样品,是 1984 年曹文达教授用 GDX-102 吸

附树脂的方法(纪明侯等, 1982a), 从海水中分离得到的, 并封装保存于干燥瓶中。而采用 Milli-Q 水作本底水样, 配制成海水黄色物质 Milli-Q 水溶液。将 10mg 海水黄色物质注入 100ml 的 Milli-Q 水配制成母液 ($1 \times 10^{-4} \text{g/ml}$)。依上述测量图谱的方法及仪器, 测量得出的海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的激发光谱与荧光光谱示于图 2a。同时还采用市售草炭腐殖质, 依上述方法配置母液并测量获得的激发光谱与荧光光谱示于图 2b。

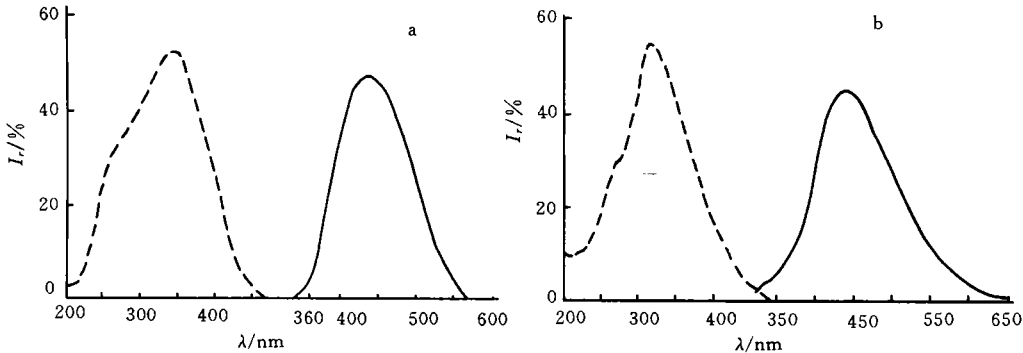


图2 海水黄色物质(a)与草炭腐殖质(b)的激发光谱和荧光光谱

Fig.2 Excitation and fluorescence spectra of yellow substances in seawater (a) and peat humic substances (b)

---激发光谱; ——荧光光谱

从图 2a 可知, 海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的激发峰值波长在 340nm 附近, 荧光峰值波长在 435nm 附近, 而草炭腐殖质的激发峰值波长在 320nm 附近, 荧光峰值波长在 440nm 附近。这表明海水腐殖质与草炭腐殖质虽然具有相近的荧光峰值波长, 但它们的激发峰值波长却有较大的差异, 这是由于两者的物质分子结构和能量分布有所差异之故。海水腐殖质主要由非芳香性的脂肪链化合物组成, 而陆地风化煤等腐殖质是以芳香结构单元为主要组成的(高洪峰等, 1996)。

2.3 海水黄色物质的浓度与荧光强度的关系

海水黄色物质是溶解于海水中的固有荧光性物质, 在测量海水中黄色物质时, 必须使用高纯度的 Milli-Q 水作本底水样配制标准浓度的溶液, 进行各种标准溶液荧光强度的测量, 绘制出其相关曲线。将上述配置的海水黄色物质 Milli-Q 水母液取出 1ml, 按配置标准溶液的要求注入 Milli-Q 水, 测出待测海水黄色物质 Milli-Q 水各种不同浓度的标准溶液的荧光相对强度。图 3 表示的是激发波长为 330nm, 激发单色仪狭缝为 10nm, 增益为 9 时, 测量得到的不同浓度海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的荧光光谱特性曲线。

图 3 表明, 对于不同浓度的海水黄色物质 Milli-Q 水溶液在相同的激发条件下, 荧光峰值波长在 435nm 附近。而它们的荧光强度却随着浓度的降低而减弱。同时, 也表明了海水黄色物质具有较高的荧光效率。在 Milli-Q 水中, 当海水黄色物质的浓度为 $1 \times 10^{-9} \text{g/ml}$ 时, 其荧光发射强度为 22.3, 而 Milli-Q 水的本底值为 6, 信噪比 (N/S) > 3 。这表明使用荧光法检测海洋中的黄色物质, 其最低检测灵敏度可达 $1 \times 10^{-9} \text{g/ml}$ 以上。

将所测量的不同浓度海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的荧光峰值强度的测量值, 进行检测灵敏度增益换算及归一化处理, 采用半对数坐标系绘制出海水黄色物质 Milli-Q 水溶液

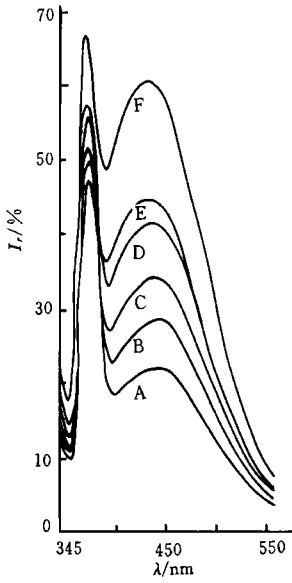


图 3 不同浓度的海水黄色物质 Milli-Q 水溶液荧光光谱特性曲线

Fig. 3 Fluorescence spectra of the yellow substance solutions with different concentrations in Milli-Q water

浓度分别为: A. 1×10^{-9} ; B. 5×10^{-9} ; C. 1×10^{-8} ; D. 5×10^{-8} ; E. 1×10^{-7} ; F. 5×10^{-7} (单位: g / ml)

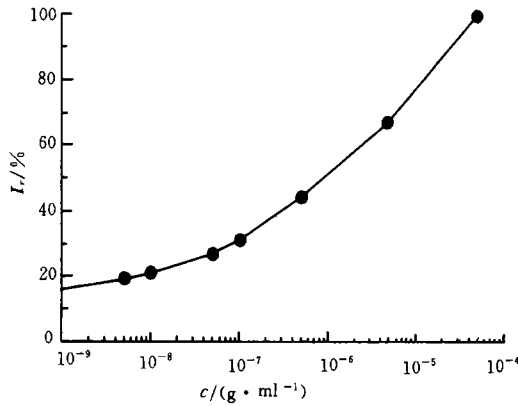


图 4 海水黄色物质 Milli-Q 水溶液浓度 (C) 与荧光相对强度 (I_r) 关系曲线

Fig. 4 Concentration the yellow substances (C) solution in Milli-Q water versus fluorescence relative intensity (I_r)

● 为不同浓度海水黄色物质 Milli-Q 水溶液的测量点

浓度 (C) 与其荧光相对强度 (I_r) 的关系曲线 (图 4)。

图 4 表明, 海水黄色物质的浓度检测范围为 $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-9}$ g / ml, 这一检测灵敏度范围足够满足海洋中黄色物质浓度分布检测的要求。沿岸海水中腐殖质浓度分布为 $3 \times 10^{-9} - 2.4 \times 10^{-6}$ g / ml, 一般春、夏季高, 冬季少 (纪明侯等, 1982b)。

2.3.1 近岸海水、褐藻培养液黄色物的荧光光谱 1998 年 8 月 7 日取青岛近岸海水, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜进行抽滤, 取部分滤液在与上述相同的实验条件下, 进行光谱测量实验, 得出的光谱特性曲线如图 5a 所示。以此同时对使用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜抽滤的褐藻培养液滤液样品也进行测量, 得出的光谱特性曲线如图 5b 所示。褐藻培养液的过滤样品是褐藻生长过程中的腐败物和排泄物受细菌分解和再合成的产物溶解于水中而生成黄色物质。

比较图 5a、5b 可知, 青岛近岸海水样品的激发光谱出现两个明显的激发峰 275nm 和 340nm, 而褐藻培养液在 340nm 处也有一个明显的激发峰, 在 275nm 处也出现一个激发峰。在相同的激发条件下, 两者具有相同的荧光发射峰波长 435nm。这表明海水黄色物质与藻类培养液腐殖质具有类似的物质分子结构, 它们都是浮游生物尸骸受细菌降解和再合成的产物。即浮游生物是海源黄色物质的重要来源。这与 Duursma(1974) 研究推断海水固有荧光物质是海洋原位产生的结论相一致。

2.3.2 近岸海水黄色物质稀释度与荧光相对强度的关系 将青岛近岸海水样品

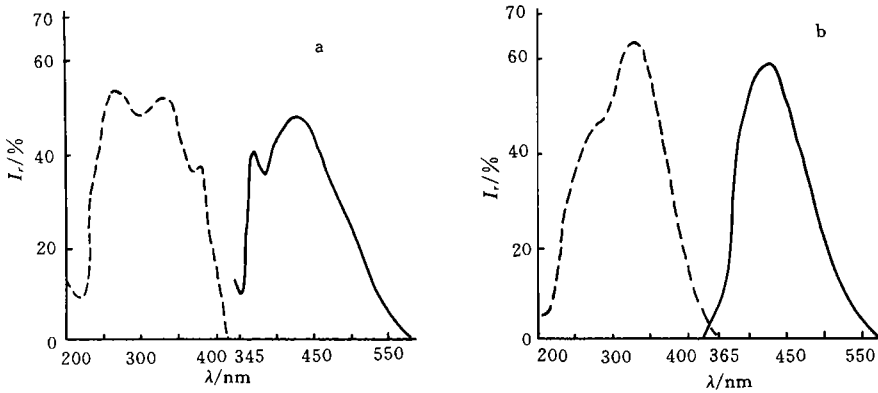


图5 青岛近岸海水样品(a)及褐藻培养液样品(b)的光谱特性曲线(0.45µm滤膜抽滤处理)

Fig.5 Excitation and fluorescence spectra of algae culture solution (passing through a 0.45µm filter) and seawater samples from Qingdao coastal waters

---激发光谱; ————荧光光谱

(0.45µm滤膜处理)用 Milli-Q水进行不同比例的浓度稀释,并进行了荧光光谱特性测量研究,结果如图 6 所示,曲线 A 为 Milli-Q水光谱曲线,只有明显的拉曼散射峰,而无荧光峰。曲线 B、C、D、E、F 是稀释度,分别为 0.01、0.10、0.25、0.50、1.00g/ml 时的荧光光谱特性曲线。激发狭缝为 10nm,激发波长为 330nm,接收器增益为 8。

取每个稀释度的稀释液峰值波长上的荧光峰值强度值,以稀释度为横坐标,荧光相对强度为纵坐标,给出青岛近岸海水样品黄色物质稀释液的稀释度与荧光相对强度的关系

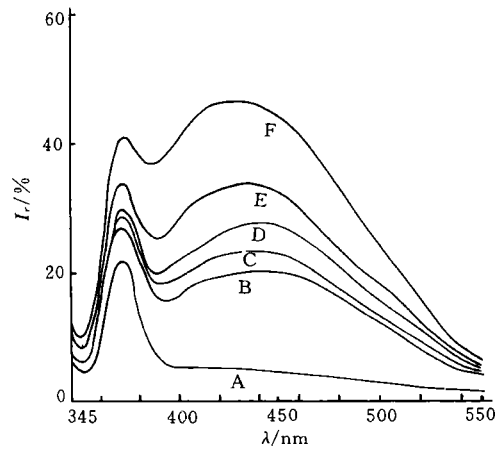


图 6 青岛近岸海水样品及其不同稀释度的稀释液的荧光光谱特性曲线

Fig.6 Fluorescence spectra of the solutions with various dilution factors and seawater sample from Qingdao coastal waters

稀释度 (g/ml) 分别为: A. milli-Q 水(空白); B. 0.01; C. 0.10; D. 0.25; E. 0.50; F. 1.00

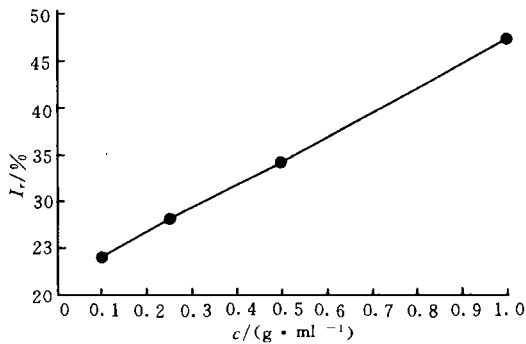


图 7 青岛近岸海水黄色物质稀释液的稀释度与荧光相对强度的关系曲线

Fig.7 Dilution factor C of the yellow substance solution versus fluorescence relative intensity from Qingdao coastal waters

● 为不同稀释度的近岸海水黄色物质稀释液的测量点

曲线(图7)。图7显示了两者之间具有明显的正相关关系,即随着海水黄色物质的增加其荧光相对强度也呈线性增加。这一结果与丹麦 Murray (1974)¹⁾的研究结果相一致。

2.3.3 青岛近岸海水黄色物质含量 从图6中得出青岛近岸海水样品的荧光峰值强度为42(检测灵敏的增益为7),对照图4的校正曲线,求得青岛近岸海水黄色物质浓度为 $3.2 \times 10^{-7} \text{g/ml}$ 。这一数值在上述资料介绍的沿岸海水黄色物质浓度范围内。

3 结语

3.1 本研究得出了海水黄色物质激发光谱的峰值波长在340nm附近,荧光峰值波长在435nm附近;藻类培养液中的降解产物和海水黄色物质具有极相似荧光特性;青岛近岸海水样品不同的稀释度与其荧光相对强度具有良好的正相关关系。同时,初次用荧光法测量出青岛近岸海水黄色物质在夏季的浓度为 $3.2 \times 10^{-7} \text{g/ml}$;荧光仪器对海水黄色物质 milli-Q水溶液的浓度的检测范围为 $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-9} \text{g/ml}$ 。

3.2 研究现场海水样品和藻类培养液样品,发现两者具有相似的荧光特性,可以认为海洋浮游生物是海源黄色物质的重要渊源。比较海源黄色物质与陆源草炭腐殖质 Milli-Q水溶液的激发光谱,发现两者有明显差异,表明两者的物质分子结构有所差别。

3.3 研究表明,荧光测量法在研究溶于海水的微量有机物方面是非常有效的。荧光光度计可对所取海水样品进行测量、鉴别物质的成分,选定激发波长和浓度测量。拖曳式水中荧光计,具有极高的检测灵敏度,可用于海上现场快速、连续检测海洋中溶解有机物质的浓度分布(夏达英等,1997a,b)。这两种技术为海洋学家在发现、鉴别海洋中溶解有机物质成分的困难任务得以解决。也就是说,将荧光激发光谱和发射光谱及其检测技术用于海洋中溶解有机物、浮游生物等的研究是理想的。

致谢 本研究承蒙中国科学院海洋研究所曹文达教授提供海水黄色物质干基样品、韩丽君教授提供草炭腐殖质和青岛海洋大学于志刚副教授提供 Milli-Q水,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 纪明侯,曹文达,韩丽君,1982a. 海洋腐殖质的研究 I. 用 GDX-102吸附树脂分离海水腐殖质. 海洋与湖沼, 13(4): 370—379
- 纪明侯,曹文达,1982b. 海水腐殖质. 海洋科学, 2: 48—54
- 高洪峰,曹文达,纪明侯,1996. 海水腐殖质的基本化学组成研究. 海洋与湖沼, 27(1): 35—40
- 夏达英,王振先,夏荣环等,1997a. 水中荧光计及其在海洋现场探测中的应用. 黄渤海海洋, 15(2): 64—69
- 夏达英,王振先,夏敬芳等,1997b. 海水叶绿素 *a* 现场测量仪研究. 海洋与湖沼, 28(4): 433—439
- 曹文达,纪明侯,裘香荃等,1987. 海洋腐殖质的研究 II. 长江口及东海海水和沉积物中腐殖质的分布. 海洋与湖沼, 18(5): 459—467
- 韩丽君,曹文达,1991. 海洋腐殖质中碳水化合物组成的研究. 海洋与湖沼, 22(3): 249—252
- 杰尔洛夫 N G, 1976(赵俊生,吴曙初译,1981). 海洋光学. 北京: 科学出版社, 228—232
- Duursma E K, 1974. The fluorescence of dissolved organic matter in the sea, In: N G. Jerlov and E. Stamat Nielsen ed. Optical Aspects of Oceanography. London: Academic Press, 237—255
- Eugene D T, 1969. Fluorescence excitation and emission spectra of dissolved organic matter in sea water.

1) Murray Brown, 1974. Laboratory measurements of fluorescence spectra of Baltic water. Copenhagen, Københavns universitet institut for fysisk oceanografi Report No.29.

Bulletin of Marine Science, 19(4): 897—904

Frank E H, Anthon, V, 1993. Inherent optical properties of the ocean: Retrieval of the absorption coefficient of chromophoric dissolved organic matter from fluorescence measurements. *Limnol Oceanogr*, 38(7): 1394—1402

Kalle K, 1966. The problem of the Gibstoff in the Sea. *Mar Biol Ann Rev*, 4: 91—104

A PRELIMINARY STUDY ON FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF YELLOW SUBSTANCE IN SEAWATER

XIA Da-ying, LI Bao-hua, WU Yong-sen, ZHANG Xu-qin,
WU Long-ye, ZHANG Shi-kui

(*First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266003*)

Abstract The inherent seawater fluorescence is produced by yellow substance in seawater. Therefore, study on the fluorescence characteristics of yellow substance is important, because seawater yellow substance plays an important role in some marine procedures. Based up physical analysis, we study the yellow substance fluorescence character in order to measure the concentration, distribution and optical property of yellow substance and to identify its application to marine process studies.

The fluorescence character of some water samples as blank was measured and studied; the free-fluorescence high pure Milli-Q water was selected in the experiment as a base-line water. Then, spectra of the samples, such as yellow substance solution in Milli-Q water. Qingdao coastal water and algae filtrate (passing through a 0.45 μ m filter) were analysed. The results show that seawater yellow substance has same fluorescence peak near 435nm for 340nm excitation as algae filtrate but 440nm emission peak at 320nm excitation for peat humic substance.

The concentration of yellow substance solution in Milli-Q water Vs fluorescence relative intensity plot (standard curves) is acquired, with the lowest detecting concentration of 1×10^{-9} g / ml. The relationship between the various dilution factors of solution and the Qingdao coastal water and fluorescence relative intensity shows an excellent linear correlation. The measured yellow substance concentration in the Qingdao coastal water is 3.2×10^{-9} g / ml.

Key words Yellow substance in seawater Fluorescence character Excitation spectrum

Fluorescence spectrum

Subject classification number P733.3