

导数同步荧光法测定硒*

赵振华 田德海 全文褶

(北京市环境保护科学研究院, 北京 100037)

摘要 对硒与 2, 3-二氨基萘(DAN)络合物在有机溶剂中的同步荧光光谱进行了研究。当同步荧光光谱的 $\Delta\lambda$ 选择 140 nm 时, 可获得一锐形单峰光谱, 在此基础上获得了一阶导数同步荧光和二阶导数同步荧光的最佳实验条件。用一阶导数同步荧光定量测定硒可提高方法的灵敏度和改善精密性, 在仪器的中挡灵敏范围, 硒的检测限为 1.5 ng, 硒浓度在 0—250 ng 时, 硒浓度与荧光强度的直线关系是 $y=0.44x-0.18$, 相关系数(r)0.9985, 10 次测定的变异系数(CV%)为 6.7%。对水样、血液和头发中的硒进行了实测。

关键词 硒, 导数同步荧光, 2, 3-二氨基萘。

将同步荧光技术与导数光谱技术结合使用, 既可提高选择性又可提高灵敏度。文献^[1]已报告了利用不同 $\Delta\lambda$ 波长条件下的二阶导数同步荧光光谱对酪氨酸和色氨酸进行分辨, 二阶导数同步荧光光谱已用于尿中肾上腺素和去甲肾上腺素的同时测定^[2], 一阶导数同步荧光分析用于金属络合物测定的已有镁^[3]和镉^[4]。但文献中尚未见有对硒的同步荧光资料。本文对硒与 DAN 试剂形成络合物的同步荧光与导数同步荧光进行了实验研究, 获得其最佳测定条件, 建立了用一阶导数同步荧光测定环境样品与生物样品中硒的方法。

1 实验部分

1.1 仪器

日立 MPF-4 型荧光分光光度计, X-Y 记录仪, MPF-4 型专用数据处理机。均使用非校正光谱, 1 cm 光径石英比色池。除特殊说明外, 均在仪器的中挡灵敏度进行: 粗调 30, 细调 6。测定激发光谱时, 激发狭缝带宽 6 nm; 发射狭缝带宽 10 nm。测定发射光谱时, 激发狭缝带宽 10 nm; 发射狭缝带宽 6 nm。同步荧光和导数同步荧光光谱的测定同激发光谱。

1.2 试剂

(1) 标准硒溶液 用单质硒在酸溶液中配制成浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 的储备液, 使用时用 0.1 mol/L 的盐酸稀释为 200 ng/ml 浓度的标准硒

工作液, 冰箱中存放。

(2) 0.1% DAN 试剂 用经纯化的 DAN 配制, 配于棕色瓶中, 每月新配 1 次使用。

(3) EDTA 混合液 将 100 ml A 液(0.2 mol/L EDTA 二钠盐)、10 ml B 液(10%盐酸羟胺溶液)和 5 ml C 液(0.02%甲酚红指示剂)混合, 加水稀释至 1000 ml 后混匀。

(4) 环己烷 北京化工厂分析纯试剂, 如有荧光杂质需重蒸后使用。

(5) 用于消化生物样品的混合酸^[5]。

1.3 测定方法

带有 10 ml 刻度的比色管中, 加入一定量标准硒溶液, 4 ml EDTA 混合液, 1 ml 0.1% DAN, 以 2 mol/L 盐酸调节溶液 pH 使小于 2.0 (溶液由黄色转为粉红), 沸水浴中加热 5 min, 冷却后用水稀释至刻度, 准确加入 5 ml 环己烷, 静置分层, 取环己烷相进行各种类型的荧光光谱分析。

生物样品的取样、消化方法参照文献^[5]的操作方法进行。

2 结果与讨论

2.1 同步荧光光谱

硒与 DAN 试剂形成的络合物 4, 5-苯并茚

* 北京市自然科学基金项目

收稿日期: 1994-12-05

硒脑在环己烷溶液中有很强的荧光,是定量测定硒的基础,图 1 为其激发光谱与发射光谱。同步光谱是使激发单色器和发射单色器同时扫描获得的光谱。最佳同步光谱选择的关键依赖于发射波长和激发波长之差($\Delta\lambda$),它与同步光谱的强度与浓度有关^[6], $\Delta\lambda$ 的值直接影响到光谱的形状、带宽和信号强度。最佳 $\Delta\lambda$ 的选择主要依靠实验结果,而理想的同步光谱又与狭缝的带宽和扫描速度有关。根据理论计算与实测,选择 E_x 的狭缝带宽为 6 nm, E_m 的带宽为 10 nm,在此条件下,不同 $\Delta\lambda$ 的同步荧光光谱的特征如表 1 所示。可以看出以 $\Delta\lambda$ 为 140 nm 时为最好,图 2 为笔者所选最佳同步荧光光谱图。

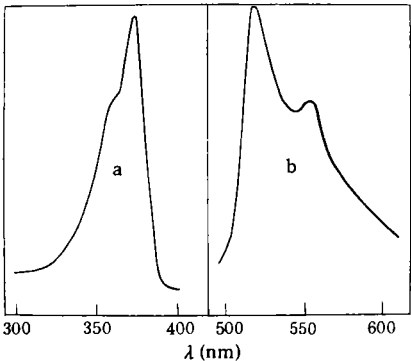


图 1 Se 与 DAN 试剂络合物的荧光光谱
a. λ_{em} : 520 nm b. λ_{ex} : 376 nm Se: 150 ng/ml

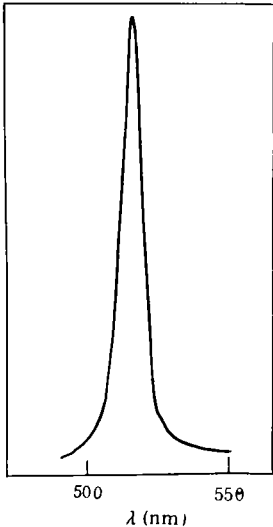


图 2 Se-DAN 络合物的同步荧光光谱
 λ_{em} :490 nm(10 nm) λ_{ex} : 350 nm(6 nm),范围: 30×2
扫描速度: 60 nm/min, Se: 150 ng/ml

根据所用仪器 6 挡扫描速度的测定结果,

表 1 不同 $\Delta\lambda$ 时的同步荧光光谱特征

$\Delta\lambda$ (nm)	谱图形状	最高峰 (nm)	相对强度 (mm)
110	峰形不显著	570	4.0
120	峰形不显著	560	3.0
130	锐形单峰	515	19.0
140	锐形单峰	517	44.0
150	双峰	530	37.0
167	双峰	540	30.0
170	双峰	550	28.0
180	三峰	560	30.0

以 30 nm/min 时的光谱最好,如图 3 所示。但在实际应用中显得太慢,而用 120 nm/min 的速度即可获得较好的效果。

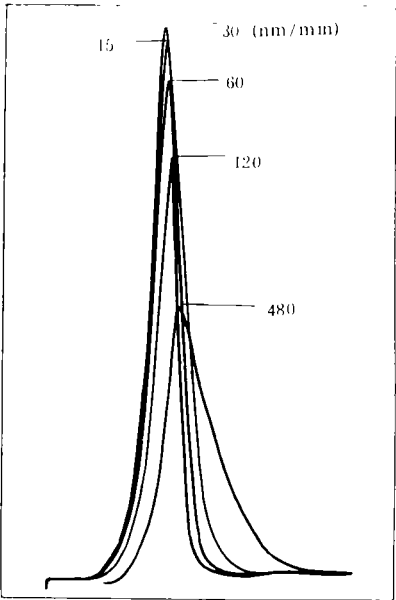


图 3 不同扫描速度对同步荧光光谱的影响

2.2 导数同步荧光光谱

由上述结果,获得最佳同步荧光光谱的条件是 $\Delta\lambda$ 140 nm,扫描速度 60 nm/min。在此条件下笔者进行了 Se-DAN 络合物的导数同步光谱测定。所用 MPF-4 型专用数据处理机,进行导数光谱扫描的波长增值($d\lambda$)共有 5 挡,分别为 1, 2, 3, 4, 5 nm,使用 5 种 $d\lambda$ 所获得的同步扫描的一阶和二阶导数光谱如图 4 所示。由图 4 中可以看出,用 $d\lambda$ 为 2 nm 时所获得的导数光谱较为理想,有较好的灵敏度和分辨力。

2 种导数光谱相比,一阶导数光谱有更高的灵敏度,在以下定量分析中得到进一步证明。

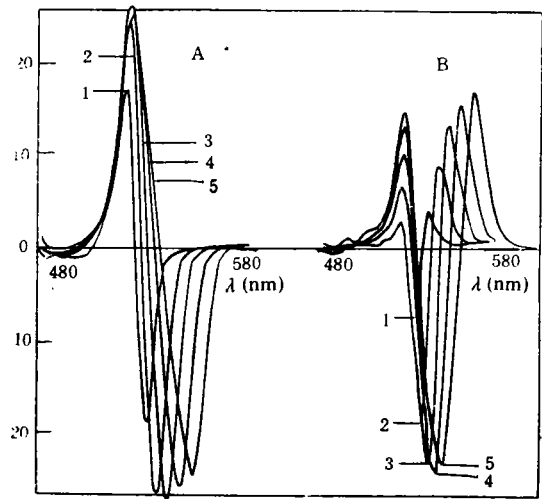


图 4 不同 $d\lambda$ 对导数同步荧光光谱的影响
a. 一阶导数 b. 二阶导数, Se : 150 ng/ml 扫描速度:
60 nm/min, $d\lambda$ 分别为 1, 2, 3, 4, 5 nm
发射狭缝带宽: 10 nm, 激发狭缝带宽: 6 nm

2.3 导数同步荧光的定量分析结果

使用不同浓度的标准硒溶液分别进行了普通荧光、同步荧光、一阶导数同步荧光、二阶导数同步荧光的测定,结果证明以一阶导数同步荧光的灵敏度最高,二阶导数同步荧光的灵敏

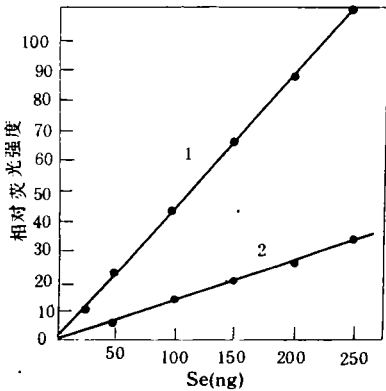


图 5 硒的标准曲线
1. 一阶导数同步荧光 2. 同步荧光

表 2 不同荧光法测定结果的比较¹⁾

方 法 种 类	线性关系 ($y=a+bx$)	相关系数 (r)	变异系数 (CV%)	最低检出限 (ng)
普通荧光	$y=0.77+0.22x$	0.9986	9.2 ± 3.6	2.9 ± 0.3
同步荧光	$y=0.57+0.25x$	0.9987	6.7 ± 3.0	3.3 ± 0.5
一阶导数同步荧光	$y=-0.18+0.44x$	0.9985	6.7 ± 2.6	1.5 ± 0.1
二阶导数同步荧光	$y=-0.12+0.33x$	0.9989	8.6 ± 3.4	1.9 ± 0.1

1) Se : 0—230 ng, 中挡灵敏度范围(30×6), 10 次测定值统计
度略低于一阶导数,而同步荧光的灵敏度与普通荧光的灵敏度处于同一水平。

在仪器的中挡灵敏度 (Range: 30×6), 硒含量在 10—300 ng 范围内有很好的线性关系 (图 5)。按照对 10 次测定结果的最低检测限, 用一阶导数同步荧光, 本法的最低检测限为 1.5 ng, 较 Ihnat 等人的检出限 (10ng)^[7] 灵敏 6 倍多, 比王光亚等人方法的灵敏度 (3 ng)^[6] 高 1 倍多。若在仪器的高灵敏挡测定, 本法的最低检出限为 0.6 ng。

以 0—230 ng 硒的 7 个不同浓度, 分别应用普通荧光光谱、同步荧光光谱和导数同步荧光光谱进行了灵敏度和精密度的测定, 每个浓度各测定 10 次, 结果如表 2 所示。由表 2 中数据

可以看出, 在 4 种荧光方法中, 以一阶导数同步荧光法的灵敏度和精密度为最好, 二阶导数同

表 3 不同样品中硒含量的测定结果

样 品	$\text{Se}(10^{-6})$	
	一阶导数同步荧光	普通荧光法
1) 水样 1	$0.848(\times 10^{-9})$	$0.845(\times 10^{-9})$
水样 2	$1.620(\times 10^{-9})$	$1.631(\times 10^{-9})$
水样 3	$1.540(\times 10^{-9})$	$1.500(\times 10^{-9})$
血液 a	2.430	2.450
血液 b	2.420	2.420
血液 c	1.060	1.062
血液 d	1.120	1.100
头发 I	0.048	0.050
头发 II	0.052	0.051

1) 水样均未经消化, 为可溶性 Se(IV) 。

(下转第 74 页)

UNICAN 气相色谱仪上,用 Dexsil-400 制备的填充柱定量测定了 8 种样品;又在 910-F 气相色谱仪上,用大口径毛细柱柱头不分流进样,进行了玉米植株和籽实样品的定量测定。在 2 种色谱柱的操作条件下,定量重复性良好,变异系数在±3%以内(见表 3)。

2.3 几种测试方法的比较

经过反复试验研究,本法与国内外有关方

法相比(见表 4)^[1-3],萃取时间为 0.5—0.7 h,缩短了 2—11 h;溶剂用量为 75—90 ml,减少了 110—1200 ml,抽提、浓缩操作简便。样品中 DEHP 的回收率,除棉花籽实为 80%以外,一般均在 90%左右。

该法不仅可用于农作物和土壤样品中 DEHP 的残留测定,而且易于在酞酸酯常规监测中推广应用。

表 3 各种样品中 DEHP 回收率和精密度测定 (n=6)

样 品 ¹⁾	添加量 (ng/g)	实测平均值 (ng/g)M±SD	变异系数 (CV%)	回收范围 (%)	柱 型
农田土	0.24	0.234±0.005	2.08	95.4—99.6	填充柱
棉花植株	11.00	10.030±0.132	1.20	90.0—92.4	填充柱
棉花籽实	4.00	3.280±0.041	1.03	81.0—83.0	填充柱
白菜茎叶	11.00	10.610±0.183	1.65	94.8—98.1	填充柱
玉米植株	3.36	3.200±0.100	2.98	92.4—98.2	毛细柱
玉米植株	5.60	5.300±0.115	2.07	93.3—97.5	填充柱
玉米籽实	9.10	8.390±0.210	2.03	89.9—94.5	毛细柱
玉米籽实	9.10	8.30±0.260	2.86	88.4—94.1	填充柱

1) 样品本底均为 0 ng/g

表 4 国内外环境样品中 DEHP 测试方法比较

项 目	本 法	北京市环境保护 科学研究院 ^[1]	丹麦科技 大学 ^[2]	美国环保局环境 监测中心实验室 ^[3]
萃取溶剂	三氯甲烷	环己烷、苯	三氯甲烷或丙酮	己烷:丙酮 9:1
萃取时间(h)	0.5—0.7	6—10	2.5—12	2.5—3.5
溶剂用量(ml)	75—90	1300		>200
净化		层析硅胶	1%的 Al ₂ O ₃ AgNO ₃ 涂覆失活	Florisil 柱 140℃活化
回收率(%)	89—96.5	81—106	61—119	74—85
变异系数(CV%)	±1.2—2.9	±10		±12.7
色谱柱类型	填充柱	填充柱	填充柱	毛细柱
色谱柱长度(m)	1.5	4	1.8	0.5 mm×30m(i. d)

参考文献

1 全文熠,许征帆.分析测试通报.1986,5(6):41
2 Viorca Lope-Avila, Berkert W F et al. . Journal of Chromo-

togr. Sci. . 1989, 27(5): 209
3 Phillip W Albro et al. . Anal. Chem. . 1984, 56: 247
4 王蓉华,吴烈钧.色谱.1992,10(2):109

(上接第 56 页)

步荧光法次之。同步荧光法与普通荧光法的灵敏度处于同一水平,但同步荧光法的变异系数显著小于普通荧光法。

2.4 对实际样品的测定结果

用一阶导数同步荧光光谱法分别对水样,血液样品和头发中的硒含量进行了测定,并用普通荧光法进行了对照,结果列入表 3 中。

参考文献

1 Miller J N et al. . Anal. Proc. . 1982, 19: 37
2 Valcarcel M et al. . Clin. Chem. . 1985, 31: 1790
3 Cruces C et al. . Anal. Chem. . 1984, 56: 2035
4 García S F et al. . Anal. Chim. Acta. 1985, 167: 217
5 王光亚等.营养学报.1985,7(1):39
6 Ihnat M J. Assoc. Off & Chem. . 1974, 57: 638

pp. 46—48

Lignin extracted from an alkaline wheat straw pulping black liquor was modified by sulfonation to study the feasibility of its use as a concrete water-reducing agent. This has resulted in the development of ZS-3 water-reducing admixture. In addition, a liquor containing sulfonated lignin and polysaccharides from the conversion process of wheat straw pulping black liquor was found to have a function of concrete water reduction and was turned into a superplasticizer ZS-2. Both ZS-3 and ZS-2 had a water reduction by 10%. The compressive strength of concrete was increased by 18% (7 days) or 5% (28 days) when ZS-3 was added, and by 73% (7 days) or 2% (28 days) when ZS-2 was added.

Key words: concrete water-reducing admixture, wheat straw lignin, sulfonation.

Small-Sized Non-Sludge-Discharged Sewage Treatment and Reuse System. Chen Xueyi et al. (Weifang Bestoc Environmental Protection Engineering Development Co., Ltd., Weifang 261011); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 49—50

A small-sized sewage treatment and reuse system without sludge discharge has been developed, based on a process consisting of two stages of contact anaerobic filters, two stages of contact aerobic filters, a slow sand filter and a fast sand filter. Generally, a domestic sewage can be treated through this system to give a satisfactory effluent, with a BOD removal of 91.7%, a COD removal of 88.9%, a SS removal of 91.1%, and a total P removal of up to 43.5%.

Key words: excess sludge, anaerobic treatment, aerobic treatment.

Determination of Chlordimeform Residues in Rice by Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibody. Yu Wanjun et al. (West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 51—53

Three sensitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)—indirect competitive ELISA, direct competitive ELISA, and reverse direct competitive ELISA—with immobilized antibody were developed for the determination of chlordimeform residues in rice. Their IC_{50} are of 1.3, 1.7 and 5.3 ng/ml, respectively. Samples were homogenized with methanol in a blender or in an ultrasonic disintegrator. The extracts could be measured directly after dilution, or underwent

a simple clean up procedure, which could improve the accuracy of the ELISAs. Effects of pH in the reaction medium, the incubation temperature, the extracting agent and the sample matrix on the detection sensitivities were also studied and discussed.

Key words: chlordimeform, pesticide residue analysis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Synchronous Scanning Derivative Spectrofluorimetry for the Determination of Selenium with 2, 3-Diaminophthalene. Zhao Zhenhua et al. (Beijing Municipal Research Academy of Environmental Protection, Beijing 100037); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 54—56

The synchronous fluorescence spectra of fluorescent chelate of selenium with 2, 3-diaminophthalene (DAN) and its synchronous scanning derivative spectra were studied. The specific $\Delta\lambda$ of the synchronous spectra was found to be 140 nm. The first derivative spectrofluorimetry for the determination of selenium with DAN was described. The limits of detection were 1.5, 1.9 and 3.0 for the first derivative, second derivative and normal spectrofluorimetric technique, respectively. Coefficient of variation was 6.7 for the first derivative spectrofluorimetry, and 9.2 for the normal spectrofluorimetry.

Key words: selenium, synchronous spectrofluorimetry, derivative spectrofluorimetry.

Determination of Total Organic Halogen (TOX) in Water. Zou Huixian et al. (Dept. of Environ. Sci. and Eng., Nanjing Univ., Nanjing 210093); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 57—60

A modified determination method for TOX was described, whereby purgeable and nonpurgeable fractions were measured respectively. Purgeable organic halogen (POX) was stripped with a mixture of N_2 and O_2 ; and nonpurgeable organic halogen (NPOX) was enriched with a Liquid-liquid Extraction (LLE) method. Both were introduced into a combustion system to change them into X^- , which were then determined with spectrophotometry. There was a detection limit of about 1 $\mu\text{mol/L}$, a variation coefficient of less than 3%, with an average recovery of 81% for 10 model compounds. The TOX concentration in the tap water from Jiangsu province was from about 217 to 483 $\mu\text{g/L}$.

Key words: purgeable organic halogen, non-purgeable organic halogen, total organic halogen,