

一种简便的原位测定红树叶片表面菲的荧光分析方法

李锐龙¹ 朱亚先² 张勇^{* 1 3}

¹(厦门大学环境科学研究中心, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

²(厦门大学化学化工学院, 厦门 361005) ³(漳州职业技术学院, 漳州 363000)

摘 要 采用自行设计的多用途荧光比色皿, 建立了一种秋茄(*Kandelia obovata*, *Ko*), 桐花树(*Aegiceras corniculatum*, *Ac*) 和白骨壤(*Avicennia marina*, *Am*) 叶片表面菲(Phenanthrene, *Phen*) 简便的原位测定方法, 本方法测定 *Ko*, *Ac* 和 *Am* 表面 *Phen* 的线性范围分别为 6.5 ~ 1200 ng/spot, 18.5 ~ 600 ng/spot 和 3.2 ~ 700 ng/spot, 检出限分别为 0.6, 0.7 和 1.3 ng/spot, 加标回收率分别为 92.4% ~ 101.0%, 94.8% ~ 108.2% 和 93.8% ~ 103.6%, 相对标准偏差小于 6.5%。本方法的检出限和相对标准偏差均优于固体表面光纤荧光法(Solid surface optical fiber fluorimetry, *SSF*)。线性范围与 *SSF* 法处于同一数量级。本方法与 *SSF* 法测得的红树叶片表面 *Phen* 的浓度并无显著差异($p > 0.05$), 但本方法极大地简化了操作, 提高了重现性。

关键词 菲; 红树叶; 原位; 荧光分析

1 引 言

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, *PAHs*) 是环境中广泛分布的一类持久性有机污染物, 具有“三致”作用, 且可通过大气长距离传输, 在全球范围内迁移, 危害人类健康^[1-3]。已有研究结果证实, 大气-植物叶片的界面交换过程是气相中 *PAHs* 去除的重要途径^[4,5]。

传统的植物叶片 *PAHs* 的测定方法虽选择性好、灵敏度高, 但破坏性的提取方式, 使其无法测定叶片表面吸附的 *PAHs*, 继而限制了大气-植物叶片 *PAHs* 界面交换过程机制的探讨^[6,7]。鉴于荧光光谱法具有原位测定 *PAHs* 的能力^[8,9], 本课题组先后建立了固体表面光纤荧光光谱法(Solid surface optical fiber fluorimetry, *SSF*)、同步固体表面荧光光谱法(Synchronous solid surface fluorimetry, *S-SSF*) 及激光诱导纳秒时间分辨荧光光谱法(Laser induced nanosecond time-resolved fluorescence, *LITRF*) 等, 较好地实现了植物叶片表面 *PAHs* 的原位测定^[10-14]。然而, 上述几种方法需额外配置固体样品荧光测定附件, 增加采购成本, 更为重要的是, 此类方法所使用的固体样品架、光纤与样品的相对距离、夹角等因素均需在每次使用前进行调整, 增加了操作难度, 不利于植物叶片表面 *PAHs* 原位测定方法的应用及推广。

本研究以菲(Phenanthrene, *Phen*) 为 *PAHs* 代表物质, 以新鲜红树^[15] 的叶片为基质, 利用自行设计的多用途荧光比色皿, 建立一种简便的红树叶片表面 *Phen* 的原位测定方法。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与样品准备

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司) 及光纤、固体样品架附件, 仪器的工作参数: 激发和发射狭缝为: 5 nm, 激发光波长为 250 nm, 发射光的波长扫描为: 300 ~ 450 nm, PMT 电压为: 600 V。10 μ L 平口微量进样器(上海医疗激光仪器厂), 5 mL 移液管(上海申立玻璃仪器有限公司), *Phen*(纯度 > 99%, 美国 Aldrich 公司), 丙酮(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

称取 0.1015 g 菲, 用丙酮配制成 100 mL 1.00 g/L 储备液, 于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。实验时采用逐级稀释法得到不同浓度的菲工作液。

植物叶片准备: 将采集自福建漳州云霄县红树林自然保护区(东经: 117 $^{\circ}$ 24' ~ 117 $^{\circ}$ 30', 北纬:

2015-01-17 收稿; 2015-03-22 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21177102), 教育部博士点基金(No. 20130121130005) 和厦门大学基础创新科研基金, 中央高校基本科研业务费专项资金(No. 2013121052) 资助项目

* E-mail: yzhang@xmu.edu.cn

23°53′~23°56′)的秋茄(*Kandelia obovata*, Ko) 桐花树(*Aegiceras corniculatum*, Ac) 和白骨壤(*Avicennia marina*, Am) 3种红树胚轴,沙培种植8个月。选取成熟度相近的叶片进行实验。

自行设计的多用途荧光比色皿结构如图1所示。将吸附有PAHs的红树植物叶片放置于石英底板(a)上,将石英底板缓缓插入通用型荧光比色池(b)中,进行植物叶片表面PAHs的荧光光谱扫描。

2.2 实验方法

选取3片大小、成熟度相近的叶片,用自来水、Mill-Q分别冲洗5遍,洗去浮尘后,自然晾干。采用文献[16]的方法,在叶片标定位置点上点加一系列浓度的Phen的丙酮溶液,待丙酮完全挥发后,利用自行设计的多用途荧光比色皿进行红树叶片表面菲的荧光光谱测定。

2.3 不同温度下红树叶片表面的消减过程

按2.2节的方法,将5 μL 100 mg/L菲的丙酮溶液均匀涂覆于叶片标定位置点,然后将每种已被污染的红树植物平均分为3组,分别将其转移至恒温培养箱中,温度控制分别为(13±2)℃, (25±2)℃, (30±2)℃,在180 h时取出红树植物,利用光纤和自行设计的多用途荧光比色皿分别对残留在红树植物叶片表面Phen的量进行原位测定。

2.4 统计分析

实验所得荧光光谱数据采用Microsoft Excel 2007进行处理、分析,本方法与SSF法间的显著性差异分析利用SPSS 13.0完成。

3 结果与讨论

3.1 红树叶片表面菲测定方法的分析特性

图2为在250 nm激发下Ko叶片表面菲的荧光发射光谱(最大发射波长367 nm),吸附于Ac和Am叶片表面Phen的光谱性质与Ko相似,故未列出。由图2可知,Ko叶片背景荧光较弱,不影响叶片表面Phen的测定。在一定浓度范围内,3种红树叶片表面Phen的浓度与其相对荧光强度呈良好的线性关系。本方法的标准曲线方程、线性范围及检出限等分析特性见表1。方法的相对标准偏差小于6.5%,表明其具有良好的重现性和精密度。利用文献[16]的SSF方法测定Ko,Ac和Am叶片表面Phen的浓度,其线性范围分别为5.0~1000 ng/spot, 12~500 ng/spot和4.5~650 ng/spot,检出限分别为0.90, 1.15和2.12 ng/spot,相对标准

表1 方法的分析特性

Table 1 Analytical merits of this method

叶片 Leaf	标准曲线方程 Calibration equation	线性范围 Linear range (ng/spot)	相关系数 Correlation coefficient	检出限 ^a Detection limit (ng/spot)	相对标准偏差 RSD (%, n=9)
Ko	$y^b = 0.188x^c + 9.5$	6.5 ~ 1200	0.9935	0.55	3.5
Ac	$y = 0.259x + 61.7$	18.5 ~ 600	0.9949	0.73	6.3
Am	$y = 0.127x + 9.4$	3.2 ~ 700	0.9855	1.3	5.5

^a: 3倍空白样的标准偏差除以标准曲线方程的斜率; ^b: 相对荧光强度; ^c: 吸附于红树叶片表面Phen的浓度(ng/spot)。

^a: It was calculated by $3S_B/m$, where ' S_B ' is the standard deviation of the blank and ' m ' is the slope of calibration curve; ^b: Relative fluorescence intensity; ^c: Concentration of Phen on mangrove leaf surface (ng/spot)。

Ko: *Kandelia obovata*; Ac: *Aegiceras corniculatum*; Am: *Avicennia marina*.

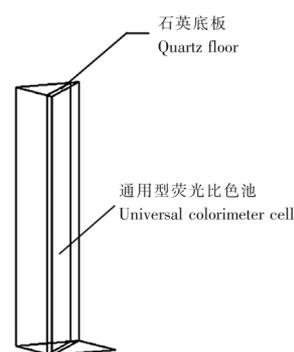


图1 多用途荧光比色皿的示意图

Fig. 1 Self-designed multipurpose fluorescence colorimetric cell

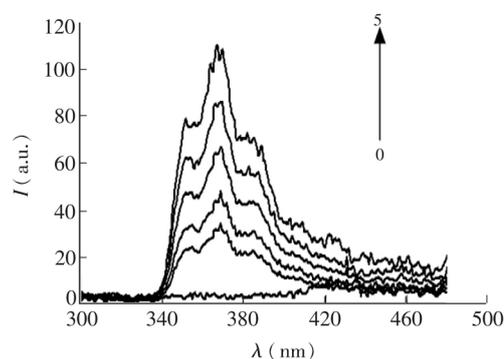


图2 Ko叶片表面Phen的荧光发射光谱

Fig. 2 Emission fluorescence spectra of phenanthrene (Phen) on *kandelia obovata* (Ko) leaves $\lambda_{ex} = 250$ nm. 0: blank; 1-5: 100, 200, 300, 400, 500 ng/spot Phen.

偏差分别为 5.5%、8.0% 和 7.7%。本方法的检出限和相对标准偏差均优于 SSF 法,线性范围与 SSF 法处于同一数量级。

3.2 回收率实验

在所建方法的线性范围内,按 2.2 节所述实验方法向叶片表面点滴加 5 μL 一定浓度(10, 50, 100 mg/L) 的菲溶液(此时浓度记为 C_1) 测定其荧光信号强度后,利用线性回归方程计算出初始浓度 C_2 。然后,再向原点样位置加入 5 μL 10 mg/L 菲溶液(此时浓度记为 C_3) 同样方法测得其浓度 C_4 ,根据公式 $R=(C_4-C_2)/(C_3-C_1)\times 100\%$ 求其回收率。由表 2 可知,本方法测定 *Ko*, *Ac* 和 *Am* 叶片表面 PAHs 的回收率分别为 92.4%~101.0%, 94.8%~108.2% 和 93.8%~103.6%。本方法的回收率优于 SSF 法,准确度可满足实验要求。

表 2 加标回收率

Table 2 Recoveries of standard addition experiments

叶片 Leaf	C_1 (ng/spot)	C_2 (ng/spot)	C_3 (ng/spot)	C_4 (ng/spot)	回收率 Recovery (%)
<i>Ko</i>	50.0	45.4	100.0	92.5	94.2
	250.0	252.3	300.0	298.5	92.4
	500.0	497.8	550.0	548.3	101.0
<i>Ac</i>	50.0	47.6	100.0	101.7	108.2
	250.0	247.6	300.0	300.7	106.4
	500.0	502.3	550.0	549.7	94.8
<i>Am</i>	50.0	47.8	100.0	99.6	103.6
	250.0	251.7	300.0	298.6	93.8
	500.0	501.0	550.0	549.8	97.6

3.3 不同温度下红树叶片表面菲的消减过程研究

由图 3 可知,在相对距离一定的条件下,光纤与样品间的夹角由 $35^\circ\sim 55^\circ$ 变化时,Phen 的荧光强度测定值呈现先增大后减少的变化趋势,在 45° 时达到最大,而在夹角一定的条件下,当光纤与样品间的相对距离为 0.5 cm,菲的荧光强度测定值最大。因此,为确保测得红树植物叶片表面菲的荧光光谱的重现性,要求在每次测定之前对夹角及相对距离进行严格控制,而本方法在测定前不需经过此过程,直接进行红树叶片表面菲的荧光光谱测定,极大地简化了操作、提高了重现性。

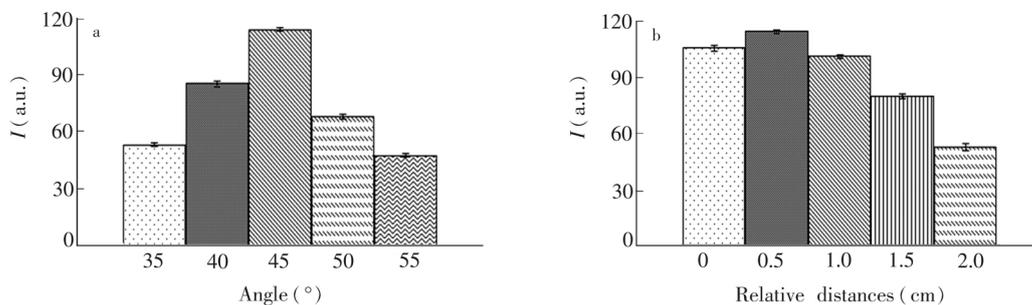


图 3 光纤与样品间夹角(a)及相对距离(b)对 *Ko* 叶片表面菲荧光强度的影响($\lambda_{\text{ex}}=250\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=369\text{ nm}$)

Fig.3 Effects of the angle and relative distances between optical fiber and sample on fluorescence intensity of Phen on *Ko* leaf surface ($\lambda_{\text{ex}}=250\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=369\text{ nm}$)

分别利用本方法和 SSF 法测定不同温度下 3 种红树植物叶片表面 Phen 的残留量,通过显著性差异分析可知,两方法所得结果并无显著差异($p>0.05$)。图 4 为消减实验结束时(180 h) 3 种红树植物叶片表面菲的百分残留量。随着温度的升高,Phen 的百分残留量显著降低,但 *Ko*, *Ac*, *Am* 表面 Phen 的百分残留量受温度的影响各不相同,这可能与不同红树植物叶片富集 PAHs 的作用方式差异有关。通过与文献[17]对比还可知,菲百分残留量受温度的影响高于荧蒽(Fluoranthene, Fla),以 *Ko* 为例,温度从

13℃增至30℃,Fla百分残留量由52.2%降至25.3%,而菲百分残留量则由60.1%降至18.4%,这表明高温更加有利于低环PAHs向大气分配。

4 结论

实验表明,本方法的测定结果与SSF基本相同,检出限和相对标准偏差优于SSF法,操作简便且平行测定次数明显减少。此外,此多用途荧光比色皿可不需改装直接应用于标配的荧光光谱仪(如英国Edinburgh公司的FLS 920/980)上,这使其具备测定叶片表面低浓度(pg/spot~ng/spot)PAHs含量的潜力,有助于进一步拓展叶片表面PAHs原位测定方法的应用范围。

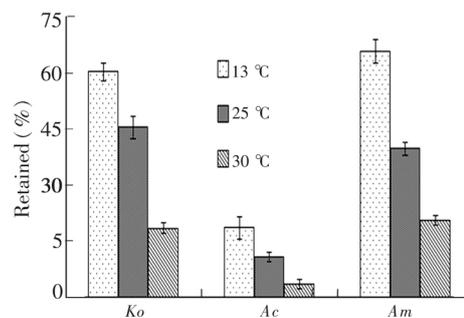


图4 不同温度条件下,消减过程结束时(180 h)3种红树叶片表面菲的百分残留量
Fig. 4 Percentage of Phen retained on three mangrove leaf surface after 180 h depuration under different temperatures

References

- Li J W, Xu S, Zhao Z X, Tanguay R L, Dong Q X, Huang C J. *J. Hazard. Mater.*, **2010**, 173: 75–81
- Delgado-Saborit J M, Stark C, Harrison R M. *Environ. Int.*, **2011**, 37: 382–392
- Lemieux C L, Long A S, Lambert I B, Lundstedt S, Tysklind M, White P A. *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 49(3): 1797–1805
- SUN Hai-Feng, ZHU Ya-Xian, ZHANG Yong. *Environmental Chemistry*, **2013**, 32(5): 734–741
孙海峰,朱亚先,张勇. *环境化学*, **2013**, 32(5): 734–741
- Desalme D, Binet P, Chiapusio G. *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, 47(9): 3967–3981
- De Nicola F, Baldantoni D, Alfani A. *Chemosphere*, **2014**, 114: 35–39
- Manzano C, Hoh E, Simonich S L M. *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46(14): 7677–7684
- SUN Hai-Feng. *In Situ Study on the Processes and Mechanisms for Depletion of Gaseous PAHs by Mangrove Canopy*. Xiamen: Xiamen University, **2014**
孙海峰. 原位研究红树植物去除气相多环芳烃的主要化学过程及机制. 厦门: 厦门大学博士学位论文, **2014**
- Canas A, Richter P, Escandar G M. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 852: 105–111
- Wang P, Du K Z, Zhu Y X, Zhang Y. *Talanta*, **2008**, 76(5): 1177–1182
- Wang P, Du K Z, Zhu Y X, Zhang Y. *Luminescence*, **2008**, 23: 99
- Chen L, Zhang Y, Liu B B. *Talanta*, **2010**, 83(2): 324–331
- Sun H F, Li R L, Zhu Y X, Zhang Y. *J. Hazard. Mater.*, **2013**, 262: 339–347
- YANG Ya-Nan, SUN Hai-Feng, ZHU Ya-Xian, WU Fang, ZHANG Yong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(10): 1465–1469
杨亚男,孙海峰,朱亚先,吴芳,张勇. *分析化学*, **2013**, 41(10): 1465–1469
- Bayen S. *Environ. Int.*, **2012**, 48: 84–101
- CHEN Li, WANG Ping, LIU Bei-Bei, ZHANG Yong. *Chinese Journal of Instrumental Analysis*, **2009**, 28(11): 1299–1303
陈丽,王萍,刘贝贝,张勇. *分析测试学报*, **2009**, 28(11): 1299–1303
- Sun H F, Yang Y N, Zhu Y X, Zhang Y. *Talanta*, **2013**, 116: 441–447

A Simple *in situ* Fluorimetry for Determination of *Phenanthrene* Adsorbed on Mangrove Leaf Surface

LI Rui-Long¹, ZHU Ya-Xian², ZHANG Yong^{2, 1, 3}

¹(State Key Laboratory of Marine Environmental Science of China (Xiamen University),
Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

²(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

³(Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China)

Abstract A self-designed multipurpose fluorescence colorimetric cell was employed to establish a simple *in situ* method for the determination of phenanthrene (Phen) adsorbed on leaf surfaces of *Kandelia obovata* (Ko), *Aegiceras corniculatum* (Ac) and *Avicennia marina* (Am). The linear dynamic ranges for the determination of phenanthrene (Phen) on Ko, Ac and Am leaf surfaces were 6.5–1200 ng/spot, 18.5–600 ng/spot and 3.2–700 ng/spot, with the detection limits of 0.6, 0.7 and 1.3 ng/spot, respectively. The recoveries of standard addition for Phen on Ko, Ac and Am leaf surfaces were 92.4%–101.0%, 94.8%–108.2% and 93.8%–103.6%, respectively. The relatively standard deviations were less than 6.5%. The detection limit and RSD of the established method were superior to solid surface optical fiber fluorimetry (SSF) while the linear range of these two methods were in the same order of magnitude. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the concentrations of Phen on mangrove leaf determined by SSF and the established method. Besides, the established method had the advantages such as simplified experimental operations and good repeatability.

Keywords Phenanthrene; Mangrove leaf; *In situ*; Fluorimetry

(Received 17 January 2015; accepted 22 March 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21177102) and the Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20130121130005) and Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 213121052).