

## 荧光法测定海水中石油烃的初步探讨\*

吴贤均 蔡魁鳌 归从时

(东海水产研究所)

### 提 要

本法以脱芳石油醚为萃取剂,提取海水中的石油烃,用岛津 MPS—5000 多用途自动记录分光光度计(Model III 荧光分光光度附件)测定萃取液的荧光相对强度。以蒽或大庆原油作为标准,用 310 毫微米波长激发,在 365 毫微米波长处读取荧光强度。方法的线性范围,蒽为 0—900 微克/升;大庆原油为 0—5000 微克/升。本法的石油检测下限至 2 微克/升。标准差为  $\pm 0.0004$  毫克/升;变异系数为 3.7%。平均回收率达 91.1%。与蒽等量的大庆原油的荧光强度比率( $R$ )为 8.7。

目前,海洋污染中以石油污染危害最大,也是海洋污染中最迫切需要解决的问题。现已发现,人体中有五种致癌物质是受环境影响的。如空气和水中的化学致癌物质,了解最多的是多环芳烃<sup>[4]</sup>。石油中即含有这类致癌烃。鱼类和贝类中亦已发现的肿瘤现象,有些是石油污染所引起的<sup>[2,8]</sup>。因此,要保护海洋环境与水产资源,就必须摸清石油污染状况,开展对石油监测方法的研究,这是当前海洋环境保护的重要课题之一。

测定石油烃的方法很多,主要方法有:1)重量法;2)红外吸收法;3)紫外吸收法;4)紫外—荧光法;5)红外—质谱分析;6)色谱法等。红外吸收法系用四氯化碳萃取水样中的油分,在红外区(3.5 微米波长处)有特征吸收峰。紫外吸收法系利用油分在紫外光区 225 或 256 毫微米波长有一特征的吸收峰。从目前研究情况看,红外法的灵敏度还达不到要求的水平;紫外吸收法测定的结果与石油污染的定量关系尚在进一步研究中;荧光法则利用石油烃在紫外光照射下所产生的荧光强度来进行分析。由于荧光法具有灵敏度高、选择性强的特点,近年来,已在国际上被广泛采用。欧美各国及日本基本上都参照“全球海洋站系统”(IGOSS)所规定的紫外—荧光光度法来测定水中石油烃<sup>[3,5-7]</sup>。水中油分的荧光法测定,国内也有报导<sup>[2]</sup>。为了正确地摸清我国海洋石油污染的现状,我们根据“全球海洋站系统”所采用的荧光法,以脱芳石油醚为萃取剂,蒽(Chrysene)为内校物质,对海水中石油烃的测定方法作了初步探索。

\* 本文曾于 1981 年 11 月 10 日在厦门召开的中国海洋化学学术讨论会上宣读。并经吉林农业大学土化系袁尔立主任审阅,谨表谢意。

## 材料与amp;方法

### (一) 仪器设备

1. 岛津 MPS—5000 多用途自动记录分光光度计(Model III 荧光分光光度附件)。
2. K.D. 浓缩器。

### (二) 试剂的配制和处理

1. 石油醚(30—60°) A.R.

预先将 100—200 目层析用硅胶和层析用氧化铝(中性)于 350°C 电阻炉温度控制器中活化 3.5 小时,趁热装入下端塞有干净玻璃棉的层析管(3×180 厘米)中,边装边敲,使其致密。硅胶柱高为 120 厘米,上层覆盖 10 厘米厚氧化铝,然后将石油醚以 0.5 毫升/分左右的流速通过该柱,收集流出液于试剂瓶中即为脱芳石油醚。将脱芳石油醚用荧光分光光度计进行扫描检查,以 310 毫微米波长激发,在 300—400 毫微米波长处不出荧光峰即可。

2. 蒽 C.P. (经处理符合要求)

蒽标准液:于干燥的 5 毫升烧杯中,精确称取 0.001 克蒽,加入脱芳石油醚使其溶解,然后转入 100 毫升容量瓶定容至标线。此标准液 1 毫升含 0.010 毫克蒽。

3. 油标准液的制备

称取 1 克大庆原油于 100 毫升烧杯中,加入约 50 毫升脱芳石油醚,搅拌溶解后静置,待不溶物全部沉于杯底后,将上层石油醚小心转入另一干燥烧杯中,置于 50±5°C 的恒温水浴锅上蒸发至近干,再于 50±5°C 的恒温箱中干燥 4 小时,取出后置于干燥器中冷却。

油标准溶液:精确称取大庆标准油 0.020 克于 5 毫升干燥的烧杯中,以脱芳石油醚溶解,移入 100 毫升容量瓶中,定容至标线。此溶液 1 毫升含 0.200 毫克标准油。

4. 硫酸奎宁(生化试剂)

硫酸奎宁储备液:称取硫酸奎宁 100 毫克于 1000 毫升容量瓶中,以 0.1N 硫酸溶液溶解,定容至标线,装入棕色瓶中置于冰箱内保存。

硫酸奎宁应用液:取 0.075 毫升硫酸奎宁储备液于 100 毫升容量瓶中,用 0.1N 硫酸溶液定容至标线。此溶液 1 毫升含硫酸奎宁 0.075 微克,作为校正仪器的标准液。

5. 无水硫酸钠 A.R.

### (三) 仪器校正

调节氙灯电流为 20—25 安,光电倍增管的负高压为 800 伏,显示范围选用“0—10% T”。

用 0.075 微克/毫升硫酸奎宁校正 MPS—5000 荧光分光光度计,把激发波长调至 350 毫微米处,紫外激发的狭缝为 20 毫微米,荧光发射波长取 450 毫微米,荧光发射的狭缝为 1.4 毫米,校正记录纸 0—90 格内。

## 结 果

### (一) 标准油样的激发光谱与荧光光谱

IGOSS 提出,目前各实验室可采用自己的油标准,但要以蒽为基准物质,并以蒽为校正荧光仪和相互比较分析方法的内校物质。

图 1、2 是蒽和“东海样品油”在石油醚溶液中的吸收光谱与荧光光谱。蒽的最大吸收光谱在 310 毫微米波长处,在 365 毫微米波长处有荧光峰出现。东海“样品油”的最大吸收波长为 300 毫微米,在 365 毫微米波长处也有一个明显的荧光峰。

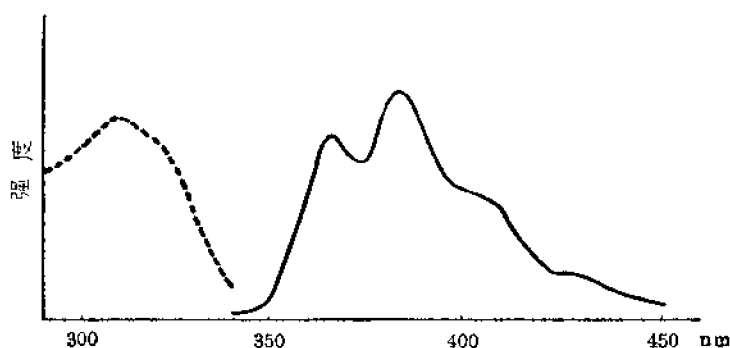


图 1 蒽的吸收光谱及荧光光谱  
.....吸收光谱,——荧光光谱

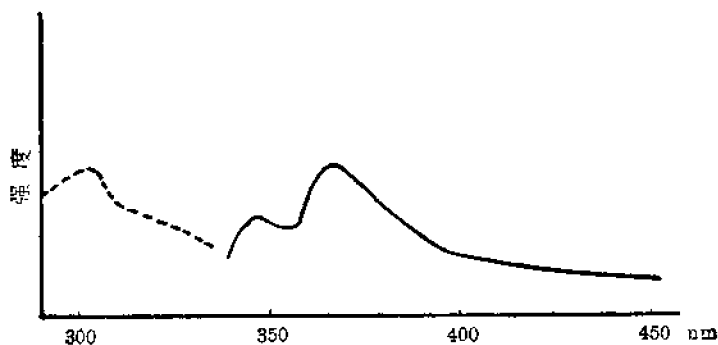


图 2 东海样品油的吸收光谱及荧光光谱  
.....吸收光谱,——荧光光谱

目前,国外普遍采用当地原油配制的油标准液,用 310 毫微米波长激发,在 360 毫微米波长处读取荧光强度。以我国大庆原油作标准油样,用 310 毫微米波长激发,进行光谱扫描。在 360 毫微米波长附近有荧光峰值。我们将大庆原油的数种产品进行全扫描,发现煤油在 360 毫微米波长附近有明显的荧光峰(见图 3)。图 4 是大庆原油中加入了蒽的荧光光谱,其混合样品的峰形与蒽的峰形极为相似,荧光峰值有明显的叠加现象。

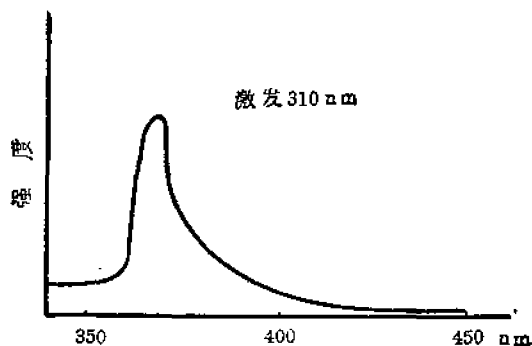


图3 煤油的荧光光谱

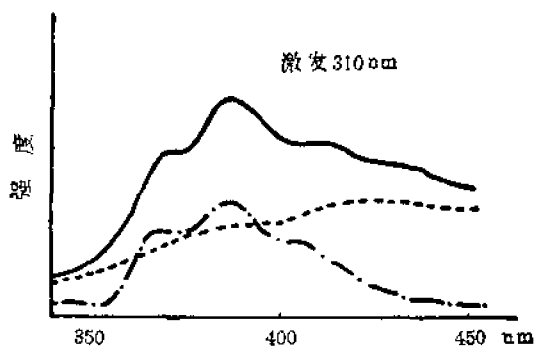


图4 大庆原油和萘的荧光光谱

.....大庆原油, — — —萘, ——大庆原油和萘

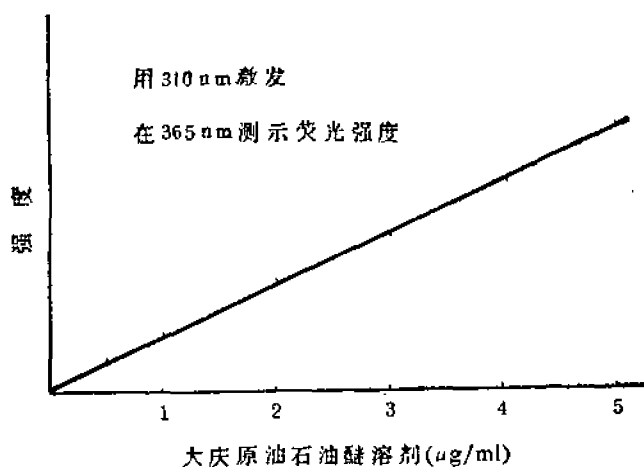
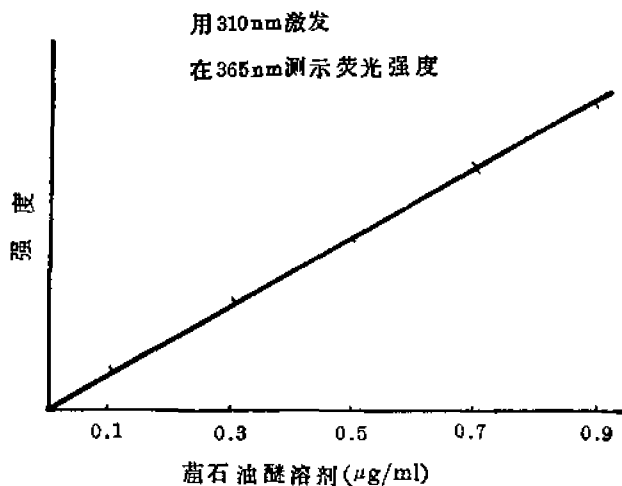
## (二) 工作曲线的绘制和样品的 R 值

取 6 支 25 毫升的具塞比色管, 分别加入 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 毫升萘标准液, 加脱芳石油醚定容至 10 毫升, 混匀。其浓度分别为每毫升含有 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 微克萘。将此溶液倒入 1 厘米石英吸收池中, 用 310 毫微米波长激发, 在 365 毫微米波长处测其荧光强度。以此标准系列的荧光强度为纵座标, 相应的萘浓度 (微克/毫升) 为横座标, 绘制成工作曲线。结果如图 5 所示。再取 7 支 25 毫升的具塞比色管, 分别加入 0、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 毫升油标准溶液, 用脱芳石油醚定容至 10 毫升, 摇匀。其浓度分别含有 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 微克标准油。照上述方法绘制成工作曲线。结果如图 6 所示。分析不同油类时, 采用相应的工作曲线。

为了对各国所测的石油烃浓度作统一比较, IGOSS 选用萘作为内校物质, 计算出各地标准油 (注明规格) 与萘 (约 0.5 微克/毫升) 等量的荧光强度比率“R”, 其公式为:

$$R = \frac{\text{萘的荧光强度}}{\text{标准油的荧光强度}} \times \frac{\text{标准油的重量}}{\text{萘的重量}}$$

根据我们初步分析, 我国大庆原油的 R 值为 8.7; 东海“样品油”的 R 值为 21.1。



### (三) 萃取条件的实验

IGOSS 指定蒽当量为统一油标准, 四氯化碳为萃取剂。我们则用蒽作为油标准, 脱芳石油醚作为萃取剂, 对萃取条件进行了实验。

#### 1. 萃取剂用量

把 1、5、9 微克蒽分别加入 500 毫升蒸馏水作为试样。萃取剂的用量为 10、15、20、25 毫升, 分别进行一次和二次萃取。结果表明, 在 500 毫升水样中, 用 15 毫升石油醚分二次萃取效果较好。(如表 1)。这同 IG OSS 以四氯化碳作萃取剂的萃取比 (1:30—40) 相吻合。

表1 萃取剂用量及萃取次数试验结果

菌加入量微克	蒸馏水体积毫升	萃取剂用量毫升	萃取次数	荧光相对强度	计算结果微克	回收率E%
1	500	10	2	8.5	0.85	85.0
1	500	15	2	7.0	0.90	90.0
1	500	20	2	4.5	0.40	40.0
1	500	25	2	3.0	痕迹	
5	500	10	2	28.0	4.30	86.0
5	500	15	2	20.5	4.50	90.0
5	500	20	2	15.0	4.00	80.0
5	500	25	2	11.5	3.25	65.0
9	500	10	2	51.0	8.50	94.4
9	500	15	2	33.0	7.80	86.7
9	500	20	2	25.0	7.60	84.4
9	500	25	2	20.0	7.25	80.6

## 2. 萃取时间的选择

试验分别以一分半钟、三分钟和四分钟进行,经萃取效果的观察,一分半钟萃取的回收率为70—80%;三分钟和四分钟的萃取效果则无明显差别。我们采用振荡三分钟(如表2)。

表2 萃取时间试验结果

菌加入量微克	蒸馏水体积毫升	萃取剂用量毫升	萃取次数	振荡三分钟	
				回收量微克	回收率E%
1	500	15	2	0.90	90.0
5	500	15	2	4.50	90.0
9	500	15	2	7.80	86.7

## 3. 加脱水剂和不加脱水剂的比较

试验分二组进行。用蒸馏水和河口水(预先用石油醚除去油分)配制相同浓度的菌溶液,加15毫升石油醚,分二次萃取,振荡时间都是三分钟。一组提取液移入具塞比色管待测;另一组提取液经无水硫酸钠脱水后再进行测定。实验表明,二组的试验结果无明显差别。为使试验手续简便,若无乳化现象,不加脱水剂也能达到同样的效果(水分不要带进比色管中)。结果如表3。

表3 脱水试验结果

水样 500 毫升	菌加入量微克	加无水硫酸钠测定		不加无水硫酸钠测定	
		回收量微克	回收率E%	回收量微克	回收率E%
蒸馏水	5	4.34	86.8	4.34	86.8
	5	4.34	86.8	4.34	86.8
河口水	5	4.42	88.4	4.34	86.8
	5	4.42	88.4	4.34	86.8

#### 4. pH 和盐度的影响

(1) pH 对萃取率的影响 取平行二组 500 毫升的蒸馏水, 用盐酸和氢氧化钠溶液将其调成不同的 PH 值, 分别加入 5 微克蒽, 用 15 毫升石油醚 (分二次) 进行萃取, 计算其回收量和回收率。在 pH 1—10 中间, 酸性条件下的萃取对回收率有影响, 硷性条件下则回收率良好 (如表 4)。由于正常海水或河口水呈硷性, 因而是有利于萃取的。

表 4 pH 影响试验结果

序 号	pH 1		4		6		7		8.2*		10	
	回收量 微克	回收率 E%	回收量 微克	回收率 E%	回收量 微克	回收率 E%	回收量 微克	回收率 E%	回收量 微克	回收率 E%	回收量 微克	回收率 E%
1	2.64	52.7	3.57	71.3	4.34	86.8	4.65	93.0	4.81	96.1	4.81	96.1
2	2.09	41.9	3.57	71.3	4.34	86.8	4.65	93.0	4.81	96.1	4.81	96.1

注: \* 海水 (32.98%)

(2) 盐度对萃取率的影响 在蒸馏水、河口水和外海水 (预先都用石油醚除去油分) 中, 分别加入 5 微克蒽, 用 15 毫升石油醚分二次进行萃取, 计算其回收量和回收率。结果表明, 盐度对萃取率影响不大 (如表 5)。

表 5 盐度影响试验结果

序 号	蒸 馏 水 0%		河 口 水 3.88%		外 海 水 32.98%	
	回收量微克	回收率 E%	回收量微克	回收率 E%	回收量微克	回收率 E%
1	4.34	86.8	4.42	88.4	4.65	93.0
2	4.34	86.8	4.42	88.4	4.34	86.8
3	4.34	86.8	4.34	86.8	4.34	86.8
平均	4.34	86.8	4.39	87.8	4.44	88.9

#### (四) 生物油对石油烃测定的干扰试验

要正确评价海洋中石油污染的程度, 就必须区分海水中的石油和动植物油脂。根据我们初步分析, 用脱芳石油醚配制的生物油脂 (鲨鱼肝油、猪油和豆油) 稀释液, 它们的荧光强度均接近零; 大庆标准油中加入各种生物油的混合样品与单一的大庆油样品的荧光峰是一致的。由此看来, 在 365 毫微米波长附近, 生物油对石油烃的测定没有干扰 (如图 7 所示)。

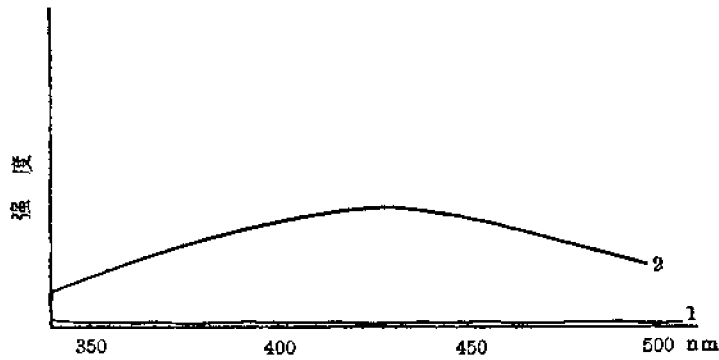


图7 生物油和大庆原油的荧光光谱

1. 2mg/L 猪油;  
2mg/L 豆油;  
10mg/L 鲨鱼肝油;
2. 2mg/L 大庆油;  
2mg/L 大庆油 + 2mg/L 猪油;  
2mg/L 大庆油 + 2mg/L 豆油。  
2mg/L 大庆油 + 2mg/L 猪油 + 2mg/L 豆油

### (五) 回收率试验

将不等量的大庆标准油溶液分别加入 500 毫升无油分的海水试样中,用 15 毫升脱芳石油醚分二次萃取,提取液移入具塞比色管中,定容至 15 毫升。然后按上述工作曲线的步骤进行测定。回收率如表 6 所示。平均回收率为 91.1%。

表 6 回收率试验结果

序号	项目	大庆原油加入量 微克	样品浓度 毫克/升	荧光 相对强度	回收量 微克	回收率 E %
1		100	0.200	57.0	87.11	87.1
2		100	0.200	58.0	91.76	91.8
3		50	0.100	30.0	47.43	94.9
4		50	0.100	29.5	46.81	93.6
5		5	0.010	3.0	4.65	92.4
6		5	0.010	2.7	4.34	86.4

### (六) 方法的精密度

用标准溶液配制含 0.010 毫克/升的海水试样,按回收试验步骤进行测定。结果见表 7。通过实验结果的计算,标准差为  $\pm 0.0004$  毫克/升,变异系数为 3.7%,表明精密度良好。



表 7 精密度试验结果

序 号	项 目	样品浓度毫克/升	荧光相对强度	回收量毫克/升	
1		0.010	24.0	0.0096	平均值 = 0.0094 毫克/升 标准差 = $\pm 0.0004$ 毫克/升 变异系数 = 3.7%
2		0.010	23.0	0.0093	
3		0.010	23.5	0.0095	
4		0.010	21.5	0.0087	
5		0.010	24.0	0.0096	
6		0.010	24.0	0.0096	

### (七) 方法的灵敏度

据文献报导, 1 升水样, 在通常条件下, 红外分光光度法的检测下限仅为 0.1ppm。紫外分光光度法为 0.01ppm 以上, 而荧光分光光度法则可达到 0.01ppm 以下。

方法的灵敏度与仪器性能、溶剂等有关。我们的试验是用 0.075 微克/毫升硫酸奎宁校正 MPS—5000 仪器, 定记录纸在 0—90 格内。以 500 毫升水样测定, 石油烃的检出下限可达 2 微克/升。

## 讨 论

(1) IGOSS 报导, 四氯化碳虽是较为理想的石油萃取剂, 但对荧光分析来说并不是合适的溶剂。因此, 提取之后将四氯化碳挥发, 再用正己烷作溶剂进行荧光分析。据文献介绍, 二氯甲烷、三氯三氯乙烷、氯仿、戊烷等都可作为萃取剂。选用的溶剂有庚烷、异辛烷、环己烷及石油醚。我们选用石油醚萃取并用作溶剂进行荧光分析, 得到的结果尚能满足, 而且石油醚具有毒性小、价格低、操作简便等优点。

(2) 荧光法测定石油烃, 激发波长取 310 毫微米, 在 360 毫微米波长处读取荧光强度。从大庆原油的荧光光谱扫描记录图来看, 最高荧光峰在 425 毫微米波长处, 在 360 毫微米波长附近没有明显“肩峰”。但是, 从大庆原油中分馏出来的煤油, 在 365 毫微米波长处却有明显荧光峰; 大庆原油与蒽混合的样品在 365 毫微米波长处有明显叠加现象。我们认为, 石油是多种烃类的混合物, 由于各组分的分子结构所对应的荧光峰波长相近, 导致了整个曲线没有明显的独立小峰。

(3) 与蒽等量的大庆原油的荧光强度比率“R”为 8.7, 而东海“样品油”的 R 值为 21.1。我们认为, 二者间有这样大的差异是由于大庆标准油是直接由石油醚配制的, 而东海“样品油”是用石油醚从海水中萃取的, 因此海水中的石油醚萃取物中含有矿物油、动植物油脂、脂肪酸、芳香族化合物、胺、农药、染料、卤代烃及其它杂质, 提取后挥发石油醚时, 仅除去了一些易挥发的低分子烃类, 而其它物质均同油类一起被称量, 因此导致东海“样品油”的 R 值偏高。

## 参 考 文 献

- [1] 吴贤均, 1981. 石油污染与海洋生物. 海洋渔业, 4: 14—15.
- [2] 黄贤智等, 1981. 水中油分的荧光测定. 光学与光谱技术, 2(1): 18—23.
- [3] 杉本喜一郎, 1981. 当面的基础的调查を進める阶段. Ocean Age, 13(5): 23—31.
- [4] Hase, A. and Hites, R. A., 1979. On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aqueous environment. *Identification and analysis of organic pollutants in water*. 205—214. Ed. by L. H. Keith, Ann Arbor Science Publishers Inc., Michigan.
- [5] IGOSS 1976. Guide to operational procedures for the IGOSS pilot project on marine pollution (petroleum) monitoring. *IOC/WMO Manuals and Guides No. 7*, UNESCO
- [6] Mackie, P. R. et al., 1978. Preliminary assessment of the presence of oil in the ecosystem at Ekofisk after the blowout. *J. Fish Res. Bd. Canada* 35(5): 544—551
- [7] Norton M. G. and Franklin, F. L., 1980. Research into toxicity evaluation and control criteria of oil dispersants. *Fish. Res. Tech. Rep.*, 57: 20. MAFF Direct. Fish. Res.
- [8] Sindermann, C. J., 1979. Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: a review. *Fish. Bull.* 76(4): 717—749.

## A PRELIMINARY STUDY ON THE DETERMINATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN SEAWATER BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Wu Xianjun, Qi Kui'ao and Gui Congshi

(Dong Hai Fisheries Research Institute)

### Abstract

The method based on ultra-violet fluorescence spectroscopy (IGOSS—Integrated Global Ocean Station System) with aromatic-free petroleum ether as the extractant and chrysene as the intercomparison chemical, for the measurement of petroleum hydrocarbons in seawater is presented in this paper.

1. The comparison between the spectra of the excitation and fluorescence of the chrysene and sample oil extracted from the Dong Hai proved that both of the chrysene and sample oil were excited most strongly in the neighborhood of 310 nm and fluoresced most intensively at 360 nm. Daqing crude oil and its kerosene were scanned with excitation at 310 nm and fluorescence spectrum also showed in the neighborhood of 360 nm. There were striking resemblances between the fluorescence spectra of the Daqing crude oil sample mixed with chrysene and that of chrysene, and it was found that fluorescence spectrum of mixed oil was simply the sum of the two individual curves

2. Using concentrations of about 0.5 µg/ml, the fluorescence intensity of the standard oil and chrysene was measured. The value of intercomparison ratio "R" was calculated: Daqing crude oil was 8.7, sample oil extracted from seawater of the Dong Hai 21.1. The causes leading in the difference of "R" were discussed briefly.

3. Conditions for sample extracting and the effect of grease or oil from animal and plant on petroleum hydrocarbons have been studied.

The linear range of the experiments indicated 0—900 $\mu\text{g}/\text{l}$  for chrysenes, 0—5000  $\mu\text{g}/\text{l}$  for Daqing crude oil. Minimum detectable concentration was approximately 2 $\mu\text{g}/\text{l}$  Daqing crude oil, the standard deviation was  $\pm 0.0004\text{mg}/\text{l}$ , the coefficient of variation was 3.7% and the average recovery of Daqing crude oil was found to be 91.1%.