

文章编号: 0253-2239(2005)05-687-4

用特征光谱荧光标记技术分析水中溶解有机物特性*

赵南京 刘文清 崔志成 张玉均 李宏斌 刘建国 丁志群 杨立书

(中国科学院安徽光学精密机械研究所环境光学与技术重点实验室, 合肥 230031)

摘要: 讨论了一种自然水体中有机物的快速诊断分析方法。介绍了总荧光光谱(TLS)和特征光谱荧光标记(SFS)技术;以激光诱导荧光(LIF)方法测量了水体的总荧光光谱,利用特征光谱荧光标记技术对水体中溶解有机物(DOM)及叶绿素 a(Chl a)进行了分析,并给出了不同浓度腐殖酸的归一化荧光强度与浓度的关系曲线。结果表明,利用特征光谱荧光标记技术对水体总荧光光谱的分析,可以进行水体污染物的快速、实时和在线监测。

关键词: 光谱学;激光诱导荧光;特征光谱荧光标记;溶解有机物;叶绿素 a

中图分类号: X832; O433.54 文献标识码: A

Analysis of Dissolved Organic Matter in Water Using Spectral Fluorescent Signature

Zhao Nanjing Liu Wenqing Cui Zhicheng Zhang Yujun Li Hongbin Liu Jianguo
Ding Zhiquan Yang Lishu

(Key Laboratory of Environmental Optics & Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics,
The Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstract: An analytical method of fast diagnosing organic matter in water is discussed. The concepts of total luminescence spectroscopy (TLS) and spectral fluorescent signature (SFS) technique are introduced. The total luminescence spectroscopy of water samples in combination with laser induced fluorescence (LIF) measurements using 532 nm wavelength excitation source are measured in the laboratory, and the spectral characteristics of dissolved organic matter (DOM) and chlorophyll a (Chl a) are analysed with spectral fluorescent signature technique. The curve of normalized fluorescence intensity against corresponding concentration of humic acid is showed. The possibilities of water quality monitoring in real time and on line based upon spectral fluorescent signature technique are discussed.

Key words: spectroscopy; laser induced fluorescence; spectral fluorescent signature; dissolved organic matter; chlorophyll a

1 引 言

利用激光诱导荧光对自然水体的水质监测是一种快速、实时和在线的检测方法,然而,污染物的复杂组成及其成分随时间和空间的变化将引起荧光光谱的改变,从背景光谱中正确地提取污染物的荧光光谱和快速准确的分析变得更加重要。自然水体中有机物以溶解(主要是棕黄酸和腐殖酸等)和悬浮(颗粒有机物)两种形式存在,浮游植物及其腐殖质的含量和水中有机物的量有关^[1,2]。溶解有机物

(DOM)是有机成份的最主要部分,在自然水体中是一本质的特性,溶解有机物的光谱特征通常由腐殖质的溶解部分来决定。典型的溶解有机物荧光强度与溶解有机碳的浓度有很好的相关性,腐殖质随不同地域和季节的变化导致它的荧光光谱的改变^[3],此外,外界因素如温度、酸碱性(pH值)和金属离子也将影响荧光特性。浮游植物是指浮在河流、湖泊和海洋中的微藻类组织结构,决定着大部分水体的初级产量。富营养化的水生态环境导致浮游植物泛

* 中国科学院知识创新工程方向性项目(KGCX2-SW-111)资助课题。

作者简介: 赵南京(1976~),男,中国科学院安徽光学精密机械研究所在职博士研究生,助理研究员,主要从事激光与光电子学方面的研究。E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2004-06-15; 收到修改稿日期: 2004-10-15

滥所引起的需氧量增加将引起鱼类死亡及其它水质问题。不同微藻类的荧光光谱特征随细胞色素组成(叶绿素、藻胆色素、类胡萝卜素)和光能在其中传输过程的不同而异。浮游植物的种类可以通过附属色素的特性来分组,不同色素的光谱特征可以用作混合浮游植物群落分类学成分的荧光指示,早期利用自然的浮游植物群落研究了光谱信号荧光强度和色素的体积浓度之间的相互关系,表明了荧光强度依赖于色素浓度及浮游植物群落的生长阶段^[4]。在一个稳定发展的群落中,荧光强度与色素浓度有一线性的依赖关系,但在浮游植物繁殖旺盛的时期,荧光强度和色素浓度的相关性降低,此时附属色素与叶绿素 a(Chl a)的荧光比依赖生理学发展阶段和分类学成分较少。大量的研究表明,有机体内叶绿素 a 的荧光量子产率依赖于浮游植物生长的阶段。因此,叶绿素 a 的荧光则是水体中总的浮游植物含量的指示剂,且随季节的变化而改变。国外对海水中的溶解有机物和浮游植物进行了大量的研究。本文的研究目的是发展自然水体中有机物的快速诊断分析方法,利用激光诱导荧光(LIF)探测技术获得自然水体的总荧光光谱(TLS),通过分析总荧光光谱中特定污染物的特征光谱荧光标记(SFS)强度对自然水体中的溶解有机物和浮游植物进行快速识别,取得了预期的结果。

2 实 验

使用 532 nm 激光激发水体中的溶解有机物和叶绿素 a 产生荧光,由于荧光光谱的时间和空间变化的一致性,荧光强度的变化与溶解有机物和叶绿素 a 的浓度变化直接相关,远远超过其成分或环境变化的影响。实验装置原理框图如图 1 所示。采用倍频 Nd:YAG 激光(532 nm)输出作为激发光源(其中 1064 nm 约 0.1%),脉冲宽度 10 ns,重复频率 10 Hz,单脉冲能量 53 mJ;产生的荧光经望远镜系统接收由光栅单色仪(北京光学仪器厂制造, WDM1-3 型)分光进入光电倍增管(日本滨松公司生产, R928 型)进行探测,光电倍增管的光谱响应范围是 185~900 nm,峰值响应波长 400 nm,阳极暗电流小于 10 μ A,脉冲上升时间 2.2 ns。光电倍增管输出的电信号经放大后由数据采集系统转换成数字信号,输入数据采集与控制系统进行数据处理。为了减小激发光源不稳定对测量结果的影响,采用激光脉冲触发信号与光电倍增管荧光接收保持一定的

延迟,以步进 0.5 nm 和 4 次采样(一次采样 1024 点)平均记数一次进行光谱连续采集。实验对合肥董铺污水处理厂处理出水 and 人工配制的已知不同浓度的腐殖酸溶液进行了荧光光谱测量和分析。

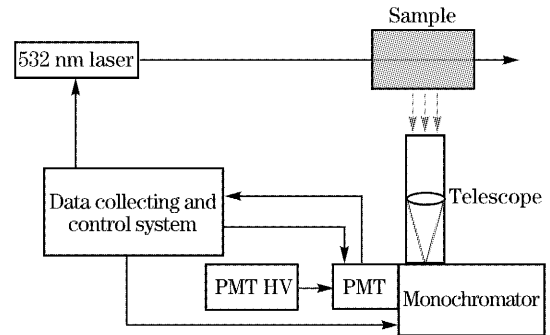


图 1 荧光探测系统原理框图

Fig. 1 Schematic diagram of fluorescence detection system

3 结果与讨论

3.1 水体的荧光光谱

在激发光作用下自然水体的总荧光光谱^[5],是由弹性散射引起的瑞利散射和米氏散射谱,非弹性散射引起的水拉曼散射谱以及溶解有机物和叶绿素 a 等有机物的荧光光谱的总和。它包括了我們所需探测的污染物发出的荧光及变化的背景所产生的光谱。通常情况下,任何一个荧光光谱(包括激发、发射、同步和时间分辨光谱)都可以作为总荧光光谱,关键是如何选择典型特征光谱来反映不同污染物的荧光特征以及如何从总荧光光谱中正确地指认和提取特定污染物的特征荧光光谱。本文采用了特征光谱荧光标记分析技术,特征光谱荧光标记是指某一污染物在特定激发波长下发出的光谱,通过对自然水体中特定污染物的特征光谱荧光标记采样积分处理来进行污染物的特性分析,指认水体中溶解有机物和叶绿素 a 等有机物的存在,并进行浓度的定量分析。

根据上述实验装置和分析方法,图 2 给出了去离子水和合肥市董铺污水处理厂处理出水在 532 nm 激发光作用下产生的总荧光光谱。我们用特征光谱荧光标记技术对处理出水指认出典型的特征谱有 λ_{532} 为水体弹性散射(包括瑞利散射和米氏散射)的峰值波长,在 $\lambda_{540} \sim \lambda_{620}$ 波长范围内,峰值约在 λ_{580} 处的光谱为水体中溶解有机物的特征荧光光谱, λ_{655} 为水拉曼散射峰值波长,而 λ_{685} 为水体中叶绿素 a 的特征荧光峰值波长。根据 λ_{580} 处的特征光谱荧光标记来定性分析水体中有机物的溶解部分。

由于每种浮游植物都含叶绿素 a, 可由 λ_{685} 处叶绿素 a 的特征荧光光谱及荧光强度作为不同浮游植物的存在及定量分析的指示剂。

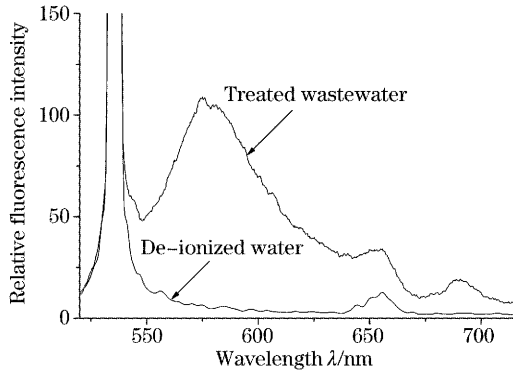


图2 董铺污水处理厂处理出水 and 去离子水的总荧光光谱

Fig. 2 The total luminescence spectra of de-ionized water and treated wastewater of Dongpu sewage treatment plant

3.2 荧光因子 ϕ

用激光诱导水体荧光的方法所获得的水体荧光光谱, 不仅是水体中溶解有机物和叶绿素 a 等有有机物的贡献, 也伴随着其它的杂散光。在测量中, 相同污染物浓度下激光诱导荧光的信号强度与水体的衰减系数有关, 而水的拉曼散射强度仅受水体衰减系数的影响^[6], 为了消除外界条件(如水波浪、气泡、泡沫及系统暗噪声等)对光谱的干扰, 我们利用水的拉曼散射信号强度 (I_{RS}) 去归一化水体中相关有机物的荧光强度 (I_{OF}), 因为水体中水分子的结构和含量是十分稳定的, 将它当作定标物质。定义荧光因子 ϕ (归一化荧光强度) 为有机物荧光信号的积分强度 I_{OF} 和水拉曼散射信号强度 I_{RS} 的比值。即

$$\phi = I_{OF}/I_{RS}$$

这一归一化处理是激光诱导水体荧光光谱分析技术的基本原则, 将它作为这一技术的内部标准。特别适合条件多变的野外激光遥感探测, 如水库、河流、湖泊和近海水体的激光诱导荧光光谱的遥感探测。

根据图 2 中叶绿素 a 的特征光谱荧光标记, 我们对叶绿素 a 的荧光强度因子作如下分析: 在 532 nm 激发波长下, 685 nm 带宽处叶绿素 a 的荧光信号强度 I_{685} 可表示为

$$I_{685} = \frac{E_A^* N_C \sigma_C^{685}(\lambda_{532})}{[K_{532} + K_{685}]}, \quad (1)$$

式中 N_C 为总体的叶绿素 a 分子密度, $\sigma_C^{685}(\lambda_{532})$ 为 532 nm 激发波长下 685 nm 带宽处的平均荧光截面, K_{532} 和 K_{685} 分别为水体对 532 nm 激发光和叶绿素 a 荧光的衰减系数。同样, 655 nm 带宽处水拉曼散射信号强度 I_{655} 可写为

$$I_{655} = \frac{E_A^* N_W \sigma_W^{655}(\lambda_{532})}{[K_{532} + K_{655}]}, \quad (2)$$

N_W 为水分子密度, $\sigma_W^{655}(\lambda_{532})$ 为水的 OH 根离子伸缩振动模式下的拉曼散射截面, K_{655} 为水对拉曼散射光强的衰减系数。

在(1)式和(2)式中,

$$E_A^* = \frac{E_{532} T(R_A) \xi(R_A) A_0 \phi_w}{4\pi R_A^2 \eta^2},$$

E_{532} 为 532 nm 激发光能量, $T(R_A)$ 为光在激发距离 R_A 下的来回传输系数, $\xi(R_A)$ 为几何交叠因子, A_0 为光学接收望远镜系统有效接收面积, ϕ_w 为水体与大气接触面的衰减系数, R_A 为激发距离, η 为水体反射指数。叶绿素 a 的归一化荧光强度因子 ϕ 可表示为

$$\phi = \frac{I_{685}}{I_{655}} = \left\{ \frac{K_{532} + K_{655}}{K_{532} + K_{685}} \right\} \frac{N_C \sigma_C^{685}(\lambda_{532})}{N_W \sigma_W^{655}(\lambda_{532})}, \quad (3)$$

由(3)式可以看出, 在衰减比值 $\frac{K_{532} + K_{655}}{K_{532} + K_{685}}$ 为常量或变化很小的情况下, 水体中叶绿素 a 的归一化荧光强度主要随叶绿素 a 的分子密度, 即叶绿素 a 的浓度而变化。因此, 根据测量污染物的归一化荧光强度可以进行有效的污染物含量的测量。

3.3 有机物浓度的标定

根据上述分析方法, 实验中测量了人工配制的已知不同浓度下标准腐殖酸溶液的总荧光光谱, 由溶解有机物的荧光强度和水拉曼散射信号强度求得溶解有机物的归一化荧光强度, 依此对溶解有机物的浓度进行标定。图 3 给出了腐殖酸溶液在不同浓度下的归一化荧光强度与浓度的关系曲线。可以看出, 归一化荧光强度与浓度的关系曲线几乎为一线性关系, 获得的线性回归方程为

$$\phi = 0.157C - 0.0199, \quad (4)$$

式中 ϕ 为归一化荧光强度, C 为腐殖酸样品质量浓度 (mg/l), 拟合相关系数为 0.9941, 可见腐殖酸溶液归一化荧光强度与质量浓度之间具有良好的线性关系。图 3 中归一化荧光强度曲线未能交于原点, 是由于所用稀释溶液去离子水中含有微量的溶解有机物以及 400~670 nm 范围可见光区的背景光叠加在有机物荧光上的影响, 使腐殖酸溶液的荧光强度曲线上移。如果能去除背景光以及实验系统整体噪声的影响, 归一化荧光强度与质量浓度的关系曲线为一过原点的直线。由于我们仅对水体中特定的污染物感兴趣, 所以可以根据已知的标准质量浓度污染物进行特定污染物质量浓度的标定, 如叶绿素等。因此, 可以根据所测有机物归一化荧光强度在

相对应的横坐标中反演出所含有有机物的质量浓度。

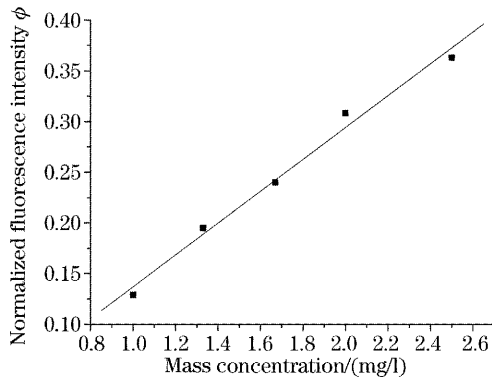


图 3 腐殖酸浓度与归一化的荧光强度关系曲线

Fig. 3 The curve of normalized fluorescence intensity and concentration of humic acid

以上给出了自然水体中有机物的快速分析方法,即通过在水体总荧光光谱中准确指认特定污染物的特征光谱荧光标记,以水拉曼散射信号强度进行归一化来求出归一化荧光强度以消除外界条件的影响。用标准质量浓度的腐殖酸(或棕黄酸)溶液进行溶解有机物的质量浓度标定。总荧光光谱可以是特定波长激发光作用下自然水体整体的发射光谱,也可以是不同波长激发光作用下的发射光谱的总和。它可以通过不同的方法来实现,包括选用多波长激发光来激发被测污染物,在实验室利用标准荧光光谱仪进行校正以及利用激光遥感分光计进行测量。根据所选择的典型特征光谱荧光标记,建立一个系统化的污染物标准特征光谱荧光标记信号库,将荧光强度与污染物质量浓度进行标定用来推算出污染物浓度的绝对值。这种方法的可靠性依赖于水体污染物标准信号库是如何表示以及如何组建的。标准信号库可以通过物理的、化学的、生物学的或者

以特征光谱表征的物质进行初始的分类和分组。

4 结 论

本文的研究目的是发展自然水体中有机物荧光的快速诊断分析方法。在总荧光光谱中通过正确的指认和提取典型污染物的特征光谱荧光标记光谱,以水拉曼散射信号强度作为水体的荧光强度单位进行特定污染物荧光强度的标定,根据归一化荧光强度与质量浓度的关系曲线反演出特定污染物质量浓度。在今后的水环境系统监测中,依靠激光诱导荧光方法开展以荧光雷达进行的水体遥感监测,根据所建立的不同区域典型污染物荧光强度与质量浓度的光谱信号库来进行污染物质量浓度的快速识别,使我们在较大范围的质量浓度中进行探测和鉴别低质量浓度的有机污染物,从而可以方便地实现水体的快速、实时和在线监测。

参 考 文 献

- 1 S. Babichenko, A. Leeben, L. Poryvkina *et al.*. Fluorescent screening of phytoplankton and organic compounds in sea water [J]. *J. Environmental Monitoring*, 2000, **2**(4): 378~383
- 2 S. Babichenko, S. Kaitala, A. Leeben *et al.*. Phytoplankton pigments and dissolved organic matter distribution in the gulf of RIGA[J]. *J. Marine Systems*, 1999, **23**(1~3): 69~82
- 3 L. V. Poryvkina, S. M. Babichenko, J. Lapimaa. Spectral variability of humus substance in marine ecosystems[J]. *AMBIO*, 1992, **21**(7): 465~467
- 4 R. Barbini, F. Colao, R. Fantoni *et al.*. Design and application of a lidar fluorosensor system for remote monitoring of phytoplankton[J]. *ICES J. Marine Science*, 1998, **55**(4): 793~802
- 5 A. E. Dudelzak, S. M. Babichenko, L. V. Poryvkina *et al.*. Total luminescent spectroscopy for remote laser diagnostics of natural water conditions[J]. *Appl. Opt.*, 1991, **30**(4): 453~463
- 6 M. Bristow, D. Nielsen, D. Bundy *et al.*. Use of water Raman emission to correct airborne laser fluorosensor data for effects of water optical attenuation[J]. *Appl. Opt.*, 1981, **20**(17): 2889~2906