

HY

中华人民共和国海洋行业标准

HY/T XXXXX—XXXX

海水中痕量铵盐的测定 流动分析-邻苯二甲醛固相萃取-荧光光度 法

Determination of Seawater trace ammonium — Flow analysis, solid phase
extraction and *o*-phthaldialdehyde fluorescence detection

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国自然资源部 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 干扰和消除.....	2
6 试剂与材料.....	2
7 仪器和设备.....	3
8 样品采集与保存.....	4
9 分析步骤.....	4
10 结果计算与记录.....	6
11 精密度和准确度.....	6
12 质量保证和质量控制.....	7
13 注意事项.....	7
附录 A（规范性）海水中痕量铵盐的测定分析记录.....	8
附录 B（规范性）海水中痕量铵盐测定的质量控制要求.....	9
参考文献.....	10

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国自然资源部提出。

本文件由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC 283）归口。

本文件起草单位：自然资源部第三海洋研究所、自然资源部第二海洋研究所、厦门大学。

本文件主要起草人：张元标、朱勇、袁东星、林辉、杨志。

海水中痕量铵盐的测定

流动分析-邻苯二甲醛固相萃取-荧光光度法

1 范围

本文件规定了采用流动分析-邻苯二甲醛固相萃取-荧光光度法测定海水中痕量铵盐的方法原理、干扰和消除、试剂与材料、仪器和设备、样品采集与保存、分析步骤、结果计算与记录、精密度和准确度、质量保证和质量控制的要求。

本文件适用于海水中 nmol/L 级别痕量铵盐的测定。样品富集体积为 10 mL 时，本方法的检出限为 9 nmol/L，测定下限为 15 nmol/L。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 12763.4 海洋调查规范 第 4 部分：海水化学要素调查

GB 17378.2 海洋监测规范 第 2 部分：数据处理与分析质量控制

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

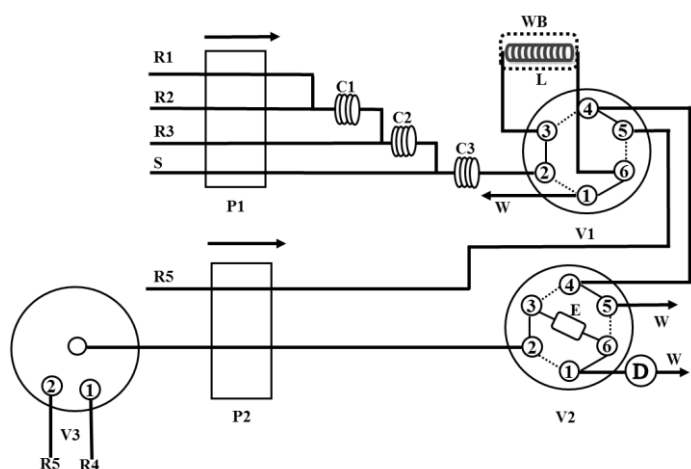
4.1 流动分析系统工作原理

样品与试剂在蠕动泵的推动下进入分析模块，在密闭的管道中按设定的顺序和比例进行混合、反应、固相萃取、洗脱，洗脱液进入荧光检测器测定荧光强度，计算样品中被测物质的含量。

4.2 化学反应原理

在碱性介质中，海水样品中的铵盐与邻苯二甲醛、亚硫酸盐发生衍生化反应，生成具有荧光性质的异吡啉衍生物，该衍生物富集在固相萃取小柱上，经乙醇洗脱后，用荧光检测器在 365 nm 激发波长、425 nm 发射波长下测定。

参考分析流路图见图 1。



说明：

P1——蠕动泵 1	P2——蠕动泵 2	C1——混合盘管 1, 80cm
C2——混合盘管 2, 80cm	C3——混合盘管 3, 80cm	L——10 mL 定量环
E——固相萃取小柱 (见 6.22)	WB——65 °C 水浴	V1——六通阀 1
V2——六通阀 2	V3——多位选择阀	D——荧光检测器
R1——邻苯二甲醛溶液 (见 6.11)	R2——亚硫酸钠溶液 (见 6.12)	R3——四硼酸钠缓冲溶液 (见 6.13)
R4——洗脱液 (见 6.14)	R5——超纯水	S——样品
W——废液		

图 1 流动分析-邻苯二甲醛固相萃取-荧光光度法测定痕量铵盐的分析流路图

5 干扰和消除

为防止空气中的氨气及颗粒物对试剂的干扰和污染,需增加试剂保护柱,试剂保护柱由一次性注射器改装而成。去除 5 mL 一次性注射器的活塞和针头,在空筒内填充 3 mL 酸化硅胶(见 6.21),即制成试剂保护柱。在试剂瓶瓶盖上打孔,其大小以能够套紧注射器空筒的乳头为宜;将乳头即整支试剂保护柱固定在试剂瓶瓶盖上。

6 试剂与材料

除非另有说明,在分析中均使用确认为分析纯的化学试剂,实验用水均为新制备的超纯水(电阻率 $\geq 18.0 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

- 6.1 邻苯二甲醛 ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$)。
- 6.2 甲醇 (CH_3OH): 色谱纯。
- 6.3 无水亚硫酸钠 (Na_2SO_3)。
- 6.4 甲醛 (HCHO): 优级纯。

- 6.5 十水合四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)。
- 6.6 95% (V/V) 乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)。
- 6.7 硫酸 (H_2SO_4): 优级纯, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4)=1.84\text{ g/mL}$ 。
- 6.8 盐酸 (HCl): 优级纯, $\rho(\text{HCl})=1.19\text{ g/mL}$ 。
- 6.9 氯化铵 (NH_4Cl): 优级纯, 在 $100\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干并恒重后, 保存在干燥器中。
- 6.10 硅胶 (200 目)。
- 6.11 邻苯二甲醛溶液: $c(\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2)=3\text{ mmol/L}$ 。配制方法为: 称取 3.35 g 邻苯二甲醛 (见 6.1) 溶于 200 mL 甲醇 (见 6.2) 中, 用水稀释至 1 L, 得到邻苯二甲醛溶液浓度为 25 mmol/L。该溶液贮存于高密度聚乙烯瓶中, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 可稳定 1 个月。临用时用水稀释至 3 mmol/L。
- 6.12 亚硫酸钠溶液: $c(\text{Na}_2\text{SO}_3)=0.8\text{ mmol/L}$ 。配制方法为: 称取 1.26 g 无水亚硫酸钠 (见 6.3) 溶于水中, 并定容至 1 L, 加入 0.2 mL 甲醛 (见 6.4), 得到亚硫酸钠溶液浓度为 10 mmol/L。该溶液贮存于高密度聚乙烯瓶中, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 可稳定 1 个月。临用时用水稀释至 0.8 mmol/L。
- 6.13 四硼酸钠缓冲溶液: $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)=15\text{ g/L}$ 。配制方法为: 称取 15 g 十水合四硼酸钠 (见 6.5) 溶于水中, 并定容至 1 L。该溶液贮存于高密度聚乙烯瓶中, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 可稳定 1 个月。
- 6.14 洗脱液: 95% (V/V) 乙醇 (见 6.6), 使用前用超声波脱气 10 min。
- 6.15 硫酸溶液: $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=6\text{ mol/L}$ 。配制方法为: 量取 300 mL 硫酸 (见 6.7), 在不断搅拌下缓缓加入 600 mL 水中。
- 6.16 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 。配制方法为: 量取 50 mL 盐酸 (见 6.8) 与 550 mL 水混合均匀。
- 6.17 铵盐标准贮备液: $c(\text{NH}_4\text{Cl})=10.00\text{ mmol/L}$ 。配制方法为: 准确称取 0.3304 g 氯化铵 (见 6.9) 溶于水中, 并定容至 500 mL, 贮存于高密度聚乙烯瓶中, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 可稳定 1 个月。
- 6.18 铵盐标准中间溶液: $c(\text{NH}_4\text{Cl})=100.00\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。配制方法为: 准确量取 1.00 mL 铵盐标准贮备液 (见 6.17), 用水定容至 100 mL, 贮存于高密度聚乙烯瓶中, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 可稳定 7 天。
- 6.19 铵盐标准使用溶液: $c(\text{NH}_4\text{Cl})=1.00\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。配制方法为: 准确量取 1.00 mL 铵盐标准中间溶液 (见 6.18), 用水定容至 100 mL, 现用现配。
- 6.20 低铵海水: 取采集于寡营养盐海域的海水作为低铵海水, 常温密封保存, 其铵盐浓度应低于本方法的检出限。
- 6.21 酸化硅胶。配制方法为: 称取 200 g 硅胶 (见 6.10) 在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干过夜, 加入 50 mL 硫酸溶液 (见 6.15), 搅拌混匀。
- 6.22 固相萃取小柱。Oasis HLB 小柱¹⁾: $6\text{ cm}^3/200\text{ mg}$ 。
- 6.23 蠕动泵泵管。试剂泵管内径 0.89 mm, 样品泵管内径 2.06 mm。
- 6.24 聚四氟乙烯管。流路管道和混合盘管内径 0.75 mm, 进样管和反应盘管内径 1.5 mm。

7 仪器和设备

7.1 商品化或实验室自制的流动分析装置, 参见图 1, 主要由下列各部分组成:

——蠕动泵;

¹⁾ Oasis® HLB 小柱是由美国 Waters 公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文件的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果, 那么可使用这些等效产品。

- 多位选择阀；
- 六通阀；
- 流动分析用荧光检测器；
- 数据处理及仪器控制软件。

7.2 恒温水浴装置。

7.3 分析天平：感量为 0.0001 g。

7.4 普通天平：感量为 0.01 g。

7.5 一般化学实验室常用的仪器和设备。

8 样品采集与保存

样品采集与保存措施如下：

- a) 采样前，应依次用盐酸溶液（见 6.16）、超纯水清洗所有接触样品的器皿；
- b) 采样过程注意防止污染，应戴无营养盐污染的一次性手套，每采一次样品应更换手套；
- c) 先用样品将高密度聚乙烯瓶润洗三次以上，再将样品采集于瓶中；
- d) 采集的样品一般无需过滤，如果必须过滤，要特别注意防止过滤过程中引入污染；
- e) 样品采集后宜现场分析，若无法及时分析，可置于冰箱中冷藏或在 -20 °C 下速冻保存，冷藏不能超过 24h，冷冻不宜超过 5d。

9 分析步骤

9.1 仪器调试

按照图 1 所示连接分析系统。开机后，先用超纯水代替试剂，检查整个分析流路的密闭性及液体流动的顺畅性，然后依次使用超纯水、盐酸溶液（见 6.16）、超纯水清洗整个管路各 20 min，待基线稳定后，将各管道的入口端置入对应的试剂或样品中。

9.2 仪器运行程序设定

按表 1 设定运行程序和参数，分析流路参见图 1，具体步骤如下：

- a) 步骤 1，样品与试剂 R1（邻苯二甲醛溶液）、R2（亚硫酸钠溶液）、R3（四硼酸钠缓冲溶液）在 P1（蠕动泵 1）的推动下，在流路中混合并进入定量环；
- b) 步骤 2，定量环中样品与试剂在恒温水浴装置中（温度 65 °C ± 1 °C）停流反应一定时间，生成异吲哚衍生物；
- c) 步骤 3，超纯水在 P2（蠕动泵 2）作用下将定量环中的衍生反应溶液推送进入固相萃取小柱，衍生物被萃取；
- d) 步骤 4，在继续步骤 3 操作的同时，洗脱液清洗检测器流通池；
- e) 步骤 5，固相萃取小柱上富集的衍生物被洗脱液迅速洗脱，流经荧光检测器进行检测；超纯水

同时清洗定量环及反应流路。

表 1 分析系统的运行程序和参数

步骤	蠕动泵 1 流速 ^a mL/min	蠕动泵 2 流速 ^a mL/min	六通阀 1 阀位	六通阀 2 阀位	多位选 择阀阀 位	持续 时间 s	说 明
1	1.7 (试剂) 8.3 (样品)	5.0 (超纯水) 5.7 (超纯水, 连 接多位阀的通道)	实线位	虚线位	2	85	样品与试剂 R1 (邻苯二甲 醛溶液)、R2 (亚硫酸钠 溶液)、R3 (四硼酸钠缓 冲溶液) 混合后, 充满定量 环; 超纯水清洗检测器流通 池
2	0.0	0.0	实线位	实线位	2	300 或 200 ^b	停流阶段, 反应生成异吡喹 啉生物
3	0.0	5.0 (超纯水) 5.7 (超纯水, 连 接多位阀的通道)	虚线位	虚线位	2	75	试液过柱, 衍生物在固相萃 取小柱上富集
4	0.0	5.0 (超纯水) 5.7 (洗脱液)	虚线位	虚线位	1	15	试液过柱, 衍生物在固相萃 取小柱上富集; 洗脱液清洗 检测器流通池
5	0.0	4.3 (超纯水) 4.6 (洗脱液)	虚线位	实线位	1	85	洗脱液洗脱富集在柱上的 衍生物, 送入检测器检测
^a 流速为实测流速。 ^b 选择标准系列 I 绘制标准曲线时, 时间设置为 300s; 选择标准系列 II 绘制标准曲线时, 时间设置为 200s。							

9.3 标准系列溶液的制备

标准系列 I: 分别移取 0.00mL、1.50mL、2.50mL、5.00mL、7.50mL 和 10.00mL 的铵盐标准使用溶液 (见 6.19), 用低铵海水 (见 6.20) 稀释并定容至 100mL, 制备 6 个浓度点的标准系列。铵盐的浓度分别为: 0.0 nmol/L、15.0nmol/L、25.0nmol/L、50.0nmol/L、75.0nmol/L 和 100.0nmol/L。

标准系列 II: 分别移取 0.00 mL、5.00 mL、10.00 mL、15.00 mL、20.00 mL、25.00 mL 和 30.00 mL 的铵盐标准使用溶液 (见 6.19), 用低铵海水 (见 6.20) 稀释并定容至 100mL, 制备 7 个浓度点的标准系列。铵盐的浓度分别为: 0.0nmol/L、50.0nmol/L、100.0nmol/L、150.0nmol/L、200.0nmol/L、250.0nmol/L 和 300.0nmol/L。

9.4 标准曲线的绘制

根据待测样品浓度, 选择合适的标准系列 (见 9.3), 依次从低浓度到高浓度取适量标准系列溶液, 置于样品瓶中, 启动分析系统进行测定。以测定荧光信号值 (荧光强度) 为纵坐标, 对应的铵盐浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

9.5 样品测定

取适量海水样品，采用 9.4 相同的条件，进行样品的测定。

9.6 空白试验

用低铵海水（见 6.20）代替样品，按照 9.5 样品测定步骤进行空白试验。

10 结果计算与记录

对 9.4 绘制的标准曲线进行线性拟合后，得到标准曲线拟合方程。样品中铵盐的浓度按照式（1）进行计算。测定分析记录表见附录 A。

$$c = \frac{y-b}{a} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

c——样品中铵盐的浓度，单位为纳摩尔每升（nmol/L）；

y——测定的荧光信号值（荧光强度）；

b——标准曲线拟合方程的截距；

a——标准曲线拟合方程的斜率。

计算结果表示到小数点后一位。

11 精密度和准确度

11.1 精密度

（6~7）家实验室分别使用本方法对铵盐浓度为 40.0nmol/L、150.0nmol/L 的样品进行了重复测试（n = 9~11），测定平均值分别为 33.3nmol/L~45.8nmol/L 和 146.3nmol/L~162.4nmol/L；重复性标准差分别为 1.7nmol/L 和 5.2nmol/L；重复性限分别为 4.7nmol/L 和 14.7nmol/L；再现性标准差分别为 4.9nmol/L 和 7.7nmol/L；再现性限分别为 13.7nmol/L 和 21.4nmol/L。

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值应不大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于 20% 的情况不超过 5% 为前提。

在不同的实验室，由不同的操作者使用不同的设备，按相同的测试方法，对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值应不大于这两个测定值的算术平均值的 35%，以大于 35% 的情况不超过 5% 为前提。

11.2 准确度

取适量浓度为 6.00 μmol/L 的铵盐国家一级标准物质，用低铵海水稀释后作为样品（稀释后浓度分

别为 40 nmol/L 和 150 nmol/L), 由 7 家实验室分别使用本方法进行测试, 结果的相对偏差范围为 -7.9%~2.9%。7 家实验室分别对实际海水样品进行加标回收测定, 加标浓度为 25.0 nmol/L~50.0 nmol/L, 回收率范围为 93.6%~103.3%。

12 质量保证和质量控制

质量保证和质量控制应按照 GB 17378.2 和 GB/T 12763.4 的相关规定执行。

每批样品或连续测定 8 h 后应做一个全程方法空白样、一组检测样品加标样、一组平行双样; 有条件的加带一个标准参考物质样品。全程方法空白样以低铵海水替代样品, 测定步骤同样品。测定结果应符合附录 B 的规定。

建议每分析 10 个样品, 使用标准曲线中间浓度溶液进行校准核查。如果测定值与理论值的相对误差在 $\pm 10\%$ 之内, 说明测定系统在可控范围内。如果相对误差超过 $\pm 10\%$, 说明测定系统失控, 则应检查仪器、试剂溶液是否正常, 确定无疑后重新配制、测定、绘制标准曲线, 上一个合格检查值之后测定的样品需重新测定, 并依照新的标准曲线计算浓度。

13 注意事项

本方法操作中应注意如下事项:

- 实验用超纯水应当天制备, 以避免空白过高;
- 试剂和环境温度会影响分析结果, 冰箱内贮存的试剂应放置至室温后再使用, 分析过程中最好保持室温恒定, 温度波动不宜过大;
- 实验中应避免使用玻璃材质容器保存试剂或样品;
- 实验环境对痕量铵盐测定影响较大, 应避免空气中的氨对试剂或样品的玷污, 避开实验室内及实验室附近区域的氨污染源;
- 每批样品分析均应绘制标准曲线。实验过程中使用新配制的试剂或标准系列溶液时, 应重新绘制标准曲线;
- 实验过程中注意按照 9.6 步骤检查低铵海水质量, 如发现低铵海水中铵盐含量超出检出限, 应及时更换低铵海水, 并重新绘制工作曲线;
- 建议每测定约 100 个样品更换一次固相萃取小柱, 并重新绘制工作曲线。

附录 A
(规范性)
海水中痕量铵盐的测定分析记录

海水中痕量铵盐的测定分析记录见表 A.1。

表 A.1 海水中痕量铵盐的测定分析记录表
(流动分析-邻苯二甲醛固相萃取-荧光光度法)

海区_____调查船_____采样日期：_____年_____月_____日

仪器型号_____分析日期：_____年_____月_____日 共_____页 第_____页

序号	站号	样品编号	荧光强度			样品中铵盐浓度 nmol/L	备注
			平行 1	平行 2	平均值		
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
备注	标准曲线线性回归拟合方程: $y=ac+b$ ($a=$ $b=$ $r=$)						

分析者:

校对者:

附录 B
(规范性)
海水中痕量铵盐测定的质量控制要求

海水中痕量铵盐测定的数据质量控制要求见表 B.1。

表 B.1 海水中痕量铵盐测定的质量控制要求

项目	参数	要求	频率
方法空白样	空白浓度	<9.0nmol/L	每次绘制校准曲线溶液前测定
检测样品加标样	加标回收率	80%~120%	测定每批样或连续测定 8h 后应做
平行双样	平行双样相对偏差 ^a	≤±10%	测定每批样或连续测定 8h 后应做
<p>^a 平行双样相对偏差以下式计算：</p> $\eta = \frac{ c_1 - c_2 }{c_1 + c_2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(B.1)$ <p>式中： η——相对偏差； c_1、c_2——平行双样测得的铵盐浓度，nmol/L。</p>			

参 考 文 献

- [1] GB 17378.3 海洋监测规范 第3部分：样品采集、贮存与运输
 - [2] GB 17378.4 海洋监测规范 第4部分：海水分析
 - [3] HY/T 147.1 海洋监测技术规程 第1部分：海水
-