



自然水體中腐植物質螢光強度檢測方法II—固相萃取法

中華民國83年3月9日(83)環署檢字第00540號公告

NIEA W940.50U

中華民國100年12月14日環署檢字第1000109874號公告修正為NIEA W941.51C



一、方法概要

自然水體中微量腐植物質 (HumicSubstances) 之螢光強度檢驗方法(以下稱本方法)係在室溫及 pH 值等於 2.5 之條件下，將水樣通過 C - 18 固相萃取裝置，水樣中所含的微量腐植質經固相吸附劑捕捉後，利用甲醇萃取腐植質，萃取液經減壓濃縮並重新溶於試劑水後，直接以波長 370nm (或其他適用波長)之紫外光照射水樣，偵測其在波長 445nm 處之螢光發射強度。該螢光強度值係與奎寧硫酸鹽 (QuinineSulfate)之過氯酸水溶液經波長 347nm 之紫外光激發時，在445nm 處發射之螢光強度值相比較，經濃縮比例校正後，以此奎寧硫酸鹽之相對應濃度值報告，定義為 QE(QuinineSulfateEquivalent) 值。由於存在於自然水體中的腐植質係有機混合物所組成，其形成來源不同時，水體中各類腐植質的分子螢光光譜所呈現的特性亦不同，激發波長可能在 330 至 390nm 之間，而發射波長亦可能在 410nm 至 470nm 之間，各類來源之腐植物質之發射波長雖不盡相同，但仍可參照 QE 值方式報告。

二、適用範圍

本方法適用之水體基質包括地下水、井水、湖泊及水庫水等。當水樣依 NIEAW940.50T 檢驗，其腐植質螢光強度超出該方法適用下限時，可適用本方法。若水樣之螢光強度範圍在 QE 值為 $3.0 \times 10^{-11} \text{M}$ 以下時，須以其他方法檢驗其螢光強度。

三、干擾

常見之干擾，有下列數種可能來源：

- (一) C-18 固相萃取膜未經甲醇適當活化以致吸附容量過低。
- (二) 水樣之 pH 值過低(< 2.0)以致 C-18 吸附劑遭受破壞，或 pH 值過高，以致回收率過低。
- (三) 水樣通過 C-18 固相萃取膜時，流速過高。
- (四) 置放水樣之石英槽未洗淨，以致產生交互污染。
- (五) 水樣中若含有在 370nm 處吸收，或在 445nm 處吸收或發射之其他有機物質時，須以其它方法驗證其螢光強度。

四、設備

- (一) 螢光光譜儀：須能以掃描方式由波長 220nm 至 800nm 波長間操作任何激發或偵測發射螢光光譜。波長解析度及再現性應在 $\pm 5 \text{nm}$ 之內。入射及發射狹縫 (SpectraSlitWidth) 可小至 2.5nm。
- (二) pH 計。
- (三) 薄膜過濾裝置。
- (四) 抽真空裝置。

- (五) 減壓濃縮裝置。
- (六) 10m m 光徑之螢光光譜分析專用之石英槽。

五、試劑與溶液

- (一) 奎寧硫酸鹽：分析試藥級以上。
- (二) 過氯酸，70%：分析試藥級以上。
- (三) 純水。
- (四) QE 檢量儲備溶液：取 0.08g 奎寧硫酸鹽(精秤至 0.1m g)溶於 1.0 升之 0.10M 過氯酸水溶液。
- (五) QE 檢量二級溶液：取 1.00m L 之儲備溶液以 0.10M 之過氯酸溶液稀釋至 100m L。
- (六) 0.10M 過氯酸水溶液：秤取 14.34g 之 70%過氯酸(精秤至 10m g)，以純水稀釋至 1.0 升。
- (七) 0.45 μ m 之硝化纖維或玻璃纖維濾膜。
- (八) C-18 固相萃取膜。
- (九) pH 為 2.3 及 7.0 的試劑水，使用 HCl 及 NaOH 溶液調整之。
- (十) 0.1M 氫氧化鈉水溶液：調整 pH 之用。
- (十一) 0.01M 氫氧化鈉水溶液：供洗滌玻璃濾器之用。
- (十二) 甲醇：殘量級。
- (十三) 1M 鹽酸水溶液：供酸化水樣之用。

六、採樣與保存

樣品可以不透光之 1L 玻璃瓶直接取樣至滿，至少需兩瓶，採樣後，應貯存於 4 °C 並避免見光。水樣應於 48 小時內用 0.45 μ m 濾膜過濾且應在採樣七天內檢驗完畢。

七、步驟

(一) 試樣處理

1. 取一乾淨 0.45 μ m 硝化纖維濾膜置入一乾淨之玻璃濾膜過濾裝置，接上抽真空裝置，再以 1L 之純水洗滌濾膜及支持之玻璃濾器，捨棄濾液，再以 100m L 純水通過濾膜，收集濾液即為空白樣品。
2. 以待測水樣通過上述之薄膜，收集濾液即可進行固相萃取。
3. 若需處理兩個以上水樣時，須更換濾膜，並以大量 0.01M 氫氧化鈉水溶液洗滌玻璃濾器，再以大量純水洗滌後，以 100m L 純水通過此濾膜，收集濾液即可作為該樣品之空白樣品。
4. 空白樣品在波長 445nm 處，若所得之螢光強度值大於 1.0×10^{-9} M 之 QE 值以上之時，必須檢討污染原因並重複操作七(一) 3. 之步驟，直至該空白樣品不再顯示污染為止。

(二) 奎寧硫酸鹽溶液螢光強度檢量線之配製方法

1. 分別量取 QE 檢量二級溶液，如 1.0，2.0，4.0，10.0m L，用 0.10M 過氯酸水溶液稀釋至 100m L 即得。此配製濃度區間須能適切的涵蓋待測水溶液之 QE 值。
2. 設定螢光光譜儀之操作條件：

激發波長設在 347nm 處，入射狹縫設在 5nm，發射狹縫設在 5nm，波長掃描範圍設定由 360nm 至 540nm，其掃描速率在 120nm/min 以內。

- 3.分別將 QE 檢量線溶液依序置入石英槽內，記錄各相對應之螢光光譜並讀取在波長 445nm 之儀器螢光強度值。

(三) 固相萃取

- 1.水樣經過濾後，在每升水樣中加入 5m L 甲醇，充分混合後，以 1M HCl 調整其 pH 值至 2.5。
- 2.將 C-18 固相萃取膜置入玻璃濾器，置回貯液槽後以濾器夾固定即成固相萃取裝置，如圖一裝置所示。
- 3.貯液槽內加入 50m L 甲醇後，靜置 5 分鐘以涵浸 C-18 固相萃取膜，隨後利用真空使甲醇通過 C-18 固相萃取膜，流率為 10m L/min。
- 4.將此裝置之真空解除，貯液槽內加入 5m L 甲醇，等到甲醇因重力而開始自固相萃取裝置內導管滴下時，貯液槽內加入 10m L 純水，開始抽真空，隨即加入水樣，調節流速為 50 mL/min 以內。
- 5.水樣完全通過後，以 10m L pH 為 2.3 的試劑水加入貯液槽並持續抽真空至少 30m in，以去除殘餘水份。
- 6.將固相萃取裝置解除真空並移去下方三角瓶內之萃餘液，在三角瓶內置入一長試管，以承接甲醇萃取液，並使用一乾淨貯液槽重新組合後，在上方儲液槽內置入 5m L 甲醇，靜置 5 分鐘後再利用真空抽取一半甲醇，靜置 2 分鐘，隨後抽盡。
- 7.再以另一 5m L 甲醇重複操作上述 6. 步驟，合併甲醇萃取液至一 150m L 燒瓶，利用減壓濃縮裝置，在約 40 °C 及 60m bar 環境下濃縮甲醇萃取液至乾。
- 8.在上述 7. 之燒瓶中加入 5.0m L pH 為 7.0 之試劑水，充分旋轉潤濕燒瓶內壁，靜置 5 分鐘後充分旋轉，再靜置 30 分鐘。
- 9.將上述濃縮水溶液移置於石英槽內並避免沾及外壁，若沾及外壁時，需以拭鏡紙拭淨。
- 10.設定螢光光譜儀之操作條件：
激發波長設在 370nm 處，入射狹縫設在 5nm，發射狹縫設在 5nm，波長掃描範圍設定由 380nm 至 540nm，其掃描速率在 120nm/min 以內。
- 11.記錄螢光光譜並讀取在波長 445nm 處之儀器螢光強度值。若發射光譜最高強度之波長位置偏離 445nm 時，應調整激發波長，直至其相對應之發射波長落在 445nm 後再讀取儀器螢光強度值，並記錄調整後之激發波長。
- 12.一典型之水庫表面水腐植物質濃縮水溶液之螢光光譜如圖二所示。

八、結果處理

- (一) QE 值檢量線：依各奎寧硫酸鹽檢量線溶液在波長 445nm 處之儀器螢光強度與各對應濃度製作檢量線或計算平均反應因子，一典型之檢量線數據如表一所示。
- (二) 利用濃縮水溶液在波長 370nm 激發時(或依七、(三) 11. 之適用激發波長)，參照 QE 檢量線平均反應因子以計算該濃縮水溶液在波長 445nm 處儀器螢光強度值相對應之 QE 值。
- (三) 利用濃縮比例計算原水樣之 QE 值。
- (四) 若濃縮水之溶液之 QE 值小於 $5.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 時，則須以其它方法檢驗其螢光強度。
- (五) 以本方法圖二所示之水庫表面水樣濃縮水溶液為例，依 370nm 之激發波長而言，樣品之螢光發射光譜最強處之發射波長應落在 $445 \pm 6 \text{nm}$ 之範圍內。最高強度 1/2 處之波峰寬 (Full Width at Half Height, FWHH) 應在 $100 \pm 15 \text{nm}$ 之範圍內。其儀器螢光強度為 191.1，依表一之 QE 值檢量線及濃縮比例計算時，其相對應之 QE 值為 $4.19 \times 10^{-10} \text{M}$ 。

九、品質管制

實驗室可購得美國腐植質協會(InternationalSocietyofHumicSubstances,IHSS)所製備之 SuwanneeRiver 腐植物質，配製成約 4×10^{-8} M QE 值之儲備水溶液，在 1L 純水中添加 5m L 上述溶液，依七(三)步驟進行固相萃取，最後所得之濃縮水溶液之 QE 值與原配製水溶液之 QE 值相比較，其回收率計算公式如下：

$$\text{回收率 (\%)} = \frac{|QE_{\text{spk}} - QE_{\text{stk}}|}{QE_{\text{stk}}} \times 100$$

QE_{spk} 表示已添加參考腐植質之濃縮水溶液

QE_{stk} 表示品質管制儲備溶液

圖三 係國際腐植物質協會 (IHSS) 所製備及純化之黃酸 (FulvicAcid,1R 101F)，依本方法驗證之 C-18 固相萃取回收率約在 87 %。若上述 SumanneeRiver 參考腐植物質無法獲得時，可從同一水體基質環境之水樣進行多量多次萃取，合併各濃縮水溶液再配製成約 4×10^{-8} M QE 值之品質管制儲備溶液。

十、精密度與準確度

略

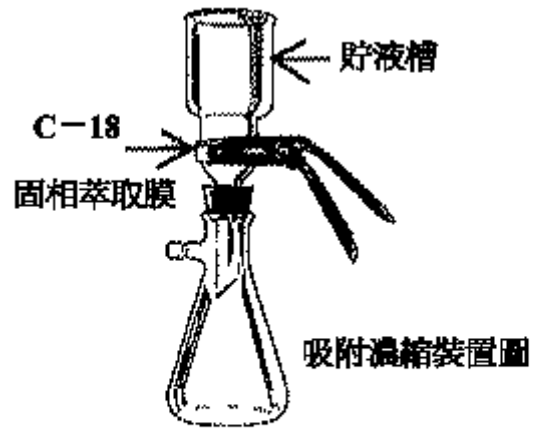
十一、參考資料

(一) 行政院環境保護署環境檢驗所·自然水體中腐植物質螢光強度之檢驗方法—I W940.50T

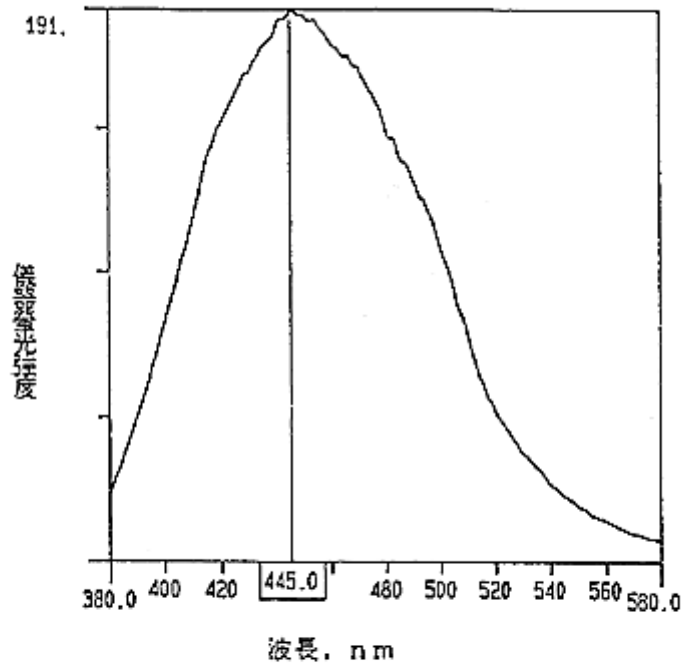
表一、一典型之奎寧硫酸鹽檢量線數據

濃度 (m)	儀器螢光強度
1.13×10^{-8}	26.2
2.26×10^{-8}	52.2
3.39×10^{-8}	77.8
4.52×10^{-8}	103.3
1.13×10^{-7}	257.3

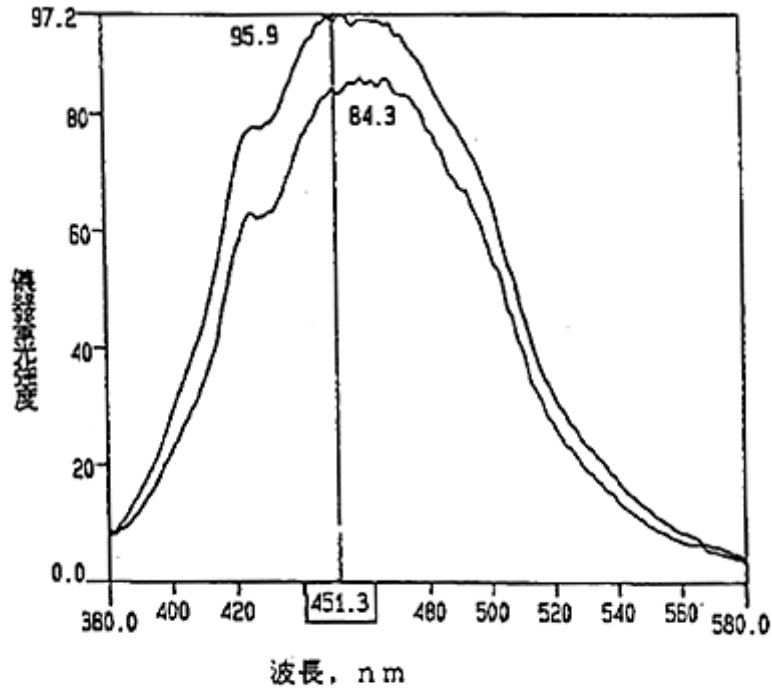
線性迴歸係數為 0.9999 (激發波長：347nm，狹縫寬度：5nm，發射波長：445nm，狹縫寬度：5nm)



圖一、一典型之固相萃取膜萃取裝置



圖二 一典型之水庫表面水腐植物質濃縮水溶液之螢光光譜
(激發波長：370nm，狹縫寬度 5nm；發射波長 445nm，
狹縫寬度 5nm)



圖三 一典型之C-18固相萃取腐植物質回收率驗證之螢光光譜
(激發波長：370nm，狹縫寬度 5nm；發射波長 450nm，
狹縫寬度 5nm，配製溶液螢光強度 95.9，回收溶液螢
光強度 84.3)

