

低成本共聚焦荧光检测器的研制及其对 水样中铵氮测定

张 政, 陈学佳, 曾梓涵, 张 敏

(桂林电子科技大学生命与环境科学学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 研究利用 3D 打印技术研制了一台低成本共聚焦荧光检测器, 并将其用于检测河水水样中的铵氮。检测器采用共聚焦结构, 使用波长为 430 nm 的发光二极管(LED)光源、球透镜和平凸透镜组成的准直透镜组以及滤光片等光学元件。研究通过 3D 打印技术制作各种模块, 用于固定各光学元件。合成了喹啉-2, 3-二甲醛(QDA)作为铵氮荧光检测试剂。QDA 试剂与 $\text{NH}_4^+ \cdot \text{SO}_3^{2-} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 反应, 其产物的最大激发波长为 429 nm, 最大发射波长为 518 nm。采用研制的检测器以及合成的 QDA 试剂建立铵氮荧光检测方法, 方法检测限为 $0.038 \mu\text{mol/L}$ (3σ), 平行测定浓度为 $3.0 \mu\text{mol/L}$ 的铵氮标准溶液, 其相对标准偏差(RSD)为 2.21%。应用于实际水样检测时, 加标回收率在 89.8% ~ 93.7% 之间。通过使用 3D 打印技术辅助检测器的研制, 降低了制作成本, 同时实现了对结构的快速优化。研制的检测器稳定性好、灵敏度高、结构简单, 可应用于环境、食品等领域的样品快速检测。

关键词: 3D 打印; 荧光检测器; 喹啉-2, 3-二甲醛; 共聚焦

中图分类号: O657.39; TH74

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2024)04-0215-06

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2024.04.002

Development of Low-Cost Confocal Fluorescence Detector and Its Application to Determination of Ammonium Nitrogen in Water Samples

ZHANG Zheng, CHEN Xuejia, ZENG Zihan, ZHANG Min

(School of Life and Environmental Sciences, Guilin University of Electronic Technology,
Guilin 541004, Guangxi China)

Abstract: A low-cost confocal fluorescence detector was developed using 3D printing technology and applied to the determination of ammonium nitrogen in river water samples. The detector used a confocal structure, and utilized light-emitting diode (LED) with a wavelength of 430 nm as light source, along with optical components such as a ball lens, plano-convex lens forming a collimating lens and filters. Various modules were produced by 3D printing technology for fixing various optical components. Quinoline-2, 3-dicarbaldehyde (QDA) was synthesized as the fluorescent reagent for ammonium nitrogen detection. QDA reacts with $\text{NH}_4^+ \cdot \text{SO}_3^{2-} \cdot \text{Ca}^{2+}$, and the product has a maximum excitation wavelength of 429 nm and maximum emission wavelength of 518 nm. The developed detector, along with the synthesized QDA reagent were used to establish a fluorescence detection method for ammonium nitrogen. The limit of detection of the method was $0.038 \mu\text{mol/L}$ (3σ), and the relative standard deviation (RSD) was 2.21% for detecting $3.0 \mu\text{mol/L}$ ammonium nitrogen standard solution. The spiked recoveries ranged from 89.8% to 93.7% when applied to the detection

收稿日期: 2024-04-22; 修订日期: 2024-06-13.

基金项目: 国家自然科学基金(Nos. 22174028, 21966012)[National Natural Science Foundation of China (Nos. 22174028, 21966012)]

作者简介: 张政(2000-), 男, 硕士, 主要从事环境监测微型仪器研制, E-mail: 2319950277@qq.com

通信作者: 张敏(1983-), 男, 教授, 《分析测试技术与仪器》青年编委, 主要从事环境分析化学、微型分析仪器研究, E-mail: zhangmin@guet.edu.cn.

of river water samples. Leveraging 3D printing technology facilitated the development of the detector, the manufacturing costs were reduced and the rapid optimization of the structure was enabled. The developed detector demonstrates excellent stability, high sensitivity, and a simple structure, making it suitable for rapid sample testing in environmental and food analysis applications.

Key words: 3D printing; fluorescence detector; quinaldine-2, 3-dicarboxaldehyde; confocal

铵氮是浮游植物的主要营养来源,对水中自养的浮游植物、水生生物和异养微生物的生长有着重要的影响。但是,当水中铵浓度过高时,可能引起大量水生生物死亡,破坏水生生态系统平衡。铵浓度过低时,可能限制水体初级生产力,从而影响生态系统的良性发展。因此,对水体中的铵氮浓度进行检测具有重要的意义^[1]。由于天然水体中铵氮的浓度较低,因此需要开发灵敏度高的检测方法。

目前铵氮检测方法中,荧光光度法是灵敏度最高的方法之一^[2]。邻苯二醛(OPA)是最常用的铵氮荧光检测试剂。水样中的铵在碱性条件下与 OPA 和亚硫酸钠反应生成荧光化合物,该化合物最大激发波长为 340 nm,最大发射波长为 455 nm^[3]。但该反应速率较慢,耗时较长,后续许多研究对此进行了改进。Liang 等^[4]使用了新型荧光试剂 4-甲氧基邻苯二醛(MOPA)。Zhang 等^[5]合成了 4, 5-二甲氧基邻苯二醛(M₂OPA)。在最近的研究中,Zhang 等^[6]合成了一种能够与氨基化合物反应的新试剂喹啉-2, 3-二甲醛(QDA),将其应用于生物体荧光成像,可在活细胞和斑马鱼成像中同时测定高半胱氨酸、谷胱甘肽和半胱氨酸等。Chen 等^[7]改进了 QDA 的合成方法,将 QDA 作为探针检测天然水体中铵氮浓度,其最大激发波长为 429 nm,最大发射波长为 518 nm。

激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)是一种高灵敏度的检测技术^[8-9]。激光光源具有输出功率高、光强稳定、光路易调整、光谱较为集中、杂散光少等优点^[10-11]。但激光的价格相对昂贵,并且使用寿命相对较短。近年来,较多的研究使用发光二极管(LED)来代替激光制作低成本、小体积的荧光检测器。LED 具有成本低、体积小、稳定时间短、使用寿命长、低功耗等优点^[2, 12-13]。

3D 打印技术已经被用于研制荧光检测器。通过 3D 打印技术,可以在实验室自行设计并制作结构复杂的检测器部件模块。更重要的是,3D 打印技术提供了一种“快速迭代”的仪器研制方法,降低

仪器研制成本的同时极大地缩短了研发时长。Zhang 等^[14]研制了一款 LIF 检测器,使用玩具 LEGO 模块与 3D 打印机制作的光学模型连接组装,该检测器成本低,并且能在短时间内完成制作。Prikryl 等^[15]利用 3D 打印技术研制了毛细管荧光检测器,使得荧光检测器的成本大幅度降低。张丕旺等^[16]利用多材料 3D 打印技术研制了 LIF 与非接触电导组合的检测器探头。

本研究尝试采用 3D 打印技术研制低成本共聚焦式 LED 诱导荧光检测器,并将其用于天然水体中铵氮的检测。该检测器针对新型荧光试剂 QDA 的激发和发射波长选择光源和滤光片,并使用 3D 打印技术优化各个模块,以实现水样中铵氮的灵敏检测。

1 试验部分

1.1 试剂与材料

除特殊说明外,所有试剂均购自上海阿拉丁试剂有限公司;用于熔融沉积(FMD)的聚乳酸(PLA, polylactic acid, 1.75 mm)打印材料购自深圳纵维立方;QDA 试剂由本实验室合成;水样采自桂林电子科技大学附近的花江河。

1.2 检测器的设计及制作

1.2.1 检测器配件

带前置放大器的 S8745-01 硅光电二极管购自滨松光子学株式会社。所用的光学滤光片、透镜均购自沈阳仪表院,具体包括:激发滤光片(EX470/30, D12 mm×6 mm)、激发滤光片(EX430/30, D12 mm×6 mm)、发射滤光片(EM525/20, D12 mm×6 mm)、二向色镜(DM490, 14 mm×18 mm)、球透镜(D = 8 mm)、平凸透镜(D = 10 mm、F = 12.5 mm)和凸透镜(D = 8 mm、F = 8 mm)等。荧光检测池为 1.5 mL PCR 管(南通市海锐实验器材有限公司)或 1.5 mL 聚苯乙烯比色皿(美国 Fisher Scientific 公司)。430 nm LED(5W)和 470 nm LED(5W)均购自忧晶光电原厂。

1.2.2 荧光检测器的设计与制作

研制的检测器结构如图 1 所示。检测器选用波

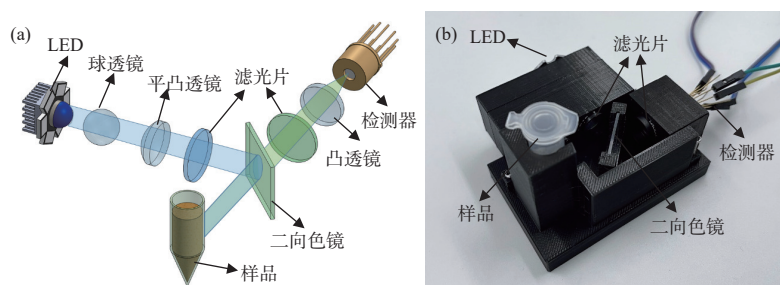


图1 3D打印技术制作的荧光检测器

(a) 检测器光路示意图, (b) 检测器主要部件照片

Fig. 1 Fluorescence detector fabricated using 3D printing technology

(a) diagram of detector optical path, (b) photograph of main parts of detector

长为 470 nm LED 或 430 nm LED 作为激发光源,光源的发光经过球透镜和平凸透镜准直为平行光束,然后透过激发滤光片(EX470/30, D12 mm×6 mm),再经二向色镜的反射,进入样品池.样品池内盛有待测试样,受激发后产生荧光.荧光穿过二向色镜,经过发射滤光片(EM525/20, D12 mm×6 mm),使用凸透镜聚焦,最终进入 S8745-01 微弱光检测器.光信号转化为电信号后,由 14 位数据采集卡(USB-6001, 美国 NI 公司)进行数模转换.数据采集程序由 LabVIEW(美国 NI 公司)编写,采集模式选择 N 采样,采样频率为 5 000 Hz,其中每 1 000 个数据点取平均值后输出,实际采样频率为 5 Hz.

1.3 QDA 试剂的合成

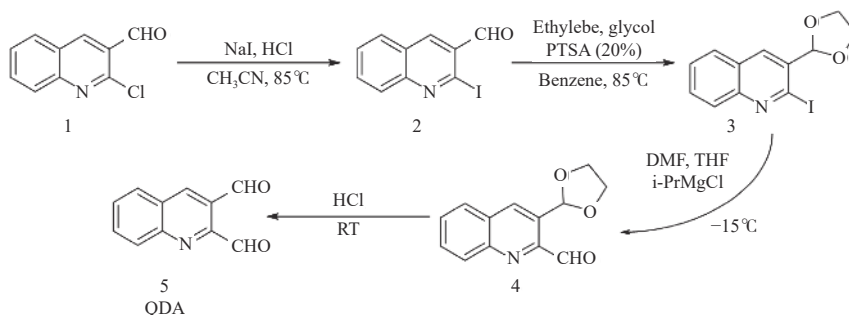
QDA 试剂合成反应路径如图 2 所示.首先以 2-氯喹啉-3-甲醛(1)为原料,溶于乙腈中,在碘化钠和盐酸存在下,85 °C 油浴中反应至少 7 h,萃取浓缩得到白色固体化合物 2-碘喹啉-3-甲醛(2).将化合物(2)、乙二醇和对甲苯磺酸(PTSA)加入苯溶液中,

80 °C 油浴 7 h,萃取提纯后得到白色固体化合物 3-[1, 3] 二氧六环-2-基-2-碘喹啉(3).将化合物(3)在 -15 °C 溶于四氢呋喃(THF)中,之后缓慢注入异丙基氯化镁溶液(*i*-PrMgCl)反应 1 h,加入干燥的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),在 -10 °C 下搅拌 40 min,然后加入盐酸,在 -10 °C 下搅拌 30 min,提纯得到淡黄色固体 3-[1, 3] 二氧六环-2-基喹啉-2-甲醛(4).将化合物(4)溶于盐酸与乙醚混合液中于室温(RT)下搅拌 1 h,提取得到黄色固体 QDA(5).具体合成细节可查看 Chen 等^[7]论文.

1.4 试验方法

在优化调整检测器结构的过程中,检测器配有 470 nm LED、激发滤光片(EX470/30, D12 mm×6 mm)、发射滤光片(EM525/20, D12 mm×6 mm),通过测量体积 1 mL,浓度 0~200 nmol/L 荧光素钠的信号值,获取线性拟合方程的斜率和截距对比检测器优化结果.

水样中铵氮的测定采用 QDA 荧光法^[7].具体步

图2 QDA 试剂的合成路径^[7]Fig. 2 Synthesis route of QDA^[7] (PTSA: *p*-toluenesulfonic acid; DMF: *N,N*-dimethylformamide;

THF: tetrahydrofuran; RT: room temperature)

(1) 2-chloroquinoline-3-carbaldehyde; (2) 2-iodoquinoline-3-carbaldehyde; (3) 3-[1, 3]dioxolan-2-yl-2-iodoquinoline;

(4) 3-[1, 3]dioxolan-2-yl-quinoline-2-carbaldehyde; (5) QDA: quinoline-2, 3-dicarbaldehyde

骤:取 75 μL Na_2SO_3 溶液(1.26 g/L)、600 μL 硼砂溶液(15 g/L)、300 μL QDA 溶液(0.5 g/L)、600 μL CaCl_2 (2.94 g/L)溶液,与水样在 PCR 管内充分混匀后,在 50 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中反应 50 min,取出冷却至室温,使用研制的共聚焦荧光检测器测定。

试验采用基底加标法考察方法回收率。分别在水样中加入浓度为 0、1.5、3.0、4.5、6.0 $\mu\text{mol/L}$ 的铵氮标准溶液,计算基底加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 QDA 激发发射光谱

水样中铵氮与 QDA、亚硫酸钠在碱性条件下反应生成荧光物质,如在反应中加入钙离子,可增强反应产物的荧光强度^[7]。图 3 显示了 NH_4^+ -QDA- SO_3^{2-} - Ca^{2+} 反应产物的激发光谱和发射光谱、430 nm LED 的发射光谱及激发滤光片(EX430/30, D12 mm $\times$ 6 mm)和发射滤光片(EM525/20, D12 mm $\times$ 6 mm)的透射光谱。由图可知,水样中荧光反应产物的最大激发波长 λ_{ex} 为 429 nm,最大发射波长 λ_{em} 为 518 nm。激发光源波长集中在 430 nm,激发滤光片和发射滤光片能有效降低来自激发光源的干扰,从而在提升信噪比的同时获得更宽的线性响应范围。

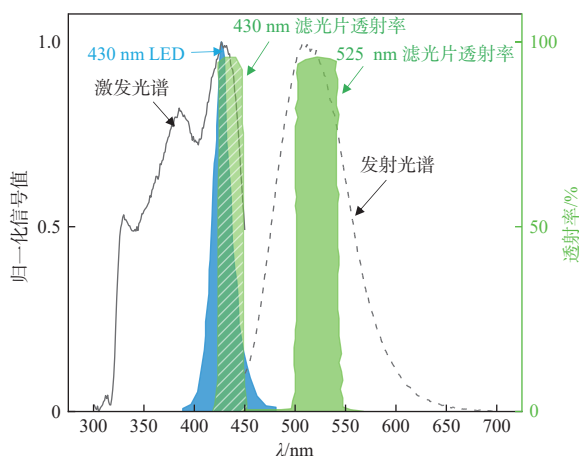


图3 QDA 反应产物激发(黑色实线)和发射(黑色虚线)光谱,430 nm LED 发射光谱,激发滤光片和发射滤光片透射率

Fig. 3 Excitation (black solid line) and emission (black dash line) spectra of QDA reaction product, emission spectrum of 430 nm LED and transmittance of band-pass (BP) filters

2.2 荧光检测池的选择

试验采用 10 mm 光程的比色皿和 1.5 mL PCR

管作为荧光检测池,分别测定浓度范围 0~200 nmol/L 的荧光素钠,获得拟合曲线。以 1.5 mL 比色皿作为样品池,获得的拟合曲线为 $F=0.000\ 639\times C+0.021\ 1$ ($r^2=0.99$, $n=6$)。而使用 1.5 mL PCR 管作为样品池,获得的拟合曲线为 $F=0.001\ 22\times C+0.033\ 0$ ($r^2=0.99$, $n=6$)。使用 PCR 管作为样品池有更高的灵敏度。可能原因是试验采用的是微量比色皿,其受光面尺寸为 4 mm $\times$ 8 mm,而激发光的圆形光斑直径为 8 mm,大于微量比色皿的受光面尺寸,导致光的利用率降低。PCR 管受光面尺寸大于光斑,因此可提供更高的检测灵敏度。后续研究采用 PCR 管作为检测池。

2.3 透镜准直对信号的影响

试验采用 TracePro 光学模拟软件,对光路进行模拟,发现采用球透镜与平凸透镜的组合能够很好的对 LED 发射光进行准直。对软件模拟结果进行试验验证,采用球透镜和平凸透镜的组合作为准直器,置于 LED 光路之上,测定浓度范围 0~200 nmol/L 的荧光素钠,获得的拟合曲线为 $F=0.006\ 99\times C+0.118$ ($r^2=0.99$, $n=6$)。未使用透镜的情况下,获得的拟合曲线为 $F=0.002\ 45\times C+0.055\ 7$ ($r^2=0.99$, $n=6$)。对比两条拟合曲线斜率可知,使用透镜的检测器灵敏度提高了近 3 倍。

2.4 方法检出限及精密度

试验采用优化后的检测器模块,测试了检测器的信号漂移。检测器测定 1 mL 纯水样品时,在 40 min 内信号值变化小于 0.3 mV,表明检测器稳定性较好。使用 470 nm LED 测定荧光素钠溶液,得到荧光素钠的检测限为 0.15 nmol/L (3σ)。测定浓度为 2 nmol/L 的荧光素钠 3 次,得到相对标准偏差(RSD)为 3.88%。测定浓度为 50 nmol/L 荧光素钠 3 次,得到 RSD 为 0.094%。使用 430 nm LED 光源对铵氮进行测定,通过计算得到铵氮的检测限为 0.038 $\mu\text{mol/L}$ (3σ),平行测定浓度为 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的铵氮标准溶液 3 次,得到 RSD 为 2.21%。说明检测器配合使用 QDA 方法,能够对水样中较低浓度的铵氮进行定量检测。

2.5 水样测定

试验采用 430 nm LED、激发滤光片以及优化后的检测器模块,以 QDA 为荧光探针,对采集的河水水样进行基底加标试验。在河水水样和超纯水水

样中分别加入浓度为 0、1.5、3.0、4.5 和 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 的铵氮标准溶液, 对测定信号值进行线性拟合, 结果如表 1 所列. 通过对比超纯水水样和河水水样基底加标曲线的斜率, 计算得到铵氮回收率在 89.8%~93.7% 范围内, 检测可得水样中铵氮浓度

为 (0.160 ± 0.020) $\mu\text{mol/L}$. 进一步采用岛津 RF-5301PC 商用荧光光谱仪重复以上测试, 得到的样品中铵氮浓度为 (0.131 ± 0.005) $\mu\text{mol/L}$. 结果表明, 本文所研制的荧光检测器得到结果与商用仪器结果相符.

表 1 共聚焦荧光检测器测定铵氮回收率 ($n=3$)
Table 1 Recoveries of ammonium nitrogen using confocal fluorescence detector ($n=3$)

铵氮加标浓度/($\mu\text{mol/L}$)	共聚焦荧光检测器/($\mu\text{mol/L}$)	台式荧光光谱仪/($\mu\text{mol/L}$)	相对标准偏差/%	回收率/%
0	0.160 ± 0.020	0.131 ± 0.005	1.51	91.8
1.5	1.973 ± 0.037	1.730 ± 0.007	3.00	89.8
3.0	3.620 ± 0.029	3.548 ± 0.002	2.33	93.7
4.5	5.168 ± 0.059	5.139 ± 0.012	4.82	91.9
6.0	6.579 ± 0.036	6.419 ± 0.014	2.91	90.7

3 结论

本研究采用共聚焦光路结构, 通过 3D 打印技术研制了一种低成本荧光检测器, 并以 QDA 为荧光探针用于水样中铵氮的测定. 试验表明, 该检测器基线稳定, 线性响应范围宽, 灵敏度高. 测定河水水样中铵氮检测限为 $0.038 \mu\text{mol/L}$, 回收率在 89.8%~93.7% 之间. 所研制的低成本共聚焦荧光检测器具有体积小、成本低等优点, 可应用于环境、食品等领域样品的快速检测.

参考文献:

[1] Lin K N, Zhu Y, Zhang Y B, et al. Determination of ammonia nitrogen in natural waters: recent advances and applications[J]. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2019, 24: e00073.

[2] Mukunda D C, Rodrigues J, Joshi V K, et al. A comprehensive review on LED-induced fluorescence in diagnostic pathology[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 209: 114230.

[3] Roth M. Fluorescence reaction for amino acids[J]. *Analytical Chemistry*, 1971, 43(7): 880-882.

[4] Liang Y, Pan Y M, Guo Q, et al. A novel analytical method for trace ammonium in freshwater and seawater using 4-methoxyphthalaldehyde as fluorescent reagent[J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 2015: 387207.

[5] Zhang M, Zhang T, Liang Y, et al. Toward sensitive determination of ammonium in field: a novel fluores-

cent probe, 4, 5-dimethoxyphthalaldehyde along with a hand-held portable laser diode fluorometer[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 276: 356-361.

[6] Zhang Y B, Zhang Y, Yue Y K, et al. A special *o*-dialdehyde fluorescent probe simultaneously sensing Hcy, GSH and its application in living cells and zebrafish imaging[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(9): 2873-2876.

[7] Chen X J, Xiong T K, Xu J, et al. Determination of ammonium in natural water using a quinoline-based *o*-dialdehyde fluorescent reagent with visible excitation wavelength[J]. *Analytical Methods*, 2021, 13(43): 5231-5239.

[8] 谭亮, 马家麟, 冀恬, 等. 便携式食品直链和支链淀粉速测仪的研制 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2019, 25(4): 242-251. [TAN Liang, MA Jialin, JI Tian, et al. Development of portable speed measuring apparatus for amylose and amylopectin in food[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2019, 25(4): 242-251.]

[9] 廖奕鸥, 冯辉, 张重远. 激光共聚焦显微镜测量表面粗糙度的探究 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2023, 29(2): 203-208. [LIAO Yiou, FENG Hui, ZHANG Zhongyuan. Research on measuring surface roughness with laser confocal microscope[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2023, 29(2): 203-208.]

[10] Geng X H, Shi M, Ning H J, et al. A compact and low-cost laser induced fluorescence detector with silicon based photodetector assembly for capillary flow sys-

- tems[J]. *Talanta*, 2018, 182: 279-284.
- [11] Xi Q Y, Shi M, Geng X H, et al. Spherical dichroic reflector improves limit of detection in laser-induced fluorescence detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(13): 8680-8684.
- [12] Geng X H, Wu D P, Guan Y F. A compact and highly sensitive light-emitting diode-induced fluorescence detector for capillary flow systems[J]. *Talanta*, 2012, 88: 463-467.
- [13] Geng X H, Wu D P, Wu Q, et al. Signal-to-noise ratio enhancement of the compact light-emitting diode-induced fluorescence detector[J]. *Talanta*, 2012, 100: 27-31.
- [14] Zhang M T, Peng Y M, Pan J Z, et al. LIFGO: a modular laser-induced fluorescence detection system based on plug-in blocks[J]. *Talanta*, 2022, 239: 123063.
- [15] Prikryl J, Foret F. Fluorescence detector for capillary separations fabricated by 3D printing[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(24): 11951-11956.
- [16] 张丕旺, 杨立业, 刘强, 等. 多材料 3D 打印技术制作用于毛细管电泳的非接触电导/激光诱导荧光二合一检测池 [J]. *色谱*, 2021, 39(8): 921-926. [ZHANG Piwang, YANG Liye, LIU Qiang, et al. Multimaterial 3D-printed contactless conductivity/laser-induced fluorescence dual-detection cell for capillary electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(8): 921-926.]
-

声明

本刊许可中国学术期刊（光盘版）等数字化传播的声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)、超星全文“域出版”期刊、长江文库、《中文科技期刊数据库》、《中国终身教育学术研究数据库》、《中国科研仪器案例成果数据库》和《万方数据-数字化期刊群》在其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。该社著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我社上述声明。

《分析测试技术与仪器》编辑部