

荧光猝灭法测定菲、蒽、芘与腐殖酸的结合常数*

邢冠华 薛蓓胡 张梦妮 陶澍**

(北京大学环境学院, 地表过程分析与模拟教育部重点实验室, 北京, 100871)

摘 要 用荧光猝灭法测定了胡敏酸 (Fluka) 与蒽、菲和芘相互作用的结合常数 (K_{DOC}), 其 $\lg K_{\text{DOC}}$ 值分别为 4.4、4.48 和 4.89. 用同样方法测得长江水生 FA 以及黑龙江水生 FA 和 HA 的 K_{DOC} 之间有显著差别. HA 的 K_{DOC} 一般高于 FA. 黑龙江水生 FA 的 K_{DOC} 高于长江. 对同一起来源的腐殖酸, 三种多环芳烃的 K_{DOC} 与 K_{ow} 呈线性相关.

关键词 荧光猝灭, 菲, 蒽, 芘, 腐殖酸, 结合常数.

溶解态天然有机物 (DOM) 与微量有机污染物的相互作用可以用结合常数 (K_{DOC}) 表征, K_{DOC} 是反映有机污染物在溶解性有机质和水中自由态之间分配关系的常数, 对污染物的迁移活性和生物有效性有重要意义^[1-2]. 荧光猝灭^[3]是常用的 K_{DOC} 测定方法之一. 多环芳烃的共轭 π 键体系决定了它们的荧光特性, 不超过四环的多环芳烃其溶解度和荧光强度都比较高^[4], 是荧光猝灭方法的理想对象. 本研究尝试建立测定腐殖酸与蒽、菲、芘相互作用的 K_{DOC} 荧光猝灭法, 并用于不同来源的 FA 和 HA 样品的实际测定.

1 K_{DOC} 测定方法

蒽 (CP, 北京化工厂), 菲和芘 (98%, Acros), 胡敏酸 (Fluka No. 38537/1194 碳含量 49.01%, 灰份 20%). 配制 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 菲、蒽和芘的甲醇储备液, 置于 5 mL 棕色试剂瓶中密封冷藏. 测试溶液用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (1:1) 缓冲溶液 ($\text{pH}\sim 6.9$) 稀释至所需浓度, 置于 4℃ 冰箱中冷藏. 稀释后甲醇带入体积不超过 0.1%, 以保证荧光测定不受影响. 实验前在黑暗处通氮 (普氮) 10 min 驱氧.

胡敏酸用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$ 溶液溶解, 离心、0.2 μm 滤膜过滤后于 4℃ 冰箱中冷藏, 测定总有机碳 (TOC) 含量 (Shimadzu 5000A). 实验前通氮 10 min.

水生腐殖酸分别取自长江 (浦口) 和黑龙江 (漠河). 试样用 XAD2 树脂吸附 ($\text{pH}=2$), NaOH (10%) 洗脱. 洗脱液酸化 (HCl), 离心分离为 FA 和 HA. 浓度用 TOC 表征.

在 8 个棕色容量瓶中, 分别准确移取 5 mL (菲: $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 蒽: $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 芘: $0.08\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 多环芳烃溶液, 依次增加腐殖酸溶液加入量 (最高浓度约 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). 每次加入一定量的腐殖酸后, 振摇 3 min, 静置 1 min, 使多环芳烃与腐殖酸作用达到平衡., 然后转移到 $1\times 1\times 4\text{ cm}$ 石英比色皿中, 用 Hitachi F-2500 荧光光谱仪连续 3 次读取荧光强度, 取三次读数均值为测定结果.

定容后多环芳烃与腐殖酸结合非常快, 6 min 内荧光读数稳定, 光解损失不足 1%, 可忽略. 另设置 8 个仅加同样量缓冲溶液和腐殖酸的对照, 用作腐殖酸溶液的自荧光测定. 从每个样品瓶中取部分溶液在紫外光栅分光光度计 (752 型) 上测定激发波长和发射波长处的吸光度. 实测结果扣除自荧光后进行内过滤校正.

2 荧光光谱参数的优化

在菲: 0— $800\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蒽: 0— $250\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 芘: 0— $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验浓度范围内, 考察了荧光

2005 年 2 月 4 日收稿.
* 国家重点基础研究发展计划 (2003CB415004), 国家自然科学基金 (40332015, 40021101) 资助项目.
* * 通讯联系人: E-mail: tao@urban.pku.edu.cn 62751938

强度对三种多环芳烃的响应。结果发现，磷酸缓冲体系中荧光强度与三种多环芳烃浓度有非常精确的定量关系：

菲： $F = 10.6C + 75.6 \quad r^2 = 0.9993$
芘： $F = 28.6C - 215.6 \quad r^2 = 0.9935$
芑： $F = 47.2C - 64.5 \quad r^2 = 0.9979$

分别测定多环芳烃的激发光谱，并根据吸收峰的位置（满足使多环芳烃和腐殖酸在发射波长处的吸光度尽可能小的要求）获得特定化合物的发射光谱。图 1 给出了菲的激发光谱和发射光谱。根据实测谱图确定芘、菲和芑的激发波长和发射波长分别为：285nm /322nm，294nm /365nm 和 320nm /373nm。

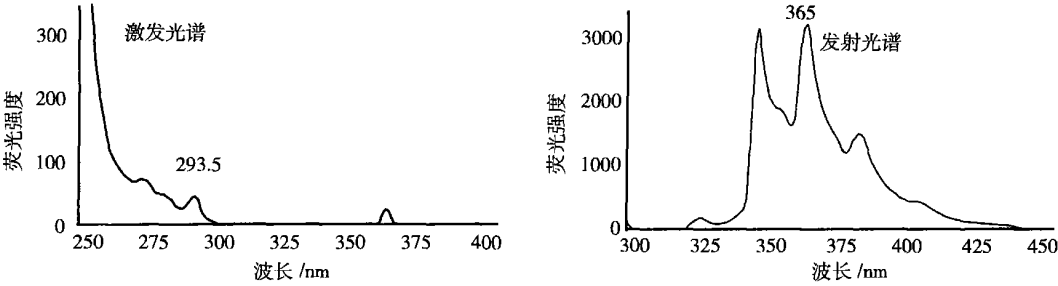


图 1 菲的激发光谱和发射光谱
Fig 1 Fluorescence exciting (left) and emission spectra (right) for phenanthrene

确定了激发波长和发射波长后，比较两种光电倍增管电压（400V，700V）和四种入射和出射狭缝组合（2.5/2.5mm，2.5/5.0mm，5.0/5.0mm和2.5/10.0mm）对测定结果的影响。三种多环芳烃的测定结果相似，以菲（0.8mg·L⁻¹）为例。400V时，2.5/2.5mm的荧光强度为127.6，2.5/5.0mm的荧光强度为513.5，5.0/5.0mm的荧光强度为234.7，2.5/10.0mm的荧光强度为1314。700V时，2.5/2.5mm的荧光强度为9404，2.5/5.0mm的荧光强度为>10000，5.0/5.0mm的荧光强度为>10000，2.5/10.0mm的荧光强度为>10000。

增大狭缝宽度有利于提高信号强度，但同时也增大了杂散光的强度，使散射和衍射效应增强，从而降低仪器灵敏度。光电倍增管电压高可使信号强度增大，但仪器的光强上限为10000。据此确定的仪器操作参数为：入射和出射狭缝宽度均为2.5mm，光电倍增管电压700V。

3 腐殖酸 K_{DOC}的测定

分子氧可以造成多环芳烃荧光猝灭，因此，实验前所有溶液均通氮驱氧。多环芳烃以及腐殖酸在入射光和出射光波长处均有吸收，必须在扣除自荧光的基础上进行内过滤效应校正。本研究采用相关文献给出的内过滤效应校正方法^[3]。校正公式为：

$$f = F_{cor} / F_{obsd} = (2.3dA_{ex} / (1 - 10^{-sA_{ex}})) \cdot 10^{-gA_m} (2.3dA_m / (1 - 10^{-sA_m}))$$

式中，d为比色池宽度，d = 1cm；s为光束宽度，s = 0.10cm；g为光束距比色池底的距离，g = 0.25cm。当f > 3时，方法不能用。

根据多环芳烃和胡敏酸相互作用的分配平衡关系得到的静态猝灭 Stern-Volmer方程为^[3,4]：

$$F_0 / F = 1 + K_b [HA]$$

式中，F为溶液荧光强度，F₀为溶液的初始荧光强度（F、F₀均为即经过内过滤效应校正后得到的F_{cor}），[HA]为胡敏酸浓度，K_b为分配常数。当溶液中的溶解态有机质用有机碳单位表示时，有：

$$K_b = K_{DOC} = [PAH]_{DOC} / [PAH]_w$$

式中，[PAH]_{DOC}和 [PAH]_w分别为多环芳烃的 DOC 结合浓度及水相游离浓度。以经过内过滤效应校正后得到的 F₀/F对胡敏酸浓度作图，用最小二乘法拟合上述方程，其斜率即为 K_{DOC}。实际测定中得到的 HA 与芘、菲、芑的荧光猝灭关系如下：

菲: $y = 0.0378x + 1.0217, R^2 = 0.9823$
芘: $y = 0.075x + 1.001, R^2 = 0.991$
茈: $y = 0.0257x + 1.017, R^2 = 0.9646$

多次重复测定得到的实测 $\lg K_{\text{DOC}}$ 均值分别为茈 4.40 菲 4.48 芘 4.89 标准差分别为茈 0.07 菲 0.06 芘 0.04 Burkhard报道的这些化合物与胡敏酸作用的 $\lg K_{\text{DOC}}$ 值分别为茈 3 菲 3.99—4.63 芘 4.91—5.52^[5].

对菲和芘而言, 文献中不同方法测得的 K_{DOC} 有半个数量级的波动, 可见方法的选择对结果的影响很大. 本研究测得菲和芘的 K_{DOC} 值与文献中的报道结果基本吻合. 文献中关于茈的 K_{DOC} 资料很少. 仅个别研究者用反相色谱法测定了该值^[5]. 本研究采用荧光猝灭得到的数据较该文献高一个数量级. 这样的差别很可能与方法不同有关, 也不能排除不同腐殖酸来源的差异. 同时本实验方法的测定精度受到络合条件和仪器本身的影响, 本研究通过缓冲体系控制 pH 值和离子强度等的影响, 而光解损失、内过滤效应等则很难控制.

4 天然水生 FA 和 HA 的 K_{DOC} 测定

用上述方法测定黑龙江 (漠河) 和长江 (浦口) 两处水生 HA 和 FA 与三种多环芳烃作用的 K_{DOC} 值. 结果列于表 1 中.

表 1 黑龙江和长江水样中提取的腐殖酸与茈、菲、芘的 $\lg K_{\text{DOC}}$

Table 1 $\lg K_{\text{DOC}}$ of acenaphthylene, phenanthrene and pyrene with HA and FA from Heilong river and Yangtze river					
PAHs	HA (黑龙江水)	FA (黑龙江水)	FA (长江水)	HA ^[5]	FA ^[5]
茈	4.41	3.89	3.73	2.55	
菲	4.63	3.85	3.78	4.70	5.20
芘	4.74	4.35	3.93	3.64—6.02	3.64—5.08

从表 1 可以看出, 两个 FA 样品的实测 K_{DOC} 显著小于取自黑龙江的 HA. 这与文献中报道的数据一致^[3-4]. 虽然胡敏酸与富里酸的结构相似, 但后者的分子量比前者小一个数量级左右, 且分子中羧基、酚羟基的含量更高^[6]. 这些性质的差别导致 K_{DOC} 不同. 黑龙江和长江水样中 FA 的 K_{DOC} 有一定差别, 二者提取的 FA 浓度分别为 $769.7\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $386.9\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但我们认为荧光猝灭应该与浓度无关, 而二者 FA 结构和成分的差别可能导致 K_{DOC} 不同.

此外, 三种多环芳烃的氢原子个数相同, 碳原子数依次递增, 环数增多, 不饱和度随之递增, 因此, 测得的 K_{DOC} 值也随之增加. 由于相同的原因, 实测 K_{DOC} 与 K_{OW} 有显著的正相关关系: 黑龙江 HA 的 $r = 0.962$ ($p < 0.05$), 黑龙江 FA 的 $r = 0.983$ ($p < 0.05$), 长江 FA 的 $r = 0.991$ ($p < 0.05$).

综上所述, 荧光猝灭方法可以快速有效地测定多环芳烃和溶解态有机质的结合常数. 在 pH 6.9 的磷酸缓冲溶液体系中, 茈、菲、芘与胡敏酸的结合常数分别为 4.40、4.48 和 4.89. 同样条件下测得黑龙江 FA 和 HA 以及长江 FA 的 K_{DOC} 值为: 茈 3.73—4.41, 菲 3.78—4.63, 芘 3.93—4.74. 一般而言, FA 的 K_{DOC} 小于 HA, 三种多环芳烃的 K_{DOC} 依次为: 茈 < 菲 < 芘.

参 考 文 献

[1] Akkanen J, Penttinen S, Haitzer M et al., Bioavailability of Atrazine, Pyrene and Benzo[a] pyrene in European River Waters [J]. *Chemosphere*, 2001, **45**: 453—462
[2] Meems N, Steinberg C E W, Wiegand C, Direct and Interacting Toxicological Effects on the Waterflea (Daphnia magna) by Natural Organic Matter, Synthetic Humic Substances and Cypermethrin [J]. *Sci. Total Environ.*, 2004, **319**: 123—136
[3] Gauthier T D, Shane E C, Guerin W F et al., Fluorescence Quenching Method for Determining Equilibrium Constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Binding to Dissolved Humic Materials [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**: 1162—1166
[4] Raber B, Kogel-Knabner I, Stein C et al., Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Dissolved Organic Matter from Different Soils [J]. *Chemosphere*, 1998, **36** (1) : 79—97
[5] Burkhard L P, Estimating Dissolved Organic Carbon Partition Coefficients for Nonionic Organic Chemicals [J]. *Environ. Sci. Technol.*,

2000 34: 4663—4668

[6] M 斯尼茨尔, S U 汉著, 吴奇虎等译, 环境中的腐殖物质 [M] 北京: 化学工业出版社, 1979 2—3

DETERM INATION OF K_{DOC} OF PHENANTHRENE,
ACENAPHTHYLENE AND PYRENE BINDING TO HUMIC
SUBSTANCES USING FLUORESCENCE QUENCHING METHOD

XING Guan-hua XUE Bei HU Jing ZHANG Meng-ni TAO Shu

(Laboratory for Earth Surface Processes, College of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT

K_{DOC} of phenanthrene acenaphthylene and pyrene binding to dissolved humic substances were determined using fluorescence quenching method. The measured $\lg K_{\text{DOC}}$ of humic acid are 4.40, 4.48 and 4.89 respectively. The procedure was used to measure the K_{DOC} of aquatic FA from Heilong river and Yangtze river and HA from Heilong river. Difference in binding capacity of these samples were identified. K_{DOC} of HA was generally higher than those of FA and K_{DOC} of samples from Heilong river was higher than that from Yangtze river. Linear correlation between K_{DOC} and K_{OW} was found for humic substances from same origin.

Keywords fluorescence quenching method, phenanthrene, acenaphthylene, pyrene, humic substances, K_{DOC} .