

土壤腐殖酸的光谱学特征及其影响因素^{*}

李文慧 李爱民 张树才 王学军^{**}

(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 利用紫外-可见和荧光光谱研究土壤中腐殖酸的光谱特性. 结果显示, 富里酸在 0—45 mg·L⁻¹ 浓度范围内, 其浓度与荧光强度呈线性正相关, 浓度大于 45 mg·L⁻¹ 时, 二者的线性关系趋弱, 非线性关系明显. pH 值对荧光强度有显著的影响, 酸性条件下荧光强度随 pH 值的增大而增强, pH 值在 4.5—10 之间的变化不显著, 在中性和碱性条件下有较高的荧光强度, 当 pH 值超过 10 以后有所减弱. 荧光光谱在酸性条件下呈现一定程度的蓝移, 碱性条件下则呈现红移.

关键词 土壤, 富里酸, 胡敏酸, 荧光强度.

腐殖酸在 280nm 处的紫外吸光值 ($\epsilon_{280} = E_{280}/\text{TOC}$) 可以用来表征腐殖酸的芳香度. 此外, 腐殖酸分子中存在着大量的芳香羧酸及酚等荧光物质, 这使荧光分析技术在此领域的应用成为可能.

本研究旨在探讨腐殖酸浓度及 pH 值对 E_4/E_6 和 ϵ_{280} 等特征参数及荧光发射光谱特征的影响, 为腐殖酸的定性和定量研究提供参考.

1 实验方法

于 2006 年 10 月在北京大学未名湖北岸的树林中采集约 50kg 的表土 (约 10cm 深) 样品, 土壤为华北地区典型的棕壤. 将采集的样品剔除树枝等杂物后于室温 (20℃) 风干.

富里酸 (FA) 和胡敏酸 (HA) 的浓度以溶液中总有机碳 (TOC) 的浓度来表征. 利用有机碳测定仪测定储备液中的 TOC, 通过对储备液进行浓度梯度稀释获得不同浓度范围的 FA 与 HA.

利用 pH 计 (Delta320) 确定 FA 及 HA 溶液的 pH 值, 加尽可能少量的 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 至 2—13 左右, 定容至 25mL, 稳定 24h 后再次测定, 记作终点 pH, 以获得不同 pH 值的 FA 与 HA.

利用紫外-可见分光光度计 (752 型) 对 FA 和 HA 样品进行测定, 波长扫描范围为 200—800nm. 分别测定 FA 和 HA 在 253nm, 280nm, 465nm, 600nm 和 665nm 处的光密度值.

利用荧光分光光度计对样品进行荧光发射光谱和激发光谱的测定. 其中荧光发射光谱的测试条件为: 波长 340nm, 扫描范围 350—600nm, 扫描速度 1500nm·min⁻¹, 带通 5.0nm, PMT 电压 700V, 自动响应时间; 荧光激发光谱的测试条件为: 波长 560nm, 扫描范围 220—500nm, 扫描速度 1500nm·min⁻¹, 带通 10nm, PMT 电压 700V, 自动响应时间.

2 FA 和 HA 光谱的特征参数

将荧光发射光谱在 350—600nm 的扫描范围平均分为 4 部分, 利用 538—600nm 之间的峰面积 (A_4) 与 350—412nm 之间的峰面积 (A_1) 的比值 (A_4/A_1) 作为衡量荧光发射光谱谱改变的参数 (图 1). 从图 1 可以看出, 随着发射波长的增加, 荧光强度呈现先增强后减弱的规律, 在 440nm 波长附近吸收最强. 本文选用发生光谱峰对应的荧光强度作为描述腐殖酸荧光吸收特性的参数.

3 荧光特性的浓度效应

图 2 是富里酸浓度与荧光强度的关系. 图 2 表明, 随着 FA 浓度的增大其荧光强度明显增强. 在低浓度范围 (0—45mg·L⁻¹) 内, FA 浓度与荧光强度呈正相关 ($p < 0.0001$). 随着 FA 浓度的进一步

2007 年 9 月 20 日收稿.
^{*} 国家自然科学基金项目 (40525003); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2003CB415004).
^{**} 通讯联系人, E-mail: xjwang@urban.pku.edu.cn

增大，线性关系变弱，尤其当 FA 浓度 $> 45\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 时，二者体现出非线性。这可能是由于高浓度时产生的大量激发态荧光分子与基态荧光分子碰撞，从而导致荧光猝灭等现象造成的。因此，在实际测量中应控制腐殖酸溶液的浓度在一定范围内才能排除荧光猝灭现象的影响，且在浓度低于 $45\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 时，腐殖酸的荧光强度可表征其浓度大小。本次实验中涉及到所有腐殖酸样品的浓度大多低于 $45\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ，因此，荧光强度可准确反映腐殖酸的浓度信息。

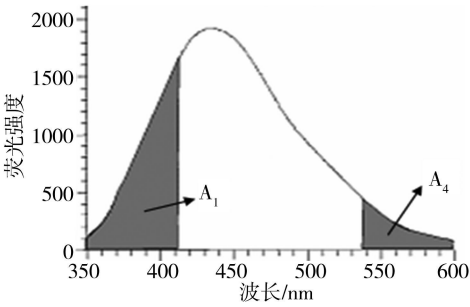


图 1 腐殖酸的荧光发射光谱
Fig 1 Typical fluorescence emission spectra of humics

4 紫外可见光特性的浓度效应

图 3 反映了富里酸和胡敏酸的 E_4/E_6 值随溶液浓度的变化情况，其中富里酸的 E_4/E_6 随浓度的增加而增大，而胡敏酸的 E_4/E_6 值随浓度的升高先增大后减小。FA 与 HA 的 E_4/E_6 值随其浓度呈现不同规律的变化，尽管 FA 的浓度范围相对狭窄，但从图 3 可以看出，在浓度低于 $30\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 范围内，相同浓度下 FA 的 E_4/E_6 值显著高于 HA 的对应值，这表明本实验中富里酸的分子量要小于胡敏酸，胡敏酸的腐殖化程度较富里酸高，这与李寻等^[1]的研究相一致。随着腐殖酸浓度的增大，HA 的 E_4/E_6 值有先增加后减小的趋势，高浓度下腐殖酸分子会发生凝聚从而使光谱特性发生改变，而且浓度变化产生的荧光内滤效应、荧光猝灭及能量转移等都会使得光谱产生红移或蓝移^[2]。

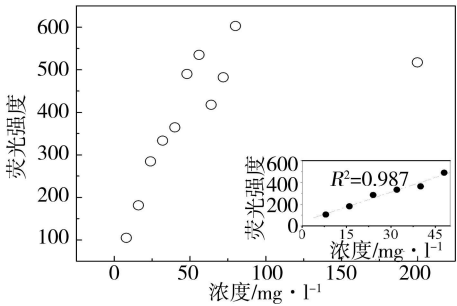


图 2 不同浓度 FA 的荧光强度
Fig 2 Fluorescence intensity of FA at different concentrations

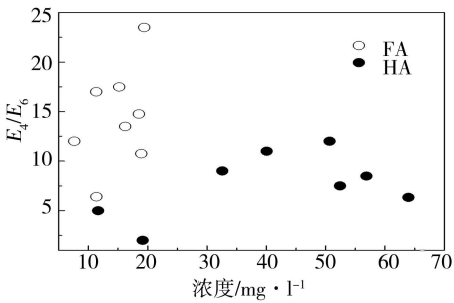


图 3 不同浓度 FA 和 HA 的 E_4/E_6 值 ($\text{pH} 7.0$)
Fig 3 E_4/E_6 absorbance ratio of FA and HA at different concentrations under $\text{pH} = 7.0$

5 pH 值与荧光强度

相同浓度下 ($15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) FA 和 HA 溶液的荧光强度随 pH 值的变化如图 4 所示，从图 4 可以看出，在相同的 pH 值条件下，FA 的荧光强度要强于 HA，这与 Miano^[3]和 Senesi^[4]等人的研究结果一致。FA 及 HA 的荧光强度随 pH 值的变化趋势大致相同：在酸性条件 ($\text{pH} < 4.5$) 下，随着 pH 值的增大，荧光强度逐渐增强，但不具备线性关系；在碱性条件 ($\text{pH} > 10$) 下，荧光强度随 pH 值的增大而减弱；而在二者之间 (pH 值 4.5—10)，荧光强度随 pH 值的变化不显著，Pate & Sorrentino 等^[5]的研究也发现了类似的腐殖酸荧光发射光谱随 pH 值的变化规律。就 FA 来说，其荧光强度最大值出现在 pH 5 左右，这与傅平青等^[6]的研究结果一致。

荧光强度的这种变化与有机结构中的酸性基团 (如酚羟基) 及其自身分子构型随 pH 值的改变有关. 腐殖酸 (包括 FA 和 HA) 作为一种带负电的高分子弱电解质, 在 pH 值较高的碱性溶液中, 羧基和羟基大多离解, 使高分子携带负电荷相互排斥, 构型伸展. 在 pH 值较低的酸性溶液中, 各官能团难于离解因而电荷减少, 高分子趋于卷缩成团, 亲水性弱, 相应裸露的发光基团比较少, 因而导致荧光强度减弱. 目前已有实验验证在中性和碱性条件下, 腐殖酸分子之间的排斥作用使其构型拉伸为线性, 使得更多的荧光基团裸露到溶液中, 从而使荧光强度增强. 在 $\text{pH} > 11$ 时, 溶液碱性较强可能对 FA 和 HA 的分子结构产生影响, 较强的离子强度都可能导致它们的荧光强度有所降低. 总体而言, pH 值对腐殖酸荧光强度影响显著.

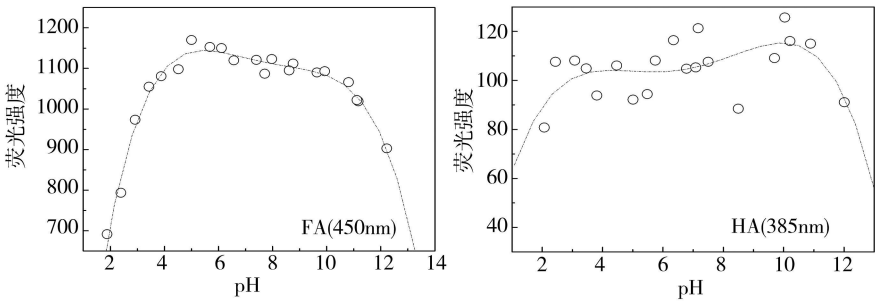


图 4 FA 和 HA 的荧光强度与 pH 值的关系

Fig 4 Effect of pH value on fluorescence at a given concentrations of $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ FA and HA

6 pH值与 ϵ_{280}

pH 值可以改变腐殖酸分子的结构和化学性质, 从而对腐殖酸的光谱特征造成影响. 图 5 反映了 FA 及 HA 在 280nm 处的吸光值 ϵ_{280} 随 pH 值的变化情况 (其中 FA 及 HA 的浓度均为 $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), 在酸性溶液中, FA 及 HA 的 ϵ_{280} 随 pH 值的增大显著升高, 表明其芳香性逐渐增强, 这也从另一角度解释了图 4 中 FA 及 HA 在酸性条件下随 pH 值的增大荧光强度逐渐增强的原因. 同时, 在 $\text{pH} \leq 5$ 区间内, 荧光强度随着 pH 值的降低而降低, 这可能是由于酸性基团难以离解使得电荷减少, 不利于荧光基团溶解造成的. 此外, FA 在 280nm 处的单位吸光值整体上要大于 HA, 这表明 FA 的芳香性要大于 HA, 可以进一步对图 4 中等浓度条件下 FA 荧光强度高于 HA 的现象加以解释.

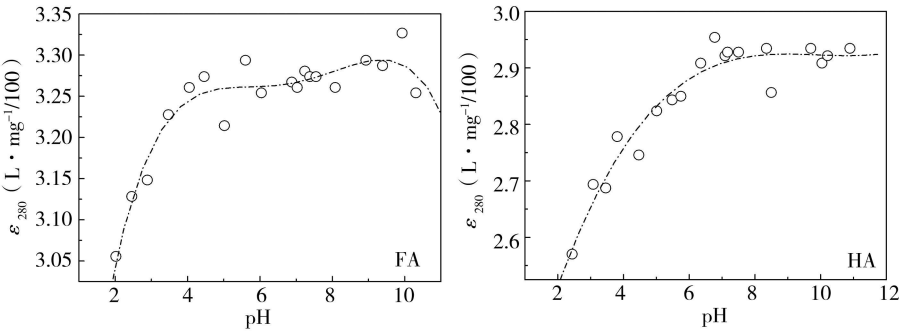


图 5 pH 值对 FA 和 HA 在 280nm 处吸光值的影响

Fig 5 Effect of pH value on ϵ_{280} of FA and HA

7 pH值与荧光发射光谱谱形

A_4/A_1 可以用来衡量荧光发射光谱谱形的改变, A_4/A_1 比值增加表明荧光发射光谱红移显著, 即腐殖化程度加深; 反之则表明光谱发生蓝移, 即腐殖化程度减弱. 如图 6 所示, 在相同浓度 (二者浓度均为 $16\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) 下, HA 随 pH 值的增大, A_4/A_1 值先增大后减小, HA 发射光谱的谱型变化明显; 而 FA 随 pH 值增大的变化不明显, 这与荧光分子愈大发射光谱红移愈明显的结论是一致的^[7]. pH 值的改变可能促进或抑制 FA 和 HA 的聚合, 导致 FA 和 HA 在不同酸性条件下表现出不同的红移或蓝移.

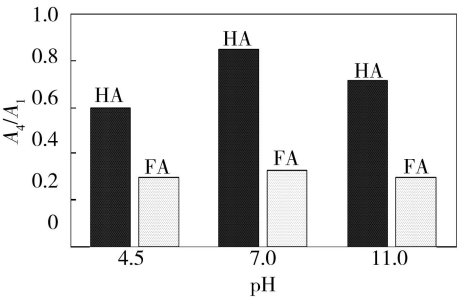


图 6 相同 pH 值下 HA 和 FA 的 A_4/A_1

Fig 6 A_4/A_1 ratio of HA and FA under the same pH value

综上所述, 0—45mg·L⁻¹范围内, 富里酸的浓度与荧光强度呈正相关关系. E_4/E_6 值也随浓度呈不规则的变化. 同等浓度下不同 pH 值的富里酸其荧光强度比胡敏酸强. 但富里酸和胡敏酸的荧光强度在酸性条件下都随 pH 值的增大而增强, 在 pH 值介于 4.5—10 之间变化不显著, 在中性和碱性条件下有较高的荧光强度, 但是当 pH 值超过 10 以后, 二者的荧光强度有所减弱.

参 考 文 献

[1] 李寻, 刘峙嵘, 韦鹏等, 泥煤溶出性能的研究. 煤炭科学技术, 2006 34 (12) : 62—65
[2] Matthews B JH, Jones A C, Theodorou N K et al., Excitation-Emission-Matrix Fluorescence Spectroscopy Applied to Humic Acid Bands in Coral Reefs [J]. Mar. Chem., 1996 55 (3—4) : 317—332
[3] Miano TM, Sposito G, Mart JP, Fluorescence Spectroscopy of Humic Substances [J]. Soil Sci. Soc. Am. J., 1988, 52 1016—1019
[4] Senesi N, Molecular and Quantitative Aspects of the Chemistry of Fulvic Acid and Its Interactions with Metal Ions and Organic Chemicals. Part II. The Fluorescence Spectroscopy Approach [J]. Anal. Chim. Acta, 1990 232: 77—106
[5] Patel Sorrentino N, Mounier S, Benaim J Y, Excitation-Emission Fluorescence Matrix to Study pH Influence on Organic Matter Fluorescence in the Amazon Basin Rivers [J]. Water Res., 2002, 36 2571—2581
[6] 傅平青, 刘丛强, 尹祚莹等, 腐殖酸三维荧光光谱特性研究 [J]. 地球化学, 2004 33 (3) : 301—308
[7] Tam S C, Sposito G, Fluorescence Spectroscopy of Aqueous Pine Litter Extracts: Effects of Humification and Aluminum Complexation [J]. Eur. J. Soil Sci., 1993 44: 513—524

SPECTROSCOPIC CHARACTERISTICS AND IMPACT
FACTORS OF SOIL HUMICS

LI Wen-hui LI Aimin ZHANG Shu-cai WANG Xue-jun

(Ministry of Education Laboratory of Earth Surface Processes, College of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

ABSTRACT

UV-visible and fluorescence spectroscopies were used to study the spectroscopic characteristics of soil humics. Results showed that the concentration had significant effect on the fluorescence intensity of fulvic acid (FA). Fluorescence intensity had significant linear relationship with concentrations in the range of 0—45 mg·L⁻¹, while linear relation became less significant and nonlinear relation got more obvious when concentration was higher than 45mg·L⁻¹. pH value also played an important role for fluorescence intensity. Fluorescence intensity increased with the increasing of pH value under acidic condition and decreased with the rising of pH value in alkaline solution when pH > 10. However, in the range of 4.5—10, the pH value had little effect on fluorescence intensity. A blue shift and a red shift were observed for fluorescence spectroscopy in acidic solution and alkaline solution, respectively.

Keywords soil fulvic acid humic acid fluorescence intensity.