

pH 值和离子强度对胡敏酸与芘之间相互作用的影响*

李文慧 李爱民 王学军**

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

摘 要 本文采用荧光猝灭法研究了不同 pH 值和离子强度下胡敏酸与芘的结合常数 (K_{doc}) 的变化, 并结合芘的特征参数 I_1/I_3 和原子力显微镜图像进行了分析. 结果表明, 离子强度对 K_{doc} 数值的影响在不同 pH 值条件下呈现不同的规律. 酸性和碱性条件下, K_{doc} 随着离子强度的增大逐渐减小; 而在中性条件下, K_{doc} 值随离子强度的增大, 先增大后减小.

关键词 胡敏酸, 芘, 荧光猝灭, 原子力电子显微镜, 结合常数.

胡敏酸 (HA) 是土壤有机质的重要组成部分, 其官能团对有机污染物的迁移、转化和降解等过程有重要影响^[1-2]. 溶解态腐殖酸与菲的结合能力显著高于固态腐殖酸, 从而可减少土壤对有机污染物的滞留作用, 增大有机污染物的溶解度和迁移性, 并直接影响到有机污染物在水-土体系中的分配^[3], 从某种程度上增大 PAHs 的潜在危害^[4-6]. 此外, 潘波等人^[7]的研究证实, 利用辛醇-水分配系数预测水溶性有机碳与菲的结合常数时, 溶解性有机碳会导致预测结果偏低, 进而降低预测结果的可信度.

本文选用具有助癌作用的芘作为目标化合物, 测定了水溶性胡敏酸与芘的结合常数 K_{doc} , 讨论了溶液化学条件对结合常数的影响, 并利用芘的特征参数和原子力显微镜 (AFM) 进行了分析.

1 实验部分

1.1 实验方法

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 (深约 10cm) 样品, 将采集的样品剔除树枝等杂物后于室温 (20℃) 风干. 胡敏酸 (HA) 样品的分离与制备采用国际腐殖质协会的分组制备方法^[8].

纯化后的胡敏酸储备液分别在 pH = 4、7 和 10 的条件下离心, 取上清液作为溶解态胡敏酸, 同时配制 $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的甲醇溶液作为储备液, 将两者放入 4℃ 冰箱中冷藏备用.

利用有机碳测定仪 (TOC-Schimadzu 5000A) 来表征 HA 的浓度, 即溶液中总有机碳的浓度 (TOC); pH 计 (Mettler Toledo) 调节 HA 溶液的 pH 值, 加尽可能少量的 HCl 或 NaOH 溶液调节溶液 pH 值分别为 4、7 和 10 左右; 紫外-可见分光光度计 (752 型) 测定样品在芘的激发波长 336nm 和发射波长 374nm 处的吸光值, 用于荧光猝灭中内过滤效应的校正.

用荧光分光光度计 (Hitachi F-2500) 进行测定, 得到了 $20\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的荧光发射光谱图, 其测试条件为: 激发波长 336nm, 扫描范围 350—420nm, 扫描速度 $1500\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 激发和发射狭缝宽度均为 2.5nm, PMT 电压 700V, 响应模式为自动. 芘的荧光光谱图有 3 个明显的峰, 分别位于波长 374nm, 384nm 和 394nm 左右. 采用 374nm 处的峰值进行定量, 同时考察了芘发射光谱两个振动带的强度比值, 即 $I_1 = 373\text{nm}$ 和 $I_3 = 384\text{nm}$ 的比值 I_1/I_3 , 以此作为特征参数来描述芘所处的微环境极性.

1.2 K_{doc} 的测定方法

每个 pH 值 (4、7、10) 下溶液的离子强度分别为 $\text{NaCl } 0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.001\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.005\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 根据预备实验的结果, 将盛有样品的 25mL 具塞三角瓶放入振荡器中 (恒温 25℃, 转速 $120\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 振荡 30min 后取出, 用荧光分光光度计对样品的荧光发射光谱进行测定. 每组 HA 与

2008 年 9 月 11 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

芘的结合平衡实验至少包括 6 个 HA 浓度水平, 每个浓度水平平行测定两次, 取其均值. 在荧光测定时, 设置不含芘的 HA 溶液作为空白对照.

荧光猝灭方法的内过滤校正公式为:

$$f = F_{cor} / F_{obsd} = \frac{2.3d_{ex}}{1 - 10^{-sI_{ex}}} \cdot 10^{-gI_{ex}} \cdot \frac{2.3sI_{em}}{1 - 10^{-sI_{em}}}$$

式中, d 为比色池宽度 (1 cm); s 为激发光束宽度 (0.10 cm); g 为光束距比色池底的距离 (0.25 cm).

根据 Stern-Volmer 方程^[9]:

$$F_0 / F = 1 + K_{doc} \cdot [HA]$$

式中, F 为溶液荧光强度, F_0 为溶液的初始荧光强度 (F, F_0 均为经过内过滤效应校正后得到的 F_{cor}), $[HA]$ 为溶解态胡敏酸浓度, K_{doc} 为溶解态胡敏酸与芘的结合常数. 以 F_0 / F_{cor} 对胡敏酸浓度 $[HA]$ 作图, 根据最小二乘法拟合得到的直线斜率可以计算出相应的结合常数^[2].

1.3 原子力显微镜对胡敏酸结构形态的测定

实验中将硅片经稀硝酸酸化后, 放入胡敏酸溶液中浸泡 1h 左右, 取出风干, 在原子力显微镜 (SPI3800/SPA400) 下进行扫描测定.

2 结果与讨论

2.1 芘的荧光特性参数

芘周围微环境中的极性越强, I_1 / I_3 比值越大^[2, 10]. 从图 1 中可以看到, 在三个 pH 值条件下, 虽然个别点有发散, 但是总体趋势还是一致的, 随着 HA 浓度增大, I_1 / I_3 减小, 表明芘周围的极性减小, 进而说明芘结合到了 HA 的憎水性部分, 因此憎水作用在 HA 与非离子芘的结合中起着非常重要的作用. 这与 Nakashima 等^[2] 和李毓骥等^[10] 观察到的现象是一致的.

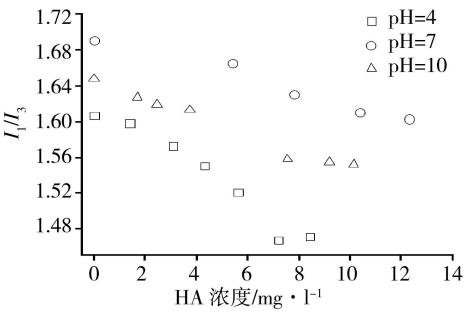


图 1 不同 pH 值条件下, 芘的 I_1 / I_3 值随 HA 浓度的变化曲线

Fig. 1 Changes of I_1 / I_3 of pyrene with HA concentration under different pH values

2.2 不同 pH 值条件下 K_{doc} 的特征

由于选用的测定方法以及 HA 来源的不同, 实验测得的结合常数会有半个数量级左右的波动, 本次实验中测定的 HA 与芘的结合常数 K_{doc} 分别为 4.85 (pH = 4), 5.00 (pH = 7) 和 4.68 (pH = 10), 其中 pH = 7 的条件下 K_{doc} 为 5.00, 这与文献^[12] 中的报道结果基本吻合.

不同 pH 值条件下, HA 与芘的结合常数是不同的, 这是因为 HA 是带有负电荷的聚合物, 其所含有的羧基、羟基以及磷酸基等官能团会随着 pH 值的不同而改变其存在状态. 李毓骥等^[10] 研究发现, HA 在 pH = 7 的条件下最容易形成“假胶束”结构, 而假胶束是芘的有利结合体, 这与本实验中 pH = 7 时 HA 与芘的结合常数最大相一致. 而在 pH = 4 时, 由于电荷中和作用, HA 会发生团聚, 形成疏水区域. pH = 10 时, HA 由于去质子化作用, 分子间的静电斥力增大, 影响了 HA 对芘的结合.

利用原子力显微镜对 pH = 4 和 pH = 7 条件下的 HA 构型进行了扫描, 得到相应的原子力显微镜图像如图 2 所示. 在 pH = 4 时 HA 呈现出聚集结合的状态, 在 pH = 10 时, HA 由于静电斥力作用而分布比较均匀. 因此 pH = 4 时测得的 K_{doc} 要大于 pH = 10 得到的 K_{doc} . 但由于“假胶束”结构的存在,

它们都小于 $\text{pH} = 7$ 时测定的 K_{doc} 。另一方面, pH 值还可能影响 HA 的极性, 在较高 pH 值条件下, HA 的极性会增强, 进而导致 HA 与芘的结合减弱^[13]。

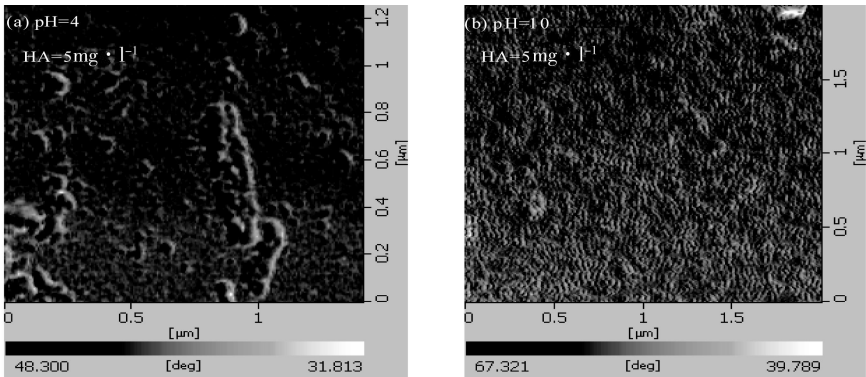


图 2 pH 为 4 (a)和 7 (b)条件下 HA 构型的原子力显微镜图

Fig 2 AFM images for different HA conformations under various pH values

2.3 离子强度的影响

pH 值和离子强度对 HA 与芘之间结合常数的影响如图 3 所示, 同一离子强度条件下, K_{doc} 变化的总体趋势是随 pH 值的增大而减小; 同一 pH 值条件下, 离子强度对 K_{doc} 值的影响则不尽相同。

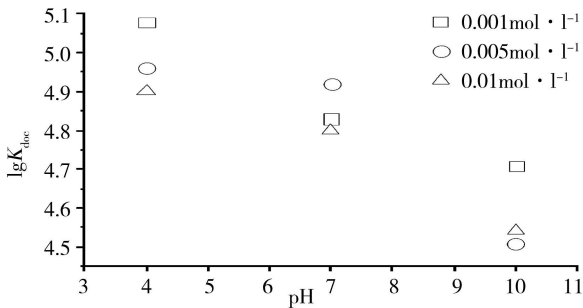


图 3 不同 pH 值和离子强度下芘与 HA 的结合常数

Fig 3 Pyrene binding coefficients for HA at different pH values and I

本实验中氯化钠电解质的作用是作为电荷中和剂与 HA 发生作用的。随着 pH 值的增大, HA 的构型从卷曲结构变化为伸展的链状结构, HA 的极性也逐渐增大, 对芘的结合减弱, 因此前者能结合更多的芘。后者由于静电作用, 链状结构中能够结合芘的点位减少。另一方面, 较低的离子强度有助于中和 HA 带的电荷, 使其极性减弱; 相反, 较高的离子强度下, HA 又带电荷, 之间的排斥力增强, 极性也相应增强。简言之, 外加电解质溶液是先起中和作用, 后与 HA 结合使其带电。

$\text{pH} = 4$ 随着离子强度的增大, K_{doc} 逐渐减小。带负电的溶解态 HA 在酸性溶液中质子化, 当 NaCl 浓度增大时, 静电斥力作用促使 HA 被 NaCl 排斥, 导致原来在中性条件下形成的憎水区域受到破坏, 在一定程度上影响了 HA 分子的卷曲结构, 随着 NaCl 浓度的增大, 静电斥力增大, HA 与芘的结合减弱, 导致 K_{doc} 逐渐减小。

$\text{pH} = 7$ 随着离子强度的增大, K_{doc} 先增大后减小。Bukhard 等^[11]考察了 $\text{pH} = 7$ 左右的情况, 随着离子强度的逐渐增大, I_1/I_3 比值先减小后增大, 这与本次实验中观察到的现象一致。在 $\text{pH} = 4$ 的时候, $0.005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl 对 HA 与芘的结合有负贡献, 而对 $\text{pH} = 7$ 条件下 HA 与芘的结合有正贡献, 说明电荷会影响 HA 的构型, 进而导致 K_{doc} 的变化。当 NaCl 浓度增大到 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的时候, K_{doc} 反而减小, 因为此时 HA 又带有正电荷。

$\text{pH} = 10$ 随着离子强度的增大, K_{doc} 逐渐减小。这与文献^[13]中描述的 HA 对菲的结合规律相似。碱性溶液中带电的 HA 会与溶液中额外的 NaCl 作用, 因而 Na^+ 会占据更多 HA 上的吸附点位, 导致

K_{doc} 的大幅减小. 但当离子强度增大到一定程度后, K_{doc} 随离子强度的变化不明显.

3 结论

本文利用特征参数 I_1/I_3 比值, 并结合原子力显微镜描述了胡敏酸的微观结构形态: pH = 4时胡敏酸呈现出聚集结合的状态, pH = 10时, 胡敏酸分子分布比较均匀. 酸性和碱性条件下, K_{doc} 随着离子强度的增大逐渐减小; 在中性条件下, K_{doc} 值随着离子强度的增大, 先增大后减小.

参 考 文 献

[1] 蒋展鹏, 廖孟钧, 腐殖质及其在环境污染控制中的作用 [J]. 环境污染与防治, 1990 12 (3) : 24

[2] Nakashina K, Makia M, Ishikawa F et al, Fluorescence Studies on Binding of Pyrene and Its Derivatives to Humic Acid [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2007, 67: 930—935

[3] Lee C L, Kuo L J Quantification of the Dissolved Organic Matter Effect on the Sorption of Hydrophobic Organic Pollutant: Application of an Overall Mechanistic Sorption Model [J]. *Chemosphere*, 1999 38 (4) : 807—821

[4] Yang Y, Ratte D, Smets B F et al, Mobilization of Soil Organic Matter by Complexing Agents and Implications for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Extraction [J], *Chemosphere*, 2001, 43: 1013—1021

[5] Kim Y J, Osako M, Leaching Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAH) from Spiked Sandy Soil [J]. *Chemosphere*, 2003 51: 387—395

[6] Lassen P, Poulsen M E, Lauridsen F S et al, Leaching of Selected PAH' s and HeteroAnalogues from an Organic Matrix into Synthetic Ground Water: Influence of Dissolved Humic Materials [J]. *Chemosphere*, 1997, 34: 335—344

[7] 潘波, 刘文新, 林秀梅等, 水溶性有机碳对非吸附系数测定的影响 [J]. 环境科学, 2005 26 (3) : 162—166

[8] Schniter M, Organic Matter Extraction [A]. In: Page AL. Methods of Soil Analysis [M]. Madison: WI Press, 1982: 581

[9] Thomas D G, Edward C S, Willan F G, Fluorescence Quenching Method for Determining Equilibrium Constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Binding to Dissolved Humic Materials [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1986, 20: 1162—1166

[10] 李毓骐, 朱亚先, 鹿贞彬等, 荧光极性探针在腐殖酸和芘相互作用研究中的应用 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2007 46 (1) : 59—62

[11] Burkhard L P, Estimating Dissolved Organic Carbon Partition Coefficients for Nonionic Organic Chemicals [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2000 34 (22) : 4663—4668

[12] Ping L F, Luo Y M, Wu L H, Phenanthrene Adsorption by Soils Treated with Humic Substances under Different pH And Temperature Conditions [J]. *Environmental Geochimistry and Health*, 2006, 28: 189—195

[13] Jones K D, Tiller C L, Effect of Solution Chemistry on the Extent of Binding of Phenanthrene by a Soil Humic Acid: a Comparison of Dissolved and Clay Bound Humic [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1999 33: 580—587

EFFECTS OF pH VALUES AND ION STRENGTHS ON BINDINGS
BETWEEN HUMIC ACID AND PYRENE

LI Wen-hui LI Aimin WANG Xue-jun

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

ABSTRACT

The fluorescence quenching method was used to determine the binding coefficients(K_{doc}) between humic acid and pyrene under different pH values and various ion strengths. I_1/I_3 was employed to analyze the variations of K_{doc} combined with images obtained by atomic force microscope. The experiment results showed that ion strengths had significant influence on K_{doc} under different pH values. K_{doc} decreased with the increasing ion strengths under acidic or base conditions, whereas K_{doc} increased first and then decreased under neutral condition.

Keywords humic acid, pyrene, fluorescence quenching, AFM, binding coefficient