

二维相关荧光光谱探究土壤富里酸亚组分的质子键合多相性

宋凡浩^{1,2}, 栗婷婷², 张进³, 刘沙沙², 冯伟莹², 何佳², 白英臣^{2*}

1. 北京师范大学水科学研究院, 北京 100875
2. 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012
3. 常州大学环境与安全工程学院, 江苏 常州 213000

摘要 利用同步荧光光谱(SFS)结合二维相关光谱(2D COS)和修正 Stern-Volmer 模型探究了森林土壤富里酸(FA)亚组分的质子键合多相性。利用 XAD-8 吸附树脂结合 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 缓冲溶液逐步洗脱方法成功将土壤 FA 分级为异质性低的 FA 亚组分(FA_3 - FA_{13})。FA₃-FA₁₃ 含有类蛋白(类酪氨酸和类色氨酸)、类富里酸和类腐殖酸组分, 且 FA₇-FA₁₃ 比 FA₃ 和 FA₅ 含有更多含量的类蛋白组分。FA₃-FA₁₃ 中不同荧光组分的光谱峰强受溶液碱性 pH 值变化的影响较为明显。FA₃-FA₁₃ 的 2D COS 同步和异步相关谱图中自峰和交叉峰的复杂分布与荧光组分的质子键合多相性有关。FA₃-FA₁₃ 中类蛋白、类富里酸和类腐殖酸组分因 pH 值变量扰动而产生的光谱变化方向相同。在碱性 pH 值条件下, 修正 Stern-Volmer 模型定量拟合 FA₃-FA₁₃ 中荧光组分的解离常数($\text{p}K_a$ 值), 其中类酪氨酸、类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸的 $\text{p}K_a$ 值范围分别为 6.11, 8.93~10.12, 9.32~10.65 和 9.70~10.63($R>0.854$)。FA₃ 中类酪氨酸组分的低 $\text{p}K_a$ 值(6.11)表明类酪氨酸组分含有更多含量的芳香族结构和相邻酚基官能团。FA₃-FA₁₃ 中类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸组分的相似 $\text{p}K_a$ 值(8.93~10.65)与羟基苯和氨基酸的 $\text{p}K_a$ 值(8.0~12.02)相近, 表明类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸组分具有相似的质子亲和力, 且酚基官能团和氨基酸组分在其质子键合过程中起主要作用。FA₃-FA₁₃ 中特定波长处荧光组分的波长连续变化顺序与其 $\text{p}K_a$ 值递增趋势相一致, 且质子结合位点的多相性特征同时存在于 FA 亚组分的不同荧光组分间和相同荧光组分内。FA₃ 中特定波长处类酪氨酸和类色氨酸组分的 $\text{p}K_a$ 值(6.11~9.16)小于类腐殖酸组分(9.70~9.97), 且荧光组分的递增趋势与波长连续变化的顺序(250 nm→275 nm→425~490 nm)相一致。FA₃-FA₁₃ 中特定波长处类色氨酸组分、类富里酸和类腐殖酸组分的 $\text{p}K_a$ 值递增趋势与波长连续变化的顺序表现出相一致的规律: 275 nm(8.93~9.70)→375~495 nm(9.88~10.16)→350 nm(10.65)(FA₅ 和 FA₇), 275 nm(10.11)→290~400 nm(10.35)(FA₉)和 265~345 nm(9.32~9.80)→360~450 nm(10.06~10.13)(FA₁₃)。同时, FA₁₃ 中同一类富里酸组分的波长和 $\text{p}K_a$ 值存在 325 nm(9.32)→375~425 nm(10.06~10.13)的连续变化顺序。SFS-2D COS 结合修正 Stern-Volmer 模型具有降低光谱重叠率和捕获光谱波长连续变化的优势, 为深入研究有机质和污染物间复杂相互作用提供支撑。

关键词 富里酸亚组分; 质子键合多相性; 荧光组分; 解离常数

中图分类号: X703.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)10-3071-07

引言

富里酸(FA)是溶解性有机质(DOM)中一类含有羟基和羧基等多种官能团的非均质混合物, 具有较强的溶解性, 移动性和污染物亲和力^[1-3]。FA 中脂肪族和芳香族等官能团的

结构和性质赋予了 FA 酸碱特性, 而 FA 酸碱特性又显著影响着 FA 的官能团形态、分子结构、构型构象和分子内反应等, 促进或制约着营养物质, 重金属和有机污染物等化学物质对环境介质中的迁移转化和生物有效性^[4-7]。FA 的质子键合能力是其酸碱特性的重要表现形式。基于酸性 pH 值条件下(pH 1.0~5.0)的荧光特性, 河流和海洋中 DOM 或 FA 的

收稿日期: 2018-08-27, 修订日期: 2018-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(41521003, 41573130, 41807372, 41603113, 41703115), 北京市自然科学基金项目(8162044), 中国博士后科学基金项目(2016M591227)资助

作者简介: 宋凡浩, 1991 年生, 中国环境科学研究院和北京师范大学博士研究生 e-mail: songfh@craes.org.cn

* 通讯联系人 e-mail: baiyc@craes.org.cn

解离常数(K_a)成功拟合并用来表征其化学特性^[8-9]。然而, FA 在碱性 pH 值条件下的 K_a 值拟合尚未系统地研究。同时, FA 结构的异质性和复杂性成为探究 FA 质子键合行为的重要限制因素^[2, 8], 借助 XAD 吸附树脂结合不同类型洗脱液将 FA 分级为低异质性的亚组分有利于深入探究 FA 的起源、分子结构及其与化学物质相互作用机理。同步荧光光谱(SFS)具有需样量少、灵敏度高、操作简便和无破坏性的优点, 广泛应用于表征河流、湖泊、土壤和沉积物来源 DOM 中芳香类化合物、不饱和脂肪烃和蛋白质等有机化合物^[10-11]。同时, SFS 常用于建立 FA 中荧光组分与质子或重金属间的相互结合参数^[8]。但是, 由于 SFS 中荧光峰的重叠现象严重, 导致单一 SFS 技术无法充分反映 DOM 与质子或重金属相互结合位点的多相性特点。二维相关光谱法(2D COS)能实现二维尺度上的光谱信号分析, 具有光谱分辨率高和光谱重叠峰简化度高的优势, 能够基于光谱信号峰间变化的相关性来探究不同物质间的相互作用^[10, 12]。基于外扰因素引起的两个不同光谱变量间的关系, 2D COS 能有效识别由外界微扰所引起的细微光谱变化顺序^[10, 12]。2D COS 为研究 DOM 在不同环境因素干扰下的结构改变和反应差异等提供了技术支撑, 在 DOM 对环境污染物的吸附和解吸等研究中具有巨大的潜在优势。Chen 等^[10]和 Xu 等^[13]利用紫外吸收光谱和 SFS 结合 2D COS 探究了 DOM 与金属离子的成键过程。Wen 等^[14]利用红外光谱结合 2D COS 研究了施肥时间差异性对土壤 DOM 与 Al^{3+} 相互作用过程的影响。荧光滴定法结合修正 Stern-Volmer 模型成功拟合 DOM 与金属离子(如 Cu^{2+} 和 Hg^{2+})或有机污染物(如 PAH 或非)相互作用的条件稳定常数^[15-16]。但是, 荧光滴定法结合修正型 Stern-Volmer 模型用于拟合 FA 的碱性 K_a 值和探究其质子结合位点的多相性的研究还不够充分。

利用 SFS 技术结合 2D COS 和修正 Stern-Volmer 模型表征土壤 FA 亚组分的结构组成, 拟合 FA 亚组分中荧光组分的 K_a 值, 探究荧光组分因碱性 pH 值变化扰动而引起的连续变化方向和次序, 并深入揭示荧光组分的质子结合位点的多相性特征。

1 实验部分

1.1 FA 样品提取与分级

土壤样品采自北京鹫峰国家森林公园 0~15 cm 表层, 风干后将其研磨并过 2.0 mm 孔筛, 去除砾石和植物残体。参照国际腐殖酸协会的推荐方法, 将过筛后的土壤进行酸化和碱化处理后, 得富含 FA 溶液。将上述 FA 溶液吸附在 XAD-8 树脂柱上, 经 NaOH 洗脱, 蒸馏水冲洗, HCl-HF 除杂和 H^+ -阳离子交换树脂纯化后, 冷冻干燥得 FA 固体样品。

利用一定量的浓度为 0.1 或 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaOH 或 HCl 溶液配置浓度均为 0.1 mol·L⁻¹, 初始 pH 值分别为 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 和 13.0 的 $Na_4P_2O_7$ 缓冲溶液。用蒸馏水溶解 FA, 并将其重新吸附到 XAD-8 树脂柱上, 然后利用不同 pH 值的 $Na_4P_2O_7$ 缓冲溶液逐步洗脱 XAD-8 树脂柱上的

FA, 分别得到 5 种 FA 洗脱液。5 种 FA 洗脱液分别进行 HCl 处理(pH 1.0), 再用 XAD-8 树脂吸附, 依次用 0.65 倍树脂柱体积的蒸馏水和 3 倍树脂柱体积的浓度为 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液淋洗 XAD-8 树脂, 分别得 5 种 FA 碱性洗脱液。上述 FA 碱性洗脱液分别进行 HCl 处理(pH 1.0), 然后添加 HCl-HF 溶液(终止浓度为 0.3 mol·L⁻¹)进行除杂, 静止 48 h, 经 H^+ -饱和和阳离子交换树脂纯化后, 冷冻干燥得 5 种 FA 亚组分(FA_3 , FA_5 , FA_7 , FA_9 和 FA_{13})。

1.2 同步荧光光谱测定

利用 100 mL 的 Milli-Q 水分别溶解 FA_3 - FA_{13} 后, 过 0.22 μm 滤膜。利用 $KClO_4$ 溶液分别稀释过滤后的 FA_3 - FA_{13} 溶液, 配置成 FA_3 - FA_{13} 浓度为 10.0 mg·L⁻¹, $KClO_4$ 浓度为 0.05 mol·L⁻¹ 的储备溶液。天然水体中 FA 浓度一般介于 2~20 mg·L⁻¹, 故选择 10 mg·L⁻¹ 的 FA_3 - FA_{13} 既反映自然环境浓度下的 FA 质子键合行为, 又避免 FA 在高浓度时因发生聚合作用而导致光谱变化^[2, 4]。采用滴加微量 $HClO_4$ 或 KOH 溶液的方式将 FA_3 - FA_{13} 储备溶液的 pH 值在 7.0~11.5 范围内以 0.5 个 pH 单位进行梯度调节。梯度调节溶液 pH 值过程中, 氮气吹扫 FA_3 - FA_{13} 储备溶液各 15 min, 避免氧气和碳酸盐物质的缓冲作用而引起静态猝灭现象。条件实验表明, FA 亚组分的质子键合反应在 15 min 内达到平衡, 保持 FA_3 - FA_{13} 溶液 pH 值稳定 15 min, 保证了 FA_3 - FA_{13} 与质子反应完全。控制 $HClO_4$ 或 KOH 溶液的体积滴加量不超过 FA_3 - FA_{13} 储备溶液体积(100 mL)的 0.1% (V/V)。实验所用 $KClO_4$ 和 HCl 等化学品均为分析纯。

利用荧光光谱仪(Hitachi F-7000, Tokyo, Japan)测定 FA 亚组分的 SFS 谱图。测定条件如下: 石英比色皿池长为 1 cm; Ex 和 Em 波长的狭缝宽度分别为 5 和 10 nm; Ex 波长范围为 200~550 nm, 以及 Ex 和 Em 的波长间隔为 30 nm; 扫描速度为 240 nm·min⁻¹。FA 亚组分的 SFS 减去空白 $KClO_4$ 的 SFS, 且荧光峰波长为 Ex 值。

1.3 二维荧光相关光谱

基于 FA 亚组分的 SFS 数据, 2D COS 分析生成同步和异步相关谱图, 提供更为详细的光谱变化信息^[17]。同步和异步相关谱图分别提供了光谱强度同步和顺序变化的信息^[17-18]。SFS 光谱变化 $y(x, t)$ 与光谱变量 (x) , 外部变量 (t) 和动态光谱 $\tilde{y}(x, t)$ 间的定量关系可以表示为^[16-17]

$$\tilde{y}(x, t) = \begin{cases} y(x, t) - \bar{y}(x) & \text{for } T_{\min} \leq t \leq T_{\max} \\ 0 & \text{否则} \end{cases} \quad (1)$$

其中, $\bar{y}(x) = \frac{1}{T_{\max} - T_{\min}} \int_{T_{\min}}^{T_{\max}} y(x, t) dt$ 为参考光谱。

同步相关谱图可以定量表示为

$$\varphi(x_1, x_2) = \frac{1}{T_{\max} - T_{\min}} \int_T^{T_{\max}} \tilde{y}(x_1, t) \cdot \tilde{y}(x_2, t) dt \quad (2)$$

基于动态频谱和 Hilbert 变换正交频谱 $\tilde{z}(x_2, t)$ 间相互关系, 异步相关谱图表示为

$$\varphi(x_1, x_2) = \frac{1}{T_{\max} - T_{\min}} \int_T^{T_{\max}} \tilde{y}(x_1, t) \cdot \tilde{z}(x_2, t) dt \quad (3)$$

在同步相关谱图中, 自动峰和交叉峰分别出现在谱图的主对角线和非对角线位置上。在异步相关谱图中, 只有交叉峰出现在谱图的非对角线位置, 且无自动峰出现^[10, 12, 17]。在

外部扰动条件下, 自动峰代表相关光谱对光谱强度变化的敏感性, 且表示符号总是正值^[16-17]。同步交叉峰和异步交叉峰分别代表两个光谱变量(v_1 和 v_2) 的光谱强度变化和连续变化顺序, 且表示符号是正值或负值^[17, 19]。根据 Noda 判定理论, 若同步和异步相关谱图中交叉峰在给定波长范围内具有相同表示符号, 则变量 v_1 处光谱变化先于变量 v_2 , 否则, 上述判断结果则相反^[10, 17]。其他 2D COS 谱图规律的判别原则参照 Noda 理论^[17]。以溶液 pH 值变化为外部扰动条件, FA₃-FA₁₃ 的 10 组 SFS 数据分别进行 2D COS 分析, 得 FA₃-FA₁₃ 的同步和异步相关谱图。

1.4 修正 Stern-Volmer 模型

在偏碱性 pH 值范围内, 假定结合位点(L)与质子形成 1:1 化学模型, 其质子结合反应为



在偏碱性 pH 值条件下, FA 亚组分中非均相结合位点的 K_a 值表述为

$$K_a = \frac{K_{ow}[L]}{[HL][OH]} \quad (5)$$

其中, [HL]表示偏碱性 pH 值条件下质子结合平衡浓度; [L]表示在偏碱性 pH 值条件下不参与反应的配体平衡浓度。

假定 FA 亚组分在荧光滴定过程中具有一致的荧光特性, 其荧光强度、配体总浓度(c_L)和 [HL]之间关系表示为

$$\frac{[HL]}{c_L} = \frac{F_0 - F}{F_0 - F_{end}} \quad (6)$$

其中, F 和 F_0 分别表示特定 pH 值和荧光滴定开始时的荧光强度; F_{end} 是滴定结束时的荧光强度。

在偏碱性 pH 值条件下, 由式(5)和式(6)得

$$\frac{F_0 - F_{end}}{F - F_{end}} = \frac{K_{ow}}{K_a[OH]} + 1 \quad (7)$$

令 $f = \frac{(F_0 - F_{end})}{F_0}$, 结合式(7)得

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{F_0}{\Delta F} = \frac{K_a}{f[H]} + \frac{1}{f} \quad (8)$$

修正 Stern-Volmer 模型拟合偏碱性 pH 值条件下 FA 亚组分的 K_a 值得^[15, 20]

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{K_a}{f[H]} + \frac{1}{f} \quad (9)$$

利用 SigmaPlot 12.5 软件, 通过 $F_0/\Delta F$ 和 $1/[H]$ 关系图来求算 f 和 K_a 值。FA 亚组分中质子结合位点的差异性导致其荧光组分表现出不同的荧光特征。基于 FA 亚组分的同步和异步相关谱图中主要相关峰的波长数据, 利用修正 Stern-Volmer 模型来拟合其荧光组分 p K_a 值 (pH 7.0 ~ 11.5)。

2 结果与讨论

2.1 FA 亚组分的同步荧光光谱特征

在偏碱性 pH 值条件下, FA₃-FA₁₃ 的 SFS 表现出 Peak A(240~280 nm), Peak B(360~380 nm)和 Peak C(420~480 nm)三个主要荧光峰(表 1)。研究表明^[10], DOM 的 SFS 荧光特征能够反映 DOM 中类蛋白, 类富里酸和类腐殖酸组

分, 且类蛋白中含有类酪氨酸(200~250 nm)和类色氨酸(250~310 nm)组分^[21]。基于光谱峰 Peaks A-C 的波长位置, Peaks A-C 分别表示 FA₃-FA₁₃ 中类蛋白, 类富里酸和类腐殖酸组分(表 1)^[10, 21]。FA₃-FA₁₃ 间 Peak A 的荧光强度差异性大于 Peak B 和 Peak C 的荧光强度差异性(表 1)。FA₃ 和 FA₅ 中 Peaks A-C 的荧光强度相近, 而 FA₇-FA₁₃ 中 Peak A 的荧光强度(248.8~2 009.0 a. u.)大于 Peak B 和 Peak C 的荧光强度(20.7~241.3 a. u.)。FA 亚组分中荧光峰的强度差异表明 FA₇-FA₁₃ 比 FA₃ 和 FA₅ 含有更多含量的类蛋白组分, 且荧光峰的强度受溶液 pH 值变化的影响较为明显。

表 1 FA 亚组分 SFS 中荧光峰的类型及位置

Table 1 Types and locations of fluorescence peaks in SFS of FA sub-fractions

荧光峰	Ex 位置/nm	类型	峰强度/(a. u.)
Peak A	240~280	类蛋白	203.1~2 009.0
Peak B	360~380	类富里酸	99.5~241.3
Peak C	420~480 nm	类腐殖酸	20.7~89.3

2.2 荧光组分质子键合位点多相性特征

在偏碱性 pH 值条件下, 2D-COS 解析 FA 亚组分中荧光组分的动态变化得同步和异步相关谱图。同步和异步相关谱图中交叉峰以对角线为轴心对称出现, 且以对角线左下方的交叉峰特性进行分析。同步和异步相关谱图中红色和蓝色

表 2 FA 亚组分与质子相结合的同步和异步相关谱图中典型峰的参数和符号

Table 2 Parameters and signs of specific peaks in synchronous and asynchronous maps of FA sub-fractions with proton binding

FA 亚组分	峰波长 v_1 /nm	组分类别	峰波长 v_2 (nm) 和表示符号			
			250	270	275	450
FA ₃	275	类色氨酸	—		(+)	(+)
	425				—	
	450	类腐殖酸	—		(+)	
FA ₅	490				—	—
	275	类色氨酸			(+)	
	375	类富里酸			—	
FA ₇	410				—	
	495	类腐殖酸			—	
	275	类色氨酸			(+)	
FA ₉	350	类富里酸			—	
	275	类色氨酸			(+)	
	280				+	
FA ₁₃	375	类富里酸			—	
	425	类腐殖酸			—	
	275	类酪氨酸			(+)	
	280	类色氨酸			+	
	325	类富里酸			+	
	375				—	
	425	类腐殖酸			—	

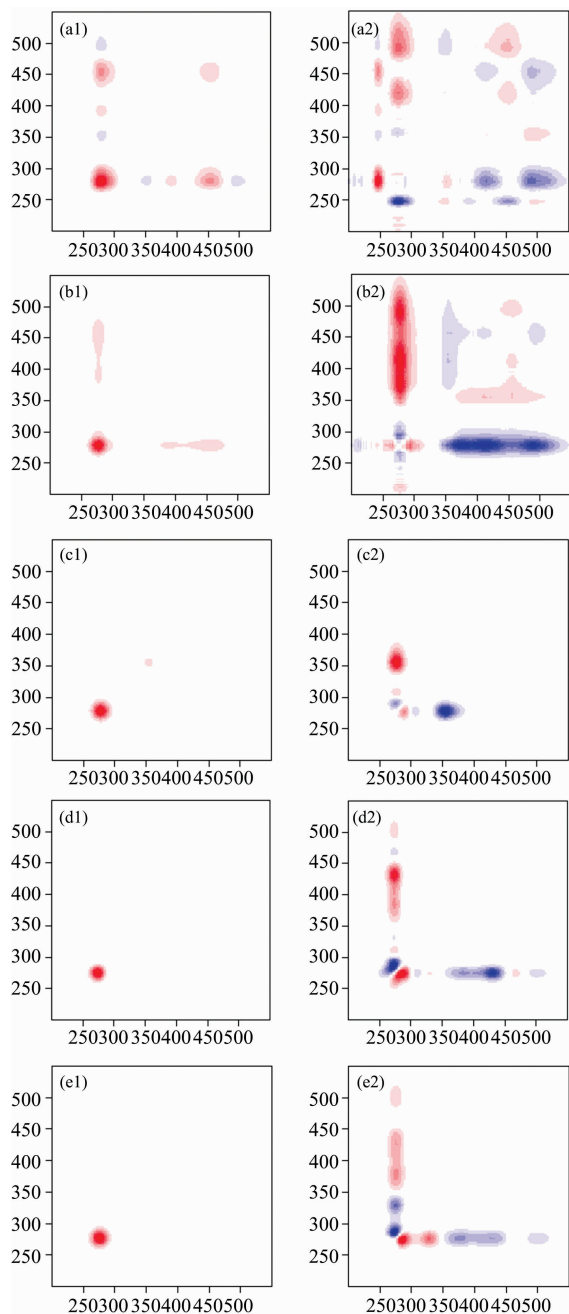


图 1 FA 亚组分 SFS 的 2D COS 分析

(a1—e1): FA_3 - FA_{13} 同步相关谱图;

(a2—e2): FA_3 - FA_{13} 异步相关谱图

x 和 y 均为波长 (nm)

Fig. 1 2D COS analysis of SFS of FA sub-fractions

(a1—e1): Synchronous maps for FA_3 - FA_{13} ;

(a2—e2): Asynchronous maps for FA_3 - FA_{13}

x and y are wavelengths (nm)

代表自峰或交叉峰的符号分别为正和负, 颜色越深表示符号特征或变化强度越明显(表 2 和图 1)。FA₃ 的同步相关谱图在 Peak A 和 Peak C 波长范围内表现出两个主要的正自峰(275/275 和 450/450 nm)和一个正交叉峰(450/275 nm)(图 1 a1), 表明 FA₃ 中类蛋白和类腐殖酸组分因 pH 值变量扰动

而产生相同的变化方向。FA₅-FA₁₃ 的同步相关谱图均在对角线处表现出一个主要的正自峰(275/275 nm), 表明 FA₅-FA₁₃ 中类蛋白、类富里酸和类腐殖酸组分的光谱变化随溶液 pH 值变化而产生相同的变化方向。同时, FA₃ 和 FA₅ 的同步相关谱图中还存在弱的正或负交叉峰(图 1 a1-b1), 表明 FA₃ 和 FA₅ 中荧光组分的光谱变化较为复杂且部分变化趋势不明显。FA₃ 的同步相关谱图中对角线波长约 275/275 nm 处的正自峰强度略高于 FA₅-FA₁₃(图 1 a1), 可能与类蛋白峰的波长漂移和峰强差异有关。

FA₃ 的异步相关谱图中交叉峰分布复杂且无规律, 表明 FA₃ 中荧光组分受 pH 值变化的影响较大且荧光特性变化复杂, 与其同步相关光谱分析结果相一致。FA₅ 的异步相关谱图中负交叉峰主要出现在 v_1 波长 350~550 nm 范围和 v_2 窄波长 250~300 nm 范围内, 其中 v_1/v_2 波长 360~500/350~355 nm 范围内出现弱的正交叉峰。FA₇ 的异步相关谱图中交叉峰分别出现在 v_2 窄波长 250~300 nm 范围内。FA₉ 和 FA₁₃ 的异步相关谱图中交叉峰出现在 v_1 波长 260~500 nm 范围和 v_2 窄波长 250~300 nm 范围内。FA₃-FA₁₃ 的同步和异步相关谱图中自峰和交叉峰的复杂分布与荧光组分质子键合的多相性有关。Hur 和 Lee 等^[18] 利用光谱学结合 2D COS 探究 DOM 与 Cu²⁺ 相互作用机理时发现两者结合位点也存在多相性分布的特点。

FA 亚组分的异步相关谱图能够揭示 v_1 和 v_2 波长随 pH 值变化的规律与联系。FA₃ 的异步相关谱图中分别在对角线下方波长 275/250, 425/275, 450/250, 490/275 和 490/450 nm 处表现出五个明显的负交叉峰(图 1 a2)。基于 Noda 判定原则^[17], FA₃ 中荧光组分的波长连续变化顺序为 250 nm→275 nm→425 (490) nm 和 250 nm→450 nm→490 nm, 表明 FA₃ 中质子结合位点的多相性分布同时体现在不同荧光组分间和同一荧光组分中。因此, FA₃ 中荧光组分的光谱变化顺序为类酪氨酸→类色氨酸→类腐殖酸。FA₅ 的异步相关谱图中对角线下方波长 375/275, 410/275 和 495/275 nm 位置出现三个主要的负交叉峰和弱的正交叉区域(360~500/350~355 nm)(图 1 b2)。FA₇ 的异步相关谱图中对角线下方波长 350/275 nm 位置出现一个明显的负交叉峰(图 1 c2)。基于 Noda 判定原则^[17], FA₅ 和 FA₇ 中荧光组分的波长连续变化顺序分别为 275 nm→375~495 nm→350~355 nm 和 275 nm→350 nm, 说明 FA₅ 和 FA₇ 中荧光组分的光谱变化顺序分别为类色氨酸→类腐殖酸→类富里酸和类色氨酸→类富里酸。在波长 275~495 nm 范围内, FA₃ 和 FA₇ 中不同荧光组分间也存在着质子结合位点的多相分布。FA₉ 的异步相关谱图中出现一个明显的正交叉峰(280/270 nm), 以及负交叉区域(355~450/275 nm)内出现两个波长为 375/270 和 425/270 nm 的负交叉峰(图 1 d2), FA₁₃ 的异步相关谱图中出现一个正交叉区域(280~345/265 nm)和一个负交叉区域(360~450/265 nm)(图 1 e2), 表现出波长 280/275 和 325/275 nm 的明显正交叉峰, 以及 375/275 和 425/275 nm 的主要负交叉峰。因此, FA₉ 和 FA₁₃ 中荧光组分的波长连续变化顺序分别为 275 nm→290~400(455) nm 和 280~345→265→360~450 nm, 表明 FA₉ 和 FA₁₃ 中荧光组分的光谱变化顺

序分别为类色氨酸→类富里酸(类腐殖酸)和类富里酸→类酪氨酸→类腐殖酸。结果表明, SFS-2D COS 方法具有降低光谱重叠率和捕获光谱波长连续变化的优势, 为深入探究荧光组分与化学物质的相互作用机理提供技术手段和理论支撑。

2.3 质子亲和力与位点多相性模型分析

基于 2D COS 同步和异步相关谱图中出现的自峰和交叉峰的波长数据, 利用修正 Stern-Volmer 模型拟合得 FA 亚组分中荧光组分的 pK_a 值(6.11~10.65)和 f 值(0.12~1.00)(pH 7.0~11.5, $R>0.854$)(表 3)。2D COS 结合修正 Stern-Volmer 模型拟合所得 FA 亚组分中荧光组分的 pK_a 值与前期研究中基于三维荧光光谱数据所得 DOM 的 pK_a 值相近^[2]。

表 3 修正 Stern-Volmer 模型拟合的质子结合参数

Table 3 Proton binding parameters fitting by the modified Stern-Volmer equation

FA 亚组分	峰波长/nm	修正 Stern-Volmer 模型	
		pK_a	f
FA ₃	250	6.11	1.00
	275	9.16	0.18
	425	9.97	0.12
	450	9.70	0.26
	490	—	—
FA ₅	275	8.93	0.17
	375	10.16	0.15
	410	10.10	0.22
	495	9.88	0.20
FA ₇	275	9.70	0.49
	350	10.65	0.20
FA ₉	270	10.12	0.92
	275	10.11	0.90
	280	10.08	0.85
	375	10.35	0.15
FA ₁₃	425	10.63	0.43
	275	9.80	0.74
	280	9.77	0.71
	325	9.32	0.41
	375	10.13	0.13
	425	10.06	0.21

FA₃-FA₁₃ 中类酪氨酸、类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸的 pK_a 值范围分别是 6.11, 8.93~10.12, 9.32~10.65 和 9.70~10.63(表 3)。FA 亚组分中类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸具有相近的 pK_a 值, 且与碱性条件下羟基苯和氨基酸的 pK_a 值(8.0~12.02)相近^[22], 结果表明类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸具有相似的质子亲和力, 且酚基官能团和氨基酸组分在其与质子相互结合中起到主要作用。FA₃ 中波长 250 nm 处的类酪氨酸的 pK_a 值(6.11)低于其他荧光组分的 pK_a 值(8.93~10.65)(表 3)。FA 亚组分中相邻芳香族羧基或羧酸基官能团, 以及相邻酚基官能团的荧光特性受溶液 pH 值变化影响较大^[23]。因此, FA₃ 中类酪氨酸可能含有更

多含量的芳香族结构和相邻酚基官能团, 从而导致 FA₃ 中类酪氨酸与质子结合能力更强。FA 亚组分中荧光组分间的不同 pK_a 值同样表明其质子结合位点存在多相性的特点(表 3)。基于结合常数(logK), Hur 等^[24] 所研究的 DOM 与 Cu²⁺ 相互作用过程中其荧光组分也存在类似的金属结合位点的多相性特征。

FA 亚组分中特定波长处的荧光组分的 pK_a 值大小与 2D COS 分析中荧光组分的波长连续变化的顺序相一致。结合异步相关谱图和 Noda 判断规律^[17], FA₃ 中特定波长 250~275 nm 处的类酪氨酸和类色氨酸的 pK_a 值(6.11~9.16) 小于特定波长 425~490 nm 处的类腐殖酸的 pK_a 值(9.70~9.97)(表 3), 与波长连续变化的顺序 250 nm→275 nm→425~490 nm 相一致(图 1)。FA₅ 和 FA₇ 中特定波长 275 nm 处的类色氨酸的 pK_a 值(8.93~9.70)依次小于特定波长 375~495 nm(9.88~10.16)和 350 nm(10.65)处的类富里酸和类腐殖酸的 pK_a 值(表 3)。FA₅ 和 FA₇ 中荧光组分的 pK_a 值递增顺序与波长连续变化的顺序 275 nm→375~495 nm→350 nm 相一致(图 1)。FA₉ 中特定波长 270~280 nm 处的类色氨酸的 pK_a 值(10.08~10.12)小于特定波长 375~425 nm 处的类富里酸和类腐殖酸的 pK_a 值(10.35~10.63)。同时, FA₁₃ 中特定波长 275~280 nm 处的类色氨酸和特定波长 325 nm 处的类富里酸的 pK_a 值(9.32~9.80)均小于特定波长 375~425 nm 处的类富里酸和类腐殖酸的 pK_a 值(10.06~10.13)(表 3)。FA₉ 和 FA₁₃ 中荧光组分的 pK_a 值递增顺序分别与波长连续变化的顺序 275 nm→290~400 nm 和 265~345→360~450 nm 相一致(图 1)。另外, FA₁₃ 中同一类富里酸组分内的波长和 pK_a 值存在 325 nm(9.32)→375~425 nm(10.06~10.13)的连续变化顺序。FA 亚组分中不同荧光组分间和同一荧光组分(如 FA₁₃ 中类富里酸)内的不同 pK_a 值也表明其质子结合位点的多相性特征同时体现在不同荧光组分间和同一荧光组分内。另外, FA₃ 中波长 490 nm 处的类腐殖酸的 pK_a 值无法准确拟合(表 3), 可能与其荧光强度具有较小的变化差异值有关。

3 结 论

(1)FA₃-FA₁₃ 含有类蛋白(类酪氨酸和类色氨酸), 类富里酸和类腐殖酸组分。不同荧光峰存在峰强度差异性, 且受溶液碱性 pH 值变化的影响较为明显。FA₇-FA₁₃ 比 FA₃ 和 FA₅ 含有更多含量的类蛋白组分。

(2)利用 SFS-2D COS 结合修正 Stern-Volmer 模型定量拟合偏碱性条件下 FA₃-FA₁₃ 中荧光组分的 pK_a 值。FA₃-FA₁₃ 中荧光组分的 pK_a 值和 f 值范围分别是 6.11~10.65 和 0.12~1.00($R>0.854$)。类色氨酸(8.93~10.12)、类富里酸(9.32~10.65)和类腐殖酸(9.70~10.63)的 pK_a 值相近, 且与羟基苯和氨基酸的 pK_a 值(8.0~12.02)相近, 表明类色氨酸、类富里酸和类腐殖酸具有相似的质子亲和力, 且酚基官能团和氨基酸组分起到主要作用。类酪氨酸的 pK_a 值(6.11)低于其他荧光组分的 pK_a 值(8.93~10.65), 与类酪氨酸含有更多含量的芳香族结构和相邻酚基官能团有关。

(3)FA₃-FA₁₃中荧光组分的波长连续变化顺序与特定波长处的荧光组分的 pK_a 值大小顺序相一致,表明不同荧光组分间和同一荧光组分内存在质子结合位点的多相性特征。FA₃ 中特定波长处的类酪氨酸和类色氨酸的 pK_a 值小于类腐殖酸,与波长连续变化顺序 250 nm(6.11)→275 nm(9.16)→425~490 nm(9.70~9.97)相一致。FA₅-FA₁₃中特定波长处的类色氨酸的 pK_a 值小于类富里酸和类腐殖酸,与

波长连续变化顺序 275 nm(8.93~9.70)→375~495 nm(9.88~10.16)→350 nm(10.65)(FA₅ 和 FA₇), 275 nm(10.11)→290~400 nm(10.35)(FA₉)和 265~345 nm(9.32~9.80)→360~450 nm(10.06~10.13)(FA₁₃)相一致。同时,FA₁₃中同一类富里酸组分内的 pK_a 值差异性也与波长连续变化顺序 325 nm(9.32)→375~425 nm(10.06~10.13)相一致。

References

- [1] Bai Y, Wu F, Xing B, et al. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 8723(doi: 10.1038/srep08723).
- [2] Song F, Wu F, Guo F, et al. *Sci. Total Environ.*, 2017, 605-606: 58.
- [3] OUYANG Heng, XIAO Jian-ren, LIN Xiu-yong, et al(欧阳恒, 肖剑仁, 林修咏, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2018, 38(4): 1146.
- [4] Song F, Wu F, Feng W, et al. *J. Environ. Sci.*, 2018, 74C: 116.
- [5] Yan M, Benedetti M F, Korshin G V. *Water Res.*, 2013, 47(14): 5439.
- [6] Wang J, Lü C, He J, et al. *Environ. Earth Sci.*, 2016, 75: 1.
- [7] Zhang H, Yang M. *Sci. Total Environ.*, 2018, 627: 118.
- [8] Song F, Wu F, Xing B, et al. *Sci. Total Environ.*, 2018, 616-617: 1279.
- [9] Yan M, Dryer D, Korshin G V. *Chemosphere*, 2016, 148: 426.
- [10] Chen W, Habibul N, Liu X, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, 49(4): 2052.
- [11] Yu H, Song Y, Pan H, et al. *Environ. Monit. Assess.*, 2016, 188(10): 579.
- [12] Maqbool T, Hur J. *Chemosphere*, 2016, 161: 190.
- [13] Xu H, Yu G, Yang L, et al. *J. Hazard. Mater.*, 2013, 263: 412.
- [14] Wen Y, Li H, Xiao J, et al. *Chemosphere*, 2014, 111: 441.
- [15] Berkovic A M, Einschlag F S G, Gonzalez M C, et al. *Photoch. Photobio. Sci.*, 2012, 12(2): 384.
- [16] Hur J, Jung K Y, Jung Y M. *Water Res.*, 2011, 45(9): 2965.
- [17] Noda I, Ozaki Y. *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. 47.
- [18] Hur J, Lee B M. *Chemosphere*, 2011, 83(11): 1603.
- [19] Su B, Qu Z, He X, et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2016, 23(9): 9237.
- [20] Yamashita Y, Jaffé R. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42(19): 7374.
- [21] Carstea E M, Bridgeman J, Baker A, et al. *Water Res.*, 2016, 95: 205.
- [22] Aliyu H N, Na'Aliya J. *Bay. J. Pure Appl. Sci.*, 2009, 2: 191.
- [23] Yan M, Fu Q, Li D, et al. *J. Lumin.*, 2013, 142: 103.
- [24] Hur J, Lee B M. *Sci. World J.*, 2011, 11(11): 1865.

Proton Binding Heterogeneity in Soil Fulvic Acid Sub-Fractions Using Two-Dimensional Correlation Fluorescence Spectrometry

SONG Fan-hao^{1, 2}, LI Ting-ting², ZHANG Jin³, LIU Sha-sha², FENG Wei-ying², HE Jia², BAI Ying-chen^{2*}

1. College of Water Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

3. School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213000, China

Abstract The proton binding heterogeneity of forest soilfulvic acid (FA) sub-fractions (FA₃-FA₁₃) was investigated by use of synchronous fluorescence spectra (SFS), combined with two-dimensional correlation spectroscopy (2D COS) and modified Stern-Volmer model. XAD-8 adsorption techniques coupled with stepwise elution using Na₄P₂O₇ buffers were successfully developed to separate the soil FA into FA sub-fractions with low heterogeneity (FA₃-FA₁₃). FA₃-FA₁₃ contained protein-like (i. e., tyrosine-like and tryptophan-like), fulvic-like and humic-like materials, and FA₇-FA₁₃ contained more contents of protein-like materials than both FA₃ and FA₅. The intensities of fluorescence peaks for different fluorescent materials in FA₃-FA₁₃ were affected significantly by the change of alkaline pH. The complex distributions of the auto-peaks and cross-peaks in synchronous and asynchronous maps derived from 2D COS were related to the proton binding heterogeneity of fluorescent materials in FA₃-FA₁₃. The protein-like, fulvic-like and humic-like materials in FA₅-FA₁₃ occurred in the same spectral direction by the pH perturbations. At alkaline pH conditions, the dissociation constants (pK_a) of fluorescent materials in FA₃-FA₁₃ were quantified by the SFS-2D COS combined with modified Stern-Volmer model. The pK_a values of tyrosine-like, tryptophan-like, fulvic-like and humic-like materials were ranged 6.11, 8.93~10.12, 9.32~10.65, and 9.70~10.63 ($R > 0.854$), respectively. The lower pK_a value (6.11) of tyrosine-like materials of FA₃ indicated that the tyrosine-like material contained more aromatic structures and adjacent phenolic functional groups. Similar pK_a values were presented for the tryptophan-like, fulvic-like and humic-like materials of FA₃-FA₁₃ (8.93~10.65), and were similar to the pK_a values (8.0~12.02) of hydroxyl-benzene and amino acid. This result suggested that the tryptophan-like, fulvic-like and humic-like materials of FA₃-FA₁₃ had similar proton affinities, and the phenolic functional groups and amino acid components played a major role in the proton bonding process. The sequential change of fluorescent materials with specific wavelengths in FA₃-FA₁₃ were consistent with their increasing trends of pK_a values. Additionally, the heterogeneous distributions of proton binding sites were both presented in different fluorescent materials and same fluorescent materials of FA sub-fractions. The pK_a values (6.11~9.16) of tyrosine-like and tryptophan-like materials with specific wavelengths of FA₃ were smaller than those of humic-like materials (9.70~9.97), and their increasing trends were consistent with the sequential orders (250 nm→275 nm→425~490 nm). The increasing trends of pK_a values of tryptophan-like, fulvic-like and humic-like materials of FA₅-FA₁₃ were consistent with the sequential variations: 275 nm (8.93~9.70)→375~495 nm (9.88~10.16)→350 nm (10.65) for both FA₅ and FA₇, 275 nm (10.11)→290~400 nm (10.35) for FA₉, and 265~345 nm (9.32~9.80)→360~450 nm (10.06~10.13) for FA₁₃. In addition, the sequential wavelength changes and pK_a values of same fulvic-like materials in FA₁₃ showed the orders of 325 nm (9.32)→375~425 nm (10.06~10.13). With the advantages of reducing the overlaps of spectra and capturing the sequential wavelength changes, the SFS-2D COS combined with modified Stern-Volmer model will provide supports for exploring complex interactions between dissolved organic matter and contaminants in future studies.

Keywords Fulvic acid sub-fraction; Proton binding heterogeneity; Fluorescent materials; Dissociation constants

(Received Aug. 27, 2018; accepted Dec. 19, 2018)

* Corresponding author