

## 取代基及 pH 对水溶态多环芳烃荧光光谱特性影响

吴伟<sup>1,2</sup>, 傅宇<sup>1,2</sup>, 任俊丽<sup>3</sup>, 缪诗超<sup>1,2</sup>, 郭远明<sup>2</sup>, 杨承虎<sup>1,2\*</sup>

1. 浙江海洋大学海洋与渔业研究所, 浙江舟山 316021
2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室, 浙江舟山 316021
3. 浙江中蓝环境科技有限公司, 浙江温州 325000

**摘要** 利用三维荧光光谱法研究了不同 pH(3~11)下水溶态( $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的芘及 1-羟基芘、1-氨基芘、1-甲基芘、1-芘甲酸、1-溴芘和 1-硝基芘等 6 种含取代基多环芳烃(S-PAHs)的荧光光谱特性,探讨了取代基及溶液 pH 对 7 种 PAHs 的荧光光谱特征的影响规律。结果表明:取代基结构对芘环荧光峰及荧光信号存在不同影响,—OH,—NH<sub>2</sub>,—CH<sub>3</sub>,—COOH 及—Br 均可导致芘环激发波长和发射波长产生不同程度红移。与此同时,1-羟基芘和 1-氨基芘的荧光强度高于芘,其原因是给电子基团—OH,—CH<sub>3</sub>可增加芘环上共轭  $\pi$  电子云密度,进而降低分子基态激发能,增加分子的荧光效率;1-硝基芘和 1-溴芘上的吸电子基团—NO<sub>2</sub>及重原子取代基—Br 具有强的诱导效应(—I),致芘环共轭体系中电子云密度降低,削弱分子的荧光效率;给电子基团—NH<sub>2</sub>对芘环荧光强度影响并不明显,而吸电子基团—COOH 小幅度增加芘环荧光效率。该实验条件下,pH 对芘、1-甲基芘及 1-溴芘的荧光峰位置及其荧光强度无显著影响;1-羟基芘最大荧光峰在 pH=11 时相比于 pH $\leq$ 9 时发生红移,且荧光强度显著下降。pH 对 1-氨基芘和 1-芘甲酸荧光光谱特性存在一定的影响,在 pH=3 时,—NH<sub>2</sub>和—COOH 发生质子化作用,使得 1-氨基芘和 1-芘甲酸荧光峰位置分别较 pH $\geq$ 5 时发生蓝移和红移;1-氨基芘荧光强度在 pH=3 时略高于 pH $\geq$ 5,而 1-芘甲酸荧光强度在 pH=3 时则略低于 pH $\geq$ 5。以上结果对水环境中 S-PAHs 荧光方法的建立及其原位测定有重要的意义。

**关键词** 多环芳烃;水溶态;取代基;pH;荧光光谱

**中图分类号:** X132 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)10-3108-05

## 引言

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类典型的持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs),因其具有“三致”效应而倍受关注<sup>[1]</sup>。含取代基 PAHs(substituted PAHs, S-PAHs)是水环境中 PAHs 重要组成部分,且 S-PAHs 较母环 PAHs 种类更多、组成更为复杂<sup>[2]</sup>。此外,由于取代基的存在 S-PAHs 性质不同于其母环 PAHs,并展现出各异的环境行为及毒性效应<sup>[3-4]</sup>,通常 S-PAHs 毒性效应(如致突变性和致癌性)强于其母环 PAH<sup>[5]</sup>。近来,水环境中 S-PAHs 环境行为及生态效应已越来越为科研工作者所关注,因此与之密切相关的水溶态部分浓度的测定至关重要。

目前,水环境中 S-PAHs 分析方法主要以气相色谱-质

谱<sup>[6]</sup>、液相色谱-质谱<sup>[7]</sup>为主,但该法前处理过程繁琐、耗时、所需萃取剂易对环境产生二次污染,且萃取过程破坏了目标化合物在水环境中的原始赋存状态。荧光法因其快速、灵敏及非破坏性而被广泛用于水体中母环 PAHs 的测定<sup>[8]</sup>。结合 S-PAHs 分子中共轭  $\pi$  键结构可产生荧光的特性,基于荧光检测 S-PAHs 的分析方法已开始被重视<sup>[9]</sup>。建立适合分析水环境中 S-PAHs 的荧光法的前提需了解水溶态 S-PAHs 荧光光谱特性。然而,有关不同取代基对 PAHs 荧光光谱特性的影响研究鲜见报道。此外,水环境因素(pH、温度等)可对荧光峰位置和荧光强度造成干扰,因此有必要考察水溶液条件对 S-PAHs 荧光光谱特性的影响。

芘及含取代基的芘衍生物在水环境中常被检出<sup>[4,7,10]</sup>,因此本研究以芘为母环 PAHs 代表,以 1-氨基芘、1-硝基芘、1-甲基芘、1-羟基芘、1-溴芘及 1-芘甲酸为 S-PAHs 代表。利用三维荧光光谱法研究不同 pH 条件下水溶态 PAHs 的荧光

收稿日期: 2019-10-18, 修订日期: 2020-02-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31800430), 舟山科技计划项目(2018C31079)资助

作者简介: 吴伟, 1994 年生, 浙江海洋大学海洋与渔业研究所硕士研究生 e-mail: 2314311055@qq.com

\* 通讯联系人 e-mail: yangchenghu135@126.com

特性,分析了各 PAHs 荧光性质与其分子结构及 pH 的关系,以期在水环境中 S-PAHs 测定和解析提供技术支持。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

芘、1-羟基芘、1-氨基芘、1-甲基芘、1-芘甲酸、1-溴芘及 1-硝基芘均购置 Sigma-Aldrich 公司,纯度均大于 96%,使用前未提纯,由 ECOSAR v1.11 计算得到 7 种 PAHs 的溶解度分别为 0.135, 4.045, 2.411, 0.058 38, 0.149, 0.013 38 及 0.011 8 mg · L<sup>-1</sup>。由 ACDLAB 软件计算得到 1-羟基芘、1-氨基芘及 1-芘甲酸的 pK<sub>a</sub> 值分别 9.4, 3.937 及 3.676。乙醇、NaOH 及 HCl 购置国药,均为分析纯试剂。

### 1.2 方法

称取适量固体 PAHs,分别配制成 50.0 mg · L<sup>-1</sup> 的乙醇储备液,于 4 °C 冰箱中避光保存、待用。分别取 4 μL PAHs 储备液至含 20 mL 背景溶液(0.01 mol · L<sup>-1</sup> NaCl, pH=3~11)的棕色玻璃瓶中,摇匀,静置 20 min 后进行检测(乙醇加入量为 0.02%,助溶剂效应可忽略)。

利用 Cary Eclipse 荧光分光光度计(Agilent, 美国)测定 PAHs 三维荧光光谱。激发波长(λ<sub>ex</sub>)范围为 220~450 nm,发射波长(λ<sub>em</sub>)范围为 350~500 nm;激发、发射狭缝宽度分别为 5 和 10 nm;激发、发射步距均为 1 nm;扫描速度为 2 400 nm · min<sup>-1</sup>;1-溴芘及 1-硝基芘测量 PMT 电压为 800 V,其余 PAHs 为 600 V。以 Milli-Q 水为空白。样品荧光光谱减去 Milli-Q 水的荧光光谱以消除拉曼散射的影响,荧光强度用 Raman 单位(R. U.)表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光峰分布规律

#### 2.1.1 取代基对荧光峰分布影响规律

图 1(a)~(f)分别展示了芘、1-羟基芘、1-氨基芘、1-甲基芘、1-芘甲酸和 1-溴芘在不同 pH 条件下三维荧光光谱(1-硝基芘无明显荧光峰,故未给出荧光光谱图)。可知,相同 pH 条件下芘及 5 种含取代基芘衍生物的荧光峰位置存在相似性,整体呈现出荧光峰的荧光激发波长位置相近,这主要是由于 6 种 PAHs 均具有芘环所致。同时,6 种 PAHs 荧光光谱又有显著不同之处,表明芘环上取代基的结构对其荧光峰位置有不同影响。如在 pH=7 时,芘、1-羟基芘、1-氨基芘、1-甲基芘、1-芘甲酸和 1-溴芘最大荧光峰位置依次分别为 λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=238/374 nm, λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=240/386 nm, λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=241/442 nm, λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=240/376 nm, λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=241/381 nm 和 λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=240/379 nm,表明—OH, —NH<sub>2</sub>, —CH<sub>3</sub>, —COOH 及—Br 均可导致芘环激发和发射波长产生不同程度红移,其中激发波长红移 2~3 nm,发射波长红移 2~68 nm。王碧等<sup>[11]</sup>研究结果显示苯酚、苯胺、甲苯、氯苯同样均较苯的荧光光谱发生红移。这主要是助色团(—OH, —NH<sub>2</sub>, —CH<sub>3</sub>, —Br)和生色团(—COOH)增加了芘环的生色能力,使其吸收波长向长波方向移动,进而导致荧光光谱红移。此外,1-氨基芘仅

有一个发射峰,与其他 5 种 PAHs 荧光峰存在显著差异。

#### 2.1.2 pH 对荧光峰分布影响规律

溶液 pH 可影响具有弱酸或弱碱性的荧光物质的电荷状态,进而改变荧光物质的基态与激发态之间的能级间隔,从而导致荧光光谱性质发生变化。由图 1 可知,不同 pH 下芘、1-甲基芘及 1-溴芘的荧光峰位置无显著变化,表明 pH 对这 3 种 PAHs 的荧光峰位置无干扰。1-羟基芘荧光光谱峰位置在 pH≤9 与 pH=11 时明显不同,其在 pH≤9 与 pH=11 时最大荧光峰位置分别为 λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=240/386 nm 和 λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=242/450 nm,即荧光光谱在 pH=11 较 pH≤9 时发生明显红移,且发射峰位置由二个变为一个[图 1(b)]。这主要是由于 1-羟基芘负离子与其分子态相比,增加了未成键电子,更有利环上 π 电子共轭,因而在 pH=11 时光谱发生红移。1-氨基芘在 pH=3 时,其最大激发波长比其在 pH≥5 时短 3 nm,表明—NH<sub>2</sub> 的质子化作用,导致光谱发生蓝移。1-芘甲酸荧光光谱峰位置在 pH=3 和 pH≥5 时存在显著差异,其在 pH=3 和 pH≥5 时最大荧光峰位置分别为 λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=241/413 nm 和 λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=241/381 nm,即荧光光谱在 pH≥5 较 pH=3 时发生明显蓝移,且发射峰位置由一个变为二个[图 1(c)],这主要是由于羧基的质子离解作用,引起光谱向短波方向移动。

### 2.2 荧光峰强度变化规律

#### 2.2.1 取代基对荧光峰强度影响规律

图 2 展示了 6 种 PAHs(10 μg · L<sup>-1</sup>)在不同 pH 下荧光强度变化趋势(以芘在 pH=7 时荧光强度做归一化处理)。由图 2 可知,取代基对 PAHs 荧光强度存在显著影响。当 pH=7 时,1-羟基芘、1-甲基芘荧光信号强于芘,与苯酚和甲苯的荧光信号高于苯的变化一致,这主要是由于—OH 和—CH<sub>3</sub> 为给电子基团,可增加芘环上共轭 π 电子云密度,进而降低分子基态激发能,增加分子的荧光效率<sup>[11]</sup>。此外,对 1-羟基芘而言,水作为氢键受体溶剂[图 3(a)],有利于—OH 上的非键孤对电子与芘环间的激发态电荷转移作用,导致荧光光谱向长波方向移动。—NH<sub>2</sub> 为强给电子基团,但 1-氨基芘荧光强度与芘相近,可归因于 1-氨基芘与水形成氢键,且水作为氢键供体[图 3(b)],抑制了—NH<sub>2</sub> 上非键孤对电子与芘环间的激发态电荷转移作用,进而未能增强其荧光强度。—NO<sub>2</sub> 属于吸电子基团,由于吸电子基的诱导效应(—I),致芘环共轭体系中电子云密度降低,削弱分子的荧光效率,因此在本实验条件下 1-硝基芘无明显荧光信号。王碧等<sup>[11]</sup>发现硝基苯在 10 mg · L<sup>-1</sup> 浓度范围内未有明显的荧光峰,其认为—NO<sub>2</sub> 可降低苯环的荧光特性是由于硝基苯的 n → π<sup>\*</sup> 跃迁属于禁戒跃迁,产生的激发态分子数较少,且系间窜越作用加强,使荧光减弱。—COOH 同样为吸电子基团,理论上 1-芘甲酸荧光信号应低于芘,但在水溶液中 1-芘甲酸其荧光信号略高于芘,这可能是由于 pH=7 大于 1-芘甲酸的 pK<sub>a</sub> 值,致羧基对芘环的吸电子诱导效应下降;当 pH=3 小于 1-芘甲酸的 pK<sub>a</sub> 值,此时水作为氢键受体抑制了芘环到吸电子基团(—COOH)上的激发态电荷转移作用[图 3(c)]。1-溴芘荧光信号仅为芘的 0.029 倍(pH=7 时),表明—Br 大大削弱了芘环的荧光性能。芳烃取代上卤素(Cl,

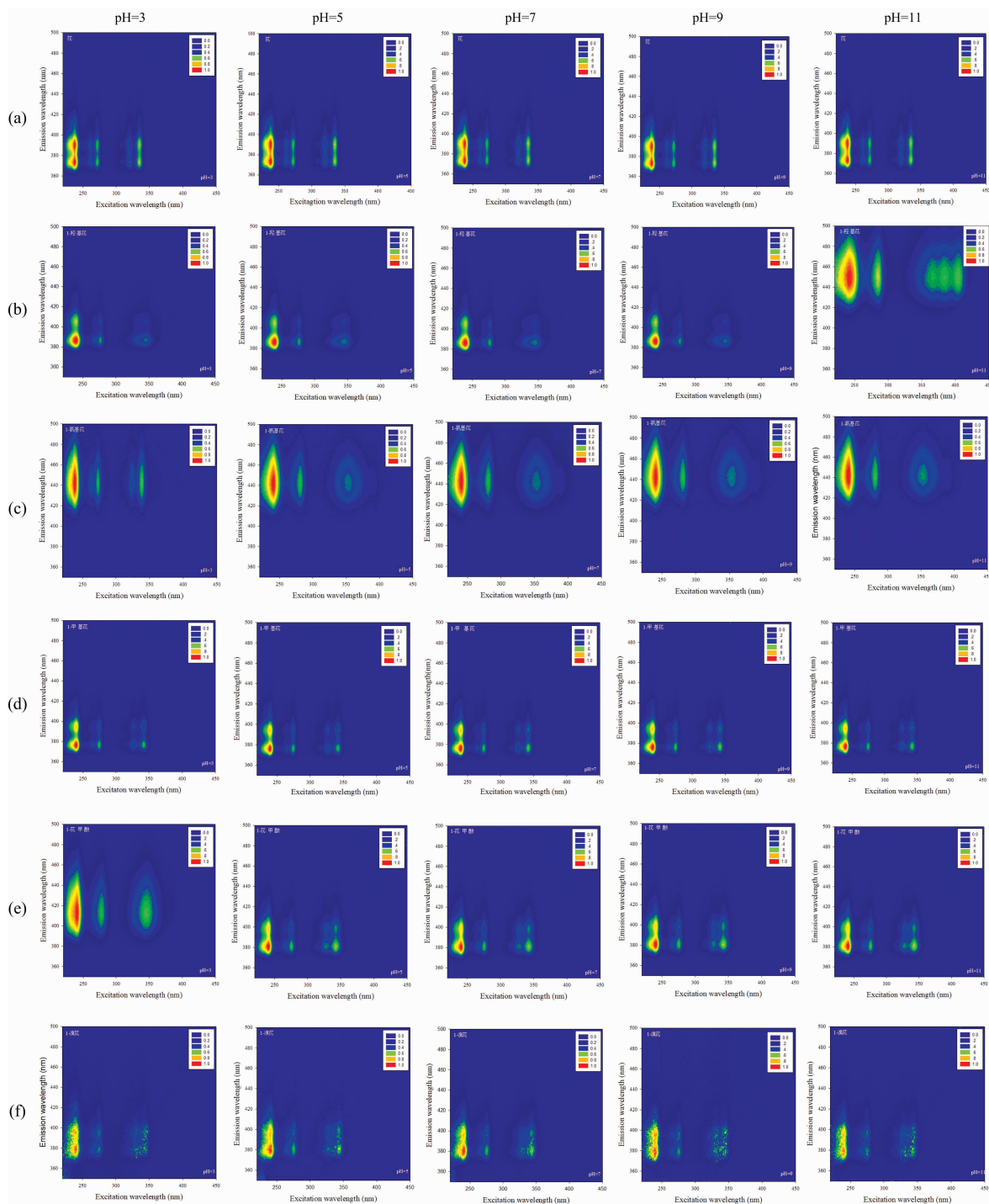


图 1 (a) 芘、(b) 1-羟基芘、(c) 1-氨基芘、(d) 1-甲基芘、(e) 1-芘甲酸和 (f) 1-溴芘在不同 pH 条件下三维荧光光谱  
 Fig. 1 Three-dimensional fluorescence spectra of (a) Pyrene, (b) 1-Hydroxypyrene, (c) 1-Aminopyrene, (d) 1-Methylpyrene, (e) 1-Pyrenecarboxylic acid and (f) 1-Bromopyrene under different pH conditions

Br 和 I 等重原子后, 分子内共轭效应 (+E) 小于诱导效应 (-I), 导致共轭体系电子云密度下降。重原子可增强荧光分子中电子自旋轨道耦合作用,  $S_1 \rightarrow T_1$  的系间交叉跃迁速率增加, 使得荧光强度减弱, 磷光强度增强。

1-羟基芘、1-氨基芘和 1-芘甲酸与水之间的氢键的几何优化、振动频率和单点能均由密度泛函理论 (density func-

tional theory, DFT) 计算获得。其中, 几何优化和振动分析在 M06-2X/def2-SVP 水平下进行, 并通过 SMD 溶剂化模型考虑水的溶剂化作用; 单点能计算在 M06-2X/def2-TZVP 下完成<sup>[12-14]</sup>。DFT 计算用 Gaussian 9.0 软件完成。1-羟基芘、1-氨基芘和 1-芘甲酸与水之间的氢键键长分别为 1.74, 1.94 和 1.57 Å, 键能分别为 -8.8, -5.2 和 -5.4 kcal · mol<sup>-1</sup>。

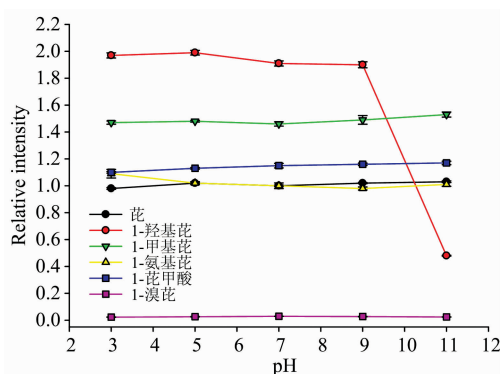


图 2 PAHs 在不同 pH 条件下相对荧光强度

Fig. 2 The relative fluorescence intensity of PAHs under different pH conditions

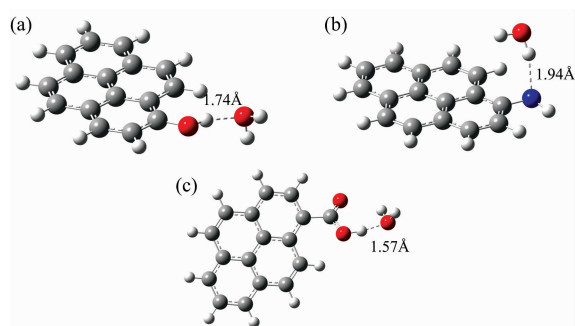


图 3 (a)1-羟基芴、(b)1-氨基芴和(c)1-芴甲酸与水结合的复合物结构

Fig. 3 The complex structure of (a) 1-Hydroxyfluorene, (b) 1-Aminofluorene and (c) 1-Pyrenecarboxylic acid with water

### 2.2.2 pH 对荧光峰强度影响规律

由图 2 可知, 相同浓度下芴及 1-甲基芴的荧光强度在 pH 为 3~11 时波动较小, 表明 pH 对两者的荧光强度无显

著影响。1-羟基芴在 pH 为 3~9 时, 荧光强度高且稳定; 而在 pH 为 11 时, 其荧光信号急剧下降, 与 pH 对苯酚荧光强度的影响一致, 这主要由于在该 pH 条件下 1-羟基芴分子发生了离解反应形成了离子态, 表明—OH 的结构形态是影响 1-羟基芴和苯酚荧光特性的重要因素。1-氨基芴荧光信号在 pH 为 5~11 时略低于 pH=3 时, 而 1-芴甲酸在 pH 为 5~11 时略高于其在 pH 为 3 时的荧光信号。此外, 已有研究表明苯胺在 pH<4 时, 几乎无荧光; 在 pH 为 6~8 时, 有较强荧光信号; 当 pH>8 时, 其荧光强度逐渐减小<sup>[15]</sup>。综上, pH 对含不同取代基荧光物质荧光特性的影响不仅与取代基有关, 还与其母体结构有关。

## 3 结 论

水溶态芴衍生物荧光光谱特性与其取代基结构及溶液 pH 有关。—OH, —CH<sub>3</sub>, —NH<sub>2</sub>, —COOH 及—Br 均使得芴环荧光峰位置发生不同程度的红移; 给电子基团—OH, —CH<sub>3</sub> 可增强芴环分子的荧光效率, 但给电子基团—NH<sub>2</sub> 对芴环荧光强度影响并不明显; 吸电子基团—NO<sub>2</sub> 及与重原子取代基—Br 可降低芴环分子的荧光效率, 但吸电子基团—COOH 可小幅度增加芴环分子的荧光效率。pH 在 3~11 范围内其对芴、1-甲基芴及 1-溴芴的荧光峰位置及荧光强度无显著影响; 在 pH=11 时, 1-羟基芴分子发生离解反应形成了离子态, 使得其荧光峰红移, 且荧光强度显著下降。1-氨基芴和 1-芴甲酸上的—NH<sub>2</sub> 和—COOH 在 pH=3 条件下发生质子化作用, 使得 1-氨基芴和 1-芴甲酸荧光峰分别较 pH≥5 时发生蓝移和红移; 1-氨基芴荧光强度在 pH=3 时略高于 pH≥5, 而 1-芴甲酸荧光强度在 pH=3 时略低于 pH≥5。未来工作中, 我们还需关注取代基对不同母环 PAHs 荧光光谱特性影响规律, 可为 PAHs 原位荧光检测方法的建立提供重要基础依据。

## References

- [1] Dominguez J J A, Bacosa H P, Chien M-F, et al. *Chemosphere*, 2019, 234: 789.
- [2] Johnson W, Idowu I, Francisco O, et al. *Chemosphere*, 2018, 202: 9.
- [3] Hayakawa K. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Behavior and Toxicity in East Asia*. Singapore: Springer Singapore, 2018. 3.
- [4] Jin R, Zheng M H, Lammel G, et al. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2021, 76: 100803.
- [5] Liu Y Z, Yang C H, Cheng P J, et al. *Environmental Pollution*, 2016, 210: 211.
- [6] Nalin F, Sander L C, Wilson W B, et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(3): 1123.
- [7] Gui E Z M, Bazan C, Martinez L D, et al. *Microchemical Journal*, 2018, 139: 164.
- [8] Yang R F, Zhao N J, Xiao X, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 199: 80.
- [9] Zhang J, Chen L F, Liu D, et al. *Talanta*, 2018, 186: 497.
- [10] Yang T H, Cheng H M, Wang H H, et al. *Chemosphere*, 2019, 218: 157.
- [11] WANG Bi, XI Hong-bo, ZHOU Yue-xi, et al (王碧, 席宏波, 周岳溪, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2017, 37(12): 3763.
- [12] Zhao Y, Schultz N E, Truhlar D G. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2006, 2(2): 364.
- [13] Zhao Y, Truhlar D G. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2008, 120(1): 215.
- [14] Marenich A V, Cramer C J, Truhlar D G. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(18): 6378.

[15] WANG Xiu-zhong(王修中). Guangzhou Chemical Industry (广州化工), 2011, 39(17): 75.

## Influences of Substituents and pH on Fluorescence Characteristics of Water-Soluble Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

WU Wei<sup>1,2</sup>, FU Yu<sup>1,2</sup>, REN Jun-li<sup>3</sup>, MIAO Shi-chao<sup>1,2</sup>, GUO Yuan-ming<sup>2</sup>, YANG Cheng-hu<sup>1,2\*</sup>

1. Marine and Fishery Institute of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China

2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Key Laboratory of Sustainable Utilization of Technology Research for Fisheries Resources of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China

3. Zhejiang Zhonglan Environmental Technology Co., Ltd., Wenzhou 325000, China

**Abstract** In the range of pH at 3~11, the fluorescence spectra of water-soluble ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) pyrene and substituted polycyclic aromatic hydrocarbons (S-PAHs) including 1-hydroxypyrene, 1-aminopyrene, 1-methylpyrene, 1-pyrenecarboxylic acid, 1-bromopyrene and 1-nitropyrene were measured by three-dimensional fluorescence spectroscopy. The influences of various substituents and solution pH on the fluorescence properties of seven kinds of PAHs were explored. The results showed that the fluorescence peak and fluorescence intensity of the pyrene ring were dependent on the substituent structure. The substituents of —OH, —NH<sub>2</sub>, —CH<sub>3</sub>, —COOH, and —Br can cause varying degrees of red shift in the excitation wavelength and emission wavelength of the pyrene ring. Meanwhile, the fluorescence intensities of 1-hydroxypyrene and 1-aminopyrene were higher than those of pyrene, which is mainly because the electron-donating group —OH, —CH<sub>3</sub> can increase the conjugated  $\pi$  electron cloud density on the pyrene ring, and then reduce the ground state excitation energy and increase the fluorescence efficiency of the fluorescence molecule. The electron-withdrawing group —NO<sub>2</sub> and heavy atom substituent —Br have a strong inductive effect, leading to decrease the electron cloud density on the pyrene ring conjugation system and reduce the fluorescence efficiency of the fluorescence molecule. The electron-donating group —NH<sub>2</sub> has no obvious effect on the fluorescence intensity of the pyrene ring, while the electron-withdrawing group —COOH could sluggishly increase the fluorescence efficiency of the pyrene ring. Under this experimental condition, there were no significant effects of pH on the fluorescence peak position and fluorescence intensity of pyrene, 1-methylpyrene and 1-bromopyrene. Compared with  $\text{pH} \leq 9$ , the maximum fluorescence peak of 1-hydroxypyrene was redshifted at  $\text{pH} = 11$ , and the fluorescence intensity decreases significantly. In addition, the effects of pH on the fluorescence properties of 1-aminopyrene and 1-pyrenecarboxylic acid were also observed clearly. The fluorescence peaks of 1-aminopyrene and 1-pyrenecarboxylic acid were blueshifted and redshifted respectively, owing to the protonation effect at  $\text{pH} = 3$ . The fluorescence intensity of 1-aminopyrene at  $\text{pH} = 3$  was slightly greater than that of  $\text{pH} \geq 5$ , while the fluorescence intensity of 1-pyrenecarboxylic acid at  $\text{pH} = 3$  was slightly lower than that of  $\text{pH} \geq 5$ . These studies are of great significance to the establishment of S-PAHs fluorescence analysis method and in situ determination of S-PAHs in the water environment.

**Keywords** Polycyclic aromatic hydrocarbons; Substituent; pH; Water-soluble; Fluorescence spectra

(Received Oct. 18, 2019; accepted Feb. 12, 2020)

\* Corresponding author