

文章编号: 0379-1726(2004)03-0301-08

## 腐殖酸三维荧光光谱特性研究

傅平青<sup>1,2</sup>, 刘丛强<sup>1</sup>, 尹祚莹<sup>1</sup>, 吴丰昌<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 腐殖质的荧光特性被广泛用来解析其在各种自然环境中的来源及分布。由于荧光光谱分析具有灵敏度高, 选择性好, 且不破坏样品结构的优点, 非常适合用来研究腐殖质的结构和官能团等特征。利用三维荧光激发-发射光谱研究了 Fluka 腐殖酸的荧光光谱特性, 结果显示, 离子强度 (0~0.05 mol/L KClO<sub>4</sub>) 对 Fluka 腐殖酸的三维荧光光谱特性影响非常小, 而腐殖酸的浓度 (5~100 mg/L) 和溶液 pH (2~12) 对其三维荧光光谱特性影响显著。当腐殖酸浓度增大时, 荧光峰出现明显红移现象。荧光强度一般随着 pH 的升高而增大, 当 pH 大于 10 后呈下降趋势, 我们从垃圾渗滤液溶解有机质的实验结果中也得到相同结论; 在浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L 的 Fluka 腐殖酸中, 荧光峰 B (fulvic-like) 的荧光强度却在 pH = 5.0 左右时达到最大值, 与前人报道的土壤富里酸的行为一致, 质子化常数  $\lg K'_{HL}$  分别为 3.57 和 3.13, 与二羧基化合物接近, 说明荧光峰 B 可能与 Fluka 腐殖酸结构中的羧基有关; 荧光峰 A 与荧光峰 B 的荧光强度比值  $r_{(A/B)}$  在 0.61~2.59 之间, 并且在 pH = 2~11 范围内,  $r_{(A/B)}$  与 pH 具有较好的线性相关关系, 表明荧光峰 A 和荧光峰 B 随着 pH 值的改变有着相同的变化趋势。

**关键词:** Fluka 腐殖酸; 溶解有机质; 三维荧光光谱; 荧光特性

**中图分类号:** P593; O657.39 **文献标识码:** A

## 0 引言

腐殖质 (humic substances; HS) 作为自然界中最丰富的有机质, 普遍存在于土壤、水体 (如湖泊、河流、海洋和地下水等) 以及沉积物中<sup>[1-5]</sup>。在水环境中, 腐殖质是溶解有机质 (dissolved organic matter; DOM) 的主要组分。由于腐殖质所带的配位基团能够强烈络合金属离子, 对有毒重金属元素的浓度、化学形态和生物有效性、以及营养元素的循环过程起着极其重要的作用, 并且腐殖质还能通过其官能团键合离子性或极性有机化合物、通过分子间的范德华力与疏水有机物结合, 所以对腐殖质结构和官能团特征的研究显得非常重要<sup>[6,7]</sup>。这些研究有助于我们更好地了解它们与重金属离子、放射性核素之间的配位作用、氧化还原作用、沉降作用等内在机理, 以及对污染金属离子、营养元素和有机污染物的地球化学行为的影响。

随着分析化学的进展, 尤其是核磁共振

(NMR)<sup>[8,9]</sup>、红外光谱 (FT-IR)<sup>[10,11]</sup>、固定金<sup>3+</sup>离子亲和色谱 (IMAC)<sup>[12-15]</sup> 和高效体积排阻色谱 (HPSEC)<sup>[16-18]</sup> 等仪器分析方法及手段的发展, 人们对腐殖质的化学结构以及各种环境行为有了更多的了解。而应用荧光光谱技术研究腐殖质是基于其结构中含有大量带有各种官能团的芳香环结构以及未饱和脂肪链 (物质之所以具有荧光是由于其结构中具有低能量  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁的芳香结构或共轭生色团)。并且由于荧光光谱技术具有灵敏度高 ( $10^{-9}$  数量级), 选择性好, 且不破坏样品结构的优点, 非常适合用来研究腐殖质的化学和物理性质<sup>[1,19-21]</sup>。目前各种荧光光谱技术如荧光激发光谱、荧光发射光谱、同步荧光光谱 (synchronous fluorescence spectroscopy; SFS) 以及三维荧光光谱 (亦称总发光光谱或激发-发射矩阵图, three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy; 3DEEM) 被广泛用于定性或定量描述腐殖质的物理化学特性<sup>[1,2,6,13,14,21-31]</sup>。腐殖质内含有几种不同的荧光基团, 其荧光特性包含了与结构、官能团、构型、非均质

收稿日期: 2003-06-19; 接受日期: 2004-03-10

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (2002CB412300); 中国科学院“百人计划”项目; 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-105)

作者简介: 傅平青 (1974-), 男, 博士研究生, 环境地球化学专业。E-mail: pqufu@mail.gyig.ac.cn

\* 通讯作者, E-mail: fcwu@hotmail.com

性、分子内与分子间的动力学特征等有关的信息<sup>[1, 22, 23]</sup>。3DEEM 能够获得激发波长和发射波长同时变化时的荧光强度信息, 并且可对多组分复杂体系中荧光光谱(激发/发射, Ex/Em)重叠的对象进行光谱识别和表征, 是一种很有用的光谱指纹技术<sup>[2]</sup>。本文拟通过研究 Fluka 腐殖酸(Fluka HA)的 3DEEM 特性及其与浓度、离子强度、pH 值之间的关系, 为准确描述腐殖质这一自然界最为复杂的天然有机物提供有用的结构和官能团特征, 以期揭示其在环境中的各种地球化学行为。

## 1 实验样品与仪器

本实验所用腐殖酸为 Fluka humic acid (Sigma-Aldrich), 样品在使用前未加提纯(因为提纯过程会影响其固有的荧光特性), 使用 0.01 mol/L KOH 溶解, 再用 GF/F 玻璃纤维滤膜(Whatman, U. K.) (预先于 450 °C 灼烧 5 min) 过滤后测定荧光强度。所用化学试剂均为优级纯或分析纯。配制溶剂等所有实验用水均为 Milli-Q 超纯水 (Millipore, 18.2 MΩ·cm)。

本文主要进行 pH 值、离子强度和腐殖酸浓度效应的研究。浓度及 pH 值效应: 配制 4 种浓度 (5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L) 的 Fluka HA 溶液(离子强度 0.01 mol/L KClO<sub>4</sub>), 分别测定 pH = 2 ~ 12 之间(间隔为 1) 的 3DEEMs。离子强度效应: 配制浓度为 50 mg/L 的 Fluka HA 溶液(离子强度分别为 0 mol/L、0.005 mol/L、0.01 mol/L 和 0.05 mol/L), 测定其在 pH 约为 2、5、8 和 11 时的 3DEEMs。样品 pH 值均使用 0.1 mol/L、1.0 mol/L KOH 和 0.1 mol/L、1.0 mol/L HClO<sub>4</sub> 溶液, 并采用 10 μL 色谱进样器(最小刻度 0.2 μL) 调节。pH 从 2 调节到 12 左右, 总共在 20 mL HA 溶液中加入酸碱的量不超过 100 μL, 以便减小浓度稀释效应。使用奥立龙 818 型 pH 计(每次使用前均用 pH = 4.00、6.86 和 9.18 标准缓冲溶液进行两点校正) 测定 pH 值。

3DEEM 测定在 Hitachi F-4500 型荧光光谱分析仪上完成。使用 150-W 氙弧灯为激发光源, PMT 电压: 700 V; 带通 (bandpass): Ex = 5 nm, Em = 10 nm; 扫描波长范围: Ex = 280 ~ 480 nm, Em = 370 ~ 570 nm; 响应时间: 自动; 扫描速度: 1 200 nm/min; 扫描光谱进行仪器自动校正。样品在装入 1 cm 石英荧光样品池测定前保持温度恒定 [恒温水浴 (20 ±

1) °C]。使用 SigmaPlot 软件进行 3DEEM 数据处理。

## 2 实验结果与讨论

最早, 土壤学家应用传统荧光光谱技术区分不同来源腐殖酸, 但腐殖酸的荧光激发或发射光谱通常表现为宽而无特征的荧光峰<sup>[1]</sup>。近十几年来, 海洋化学家<sup>[2, 3, 32, 33]</sup> 首先应用 3DEEM 分析海洋溶解有机质的组成, 发现其中含有几种不同荧光基团。另外, 人们对河流、湖泊、湿地及沼泽中的溶解有机质, 土壤腐殖质, 洞穴滴水、珊瑚礁中有机质等的研究表明, 不同来源的溶解有机质或腐殖质具有不同的荧光基团, 并且荧光峰的位置和荧光强度也不尽相同<sup>[3, 26, 28 ~ 30, 34, 35]</sup>。一般而言, 天然环境中各种溶解有机质的 Ex/Em 荧光峰位置可概述如下: Class I (Ex 约为 350 ~ 440 nm, Em 约为 430 ~ 510 nm); Class II (Ex 约为 310 ~ 360 nm, Em 约为 370 ~ 450 nm); Class III (Ex 约为 260 ~ 290 nm, Em 约为 300 ~ 350 nm); Class IV (Ex 约为 240 ~ 270 nm, Em 约为 370 ~ 440 nm)。其中 Class I 为类腐殖酸荧光(humic-like), Class II 与 Class IV 为类富里酸荧光(分别称为 visible fulvic-like and UV fulvic-like), Class III 为类蛋白荧光(protein-like)<sup>[2, 12, 14, 30, 36]</sup>。由于微生物来源的 DOM 具有强烈的类蛋白荧光, 而陆源腐殖酸的荧光峰主要出现在 Class I 和 Class II 位置, 这样我们就可利用 3DEEM 区分 DOM 的来源及组成。

本文对 Fluka HA 的 3DEEM 表征主要基于等高线图、荧光峰数目、Ex/Em 峰位置及荧光强度、Class I 与 Class II 荧光峰的荧光强度比值  $r_{(A/B)}$  等。

### 2.1 腐殖酸荧光光谱特性的浓度效应

Mobed *et al.*<sup>[22]</sup> 报道, 水体富里酸 (fulvic acid; FA) 浓度在 5 mol/L、50 mol/L 和 100 mg/L 时(离子强度 0.01 mol/L KCl) 的荧光特性并没有显著差别, 认为这种现象可能是由于相对较低的离子强度所造成, 也可能是不同来源的腐殖质对于腐殖质分子之间的聚集作用 (aggregation) 表现出不同的光谱效应。之前 Lochmüller *et al.*<sup>[37]</sup> 发现商品富里酸在高浓度时可能发生聚集作用使光谱特性发生改变。

为了充分检验 Fluka HA 的荧光光谱特性与浓度之间的关系, 我们配制 4 种浓度 (5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L) 的腐殖酸溶液, pH 分别为 6.0 和 10, 离子强度均为 0.01 mol/L KClO<sub>4</sub> (图 1)。当腐殖酸浓度为 5 mg/L 时, 最大的 Ex/Em 都出现

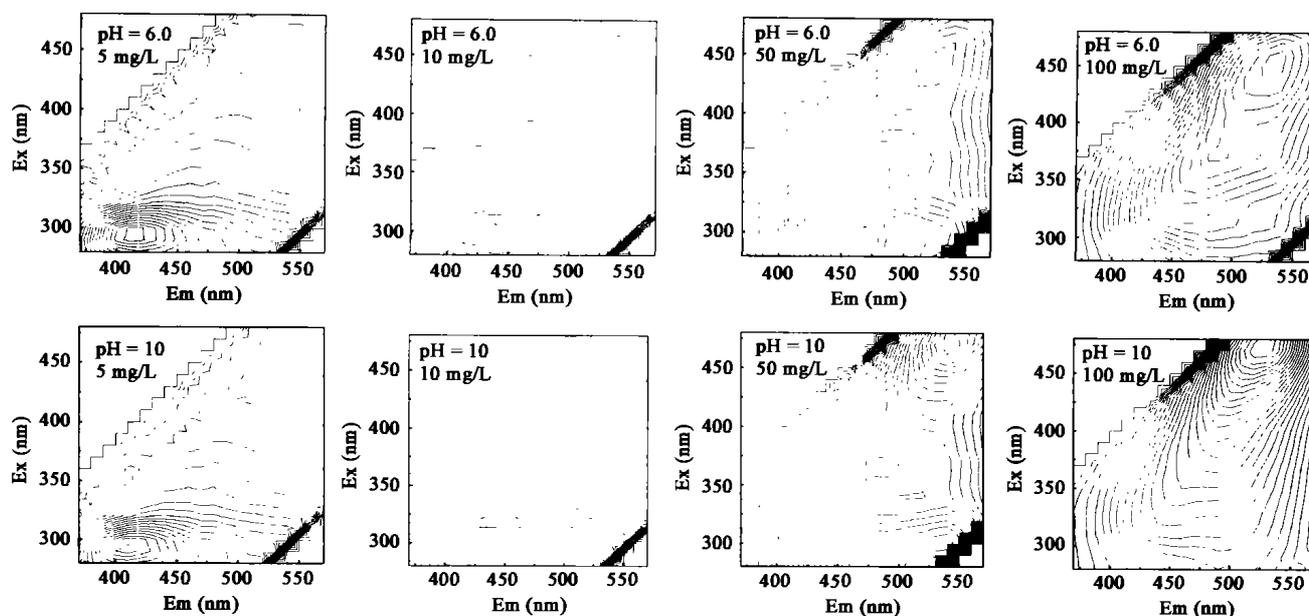


图 1 不同浓度 Fluka HA 的 3DEEMs

Fig. 1 3DEEMs of Fluka humic acid at different concentrations  
pH = 6.0 and 10; 0.01 mol/L KClO<sub>4</sub>.

在 310/415 nm。随着腐殖酸浓度增大,最大 Ex/Em 峰位置红移至 460/540 nm。进一步分析这些谱图可以发现,其实每个谱图都有一些肩峰(shoulder peaks)存在。不难理解,肩峰是由于腐殖酸分子中含有多种荧光基团造成的。腐殖酸浓度发生变化时,将导致腐殖质的荧光内滤效应,荧光猝灭及能量转换等过程的差异<sup>[3]</sup>,在三维荧光光谱图上就表现为 Ex/Em 峰的红移(或蓝移)现象。从图 1 还可以看出,同一浓度腐殖酸在 pH = 10 时比 pH = 6.0 时的 Ex/Em 值略微红移。腐殖酸浓度为 10 mg/L 时,碱性条件下明显出现 Ex/Em = 460/550 nm 荧光峰,而在酸性条件下时不明显。

## 2.2 离子强度对荧光光谱的影响

关于离子强度对腐殖质荧光光谱影响的报道并不多。Ghosh *et al.*<sup>[38]</sup>指出,土壤富里酸的荧光激发光谱强度在离子强度为 0.001 ~ 0.1 mol/L NaCl 范围内随离子强度增大而减小。在本实验中,离子强度范围在 0 ~ 0.05 mol/L KClO<sub>4</sub> 之间, pH 值分别为 2.0、5.0、8.0 和 11 时,离子强度对 Fluka HA 的 3DEEM 影响并不大(见图 2)。从图 2 我们还发现,当 pH = 2.0,离子强度为 0 mol/L KClO<sub>4</sub> 时, Ex/Em = 325/450 nm,而增大到 0.05 mol/L KClO<sub>4</sub> 时, Ex/Em = 330/460 nm。而在 pH = 5.0、8.0 和 11 时,没有发现荧光峰位置红移现象。所以,我们可以得出结论:腐殖质的 3DEEM 特性与离子强度关系不

大。这与 Senesi<sup>[11]</sup> 的报道相吻合:在 pH > 4.5 时,离子强度对富里酸的荧光特性没有影响。Mobed *et al.*<sup>[22]</sup> 也指出,离子强度(0 ~ 1 mol/L KCl)对水体腐殖酸和土壤来源腐殖酸的 3DEEM 没有显著影响,只观察到水体富里酸有一个小的荧光峰随着离子强度增大,峰位置略微红移。

## 2.3 溶液 pH 值对腐殖酸荧光特性的影响

研究<sup>[11, 2, 19, 39]</sup>表明,溶解有机质(包括腐殖质)的荧光强度随着 pH 值升高而增大。荧光光谱的这种变化与有机大分子结构中的酸性基团(如苯酚基团)以及自身的分子构型随着 pH 的改变有关<sup>[2, 40, 41]</sup>。酚羟基浓度越高, pH 值对荧光强度的影响越大。Ghosh *et al.*<sup>[38]</sup>认为在高 pH 时腐殖质分子呈线性结构,当 pH 下降时分子发生卷曲。Au *et al.*<sup>[42]</sup> 通过实验证实,在中性和碱性 pH 条件下,由于腐殖质分子之间的排斥作用其构型拉伸为线性。这样就有更多的荧光基团裸露到溶液中,使荧光强度增强。

图 3 显示,当 Fluka HA 浓度为 5 mg/L 和 10 mg/L 等低浓度时, pH 值的变化没有引起 Ex/Em 峰位置的显著改变,只是荧光强度随着 pH 值的升高而增大(图 4a),当 pH > 10 时,浓度为 5 mg/L 的 Fluka HA 荧光强度随之下落,而浓度为 10 mg/L 的 Fluka HA 荧光强度变化不大。从整个 pH 范围来看,低浓度腐殖酸的荧光强度在 pH = 4 ~ 10 区间内保持相对稳定。前人对湖泊 DOM<sup>[24]</sup>(图 4c)、海洋

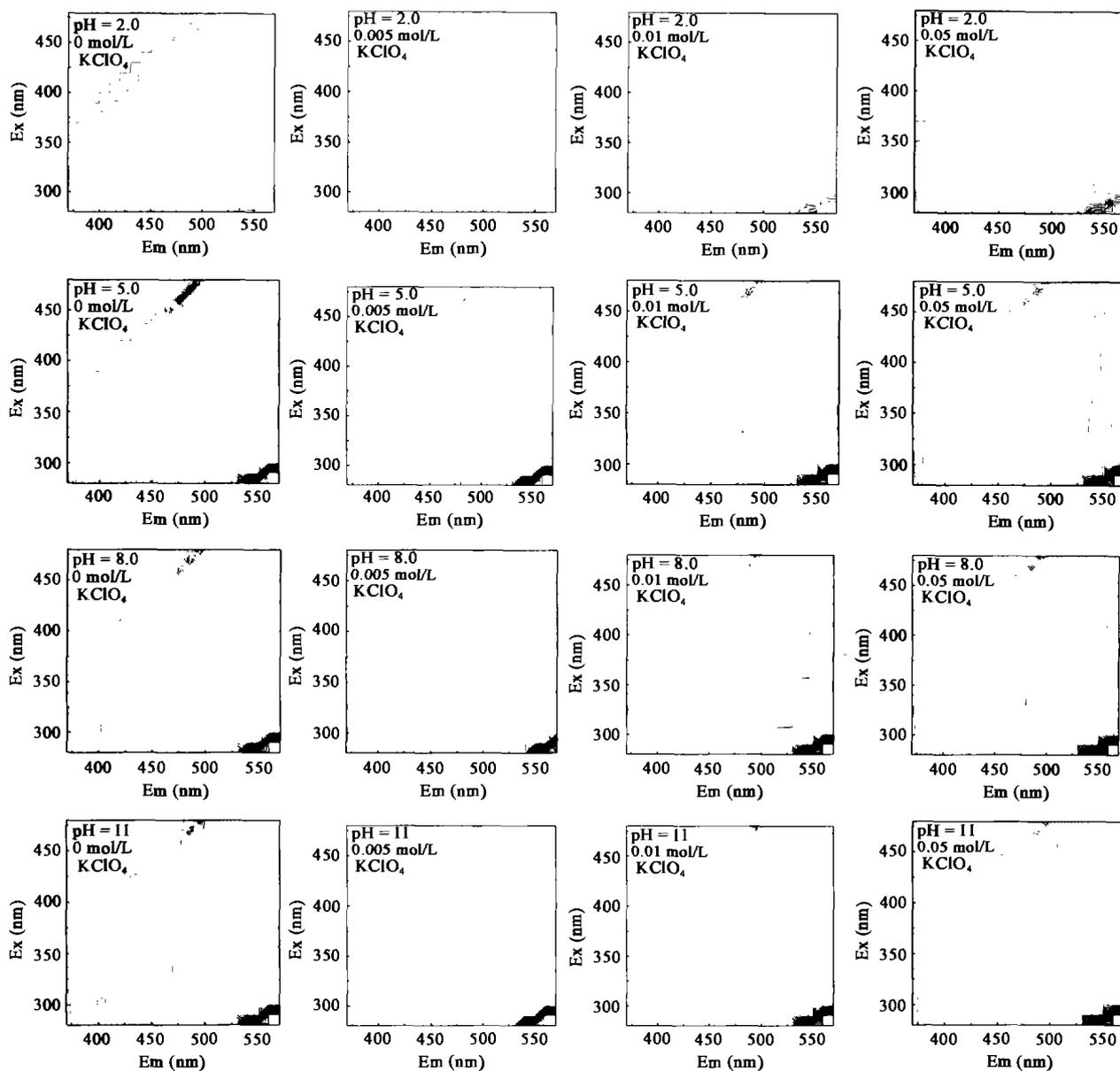


图 2 不同离子强度和 pH 条件下 HA 的 3DEEMs (50 mg/L)

Fig. 2 3DEEMs of Fluka humic acid at different ionic strengths and different pHs (50 mg/L)

DOM<sup>[43]</sup>、标准腐殖质<sup>[20]</sup>、珊瑚有机质和 Aldrich HA<sup>[3]</sup>的研究也得到类似的实验结果。我们使用垃圾渗滤液 DOM 研究其荧光强度与 pH 值关系时,也可以看到荧光强度随着 pH 升高而逐渐增大,到 pH > 10 以后又呈下降趋势(图 4c),只是垃圾渗滤液中 DOC 含量很高(为 85.5 mg/L),稀释 5 倍后其荧光强度依旧达到河流或湖泊溶解有机质荧光强度的 10 倍以上(图 4c)。

当 Fluka HA 浓度为 50 mg/L(图 2), pH = 2.0 时只有一个明显的荧光峰,其 Ex/Em = 330/450 nm。随着 pH 值升高,逐渐出现三个明显的荧光峰: Ex/Em = 470/540 nm、370/470 nm 和 290/500 nm。而且不难发现, Ex/Em = 470/540 nm 的峰位置

随着 pH 值升高发生明显红移。当 Fluka HA 浓度为 100 mg/L 时,在 pH = 2.0 ~ 10 范围内,只出现一个明显的荧光峰。随着 pH 值升高,其荧光峰位置逐渐红移。前人在对 IHSS 标准腐殖质的研究中也发现这种红移现象<sup>[1, 19, 20, 41]</sup>。

我们以荧光峰 A 和荧光峰 B(A: Ex/Em = 470/540 nm; B: Ex/Em = 340/460 nm)来描述高浓度腐殖酸荧光强度与 pH 值的关系,可以看到(图 4b),在酸性条件下,峰 B 的荧光强度略大于峰 A;而在碱性条件时,峰 A 的荧光强度明显大于峰 B,这种情形表现在 3DEEM 中,荧光峰 A 就把荧光峰 B 给掩盖住,似乎只有一个荧光峰存在。有趣的是,我们可以看到荧光峰 B 在 Fluka HA 浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L

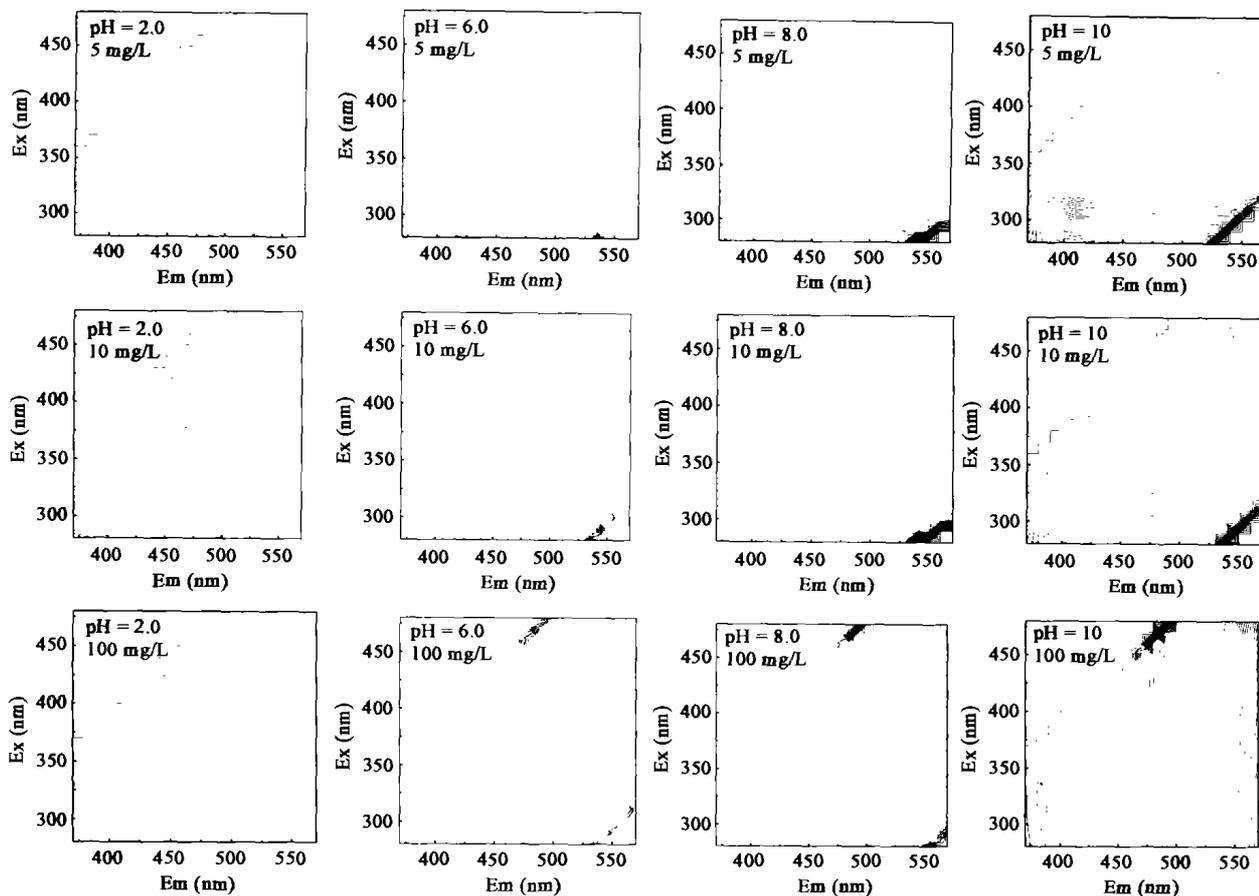


图 3 不同 pH 条件下 Fluka HA 的 3DEEMs (5 mg/L、10 mg/L 和 100 mg/L; 0.01 mol/L KClO<sub>4</sub>)

Fig. 3 3DEEMs of Fluka humic acid at different pHs (5 mg/L, 10 mg/L and 100 mg/L; 0.01 mol/L KClO<sub>4</sub>)

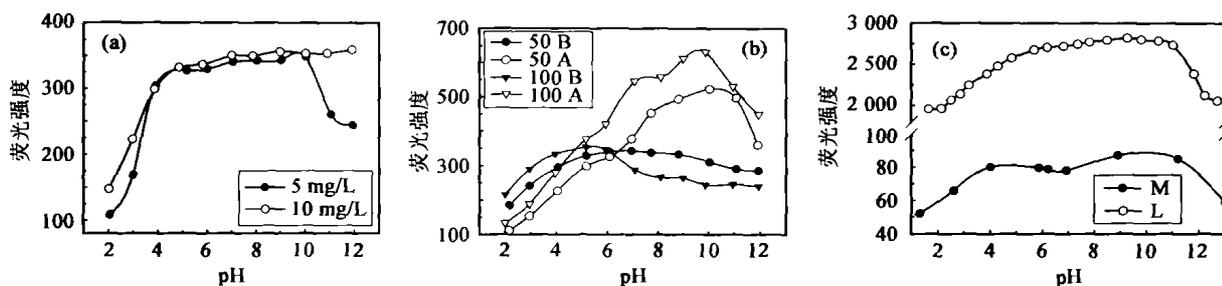


图 4 不同浓度 Fluka HA、湖泊 DOM<sup>[24]</sup>、垃圾渗滤液 DOM 的荧光强度与 pH 的关系 (0.01 mol/L KClO<sub>4</sub>)

Fig. 4 Effect of pH on fluorescence at different concentrations of Fluka humic acid (0.01 mol/L KClO<sub>4</sub>)

图 4b 中: 50B 表示 50 mg/L(B); 50A 表示 50 mg/L(A); 100B 表示 100 mg/L(B); 100A 表示 100 mg/L(A)。

图 4c 中: M 表示 Mary 湖 DOM; L 表示垃圾渗滤液 DOM

时,其荧光强度最大值出现在 pH 约为 5.0 处,而不像其他溶解有机质的荧光强度最大值出现在 pH = 10 左右,这与 Saar *et al.*<sup>[44]</sup>的研究相吻合。他们在研究 pH 值对水体富里酸和土壤富里酸的荧光发射光谱影响时发现,其最大荧光强度值也出现在 pH = 5.0。而在本文中,荧光峰 B (Ex/Em = 340/460 nm) 恰好属于类富里酸荧光。而且,在 pH = 5.0 ~ 12 范围内,荧光峰 B 的荧光强度呈略微下降趋势。有报道<sup>[11]</sup>说土壤富里酸的同步荧光光谱在 pH = 4.5 ~ 10

范围内也呈下降趋势,而河流富里酸和泥炭富里酸的荧光强度则呈略微上升趋势。这种情况表明,可以利用荧光峰 B 的荧光强度随 pH 值的变化规律来判断腐殖质的来源。Mobed *et al.*<sup>[22]</sup> 则通过实验指出,可以用 pH = 10 时的 3DEEM 来区分不同来源的富里酸;而区分水体和土壤腐殖酸的最佳 pH 值为 6.0。

此外,吴丰昌等<sup>[14]</sup>为表征荧光峰与官能团之间的联系,研究了日本琵琶湖支流水体中铜有机配位

体荧光强度与 pH 之间的关系。实验结果显示, 荧光峰 A ( $Ex/Em = 320/444 \text{ nm}$ ) 和荧光峰 B ( $Ex/Em = 235/434 \text{ nm}$ ) 的荧光强度最大值也出现在  $pH = 5$  左右, 在  $pH \leq 5$  区间内, 荧光强度随着 pH 值降低而降低, 说明酸性基团在起作用。并且, 在低 pH 值区间, 荧光强度随着 pH 降低而减小这种现象可以用于计算某种官能团的质子化常数 (protonation constant)  $\lg K'_{HL}$ <sup>[14, 45]</sup>:

$$\lg \left[ \frac{(FL_{H-pH} - FL)}{(FL - FL_{L-pH})} \right] = \lg K'_{HL} - pH \quad (1)$$

式中:  $FL_{H-pH}$  为低 pH 值区间最高 pH 时的荧光强度,  $FL_{L-pH}$  为低 pH 值区间最低 pH 时的荧光强度。根据式 (1) 和图 4b, 可以算出 Fluka HA 浓度分别为 50 mg/L 和 100 mg/L 时, 其荧光峰 B 的质子化常数  $\lg K'_{HL}$  分别为 3.57 和 3.13, 与通常二羧基化合物的  $\lg K'_{HL}$  值 (2.5 ~ 4.3) 相接近<sup>[14]</sup>, 表明荧光峰 B 可能与 Fluka HA 结构中的羧基有关。

#### 2.4 荧光峰 A 和荧光峰 B 比值 $r_{(A/B)}$

在图 4b 中, 荧光峰 A 和荧光峰 B 的荧光强度以  $I_A$  和  $I_B$  表示, 定义  $r_{(A/B)} = I_A / I_B$ 。由于  $r_{(A/B)}$  被认为是一个有机质结构和成熟度的指标<sup>[39]</sup>, 并且与分子大小、溶液 pH 等有关, 我们也对 Fluka HA 的  $r_{(A/B)}$  值感兴趣。从实验结果得出, 当 Fluka HA 浓度为 50 mg/L 时,  $r_{(A/B)}$  在 0.61 ~ 1.71 之间; 当 Fluka HA 浓度为 100 mg/L 时,  $r_{(A/B)}$  在 0.62 ~ 2.59 之间, 这些  $r_{(A/B)}$  值与其他研究者的结果<sup>[2, 39, 46]</sup> 相接近。例如, 据 Coble<sup>[2]</sup> 的研究, 蛋白黑素 (melanoidin)  $r_{(A/B)}$  为 0.88, 黑海水样  $r_{(A/B)}$  为 1.74; 据 De Souza Sierra *et al.*<sup>[46]</sup> 的研究, 滨海水体  $r_{(A/B)}$  为 1.8, 公海水样  $r_{(A/B)}$  为 2.6, 但是他们都没有研究 pH 对  $r_{(A/B)}$  的影响。事实上, 荧光强度以及  $r_{(A/B)}$  强烈依赖于 pH, 若要比不同来源腐殖质的  $r_{(A/B)}$ , 必须在 pH 相等的条件下才能进行。

Patel-Sorrentino *et al.*<sup>[39]</sup> 研究了 pH 对河流有机质  $r_{(A/B)}$  的影响, 发现在  $pH = 2 \sim 12$  范围内, pH 与  $r_{(A/B)}$  之间具有很好的线性关系。并且  $r_{(A/B)}$  在 0.81 ~ 2.27 之间。我们对 Fluka HA 的研究结果也显示 (图 5), 当 HA 浓度为 50 mg/L 时,  $R^2$  为 0.98; 当 Fluka HA 浓度为 100 mg/L 时,  $R^2$  为 0.91, 说明  $r_{(A/B)}$  与 pH 之间的确具有线性关系。从图 5b 还可以发现, 当  $pH \leq 10$  时, 这种线性相关性更好, 当  $pH > 10$  时, 由于腐殖酸浓度较高, 其荧光内滤效应造成了  $r_{(A/B)}$  下降。上述结果表明, 当  $pH \leq 10$  时, 荧光峰 A 与荧光

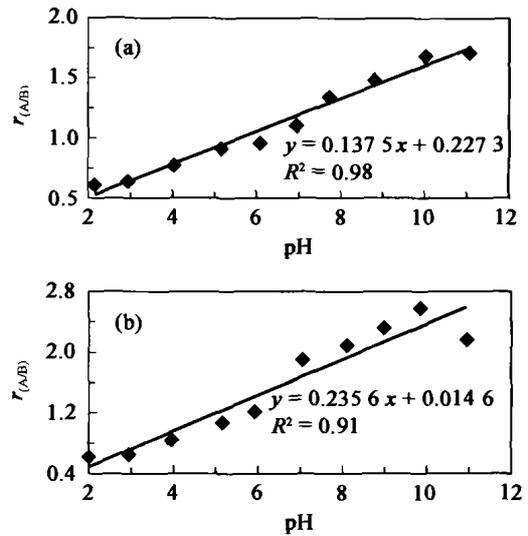


图 5  $r_{(A/B)}$  与 pH 值的关系  
Fig. 5 Correlation between  $r_{(A/B)}$  and pH  
a. 50 mg/L; b. 100 mg/L.

峰 B 随着 pH 值的改变有着相同的变化趋势, 可能预示着荧光峰 A 与荧光峰 B 具有某种类似的结构特征。

### 3 结 语

3DEEM 能够获得腐殖酸中荧光基团完整的光谱信息, 是一种很有价值的光谱指纹技术。本文对 Fluka HA 的 3DEEM 特性进行了系统分析, 实验结果显示, Fluka HA 在低浓度 (5 mg/L 和 10 mg/L) 时只有一个明显的荧光峰, 高浓度 (50 mg/L 和 100 mg/L) 时出现几个荧光峰, 并且发生  $Ex/Em$  红移现象。研究离子强度对 Fluka HA 的 3DEEM 影响时发现, 离子强度对其 3DEEM 影响很小。总体而言, pH (2 ~ 12) 对腐殖酸荧光强度的影响显著, 主要与其结构中酚羟基的电离作用有关。腐殖酸荧光强度随着 pH 升高呈增强趋势, 在  $pH = 10$  时达到最大, 但并没有线性关系, 类富里酸荧光峰强度最大值则出现在  $pH = 5.0$  左右。Fluka HA 浓度分别为 50 mg/L 和 100 mg/L 时, 其荧光峰 B 的质子化常数  $\lg K'_{HL}$  分别为 3.57 和 3.13, 与某些二羧基化合物的  $\lg K'_{HL}$  值 (2.5 ~ 4.3) 非常接近, 说明荧光峰 B 与腐殖酸结构中的羧基有关;  $r_{(A/B)}$  分别在 0.61 ~ 1.71 之间和 0.62 ~ 2.59 之间, 并且在  $pH = 2 \sim 11$  范围内  $r_{(A/B)}$  与 pH 之间具有良好的线性相关关系,  $R^2$  达 0.91 以上, 表明荧光峰 A 和荧光峰 B 随着 pH 的变化有着相同的变化趋势, 揭示了荧光峰 A 与荧光峰 B 具有某种类似的结构特征。

## 参考文献(References):

- [1] 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.
- [2] Coble P G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy [J]. *Mar Chem*, 1996, 51(4): 325 ~ 346.
- [3] Matthews B J H, 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.
- [4] McKnight D M, Aiken G R. Sources and age of aquatic humus [A]. Hessen D O, Tranvik L J. *Aquatic Humic Substances: Ecology and Biogeochemistry* [C]. Berlin: Springer-Verlag, 1998. 9 ~ 39.
- [5] Warren L A, Haack E A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments [J]. *Earth-Sci Rev*, 2001, 54(4): 261 ~ 320.
- [6] Chen J, Gu B, LeBoeuf E J, *et al.* Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions [J]. *Chemosphere*, 2002, 48(1): 59 ~ 68.
- [7] Ritchie J D, Perdue E M. Protion-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 2003, 67(1): 85 ~ 96.
- [8] Hedges J I, Hatcher P G, Ertel J R, *et al.* A comparison of dissolved humic substances from seawater with Amazon River counterparts by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrometry [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1992, 56(4): 1 753 ~ 1 757.
- [9] Peuravuori J, Ingman P, Pihlaja K. Critical comments on accuracy of quantitative determination of natural humic matter by solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy [J]. *Talanta*, 2003, 59(1): 177 ~ 189.
- [10] Elkins K M, Nelson D J. Fluorescence and FT-IR spectroscopic studies of Suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium [J]. *J Inorg Biochem*, 2001, 87(1 ~ 2): 81 ~ 96.
- [11] Kalbitz K, Geyer W, Geyer S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances—A reflection of land use history in a fen area [J]. *Biogeochemistry*, 1999, 47(2): 219 ~ 238.
- [12] Wu F C, Midorikawa T, Tanoue E. Fluorescence properties of organic ligands for copper (II) in Lake Biwa and its rivers [J]. *Geochem J*, 2001, 35(5): 333 ~ 346.
- [13] Wu F C, Tanoue E. Molecular mass distributions and fluorescence characteristics of organic ligands for copper (II) in Lake Biwa, Japan [J]. *Org Geochem*, 2001, 32(1): 11 ~ 20.
- [14] Wu F C, Tanoue E. Isolation and partial characterization of dissolved copper-complexing ligands in streamwaters [J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35(18): 3 646 ~ 3 652.
- [15] Wu F C, Evans R D, Dillon P J. Fractionation and characterization of fulvic acid immobilized metal ion affinity chromatography [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 452(1): 85 ~ 93.
- [16] Chin Y P, Aiken G, O'Loughlin E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances [J]. *Environ Sci Technol*, 1994, 28(11): 1 853 ~ 1 858.
- [17] Alberts J J, Takács M, Egeberg P K. Total luminescence spectral characterization of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC) [J]. *Org Geochem*, 2002, 33(7): 817 ~ 828.
- [18] Wu F C, Evans R D, Dillon P J. High-performance liquid chromatographic fractionation and characterization of fulvic acid [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 464(1): 47 ~ 55.
- [19] Senesi N, Miano T M, Provenzano M R, *et al.* Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy [J]. *Soil Sci*, 1991, 152(4): 259 ~ 271.
- [20] Pullin M J, Cabaniss S E. Rank analysis of the pH-dependent synchronous fluorescence spectra of six standard humic substances [J]. *Environ Sci Technol*, 1995, 29(6): 1 460 ~ 1 467.
- [21] McKnight D M, Boyer E W, Westerhoff P K, *et al.* Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic materials and aromaticity [J]. *Limnol Oceanogr*, 2001, 46(1): 38 ~ 48.
- [22] Mobed J J, Hemmingsen S L, Autry J L, *et al.* Fluorescence characterization of IHSS humic substances: Total luminescence spectra with absorbance correction [J]. *Environ Sci Technol*, 1996, 30(10): 3 061 ~ 3 065.
- [23] Chen J, LeBoeuf E J, Dai S, *et al.* Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions [J]. *Chemosphere*, 2003, 50(5): 639 ~ 647.
- [24] Hall K J, Lee G F. Molecular size and spectral characterization of organic matter in a meromictic lake [J]. *Wat Res*, 1974, 8(4): 239 ~ 251.
- [25] Hautala K, Peuravuori J, Pihlaja K. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses [J]. *Wat Res*, 2000, 34(1): 246 ~ 258.
- [26] Parlanti E, Morin B, Vacher L. Combined 3D-spectrofluorometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters [J]. *Org Geochem*, 2002, 33(3): 221 ~ 236.
- [27] Wolfe A P, Kaushal S S, Fulton J R, *et al.* Spectrofluorescence of sediment humic substances and historical changes of lacustrine organic matter provenance in response to atmospheric nutrient enrichment [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(15): 3 217 ~ 3 223.
- [28] Baker A. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers [J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35(5): 948 ~ 953.
- [29] Baker A. Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(7): 1 377 ~ 1 382.
- [30] Baker A. Fluorescence properties of some farm wastes: Implications for water quality monitoring [J]. *Wat Res*, 2002, 36(1): 189 ~ 195.
- [31] Baker A, Inverarity R, Charlton M, *et al.* Detecting river

- pollution using fluorescence spectrophotometry: Case studies from the Ouseburn, NE England [J]. *Environ Pollut*, 2003, 124(1): 57 ~ 70.
- [32] Coble P G, Green S A, Blough N V, *et al.* Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy [J]. *Nature*, 1990, 348(6300): 432 ~ 435.
- [33] Mopper K, Schultz C A. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components [J]. *Mar Chem*, 1993, 41(1-3): 229 ~ 238.
- [34] Van Beynen P, Bourbonniere R, Ford D, *et al.* Causes of colour and fluorescence in speleothems [J]. *Chem Geol*, 2001, 175(3/4): 319 ~ 341.
- [35] Komada T, Schofield O M E, Reimers C E. Fluorescence characteristics of organic matter released from coastal sediments during resuspension [J]. *Mar Chem*, 2002, 79(2): 81 ~ 97.
- [36] Leenheer J A, Croué J-P. Characterizing aquatic dissolved organic matter [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(1): 19A ~ 26A.
- [37] Lochmüller C H, Saavedra S S. Conformational changes in a soil fulvic acid measured by time-dependent fluorescence depolarization [J]. *Anal Chem*, 1986, 58(9): 1 978 ~ 1 981.
- [38] Ghosh K, Schnitzer M. Fluorescence excitation spectra of humic substances [J]. *Can J Soil Sci*, 1980, 60: 373 ~ 379.
- [39] Patel-Sorrentino N, Mounier S, Benain J Y. Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers [J]. *Wat Res*, 2002, 36(10): 2 571 ~ 2 581.
- [40] Buffle J, Altmann R S, Filella M, *et al.* Complexation by natural heterogeneous compounds: Site occupation distribution functions, a normalized description of metal complexation [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1990, 54: 1 535 ~ 1 553.
- [41] Miano T M, Sposito G, Martin J P. Fluorescence spectroscopy of humic substances [J]. *Soil Sci Soc Am J*, 1988, 52: 1 016 ~ 1 019.
- [42] Au K-K, Penisson A C, Yang S, *et al.* Natural organic matter at oxide/water interfaces: Complexation and conformation [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1999, 63(19/20): 2 903 ~ 2 917.
- [43] Lamm R W P M. Influence of pH on the fluorescence of dissolved organic matter [J]. *Mar Chem*, 1982, 11(4): 395 ~ 401.
- [44] Saar R A, Weber J H. Comparison of spectrofluorometry and ion-selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy-metal ions [J]. *Anal Chem*, 1980, 52(13): 2 095 ~ 2 100.
- [45] Midonikawa T, Tanoue E. Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water [J]. *Mar Chem*, 1998, 62(3-4): 219 ~ 239.
- [46] De Souza Sierra M M, Donard O F X, Lamotte M, *et al.* Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters [J]. *Mar Chem*, 1994, 47(2): 127 ~ 144.

## Characterization of humic acid by three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy

FU Ping-qing<sup>1,2</sup>, LIU Cong-qiang<sup>1</sup>, YIN Zuo-ying<sup>1</sup>, WU Feng-chang<sup>1,\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The fluorescence spectroscopy is widely used to elucidate the origin and structure of humic substances (HS) in natural environments. Due to its high sensitivity, good selectivity and nondestructive nature, fluorescence technique is suitable to the study of HS. In this study, three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy (3DEEM) was applied to characterize a commercial Fluka humic acid. The results show that 3DEEMs of HA have several Ex/Em peaks. Ionic strength in the range of 0 ~ 0.05 mol/L KClO<sub>4</sub> had little effect on the fluorescence spectra, while the concentrations (5 ~ 100 mg/L) of HA and pH (2 ~ 12) had significant effect. A red shift in the longer wavelength peak region was observed when concentration or pH value increased. The fluorescence intensity increased with increasing pH, but slightly decreased when pH ≥ 10. Similar changing trend was also observed for the sample of landfill leachate dissolved organic matter. For the fulvic-like peak B (HA: 50 mg/L or 100 mg/L), the maximum fluorescence occurred at pH 5.0. The protonation constants (lg K'<sub>HL</sub>) were calculated to be 3.57 and 3.13, indicating that peak B was associated with carboxyl groups. The  $r_{(A/B)}$  values ranged from 0.61 to 2.59. A strong linear relationship between  $r_{(A/B)}$  and pH was also observed. This indicates that the fluorescent molecules of peak A and B seem to be the same sensitive to pH variations.

**Key words:** Fluka humic acid; dissolved organic matter; three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy (3DEEM); fluorescence properties

**CLC number:** P593; O657.39

**Document code:** A