

分子荧光偏振技术及其在研究腐殖物质与 污染物相互作用方面的研究进展

梅毅^{1,2}, 尹祚莹¹, 黎文^{1,2}, 傅平青^{1,2}, 吴丰昌¹

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, 贵阳 550002; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘 要:腐殖物质对污染物如有毒金属元素(如汞、铜和铅等)及有机污分子荧光染物(如多环芳烃, 有机农药等)具有络合或吸附作用, 从而改变污染物的存在形式及其迁移途径, 所以能有效地降低污染物的毒性。近年来, 用分子荧光学研究两者间的这种作用过程逐渐得到人们的关注。本文综述了运用荧光偏振技术在腐殖物质与污染物的相互作用领域的研究现状。荧光偏振的研究成果可加深对腐殖物质与污染机理的认识, 能较精确地定量评估它们之间的作用强度, 了解它们结合后的分子构型变化, 有助于了解污染物在环境中的生物地球化学循环。

关 键 词: 荧光偏振; 腐殖物质; 重金属; 有机污染物

中图分类号: P575.9; 593 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-2802(2005)01-0075-04

环境中的腐殖物质和溶解有机物(DOM)能与污染物, 如重金属与有机污染物(DDT、多环芳烃等)发生作用, 从而改变了污染物的存在形式和迁移途径, 有效降低了毒性^[1,2]。腐殖物质或DOM中有一些含有聚合芳香链及不饱和和脂链的有机物质, 在一定的条件下能够发射荧光(即天然荧光生色团)。因此, 应用分子荧光光谱学方法研究天然有机物与环境中污染物的相互作用过程受到重视: 上世纪七八十年代出现, 稍后开始应用荧光偏振技术。分子荧光的偏振现象最初由 Perrin^[3]发现于1926年。后来他用此方法研究溶液中分子的运动及其构型变化。荧光偏振(FP)是用平面偏振光去探测溶液中分子旋转的速率变化。当电子力矩平行于入射偏振光的平面时才能被分子所吸收。吸收了偏振光的分子在返回基态时发射出与电子的迁移力矩相平行的偏振光。如果分子在溶液中旋转, 那么偏振光将会由于电子迁移力矩方位的变化而发生去偏振现象(depolarization)。因此, 分子发射的偏振光可与溶液中分子旋转的速率相对应。而溶液中分子旋转的速率又与分子的几何结构有关, 因为分子的形状决定了分子旋转时的摩擦力的大小。所以, 使用荧光偏振就可观察到与有机大分子结合的配位体浓度改变时有机大分子发射的偏振光的不同, 从而推断出

有机大分子的构形变化^[1,3]。Senesi^[6]指出, 由溶液中分子的旋转产生的去偏振作用除受分子尺寸和形状控制外, 还受一系列的分子与环境参数, 如本征偏振值 P_0 (intrinsic polarization, 与有机物分子结构有关)、分子体积 V 、荧光寿命 τ 、温度 T 和溶液粘度 η 的影响。

作为一种灵敏的、很有发展前景的分析技术, 分子荧光偏振技术已被广泛用于医学及分子生物学研究, 近年来又用于研究环境中溶解有机质或腐殖物质与污染物的作用过程。这一技术的最大特点是无需对样品进行物理分离, 不破坏其分子结构。因此, 最适用于研究结构和化学组成复杂的有机质与金属、有机污染物的相互作用, 可以避免分离过程中造成的对分析结果的影响。而且, 由于它不受光源强度波动的影响, 因而精度非常高。

天然有机物(其主要由腐殖酸和富里酸组成)与环境中的污染物, 如金属离子和有机污染物(如多环芳烃、有机农药、杀虫剂等)通过络合或疏水吸附等方式相互作用时会使腐殖酸(HA)或富里酸(FA)的分子结构与体积发生变化, 其荧光偏振值也随之改变。通过用荧光偏振值对腐殖酸或富里酸浓度作图, 由非线性回归可求出腐殖物与污染物的吸附系数 K_{oc} ^[7]。

收稿日期: 2003-09-01 收到, 2004-08-09 改回

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(2002CB412300); 中国科学院百人计划资助项目; 国家自然科学基金资助项目(40403011)

第一作者简介: 梅毅(1964—), 男, 硕士研究生, 主要从事环境地球化学研究。

目前荧光偏振技术在研究腐殖物质与污染物相互作用时的应用主要集中在以下三个方面。

(1) FA 及溶解有机物与金属离子的络合研究: 富里酸或溶解有机物与金属离子络合后构型发生明显的变化, 由于分子体积增大, 它在溶液中旋转速率就会下降, 荧光偏振值就升高。通过简单的数学推导即可获得条件稳定常数 K 与荧光偏振值 P 间的定量关系。因此, 运用荧光偏振技术研究溶解有机物与污染物的络合或吸附作用不仅能知道它们之间的作用大小(条件稳定常数或吸附系数), 而且可以了解溶解有机物的分子构型的变化。

Lakshmann^[8] 等用荧光偏振方法研究用超滤分离的土壤富里酸三类不同分子量的配位体与铝的络合反应。这三类配位体的分子量分别为: A 类小于 500 道尔顿, B 类 500~1000 道尔顿, C 类 1000~10000 道尔顿。在低浓度及低 pH 值(3~5)的条件下, 富里酸在溶液中以平面扩展的构型存在^[9]。因此富里酸分子的旋转速率很慢, 而荧光偏振值较大。随着铝离子的加入, 未经超滤分离的富里酸的荧光偏振值随即下降, 显示富里酸的构型发生改变, 很可能富里酸环绕在铝离子周围, 这样其旋转时的阻力减小, 旋转速率增加, 使得偏振值降低。同样的结果出现在 B 类和 C 类配位体, 它们的荧光偏振值也下降了, 但分子量较小的 A 类配位体在与铝结合后偏振值反而上升, 表明其分子构型没有变化。计算的条件稳定常数 $\log K = 4.2 \sim 5.1$, 这与 Elkins 等^[10] 用 Ryan 和 Weber 的荧光淬灭滴定得出的 $\log K$ 值基本一致, 表明用荧光偏振研究溶解有机物与金属离子间的相互作用能够获得可靠的结果。

多种分离方法如体积排阻色谱^[11,12]、反渗透(Wong 等^[13])、XAD 树脂^[11]并结合¹³C 核磁共振及红外光谱研究表明, 富里酸中不同分子量分布的配位体所含功能团的类型及数量有差异, 大分子量的配位体含有较多的芳香基、羧基等功能团及碳水化合物, 疏水较强; 而小分子量的配位体则具有较多的酚基官能团和烷烃等, 因而更具亲水性。本实验中, 小分子量配位体与大分子量配位的荧光偏振值变化完全不同, 进一步说明它们在结构和组成上的巨大差异。

(2) 富里酸或溶解有机物(DOM)与有机污染物的吸附研究: 如果 FA 或 DOM 吸附了有机污染物, 其尺寸就会变大, 使荧光团的旋转速率降低, 导致荧光偏振值升高。只要测出未被吸附有机污染物的偏

振值(P_f)及被吸附有机污染物的荧光团的偏振值(P_b), 根据公式即可求出吸附系数 K 。荧光偏振已被广泛用于研究腐殖物质对多环芳烃(PAHs)的吸附作用^[13~15]。

Roemelt 等^[15] 用荧光偏振研究代表性的有机污染物二萘嵌苯(perylene)与富里酸的反应过程。二萘嵌苯在 75% 的甘油溶液(pH 值为 7)中荧光偏振值以加入的 FA 的浓度为函数作图, 得出典型曲线(在较低的富里酸浓度范围内, 荧光偏振值随富里酸浓度的加入而线性地增加)。加入 75% 的甘油是为了增加二萘嵌苯的溶解能力和降低它在溶液中的旋转速率, 增大偏振值以减小实验误差。在相同的实验条件下, 在 pH 值为 2 和 11 时也得到同样趋势的曲线, 但二萘嵌苯的偏振值变化在 pH 值为 2 时最大, 11 时最小, 这与溶液中 FA 在三个 pH 点上不同的构型相吻合^[15]。

在上述情况下, 随 FA 的浓度增大, 二萘嵌苯的荧光偏振值也增大, 表明它与 FA 结合形成了比其自身更大的构型, 使之在溶液中旋转得较慢。假定 perylene-FA 以 1:1 的化学计量反应, 从公式可计算出 perylene-FA 的吸附系数 K 。三个 pH 值点上计算的 K 值几乎相同, 表明羧基和苯酚羟基的电离并没有影响 FA 中憎水区与二萘嵌苯的结合能力。这一发现进一步证实了腐殖物对有机污染物的吸附机理是典型的憎水吸附。计算出的吸附系数 K 很大, 由相似性原则推测 FA 分子应有较大的憎水区, 表明腐殖物质对有机污染物的吸附能力很大^[15]。

Lochmuller 等^[16] 将已广泛用于生物大分子构型研究的时间相关荧光去偏振光谱技术(time-dependent fluorescence depolarization spectroscopy)用于研究 EA 的构型变化与溶液 pH、离子强度和样品浓度的关系。实验结果显示, 在低浓度和高离子强度时, 土壤来源的 FA 具有相同的构型。反之, 在低 pH 值(2.0 和 4.0)和高离子强度条件下得出的旋转松弛时间(RRT)表明, FA、以两个明显不同的旋转轴(长轴与短轴)的伸展构型存在, 或者以两种不同尺寸的组成(一大一小)存在。而在较高的 FA 浓度和高离子强度时得出的 RRT 数据表明, FA 具与上述相同的构型。这表明在高离子强度的溶液中, 提高 FA 浓度或降低溶液 pH 值都明显有利于 FA 荧光团的聚集^[16]。由这项实验得出关于 FA 化学性的质的研究结果非常重要, 因为 FA 的结构及其与金属离子、疏水有机质的反应能力都强烈地受

构型(即分子大小和形状)的影响。

(3)荧光偏振新技术在环境研究中的一些应用:由于天然的荧光腐殖物种类很有限,而且荧光强度较弱,为了研究多数不发光的腐殖物与环境中污染物的相互作用,广泛利用一类能产生稳定荧光的分子,把这些小分子和大分子结合起来,或者插入大分子中,根据较小的荧光分子性质的改变,分析大分子的结构,这类小分子称为荧光探针。利用腐殖物质的荧光标记方法,可以研究荧光探针标记部位微环境的极性、结构、分子运动、结合紧密程度等;也可以利用共振能量转移原理测定基团之间的距离。这项技术已广泛应用于生物学研究,近年来一些研究者如 Amosti 等已把它用于环境科学研究。

自然环境中的大分子生物聚合物,如蛋白质、脂类、聚糖等对环境有一定的污染作用,但生物酶的存在能促成其降解。Amosti 等^[17]应用荧光偏振技术研究自然环境中生物聚合物在酶的作用下的水解过程。这就是荧光探针技术。这个方法的基本原理是:分子在溶液中是不断旋转的,小分子旋转得较快而分子量大的分子旋转得较慢。当溶液中荧光示踪的小分子被平面偏振光激发时,由于分子的快速运动而使发射光去偏振(荧光偏振值降低)。但当这种高速旋转的小荧光示踪分子与一大分子量的受体(如蛋白质)结合时,络合物的运动就会受到限制并会变慢,并导致荧光偏振值增大。通过把有机大分子滴入有固定浓度的小荧光示踪分子的溶液,由吸附等温线通过非线性回归分析就可以得到络合常数 K 值。此外,与上述荧光分析技术相似的荧光偏振技术是竞争络合分析原理,即两种不同的试样(示踪剂和待分析的试样)相互竞争以争夺与一特定物质的络合位置^[18],通过荧光偏振值的变化研究样品与其它物质的结合情况。

Amosti 等^[17]的研究中,聚糖被荧光示踪,荧光偏振直接用于控制水解过程中聚糖尺寸的减小。在酶的作用下,当荧光示踪的聚糖不断水解时荧光偏振值连续下降。这种方式能完整展现生物聚合物的水解过程。

在进行此类研究时,首先应选择一个合适的荧光示踪配位体以期得到足够的灵敏度,选择原则就是要尽量选择分子量较小(一般小于 1000Da)的荧光示踪剂(这样可得到较大的偏振值)。实验过程中保持荧光示踪剂浓度不变,通过改变受体(如蛋白质)的浓度来测定偏振值,利用吸附等温线可求出吸

附系数 K ^[18]。

荧光偏振技术的局限性:(1)含聚合芳香链或不饱和脂链的天然生色团只是腐殖物质或天然溶解物(DOM)的一个组成部分,其它的一些组分(如一些中性及亲水基团)并不发荧光。因此,用荧光偏振法尚有一定困难;(2)对于能强烈猝灭腐殖物或 DOM 荧光的污染物,如顺磁性金属离子及某些有机污染物,由于测出的荧光偏振值较小而降低了分析精度。

荧光标记示踪技术和竞争络合分析原理可克服上述缺点,且能将荧光偏振方法扩展到不发荧光的化合物,如已用于研究与小分子络合的蛋白质的极性及蛋白质的结构变化等^[18],只要荧光示踪剂和待测样(不发荧光物质)竞争相同的络合位置,且已知荧光示踪剂与有机大分子的络合稳定常数,就能计算出待测样的条件稳定常数 K 。

荧光偏振技术在研究腐殖物质与环境中污染物相互作用的研究尚处于起步阶段,应用还相对有限,但由于它有许多优势,以及荧光光谱学新技术的不断涌现,这项新技术一定会取得更多成果。从荧光偏振的原理看,这项技术在研究腐殖酸、富里酸的分子构型变化方面具有任何别的方法所没有的优势,而这些构型变化不管是由于它们与污染物相互作用或是因为各种降解作用及酸性功能团的分解引起的,都能用荧光偏振方法进行研究。同时,通过荧光偏振取得的研究成果使我们加深了对腐殖物质与污染物的作用机理的认识,能较精确地定量评估它们之间的作用强度,了解它们结合后的分子构型变化,帮助了解污染物在环境中的生物地球化学循环过程。

参考文献(Reference):

- [1] Carter C W, Suffet I H. Binding of DDT to dissolved humic materials[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1982, 16(11): 735-740
- [2] Leenheer J A, Croue J P. Characterizing aquatic dissolved organic matter[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37(1): 19A-26A.
- [3] Perrin F. Polarization of light of fluorescence, average life of molecules[J]. *J. Phys. Radium*, 1926, 7: 390-400.
- [4] Seitz W R. Luminescence spectrometry[C]. New York: John Wiley Sons, 1981, 159-248.
- [5] 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.

- [6] Seitz W R. Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water[J]. *Trend Anal. Chem.*, 1981, 1; 79–83.
- [7] Kazuaki Kakehi, Yasuo Oda, Mitsuhiro Kinoshita. Fluorescence Polarization; Analysis of Carbohydrate-Protein Interaction[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 297; 111–116.
- [8] Lakshman S, Mills R, Feng Fang. Use of fluorescence polarization to the structure and aluminum complexation of three molecular weight fraction of a soil fulvic acid[J]. *Analytical Chimica Acta*, 1996, 321; 113–119.
- [9] Lapen A J, Seitz W R. Fluorescence Polarization studies of the conformation of soil fulvic acid[J]. *Anal. Chim. Acta*, 1982, 134; 31.
- [10] Elkins K M, Nelson D J. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with nunic substances [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 228; 205–225.
- [11] Everett C R, Chin Y P, Aiken G R. High-Pressure Size Exclusion Chromatography Analysis of Dissolved Organic Matter I solation by Tangential-Flow Ultra filtration [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1999, 44(5); 1316–1322.
- [12] Irina V P, Fritz H F, Alexey V K, Natalia A K, Gudrun A B, Sebastian H, Valery S P. Molecular Weight Characteristics of Humic substances from different Environments As determined by Size Exclusion Chromatography and Their Statistical Evaluation[J]. *Enviorn. Sci. Technol.*, 2003, 37; 2477–2485.
- [13] Wong S, Hanna J V, Carroll S K, Eldridge R J, Dixon D R, Bolto B A, Hesse G, Frimmel F H. Fractionation of Natural Organic Matter in Drinking Water and Characterization by ^{13}C Cross-Polarization Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy and Size Exclusion Chromatography[J]. *Enviorn. Sci. Technol.*, 2002, 36; 3497–3503.
- [14] Croue J P, Benedetti M F, Violleau D, Leenheer A J. Characterization and Copper Binding of Humic and Nonhumic Organic Matter Isolated from the South Platte River; Evidence for the Presence of Nitrogenous Binding Sites[J]. *Enviorn. Sci. Technol.*, 2003, 37; 28–36.
- [15] Roemelt P M, Seitz W R. Fluorescence Polarization Studies of Perylene-Fulvic Acid Binding[J]. *Sci. Technol.*, 1982, 16; 613.
- [16] Lochmuller C H, Saavedrs S S. Conformational Changes In a Soil Fulvic Acid Measured by Time-Dependent Fluorescence Depolarization[J]. *Anal. Chem.*, 1986, 58; 1978.
- [17] Arnosti C, Keith S C, Blough N V. Application of fluorescence spectroscopic techniques and probes to the detection of biopolymer degradation in natural environments [J]. *Marine Chemistry* 2000, 71; 321–330.
- [18] Mann T L, Krull U J. Fluorescence Polarization Spectroscopy in Protein Analysis [J]. *Analyst*, 2003, 128; 313–317.

Advances in Molecular Fluorescence Polarization Spectroscopy and its Applications to Study on the Interaction between Humic Substances and Pollutants

MEI Yi^{1,2}, YIN Zuo-ying¹, LI Wen^{1,2}, FU Ping-qing^{1,2}, WU Feng-chang¹

1. *Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China;*

2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*

Abstract: Humic substances (HS) are a ubiquitous natural organic matter in natural environments. As HS can bind or adsorb pollutants, e. g. toxic metal elements (Hg, Pb and Cu etc) and organic pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons and carbamate pesticides etc), thus HS can change the existing states, speciation and transporting states of pollutants, and then to decrease the harmfulness and toxicity of pollutants to the environments. The molecular fluorescence polarization spectroscopy has been widely used to study qualitatively and quantitatively the behaviors of the HS-pollutants interaction process due to its sensitivity, rapidness, non-destructivity and simplicity. This paper has reviewed some advances in molecular fluorescence polarization spectroscopy and its application to study on the field of interaction between humic substances and pollutants. The results obtained by using the molecular fluorescence polarization spectroscopy have played very important role to understand the mechanism of the HS-pollutants interaction, to precisely evaluate the intensity of the HS-pollutants interaction, to understand the variation of the molecular structures after the HS-pollutants combination, and to understand the biogeochemical cycling process of pollutants in our living environment.

Key words: fluorescence polarization spectroscopy; humic substances; heavy metals; organic pollutants