

以腐植酸为对象开展稳态和时间分辨荧光实验教学

张 旭* 陈 媛

(武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430072)

摘要: 腐植酸是天然有机质的重要组成部分, 其结构复杂且具有多种荧光发射特征。我们结合目前环境科学领域腐植酸或其他天然有机质的研究重点, 利用腐植酸开展稳态和时间分辨荧光综合实验教学。本实验可以使学生全面掌握分子荧光分析中拉曼散射、激发光能量对荧光发射影响、荧光寿命和内滤效应等知识。

关键词: 分子荧光; 荧光寿命; 腐植酸; 拉曼散射

中图分类号: G64; O657

Using Humic Acid for Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Experimental Teaching

ZHANG Xu* CHEN Yuan

(School of Resources and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, P. R. China)

Abstract: Humic acid is the major component of natural organic matters, which possesses a complex structure and multiple emission characteristics. Considering the research topics of humic acid or other natural organic matters, humic acid was used for steady-state and time-resolved fluorescence experimental teaching. Students can acquire the knowledge about the Raman scattering and inner filtering effects on fluorescence measurements, the effects of excitation energy on the emission spectrum, and fluorescence lifetime.

Key Words: Molecular fluorescence; Fluorescence lifetime; Humic acid; Raman scattering

环境仪器分析理论与实验是环境科学和环境工程等学科的专业必修基础课程之一^[1-3]。通过课程学习, 学生可以掌握光谱分析、色谱分析、电化学分析及其他分析方法中常用仪器设备的工作原理、使用方法和仪器维护等知识。其中, 荧光分析方法具有灵敏度高、应用范围广泛等优点, 是目前常用环境分析技术之一^[4,5], 在环境仪器分析中占有重要地位。

分子荧光分析内容广泛, 概念较多, 同时涉及稳态和瞬态两个不同的时间尺度。而在目前开展的实验教学中, 往往只利用简单荧光探针分子, 进行稳态荧光发射光谱的测定^[6,7], 学生难以将实验内容与理论知识结合并进行对照学习。为使学生全面掌握荧光分析方法, 需要对实验内容进行拓新。腐植酸是水体和土壤等环境介质中天然有机质的重要组成部分, 也是各种物理、化学、生物反应的重要参与者, 是环境科学、自然地理学等学科的重要研究体系^[8-11]。同时, 腐植酸结构复杂, 具有多种荧光发射官能团, 是一种良好的荧光研究体系。因此, 可以借助腐植酸的荧光特性, 开展荧光分析方法的综合实验教学。通过本实验, 学生可以掌握分子荧光光谱的产生原理、影响因素、稳态荧光与时间

*通讯作者, Email: xuzhangwhu@gmail.com

基金资助: 武汉大学实验技术项目(WHU-2015-SYJS-10); 国家自然科学基金(21477091)

分辨荧光的联系和区别等知识点,熟悉稳态荧光和时间分辨荧光光谱仪的构造并掌握基本使用方法。同时,本实验的学习也可以为借助荧光光谱研究复杂环境体系打下基础^[12,13]。

1 实验目的

- (1) 掌握荧光光谱产生的原理及动力学过程;
- (2) 掌握稳态荧光和时间分辨荧光光谱仪的构造;
- (3) 掌握荧光寿命的测定方法及其物理意义。

2 实验材料与仪器

2.1 实验材料

腐植酸(阿拉丁试剂(上海)有限公司,上海),分子截流量 3.5kD 透析袋(Spectra/Por, Canada), SiO₂胶体溶液(Ludox® CL, Sigma-Aldrich), 10 mm 石英比色皿,超纯水(电阻率 > 18.2 MΩ·cm)。

2.2 实验仪器

紫外-可见分光光度计(UV-Vis 2550, Shimadzu),稳态荧光光谱仪(FS-5, Edinburgh),时间分辨荧光光谱仪(Fluotime 200, PicoQuant),总有机碳分析仪(Vario, Elementar)。

3 实验原理

能量等于分子轨道不同能级差值的激发光子与分子碰撞后会产生激发光的吸收,分子受激发后从基态转变为对应的激发态。激发态分子既可以以辐射跃迁的形式返回基态,也可以以非辐射跃迁的形式返回基态^[14,15],两种方式分别以发射光子和热量的形式释放能量。当使用激发光对样品持续照射时,在给定热力学条件下,激发态分子个数和基态分子个数的比值为定值,而激发态分子发射光子的几率也为定值,因此,分子的稳态荧光强度为定值。

当激发光停止照射分子后,处于激发态的分子不断减少,分子的荧光强度逐渐衰减。荧光强度衰减至初始强度的 1/e 所经历的时间即为该分子的荧光寿命 τ 。激发态分子发射光子是随机的,所以 τ 是第一激发态分子的平均寿命。目前,利用时间相关单光子计数(time-correlated single photon counting, TCSPC),借助高频率脉冲激发光源,通过多次重复采集荧光衰减信号重构荧光衰减曲线是实现时间分辨荧光测定的主要方法之一。利用去卷积(deconvolution)和尾部拟合(tail fitting)等数学处理方式对衰减曲线进行处理得到分子的荧光寿命。

稳态荧光光谱仪和时间分辨荧光光谱仪均由光源系统、光路系统、检测系统、数据采集系统和数据分析系统组成。两者区别在于:稳态荧光光谱仪的激发光源多为氙灯,利用单色器获得单色激发光;而时间分辨荧光光谱仪的激发光源为高频率(亚纳秒、皮秒或飞秒)脉冲激光器。两者的光路系统和检测系统相似,但时间分辨荧光光谱仪的数据采集系统(时间相关单光子计数器)更加复杂,具有功能更加多样的数据分析系统。

4 实验步骤

4.1 腐植酸溶液的吸收光谱测定

以超纯水为参比,在 UV 2550 分光光度计上测定腐植酸溶液在 200–800 nm 范围内的吸收光谱。

4.2 腐植酸溶液的稳态荧光光谱测定

在激发波长(E_x)分别为 255、280、320、340、375、390、420、440、470、500、550 和 600 nm 条件下,测定腐植酸溶液自 $E_x + 15$ nm 到 $2E_x - 15$ nm 范围内的荧光发射光谱,以超纯水的拉曼散射光谱进行荧光发射光谱的背景校正。

4.3 腐植酸溶液的时间分辨荧光光谱测定

以PicoQuant公司的LDH-D-C-375 (375 nm)和LDH-P-C-485 (485 nm)作为激发光源,采集腐植酸溶液在发射光(E_m)为530 nm下的荧光衰减曲线。以 SiO_2 胶体溶液为样品测定时间分辨荧光光谱仪的仪器响应函数(instrumental response function, IRF)。在实验过程中应注意避免眼睛直视激光光源。

5 实验结果分析

5.1 腐植酸溶液的紫外-可见吸收光谱

图1为腐植酸溶液(其中碳的浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的吸收光谱。从图1可以看出,腐植酸不仅在紫外光范围内有吸收,在波长大于400 nm的可见光范围内同样有吸收。由于多数有机污染物在可见光区域没有吸收,且到达水体表面的太阳光辐射以可见光为主,因此,腐植酸敏化产生的光化学反应是有机污染物发生化学转化的主要途径。

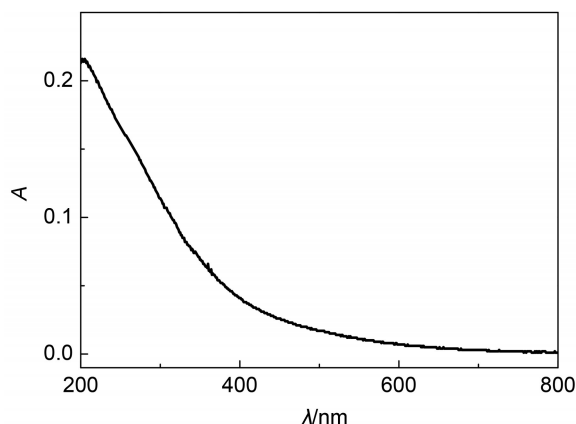


图1 腐植酸溶液的紫外-可见吸收光谱
碳的浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

5.2 腐植酸溶液的稳态荧光发射光谱

图2为溶剂水在不同激发条件下的拉曼散射光谱,从图2中的光谱可以清楚看到,水的拉曼散射峰的位置随着激发波长的红移而发生显著红移。激发光子与水分子发生碰撞后,既存在激发光子的吸收,也存在瑞利散射和拉曼散射。由于在荧光测定时,一般选定的发射波长长于激发波长,因此,拉曼散射是荧光发射光谱中的主要干扰因素。另一方面,拉曼散射同样能够提供有关样品的化学成分和

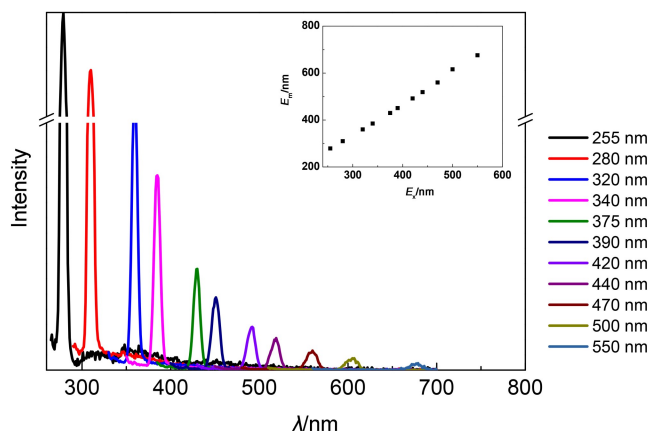


图2 不同激发条件下水的拉曼散射光谱
插图为不同激发条件下,拉曼散射峰的位置变化

结构信息, 所以拉曼散射光谱也是一种重要的光谱分析技术。

图3为扣除溶剂拉曼散射后腐植酸溶液的荧光发射光谱。从图3中的光谱变化可以清楚看到, 当激发光波长小于440 nm时, 腐植酸溶液的发射峰基本不随激发波长的改变而变化, 但是荧光强度变弱。这主要是由于腐植酸的吸光度值随着激发波长的增加迅速降低, 单位时间内吸收的光子数变少, 所以激发态分子数量同样变少, 腐植酸溶液的稳态荧光强度降低。当激发波长大于440 nm时, 腐植酸的发射峰随着激发波长增加而发生明显红移。由荧光光谱的原理可知, 由于单一物质第一激发态和基态之间的能量差为定值, 因此, 其荧光发射峰位置不会随着激发波长的改变而发生变化。所以, 腐植酸的荧光光谱变化特征表明其不是单一物质。同时, 由于长波长激发下的荧光发射光谱始终包含于短波长激发下的荧光发射光谱中, 所以, 腐植酸同样不仅仅是不同物质组成的混合物, 而是由具有分子内相互作用的组分组成的复杂物质^[10]。

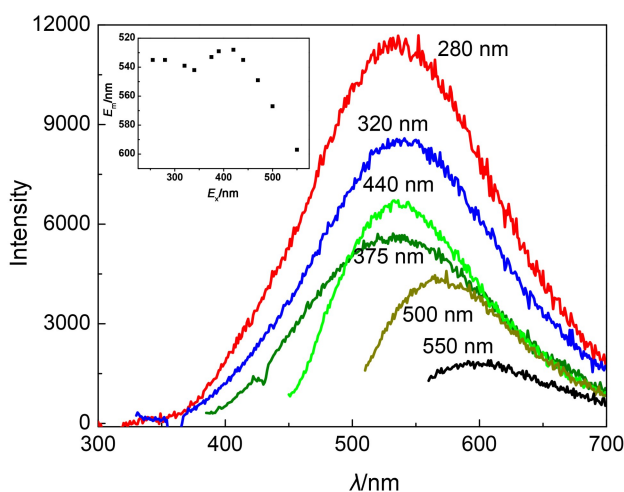


图3 不同激发条件下, 腐植酸溶液的荧光发射光谱

腐植酸溶液中碳的浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 插图为不同激发条件下, 腐植酸溶液最大发射峰的位置变化

5.3 腐植酸溶液的时间分辨荧光光谱

腐植酸溶液在375和485 nm激发、530 nm发射下的荧光衰减曲线以及拟合结果分别如图4和图5所示。从图4中的荧光衰减曲线可以看出, 腐植酸在530 nm下的衰减不是单指数衰减。利用多指数法对荧光衰减曲线进行去卷积处理, 拟合得到3组平均荧光寿命: 7.6、2.6和0.53 ns, 对应的指前因子分别为10.4%、34.6%和55.0%。需要注意的是, 上述3个荧光寿命并不表明腐植酸只由3种物质组成^[16]。由于腐植酸分子结构复杂, 存在多种荧光发射官能团, 上述3个荧光寿命为结构相近的物质或官能团表现出的平均寿命。

当激发波长为485 nm时, 腐植酸溶液在530 nm处的荧光衰减曲线仍表现出多指数的衰减特征。去卷积处理后得到的3组荧光寿命分别为6.9、2.7和0.45 ns, 对应的指前因子分别为18.5%、32.6%和48.9%。结果表明, 长波长激发产生的腐植酸激发态与短波长激发产生的激发态的组成存在差异。

图4和图5的结果表明, 不同激发波长下腐植酸的激发态存在差异, 这与稳态荧光结果相一致。腐植酸存在电子给体、电子受体和分子内的电子转移络合物^[10]。因为具有不同分子结构的物质对光子的吸收存在差异, 所以腐植酸的稳态荧光和时间分辨荧光均随着激发光的变化而发生改变, 表现出与单一化合物显著的差异。

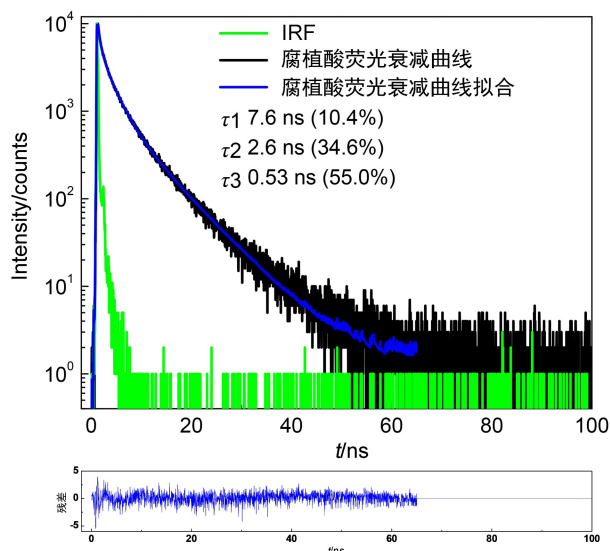


图4 激发波长375 nm下腐植酸溶液在发射波长为530 nm的荧光衰减曲线

图中数据为拟合的荧光寿命和对应的指前因子，拟合的 χ^2 为1.02

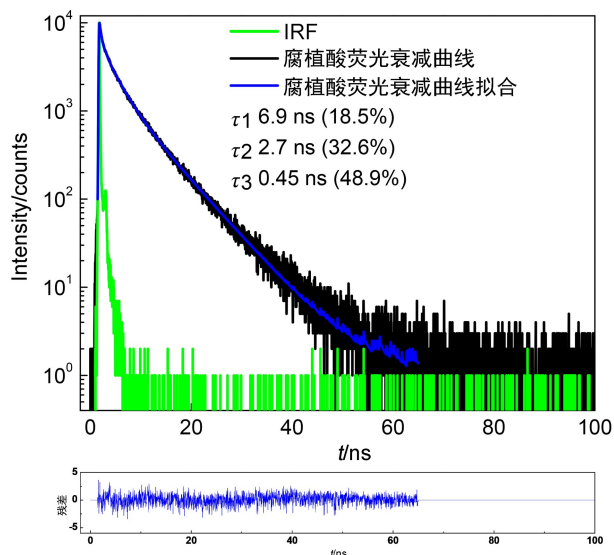


图5 激发波长485 nm下腐植酸溶液在发射波长为530 nm的荧光衰减曲线

图中数据为拟合的荧光寿命和对应的指前因子，拟合的 χ^2 为0.980

6 实验拓展

实验结束后，结合以下3个方面对实验内容进行学习与拓展：

- (1) 稳态荧光光谱仪与时间分辨荧光光谱仪的激发光源的特点和区别是什么？
- (2) 腐植酸的荧光发射光谱与其吸收光谱存在重合，会影响腐植酸荧光发射光谱的测定，如何进行内滤效应的校正？
- (3) 查阅文献，阐述腐植酸荧光寿命的物理意义。

7 结 语

实验以腐植酸为对象，研究了腐植酸的吸收和荧光发射光谱特征。通过实验的开展，有助于学生

综合掌握分子荧光分析法, 了解稳态和时间分辨两种荧光光谱仪的构造并掌握其操作。同时, 以本实验为基础, 可以进一步开展分子荧光的静态淬灭和动态淬灭、污染物和有机质的结合等方面的教学和科学研究。

参 考 文 献

- [1] 赵东宇. 高教学刊, **2017**, No. 4, 64.
- [2] 陈 浩, 李 庆, 李胜清, 薛爱芳. 大学化学, **2006**, 21 (3), 20.
- [3] 赵洪霞. 教育教学论坛, **2017**, No. 3, 176.
- [4] 范传刚, 刘道杰. 理化检验(化学分册), **2006**, 42 (1), 66.
- [5] 梁锡辉, 区伟能, 任 豪, 付治新. 激光与光电子学进展, **2008**, 45 (1), 65.
- [6] 盛 丽, 赵志惠, 米 莹, 苏碧泉, 荆王莉, 陶彩虹. 大学化学, **2017**, 32 (1), 58.
- [7] 赵长春, 刘晓君, 王 颇, 卢菊生. 实验室研究与探索, **2016**, 35 (12), 160.
- [8] 吴丰昌. 天然有机质及其与污染物的相互作用. 北京: 科学出版社, 2010.
- [9] Mostofa, K. M. G.; Yoshioka, T.; Mottaleb, A.; Vione, D. *Photobiogeochemistry of Organic Matter: Principles and Practices in Water Environments*; Springer: Berlin Heidelberg, Germany, 2013.
- [10] Sharpless, C. M. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 46 (8), 4466.
- [11] McNeill, K.; Canonica, S. *Environ. Sci. Processes Impacts* **2016**, 18 (11), 1381.
- [12] 李东旭, 许 潇, 李 娜, 李克安. 大学化学, **2008**, 23 (4), 1.
- [13] 胡丽华, 周 弟, 朱 健, 黄志斌. 化学研究与应用, **2010**, 22 (8), 969.
- [14] 许金钧, 王尊本. 荧光分析法. 第3版. 北京: 科学出版社, 2006.
- [15] Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2002.
- [16] Kumke, M. U.; Abbt-Braun, G.; Frimmel, F. H. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **1998**, 26 (2), 73.