

# 基于平行因子分析的激光诱导纳秒时间分辨荧光猝灭法 原位研究芘和菲与腐植酸相互作用

杨承虎<sup>1</sup>, 刘洋之<sup>1</sup>, 朱亚先<sup>2</sup>, 张 勇<sup>1, 3\*</sup>

1. 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361102
2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005
3. 漳州职业技术学院, 福建 漳州 363000

**摘 要** 基于平行因子(PARAFAC)分析的激光诱导纳秒时间分辨荧光(LITRF)猝灭法原位研究典型多环芳烃(PAHs)芘(Pyr)和菲(Phe)单独及混合状态下与 Aldrich 腐植酸(HA)相互作用。实验表明, 在 266 nm 激发波长下, Pyr, Phe 及 HA 三者的 LITRF 光谱相互重叠, 无法直接同时测定混合组分中游离 Pyr 和 Phe 荧光强度。利用 PARAFAC 分析可快速有效消除 HA 荧光干扰, 获取混合溶液 LITRF 光谱中 Pyr 和 Phe 荧光强度及各自荧光衰减曲线, 并以 Freundlich 吸附等温模型描述 PAHs 与 HA 结合特性。结果验证了 Pyr 和 Phe 与 HA 以非线性形式结合( $n < 1$ ); Pyr 和 Phe 共存时, 两者与 HA 结合存在竞争关系。加入竞争吸附质后, Pyr 和 Phe 与 HA 的吸附等温线非线性程度减弱( $n$  趋近于 1), 单点结合系数下降, 且竞争强度随竞争吸附质浓度增加而增强。此外, LITRF-PARAFAC 猝灭法与传统荧光猝灭法所得单组分 Pyr 和 Phe 与 HA 结合特性无显著差异。猝灭速率常数及荧光寿命分析反映出 Pyr 和 Phe 与 HA 间荧光以静态猝灭形式为主。LITRF-PARAFAC 猝灭法可快速原位研究混合 PAHs 与 HA 相互作用, 有利于原位预测和评估 PAHs 的环境行为及其生态风险。

**关键词** 激光诱导纳秒时间分辨荧光; 平行因子分析; 荧光猝灭法; 原位; 腐植酸; 芘; 菲

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2017)05-1519-06

## 引 言

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类重要疏水性有机污染物(hydrophobic organic contaminants, HOCs), 因其有“三致效应”而倍受关注<sup>[1]</sup>。PAHs 在水中的环境行为及其生物有效性受溶解性有机质(dissolved organic matter, DOM)影响<sup>[2]</sup>。腐植酸(humic acid, HA)是 DOM 中重要组分部分, 研究表明其与 PAHs 相互作用对 PAHs 归趋及生物毒性有重要影响<sup>[3-4]</sup>。

溶解性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)归一化的结合系数( $K_{DOC}$ )及吸附等温线非线性程度常作为 PAHs 与 HA 相互作用的重要指标<sup>[5]</sup>。荧光猝灭法因其灵敏度高、操作简便、非破坏性而被广泛用于研究 PAHs 与 HA 结合特性<sup>[6]</sup>。然而, 传统荧光猝灭法采用扣除法以消除 HA 的光谱干扰, 难以实现水环境中光谱重叠的 PAHs 共存时与 HA 相互

作用研究。双波长荧光猝灭法被用于芘(pyrene, Pyr)与 HA 结合常数的直接测定<sup>[7]</sup>的方法。文献[8]报道了双组分芘和蒽与富里酸结合能力同时测定。但上述方法所用仪器便携性较差, 耗时相对较长, 且水体自身拉曼散射、杂散光及污染物低浓度等因素限制了相关方法对 HA 和 PAHs 间相互作用原位研究。

激光诱导纳秒时间分辨荧光(laser-induced nanosecond time-resolved fluorescence, LITRF)系统便携性强、灵敏度高、快速、可有效避免拉曼散射和杂散光的干扰<sup>[9]</sup>。此外, LITRF 系统配置光纤和探头, 已成为 PAHs 原位检测的重要手段, 推动了 PAHs 在不同环境介质中迁移转化、环境归趋等方面研究。Rudnick 和 Chen 基于 HA 与 PAHs 荧光寿命差异, 通过改变延迟时间消除 HA 荧光背景干扰, 实现了波士顿湾等近海水体中长寿 Pyr 现场原位测定<sup>[10]</sup>; 本课题组用此考察单组分菲(phenanthrene, Phe)和烷基 Phe 与 HA 结合特性。然而, 相关方法对于短寿命 PAHs 及混合组分

收稿日期: 2015-09-27, 修订日期: 2016-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(21177102, 21577110), 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20130121130005)资助

作者简介: 杨承虎, 1987 年生, 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室博士研究生 e-mail: yangchenghu135@126.com

\* 通讯联系人 e-mail: yzhang@xmu.edu.cn

PAHs 原位研究存在不足<sup>[11]</sup>。

本文以 Pyr 和 Phe 为 PAHs 代表物质, 尝试将 LITRF 猝灭法和平行因子(parallel factor, PARAFAC)分析相结合, 以期原位考察混合 PAHs 与 HA 结合特性及作用机理。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

Pyr(纯度 > 98%, Aldrich, USA); Phe(纯度 > 98%, Aldrich, USA); HA(Technical grade, Aldrich)。分别称取适量 Pyr 和 Phe, 配制成  $0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇储备液。采用元素分析仪(Elementar EL Cube, 德国)测定 HA 中元素 C, H, N, S 和 O 含量, 分别为 60.24%, 3.38%, 1.37%, 0.67% 和 34.33%。利用傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 380, 美国)测定 HA 官能团, 其具有明显的—OH 基团( $3398 \text{ cm}^{-1}$ ), —CH<sub>2</sub> 基团( $2920 \text{ cm}^{-1}$ ), —C=C 基团( $1603 \text{ cm}^{-1}$ ), —COO 基团( $1376 \text{ cm}^{-1}$ )及—C—O 基团( $1066 \text{ cm}^{-1}$ )。HA 溶液配制参考文献[11], 以有机碳含量表示其浓度( $\text{mgC} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

LITRF 系统(Fluovision, 德国), 光谱测量参数: Timing shift: 1 ns, 激发波长( $\lambda_{\text{ex}}$ ): 266 nm, Laser energy:  $30 \mu\text{J}$ , Time Slices: 130, Cooler temperature:  $-1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 发射波长( $\lambda_{\text{em}}$ ): 241.61~550.05 nm。

### 1.2 方法

采用批次实验研究 Pyr 和 Phe 单独及混合状态下与 HA 相互作用。按文献[11]所述实验方法, 单组分体系, 分别设定 7 个 Pyr 浓度( $0 \sim 6.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 Phe 浓度( $0 \sim 30.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。双组分体系, Phe-HA 吸附体系中加入浓度为  $2.0$  或  $6.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Pyr; Pyr-HA 吸附体系中加入浓度为  $5.0$  或  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Phe。HA 浓度固定为  $1.0 \text{ mgC} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所有样品于  $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$  避光静置 24 h 后, 将 LITRF 系统探头直接垂直插入样品溶液, 原位测量荧光光谱。以样品各自  $292.15 \text{ nm}$  处拉曼峰作归一化处理, 以消除激发光的能量波动带来的影响<sup>[12]</sup>。LITRF 光谱包含荧光衰减时间、发射波长及强度三维信息。

### 1.3 数据分析

于 MATLAB7.0(Mathworks, Natick, MA, USA)平台上利用 N-way toolbox 程序包进行 PARAFAC 分析<sup>[13]</sup>。以改进的 Freundlich 方程  $c_b = K_{\text{FOC}} \times (c_{\text{free}}/c_{\text{sel}})^n$  ( $c_b$  为被结合 PAH 浓度;  $c_{\text{free}}$  为游离 PAH 浓度;  $c_{\text{sel}}$  为 PAH 过冷液体溶解度;  $K_{\text{FOC}}$  和  $n$  为 Freundlich 吸附参数,  $n$  表示吸附等温线非线性程度)拟合 Pyr 和 Phe 与 HA 等温曲线, 并计算给定平衡浓度( $c_{\text{free}}$ )时单点结合系数  $K_{\text{FOC}}^{15}$ 。用 Excel 对荧光衰减曲线进行单指数拟合以计算荧光寿命。利用 SPSS19.0 进行单因素方差分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Pyr, Phe 及 HA 荧光光谱

在  $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$  下, Pyr, Phe 及 HA 荧光发射光谱和

LITRF 光谱见图 1。由图 1(a)可知, HA 荧光发射光谱与芘和非荧光发射光谱存在重叠, 传统荧光扫描无法直接测定 HA 存在下两种 PAHs 荧光强度。HA 荧光衰减趋势快于 Pyr 和 Phe [图 1(b)], 即 HA 的荧光寿命短于两种 PAHs<sup>[12]</sup>, 改变延迟时间可消除 HA 荧光干扰<sup>[11]</sup>。此外, 一方面 Pyr 对 Phe 次荧光峰干扰相对较少, 可通过测量  $\lambda_{\text{em}} = 350.47 \text{ nm}$  处荧光信号以获取混合组分中 Phe 浓度。另一方面, Pyr 的荧光寿命大于 Phe, 理论上进一步增加延迟时间可实现对 Pyr 荧光光谱测定。然而, 增加延迟时间及选择非最大荧光峰测量将降低检测目标物荧光强度及方法灵敏度, 易给定性定量分析带来误差。对于短荧光寿命且与 HA 光谱较大重叠的 PAHs(如蒽, 寿命为  $3.8 \text{ ns}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$  范围为  $370 \sim 455 \text{ nm}$ )难以通过改变延迟时间直接获取其荧光信号<sup>[12]</sup>。

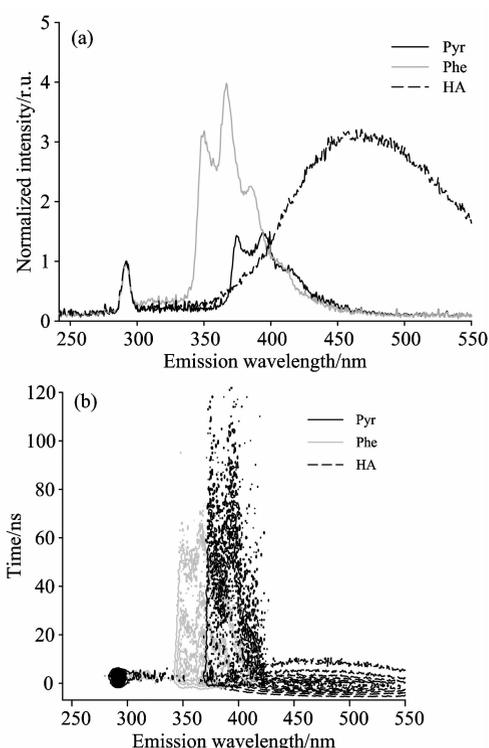


图 1 直接测量的 Pyr, Phe 及 HA 的荧光发射光谱 (a) 及 LITRF 光谱 (b)

Fig. 1 Fluorescence emission spectra (a) and LITRF spectra (b) of single Pyr, Phe and HA by direct measurement

LITRF 光谱数据包含多维信息, 且 PARAFAC 分析可对多维数据进行解析, 从混合组分光谱中分离出各自特征荧光光谱及荧光强度<sup>[8]</sup>。本实验进行 PARAFAC 分析前, 剔除  $\lambda_{\text{em}} < 320 \text{ nm}$  处光谱数据以排除拉曼峰干扰。

### 2.2 Pyr, Phe 与 HA 结合特性

将所有样品 LITRF 光谱数据按照样品编号、发射波长和荧光衰减时间的顺序组合成三维数据矩阵进行 PARAFAC 分析, 图 2 为所得荧光组分归一化发射光谱及荧光衰减曲线, 图 3 为各自 LITRF 光谱。因 HA 为混合物, 含有不同荧光组分, 本文中其被识别出两个荧光组分(HA1 和 HA2), 与文献[16]报道类似。由图 1(a)和图 2(a)可知, 直接测定和

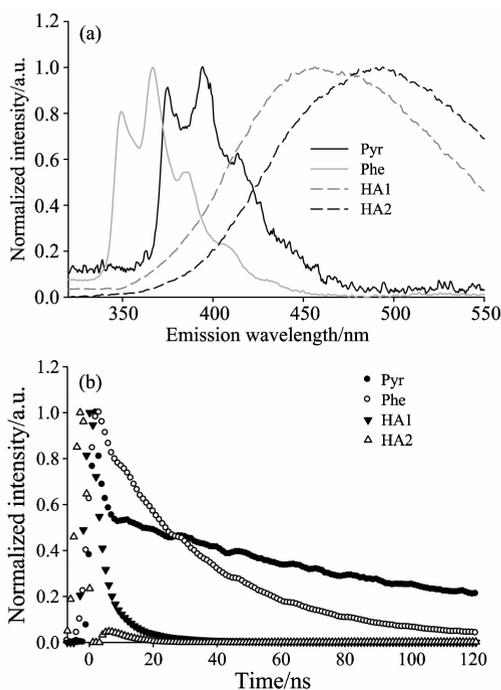


图 2 经 PARAFAC 分离的 Pyr、Phe 及 HA 归一化荧光发射光谱 (a) 及荧光衰减曲线 (b)

Fig. 2 Normalized fluorescence emission spectra (a) and fluorescence decay curves (b) of Pyr, Phe and HA identified by PARAFAC analysis

经 PARAFAC 分离的 Pyr 和 Phe 最大发射峰位置相同, 分别为 393.89 和 366.67 nm; 比较图 1(b) 和图 3 可发现 Pyr 和 Phe 的衰减时间相似, 进一步表明经 PARAFAC 分离后 Pyr 和 Phe 的荧光光谱图与各自单一组分的光谱图具有较好一致性。通过 PARAFAC 分析, 同时可获取游离 Pyr, Phe 及 HA 荧光强度<sup>[8]</sup>, 经最小二乘拟合, 可建立不含 HA 样品中 PAHs 荧光强度—浓度的线性回归方程( $R^2 > 0.99$ )。随之将 HA 和 PAHs 混合样中 PAHs 荧光强度代入相应线性方程, 求出游离 PAHs 浓度。最后, 利用改进的 Freundlich 公式对结合数据进行拟合(图 4), 模型参数及单点结合系数  $\log K_{\text{DOC}}$  结果见表 1。

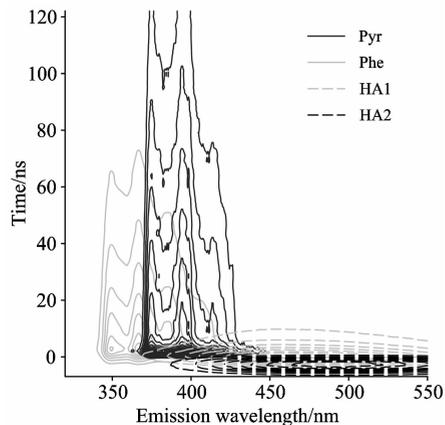


图 3 经 PARAFAC 分析所得 Pyr, Phe 及 HA 的 LITRF 光谱

Fig. 3 LITRF of Pyr, Phe and two HA components identified by PARAFAC analysis

表 1 经 LITRF-PARAFAC 猝灭法获取的 Pyr 和 Phe 在 HA 上的 Freundlich 吸附等温模型拟合结果

Table 1 Fitting results of the modified Freundlich model for binding of Pyr and Phe by HA using LITRF-PARAFAC quenching method

PAHs	$\log K_{\text{FOC}} / (\mu\text{g} \cdot \text{kgC}^{-1})$	$n$	$\log K_{\text{DOC}} / (\text{L} \cdot \text{kgC}^{-1})$	
			$c_{\text{free}} = 0.05 S_w^a$	$c_{\text{free}} = 0.01 S_w$
Pyr (added Phe)				
0	$8.69 \pm 0.04$	$0.86 \pm 0.02$	5.71	5.80
5.0	$9.02 \pm 0.03$	$0.99 \pm 0.02$	5.71	5.72
20.0	$9.04 \pm 0.04$	$1.01 \pm 0.01$	5.68	5.67
Phe (added Pyr)				
0	$8.36 \pm 0.03$	$0.87 \pm 0.01$	4.85	4.94
2.0	$8.34 \pm 0.04$	$0.93 \pm 0.02$	4.71	4.76
6.0	$8.29 \pm 0.02$	$0.94 \pm 0.01$	4.64	4.68

a:  $S_w$  为 PAHs 水溶解度(25 °C)<sup>[15]</sup>

如表 1 所示, 参数  $n < 1$ , 说明 Pyr 和 Phe 与 HA 以非线性方式结合<sup>[17-18]</sup>。给定平衡浓度下, Pyr 的  $\log K_{\text{DOC}}$  大于 Phe, 与 Pyr 的辛醇水分配系数  $\log K_{\text{OW}}$  较大有关。平衡浓度越低,  $\log K_{\text{DOC}}$  越大, 该吸附现象表明 HA 吸附区所拥有高能结合位点数量有限, 低浓度 PAHs 较高浓度 PAHs 吸附于特定位点比例更高, 即 Pyr 和 Phe 浓度较低时更易与此类位点相结合<sup>[2, 14]</sup>。

实际水环境中多组分 PAHs 共存, 且各组分浓度呈动态

变化。因此, 考察双组分 Pyr 和 Phe 在不同浓度配比时与 HA 结合特性, 对进一步了解 HA 对 PAHs 环境行为影响有重要意义。双组分吸附体系中 Pyr 和 Phe 的参数  $n$  大于相同浓度下各自单组分吸附体系 ( $p < 0.05$ ) (表 1), 表明双组分体系中 PAH 和 HA 间非线性吸附程度减弱<sup>[14]</sup>。竞争吸附质 Pyr 加入后 Phe-HA 体系  $n$  由 0.87 增至 0.94, 而竞争吸附质 Phe 加入后 Pyr-HA 体系  $n$  增加较大 (0.86~1.01), 即 Phe-

HA 体系非线性程度降低趋势小于 Pyr-HA 体系, 主要原因为 Phe-HA 体系中分配吸附方式所占比例较大且竞争吸附质 Pyr 的浓度较低<sup>[14]</sup>。相同平衡浓度下, 双组分吸附体系 Pyr 和 Phe 的  $\log K_{\text{DOC}}$  小于各自单组分体系的  $\log K_{\text{DOC}}$ , 表明 Pyr 和 Phe 竞争吸附至 HA, 且竞争强度随竞争吸附质浓度增加而增大, 该现象与已有报道类似<sup>[19]</sup>。

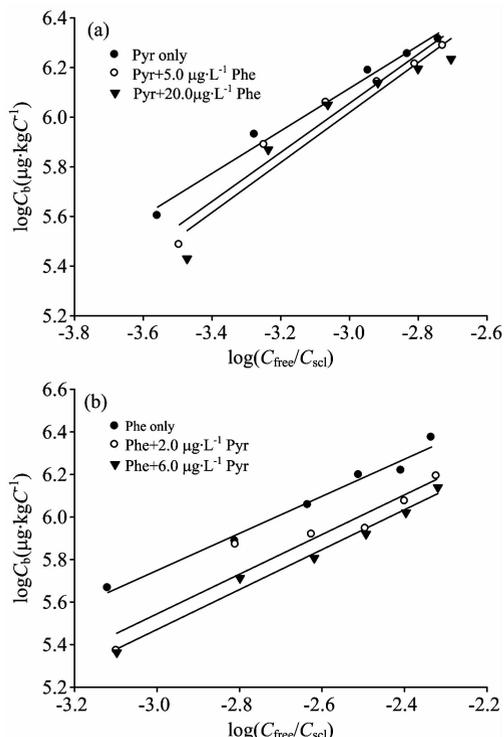


图 4 HA 对 Pyr 和 Phe 的 Freundlich 吸附等温模型

Fig. 4 Freundlich isotherms of Pyr and Phe on HA

表 2 为传统荧光猝灭法研究单组分 Pyr 和 Phe 与 HA 结合的 Freundlich 吸附模型拟合结果及单点结合系数  $\log K_{\text{DOC}}$ 。统计分析表明, 传统荧光猝灭法与 LITRF-PARAFAC 猝灭法获取单组分 Pyr 和 Phe 与 HA 结合特性无显著差异 ( $p > 0.05$ )。且 LITRF-PARAFAC 猝灭法所得单组分 Pyr 和 Phe 与 HA 结合能力与已有荧光猝灭法相关研究结果类似<sup>[20]</sup>。

表 3 直接测量及 PARAFAC 分析所得 Pyr 和 Phe 荧光寿命 (ns)

Table 3 Fluorescence lifetimes (ns) of Pyr and Phe were calculated by direct measurement (DM) and PARAFAC analysis

PAHs	PAH (single)		PAH-HA		Literatures
	DM		DM	PARAFAC	
Pyr	120.75 ± 3.90		90.58 ± 2.43	118.48	122.2 ± 3 <sup>[12]</sup> 107 ± 11 <sup>[24]</sup>
Phe	36.56 ± 2.21		35.34 ± 1.03	37.22	36.8 ± 0.4 <sup>[12]</sup> 37.4 ± 3.6 <sup>[24]</sup>

### 3 结论

结果显示 LITRF-PARAFAC 猝灭法不仅可实现混合组分 PAHs 与 HA 结合特性测定, 且能获得 PAHs 荧光寿命信

因此 LITRF-PARAFAC 猝灭法可用于 HA 与 PAHs 结合特性研究。

表 2 传统猝灭法获取的单组分 Pyr 和 Phe 在 HA 上的 Freundlich 吸附等温模型拟合结果

Table 2 Fitting results of the Freundlich model for binding of single Pyr and Phe by HA using conventional fluorescence quenching method

PAHs	$\log K_{\text{FOC}} / (\mu\text{g} \cdot \text{kgC}^{-1})$	$n$	$\log K_{\text{DOC}} / (\text{L} \cdot \text{kgC}^{-1})$	
			$c_{\text{free}} = 0.05S_w$	$c_{\text{free}} = 0.01S_w$
Pyr	8.66 ± 0.05	0.85 ± 0.02	5.70	5.81
Phe	8.40 ± 0.04	0.88 ± 0.01	4.87	4.95

### 2.3 Pyr, Phe 与 HA 荧光猝灭机理

通过双分子猝灭速率常数 ( $K_q$ ) 可判断 PAHs 与 HA 间是否存动态猝灭<sup>[21]</sup>。  $K_q$  值与猝灭剂分子量、猝灭常数及 PAHs 荧光寿命有关。Aldrich HA 分子量约为 4 000 Da<sup>[20-22]</sup>, 水溶液中 Pyr 和 Phe 荧光寿命参照 Karlitschek 等研究报道<sup>[12]</sup>。通过计算, 单组分 Pyr 和 Phe 最大猝灭速率常数分别为  $2.11 \times 10^{13}$  和  $9.69 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 双组分条件下, Pyr 和 Phe 猝灭速率常数范围分别为  $1.53 \times 10^{13} \sim 1.72 \times 10^{13}$  和  $4.74 \times 10^{12} \sim 6.25 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 均大于水溶液中扩散控制过程最大速率常数  $1 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 表明 Pyr 和 Phe 与 HA 间荧光以静态猝灭形式为主<sup>[6, 21-22]</sup>。

此外, LITRF-PARAFAC 猝灭法拥有时间维度优势, 不仅能计算 PAHs 与 HA 的结合常数, 且能进行 PAHs 荧光寿命分析, 因此该方法可用于区分动态猝灭和静态猝灭机理<sup>[17]</sup>。对直接测量的单组分 Pyr, Phe 和 PAH-HA 归一化荧光衰减曲线及 PARAFAC 解析获取的 Pyr 和 Phe 归一化荧光衰减曲线进行单指数拟合以计算荧光寿命。如表 3 所示, 直接测量受 HA 荧光衰减曲线干扰, 导致 Pyr 和 Phe 荧光寿命均小于其各自单组分寿命。通过 PARAFAC 解析, 消除 HA 荧光干扰, 结果显示 Pyr 和 Phe 荧光寿命在 HA 加入前后无显著性差异, 进一步说明 Pyr 和 Phe 与 HA 间荧光以静态猝灭形式为主<sup>[23]</sup>。

息以判别猝灭机理。此外, LITRF 法测量一个样品仅需约 20 s, 而文献[8]所用激发发射三维荧光法测定一个样品所需时间大于 10 min, 表明 LITRF 法大幅度提升光谱采集速率, 为原位在线研究提供有力保障。文中所用 LITRF 系统激发光波长单一, 266 nm 并不是所有 PAHs 的最佳  $\lambda_{\text{ex}}$ , 进而降低

了目标物检测灵敏度及荧光测定对象的广谱性。若采用更多  $\lambda_{ex}$ , 以荧光衰减时间-激发波长-发射波长-强度四维荧光光谱结合 PARAFAC 分析, 有望实现原位研究 DOM 对更多组分

PAHs 共存时影响, 对深入了解实际水环境中 PAHs 环境行为及其生物有效性有重要意义。

## References

- [1] Sun H F, Yang Y N, Zhu Y X, et al. *Talanta*, 2013, 116(15): 441.
- [2] Mei Y, Wu F C, Wang L Y, et al. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(4): 414.
- [3] Hur J, Kim G. *Chemosphere*, 2009, 75(4): 483.
- [4] Chen S, Ke R H, Zha J M, et al. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(24): 9431.
- [5] Hur J, Lee B M, Shin H S. *Chemosphere*, 2011, 85(8): 1360.
- [6] Gauthier T D, Shane E C, Guerin W F, et al. *Environmental Science & Technology*, 1986, 20(11): 1162.
- [7] DU Ke-zhao, CHEN Jia-ning, CHEN Sheng-neng, et al (杜克钊, 陈佳宁, 陈省能, 等). *Jouanal of Xiamen University • Natural Science (厦门大学学报 • 自然科学版)*, 2008, 1: 131.
- [8] Lu R, Sheng G P, Liang Y, et al. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(4): 2220.
- [9] SUN Hai-feng, ZHU Ya-xian, WU Fang, et al (孙海峰, 朱亚先, 吴芳, 等). *Modern Instruments*, 2012, 18(6): 1.
- [10] Rudnick S M, Chen R F. *Talanta*, 1998, 47(4): 907.
- [11] LIU Yang-zhi, YANG Cheng-hu, ZHU Ya-xian, et al (刘洋之, 杨承虎, 朱亚先, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2016, 36(10): 3332.
- [12] Karlitschek P, Lewitzka F, Bünting U, et al. *Applied Physics B*, 1998, 67(4): 497.
- [13] Andersson C A, Bro R. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2000, 52(1): 1.
- [14] Pan B, Ghosh S, Xing B S. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(18): 6472.
- [15] Plaza C, Xing B S, Fernandez J M, et al. *Environmental Pollution*, 2009, 157(1): 257.
- [16] Chen H, Kenny J E. *Annals of Environmental Science*, 2007, 1(1): 21.
- [17] Laor Y, Rebhun M. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(5): 955.
- [18] Pan B, Xing B S, Liu W X, et al. *Chemosphere*, 2007, 69(10): 1555.
- [19] Yang K, Wang X L, Zhu L Z, et al. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(18): 5804.
- [20] Perre C D, Menach K L, Ibalot F, et al. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 807(7): 51.
- [21] Wang H B, Zhang Y J. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2014, 49(1): 78.
- [22] Pitois A, Abrahamsen L G, Ivanov P I, et al. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, 325(1): 93.
- [23] Chen S, Inskeep W P, Williams S A, et al. *Environmental Science & Technology*, 1994, 28(9): 1582.
- [24] Selli E, Zaccaria C, Sena F, et al. *Water Research*, 2004, 38(9): 2268.

# ***In Situ* Investigation of the Interactions of Pyrene and Phenanthrene with Humic Acid Using Laser Induced Nanoseconds Time Resolved Fluorescence Quenching Method Combined with PARAFAC Analysis**

YANG Cheng-hu<sup>1</sup>, LIU Yang-zhi<sup>1</sup>, ZHU Ya-xian<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>1,3\*</sup>

1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science of China (Xiamen University), College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3. Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China

**Abstract** The fluorescence quenching method using laser-induced nanosecond time-resolved fluorescence (LITRF) combined with parallel factor (PARAFAC) analysis was developed for *in situ* investigation of the interactions of two typical polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), pyrene (Pyr) and phenanthrene (Phe) either singly or in a mixture with Aldrich humic acid (HA). The concentration of free Pyr and Phe cannot be determined directly at the same time because the LITRF spectra of Pyr, Phe and HA are overlapping at the excitation wavelength of 266 nm. The fluorescent interference of HA can be eliminated quick-

ly and effectively, while the fluorescence intensity and fluorescence decay curves of Pyr and Phe can be acquired by LITRF-PARAFAC analysis. The binding characteristics of PAHs with HA were described with Freundlich isothermal model. Nonlinear binding ( $n < 1$ ) and competitive sorption of Pyr and Phe on HA were verified, which showed that the linearity increased ( $n$  tend to be 1) and the single point binding coefficient decreased after the addition of Pyr or Phe. The degree of competition was depended on the concentrations of cosolutes, and competition was much stronger in the case of relatively high competitor concentrations. In addition, the results indicated that the binding characteristics of single component Pyr and Phe with HA obtained with LITRF-PARAFAC quenching method were in accordance with conventional fluorescence quenching method. The quenching mechanism for Pyr and Phe by HA was primarily static quenching which was also verified by quenching rate constant and fluorescence lifetime analyses. The LITRF-PARAFAC quenching method could be used for *in situ* investigate the interactions between mixture of PAHs and HA, which could be applied to predict and evaluate the environmental behavior and ecological risk of PAHs in real time.

**Keywords** Laser-induced nanosecond time-resolved fluorescence; Fluorescence quenching method; Parallel factor analysis; *In Situ*; Humic acid; Pyrene; Phenanthrene

(Received Sep. 27, 2015; accepted Jan. 17, 2016)

\* Corresponding author