

## 光谱校正对溶解有机物三维荧光光谱特征影响

吴华勇<sup>1</sup>, 周泽宇<sup>1</sup>, 王洪涛<sup>1\*</sup>, 陆文静<sup>1</sup>, 孙晓杰<sup>2</sup>

1. 清华大学环境学院, 北京 100084

2. 桂林理工大学环境科学与工程学院, 广西 桂林 541004

**摘要** 在三维荧光光谱(EEM)测定中,由仪器直接记录的光谱(称为未校正光谱)由于受荧光光度计光源灯或探测器等波长特性的影响,并不是荧光物质本身的真实光谱,研究了光谱校正对腐殖酸和色氨酸 EEM 光谱特征以及传统寻峰法和新兴 FRI 分析法结果的影响,结果表明:校正后,  $E_x/E_m=220\sim 450/250\sim 500$  nm 范围内荧光强度降低,  $E_m<250$  nm 范围内荧光强度增大,腐殖酸荧光峰明显“蓝移”。基于寻峰法的荧光指数(FI)和腐殖化指数(HIX)明显减小,自生源指数(BIX)略增;基于 FRI 分析法的反映各区域标准体积百分比  $P_{I,n}$ ,  $P_{II,n}$  和  $P_{III,n}$  明显上升,而  $P_{IV,n}$  和  $P_{V,n}$  显著下降。因此,进行光谱校正是获得真实光谱谱图及光谱特征不可或缺的一部分。

**关键词** 溶解性有机物; 三维荧光光谱; 光谱校正; 荧光指数; FRI 分析法

**中图分类号**: X830.2 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)11-3044-05

### 引言

三维荧光光谱技术(excitation emission matrix, EEM)由于灵敏度高( $10^{-9}$ 数量级)、样品用量小(1~2 mL)、不破坏样品结构、选择性高和操作方便等优点,被广泛应用于表征海洋、湖泊、河流等自然水体中的溶解性有机物(dissolved organic matter, DOM)<sup>[1-3]</sup>,也逐渐应用于定性和定量分析给水和废水系统中的有机污染物<sup>[4-6]</sup>。由于三维荧光光谱反映了荧光强度(FI)随激发波长( $E_x$ )和发射波长( $E_m$ )变化的情况,因而能提供比传统荧光光谱更丰富的光谱信息,被称为荧光物质的指纹。光谱特征如荧光峰强度、荧光峰斜率等和特定区域面积可以用来识别和表征不同类型的 DOM。

由于受到激发光源或探测器光谱特性的影响,仪器直接记录的荧光光谱通常带有这些仪器特性,并非所研究物质的真实光谱,这样的光谱称为未校正光谱<sup>[7]</sup>。未校正光谱的谱峰位置和谱峰强度与真实光谱都有一定区别,因此要获得真实光谱首先必须进行光谱校正以去除仪器特性的影响。目前大部分学者在进行 EEM 光谱特征的提取和识别过程中,由于忽视了光谱校正的重要性和必要性,基于未校正光谱分析结果得出结论的可靠性和准确性值得商榷,这也可能是不同学者间的研究结论存在不一致性的原因之一<sup>[8]</sup>。

本研究应用 Murphy 等<sup>[9]</sup>推荐的光谱校正和标准化方法获得了腐殖酸和色氨酸的真实 EEM,探讨了光谱校正前后 EEM 光谱特征以及传统寻峰法和新兴 FRI 分析法结果的差异,阐明了光谱校正和标准化在 EEM 应用中的重要性 and 必要性。

### 1 实验部分

#### 1.1 DOM 样品制备与提取

腐殖酸钠(Humic acid sodium salt, Sigma, USA)和 L-色氨酸(L-tryptophan, 天津市光复精细化工研究所)溶于去离子水中并经  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤。溶液总有机碳浓度(dissolved organic carbon, DOC)采用 TOC-VCPH(岛津公司,日本)测定,并将其浓度归一化为  $\mu\text{g-DOC/L}$ 。

#### 1.2 光谱校正

根据日本日立 F-7000 型荧光分光光度计随机附带的光谱校正工具组件校正方法,使用罗丹明 B 标准液,波长扫描模式,激发光谱  $200\sim 600$  nm 波长扫描,获得荧光激发光谱校正因子。而后使用扩散子,通过波长扫描模式,发射和激发光谱  $200\sim 600$  nm 波长扫描,获得荧光发射光谱校正因子。

#### 1.3 荧光光谱测定

收稿日期: 2012-04-24, 修订日期: 2012-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(40872151)资助

作者简介: 吴华勇, 1983 年生, 清华大学环境学院博士研究生

e-mail: wuhy02@mails.thu.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: htwang@tsinghua.edu.cn

采用  $0.37 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 分别将腐殖酸溶液和色氨酸溶液稀释不同浓度梯度。稀释后溶液采用日本岛津 UV-2401 PC 型紫外-可见分光光度计测定紫外-可见吸收光谱, 波长扫描范围为  $200 \sim 700 \text{ nm}$ 、狭缝宽度  $1 \text{ nm}$ ; 溶液的 EEM 光谱采用日本日立 F-7000 型荧光分光光度计测定。激发波长 (Ex) 为  $220 \sim 450 \text{ nm}$ , 狭缝宽度  $5 \text{ nm}$ , 增量  $5 \text{ nm}$ ; 发射波长 (Em)  $280 \sim 550 \text{ nm}$ , 狭缝宽度  $5 \text{ nm}$ , 增量  $2 \text{ nm}$ , PMT 电压  $700 \text{ V}$ , 扫描速度  $2400 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

#### 1.4 光谱校正和标准化

采用 Murphy 等<sup>[9]</sup>推荐的方法对 EEM 光谱进行校正和标准化: (1) 光谱校正: 将原始谱图的谱峰强度乘以相应激发波长和发射波长处的校正因子即为校正后的荧光强度, 即  $F^{\text{Corr}} = f^{\text{Excorr}} = f^{\text{Emcorr}} F$ , 式中  $F$  为原始谱图荧光强度,  $f^{\text{Excorr}}$  和  $f^{\text{Emcorr}}$  分别为相应激发和发射波长处校正因子,  $F^{\text{Corr}}$  为校正后的荧光强度。(2) 荧光内滤效应校正: 采用溶液的紫外-可见吸收光谱对校正后的荧光强度进行荧光内滤效应校正, 即  $F^{\text{IFE}} = F^{\text{Corr}} \cdot 10^{0.5(A_{\text{Ex}} + A_{\text{Em}})}$ , 式中  $F^{\text{IFE}}$  为荧光内滤效应校正后荧光强度,  $A_{\text{Ex}}$  和  $A_{\text{Em}}$  分别为相应激发和发射波长处的吸光度。(3) 标准化: 荧光内滤效应校正后荧光强度与拉曼峰面积比值即单位为 RU 的荧光强度。拉曼峰面积通过测定 Milli-Q 水的发射光谱获得 (Ex =  $350 \text{ nm}$ , Em =  $365 \sim 450 \text{ nm}$ , 狭缝宽度  $5 \text{ nm}$ , 增量  $1 \text{ nm}$ )。(4) 光谱散射峰去除: 荧光谱图扣除空白 ( $0.37 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 8.0 磷酸盐溶液) 可去除大部分散射峰 (一级、二级瑞利散射、一级拉曼散射), 其余部分采用切割和内插的方法去除<sup>[10]</sup>。直接从第二步开始获得的光谱为未校正的光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 光谱校正因子

一般来说, 光源 (常用的氙灯等) 在不同波长下的发射能量并不是一个定值, 发射单色器和光电倍增管的光谱特征在

所检测波长范围内不是一条直线, 因此消除仪器光源、单色器和光电倍增管的光谱特征影响, 才能得到荧光物质的真实光谱<sup>[7]</sup>。本研究所用的荧光分光光度计的光谱校正因子曲线如图 1 所示。由图可知, 在  $250 \sim 500 \text{ nm}$  附近, 荧光发射光谱校正因子大约为 1.0 左右, 波长  $250 \text{ nm}$  以下和  $500 \text{ nm}$  以上校正因子均明显大于 1.0。对于荧光激发光谱校正因子,  $220 \sim 450 \text{ nm}$  范围内校正因子均小于 1.0, 而  $600 \text{ nm}$  以上, 校正因子明显增大。因此, 可以想象, 波长  $250 \sim 500 \text{ nm}$  范围, 校正后荧光强度降低, 而长波长处 (大于  $500 \text{ nm}$ ) 则校正后荧光强度大幅增加。

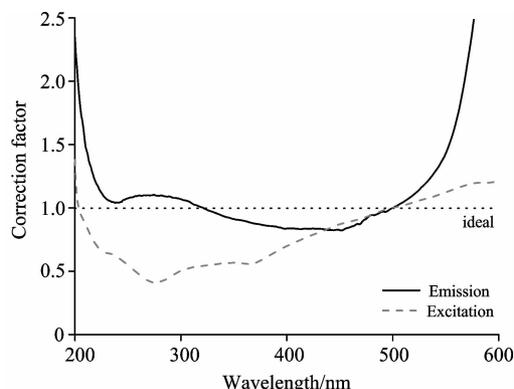


Fig. 1 Fluorescence correction factor of excitation and emission spectra

### 2.2 光谱校正对 EEM 荧光指数分析结果的影响

腐殖酸和色氨酸溶液的校正前后 EEM 图谱如图 2 和图 3 所示。校正后, 荧光峰位置和强度均发生了明显变化。总体上来讲, Ex/Em =  $220 \sim 450/250 \sim 500$  范围荧光强度降低, 而 Em <  $250 \text{ nm}$  时荧光强度增大, 从而导致荧光峰位置向低激发波长方向偏移。校正前后, 荧光峰位置及强度如表 1 所示。对于腐殖酸, 校正前后荧光峰强度和位置的变化尤为显著。未校正前, 腐殖酸的峰位于 Ex/Em =  $280/430$  处,

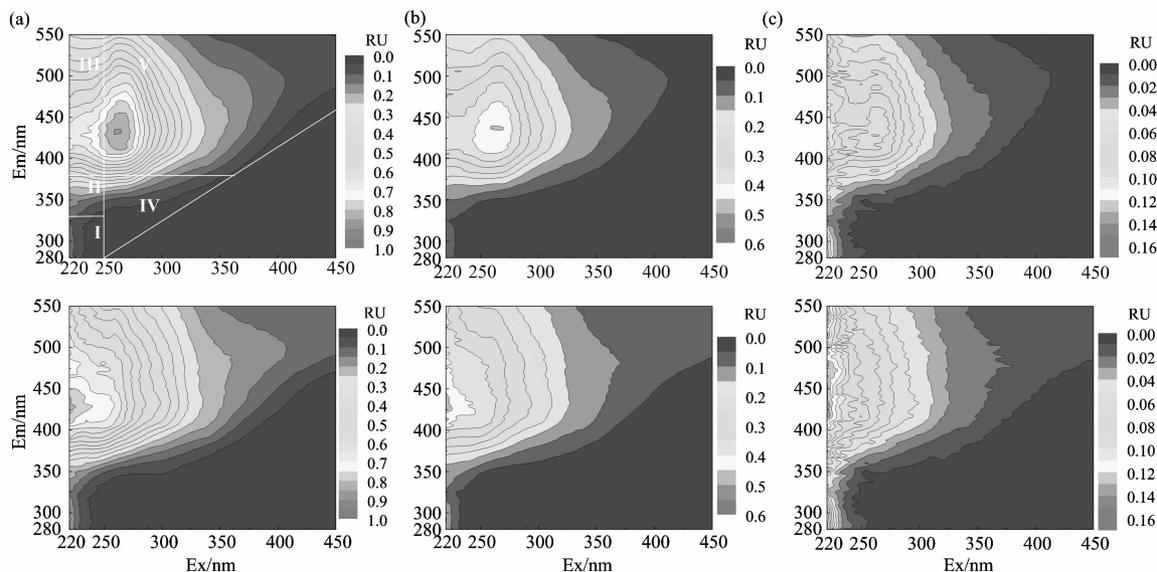


Fig. 2 EEMs for uncorrected (top) and corrected (bottom) spectra of humic acid

(a):  $2000 \mu\text{g-DOC} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b):  $1000 \mu\text{g-DOC} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (c):  $200 \mu\text{g-DOC} \cdot \text{L}^{-1}$

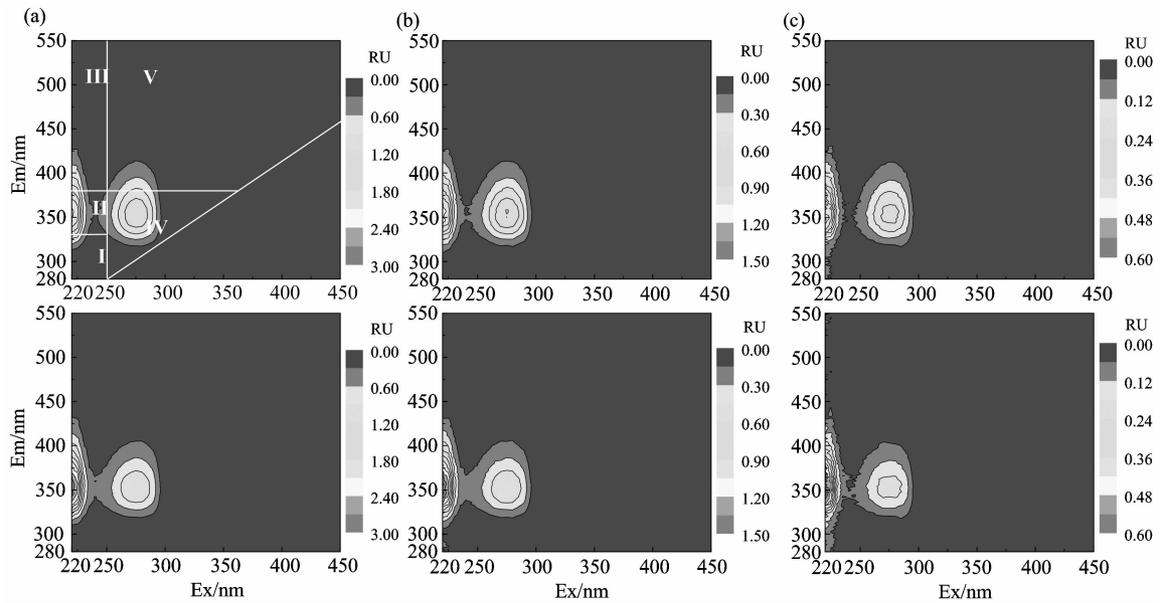


Fig. 3 EEMs for uncorrected (top) and corrected (bottom) spectra of tryptophan

(a): 60  $\mu\text{g}\cdot\text{DOC}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (b): 30  $\mu\text{g}\cdot\text{DOC}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (c): 12  $\mu\text{g}\cdot\text{DOC}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 1 Fluorescence peaks for uncorrected and corrected spectra of humic acid and tryptophan

	Concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{DOC}/\text{L}$ )	Uncorrected		Corrected	
		Ex/Em/nm	Intensity	Ex/Em/nm	Intensity
Humic acid	2 000	280/430	1.061	220/426	1.102
	1 000	280/436	0.547	220/414	0.594
	200	280/428	0.147	220/428	0.183
Tryptophan	60	220, 275/352	2.197, 1.496	220, 275/350	2.968, 1.173
	30	220, 275/358	1.093, 0.761	220, 275/356	1.475, 0.590
	12	220, 275/352	0.509, 0.274	220, 275/352	0.694, 0.219

而校正后, 峰位置“蓝移”至  $\text{Ex}/\text{Em}=220/430$ , 并且峰值强度有所升高。

EEM 荧光强度和谱峰位置的变化同样会引起反映其某些特定性质的荧光光谱指标数值的变化。传统的荧光光谱分析方法亦称为寻峰法 (peak picking), 主要根据特定波长处的荧光强度或者荧光强度比值进行量化的表征<sup>[11, 12]</sup>。基于水样中陆源和微生物源荧光物质的光谱差异, McKnight 等<sup>[13]</sup>引入了荧光指数 (fluorescence intensity ratio, FI) 用来区分 DOM 的不同来源。FI 指数定义为 370 nm 波长激发下, 发射波长在 450 和 500 nm 处的荧光强度比值, 该值在 1.4 左右时代表陆地或土壤源输入, 而 1.9 左右时代表微生物活

动引起的自生来源。类似 FI 指数, 自生源指数 (biological index, BIX) 反映 DOM 中自生贡献比例的指标, 定义为 254 nm 波长激发下, 发射波长在 380 和 430 nm 处的荧光强度比值<sup>[14]</sup>。BIX 值大于 1 时代表生物或细菌引起的自生来源, 而介于 0.6~0.7 之间时代表陆地源输入或受人类影响较大。腐殖化指数 (humification index, HIX) 表征 DOM 的腐殖化程度或成熟度, 定义为波长 254 nm 激发下, 发射波长在 435~480 nm 与 300~345 nm 波段内的荧光强度平均值的比值<sup>[15]</sup>。HIX 小于 4 时, 说明 DOM 腐殖化程度较弱, 而高达 10~16 时, 则说明 DOM 具有显著的腐殖质特征。

光谱校正前后荧光指数如表 2 所示。校正后, FI 指数和

Table 2 Fluorescence-derived indices for uncorrected and corrected spectra of humic acid and tryptophan

	Concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{DOC}/\text{L}$ )	Uncorrected			Corrected		
		FI	BIX	HIX	FI	BIX	HIX
Humic acid	2 000	1.098	0.387	27.0	0.905	0.399	23.7
	1 000	1.142	0.403	19.3	0.941	0.415	17.0
	200	1.013	0.401	26.2	0.848	0.414	22.8
Tryptophan	60	2.069	0.749	0.107	1.704	0.772	0.094
	30	1.708	0.834	0.117	1.398	0.860	0.103
	12	0.805	1.283	0.179	0.667	1.322	0.159

HIX 指数减小, 而 BIX 指数略增。例如, 2 000  $\mu\text{g-DOC/L}$  腐殖酸溶液, 校正前 FI 指数为 1.098, HIX 指数为 27.0, 校正后 FI 指数减小为 0.905, HIX 指数减小为 23.7; 相反, 校正前 BIX 指数为 0.387, 校正后 BIX 指数较增大为 0.399。总体来讲, 校正后 FI 指数和 HIX 指数分别为校正前的 0.824 倍和 0.87 倍, 而校正后 BIX 指数为校正前的 1.031 倍。由此可见, 光谱校正对 FI 指数和 HIX 指数的影响较为显著。

### 2.3 光谱校正对 EEM 光谱特征 FRI 分析结果的影响

传统分析方法只用到了荧光峰位置、峰强, 强度比例, 相对于三维荧光光谱数以万计的光谱数据, 实际利用到的数

据相对有限, 因此无法定量分析复杂 DOM 的细微变化。近几年新发展起来的荧光区域综合指数 FRI (fluorescence regional integration, FRI) 方法综合利用整个 EEM 光谱数据, 因而能定量区分 EEM 的细微变化, 提高了谱图的识别能力<sup>[16-19]</sup>。Chen 等<sup>[19]</sup>将 EEM 谱图分为 5 个区域: 区域 I (Ex/Em=220~250/280~330 nm), 为络氨酸类蛋白质; 区域 II (Ex/Em=220~250/330~380 nm); 为色氨酸类蛋白质, 区域 III (Ex/Em=220~250/380~550 nm), 为类富里酸; 区域 IV (Ex/Em=250~400/280~380 nm), 为溶解性微生物代谢产物; 区域 V (Ex/Em=250~400/380~550 nm), 为类腐殖酸。通过计算特定区域标准体积 ( $\Phi_{i,n}$ ) 和各区域标准体积百分比 ( $P_{i,n} = 100 \times \Phi_{i,n} / \Phi_{T,n}$ ,  $\Phi_{T,n}$  为整体区域标准体积) 反映对应区域具有特定结构荧光物质的含量和相对含量。

光谱校正前后, FRI 指数如图 4 所示。总体来说, 校正后, I, II 和 III 区域标准体积百分比有所上升, 而 IV 和 V 区域标准体积百分比显著下降。校正后, I 区络氨酸类蛋白质  $P_{I,n}$  提高了 20% 左右, II 区色氨酸类蛋白质  $P_{II,n}$  和 III 区类富里酸  $P_{III,n}$  均提高了 5~10%, 而 IV 区溶解性微生物代谢产物  $P_{IV,n}$  和 V 区类腐殖酸  $P_{V,n}$  分别下降了 20~30% 和 10~20%。并且, 光谱校正前后 FRI 指数变化幅度与溶液浓度有关。例如, 色氨酸浓度为 60, 30 和 12  $\mu\text{g-DOC/L}$  时, II 区色氨酸类蛋白质  $P_{II,n}$  校正后的分别提高了 9.1%, 8.2% 和 6.7%。腐殖酸浓度为 2 000, 1 000 和 200  $\mu\text{g-DOC/L}$  时, 校正后 V 区类腐殖酸  $P_{V,n}$  分别下降了 14.4%, 14.8% 和 17.7%。

## 3 结 论

光谱校正对 EEM 光谱特征以及传统寻峰法和新兴的 FRI 分析结果均有显著影响。校正后, Ex/Em=220~450/250~500 nm 范围内荧光强度降低, Em<250 nm 范围内荧光强度增大, 从而也导致腐殖酸荧光峰发生明显“蓝移”。EEM 荧光强度和谱峰位置的变化同样会引起反映其某些特定性质的荧光指标数值的变化。校正后, 基于寻峰法的 FI 指数和 HIX 指数明显减小, 而 BIX 指数略增; 基于 FRI 分析法的反映各区域标准体积百分比的  $P_{I,n}$ ,  $P_{II,n}$  和  $P_{III,n}$  明显上升, 而  $P_{IV,n}$  和  $P_{V,n}$  显著下降。因此, 进行光谱校正是获得真实光谱谱图及特征不可或缺的。

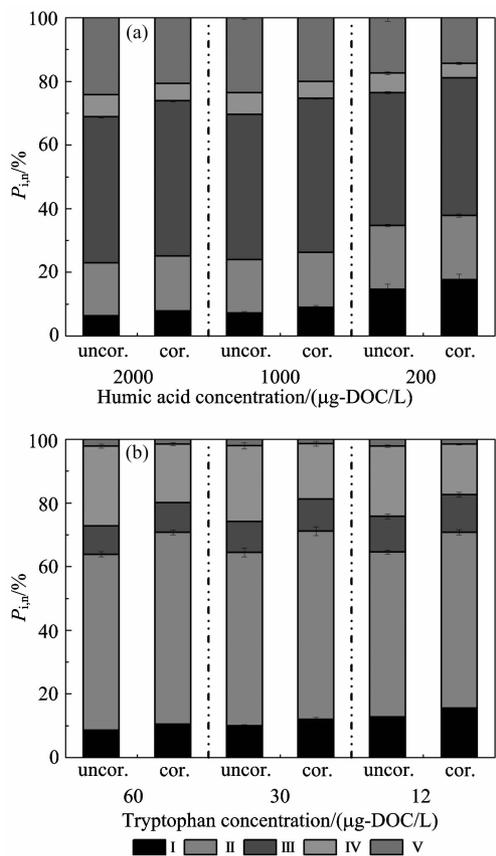


Fig. 4 FRI Distribution for uncorrected (uncor.) compared with corrected (cor.) spectra in concentration gradients for (a) humic acid and (b) tryptophan

## References

- [1] Coble P G. Marine Chemistry, 1996, 51: 325.
- [2] Stedmon C A, Amon R M W, Rinehart A J, et al. Marine Chemistry, 2011, 124(1-4): 108.
- [3] Yao X, Zhang Y L, Zhu G W, et al. Chemosphere, 2011, 82(2): 145.
- [4] Bridgeman J, Bierzoza M, Baker A. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 2011, 10: 277.
- [5] Henderson R K, Baker A, Murphy K R, et al. Water Research, 2009, 43: 863.
- [6] DENG Xun, GUO Wei-dong, ZHUO Jian-fu (邓荀, 郭卫东, 卓健富). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2012, 32(1): 137.
- [7] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, 2008.

- [ 8 ] Hudson N , Baker A , Reynolds D . *River Resources*, 2007, 23(4): 631.
- [ 9 ] Murphy K R , Burler K D , Spencer R M , et al . *Environmental Science & Technology*, 2010, 44: 9405.
- [10] Bahram M , Bro R , Stedmon C , et al . *Journal of Chemometrics*, 2006, 20(3-4): 99.
- [11] Kalbitz K , Schmerwitz J , Schwesig D , et al . *Geoderma*, 2003, 103: 273.
- [12] Birdwell J E , Engel A S . *Organic Geochemistry*, 2010, 41: 270.
- [13] McKnight D M , Boyer E W , Westerhoff P K , et al . *Limnology and Oceanography*, 2001, 46: 38.
- [14] Huguet A , Vacher L , Relexans S , et al . *Organic Geochemistry*, 2009, 40: 706.
- [15] Zsolnay A , Baigar E , Jimenez M , et al . *Chemosphere*, 1999, 38: 45.
- [16] Wu H Y , Zhou Z Y , Zhang Y X , et al . *Bioresource Technology*, 2012, 110: 174.
- [17] He X S , Xi B D , Wei Z M , et al . *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190: 293.
- [18] Hernandez-Ruiz S , Abrell L , Wickramasekara S , et al . *Water Research*, 2012, 46(4): 943.
- [19] Chen W , Westerhoff P , Leenheer J A , et al . *Environmental Science & Technology*, 2003, 37: 5701.

## Effect of Spectra Correction on the Fluorescence Characteristics of Dissolved Organic Matter

WU Hua-yong<sup>1</sup>, ZHOU Ze-yu<sup>1</sup>, WANG Hong-tao<sup>1\*</sup>, LU Wen-jing<sup>1</sup>, SUN Xiao-jie<sup>2</sup>

1. School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2. School of Environmental Science and Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

**Abstract** The Excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectra of dissolved organic matter (DOM) are not only dependent on the chemical structure of DOM as well as the local chemical environment around the DOM, but also dependent on the instrument employed for the analysis. Thus, in order to get the real spectra of the DOM, spectra correction of the effect of the instrument-specific response is necessary. However, some studies corrected DOM spectra, while still some studies didn't, leading to inconformity when comparing the data and the results from different groups. The present work evaluated the effect of spectra correction on the fluorescence characteristics of DOM. The results demonstrated that DOM spectra differed significantly after correction. Fluorescence intensities showed a decrease in the range of  $Ex/Em=220\sim 450/250\sim 500$  nm, while an increase at  $Em<250$  nm after correction. Fluorescence intensity ratio (FI) and humification index (HIX) derived from peak picking method showed a decrease after correction, while biological index (BIX) increased slightly.  $P_{I,n}$ ,  $P_{II,n}$  and  $P_{III,n}$  derived from FRI analysis exhibited a significant increase, while  $P_{IV,n}$  and  $P_{V,n}$  decreased. The results suggest that spectral correction should be included when analyzing the properties and trends of the DOM using EEM.

**Keywords** Dissolved organic matter; Excitation-emission matrix (EEM); Spectra correction; Fluorescence intensity; Fluorescence regional integration (FRI)

(Received Apr. 24, 2012; accepted Jul. 4, 2012)

\* Corresponding author