

# 溶解态菲及其中间代谢产物 1-羟基-2-萘甲酸的同时测定

岑秋霖<sup>1</sup>, 朱亚先<sup>2</sup>, 张 勇<sup>1\*</sup>

(1. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 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 化学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 运用导数-同步荧光光谱建立了快速同时测定溶解态菲(Phenanthrene, Phe)及其中间代谢产物 1-羟基-2-萘甲酸(1-Hydroxy-2-naphthoic acid, 1H2NA)的分析方法。所建方法同时测定 Phe 与 1H2NA 的线性范围分别为  $4.0 \sim 1.0 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  和  $4.0 \sim 1.2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ , 检出限分别为  $0.08 \mu\text{g/L}$  和  $0.07 \mu\text{g/L}$ , 加标回收率分别为 96.5%~105.3% 和 99.2%~106.5%, 相对标准偏差均小于 1.0%。该方法可应用于实验室条件下溶解态 Phe 微生物降解过程中 Phe 和 1H2NA 的测定, 具备原位研究 Phe 降解过程中中间代谢产物 1H2NA 的应用潜力。

**关键词:** 菲; 1-羟基-2-萘甲酸; 中间代谢产物; 导数-同步荧光法

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2018)03-0350-05

## Simultaneous Determination of Phenanthrene and Its Intermediate Metabolite 1-Hydroxy-2-naphthoic Acid in Aqueous Solution

CEN Qiu-lin<sup>1</sup>, ZHU Ya-xian<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>1\*</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. Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** A novel method for the simultaneous determination of dissolved phenanthrene(Phe) and its intermediate metabolite 1-hydroxy-2-naphthoic acid(1H2NA) in aqueous solution was established by using derivative synchronous fluorescence spectroscopy. The linear dynamic ranges for the determination of Phe and 1H2NA were  $4.0 - 1.0 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  and  $4.0 - 1.2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ , with the detection limits of  $0.08 \mu\text{g/L}$  and  $0.07 \mu\text{g/L}$ , and the spiked recoveries of 96.5% - 105.3% and 99.2% - 106.5%, respectively. And the relatively standard deviations were less than 1.0%. The established method was successfully applied in the determination of Phe and 1H2NA during biodegradation of dissolved Phe in lab, which showed that it has a potential in *in situ* determination of Phe and 1H2NA.

**Key words:** phenanthrene; 1-hydroxy-2-naphthoic acid; metabolites; derivative synchronous fluorescence spectroscopy

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)因其“三致效应”和内分泌干扰效应备受关注<sup>[1-3]</sup>。研究表明, PAHs 降解过程中的含氧代谢产物比其母体毒性更大<sup>[4]</sup>, 因此须追踪 PAHs 微生物降解中间代谢产物变化规律, 深入了解 PAHs 降解机制<sup>[5]</sup>。菲(Phenanthrene, Phe)常作为研究 PAHs 微生物降解过程的模式化合物<sup>[6]</sup>, 其中 1-羟基-2-萘甲酸(1-Hydroxy-2-naphthoic acid, 1H2NA)是 Phe 重要的中间代谢产物<sup>[7]</sup>。Phe 降解通路多样性主要通过 1H2NA 的转化和再代谢方式体现<sup>[8]</sup>; 当双加氧酶特异性作用于 Phe 的 3, 4 碳位后可将 Phe 代谢为 1H2NA<sup>[9]</sup>; 此外, 高环 PAHs(芘<sup>[10]</sup>、苯并芘<sup>[11]</sup>等)及 PAHs 衍生物(1-甲基-菲<sup>[12]</sup>等)的微生物降解通路研究均可检出 1H2NA。因此, 建立 Phe、1H2NA 的原位、在线检测方法, 有助于深入探讨 PAHs 的微生物降解机制。

现有 Phe 及其微生物降解产物测定方法多采用气相色谱-质谱、液相色谱、液相色谱-质谱

收稿日期: 2017-10-11; 修回日期: 2017-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21577110, 21627814)

\* 通讯作者: 张 勇, 博士, 教授, 研究方向: 环境化学, Tel: 0592-2188685, E-mail: yzhang@xmu.edu.cn

法<sup>[13-15]</sup>。色谱法具有选择性好、灵敏度高、检测通量大等特点,但其前处理步骤繁琐、耗时长、操作复杂,且破坏了目标物在降解过程中的原始赋存状态,难以实现溶解态目标物的原位、在线检测。另外,PAHs 微生物降解过程中,大部分中间代谢产物再代谢速度快,不易积累<sup>[16]</sup>,使原位测定溶解态 PAHs 降解过程中代谢产物成为挑战。荧光分析法具备原位在线检测的特点<sup>[17-18]</sup>,而导数-同步荧光法可窄化谱图、提高选择性,能用于多组分的同时测定<sup>[19-22]</sup>。

本文拟运用导数-同步荧光光谱法建立一种快速同时测定溶解态 Phe 和 1H2NA 的新方法,以期原位研究 PAHs 降解过程及其中间代谢产物,为实现原位、在线研究 PAHs 降解通路提供方法基础。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Phe(纯度 >98%, Sigma-Aldrich 公司,美国); 1H2NA(纯度 >98%, 东京化成工业,日本); MSM 无机盐培养基<sup>[23]</sup>; 富营养培养基 2216E(青岛海博生物技术有限公司); 无水乙醇(分析纯,西陇化工股份有限公司); 实验用水为 Milli-Q 水。

FLS 920 型纳秒时间分辨荧光光谱仪(Edinburgh Instrument 公司,英国); GI54DWS 高压灭菌器(Zealway 公司,美国); Sky 2102C 恒温振荡器(上海苏坤实业有限公司); Universal 320R 高速冷冻离心机(Hettich 公司,德国); VS-840K-U 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(500 W, 昆山公司)。

降解菌 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1, 由韩国海洋研究与发展院提供<sup>[24]</sup>。

### 1.2 实验方法

分别准确称取 0.100 3 g Phe 和 0.100 5 g 1H2NA 配成 1.00 g/L 的乙醇储备液,避光置于 4 °C 冰箱保存。实验时采用逐级稀释法得到 Phe 和 1H2NA 不同浓度的工作液。实验在 MSM 溶液(pH 7.0)体系中进行。

仪器激发和发射狭缝均为 3 nm; 测量精度为 0.5 nm。

Phe 微生物降解实验参考文献[23],以 600 nm 吸光值( $OD_{600}$ )表示微生物量。设置 3 组平行实验,每隔一定时间移取适量降解液至比色皿中进行荧光光谱扫描。

## 2 结果与讨论

### 2.1 1H2NA 的荧光光谱

2.1.1 1H2NA 的荧光光谱分析 Sivakumar 等<sup>[25]</sup>的研究表明,1H2NA 水溶液在 342 nm 处有最大吸收峰。本实验降解体系溶液为 MSM 溶液。为考察降解体系是否影响单组分 1H2NA 的测定,比较了 Milli-Q 水和 MSM 溶液中 1H2NA 的荧光发射光谱(图 1)。结果表明,MSM 溶液中 1H2NA 的荧光发射强度、峰位置未受影响。

#### 2.1.2 体系 pH 值对 1H2NA 荧光光谱的影响

1H2NA 含有羧基和羟基,体系 pH 值可能影响其荧光光谱的形状和强度<sup>[26]</sup>。图 2 结果表明,溶液 pH > 8.0 或 pH < 6.0 时,1H2NA 的荧光发射信号强度降低,且酸性介质使 1H2NA 的最大发射峰

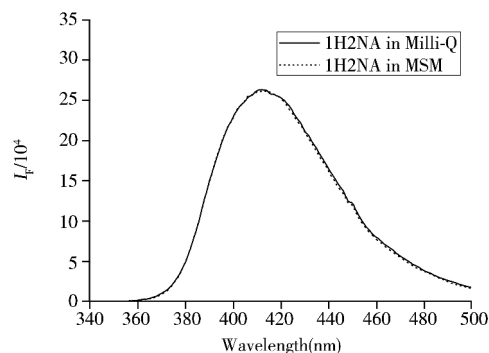


图 1 1H2NA 在 Milli-Q 水和 MSM 溶液中的荧光发射光谱

Fig. 1 Emission fluorescence spectra of 1H2NA in Milli-Q and MSM solution  
[1H2NA] =  $1.0 \times 10^3$   $\mu\text{g/L}$ ;  $\lambda_{\text{ex}, 1\text{H}2\text{NA}} = 344$  nm

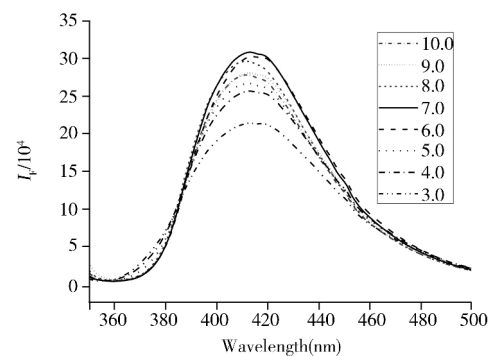


图 2 不同 pH 值下 1H2NA 的荧光发射光谱

Fig. 2 Emission fluorescence spectra of 1H2NA at different pH values  
[1H2NA] =  $1.0 \times 10^3$   $\mu\text{g/L}$

红移。另外, Phe 降解过程中的三羧酸循环过程会产生酸性物质, 基于此考察溶解态 Phe 降解过程中体系 pH 值的变化。实验结果显示, 在整个实验周期内, 降解体系的 pH 值可保持在中性 (pH 6.9 ~ 7.1)。因此, 选取 pH 7.0 为实验条件。

## 2.2 导数 - 同步荧光光谱同时测定 Phe 与 1H2NA

### 2.2.1 Phe 与 1H2NA 共存下的同步荧光光谱

Phe、1H2NA 在 MSM 溶液中的荧光发射光谱如图 3A 所示。体系中 Phe 与 1H2NA 的发射光谱部分重叠, 影响传统荧光方法对二者的同时测定。考察不同  $\Delta\lambda$  下 ( $\Delta\lambda = 45 \sim 79$  nm, 间隔 2 nm) Phe 和 1H2NA 的同步荧光光谱特征。当选取  $\Delta\lambda = 69$  nm 为 Phe、1H2NA 混合组分的同步荧光光谱测定条件 (图 3B) 时, Phe 和 1H2NA 的荧光光谱分辨率较好且荧光强度最强, 可实现二者的同时测定。

### 2.2.2 Phe 与 1H2NA 共存下的导数 - 同步荧光光谱

由图 3B 可知, 1H2NA 的同步荧光光谱峰宽, 且降解过程中其含量低、变化快<sup>[12]</sup>。本实验研究结果表明, 当 1H2NA 的质量浓度为 10.0  $\mu\text{g/L}$  时, 其信噪比 ( $S/N$ ) 仅为 12。因此有必要进一步改善方法的灵敏度。同步荧光法结合导数技术可改善分辨能力, 排除基体干扰, 有利于提高方法选择性和灵敏度<sup>[26]</sup>。Phe 和 1H2NA 的导数 - 同步光谱如图 4 所示, 选定 296 nm 和 352 nm 分别为 Phe 和 1H2NA 的导数 - 同步荧光峰, 此时目标物的信噪比最大, 1H2NA 的检测灵敏度明显改善。

## 2.3 工作曲线、线性范围及检出限

在 Phe 和 1H2NA 的混合液中固定其中一种组分浓度, 配制另一组分的一系列浓度标准溶液。在优化实验条件下, Phe 和 1H2NA 的测定结果见表 1。结果表明, 混合物体系中目标物浓度 ( $x$ ,  $\mu\text{g/L}$ ) 与其导数 - 同步荧光信号 ( $y$ ) 呈良好的线性关系; 方法的相对标准偏差 (RSD) 小于 1.0%; 以 3 倍空白样的标准偏差除以标准曲线方程的斜率, 得 Phe 和 1H2NA 的检出限 (LOD) 分别为 0.08  $\mu\text{g/L}$  和 0.07  $\mu\text{g/L}$ 。1H2NA 的 LOD 较气相色谱法<sup>[27]</sup> 的 0.3  $\mu\text{g/L}$  明显改善。

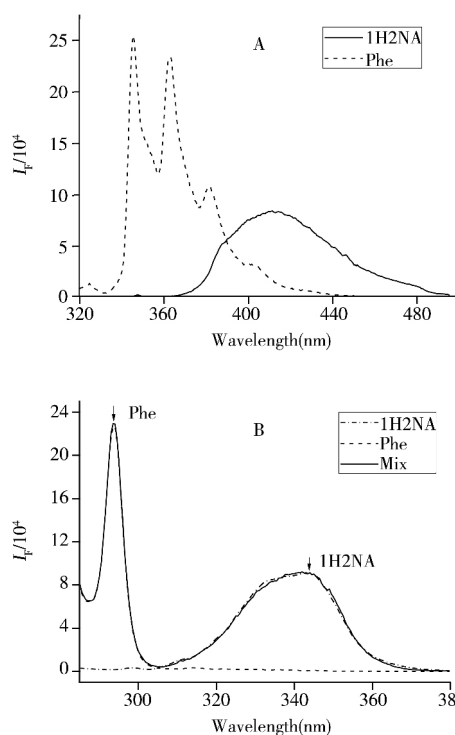


图 3 Phe 和 1H2NA 的荧光发射光谱 (A) 和同步光谱 (B)

Fig. 3 Emission fluorescence spectra (A) and synchronous fluorescence spectra (B) of Phe and 1H2NA

[Phe] =  $4.0 \times 10^2$   $\mu\text{g/L}$ , [1H2NA] =  $4.0 \times 10^2$   $\mu\text{g/L}$ ;  
 $\lambda_{\text{ex, Phe}} = 293$  nm,  $\lambda_{\text{ex, 1H2NA}} = 344$  nm,  $\Delta\lambda = 69$  nm

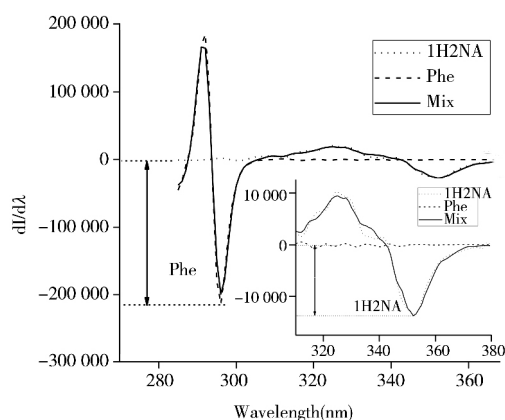


图 4 Phe 和 1H2NA 混合体系的导数 - 同步荧光光谱  
 Fig. 4 Derivative synchronous fluorescence spectra of Phe and 1H2NA

[Phe] =  $4.0 \times 10^2$   $\mu\text{g/L}$ , [1H2NA] =  $4.0 \times 10^2$   $\mu\text{g/L}$ ;  
 $\Delta\lambda = 69$  nm, number of scans: 5

表 1 导数 - 同步荧光光谱法的分析特性

Table 1 Analytical merits of the derivative synchronous fluorescence spectroscopy

Compound	Coexisting compound	Calibration equation	Linear range ( $\mu\text{g/L}$ )	Correlation coefficient	Detection limit ( $\mu\text{g/L}$ , $n = 9$ )	RSD (% , $n = 9$ )
Phe	1H2NA: $4.0 \times 10^2$ $\mu\text{g/L}$	$y = -728.9x + 3694$	$4.0 \sim 1.0 \times 10^3$	0.998 3	0.08	0.51
1H2NA	Phe: $4.0 \times 10^2$ $\mu\text{g/L}$	$y = -27.5x + 50.2$	$4.0 \sim 1.2 \times 10^3$	0.998 2	0.07	0.42

## 2.4 回收率实验

取降解 8 h 后的样品过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 分别向样品中加入一定浓度 Phe 和 1H2NA 混合物的标准品进行回收率实验, 每组设置 3 个平行样, 结果见表 2。本方法同时测定 Phe 和 1H2NA 的回收率分别为 96.5%~105.3% 和 99.2%~106.5%, 均可满足实验要求。

表 2 样品的加标回收率

Table 2 Recoveries of standard addition experiments

Compound	Added( $\mu\text{g/L}$ )	Recovery( %)	RSD( % , $n=3$ )
Phe	600.0, 60.0, 6.0, 6.0	97.6, 96.5, 104.9, 105.3	0.44, 2.2, 0.29, 2.2
1H2NA	6.0, 60.0, 600.0, 6.0	106.5, 99.2, 102.1, 101.4	1.3, 2.4, 4.7, 2.0

## 2.5 Phe 降解过程中 Phe 与 1H2NA 的同时测定

溶解态 Phe 的微生物降解实验结果见图 5。空白实验结果表明, 降解菌不干扰 Phe 和 1H2NA 的测定。实验周期内, 随着 Phe 的降解, 1H2NA 不断积累, 在 Phe 近乎完全降解时, 1H2NA 积累量达到最大, 之后降解菌继续降解 1H2NA。参考文献 [7], 根据  $\alpha = n(1\text{H}2\text{NA})_{\text{max}}/n(\text{Phe})_{\text{init}}$  (其中  $n(1\text{H}2\text{NA})_{\text{max}}$  表示 1H2NA 的最大积累摩尔浓度,  $n(\text{Phe})_{\text{init}}$  表示 Phe 的初始摩尔浓度) 计算可知, 本实验过程中约有 33.2% 的 Phe 被降解菌转化成 1H2NA。

综上, 所建方法实现了降解过程中溶解态 Phe 及其中间代谢产物 1H2NA 的同时测定, 且可用于 1H2NA 的动态变化测定; 方法操作简便, 具备原位在线研究 PAHs 微生物降解机理的应用潜力。

## 3 结论

上述实验结果表明, 运用导数-同步荧光光谱法可同时测定 Phe 和 1H2NA, 方法灵敏度高、检出限较色谱法改善近 4 倍。本方法无需前处理分离, 操作简便, 省时省力, 为原位在线测定 PAHs 及其中间代谢产物并进一步研究 PAHs 降解机制提供了可能。在此基础上, 今后将进一步研究多种代谢产物的原位同时测定, 为 PAHs 微生物降解通路机制的原位研究提供新方法。

### 参考文献:

- [1] Zheng B H, Wang L P, Lei K, Nan B X. *Chemosphere*, **2016**, 149: 91-100.
- [2] Yin S S, Tang M L, Chen F F, Li T L, Liu W P. *Environ. Pollut.*, **2017**, 220: 1429-1437.
- [3] Zhang Y Y, Dong S J, Wang H G, Tao S, Kiyama S. *Environ. Pollut.*, **2016**, 213: 809-824.
- [4] Wolfgang W, Mario K, Benjamin M B. *Environ. Pollut.*, **2014**, 184: 385-390.
- [5] Mai Q N, Hong Y N, Wen C, Xiao D W, Yu T G, Xiao T T, Xi H Y, Yan W. *Polycyclic Aromat. Compd.*, **2016**, 36: 132-151.
- [6] Waigi M G, Kang F X, Goikavi C, Ling W T, Gao Y Z. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **2015**, 104: 333-349.
- [7] Wang H Z, Lou J, Gu H P, Luo X Y, Yang L, Wu L S, Liu Y, Wu J J, Xu J M. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2016**, 23: 13378-13388.
- [8] Madhumita R, Pratick K, Tapan K D. *Microbiology*, **2012**, 158: 685-695.
- [9] Mallick S, Chakraborty J, Dutta T K. *Crit. Rev. Microbiol.*, **2011**, 37(1): 64-90.
- [10] Jin J N, Yao J, Zhang Q Y, Liu J L. *Chemosphere*, **2016**, 164: 379-386.
- [11] Hilton M, Lara D, Adolfo J, Joaquim F, André R, Oliveira T, Fernando M, Luiz A, Hileia S, Sandra P. *Water, Air, Soil Pollut.*, **2016**, 227: 431-444.
- [12] Zhong J N, Luo L J, Chen B W, Sha S, Qing Q, Nora F T, Zhang Y, Luan T G. *Mar. Pollut. Bull.*, **2017**, 114: 926-933.
- [13] Meyer S, Cartellieri S, Steinhart H. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(18): 4023-4029.

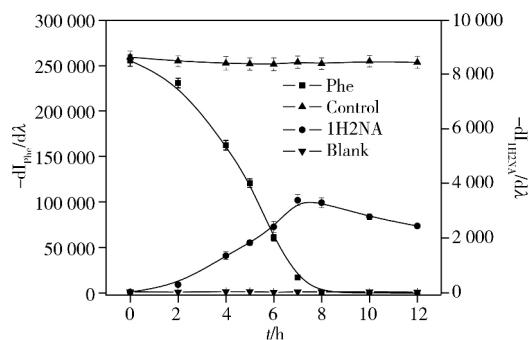


图 5 导数-同步荧光法同时测定 Phe 微生物降解过程中的 Phe 和 1H2NA

Fig. 5 Simultaneous determination of Phe and 1H2NA by the derivative synchronous fluorescence spectroscopy during the biodegradation process of Phe  
 $OD_{600} = 0.002$ ,  $[\text{Phe}]_{\text{init}} = 4.0 \times 10^2 \mu\text{g/L}$

- [14] Hennessee C T, Li Q X. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2016**, 82(11): 3357–3369.
- [15] Fernando J H B, Martha P G L. *Chemosphere*, **2016**, 158: 80–90.
- [16] Huang X, Shi J, Cui C, Yin H, Zhang R, Ma X, Zhang X. *J. Appl. Microbiol.*, **2016**, 121: 1616–1626.
- [17] Siraj N, Bilal E Z, Hamdan S, Karam T E, Haber L H, Li M, Fakayode S O. *Anal. Chem.*, **2016**, 88: 170–202.
- [18] Li J F, Li C Y, Ricardo F A. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46: 3962–3979.
- [19] Liu Y Z, Yang C H, Zhu Y X, Zhang Y. *J. Instrum. Anal.* (刘洋之, 杨承虎, 朱亚先, 张勇. 分析测试学报), **2015**, 34(12): 1366–1371.
- [20] Dankowska A, Domagała A, Kowalewski W. *Talanta*, **2017**, 172: 215–220.
- [21] Liu X X, Wan Y Q. *Chin. J. Anal. Lab.* (刘香香, 万益群. 分析实验室), **2013**, 32(8): 7–10.
- [22] Li R L, Zhu Y X, Zhang Y. *Environ. Pollut.*, **2016**, 219: 245–252.
- [23] Du L, Zhang Z X, Zhu Y X, Zhang Y. *China Environ. Sci.* (杜兰, 张振轩, 朱亚先, 张勇. 中国环境科学), **2017**, 37(4): 1375–1379.
- [24] Sung H Y, Choi C W, Lee S Y, Kwon J, Leem S H, Chung Y H, Kahng J H, Kim S J, Kwon K K, Kim S. *Plos one*, **2014**, 9(3): 1–11.
- [25] Sivakumar K, Bhakyajothi V, Parameswari M, Prema D, Stalin T. *Polycycl. Aromat. Compd.*, **2013**, 23: 221–235.
- [26] Xu J G, Wang Z B. *Fluorometry*. 3rd ed. Beijing: Science Press(许金钩, 王尊本. 荧光分析法. 3版. 北京: 科学出版社), **2006**.
- [27] Benjamin M B, Wolfgang W. *J. Environ. Qual.*, **2010**, 39: 1349–1358.

(上接第 349 页)

- [6] Kim K, Steuerwald A J, Parsons P J, Fujimoto V Y, Browne R W, Bloom M S. *J. Environ. Monit.*, **2011**, 13(9): 2413–2419.
- [7] Lu Y, Kippler M, Harari F, Grandér M, Palm B, Nordqvist H, Vahter M. *Clin. Biochem.*, **2015**, 48(3): 140–147.
- [8] Goullé J P, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix C. *Forensic Sci. Int.*, **2005**, 153(1): 39–44.
- [9] Cieslak W, Pap K, Bunch D R, Reineks E, Jackson R, Steinle R, Wang S. *Clin. Biochem.*, **2013**, 46(3): 266–270.
- [10] Ivanenko N B, Ivanenko A A, Solovev N D, Zeimal A E, Navolotskii D V, Drobyshev E J. *Talanta*, **2013**, 116: 764–769.
- [11] Giakissikli G, Quezada A A, Tanaka J, Anthemidis A N, Murakami H, Teshima N, Sakai T. *Anal. Sci.*, **2015**, 31(5): 383–389.
- [12] Zaichick V, Zaichick S. *Open J. Biochem.*, **2014**, 1(2): 16–33.
- [13] Chen Y, Li M, Fu L, Hou X D, Jiang X M. *Microchem. J.*, **2014**, 114: 182–186.
- [14] Pemmer B, Roschger A, Wastl A, Hofstaetter J G, Wobrauschek P, Simon R, Thaler H W, Roschger P, Klaushofer K, Strelci C. *Bone*, **2013**, 57(1): 184–193.
- [15] Reitznerová E, Amarasiriwardena D, Kopčáková M, Barnes R M. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **2000**, 367(8): 748–754.
- [16] Zacharski, Leo R, Ornstein D L, Woloshin S, Schwartz L M. *Am. Heart J.*, **2000**, 140(1): 98–104.
- [17] Liu W, Song J M, Yuan H M, Li X G, Li N, Duan L Q. *J. Instrum. Anal.* (刘伟, 宋金明, 袁华茂, 李学刚, 李宁, 段丽琴. 分析测试学报), **2017**, 36(4): 471–477.