

酪氨酸氯化过程中光谱变化特征 及消毒副产物的生成规律

丁亚楠¹ 李 轶¹ 吴乾元² 胡洪营^{2,3*}

(1. 河海大学环境学院, 南京 210098; 2. 清华大学环境学院 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084;
3. 清华大学深圳研究生院国家环境保护环境微生物利用与安全控制重点实验室, 深圳 518055)

摘 要 考察酪氨酸在不同投氯量条件下氯化后的余氯、紫外吸光度值和荧光光谱, 以及消毒副产物对羟基苯乙腈(4-HBC)的生成特性。结果表明, 随着投氯量的增加, 余氯呈现先增加再减小再增加的趋势。在投氯量为 0~0.5 mmol Cl₂/L 时, 增加投氯量可提高氯化后溶液的 UV₂₅₄、UV₂₇₄ 和 UV₂₈₀ 值以及 4-HBC 的生成量, 表明低投氯量时氯化可提高溶液中不饱和键的含量; 而投氯量为 0.5~1 mmol Cl₂/L 时, 增加投氯量降低 UV₂₅₄、UV₂₇₄ 和 UV₂₈₀ 值以及 4-HBC 的生成量, 表明过量的氯亦可破坏溶液中的不饱和键。荧光光谱测试实验亦发现: 在投氯量为 0.05 mmol Cl₂/L 时, 酪氨酸溶液氯化后的荧光峰强度明显增加, 表明氯化可生成荧光强度较高的产物。过量的氯(0.5~1 mmol Cl₂/L) 则可破坏溶液中的荧光结构, 降低荧光峰强度直至未检出。

关键词 氯消毒 酪氨酸 余氯 紫外吸光度值 三维荧光光谱 对羟基苯乙腈

中图分类号 X703 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)08-2555-05

Spectrum changes and disinfection by-product formation during chlorination of tyrosine

Ding Yanan¹ Li Yi¹ Wu Qianyan² Hu Hongying^{2,3}

(1. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. State Environmental Protection Key Laboratory of Microorganism Application and Risk Control (MARC), Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

Abstract The changes of residual chlorine, UV absorbance values, fluorescence spectrum and 4-hydroxybenzyl cyanide (4-HBC) concentration after chlorination of tyrosine solution were investigated. The results showed that residual chlorine firstly increased with increasing chlorine doses, then decreased with increasing chlorine doses, and finally increased again. The values of UV₂₅₄, UV₂₇₄, UV₂₈₀ and formation of 4-HBC increased with increasing chlorine doses from 0 to 0.5 mmol Cl₂/L, and then decreased sharply with increasing chlorine doses from 0.5~1 mmol Cl₂/L. The changes of UV absorbance values suggested that low dose of chlorine induced formation of unsaturated bonds in chlorinated tyrosine solution, while high dose of chlorine decreased the unsaturated bonds. By measuring fluorescent spectroscopy of chlorinated tyrosine, fluorescence intensity of the band maximum was found to increase sharply with the addition of sodium chloride at 0.05 mmol Cl₂/L, indicating that chlorination with low doses can produce substances with stronger fluorescence intensity than tyrosine. However, the fluorescence intensity decreased to non-detected with the increase of chlorine doses from 0.5~1 mmol Cl₂/L, suggesting that chlorine at high doses would decrease the fluorescent structure of tyrosine.

Key words chlorination; tyrosine; residual chlorine; UV absorbance; fluorescence spectra; 4-hydroxybenzyl cyanide

消毒是有效灭活病原微生物,保障再生水水质安全的必要措施。氯消毒技术因其技术成熟,价格低廉且具有光谱杀菌能力而得到广泛应用^[1]。然而,氯在灭活病原微生物的同时,亦可与再生水中的有机物反应生成多种消毒副产物,如三卤甲烷^[2]、卤代乙酸^[3]、卤代乙腈^[4]、二甲基亚硝胺^[5]等,从而

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(50825801); 国家高科技研究发展计划(863)项目(2008AA062502)

收稿日期: 2011-04-04; 修订日期: 2011-05-13

作者简介: 丁亚楠(1988~),女,硕士,主要从事水污染控制研究工作。E-mail: dyn419@yahoo.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

引发新的风险。

氨基酸是再生水中一类重要的含氮有机物,已有研究表明 R 基上带有活性苯环的氨基酸在氯消毒过程中不仅表现出了较高的三卤甲烷、卤乙酸和卤乙腈生成潜能^[6],而且可生成具有抗雌激素活性的消毒副产物^[7]。抗雌激素活性物质能模拟或干扰天然激素的生理生化作用^[8],影响动物的生殖和发育^[9]。目前关于 R 基上带有活性苯环的氨基酸在氯消毒过程中的生物毒性变化已有研究,但物质组成的变化规律研究仍有待开展。

本研究选取再生水中常见的 R 基上含有苯环的氨基酸酪氨酸作为研究对象进行氯化实验,考察了投氯量对氯化后余氯、紫外吸光度值、荧光光谱以及消毒副产物对羟基苯乙腈(4-HBC)的影响,从而为优化消毒工艺、保障再生水水质安全提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 酪氨酸溶液的制备

酪氨酸溶液采用酪氨酸固体(分析纯)溶解于高纯水,配制成 0.5 mmol/L 的溶液,混匀后待用。

1.2 氯化反应

使用前将次氯酸钠(分析纯)溶液稀释成有效氯含量为 30 mmol Cl_2 /L 的次氯酸钠储备液,4℃避光保存,实验前测定实际有效氯后立刻使用。取酪氨酸储备液于 500 mL 玻璃瓶中,加入 5 mL 过量磷酸缓冲液(34.0 g KH_2PO_4 、35.5 g Na_2HPO_4 制备 1 L 的缓冲溶液),保证整个氯化反应在 pH 在(7.0 ± 0.2)的条件下进行,依次添加高纯水和次氯酸钠储备液,使得溶液的反应总体积为 500 mL,酪氨酸浓度为 0.17 mmol/L,总有效氯浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5 和 1 mmol Cl_2 /L,摇匀后用带膜橡胶塞封好后置于 20℃ 恒温培养箱避光静置反应 30 min。

1.3 紫外吸光度测定

紫外吸光度采用 UV-2401 (SHIMADZU) 型紫外/可见分光光度计测定。

1.4 三维荧光光谱测定

三维荧光光谱采用 HITACHI-2500 型分光光度计测定,操作方法参考文献[10]所述。对所有数据点采用 Origin 软件进行处理,得到三维数据矩阵,并形成等值线图。

1.5 消毒副产物 4-HBC 测定

固相萃取采用 OASIS HLB 固相萃取柱,依次用 5 mL 丙酮(色谱纯)、5 mL 甲醇(色谱纯)和 5 mL 高纯水活化固相萃取柱。溶液用 2 mol/L 的 H_2SO_4 调节至 pH = 2 后,以 5 mL/min 的流速通过固相萃取

柱,过完后抽真空 5 min。用 10 mL 的甲醇以 1 ~ 2 mL/min 的流速洗脱固相萃取柱。将提取物用氮气缓慢吹干,再用甲醇重新溶解,使其浓缩倍数为 500 倍,浓缩后样品用于液相色谱仪的测定。

4-HBC 的测定采用液相色谱仪 (Shimadzu LC20, Japan),使用反相 C18 色谱柱 (Shim-pack PREP-ODS μ 6 mm × 25 cm × 5 μ m, Shimadzu, Japan),二极管阵列检测器。HPLC 的操作条件如下:进样量 10 μ L;柱温 40℃;流动相为甲醇-乙酸 (pH = 3.72) 溶液,梯度洗脱(0 ~ 10 min 80% 的乙酸;10 ~ 40 min 80% 降至 60% 的乙酸;40 ~ 90 min 60% 降至 20% 的乙酸;90 ~ 100 min 20% 的乙酸),流速为 0.3 mL/min;二极管阵列检测器的检测波长为 200 ~ 300 nm。用 4-HBC 标准品分别制备不同浓度的 4-HBC 溶液,采用上述方法进行测定,检测波长为 280 nm 时 4-HBC 的出峰时间为 40 ~ 42.5 min,4-HBC 的标准曲线为:峰面积 = $4.48 \times 10^6 \times 4\text{-HBC 浓度}$ (mmol/L) $R^2 = 0.999$ 。检测限为 0.0002 nmol/L。

2 结果与讨论

2.1 投氯量对余氯的影响

余氯值是一项重要的水质指标,对控制水中的微生物学指标具有重要意义,且可一定程度反映水中氯胺存在水平。余氯随着投氯量的变化如图 1 所示。

由图 1 可得,随着投氯量的增加,余氯呈现先增加再减小再增加的趋势:当投氯量小于 0.2 mmol Cl_2 /L 时,余氯随着投氯量的增加而增加,余氯在投氯量为 0.5 mmol Cl_2 /L 时出现折点,当投氯量继续增加时,余氯继续增加。此现象与周彤等^[11]的研究相符。

酪氨酸与苯丙氨酸结构相似,根据苯丙氨酸氯化过程中的物质结构变化^[12,13],可推测酪氨酸氯化过程中的物质结构变化:在投氯量较低的情况下,酪氨酸发生氨基上的取代反应,产物以 N-氯代对羟基苯丙氨酸为主。随着投氯量的增加,N-氯代对羟基苯丙氨酸的生成量增加,即结合氯含量增加,从而导致余氯含量的增加。当投氯量较高时,酪氨酸氯化后主要氨基取代产物向二氯代产物转移。此类物质很不稳定,可以迅速发生去羧基、水解等一系列化学反应,生成醛类、腈类物质,使得产物中余氯,特别是结合氯减少。当投氯量超过折点继续增加时,氨基被完全氧化,产物中自由氯含量随着投氯量的增加而逐渐增加,从而导致余氯增加。

2.2 投氯量对酪氨酸紫外吸光度的影响

有机物的变化与紫外吸光度有密切关系:水样

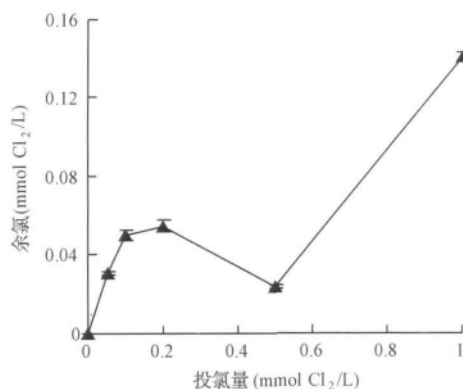


图 1 投氯量对酪氨酸氯化后余氯的影响

Fig. 1 Effect of chlorine doses on residual chlorine in tyrosine solution after chlorination

在波长为 254 nm 处的吸光度 (UV_{254}) 反映了水中不饱和键的含量^[14], 与消毒副产物的生成潜能具有很大的相关性^[15]。酪氨酸在波长为 274 nm 处有很强吸收峰^[16]。水样在波长为 280 nm 处的吸光度 (UV_{280}) 与苯环的含量具有很好的相关性^[17, 18]。用消毒后溶液的吸光度值扣除余氯的吸光度值, 得到如图 2 所示的差值图。

由图 2 可知, 当投氯量小于 0.5 mmol Cl_2 /L 时, UV_{254} 、 UV_{274} 和 UV_{280} 值随着投氯量的增加而增加。投氯量再增加至 1 mmol Cl_2 /L 时, UV_{254} 、 UV_{274} 和 UV_{280} 值随着投氯量的增加而减小, 其中 UV_{254} 值变化最为明显。由于 UV_{254} 与水中不饱和键的含量具有正相关性^[19], 可以推测酪氨酸氯化过程中, 在投氯量由 0 增至 1 mmol Cl_2 /L 时, 产物中不饱和键含量先增加后减少。在酪氨酸的氯化过程中, 发生的化学反应发生的化学反应类型包括卤化、去羧基、水解、苯环开环等^[20]。在投氯量较低的情况下, 酪氨酸的氯化过程中发生的化学变化以卤化反应为主,

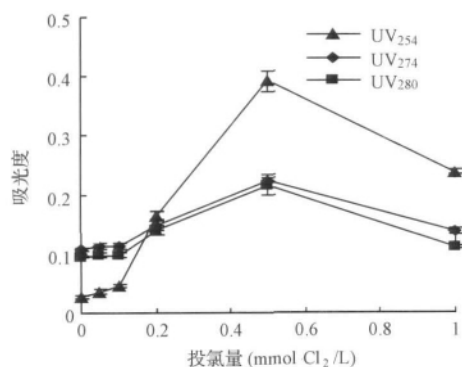


图 2 氯化反应对酪氨酸溶液紫外吸收的影响

Fig. 2 Effect of chlorine disinfection on UV absorbance of tyrosine solution

而去羧基、水解反应为辅, 因而不饱和键的含量及 UV_{254} 值无明显增加; 当投氯量再逐渐增加时, 去羧基、水解反应所占比例逐渐增加, 因而不饱和键含量及 UV_{254} 值显著增加; 而在投氯量为 1 mmol Cl_2 /L 时 UV_{254} 值突然减少可能是由苯环断裂造成的。

2.3 投氯量对酪氨酸三维荧光光谱的影响

三维荧光技术可以较好地分析水中可溶解性有机物种类的特性^[21]。图 3 为酪氨酸溶液的三维荧光光谱图, 溶液在激发波长为 225 nm 处有较强的荧光吸收峰, 因而选定激发波长为 225 nm, 对氯化前后溶液的发射波长进行高斯拟合, 结果如图 4 所示。投氯量为 0.05 mmol Cl_2 /L 时, 溶液氯化后的荧光峰强度明显增加, 这说明低浓度的氯可以导致荧光强度较高的产物生成。当投氯量由 0.05 mmol Cl_2 /L 增至 0.5 mmol Cl_2 /L 时, 荧光峰强度逐渐减小, 而荧光发射波长则先略有增加后显著降低。当投氯量为 0.5 mmol Cl_2 /L 时, 溶液氯化后的发射波长显著低于消毒前的, 即荧光峰发生蓝移, 这表明溶液中的荧光结构受到破坏。当投氯量增至 1 mmol Cl_2 /L 时, 荧光峰消失, 氯对酪氨酸的苯环结构的破坏可能是造成荧光峰消失的主要原因。

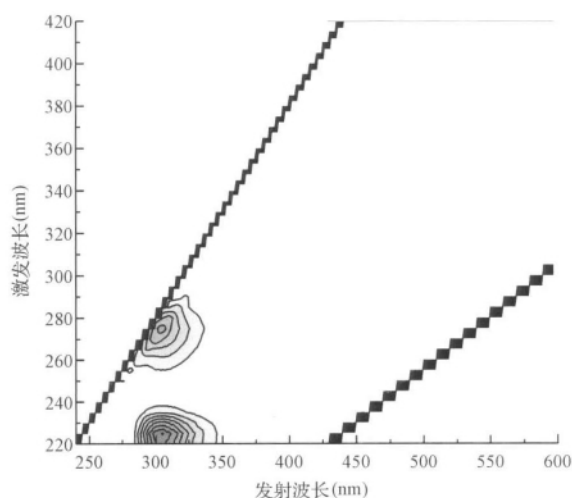


图 3 酪氨酸溶液的三维荧光光谱图

Fig. 3 Contour graphs of fluorescence excitation-emission matrices of tyrosine solution

2.4 氯化过程中 4-HBC 的生成规律

4-HBC 是典型的酪氨酸氯消毒副产物^[23], 它不仅是三卤甲烷的前体物^[24], 对皮肤和粘膜也具有一定的刺激作用。

图 5 给出了酪氨酸氯化过程中 4-HBC 的生成特性: 在投氯量 ≤ 0.5 mmol Cl_2 /L 时 4-HBC 的生成量随着投氯量的增加而增加; 当投氯量高于 0.5 mmol Cl_2 /L 时 4-HBC 的生成量则随着氯投加量的

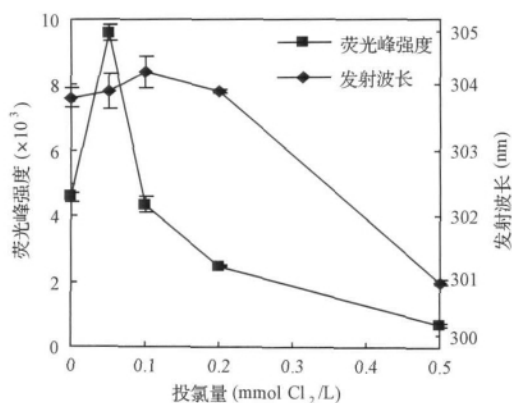


图4 酪氨酸氯化后的荧光发射光谱(激发波长 = 225 nm)
高斯拟合结果

Fig. 4 Gaussian fitting results of fluorescence emission spectrum in chlorinated tyrosine solution (wavelength of excitation = 225 nm)

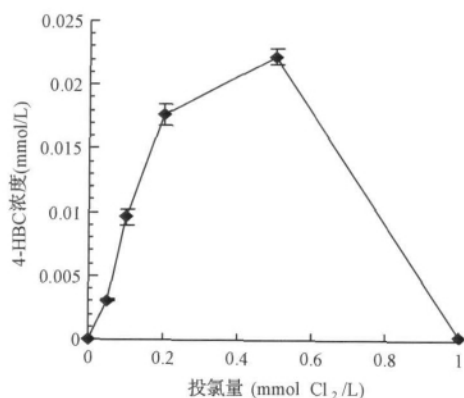


图5 氯化过程中对羟基苯乙腈(4-HBC)的生成特性
Fig. 5 Formation of 4-hydroxybenzyl cyanide (4-HBC) during chlorine disinfection

增加而几乎降为零。参考苯丙氨酸氯化过程中的物质结构变化^[12,13]推测4-HBC可能的生成路径如图6所示,由图6可得,在酪氨酸的氯化过程中,4-HBC是由N,N-二氯代对羟基苯乙腈经过去羧基等反应生成的,因而在投氯量小于0.5 mmol Cl₂/L范围内,投氯量的增加有助于4-HBC的生成。当投氯量增至1 mmol Cl₂/L,苯环结构被破坏,因而4-HBC浓度几乎降为零。在消毒工艺中,在氨基酸存在的情况下,需要增加投氯量以保证消毒效果,然而投氯量的增加也可能导致消毒副产物的生成,因而,低投氯量条件下,在保证消毒效果的同时应尽可能减小投氯量以降低消毒副产物所带来的水质安全风险。

3 结论

(1) 随着投氯量的增加,氯化后溶液余氯呈现先

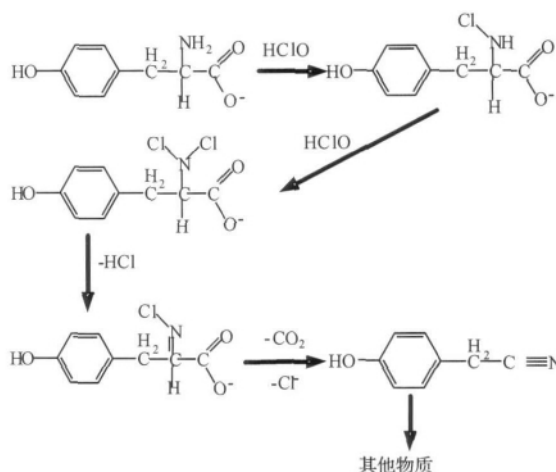


图6 酪氨酸氯化过程中对羟基苯乙腈(4-HBC)的生成机制
Fig. 6 Proposed mechanism of 4-hydroxybenzyl cyanide (4-HBC) formation during chlorine disinfection

增加再减小再增加的趋势。低投氯量条件下,酪氨酸氨基一氯代物质的生成导致余氯的增加,投氯量增加,酪氨酸氨基二氯代物质的生成与快速降解导致余氯暂时减少,当投氯量超过拐点再继续增加时,氨基完全被破坏,自由氯的增加导致余氯的再增加。

(2) 酪氨酸氯化过程中,UV₂₅₄、UV₂₇₄、UV₂₈₀值变化趋势一致,均随着投氯量的增加先增加后减少,其中UV₂₅₄值变化最为显著。这表明酪氨酸氯化产物中不饱和键含量亦是先增加后减少。

(3) 添加0.05 mmol Cl₂/L的氯时,消毒后溶液的荧光峰强度明显增加,这说明低浓度的氯可以导致荧光强度较高的产物生成。当投氯量增至0.5 mmol Cl₂/L时,溶液消毒后荧光峰的发射波长明显低于消毒前的,这表明溶液中的荧光结构受到破坏。当投氯量增至1 mmol Cl₂/L时,荧光峰消失,这可能是由于酪氨酸的苯环结构被破坏造成的。

(4) 在投氯量≤0.5 mmol Cl₂/L时,4-HBC的生成量随着投氯量的增加而显著增加;当投氯量高于0.5 mmol Cl₂/L时,4-HBC的生成量则随着氯投加量的增加而几乎降为零。因而在消毒工艺中,在保证消毒效果的情况下应充分考虑其消毒副产物所带来的水质安全风险。

参考文献

- [1] Golfopoulos S. K., Nikolaou A. D. Survey of disinfection by-products in drinking water in Athens, Greece. Desalination **2005**, 176(1-3): 13-24
- [2] Leenheer J. A., Rostad, C. E., Baraer L. B., et al. Mature and chlorine reactivity of organic constituents from reclaimed water in groundwater, Los Angeles County, California. Environmental Science & Technology, **2001**, 35

- (19): 3869-3876
- [3] Choi J. , Valentine R. L. Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from reaction of monochloramine: A new disinfection by-product. *Water Research* **2002** ,36(4) : 817-824
- [4] Goslan E. H. , Krasner S. W. , Bower M. , et al. A comparison of disinfection by-products found in chlorinated and chloraminated drinking waters in Scotland. *Water Research* **2009** ,43(18) : 4698-4706
- [5] Charrois J. W. A. , Hrudey S. E. Breakpoint chlorination and free-chlorine contact time: Implications for drinking water N-nitrosodimethylamine concentrations. *Water Research* **2007** ,41(3) : 674-682
- [6] 王超 胡洪营 王丽莎 等. 典型含氮有机物的氯消毒副产物生成潜能研究. *中国给水排水* **2006** ,22(15) : 9-12
Wang Chao , Hu Hongying , Wang Lisha , et al. Chlorination byproducts formation potentials of typical nitrogenous organic compounds. *China Water & Wastewater* ,**2006** ,22(15) : 9-12(in Chinese)
- [7] Wu Q. Y. , Hu H. Y. , Zhao X. , et al. Effect of chlorination on the estrogenic/antiestrogenic activities of biologically treated wastewater. *Environmental Science & Technology* **2009** ,43(13) : 4940-4945
- [8] Jobling S. , Nolan M. , Tyler , C. R. , et al. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* **1998** ,32(17) : 2498-2506
- [9] Falconer I. R. , Chapman H. F. , Moore M. R. , et al. Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environ Toxicology* **2006** ,21(2) : 181-191
- [10] 王丽莎 胡洪营 滕江幸. 污水氯和二氧化氯消毒过程中溶解性有机物变化的三维荧光光谱解析. *环境科学* **2007** ,28(7) : 1524-1528
Wang Lisha , Hu Hongying , Koichi Fujie. Characterization of the change in DOM during wastewater chlorine and chlorine dioxide disinfections by 3DEEM. *Environmental Science* **2007** ,28(7) : 1524-1528(in Chinese)
- [11] 周彤 郭晓 周向争. 城市污水回用于循环冷却水时氨氮去除. *工业用水与废水* **2000** ,31(6) : 9-11
Zhou Tong , Guo Xiao , Zhou Xiangzheng. Removal of $\text{NH}_3\text{-N}$ in the reuse of municipal wastewater for circulating cooling water. *Industrial Water & Wastewater* ,**2000** ,31(6) : 9-11(in Chinese)
- [12] Freuze I. , Brosillon S. , Herman D. , et al. Odorous products of the chlorination of phenylalanine in water: Formation , evolution , and quantification. *Environmental Science & Technology* **2004** ,38(15) : 4134-4139
- [13] Conyes B. , Scully Jr F. E. N-chloroaldimines. 3. Chlorination of phenylalanine in model solutions and in a wastewater. *Environmental Science & Technology* ,**1993** ,27(2) : 261-266
- [14] Amy G. L. , Chadik P. A. , Chowdhury Z. K. Developing models for predicting trihalomethane formation potential and kinetics. *Journal American Water Works Association* **1987** ,79(7) : 89-97
- [15] Comstock S. E. H. , Boyer T. H. , Graf K. C. , et al. Effect of landfill characteristics on leachate organic matter properties and coagulation treatability. *Chemosphere* ,**2010** ,81(7) : 976-983
- [16] Napolitano M. J. , Green B. J. , Nicoson J. S. , et al. Chlorine dioxide oxidations of tyrosine , N-Acetyltyrosine , and dopa. *Chemical Research in Toxicology* ,**2005** ,18(3) : 501-508
- [17] Rizzo L. , Lofrano G. , Grassi M. , et al. Pre-treatment of olive mill wastewater by chitosan coagulation and advanced oxidation processes. *Separation and Purification Technology* **2008** ,63(3) : 648-653
- [18] Lofrano G. , Rizzo L. , Grassi M. , et al. Advanced oxidation of catechol: A comparison among photocatalysis , Fenton and photo-Fenton processes. *Desalination* ,**2009** ,249(2) : 878-883
- [19] Chark R. M. , Thurnau R. C. , Sivaganesan M. , et al. Predicting the formation of chlorinated and brominated by-products. *Journal of Environmental Engineering* ,**2001** ,127(6) : 493-501
- [20] Zhang X. R. , Minear R. A. Formation , adsorption and separation of high molecular weight disinfection byproducts resulting from chlorination of aquatic humic substances. *Water Research* **2006** ,40(2) : 221-230
- [21] 吕洪刚 欧阳二明 郑振华 等. 三维荧光技术用于给水的品质测定. *中国给水排水* **2005** ,21(3) : 91-93
Lv Honggang , Ouyang Erming , Zheng Zhenhua , et al. Three dimensional fluorescence spectroscopy for water quality determination in water treatment plant. *Chinese Water & Wastewater* ,**2005** ,21(3) : 91-93 (in Chinese)
- [22] Coble P. G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* **1996** ,51(4) : 325-346
- [23] Horth H. Identification of mutagens in drinking water. *Aqua AQUAAA* ,**1989** ,38(2) : 80-100
- [24] Hidaka T. , Ishii K. , Kirigaya T. , et al. Study on intermediate products in chloroform formation from L-tyrosine treated with sodium hypochlorite. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* ,**2007** ,48(4) : 97-105