

文章编号:1674-2869(2016)05-0431-06

亚硝酸根的2,3-二氨基吩嗪荧光猝灭法测定

翟马跃¹, 梁淑彩^{2*}, 潘宇¹, 刘羽萍¹, 谭支林¹, 刘凡¹, 鄢国平^{1*}

1. 武汉工程大学材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430074;

2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430074

摘 要: 2,3-二氨基吩嗪(DAP)在中性环境中具有强荧光. 发现其在酸性介质中能与亚硝酸根离子反应, 生成产物在中性环境下荧光很弱, 据此建立了一种以DAP为探针, 荧光猝灭测定水样中亚硝酸根离子的方法. 在最佳测定条件下(0.03 mol/L的硫酸, 2.0×10^{-3} mol/L十六烷基三甲基溴化铵, 反应温度50℃、反应时间50 min, 激发和发射波长分别为435 nm和557 nm), 体系荧光强度变化与亚硝酸根浓度在0.1 mol/L ~ 2.1×10^{-6} mol/L范围内呈线性关系, 检测限为 9.8×10^{-8} mol/L. 该方法具有操作简便、灵敏度高、长波长下检测及斯托克位移大的优点.

关键词: 荧光分析法; 亚硝酸盐; 2,3-二氨基吩嗪; 胶束增敏

中图分类号: O657.3 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2016.05.004

Determination of Nitrite with 2, 3-Diamino-Phenazine by Fluorescence Quenching Method

ZHAI Mayue¹, LIANG Shucui^{2*}, PAN Yu¹, LIU Yuping¹, TAN Zhilin¹, LIU Fan¹, YAN Guoping^{1*}

1. School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430074, China

Abstract: The 2,3-Diamino-phenazine(DAP) has strong fluorescence in the neutral medium. We found that it could react with nitrite in acidic medium, and the produce displayed weak fluorescence in the neutral medium, thus a fluorimetric quenching method for the detection of nitrite in water samples was developed employing DAP as fluorescence probe. Upon the optimum experimental conditions (0.03 mol/L of H_2SO_4 , 2.0×10^{-3} mol/L of hexadecyl trimethyl ammonium bromide, reaction temperature of 50℃, reaction time of 50 min, fluorescence detected at 557nm with the excitation wavelength of 435 nm), the fluorescence change was linear to nitrite concentration over the range of 0.1 mol/L – 2.1×10^{-6} mol/L with the detection limit of 9.8×10^{-8} mol/L. The proposed method possessed the characteristics of simpleness, sensitivity, long detection wavelength and large Stocks shift.

Keywords: fluorescence analysis; nitrite; 2,3-diamino-phenazine; micellar sensitization

1 引言

亚硝酸盐广泛存在于土壤、水以及食品等物

质中^[1],应用于工、农业以及食品添加剂等方面. 其大量应用导致环境污染如水体富营养化、地下水污染等,而摄入过量的亚硝酸盐更是能使人体中

收稿日期:2016-05-10

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51373128,51173140);武汉市高新技术产业科技创新团队培养计划项目(2013010501010131);武汉工程大学研究生教育创新基金项目(CX2015007,CX2014058);武汉工程大学第十期大学生校长基金项目(2015004)

作者简介:翟马跃,硕士研究生. E-mail: zmyysy@163.com

*通讯作者:鄢国平,博士,教授. E-mail: guopyan2006@163.com

梁淑彩,博士,副教授. E-mail: chrolab@gmail.com

毒,严重者甚至会导致死亡^[2].因此,亚硝酸根离子的检测具有十分重要的意义.荧光分析法操作方便、灵敏度高、反应速度快、对环境污染小^[3],是测量亚硝酸根离子的重要分析方法.

荧光法测定亚硝酸盐大多是基于探针上的胺基与亚硝酸根离子在酸性条件下的重氮化或者亚硝化反应从而使得探针的荧光增强或猝灭.如紫脲酸铵^[4]、吡啶^[5]、中性红^[6-7]、藏红 T^[8]、品红^[9]、荧光素^[10-11]、酪氨酸^[12]、叶酸^[13]等荧光探针都是基于此机理来测定亚硝酸盐的.含邻二胺基团的荧光探针可与亚硝酸盐反应生成三氮唑化合物,如乙二胺^[14]、2,3-二氨基萘^[15]等,这类荧光探针一般具有更低的检测限与更宽的线性范围.此外有些物质如十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基苯磺酸钠等的加入,可使体系荧光大大增强,从而降低了体系的检测限,起到胶束增敏的作用.

本文采用含邻二胺基团的2,3-二氨基吩嗪(DAP)作为荧光探针(其结构如图1所示),以十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)作为增敏剂,建立了胶束增敏荧光猝灭测定亚硝酸盐的新方法,并将其用于湖水、雨水和自来水的实际检测.

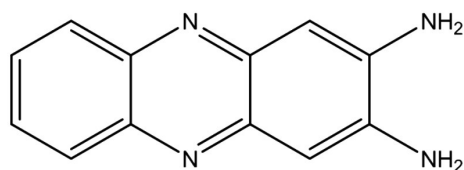


图1 DAP的结构式

Fig. 1 Structure of DAP

2 实验部分

2.1 试剂及仪器

AR1104电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);F-4600荧光分光光度计(日立高新技术公司).

DAP根据文献[16]合成. DAP溶液:用DMSO溶解配制成浓度为 1.0×10^{-2} mol/L的储备液,置于冰箱保存,临用时用水稀释;亚硝酸钠溶液:用水溶解配置成0.1 mol/L的储备液,冰箱保存,需每天新配;硫酸、盐酸、磷酸、氢氧化钠均配成1.0 mol/L溶液.所有试剂均为分析纯,东湖等实际样品需过滤使用,实验用水为超纯水.

2.2 方法

2.2.1 DAP与亚硝酸根离子反应荧光变化 在10 mL比色管中依次加0.3 mL硫酸溶液,0.2 mL

CTAB溶液,0.2 mL DAP(储备液稀释后成 1.0×10^{-4} mol/L),适量亚硝酸根溶液,加水定容至5 mL,50 ℃下反应50 min,加入0.6 mL氢氧化钠,再次定容至10 mL,同时作空白试验.选择狭缝宽度为10 nm×20 nm,激发波长为435 nm,发射波长为557 nm,测定溶液荧光强度.

2.2.2 硫酸浓度影响 比色管中分别加不同量的硫酸溶液,0.2 mL CTAB溶液,0.2 mL DAP,1.5 mL亚硝酸根溶液(1.0×10^{-5} mol/L),定容至5 mL,50 ℃下反应50 min,加氢氧化钠至pH为中性,定容至10 mL,同时作空白试验.在狭缝宽度为10 nm×15 nm(后面实验均在此狭缝下测定),激发波长 $\lambda_{ex}=435$ nm、发射波长 $\lambda_{em}=557$ nm的条件下测定其荧光强度变化 ΔF ($\Delta F = F_{空白} - F$).

2.2.3 CTAB浓度影响 比色管中分别加0.3 mL硫酸溶液,不同量CTAB溶液,0.2 mL DAP,1.5 mL亚硝酸根溶液,定容至5 mL,50 ℃下反应50 min,加入0.6 mL氢氧化钠,定容至10 mL,同时作空白试验.测定加入不同量CTAB的荧光强度变化 ΔF .

2.2.4 时间依赖性及温度影响 比色管中分别加入0.3 mL硫酸溶液,0.2 mL CTAB溶液,0.2 mL DAP,1.5 mL亚硝酸根溶液,定容至5 mL,不同温度下反应,加入0.6 mL氢氧化钠,定容至10 mL,同时作空白试验.测定不同温度(25 ℃、37 ℃、50 ℃)反应不同时间的 ΔF .

2.2.5 工作曲线、检测限与精密度 在所选择的最佳条件下(DAP浓度为 2×10^{-6} mol/L、硫酸浓度为0.03 mol/L、CTAB浓度为 2.0×10^{-3} mol/L、温度为50 ℃,反应时间50 min),配置一系列不同浓度的亚硝酸根溶液,测定线性范围,并根据公式 $LOD = kS_0 / S$ (S_0 为空白标准偏差, S 是工作曲线斜率, $k=3$)计算检测限.在最佳条件下加入1.0 mL亚硝酸根溶液,重复6次,计算相对标准偏差.

2.2.6 离子干扰 在最佳实验条件下($C_{DAP}=2 \times 10^{-6}$ mol/L, $C_{H_2SO_4}=0.03$ mol/L, $C_{CTAB}=2.0 \times 10^{-3}$ mol/L),亚硝酸根离子浓度为 1.5×10^{-6} mol/L时,考察其它离子(Cu^{+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Li^{+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cl^{-} 、 I^{-} 、 NO_3^{-} 、 Ac^{-})能够共存的最大浓度.

2.2.7 实际样品测试 在最佳实验条件下加入实际样品(自来水加入量为3 mL,雨水2 mL,东湖为1 mL),加标组再加入 8.0×10^{-7} mol/L的亚硝酸根溶液,测定各组荧光强度变化,平均测定3次,并计算样品中亚硝酸根离子含量和加标回收率.

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱

DAP 在溶液 pH 小于 6 时基本无荧光,此后随着 pH 增加,荧光逐渐增强,最大激发波长为 435 nm,发射波长为 557 nm. 在 pH 为 7~8 时荧光强度基本稳定;在 pH 大于 8 时荧光强度随 pH 值增大而减小. 在酸性条件下,DAP 能与亚硝酸根离子反应,产物在酸性条件下荧光较弱,加碱中和后荧光强度也无明显增强. 因此,可以在酸性条件下使亚硝酸根离子和 DAP 反应,在中性条件下进行亚硝酸根离子测定. 加入 CTAB 后体系荧光强度变化增强了十几倍,表明 CTAB 对测定有增敏作用. 另外,加入 CTAB 后激发波长会小幅度发生红移,波长由 425 nm 移至 435 nm 处,发射波长基本不变.

图 2 是 CTAB 存在下 DAP 与亚硝酸根离子反应前后荧光光谱图,其中 1 和 1' 是 DAP 的激发和发射波长,2 和 2' 是与亚硝酸根离子反应后的激发与发射波长. 由图 2 可知,在激发波长为 435 nm,发射波长为 557 nm 时,DAP 荧光强度很大,加入亚硝酸根离子后荧光明显发生猝灭. 说明 DAP 能对亚硝酸根离子做出响应.

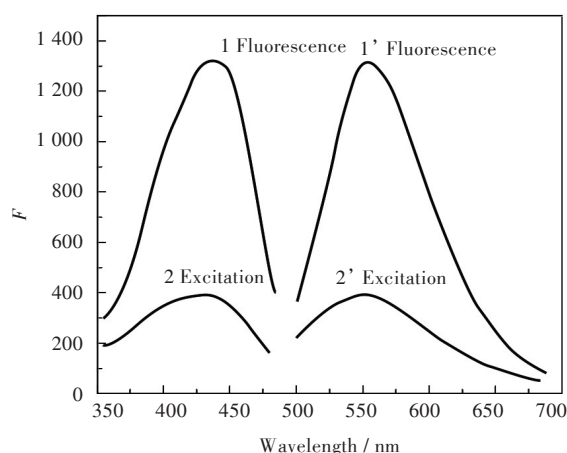


图 2 DAP 与亚硝酸根离子反应前后荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of DAP before and after reacting with nitrite

3.2 酸性介质及其浓度影响

在相同实验条件下分别考察盐酸、硫酸、磷酸 3 种介质对体系荧光强度的影响. 实验结果发现在硫酸介质中体系荧光强度变化 ΔF 最大,故选用硫酸作为酸性介质. 不同浓度硫酸溶液对 ΔF 影响结果如图 3 所示,当硫酸浓度较小时, ΔF 随酸度增大快速而增强,当硫酸浓度为 0.03 mol/L 时 ΔF 达到最大,之后 ΔF 基本不变,所以最终选择硫酸的最佳浓度 0.03 mol/L.

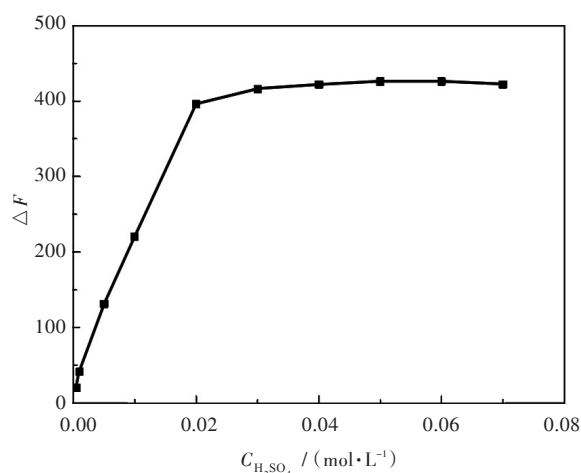


图 3 硫酸浓度对 ΔF 影响

Fig. 3 Effect of sulfuric acid concentration on ΔF

3.3 CTAB 浓度影响

不同浓度 CTAB 溶液对 ΔF 影响如图 4 所示. CTAB 浓度较小时, ΔF 随其增大而快速增强,当 CTAB 浓度为 2.0 mmol/L 时达到最大,之后 ΔF 基本不变,所以最终选择 2.0×10^{-3} mol/L 作为 CTAB 的最佳浓度.

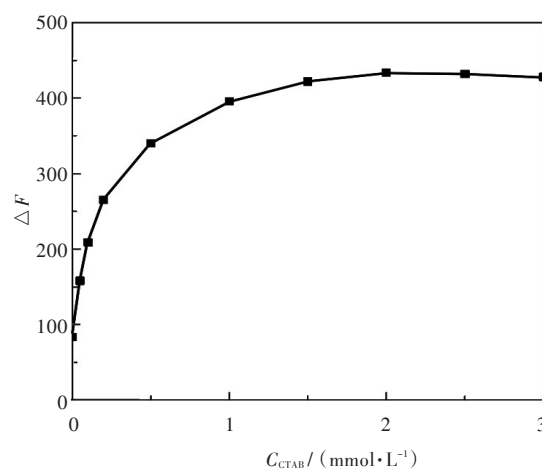


图 4 CTAB 浓度对 ΔF 影响

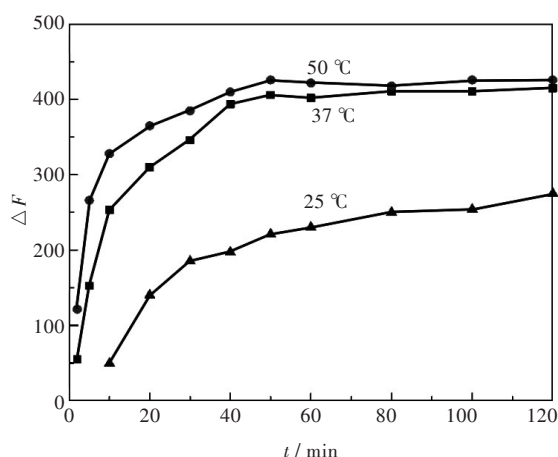
Fig. 4 Effect of CTAB concentration on ΔF

3.4 时间依赖性及温度影响

如图 5 所示,DAP 与亚硝酸根离子在 25 °C 下反应较慢,120 min 后反应仍不完全,而在 37 °C 和 50 °C 下,在反应时间小于 15 min 时 ΔF 迅速增大,在 15 min 至 50 min 时 ΔF 增加趋势变缓,在 50 min 时反应基本完全,且在 50 °C 下的 ΔF 比在 37 °C 下的 ΔF 稍高,故选择最佳反应温度为 50 °C,反应时间为 50 min.

3.5 工作曲线、检测限与精密度

如图 6 所示,亚硝酸根浓度在 0.1 mol/L ~ $2.1 \times$

图5 温度和时间对 ΔF 影响Fig. 5 Effect of temperature and time on ΔF

10^{-6} mol/L 范围内与 ΔF 呈良好的线性关系. 其线性回归方程为: $\Delta F = 249.2C + 26.07$ ($R^2 = 0.999$), 其中 C 为亚硝酸根浓度, 并根据公式 $LOD = kS_0 / S$ (空白标准偏差 $S_0 = 8.2$, 工作曲线斜率 $S = 249.2$, $k = 3$) 计算出检测限为 9.8×10^{-8} mol/L. 加入亚硝酸根离子的浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 按实验方法测定 6 次, 相对标准偏差为 1.5%.

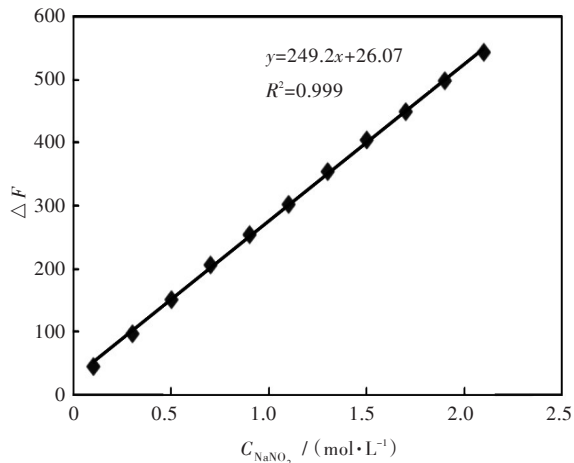


图6 工作曲线

Fig. 6 Calibration curve

3.6 其它离子干扰

在亚硝酸根浓度为 1.5×10^{-6} mol/L 时, 相对误差在 $\pm 5\%$ 以内, 允许 1 000 倍的 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 Ac^- , 500 倍浓度的 Ni^{2+} 、 Li^+ 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} , 100 倍的 Co^{2+} , 50 倍的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} , 5 倍的 I^- , 2 倍浓度的 Ag^+ , 1 倍浓度的 Ba^{2+} 与亚硝酸根离子共存.

3.7 实际样品测定

表 1 是实际样品的亚硝酸根离子含量测定值与加标回收率(三种试样的加入量分别为 3 mL、

1 mL 和 2 mL). 经计算可得, 自来水、东湖水、雨水中亚硝酸根离子含量分别为 1.10×10^{-6} mol/L、 3.43×10^{-6} mol/L、 2.14×10^{-6} mol/L.

表1 实际样品测定及加标回收率

Tab. 1 Determination and recovery rates of nitrite in samples

samples	added / (mol·L ⁻¹)	found / (mol·L ⁻¹)	recovery / %
tap water	0	3.29×10^{-7}	—
	8.0×10^{-7}	11.34×10^{-7}	101.5
East Lake water	0	3.43×10^{-7}	—
	8.0×10^{-7}	11.45×10^{-7}	100.6
rain water	0	4.27×10^{-7}	—
	8.0×10^{-7}	12.29×10^{-7}	100.5

4 结 语

本文建立了基于 2,3-二氨基吩嗪的荧光分析测定亚硝酸根离子的方法. 在最佳实验条件下的线性范围为 $0.1 \text{ mol/L} \sim 2.1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 检测限为 $9.8 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$. 该方法测定灵敏度高、斯托克位移大, 有望用于实际样品中亚硝酸根离子的测定.

参考文献:

- [1] 王丽丽, 肖亮, 丛云霞. 食品中亚硝酸盐的残留与控制[J]. 中外食品工业月刊, 2014, 8(4): 53-58.
WANG L L, XIAO L, CONG Y X. Residual and control of nitrite in food[J]. Sino-foreign food industry, 2014, 8(4): 53-58.
- [2] 张颖琦, 沈俊毅, 徐映如. 亚硝酸盐对人体的危害及检测方法的进展[J]. 职业与健康, 2015, 31(6): 851-855.
ZHANG Y Q, SHEN J Y, XU Y R, et al. Harm of nitrite to human body and progress on test methods[J]. Occupation and health, 2015, 31(6): 851-855.
- [3] 潘红, 许亚红. 荧光分析法在环境有机污染物分析中的运用[J]. 科技创新与应用, 2015, 10(31): 167-172.
PAN H, XU Y H. Application of fluorescence analysis in the analysis of environmental organic pollutants [J]. Technology innovation, 2015, 10(31): 167-172.
- [4] BISWAS S, CHOWDHURY B, RAY B C. A novel spectrofluorimetric method for the ultra trace analysis of nitrite and nitrate in aqueous medium and its application to air, water, soil and forensic samples[J]. Talanta, 2004, 64(2): 308-312.
- [5] JIE N Q, YANG D L, ZHANG Q, et al. A fluorescence quenching method for the determination of nitrite with

- indole [J]. *Microchemical journal*, 1999, 62 (3) : 371-376.
- [6] 符连社,任慧娟. 催化荧光法测定痕量亚硝酸根[J]. *环境化学*, 2015(4):371-373.
- FU L S, REN H J. Catalytic fluorophotometric determination of trace amounts of nitrite [J]. *Environmental chemistry*, 2015(4):371-373.
- [7] 刘永涛,云霞,那广水. 催化荧光法测定蔬菜中痕量亚硝酸根的研究[J]. *中国酿造*, 2014, 33(7) : 113-117.
- LIU Y T, YUN X, NA G S. Determination of trace nitrite in vegetables by catalytic fluorescence method [J]. *China brewing*, 2014, 33(7):113-117.
- [8] 董存智,吴伟东. 藏红 T 荧光熄灭法测定痕量亚硝酸根[J]. *光谱学与光谱分析*, 2003, 23(1):170-172.
- DONG C Z, WU W D. Spectrophotofluorimetric determination of trace nitrite with safranin T [J]. *Spectroscopy and spectral analysis*, 2003, 23 (1) : 170-172.
- [9] 邓湘舟,刘振南,邓晴予. 荧光熄灭法测定痕量亚硝酸根离子研究[J]. *化学试剂*, 2008, 30(8) : 581-583.
- DENG X Z, LIU Z N, DENG Q Y. Study on determination of trace nitrite by fluorimetric quenching method [J]. *Chemical reagents*, 2008, 30 (8) : 581-583.
- [10] 冯锋,陈泽忠,梁文娟,等. 荧光法用于痕量亚硝酸根的测定[J]. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2007, 23(4):31-33.
- FENG F, CHEN Z Z, LIANG W J, et al. Determination of trace nitrite drop-based spectrofluorimetry [J]. *Journal of Shanxi Datong university (natural science)*, 2007, 23(4):31-33.
- [11] WANG Q, HUANG H, NING B. A highly sensitive and selective spectrofluorimetric method for the determination of nitrite in food products [J]. *Food analytical methods*, 2015, 9(5):1-8.
- [12] 任慧娟,杨立平,符连社,等. 酪氨酸作试剂荧光光度法测定亚硝酸根[J]. *分析试验室*, 2003, 22(1): 90-91.
- REN H J, YANG L P, FU L S, et al. Fluorimetric determination of nitrite with tyrosine [J]. *Chinese journal of analysis laboratory*, 2003, 22(1):90-91.
- [13] LU L, CHEN C, ZHAO D. A simple and sensitive assay for the determination of nitrite using folic acid as the fluorescent probe[J]. *Analytical methods*, 2015, 7 (4):129-133.
- [14] 周运友,余世科,卢琴,等. N-(1-萘基)-乙二胺荧光光度法测定痕量亚硝酸根[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(8) :1318-1321.
- ZHOU Y Y, SHE S K, LU Q, et al. Highly sensitive spectrofluorimetric determination of trace amounts of nitrite with N- (1-Naphthyl) Ethylenediamine [J]. *Spectroscopy and spectral analysis*, 2005, 25 (8) : 318-1321.
- [15] 张政,王转花,陈亮,等. 2,3-二氨基萘荧光分光光度法测定环境水样中的痕量亚硝酸盐[J]. *分析测试学报*, 1994, 13(3):67-70.
- ZHAN Z, WANG Z H, CHEN L, et al. Spectrofluorometric determination of trace nitrite in environmental water with 2,3-diaminonaphthalene[J]. *Journal of instrumental analysis*, 1994, 13(3):67-70.
- [16] ZHOU P D, LIN H, CHEN S C, et al. 2,3-diaminophenazine[J]. *Molbank*, 2011(3):1-5.

本文编辑:张 瑞