

# 吡啶红 3B 荧光熄灭法测定痕量亚硝酸根

董存智\*, 苟利红

(淮北煤炭师范学院化学系, 淮北 235000)

**摘 要** 在 HCl 介质中, 吡啶红 3B 与痕量  $\text{NO}_2^-$  发生亚硝化反应, 使得吡啶红 3B 在激发波长为 527 nm, 发射波长为 556 nm 条件下的荧光强度明显下降, 其下降程度在一定范围内与  $\text{NO}_2^-$  的加入量呈线性关系, 从而建立了荧光熄灭法测定痕量  $\text{NO}_2^-$  的新方法。方法的线性范围为  $(4 \sim 320) \times 10^{-9}$  g/mL, 检出限为  $1.98 \times 10^{-9}$  g/mL。方法已用于环境水样中痕量  $\text{NO}_2^-$  的测定, 回收率在 95% ~ 105%。

**关键词** 吡啶红 3B; 亚硝酸根; 荧光熄灭法

中图分类号: O657.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2004)03-0054-03

亚硝酸根广泛存在于天然水、食品、土壤等物质中, 当它进入人体后, 可与仲胺、酰胺反应, 生成致癌的亚硝胺化合物, 在人体中不断积累, 严重威胁人的健康, 因此, 检验  $\text{NO}_2^-$  的存在是很必要的,  $\text{NO}_2^-$  是水质、食品和检测的重要指标之一。测定天然水中和食品中  $\text{NO}_2^-$  的方法很多, 常用的有光度法<sup>[1]</sup>, 荧光法<sup>[2,3]</sup>, 催化法<sup>[4]</sup>等。吡啶红 3B 是一种生物染色剂, 常用于生化分析中。目前, 尚未见到以吡啶红 3B 为指示剂, 荧光熄灭法测定痕量  $\text{NO}_2^-$  的报道。实验发现, 在 HCl 介质中, 痕量  $\text{NO}_2^-$  的存在可使吡啶红 3B 的荧光强度明显降低, 降低程度在一定范围内与  $\text{NO}_2^-$  量呈线性关系, 从而建立了吡啶红 3B 荧光熄灭法测定痕量  $\text{NO}_2^-$  的新方法, 方法的操作简单, 线性范围宽, 用于环境水样中痕量  $\text{NO}_2^-$  的测定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及主要试剂

850 型荧光光度计(日本日立公司); 930 型荧光光度计(上海分析仪器厂); DMS-200 型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安公司)。

$\text{NO}_2^-$  标准溶液(100 mg/L): 使用前稀释成 1.0 mg/L 工作液。吡啶红 3B:  $4 \times 10^{-3}$  mol/L; 水为二次蒸馏水, 所用试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

在两支 25 mL 具塞比色管中, 加入吡啶红 3B 溶液 0.2 mL, 其中一支加入  $\text{NO}_2^-$  标准溶液 2.0 mL 或适量待测溶液, 另一支为试剂空白, 然后均加入 6 mol/L HCl 溶液 1.5 mL, 稀释至 25 mL, 摇匀后静置 15 min, 在激发波长为 527 nm, 发射波长为 556 nm 的条件下测量溶液的荧光强度, 其中含  $\text{NO}_2^-$  者为  $F$ , 试剂空白为  $F_0$ , 计算  $\Delta F$  值( $\Delta F = F_0 - F$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 吸收光谱和荧光光谱

吡啶红 3B 为一荧光染料, 在 HCl 介质中呈红色, 带黄绿色荧光, 其吸收光谱如图 1 所示, 由图 1 可知, 吡啶红 3B 在 526 nm 处有一强吸收峰, 当有  $\text{NO}_2^-$  存在时, 吸收峰明显下降。吡啶红 3B 在 HCl 介质中的荧光光谱如图 2 所示。图 2 中, 曲线 1, 1', 2, 2' 分别表示试剂空白和含  $\text{NO}_2^-$  溶液的激发和发射光谱, 由图可知, 两份溶液的最大激发波长均位于 527 nm, 最大发射波长均为 556 nm。即加入  $\text{NO}_2^-$  并不对吡啶红 3B 的激发波长和发射波长产生影响, 仅使荧光强度降低。

### 2.2 酸度的影响

分别以  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , KBr 和 HCl 为介质进行实验, 结果表明, 使用 HCl 介质时的效果最好, 故本

\* 收稿日期: 2003-03-31; 修订日期: 2003-06-23

作者简介: 董存智(1954-), 男, 教授

实验以 HCl 作为介质。按实验方法, 改变 HCl 用量时结果如图 3 所示, 当 HCl 用量为 1.5 mL (浓度为 0.36 mol/L) 时  $\Delta F$  值最大。所以本实验选用 6 mol/L HCl 的加入量为 1.5 mL。

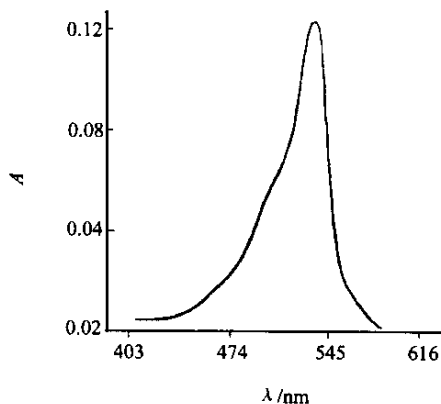


图 1 吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum  
HCl + 吡啶红 3B

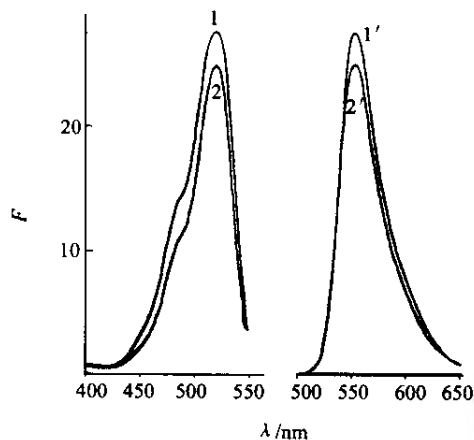


图 2 荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra

1, 1' - HCl + 吡啶红 3B 2, 2' - HCl + 吡啶红 3B + NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

### 2.3 显示剂用量的影响

按实验方法, 改变显示剂的用量, 结果如图 4 所示, 当显色剂用量大于 0.3 mL 时,  $\Delta F$  值趋于 0, 随着显色剂用量减少,  $\Delta F$  值增大, 但荧光强度下降。综合考虑显色剂用量对  $\Delta F$  值和荧光强度的影响, 考虑到要有一定的荧光强度并有较大  $\Delta F$  值的要求, 确定显示剂的用量为 0.2 mL。

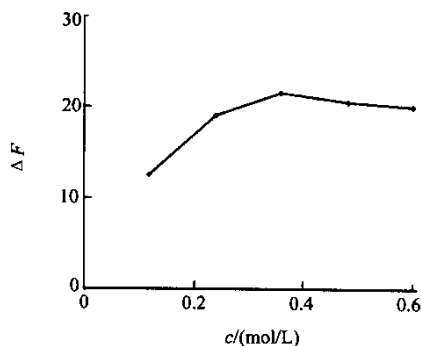


图 3 HCl 的影响

Fig. 3 Effect of HCl

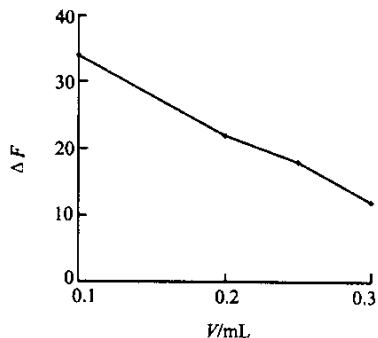


图 4 吡啶红 3B 的影响

Fig. 4 Effect of acridine red 3B

### 2.4 反应时间的影响

按实验方法, 改变反应时间, 结果表明, 在 10 min 内吡啶红 3B 与 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的反应即达平衡, 反应时间在 10 ~ 40 min 内,  $\Delta F$  值不变, 本实验选用反应时间为 15 min。

### 2.5 工作曲线

按照实验方法, 改变 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的加入量, 结果表明, 当 1 μg/mL NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的加入量在 0.1 ~ 8 mL 范围内时, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度与  $\Delta F$  呈线性关系, 线性良好, 即方法的线性范围为 (4 ~ 320) × 10<sup>-9</sup> g/mL, 以最小二乘法拟合, 得回归方程:

$$\Delta F = 1.573 + 77.79c (\mu\text{g/mL NO}_2^-)$$

相关系数为 0.996, 方法的检出限为 1.98 ng/mL (3SD/斜率, n = 12)。

### 2.6 干扰试验

对 25 种常见离子进行了干扰试验, 结果表明, 当 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 加入量为 4 μg, 相对误差在 ±5% 以内, 各种离子的允许倍数为: Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Mn<sup>2+</sup> 1000

倍;  $K^+$ ,  $NO_3^-$  200 倍;  $Ti^{4+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Co^{2+}$  100 倍;  $SO_4^{2-}$ ,  $F^-$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Se^{4+}$ ,  $Cu^{2+}$  50 倍;  $Ce^{4+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zr$  (IV),  $Mg^{2+}$  20 倍;  $Br^-$ ,  $Hg^{2+}$  10 倍;  $I^-$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  5 倍;  $Al^{3+}$  2 倍;  $Cr$  (VI) 1 倍。  $Al^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$  等的干扰可通过加入 EDTA 进行掩蔽, 当加入 0.02 mol/L 的 EDTA 溶液 1 mL 后, 它们的允许倍数分别为:  $Al^{3+}$  1000 倍以上;  $Fe^{3+}$  20 倍;  $Zn^{2+}$  200 倍

(EDTA 的用量在 2 mL 以内无干扰)

### 2.7 样品分析

按实验方法, 分别加入电厂污水, 煤矿废水, 酒厂地下水各 15 mL, 0.02 mol/L 的 EDTA 溶液 1 mL, 测得的  $\Delta F$  值代入回归方程计算水样中  $NO_2^-$  的量, 并进行加标回收试验, 结果如表 1 所示。

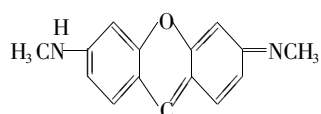
表 1 水样中  $NO_2^-$  的测量结果

Tab. 1 Determination results of Nitrite in water samples

样品名称	本法 $\rho$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD/% ( $n = 4$ )	$\alpha$ -萘胺法 $\rho$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	加入 $NO_2^-$ 量 $\rho$ ( $\mu\text{g}$ )	回收率 /%
电厂废水	0.147	3.87	0.154	2.0	95
煤矿废水	0.115	2.89	0.109	2.0	105
酒厂地下水	0.026	6.12	0.021	2.0	98.5

### 3 反应机理探讨

吡啶红 3B 属二苯并吡喃类碱性阳离子染料, 多用作生物染色剂, 其结构如式 1 所示。由式 1 可知, 吡啶红 3B 分子存在一仲胺基, 在酸性条件下易与溶液中的  $NO_2^-$  发生亚硝化反应。亚硝化反应使得仲胺基这一推电子基团消失, 同时引入了吸电子基团亚硝基, 使产物分子的  $\pi$  电子共轭度降低, 导致产物分子的荧光效率降低。从而使整个反应体系的荧光强度下降。



(1)

### 参考文献

- [1] 董存智, 陈立国. 分析化学, 1998, 26(7): 858
- [2] Damiani P, Burini G. Talanta, 1986, 33(8): 649
- [3] 苑宝玲, 林清赞. 分析化学, 2000, 28(6): 692
- [4] 张克忠, 冯尚彩, 庄会荣. 分析化学, 1998, 26(4): 494

**Determination of trace nitrite based on fluorescence quenching with acridine red 3B** DONG Cun-zhi and GOU Li-hong (Department of Chemistry, Huaibei Coal Teachers' College, 235000), Fenxi Shiyanshi, 2004, 23(6): 54 ~ 56

**Abstract**: A new fluorescence quenching method was developed to determine nitrite in water samples. The method was based on the reaction between nitrite and Acridine Red 3B in hydrochloric acid medium. The fluorescence intensity was measured with excitation and emission wavelengths of 527 and 556 nm, respectively. The linear range for the determination of  $NO_2^-$  was  $(4 \sim 320) \times 10^{-9}$  g/mL. The detection limit was  $1.98 \times 10^{-9}$  g/mL  $NO_2^-$ . It was applied to determine trace nitrite in water samples. The recoveries were 95% ~ 105%.

**Keywords**: Acridine Red 3B; Nitrite; Fluorescence quenching