

罗丹明内酰胺和铜离子荧光法检测人工湿地中的磷酸根离子

杨 慧¹ 郑林玲¹ 李原芳¹ 黄承志^{* 1,2}

¹(发光与实时分析教育部重点实验室, 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

²(西南大学药学院, 重庆 400715)

摘 要 研究发现, PO_4^{3-} 在中性条件下抑制 Cu^{2+} 催化罗丹明内酰胺水解生成强荧光罗丹明 B 的反应, 抑制的程度与 PO_4^{3-} 的浓度具有线性关系。由此, 建立了检测 PO_4^{3-} 的荧光分光光度法。在 pH 7.0 的条件下, 方法的线性范围为 $3.0 \times 10^{-6} \sim 4.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 相关系数为 0.9938, 检出限 (3σ) 为 $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。本方法用于人工湿地中 PO_4^{3-} 的检测, 加标回收率为 93.0%~108.0%, 相对标准偏差小于 6.0%。

关键词 荧光光度法; 罗丹明内酰胺; 铜离子; 磷酸根

1 引 言

人工湿地是由人工建造和控制运行的与沼泽地类似的地面, 将污水、污泥有控制地投配到经人工建造的湿地上, 污水与污泥在沿一定方向流动的过程中, 主要利用土壤、人工介质、植物、微生物的物理、化学、生物三重协同作用, 对污水、污泥进行处理的一种技术^[1], 人工湿地的分析化学是分析化学在环境科学研究中的一个应用领域^[2], 是个典型的复杂体系。 PO_4^{3-} 在生命体系中广泛存在, 并在环境净化和生化过程中扮演着重要的角色, 因此对 PO_4^{3-} 的识别尤为重要。在众多检测方法中, 荧光光谱法由于其灵敏度高、操作简便及成本低等优点, 广泛应用于环境生命体系中离子的识别和检测。现有的荧光法测定水体中 PO_4^{3-} 主要是利用 PO_4^{3-} 与特定的有机物或无机物发生作用, 使其产生荧光或荧光猝灭, 直接或间接测定 PO_4^{3-} 的含量。胡望霞等^[3]合成了一种三联吡啶衍生物, 利用其与 Zn^{2+} 形成的配合物, 研究了各种阴离子对该配合物的荧光发射, 选择性地识别了 PO_4^{3-} ; 曹春等^[4]报道了一种用水溶性 CdTe 量子点传感 PO_4^{3-} 的发光方法; 林旭聪等^[5]建立了流动注射分析结合荧光测定水中磷酸盐的方法。

罗丹明(Rhodamine)是一类重要的咕吨类碱性荧光染料, 发射处于 500~680 nm 红色可见光区, 具有较高的荧光量子产率, 在生物荧光标示与分子识别领域得到广泛应用。近年来, 以罗丹明分子为母体, 人们通过引入不同的官能团进行改造, 合成出了具有不同荧光性能的罗丹明类衍生物。罗丹明内酰胺(Rhodamine Spirolactams, RBh)是其中重要一类, 由于五元环的形成使得整个分子成螺环状结构, 刚性平面打破而无荧光发射。但当其与金属离子作用时, 内酰胺结构打开, 在长波长处有吸收, 发出强荧光。1997 年, Dujds 等^[6]合成了 RBh, 可以选择性识别 Cu^{2+} (如图 1 所示); Zheng 等^[7]随后将 RBh 螺环结构上的 N 原子换成 S 原子, 成功实现了对 Hg^{2+} 的选择性识别。此外, 将不同的小分子有机物与罗丹明 B 作用, 可合成不同的罗丹明 B 衍生物, 分别实现了 Pb^{2+} ^[8]、 Fe^{3+} ^[9] 的检测。

本研究发现, PO_4^{3-} 能抑制 Cu^{2+} 对 RBh 的水解, 使生成的罗丹明 B 减少, 且抑制程度与 PO_4^{3-} 浓度呈线性关系, 由此建立了中性条件下选择性识别人工湿地中 PO_4^{3-} 的荧光光度法。本方法简单, 耗时较短, 成本较低。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-2500 荧光分光光度计, U-3010 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司); Fluorlog-3 荧光光谱仪(法国 Horiba Jobin Yvon 公司); ^1H NMR 核磁共振仪 AVANCE AV-300 (BRUKER, Swiss); 旋转蒸发器

2012-02-10 收稿; 2012-07-25 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21035005)资助

* E-mail: chengzhi@swu.edu.cn

RE-2000 (上海亚荣生化仪器公司); MVS-1 型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造公司)。

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (天津市河北区海晶精细化工厂) 和 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (天津市恒兴化学试剂制造有限公司) 用于配制储备液; 罗丹明 B (上海化学试剂总厂)、水合肼、乙酸乙酯和无水 Na_2SO_4 用于合成 RBh, HEPES 缓冲溶液 (pH 7.0) 用于控制体系酸度。试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

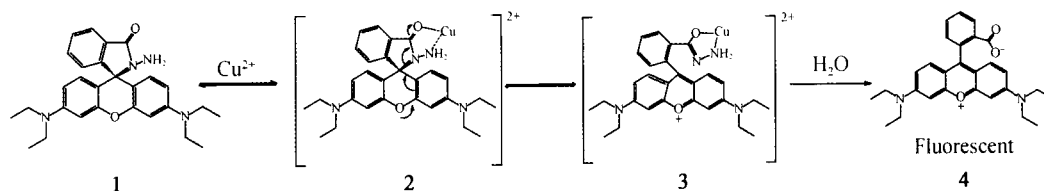


图 1 罗丹明内酰胺与铜离子的催化作用路线

Fig. 1 Catalytic route of Rhodamine spirolactam (RBh) by copper ion

2.2 实验方法

2.2.1 RBh 的合成 采用水合肼还原罗丹明 B 法合成 RBh^[6]。取 15 mL 甲醇于 25 mL 圆底烧瓶中, 加入罗丹明 B (0.4024 g, 0.88 mmol/L), 搅拌溶解后, 向溶液中加入 0.5 mL 水合肼, 加热回流 12 h, 用乙酸乙酯连续萃取 6 次, 得到粉红色透明萃取液。用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 旋转蒸发除去乙酸乙酯, 得到黄色黏稠液体 1, 再重结晶, 得白色粉末状产物 (0.2748 g, 产率 68.3%)。用 AV-300 型超导核磁共振仪 (以 TMS 为内标) 对产物进行表征, 证实所合成罗丹明衍生物为 RBh。

2.2.2 PO_4^{3-} 的检测 在 1.5 mL EP 管中依次加入适量 pH 7.0 HEPES 缓冲溶液、水、 CuCl_2 溶液、 NaCl 溶液、 PO_4^{3-} 溶液, 充分混匀后加入 RBh 溶液, 总体积为 500 μL 。室温放置 25 min 后, 用 F-2500 荧光分光光度计以 530 nm 光激发, 扫描发射光谱, 并测定位于 577 nm 的荧光强度, 激发和发射狭缝均为 5 nm, 比色池的光程为 0.5 cm。

2.2.3 实际水样中 PO_4^{3-} 检测样品预处理 取同一区域不同填料和植物的 3 块湿地的水样, 用 0.45 μm 滤膜过滤除去水中悬浮物, 再通过阳离子交换层析柱处理, 最后按照实验方法测定。

3 结果与讨论

3.1 光谱特征

RBh 为非刚性五元环螺环结构, 在可见光区无特征吸收, 也无荧光发射; 但当加入 Cu^{2+} 后, RBh 上的内酰胺结构被 Cu^{2+} 打开, Cu^{2+} 可与 RBh 的 1 位及 4 位的 N 与 O 原子配位, 形成过渡态 2, 进而导致 RBh 3 位螺环 N 原子的断键形成开环过渡态 3 的刚性平面, 再水解生成罗丹明 B 分子^[6] (见图 1), 该分子的吸收峰位于 552 nm 处, 荧光峰位于 577 nm。若向其中加入 PO_4^{3-} , 则该罗丹明 B 分子的吸光度和荧光强度均显著降低。这是由于 PO_4^{3-} 与 Cu^{2+} 具有很高的结合能力, 生成溶度积很小的沉淀 ($K_{\text{sp}} = 1.39 \times 10^{-37}$), 使得催化 RBh 开环反应的 Cu^{2+} 减少, 从而导致生成的荧光分子罗丹明 B 的吸收和荧光降低。

由图 2 可知, 单独 RBh- Cu^{2+} 在 552 nm 处有特征紫外-可见吸收峰, 吸收强度较低; 向其中加入不同浓度 PO_4^{3-} 后, 吸收强度逐渐降低。由图 3 可知, 当采用荧光分析法进行检测时, 单独 RBh- Cu^{2+} 在 577 nm 处具有较强荧光, 向 RBh- Cu^{2+} 中加入 PO_4^{3-} 时, 随着 PO_4^{3-} 浓度的增加, RBh- Cu^{2+} 在 577 nm 处的荧光强度逐渐降低, 据此可用于 PO_4^{3-} 的定量检测。

3.2 反应条件选择

由于 Cu^{2+} 对 RBh 的催化开环作用不可逆^[6], 故考虑先将 Cu^{2+} 和 PO_4^{3-} 混合后, 再加入 RBh。由实验考察 RBh、 Cu^{2+} 和 PO_4^{3-} 三者间的 6 种加样顺序, 亦得知按此顺序加样反应信噪比最高。除此以外, 考察了 Cu^{2+} 与 RBh 反应的最佳摩尔比。由图 4A 可知, 在 5.3×10^{-7} mol/L RBh 中加入不同浓度的 Cu^{2+} , 体系在 577 nm 处的荧光强度逐渐增强, 且 Cu^{2+} 浓度在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内呈现良好的线性关系 (图 4B)。由图 4B 可知, 当 Cu^{2+} 浓度为 5.0×10^{-5} mol/L 时, 体系的荧光强度达到稳定, 为此选择该浓度为最佳 Cu^{2+} 浓度。此时 Cu^{2+} 与 RBh 的摩尔比为 100:1, 与文献[6]报道相符。

考察了 pH 6.8~8.4 HEPES 缓冲溶液以及离子强度对荧光强度的影响。由图 5 可知, pH 7.0 时体系

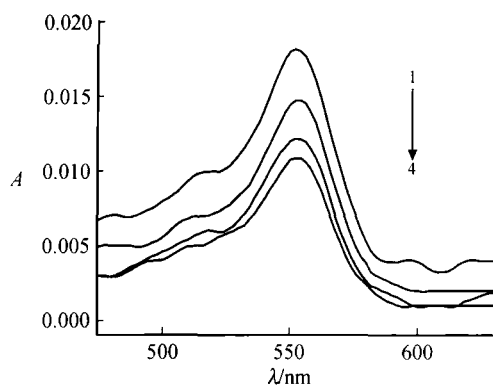


图 2 Pi 存在下 RBh 与 Cu^{2+} 作用的紫外-可见吸收光谱
Fig. 2 UV-vis absorption spectra of RBh and Cu^{2+} in presence of phosphate ions (Pi)

pH 7.0; c_{RBh} , 5.3×10^{-6} mol/L; $c_{\text{Cu}^{2+}}$, 5.5×10^{-4} mol/L; c_{Pi} (Curves 1—4, $\mu\text{mol/L}$), 0, 9.0, 18, 25; c_{NaCl} , 0.05 mol/L.

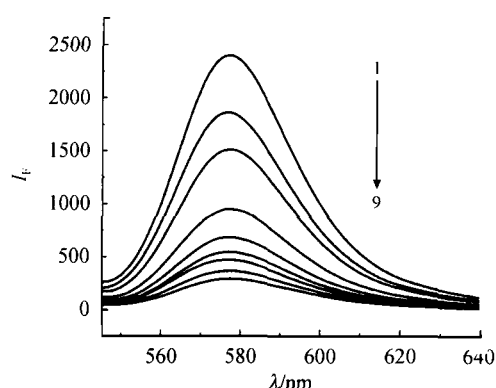


图 3 Pi 存在下 RBh 与 Cu^{2+} 作用的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of RBh and Cu^{2+} in presence of Pi

pH 7.0; c_{RBh} , 5.3×10^{-7} mol/L; $c_{\text{Cu}^{2+}}$, 5.5×10^{-5} mol/L; c_{Pi} (Curves 1—9, $\mu\text{mol/L}$), 0, 0.7, 1.0, 3.0, 9.0, 14, 20, 35, 45; c_{NaCl} , 0.05 mol/L.

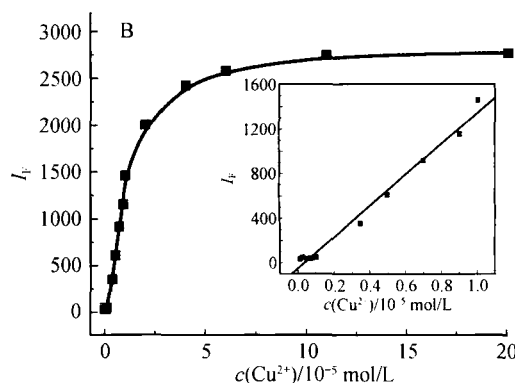
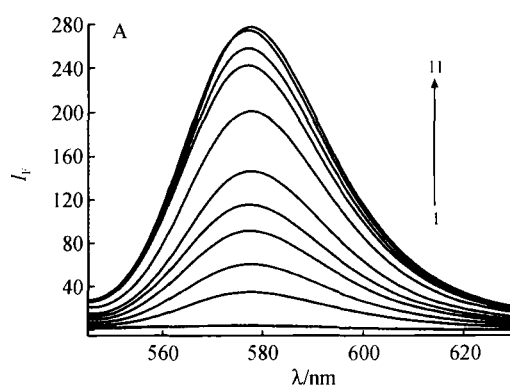


图 4 RBh 与不同浓度 Cu^{2+} 反应后的荧光光谱(A)及响应曲线(B)

Fig. 4 Fluorescence spectra (A) of RBh upon the addition of different concentrations of Cu^{2+} and the response curve (B)

pH 7.0; RBh: 0.53 $\mu\text{mol/L}$; Cu^{2+} : (Curves 1—11, $\mu\text{mol/L}$), 0, 1.0, 3.5, 5.0, 7.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 90.0, 200.0; NaCl: 0.05 mol/L.

荧光强度达到最大值,且空白和样品在 577 nm 处荧光强度差值最大。pH>7.0 时,空白和样品荧光强度逐渐降低,可能是在弱碱性环境中 Cu^{2+} 发生部分水解,影响了催化作用。NaCl 浓度在 0.05 ~ 0.4 mol/L 范围内,荧光强度随盐浓度增加而增大(图 6),说明高离子强度会抑制 PO_4^{3-} 与 Cu^{2+} 的配位作用,降低体系灵敏度。因此,本研究选择 pH 7.0 的 HEPES 缓冲溶液控制反应酸度,0.05 mol/L NaCl 为最佳离子浓度。

3.3 反应机理探讨

为了研究 RBh, Cu^{2+} 和 Pi 的具体作用机理,分别测量了罗丹明 B、RBh- Cu^{2+} 和 RBh- Cu^{2+} -Pi 的荧光寿命(τ)。实验表明,罗丹明 B、RBh- Cu^{2+} 和 RBh- Cu^{2+} -Pi 的 τ 分别为 1.89, 1.84 和 1.88 ns,表明 PO_4^{3-} 的加入对 RBh 开环产物的荧光寿命没有显著影响,可排除发生动态猝灭的可能性^[10]。

图 2 的吸收光谱表明, RBh- Cu^{2+} 和 RBh- Cu^{2+} -Pi 在 552 nm 处有最大吸收峰,与罗丹明 B 的吸收完全一致,说明 RBh 开环产物即为罗丹明 B 分子,与文献[6]报道一致。 PO_4^{3-} 的加入对 RBh 开环产物的吸收带位置没有影响,只引起吸光度强度的改变,故可推知 RBh, Cu^{2+} 和 PO_4^{3-} 作用机理是基于竞争反应的机制。从上述加样顺序的考察中,可以进一步证实该反应机理,即当向 RBh 中加入 Cu^{2+} , Cu^{2+} 催化 RBh 开环生成发射强荧光的罗丹明 B 分子, Cu^{2+} 以游离态存在于溶液中;当向 RBh- Cu^{2+} 中加入 PO_4^{3-} 时,由于 Cu^{2+} 和 PO_4^{3-} 脱氢羟基氧之间的强配位作用,体系中的 Cu^{2+} 优先与 PO_4^{3-} 发生配位,从而与 RBh 发生催化开环作用的 Cu^{2+} 减少, RBh 的荧光发射强度较小。

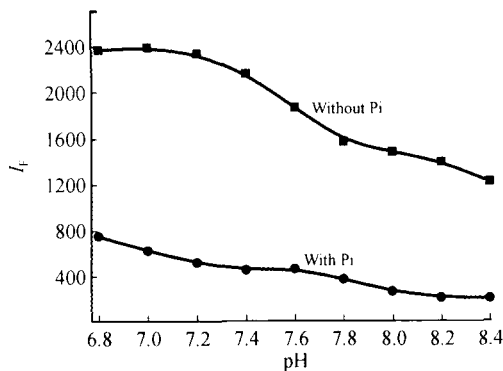


图 5 pH 值的优化

Fig. 5 Effect of pH on fluorescence intensity

c_{RBh} , 5.3×10^{-7} mol/L; c_{NaCl} , 0.05 mol/L; $c_{Cu^{2+}}$, 5.5×10^{-5} mol/L; c_{Pi} , 1.0×10^{-5} mol/L.

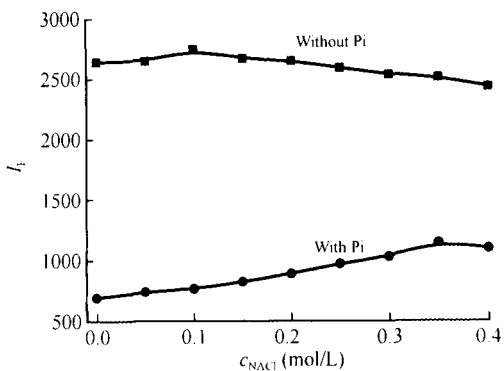


图 6 离子强度的优化

Fig. 6 Effect of ionic strength on fluorescence intensity

pH 7.0; c_{RBh} , 5.3×10^{-7} mol/L; $c_{Cu^{2+}}$, 5.5×10^{-5} mol/L; c_{Pi} , 1.0×10^{-5} mol/L.

3.4 共存物质影响

在优化实验条件下,考察了常见金属离子和阴离子对作用体系的影响,结果如表 1 所示。同倍的 SO_4^{2-} 等十余种阴离子对体系均不干扰;5.5 倍的 Al^{3+} 等 9 种金属离子对体系无干扰,但 Fe^{3+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} 的影响较大,允许量较低,可能是它们与 RBh 1-位及 4-位的 N 与 O 原子部分发生配位开环。因此,在测定实际样品前,采用阳离子交换树脂除去干扰阳离子,再进行测定。

表 1 共存物质影响

Table 1 Tolerance of foreign substances

共存物 Substances	浓度 Concentration ($\times 10^{-5}$ mol/L)	相对误差 Relatively error (%)	共存物 Coexistent substance	浓度 Concentration ($\times 10^{-5}$ mol/L)	相对误差 Relatively error (%)
Ca^{2+} , Cl^-	5.5	0.8	Ag^+ , NO_3^-	5.5	2.4
Mg^{2+} , SO_4^{2-}	5.5	2.1	Ba^{2+} , Cl^-	5.5	1.6
Al^{3+} , Cl^-	5.5	4.3	Na^+ , SO_4^{2-}	1.0	-4.7
Zn^{2+} , SO_4^{2-}	5.5	-3.9	K^+ , Ac^-	1.0	3.1
Mn^{2+} , SO_4^{2-}	5.5	-2.2	Na^+ , S^{2-}	1.0	-9.9
Pb^{2+} , NO_3^-	5.5	-3.9	Na^+ , SO_3^{2-}	1.0	-0.4
Cd^{2+} , NO_3^-	5.5	+0.5	Na^+ , Br^-	1.0	-3.0
Ni^{2+} , Cl^-	5.5	3.8	K^+ , I^-	1.0	-4.3
Co^{2+} , Cl^-	4.6	+4.7	K^+ , ClO_3^-	1.0	-2.2
Fe^{3+} , Cl^-	0.11	-3.2	Na^+ , NO_3^-	1.0	-4.4
Fe^{2+} , Cl^-	0.11	+2.2	K^+ , CO_3^{2-}	1.0	-1.6
Hg^{2+} , Cl^-	0.11	-8.2	K^+ , SCN^-	1.0	2.1

5.3×10^{-7} mol/L RBh; 1.0×10^{-5} mol/L Pi; 5.5×10^{-5} mol/L Cu^{2+} ; 0.05 mol/L NaCl; pH 7.0.

3.5 PO_4^{3-} 的分析测定参数及实际样品的测定

在优化的实验条件下,当 PO_4^{3-} 浓度在 $3.0 \times 10^{-6} \sim 4.5 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内时,空白和样品在 577 nm 处的荧光值的比值(F_0/F)与其浓度呈良好的线性关系,其线性方程为 $F_0/F = 2.2 + 1.3c$ (10^{-5} mol/L), $r = 0.9938$ 。对 1.0×10^{-5} mol/L PO_4^{3-} 溶液平行测定 11 次,得出其检出限为 1.6×10^{-7} mol/L (3σ)。

在优化的实验条件下,对人工湿地水样中的 PO_4^{3-} 含量进行测定,并进行加入标准回收率实验,同时用钼锑抗分光光度法对样品进行 PO_4^{3-} 含量测定(表 2)。钼锑抗分光光度法是在一定酸度和锑离子存在

表 2 样品 PO_4^{3-} 检测结果及回收实验($n=3$)

Table 2 Analytical results and recovery tests for phosphate ions in real sample($n=3$)

样品 Sample	测得量 Found (10^{-5} mol/L)	加入量 Added (10^{-5} mol/L)	测得总量 Total found (10^{-5} mol/L)	回收率 Recovery (%, $n=3$)	RSD (%, $n=3$)	标准方法测得量 Standard method found (10^{-5} mol/L)
1	0.76	1.00	1.69	93.00	5.74	0.77
2	0.29	1.00	1.37	108.00	2.61	0.25
3	0.36	1.00	1.34	98.00	2.49	0.32

5.3×10^{-7} mol/L RBh; 5.5×10^{-5} mol/L Cu^{2+} ; 0.05 mol/L NaCl; pH 7.0.

的情况下, PO_4^{3-} 与钼酸铵形成铋磷钼混合杂多酸, 它在常温下可迅速被抗坏血酸还原为钼蓝, 在 650 nm 波长下测定^[1]。本方法与钼铋抗分光光度法所得结果一致, 说明本方法可用于实际测定, 且本方法的操作相对简单、耗时较短、成本较低, 为环境监测中 PO_4^{3-} 的检测提供了一种快捷的新方法。

References

- 1 WANG Hui-Wen, HAN Hui-Ling. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, **2010**, 38(1): 163–167
王晖文, 韩会玲. 安徽农业科学, **2010**, 38(1): 163–167
- 2 Zhao H X, Liu L Q, Liu Z D, Wang Y, Zhao X J, Huang C Z. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(9): 2604–2606
- 3 HU Wang-Xia, LIN Li-Rong, HUANG Rong-Bin, Zheng Lan-Sun. *Chinese J. Inorg.*, **2009**, 25(3): 381–385
胡望霞, 林丽榕, 黄荣彬, 郑兰荪. 无机化学学报, **2009**, 25(3): 381–385
- 4 CAO Chun, LIU Mei-Gui, CAO Ming, XIA Yun-Sheng, ZHU Chang-Qing. *Sci. China Chem.*, **2010**, 40(4): 379–385
曹 春, 刘玫瑰, 曹 明, 夏云生, 朱昌青. 中国科学: 化学, **2010**, 40(4): 379–385
- 5 LIN Xu-Cong, XIE Zeng-Hong, CHEN Guo-Nan. *Analysis and testing technology and instruments*. **2001**, 7(4): 215–218
林旭聪, 谢曾鸿, 陈国南. 分析测试技术与仪器, **2001**, 7(4): 215–218
- 6 Dujols V, Ford F, Czarnik A W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119(31): 7386–7387
- 7 Zheng H, Qian Z H, Xu L, Yuan F F, Lan L D, Xu J G. *Org. Lett.*, **2006**, 8(5): 859–861
- 8 Kwon J Y, Jang Y J, Lee Y J, Kim K M, Seo M S, Nam W W, Yoon J Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(28): 10107–10111
- 9 Xiang Y, Tong A J. *Org. Lett.*, **2006**, 8(8): 1549–1552
- 10 XU Jin-Gou, WANG Zun-Ben. *Fluorometric Analysis Method*. Beijing: Science Press, **2006**: 64–70
许金钩, 王尊本. 荧光分析法. 北京: 科学出版社, **2006**: 64–70
- 11 State Environmental Protection Administration. *Monitoring analytical method of Water and waste water*. Beijing: Chinese environmental science press, **2006**: 243–246
国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, **2006**: 243–246

Rhodamine Spirolactam and Copper Ion-based Fluorometric Detection of Phosphate in Artificial Wetlands

YANG Hui¹, ZHENG Lin-Ling¹, LI Yuan-Fang¹, HUANG Cheng-Zhi^{1,2}

¹(Education Ministry Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, College of Chemical and Chemistry Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

²(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Under neutral condition, phosphate ions could inhibit the catalytic effect of copper ions on the hydrolysis of rhodamine spirolactam to form fluorescent rhodamine B, resulting in the decrease of fluorescent intensity. Moreover, the inhibitive degree was in proportional to the concentration of phosphate ions, which could be developed for sensing phosphate. In the buffer (pH 7.0) solution, phosphate ions could be determined in the range of 3.0×10^{-6} – 4.5×10^{-5} mol/L with the correlation coefficient of 0.9938 and the detection limit of 1.6×10^{-7} mol/L (3σ). This method was applied to the detection of phosphate in artificial wetlands with the recovery from 93.0% to 108.0% and the RSD lower than 6.0%.

Keywords Fluorometric method; Rhodamine spirolactam; Copper ions; Phosphate ions

(Received 10 February 2012; accepted 25 July 2012)