钨酸根共振瑞利散射法测定碱性三苯甲烷类染料

喻丽红, 刘忠芳, 胡小莉, 孔玲, 刘绍璞*

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

* 联系人, E-mail: liusp@swu.edu.cn

2009-02-27 收稿, 2009-08-28 接受

国家自然科学基金(批准号: 20875078)、重庆市科委自然科学基金(编号: 2007BB1359)和发光与实时分析重庆市重点实验室(西南大学)基金(编号: 2006CA8006)资助项目

摘要 在 pH 4.2~6.0 的 HAc-NaAc 缓冲介质中, 甲基紫、乙基紫、结晶紫、甲基绿、碘绿、孔雀石绿、亮绿等碱性三氨基三苯甲烷类染料(BTPMD)以及钨酸根溶液本身的共振瑞利散射(RRS)强度均十分微弱, 但是当这类染料阳离子与钨酸根配阴离子(WO_4^{2-})形成离子缔合物时, RRS 急剧增强, 并产生新的 RRS 光谱, 甲基紫、乙基紫、结晶紫与 WO_4^{2-} 的反应产物具有相似的光谱特征, 分别在 330 和 560 nm 左右有两个较强的 RRS 峰, 甲基绿、碘绿、孔雀石绿、亮绿与 WO_4^{2-} 反应产物的光谱特征也相似, 其 3 个 RRS 峰分别位于 335, 450 和 580 nm 左右. 7 种反应产物的散射强度有较大的差异, 其中孔雀石绿的灵敏度最高, 其余依次是亮绿、结晶紫、乙基紫、甲基绿、碘绿、甲基紫. 对上述 7 种染料的线性范围和检出限分别为: 0.06~2.80 $\mu\text{g/mL}$ 和 18.1 ng/mL (MG), 0.08~4.80 $\mu\text{g/mL}$ 和 22.6 ng/mL (BG), 0.10~4.80 $\mu\text{g/mL}$ 和 31.4 ng/mL (CV), 0.14~3.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 40.5 ng/mL (EV), 0.17~3.80 $\mu\text{g/mL}$ 和 50.2 ng/mL (MeG), 0.22~5.80 $\mu\text{g/mL}$ 和 67.1 ng/mL (IG), 0.25~7.40 $\mu\text{g/mL}$ 和 76.3 ng/mL (MV). 由于反应产物的散射强度(ΔI)在一定范围内与染料浓度有良好的线性关系, 因此可用于碱性三苯甲烷类染料的测定. 方法灵敏度高, 简便快速. 据此发展了一种用钨酸根作探针 RRS 法测定碱性三苯甲烷染料的新方法, 该法用于鱼肉中孔雀石绿残留量的测定, 结果满意.

关键词

碱性三苯甲烷染料
隐色孔雀石绿
隐色结晶紫
钨酸根
共振瑞利散射

孔雀石绿(MG)、亮绿(BG)、甲基绿(MeG)、碘绿(IG)、结晶紫(CV)、甲基紫(MV)和乙基紫(EV)是常见的碱性三苯甲烷染料(BTPMD), 它们除可用于棉、腈纶、蚕丝和纸张的染色外, 还是医学上一种常用消毒剂^[1], 它们在水产养殖业和家禽饲养所中也作为抗菌剂使用^[2], 其中孔雀石绿从 1933 年开始作为驱虫剂、杀菌剂、防腐剂在水产养殖中出现, 由于它对于预防和治疗各类水产动物的水霉病和对原虫的控制有良好的作用, 加之价格低廉, 效果显著, 曾一度得到广泛的应用^[3]. 然而, 从 20 世纪 90 年代开始, 国内外的

研究发现, 孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿(或称隐色孔雀石绿 LMG)在鱼的体内和环境中残留时间长, 被确证具有致畸、致癌、致突变等毒副作用^[4]. 鉴于孔雀石绿的危害性, 我国也于 2005 年 5 月将孔雀石绿列入食品动物禁用兽药^[5], 将它们的检测作为水产品的重要项目以确保食品安全. 由于其他碱性三苯甲烷染料与孔雀石绿具有相似的结构, 因此其毒副作用也十分相似, 对于它们的检测不论对于食品检验或者环境分析都是一项重要的研究内容. 目前对于这类碱性三苯甲烷染料测定的常用方法主要

引用格式: 喻丽红, 刘忠芳, 胡小莉, 等. 钨酸根共振瑞利散射法测定碱性三苯甲烷类染料. 科学通报, 2009, 54: 3283~3290

Yu L H, Liu Z F, Hu X L, et al. Tungstate ion resonance Rayleigh scattering method for the determination of basic triphenylmethane dyes. Chinese Sci Bull, 2009, doi: 10.1007/s11434-009-0692-3

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-21-3283>

有高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[9-11]、表面增强拉曼光谱法^[12]、预分离富集光度法^[13,14]和电化学分析法^[15]等,其中以 LC-MS 法灵敏度最高,分析效果最好,可惜仪器价格昂贵,因此,进一步研究和发展灵敏度高,选择性好,简便、快速的新分析方法仍是一项有意义的工作。

共振瑞利散射法是20世纪90年代之后发展起来的一种新分析技术^[16]。最近范翔等^[17]利用磷钼酸根共振瑞利散射法测定孔雀石绿取得了一定的成果,但文中仅作了简单的条件实验,既未研究其他碱性三苯甲烷染料的影响,也未涉及 MG 和 LMG 的不同作用,更未对反应机理进行讨论,因此对于用 RRS 法测定碱性三苯甲烷染料进行更深入系统的研究,发展测定这类染料更灵敏、更有效的方法是具有研究潜力和应用前景的。

我们的研究发现,在弱酸性介质中,钨酸根和钼酸根与上述7种碱性三苯甲烷染料反应形成离子缔合物时均能引起共振瑞利散射不同程度的增强并产生相应的RRS光谱,但钨酸根的灵敏度更高。当用钨酸根作探针时,对于不同的染料的检出限在18.1~76.3 ng/mL之间,其中对于MG和CV的检出限分别为18.1和31.4 ng/mL,而此时它们的无色型体,即无色孔雀石绿(LMG)和无色结晶紫(LCV)因以分子型体存在并不能产生类似反应,但当用适当氧化剂将其氧化为有色型体(如MG和CV)时,则恢复与 WO_4^{2-} 的反应能力,因此可以用RRS法同时测定MG和LMG或CV和LCV,而后者是动物吸收染料后的重要代谢物,而且灵敏度也比许多常用的方法(包括上述RRS法)更高,因此为它的分析应用创造了更好的条件。文中研究了7种染料与 WO_4^{2-} 反应体系的RRS光谱特征,适宜的反应条件和影响因素,考察了MG, CV及其无色型体LMG和LCV与 WO_4^{2-} 的反应能力及同时测定的可能性,并对反应机理及离子缔合物形成使散射增强的原因进行讨论。

1 实验

1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(岛津公司,日本),测定参数:狭缝宽度3.0 nm,高灵敏度;PHS-3D酸度计(上海精密科学仪器有限公司,上海);Acculab电子天平(赛多利斯股份公司,德国);荷兰飞利浦TECNAI10电子显微镜。

甲基紫、乙基紫、结晶紫、孔雀石绿、甲基绿、亮绿(MG, 分析纯,上海化学试剂采购供应站)以及碘绿(IG, CHROMA)标准溶液:分别配制 1.0×10^{-3} mol/L储备溶液和20.0 $\mu\text{g/mL}$ 工作溶液。隐色孔雀石绿(LMG, Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, ward Hill, MA 01835)和隐色结晶紫(LCV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, D-89555 Steinheim, Germany)标准溶液:分别配制 1.0×10^{-3} mol/L储备溶液和20.0 $\mu\text{g/mL}$ 工作溶液(用乙腈作溶剂)。钨酸钠溶液(分析纯,重庆北碚化学试剂厂):先配制 5.0×10^{-2} mol/L的贮备溶液,再稀释至 5.0×10^{-3} mol/L作为工作溶液。试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

于10 mL比色管中,依次加入(1.5~2.0) mL pH 4.4~5.0 HAc-NaAc缓冲溶液,(0.5~1.0) mL 5.0×10^{-3} mol/L钨酸钠溶液,适量的碱性三苯甲烷类染料溶液,用二次蒸馏水稀释至刻度,摇匀,依据不同体系分别放置15~60 min,在荧光分光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$ 进行同步扫描,记录共振瑞利散射(RRS)光谱,并于选定散射波长处分别测量反应产物的RRS强度(I)及试剂空白的RRS强度 I_0 , $\Delta I=I-I_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 RRS 光谱

实验了7种碱性三苯甲烷类染料与 WO_4^{2-} 的离子缔合反应及其RRS特征,结果如图1(a)和(b)所示,7种碱性染料和 WO_4^{2-} 溶液自身的RRS均十分微弱,当染料与 WO_4^{2-} 反应后,反应产物的RRS显著增强,但由于染料分子中含氨基数量及其烷基化程度以及所带电荷的不同,反应产物的RRS光谱特征和相对强度也有较大的差异,这里可以大体分为三类(见图1和表1):(1)单电荷的碱性三氨基三苯甲烷染料的MV, CV和EV具有类似的光谱特征(见图1(a)),它们有两个分隔的散射带,其最大散射峰位于550 nm附近,另一散射峰位于330 nm;(2)单电荷的碱性二氨基三苯甲烷染料的MG, BG的RRS光谱特征相似,它们有3个明显的散射带,其最大散射峰位于335 nm附近,另两个散射峰则分别位于450和570 nm附近;(3)双电荷的碱性三氨基甲烷染料的MeG和IG,它们具有强度逐渐降低的3个散射带,其最大散射峰位于335 nm附近,另两个散射峰分别在450 nm和600 nm

图1 RRS光谱

(a) CV, EV 和 MV 体系. 1, 试剂空白; 2, CV; 3, EV; 4, MV; 5, MV- WO_4^{2-} ; 6, EV- WO_4^{2-} ; 7, CV- WO_4^{2-} ; WO_4^{2-} 浓度: 2.5×10^{-4} mol/L, 染料浓度: $2.0 \mu\text{g/mL}$, pH 5.0. (b) MG, BG, MeG 和 IG 体系. 8, 试剂空白; 9, MG; 10, BG; 11, MeG; 12, IG; 13, IG- WO_4^{2-} ; 14, MeG- WO_4^{2-} ; 15, BG- WO_4^{2-} ; 16, MG- WO_4^{2-} . WO_4^{2-} 浓度: 5.0×10^{-4} mol/L, 染料浓度: $2.0 \mu\text{g/mL}$, pH 4.4

附近, 这不同于单电荷三氨基甲烷染料两个散射带, 在光谱外形上也有别于 MG 和 BG, 不仅散射强度较低, 而且第 3 个散射峰红移至 600 nm 附近(见图 1(b)). 因此可以看出 RRS 光谱特征在一定程度上能反映染料的某些结构信息, 在反应产物的相对散射强度看, 以 MG 和 CV 体系最高, 而 IG, MeG 和 MV 体系最低, 因此 RRS 对于测定 MG 和 CV 是最有利的, 图 2 是不同浓度的 MG 和 CV 与 WO_4^{2-} 结合产物的 RRS 光谱图, 可以看出, 散射强度与染料浓度成正比, 其他染料也有类似关系, 故此方法可用于这类染料的定量测定.

图2 MG- WO_4^{2-} 和 CV- WO_4^{2-} 体系的 RRS 光谱和浓度之间的关系

(a) MG- WO_4^{2-} 体系. 1, 试剂空白; 2~7, MG- WO_4^{2-} 体系, MG 浓度: 分别为 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 $\mu\text{g/mL}$; WO_4^{2-} 浓度: 2.5×10^{-4} mol/L, pH 5.0. (b) CV- WO_4^{2-} 体系. 1', 试剂空白; 2'~6', MG- WO_4^{2-} 体系, CV 浓度分别为: 1.6, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8 $\mu\text{g/mL}$; WO_4^{2-} 浓度: 5.0×10^{-4} mol/L, pH 4.4

2.2 适宜的反应条件

(1) 溶液 pH 值的影响. 实验了柠檬酸钠-NaOH, HCl-NaAc, HAc-NaAc 和 Britton-Robinson 等缓冲介质对反应体系 RRS 强度的影响, 结果表明 HAc-NaAc 的效果最好. 当用 HAc-NaAc 缓冲溶液作为反应介质, 适宜的 pH 值范围对于 MV, CV 和 EV 体系是 4.5~6.0, 而对于 MG, BG, MeG 和 IG 体系的适宜 pH 值范围在 4.2~4.6 之间, 显然, 碱性三氨基三苯甲烷染料的 CV, EV 和 MV 适宜 pH 值范围更宽, 而碱性二氨基三苯甲烷染料的 MG, BG 和双电荷的碱性三苯甲烷染料的 IG 和 MeG 的适宜 pH 较窄. 实验了缓冲溶液用量的影响, 结果是对于 CV, EV 和 MV 的适宜用量为 1.5~2.5 mL, 对其余体系为 1.0~

表 1 BTPMD- WO_4^{2-} 反应体系的 RRS 光谱特征

体系	散射峰			散射强度			散射增强		
	λ_1	λ_2	λ_3	I_1	I_2	I_3	$\Delta I_1=I_1-I_0$	$\Delta I_2=I_2-I_0$	$\Delta I_3=I_3-I_0$
MV- WO_4^{2-}	331	561		20.3	26.2		15.9	24.2	
CV- WO_4^{2-}	331	561		70.9	93.7		67.9	92.6	
EV- WO_4^{2-}	332	561		61.2	80.2		56.8	78.2	
MG- WO_4^{2-}	339	459	563	109.2	67.8	60.8	107.9	66.1	59.9
BG- WO_4^{2-}	335	451	569	77.9	42.1	46.7	73.6	40.6	44.9
MeG- WO_4^{2-}	337	450	599	41.7	25.0	14.1	40.1	23.9	13.1
IG- WO_4^{2-}	334	450	598	33.8	15.7	12.8	29.8	14.2	10.8

2.0 mL. 故以下实验对于 MV, CV 和 EV 体系, 选用 pH 5.0 的缓冲溶液, 其加入量为 2.0 mL, 对于 MG, BG, MeG 和 IG 体系选用 pH 4.4 的缓冲溶液, 加入量为 1.5 mL.

(2) 钨酸钠浓度的影响. 实验了钨酸钠浓度对 RRS 强度的影响. 结果表明, WO_4^{2-} 的适宜浓度对于 CV 和 EV 体系为 $0.8 \times 10^{-4} \sim 3.8 \times 10^{-4}$ mol/L, 对于 BG, MeG 和 IG 体系为 $3.8 \times 10^{-4} \sim 7.5 \times 10^{-4}$ mol/L, 而对于 MV 和 MG 则分别为 $0.5 \times 10^{-4} \sim 10.0 \times 10^{-4}$ mol/L 和 $3.8 \times 10^{-4} \sim 10.0 \times 10^{-4}$ mol/L. 在以下实验中, WO_4^{2-} 的浓度对于 CV, EV 和 MV 体系选用 2.5×10^{-4} mol/L, 而其余体系均选用 5.0×10^{-4} mol/L.

(3) 反应速度及散射强度的稳定性. 实验了反应速度及散射强度(ΔI)的稳定性. 结果表明, 在室温 (15~25℃) 条件下, EV 和 MeG 体系反应较慢, 反应完成需 1 h, 而 MV, CV, IG 和 BG 体系需 40 min, 但 MG 反应较迅速, 在 15 min 内能完成反应, 此后散射强度除 MG 和 CV 体系稳定 30 min 外, 其余体系均可至少稳定 2 h. 因此, 不同的反应体系应在散射强度稳定区间完成测量.

(4) 离子强度的影响. 用调节 NaCl 浓度的方法实验了离子强度对散射强度(ΔI)的影响. 对于 BG- WO_4^{2-} , MeG- WO_4^{2-} , IG- WO_4^{2-} 体系, NaCl 浓度低于 0.01 mol/L 时, 离子强度对 ΔI 的影响较小, 但更高的 NaCl 浓度会使 ΔI 逐渐降低, 对于其余体系, NaCl 浓度低于 0.05 mol/L 时, 对 ΔI 的影响甚微, 而 NaCl 浓度更大时也会引起 ΔI 的降低, 故反应中应注意控制无机盐的加入, 不使离子浓度过高.

(5) 乙腈浓度的影响. 试验了乙腈浓度对测定孔雀石绿和钨酸根结合产物 RRS 强度的影响, 发现乙腈的允许浓度为 10%, 当大于该浓度时, ΔI 显著降低, 故该反应应控制乙腈的浓度低于 10%.

2.3 标准曲线

在最佳实验条件下, 取不同浓度的染料标准溶液与 WO_4^{2-} 溶液反应, 在选定波长处测量 RRS 强度, 绘制相应的标准曲线, 从标准曲线得到的线性范围、相关系数和检出限等列于表 2.

本法测定孔雀石绿和结晶紫等碱性三苯甲烷染料具有较高的灵敏度, 其灵敏度虽低于液相色谱-质谱法^[6,9,10], 但是高于已知的分光光度法, 它们必须经预处理富集后才能达到较高的灵敏度^[14,18], 我们实验了不经预富集直接用本身的吸收光谱分光光度法测定 MG, 结果表明其检出限大约为 70 ng/mL, 其检出限是本法的 4 倍左右, 显然 RRS 法更灵敏. 而且用 WO_4^{2-} 作探针 RRS 法测定 MG 的灵敏度大大高于磷酸盐 RRS 法 (55 ng/mL)^[19], 而 RRS 法较液相色谱-质谱法等更为简便快速.

3 碱性三苯甲烷染料及其隐色体与 WO_4^{2-} 的相互作用

3.1 碱性三苯甲烷染料与 WO_4^{2-} 的相互作用

钨酸根离子酸化时会发生聚合, 随着 H^+ 与 WO_4^{2-} 的摩尔比的变化, 将生成不同类型的同多钨酸根阴离子^[20]. 当 H^+ 与 WO_4^{2-} 的摩尔比在 0 和 1 附近时, 主要以 WO_4^{2-} 和 $\text{W}_4\text{O}_{16}^{8-}$ 的形式存在.

表 2 标准曲线的某些参数和检出限

体系	测量波长/nm	线性回归方程/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	相关系数(r)	线性范围/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	检出限/ ng mL^{-1}
MG- WO_4^{2-}	339	$\Delta I = -3.1 + 56.4 C$	0.9998	0.06~2.80	18.1
BG- WO_4^{2-}	335	$\Delta I = 3.5 + 37.2 C$	0.9983	0.08~4.80	22.6
CV- WO_4^{2-}	331	$\Delta I = -2.9 + 38.2 C$	0.9970	0.10~4.80	31.4
EV- WO_4^{2-}	335	$\Delta I = 2.0 + 29.6 C$	0.9984	0.14~3.00	40.5
MeG- WO_4^{2-}	337	$\Delta I = 4.7 + 18.5 C$	0.9952	0.17~3.80	50.2
IG- WO_4^{2-}	332	$\Delta I = 3.4 + 15.2 C$	0.9985	0.22~5.80	67.1
MV- WO_4^{2-}	329	$\Delta I = -2.5 + 11.4 C$	0.9997	0.25~7.40	76.3

本实验的酸度为 pH 4.2~6.0, 钨酸根的浓度较低为 $0.5 \times 10^{-4} \sim 10 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, H^+ 与 WO_4^{2-} 的摩尔比在 0~1 之间, WO_4^{2-} 聚集程度很低, 此时钨酸根主要以 WO_4^{2-} 型体存在。

以 CV 和 MeG 为例, 测定了它们与 WO_4^{2-} 反应形成离子缔合物的组成比, 结果为 $\text{CV}^+ : \text{WO}_4^{2-} = 2 : 1$, 而 $\text{MeG}^{2+} : \text{WO}_4^{2-} = 1 : 1$, 可以推出作为单电荷阳离子的三苯甲烷染料的 MG, BG, CV, EV, MV 与 WO_4^{2-} 反应均形成 2 : 1 的电荷中和的离子缔合物, 而作为双电荷阳离子的三苯甲烷染料的 MeG, IG 则形成 1 : 1 的电荷中和的离子缔合物, $[\text{CV}]_2[\text{WO}_4^{2-}]$ 和 $[\text{MeG}][\text{WO}_4^{2-}]$ 的结合模式如图 3 所示。

了解离子缔合物是以单个分子状态或是分子聚集体的型体存在对于探讨散射增强的原因有重要作用, 因此我们以结晶紫体系为例, 对于 WO_4^{2-} , 结晶紫及它们的结合产物用透射电子显微镜进行了观测, 结果发现, 无论是 WO_4^{2-} 还是结晶紫本身均以小分子的状态存在, 但是它们的结合产物则是形成平均粒径约为 30 nm 的纳米微粒, 并有进一步聚集的倾向,

如图 4 所示。

因此可以认为 1 价染料阳离子形成的离子缔合物如 $[\text{CV}]_2[\text{WO}_4^{2-}]$ 或 2 价染料阳离子形成的离子缔合物如 $[\text{MeG}][\text{WO}_4^{2-}]$ 均不是以单分子型体存在, 而是由于离子缔合物有强的疏水性, 它们在水相的“挤压”作用和疏水分子之间的范德华力的作用下, 会彼此靠近并聚集形成大的分子聚集体(见图 4(c)), 聚集反应如下:

3.2 隐色孔雀石绿(LMG)和隐色结晶紫(LCV)与 WO_4^{2-} 的相互作用

由于孔雀石绿和结晶紫的还原型为无色的隐色体, 其结构见图 5, 它们也是动物或人体吸收消化后的主要代谢产物, 因此研究隐色孔雀石绿(LMG)和隐色结晶紫(LCV)的 RRS 光谱特征及其与 WO_4^{2-} 的反应能力对于实际分析应用有重要意义。

图 3 $[\text{CV}]_2[\text{WO}_4^{2-}]$ 和 $[\text{MeG}][\text{WO}_4^{2-}]$ 离子缔合物结构示意图

图 4 钨酸钠、结晶紫及二者结合产物的透射电子显微镜图
(a) WO_4^{2-} ; (b) CV; (c) CV-WO_4^{2-}

图 5 LMG 和 LCV 的结构图

孔雀石绿和结晶紫与相应的隐色体与 WO_4^{2-} 反应体系的 RRS 光谱比较如图 6 所示, 由图 6 可以看出, LMG 和 LCV 的 RRS 均高于相应的 MG 和 CV, 这是由于 LMG 和 LCV 是不带电荷的中性分子, 难溶于水,

虽然加入一定量的乙腈使它们溶解, 但是由于其疏水性, 它们仍表现出较高散射强度(LMG 和 LCV 见图 6 中曲线 3 和 7, 而 MG 和 CV 则为曲线 1 和 5), 但是与 MG 和 CV 不同的是它们基本上不与 WO_4^{2-} 反应并引起 RRS 增强, 这是由于电中性的 LMG 和 LCV 不能借静电引力与 WO_4^{2-} 反应, 并形成相应的离子缔合物. 故 WO_4^{2-} 只能与 MG 和 CV 等氧化型染料发生反应而不与还原型的隐色体反应. 这样, 当 WO_4^{2-} 直接与染料反应时可用 RRS 法测定染料的可色型体, 当预先用适当的方法将隐色体氧化后, 即可测定有色和隐色两种型体的总量, 两者之差即为隐色体的含量.

图 6 MG, CV, LMG 和 LCV 及它们与钨酸根反应的 RRS 光谱对比图

(a) 1, 2, 3, 4: MG, MG-WO_4^{2-} , LMG, LMG-WO_4^{2-} ; (b) 5, 6, 7, 8: CV, CV-WO_4^{2-} , LCV, LCV-WO_4^{2-}

3.3 散射增强的原因

WO_4^{2-} 与碱性三苯甲烷染料之间的离子缔合作用导致散射增强可能主要有以下两个方面的原因.

(1) 共振增强瑞利散射效应. 由于 RRS 是由散射与光吸收发生共振而产生的散射-吸收-再散射过程, 因此, RRS 光谱应当与吸收光谱密切相关, 从 RRS 与吸收光谱的比较(见图 7)可以看出 RRS 峰位

于它的吸收带中. 图7显示了MG- WO_4^{2-} 离子缔合物在459和563 nm处的RRS峰与460和640 nm处的吸收峰存在较好的对应关系, 因此产生了共振增强效应, 使散射强度显著增大, 这是产生RRS的必要条件.

图7 MG- WO_4^{2-} 体系的吸收光谱(实线)和RRS光谱(虚线)
 WO_4^{2-} 浓度: 5.0×10^{-4} mol/L, MG 浓度: 2.0 $\mu\text{g/mL}$

(2) 纳米聚集体的形成. 由前述 CV- WO_4^{2-} 体系可以看出, 离子缔合物能进一步聚集成 30 nm 左右的纳米微粒, 纳米微粒的形成可以产生以下效应: ① 体积增大效应. 已知共振瑞利散射强度与散射微粒的体积成正比, WO_4^{2-} 和碱性三苯甲烷染料的体积都很小, 当碱性三苯甲烷染料与 WO_4^{2-} 形成离子缔合物后, 形成了较大的纳米微粒聚集体, 其体积明显增大(见图4), 这是共振瑞利散射增强的原因之一. ② 界面增强散射效应. 无论是带正电荷的碱性三苯甲烷类染料还是钨酸根阴离子, 它们都具有较好的亲水性, 因此能很好地溶于水形成水合物, 由于没有与水产生界面而使 RRS 强度很低, 但当碱性三苯甲烷类染料与钨酸根形成离子缔合物后, 它们所带的电荷被中和, 电中性的缔合物又进一步聚集成疏水性的纳米微粒, 它们与水相之间可能形成疏水界面, 这种疏水界面的形成将有利于散射的增强.

4 方法的选择性及分析应用

4.1 共存物质的影响

以孔雀石绿为例, 研究了共存物质对测量 RRS 强度的影响. 结果表明, 200~1500 倍的 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , 100 倍的 Zn^{2+} , 16~70 倍的 Cu^{2+} , $\text{Hg}(\text{II})$, $\text{Mn}(\text{II})$, Fe^{2+} , Fe^{3+} , 1000 倍的 SO_4^{2-} , Cl^- , 柠檬酸根, 200~1000 倍的淀粉、葡萄糖, 100~600 倍的氨基酸以及 10~50 倍的 HSA 和 BSA 不干扰测定. 而 $\text{Al}(\text{III})$ 的干扰较大, 但加入少量 NaF 溶液作掩蔽剂时, 允许量可增大至 50 $\mu\text{g/mL}$, 因此方法有较好的选择性. 但是由于 MoO_4^{2-} 与 MG, CV 等染料有相似的反应, 仅允许 18 $\mu\text{g/mL}$ 存在, 而带正电荷的大分子蛋白质(如 HSA) 能与钨酸根形成结合产物也能引起 RRS 增强^[19], 此时 Pb^{2+} 也可能与 WO_4^{2-} 形成难溶的 PbWO_4 ($K_{\text{sp}}: 4.5 \times 10^{-7}$) 而悬浮于溶液, 导致它们的散射增强允许量较低. 因此在实际分析中, 应根据样品情况作必要的前处理和分离富集工作.

4.2 鱼肉中孔雀石绿的测定

(1) 样品提取和净化^[21]. 称取 20.0000 g 样品, 根据文献^[21]对样品进行提取和净化, 制得 50.0 mL 待测液.

(2) 孔雀石绿的测定. 取 2.5 mL 样品溶液于 10 mL 比色管中, 按实验方法测定孔雀石绿的含量.

(3) 孔雀石绿和隐色孔雀石绿总量的测定. 另取 10.0 mL 试液于 50 mL 烧杯中, 加水 10.0 mL, 再加 0.2 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 g 铋酸钠, 放置 20 min 后, 用 0.2 mol/L NaOH 中和至刚果红试纸由蓝变红, 于沸水浴上蒸发至近干, 加 10 mL 乙腈水混合物(1:9)溶解并转移至离心管中, 用 6000 r/min 离心机离心 15 min 后, 移取上层清液 2.5 mL 于 10 mL 比色管中, 同实验方法. 此时得到的是孔雀石绿和隐

表3 鱼肉中孔雀石绿的测定结果

样品	染料	测得值/ mg kg^{-1}	加入量/ mg kg^{-1}	测得值/ mg kg^{-1}	平均值/ mg kg^{-1}	RSD(%)	回收率(%)
1	MG	ND ^{a)}	4.0	4.12, 4.15, 4.23, 4.00, 4.09	4.12	2.0	103.0
	LMG	ND	2.0	1.95, 1.88, 2.12, 1.93, 1.85	1.95	5.4	97.3
2	MG	ND	8.0	8.06, 8.05, 7.92, 7.86, 8.04	7.98	1.0	99.7
	LMG	ND	6.0	5.85, 5.91, 6.07, 5.87, 5.79	5.90	1.8	98.3

a) ND 表示未测出

色孔雀石绿的总量. 总量减去孔雀石绿的量即为隐色孔雀石绿的量.

上述方法的测定结果及加标回收实验结果列于表3中.

参考文献

- 1 中国大百科全书编辑委员会编. 中国大百科全书(化学Ⅱ). 北京: 中国大百科全书出版社, 1989. 888
- 2 De S, Girigoswami A, Mandal S. Enhanced fluorescence of triphenylmethane dyes in aqueous surfactant solutions at supramolecular concentrations—effect of added electrolyte. *Spectrochim Acta Part A*, 2002, 58: 2547—2555[doi]
- 3 翟毓秀, 郭莹莹, 耿霞, 等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展. *中国海洋大学学报*, 2007, 37: 27—32
- 4 翟毓秀, 张翠, 宁劲松, 等. 水产品中的孔雀石绿残留及其研究概况. *海洋水产研究*, 2007, 28: 102—108
- 5 仇国苏, 张旭东, 陈仕功. 认识孔雀石绿. *化学教育*, 2007: 22—23
- 6 Halme K, Lindfors E, Peltonen K. A confirmatory analysis of malachite green residues in rainbow trout with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2007, 845: 74—79[doi]
- 7 Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2005, 1089: 187—192[doi]
- 8 安蓉, 黄炯嘉, 李琛琛. 安捷伦高分离快速液相色谱(RRLC)分析孔雀石绿与结晶紫. *质量监督与标准*, 2006, 6: 32—35
- 9 Geraldine D, Patrick P J, Mulder C D, et al. Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leuco-crystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2007, 586: 411—419[doi]
- 10 Vallea L, Díaz C, Zanocco A L, et al. Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2005, 1067: 101—105[doi]
- 11 吴学立, 吴永宁, 赵云峰, 等. 液相色谱—线性离子阱质谱法检测草鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19: 209—214
- 12 Lucotti A, Pesapane A, Zerbi G. Use of a geometry optimized fiber-optic surface-enhanced Raman scattering sensor in trace detection. *Appl Spectrosc*, 2007, 61: 260—268[doi]
- 13 Pourreza N, Elhami Sh. Spectrophotometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-100. *Anal Chim Acta*, 2007, 596: 62—65[doi]
- 14 Šafařík I, Šafaříková M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. *Water Res*, 2002, 36: 196—200[doi]
- 15 Passapol N, Thiraporn C, Orawon C. Cost-effective flow cell for the determination of malachite green and leucomalachite green at a boron-doped diamond thin-film electrode. *Anal Sci*, 2006, 22: 111—116[doi]
- 16 Pasternack R F, Collings P J. Resonance Rayleigh scattering: A new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 1995, 269: 935—939[doi]
- 17 范翔, 吕昌银, 刘运美, 等. 共振瑞利散射法测定孔雀石绿. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16: 1158—1169
- 18 Pourreza N, Elhami S H. Spectrophotometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-100. *Anal Chim Acta*, 2007, 596: 62—65[doi]
- 19 刘绍璞, 杨睿, 罗红群, 等. 某些同多酸根与蛋白质相互作用的共振瑞利散射光谱研究. *分析化学研究简报*, 2005, 33: 1125—1128
- 20 化工百科全书编辑部编. 化工百科全书. 北京: 化学工业出版社, 1996
- 21 GB/T19857-2005. 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定.