

多波长荧光分光光度法(二)

— 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 三组分混合物的测定

黄贤智 许金钧 李文钦* 卢建敏*

(厦门大学化学系)

摘 要

本文叙述了应用多波长荧光分光光度法测定人工样品中的荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B。于波长 502nm 直接测量荧光黄的荧光强度, 罗丹明 6G 和罗丹明 B 均不干扰; 罗丹明 6G 的测定波长 λ_1 为 555nm, 参比波长 λ_2 和 λ_3 为 502nm 和 660nm, 罗丹明 B 的测定波长 λ_1 选用 585nm, 参比波长 λ_2 、 λ_4 和 λ_3 相应为 538nm、508nm 和 494nm, 方法的相对误差一般小于 6%。

作者于前文叙述了多波长荧光分光光度法的原理^[1], 为了验证该原理的可靠性, 特对荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 人工混合样品进行实测。结果表明, 方法原理可靠, 实验操作和数据处理简便快速, 三次测定平均偏差 < 3%。

实 验 部 分

一、仪器和试剂

(一) 仪器: yF-1 型、yF-2 型荧光分光光度计 (厦门大学精密仪器厂)

(二) 试剂:

1. 荧光黄标准溶液: 称取 10 毫克荧光黄于小烧杯中, 用少许 0.1N NaOH 溶解, 移入 200 毫升容量瓶, 用 2.5×10^{-3} N NaOH 溶液稀释至刻度。此溶液荧光黄浓度为 50 微克/毫升 (即 50ppm)。使用时移取上述溶液, 用 2.5×10^{-3} N NaOH 稀释成 5ppm。

2. 罗丹明 6G 标准溶液: 50 微克/毫升; 5 微克/毫升。配制方法同上。

3. 罗丹明 B 标准溶液: 50 微克/毫升; 5 微克/毫升。配制方法同上。

二、条件试验

(一) 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 荧光发射光谱的测绘。分别移取上述的荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 的 5ppm 标准溶液 5 毫升于三个 50 毫升容量瓶中, 用 2.5×10^{-3} N NaOH 溶液稀释至刻度, 摇匀。于 yF-2 型荧光分光光度计, 以 365nm 汞线为激发光, 自动扫描记录出它们的荧光发射光谱, 所得的谱图如图 1 所示。它们的荧光峰分别为: 荧光黄 520nm、罗丹明 6G 555nm 和罗丹明 B 585nm。

(二) 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 荧光强度加和性试验

多波长荧光分光光度法的重要条件之一, 是在不同的波长下, 其荧光强度应有良好的加和性。因此有必要对它们分别存在时和它们共存时的荧光强度进行试验。结果列于表 1。显然, 它们在不同波长下的荧光强度均有良好的加和性。

* 化学系分析专业 84 届毕业生

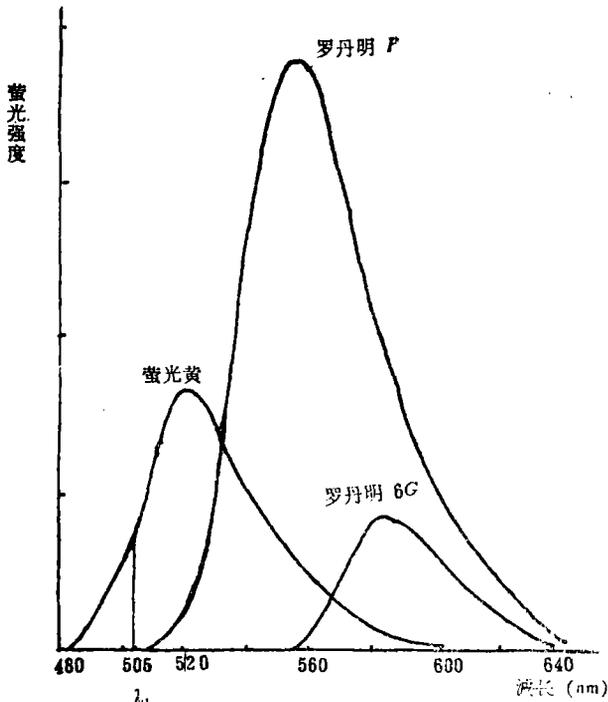


图1 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 的荧光发射光谱

(三) 测定波长 λ_1 和参比波长 λ_2 (λ_3 或 λ_4) 的选择及计算方法

1. 测定荧光黄时波长的选择

由图 1 荧光黄的发射光谱可知,其荧光峰位于 520nm,虽在 520nm 处测量荧光的方法灵敏度最高,可是罗丹明 6G 有干扰。为了避开罗丹明 6G 的干扰,我们改在 502 nm 处测定荧光黄,虽然方法灵敏度有所下降,但其他两种荧光物质不干扰。

2. 测定罗丹明 6G 时波长对的选择

根据罗丹明 6G、罗丹明 B 和荧光黄的发射光谱,我们选用罗丹明 6G 的荧光峰 555nm 为它的测定波长 λ_1 ; 为了消除荧光黄的干扰,由荧光黄的发射光谱找出它的与 λ_1 等荧光强度的波长 502nm 为参比波长 λ_2 ; 为了消除罗丹明 B 的干扰,由罗丹明 B 的发射光谱找出它的与 λ_1 等荧光强度的波长 660nm 为参比波长 λ_3 (见图 2)。接着由公式 (1) 计算出罗丹明 6G 的 ΔF

$$\Delta F = F_{555}^{\text{总}} - F_{502}^{\text{荧光黄}} - F_{660}^{\text{罗丹明 6G + 罗丹明 B}} \quad (1)$$

式中 ΔF 为罗丹明 6G 于波长 555nm 和 660nm 测得的荧光强度之差。

$F_{555}^{\text{总}}$ 为于波长 555nm 测得的罗丹明 6G、罗丹明 B 及荧光黄三者的荧光强度之和。

$F_{502}^{\text{荧光黄}}$ 为于波长 502nm 测得的荧光黄的荧光强度。

$F_{660}^{\text{罗丹明 6G + 罗丹明 B}}$ 为于波长 660nm 测得的罗丹明 6G 和罗丹明 B 的荧光强度之和。

然后由罗丹明 6G 的 $\Delta F \sim C$ 工作曲线找出罗丹明 6G 的含量。

3. 测定罗丹明 B 时波长对的选择

由图 1、2 可知,罗丹明 6G 和荧光黄对罗丹明 B 的测定都有干扰,其中以罗丹明 6G 的干扰最严重。实践表明,只要选择好测定的波长对,仍能对罗丹明 B 进行测定,我们选择罗丹明 B 的荧光峰 585nm 为它的测定波长 λ_1 。为消除罗丹明 6G 和荧光黄的干扰,分别找出其等荧光强度波长 538nm 和 494 nm 为参比波长 λ_2 和 λ_3 。由于 λ_2 测得的荧光强度是罗丹明 6G 和荧光黄于 λ_2 的荧光强度之和,因此还得由荧光黄的 λ_2 找出其荧光强度波长 508nm 为 λ_4 (见图 3),接着由公式 (2) 计算出罗丹明 B 于 585nm 的荧光强度

$$F_{585}^{\text{罗丹明 B}} = F_{585}^{\text{总}} - F_{494}^{\text{荧光黄}} - F_{538}^{\text{罗丹明 6G + 荧光黄}} + F_{508}^{\text{荧光黄}} \quad (2)$$

式中 $F_{585}^{\text{罗丹明 B}}$ 为罗丹明 B 于波长 585nm 的荧光强度

$F_{585}^{\text{总}}$ 为罗丹明 B、罗丹明 6G 和荧光黄三者于波长 585nm 的荧光强度之和

$F_{538}^{\text{罗丹明 6G + 荧光黄}}$ 为罗丹明 6G 和荧光黄于波长 538nm 的荧光强度之和

表1 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 荧光强度加和性试验 (三者浓度均为 0.200ppm, 介质为 $2.5 \times 10^{-3} \text{N NaOH}$)

荧光物质	荧光黄	罗丹明 6G	罗丹明 B	荧光黄、罗丹明 6G 罗丹明 B 三者混合物
波长nm				
480	0	0	0	0
490	0	0	0	0
500	50	0	0	51
505	79	0	0	81
510	115	0	0	114
520	166	5	0	170
540	106	255	0	340
550	74	362	0	438
555	62	378	0	443
560	50	366	10	426
570	33	298	49	380
580	18	219	85	322
585	12	185	89	289
590	6	152	87	245
600	0	105	67	172
610	0	75	45	120
620	0	45	26	71
630	0	24	14	38
640	0	12	5	17

$F_{508}^{\text{荧光黄}}$ 和 $F_{494}^{\text{荧光黄}}$ 分别是荧光黄于 508nm 和 494nm 处的荧光强度,最后由罗丹明 B 的

工作曲线查出罗丹明 B 的含量。

(四) 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 工作曲线的测绘

1. 荧光黄工作曲线的测绘

移取不同量的荧光黄于一系列 50 毫升的容量瓶中,用 $2.5 \times 10^{-3} \text{N NaOH}$ 稀释,配制成含荧光黄 0, 0.10, 0.20...1.00ppm 的标准系列,于荧光分光光度计用 365nm 汞线激发,502nm 测量荧光强度,然后由荧光强度对荧光黄浓度绘制成 $F \sim C$ 工作曲线(见图 4)。

2. 罗丹明 B 工作曲线测绘

除改用 585nm 测量荧光强度外,其他步骤同上。结果见图 4。

3. 罗丹明 6G 工作曲线的测绘

标准系列配制步骤和激发波长同上,于 555nm 和 660nm 测量荧光强度,并计算出其荧光强度差值 ΔF ,然后由 ΔF 对罗丹明 6G 浓度绘制成 $\Delta F \sim C$ 工作曲线(见图 5)。

三、荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 人工混合样品的测定

移取已知量的荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 标准溶液,用 $2.5 \times 10^{-3} \text{N NaOH}$ 稀释

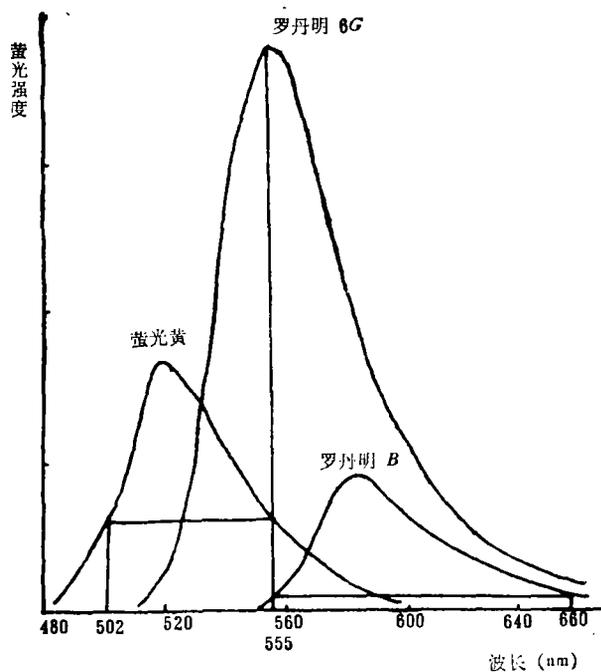


图 2 测定罗丹明 6G 时波长对的选择 λ_1 555nm; λ_2 502nm; λ_3 660nm

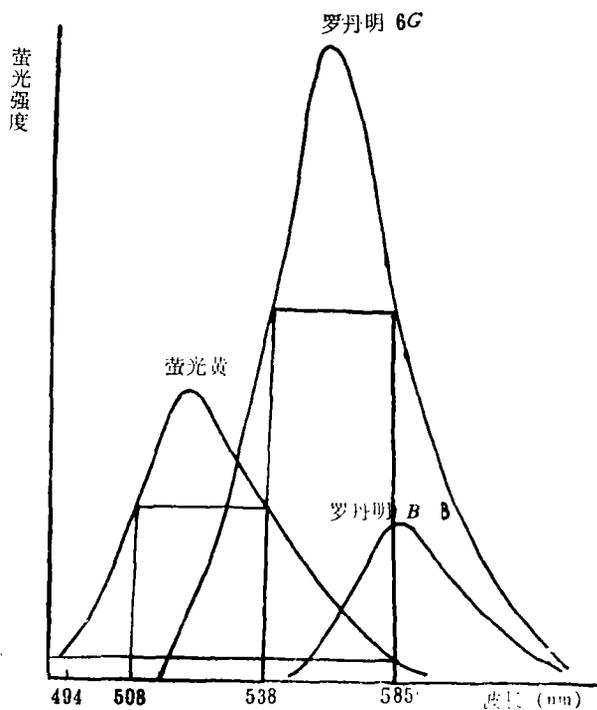


图 3 测定罗丹明 B 时波长 λ_1 585nm; λ_2 538nm; λ_3 494nm; λ_4 508nm 的选择

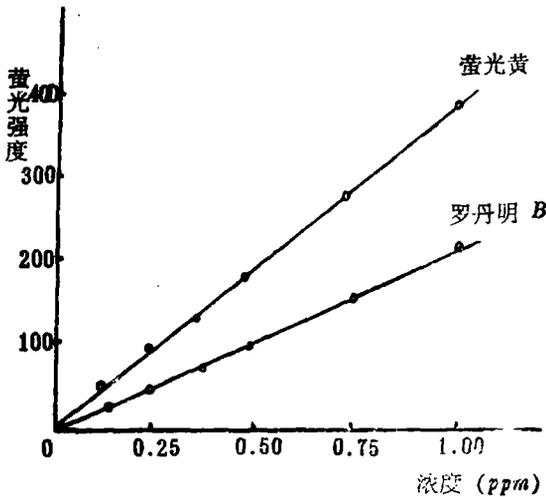


图4 荧光黄和罗丹明 B 的工作曲线

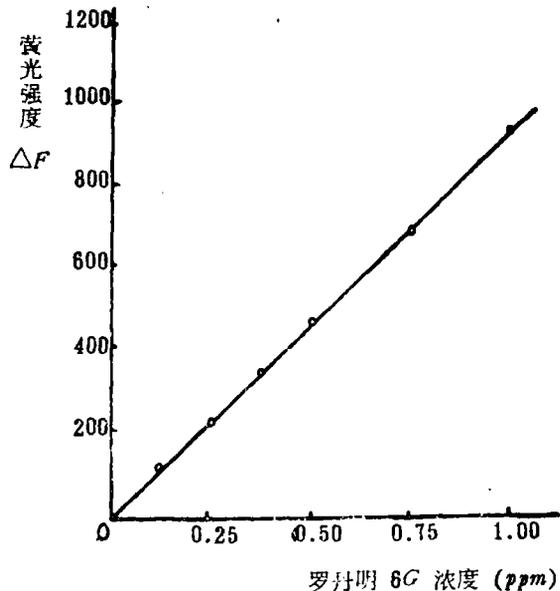


图5 罗丹明 6G 的工作曲线

成人工样品,而后按(三)1、2、3节所述的方法分别对荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 进行测定,结果列于表 2

表 2 荧光黄、罗丹明 6G 和罗丹明 B 人工样品测定结果

人工样品		荧光黄 (ppm)	罗丹明 6G (ppm)	罗丹明 B (ppm)
1	已知量 测得量	0.100	0.050	0.010
		0.097	0.048	0.011
2	已知量 测得量	0.010	0.100	0.050
		0.008	0.095	0.052
3	已知量 测得量	0.050	0.010	0.100
		0.047	0.010	0.100
4	已知量 测得量	0.020	0.100	0.050
		0.020	0.094	0.052
5	已知量 测得量	0.100	0.100	0.100
		0.102	0.098	0.10
6	已知量 测得量	0.200	0.200	0.200
		0.198	0.201	0.205
7*	已知量 测得量	1.00	1.00	1.00
		0.76	0.87	1.00

7* 号样品中相应组分的浓度太大,荧光黄和罗丹明 6G 荧光熄灭显著,测得结果大大偏低。

(1985 年 4 月 28 日收稿)

参 考 文 献

[1] 黄贤智、许金钧《实验技术与管理》(二卷四期,1985 年 12 月)