

# 荧光光谱检测的酸性橙 II 的研究

刘周忆<sup>1</sup> 朱拓<sup>2</sup> 顾恩东<sup>1</sup> 刘莹<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 江南大学通信与控制工程学院, 江苏 无锡 214122; <sup>2</sup> 江南大学理学院, 江苏 无锡 214122)

<sup>3</sup> 徐州师范大学物理系, 江苏 徐州 221116

**摘要** 酸性橙 II 在食品工业中是禁用添加剂。针对酸性橙 II 的食品安全检测问题, 报道了运用荧光光谱技术检测其水溶液的实验。实验表明, 酸性橙 II 水溶液在 230~290 nm 波长激发下, 310~390 nm 范围内产生荧光光谱, 峰位波长在 350 nm, 最佳激励波长为 250 nm; 采用垂直偏振片(起偏角为 0°)起偏照射样品, 发现偏振荧光峰位不变, 荧光峰强度随检偏角的增大而呈明显的线性递减关系。由实验数据计算得到荧光偏振度为 0.783, 表明分子具有一定确定取向; 另外, 分析认为酸性橙 II 产生荧光, 是由于分子中含有苯环和萘环结构吸收紫外光能量, 以及氮键在光子作用下形成顺式异构体的激发单线态后, 两者发射的光子所致。整个结果对酸性橙 II 在食品中的违禁使用检测、特性表征、以及分子规律的更深入研究, 有一定的参考价值。

**关键词** 光谱学; 色素食品安全; 荧光分析; 酸性橙 II

**中图分类号** O657.39 **文献标识码** A

## Acid Orange II Detection by Fluorescence Spectra

Liu Zhouyi<sup>1</sup> Zhu Tuo<sup>2</sup> Gu Endong<sup>1</sup> Liu Ying<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Communication and Control Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China  
<sup>2</sup> School of Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China  
<sup>3</sup> Department of Physics, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China

**Abstract** Acid orange II is forbidden in food industry. For food security detection of acid orange II, the experiment based on fluorescence spectra is reported. The result shows that the emitted fluorescence range is 310~390 nm when the sample is excited by ultraviolet radiation in 230~290 nm, the peak wavelength is 350 nm, and the best excitation wavelength is 250 nm. The polarized fluorescence peak is constant, when a vertical polarizer is used. The intensity of fluorescence spectrum decreases in a linear law, with polarization angle increasing, and the polarization degree is calculated as 0.783. The orientation characteristics of molecule are considered. Moreover, analysis shows that the existence of structure of benzene and naphthalin in molecule is a reason of fluorescence, and single-line excited state of nitrogen-bond by exciting light is another. The research can contribute to the detection of food security characteristic experssion, study of characterization of acid orange II.

**Key words** spectroscopy; pigment food security; fluorescence analysis; acid orange II

## 1 引 言

酸性橙 II 由对氨基苯磺酸重氮化, 与间苯二酚偶合, 其产物再与重氮化的二甲基苯胺偶合而成的酸性偶氮染料<sup>[1]</sup>, 是重要的精细化工产品, 属于常用酸性水溶性染料, 有强致癌性<sup>[2]</sup>, 禁止作为食品添加

剂使用。但是由于酸性橙 II 具有色泽鲜艳, 着色稳定, 价廉等特点, 不法商贩将其用于食品生产与加工, 严重危害了消费者身体健康。

M. A. Prado 等<sup>[3]</sup>提出了运用高效液相色谱技术检测食品中合成染料的方法, F. Calbiani 等<sup>[4]</sup>采

收稿日期: 2007-10-08; 收到修改稿日期: 2007-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(20671044)资助课题。

作者简介: 刘周忆(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品光谱安全检测方面的研究。E-mail: edwardsliu@sohu.com

导师简介: 朱拓(1957-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事光谱与光子学等方面的研究。

E-mail: tzhu@jiangnan.edu.cn. 通信联系人。

用液质联合技术检测辣椒制品中的苏丹红系列色素。酸性橙 II 的常用测定方法有极谱法、高效液相色谱、反相高效液相色谱<sup>[5-7]</sup>。但是以上方法都是基于色谱技术的检测方法,操作时间较长、不经济、难以推广普及。荧光光谱分析法具有测量更精确、样品量更少、更快速、操作简单、分辨率更高、适合小分子样品的特点,应用十分广泛<sup>[8,9]</sup>。荧光分析和偏振技术相结合的荧光偏振法,通过对受激发后发出的偏振荧光光子的性质进行分析比较,可以揭示物质活动的内在规律,更好地标识、认识物质本质。在物质分析检测,医学生物<sup>[10,11]</sup>等领域具有很好的应用前景。

本文采用 FLS920 稳态荧光光谱仪,检测出酸性橙 II 水溶液在 310~390 nm 范围内存在荧光光谱,荧光峰波长为 350 nm,并给出了其三维表征和激发图谱。通过荧光偏振实验表征了荧光偏振特性,并求得荧光偏振度 0.783 和各向异性度 0.74,进一步揭示了分子取向规律和内在本质。

## 2 实 验

FLS920 稳态荧光光谱仪,采用光源为 450 W 的弧光 Xe 灯,单色仪为每毫米 1800 刻线的分光光栅,光电转换器采用 R928 型光电倍增管(PMT),仪器扫描范围 200~900 nm,起偏和检偏装置均为仪器自带的格兰-汤普森(Glan Thompson)棱镜。测得的数据由计算机经 FLS920 软件实时采集、处理并输出。

所用材料为山东临邑黄河化工有限公司生产的标准酸性橙 II 样品和无锡华晶公司生产的超纯净水。

将标准酸性橙 II 样品和纯水配置成 0.5 mg/ml 酸性橙 II 水溶液,用 3 ml 可封闭石英比色皿盛放,放入样品池。待仪器启动 0.5 h 后,进入正常工作环境开始实验。

测量酸性橙 II 水溶液以及作为溶剂的纯水,在相同实验条件下的荧光光谱图。实验参量设置为:扫描步长 1 nm,每点扫描时间 0.5 s,狭缝宽度都为 8 nm,样品池温度为 26 ℃。200~300 nm 间每隔 10 nm 进行激发,扫描范围为 300~420 nm。

测出酸性橙 II 溶液的激发光谱,参量设置为:扫描步长 1 nm,每点扫描时间 0.1 s,狭缝宽度都为 12 nm,样品池温度为 25.83 ℃,扫描范围为 210~300 nm。

测出酸性橙 II 水溶液的荧光偏振光谱。在激发光入射光路和荧光发射光路中分别放入仪器自带的

起偏和检偏器(格兰-汤普森棱镜)。实验采用垂直偏振片(起偏角为 0°)起偏照射样品,采用不同检偏角(分别设置为 0°,10°,20°,30°,40°,50°,60°,70°,80°,90°)进行荧光检测,参量设置为:扫描步长 1 nm,每点扫描时间 0.2 s,狭缝宽度都为 15 nm,样品池温度为 26 ℃,扫描范围为 310~420 nm。

## 3 实验结果

### 3.1 酸性橙 II 水溶液的荧光光谱

图 1 给出了酸性橙 II 水溶液荧光光谱的等角三维投影方式表征。三维荧光表示法能获得激发和发射波长同时变化时的荧光强度信息,能够提供酸性橙 II 水溶液的荧光强度随激发和发射波长同步变化的光谱信息,且更加直观,具有灵敏度高等优点。从图 1 中可以发现在 230~290 nm 近紫外区下激发时,310~390 nm 之间出现明显的荧光光谱,荧光峰值波长固定在 350 nm。其中用 250 nm 波长进行激发时,发射的荧光强度最大,达到  $2.25 \times 10^7$  个光子数。从 250 nm 波长开始,随着激发波长的增大,发射的荧光光子数基本趋于逐渐减小的趋势,只是在 280 nm 激发时,产生的荧光光子数大于 270 nm 时激发,其原因是由于酸性橙 II 在 280 nm 产生强烈吸收。

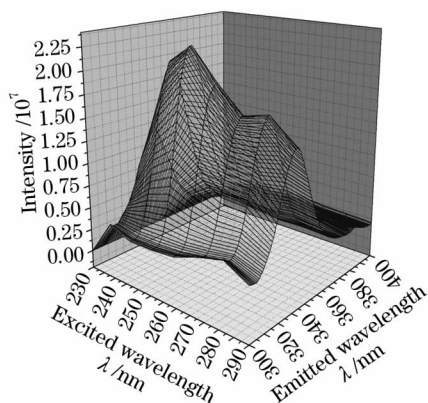


图 1 酸性橙 II 溶液的等角三维荧光光谱表征

Fig. 1 Equivalent angle three-dimensional fluorescence spectra of acid orange II solution

### 3.2 纯水的荧光光谱

在食品工业中违禁使用酸性橙 II,大都是将其溶解在水中。其荧光光谱会对要检测的酸性橙 II 荧光光谱产生干扰。在相同实验参量设置下也扫描了纯水的荧光光谱如图 2 所示。可知纯水在 230~290 nm 激发下,不产生荧光,测出的酸性橙 II 水溶液的荧光光谱为酸性橙 II 本身发出的荧光。

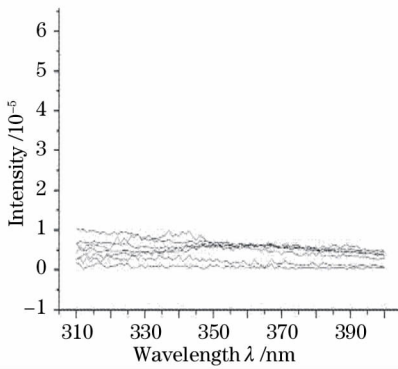


图 2 纯水的荧光图谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of H<sub>2</sub>O

### 3.3 酸性橙 II 水溶液的激发光谱

图 3 给出荧光峰波长对应的激发光谱。分别在 250 nm 和 285 nm 附近出现两个吸收峰, 230~290 nm 每隔 10 nm 做一条垂直于横轴的虚线, 分别交激发光谱于 A、B、C、D、E、F、G 点, 按吸收光子数从小到大排列分别为 A、G、E、F、D、B、C, 与实验 3.1 在 230~290 nm 各激发波长下发射的荧光强度成正相关关系, 即在特定波长处吸收的光子越多, 发射的荧光强度越大。解释了酸性橙 II 水溶液在 280 nm 激发下产生的荧光强度要大于在 270 nm 激发的荧光强度。

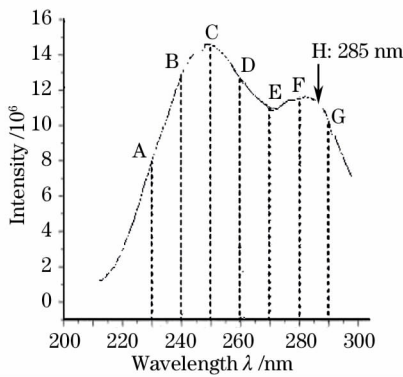


图 3 酸性橙 II 水溶液的激发光谱

Fig. 3 Excitation spectra of acid orange II solution

### 3.4 酸性橙 II 水溶液的荧光偏振光谱

垂直偏振片(起偏角为 0°)起偏照射样品, 采用不同检偏角(分别设置为 0°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°)进行荧光检测。图 4(a)、图 4(b)为 250 nm 波长激励下的三维和二维偏振荧光光谱图。实验表明, 不同检偏角测得的偏振荧光的峰位和波形基本无变化, 峰位波长依旧在 350 nm 附近, 只是发射的荧光强度有明显变化, 当检偏角增大时, 测得的荧光强度降低。当偏振光激励酸性橙 II 水溶液时, 发射荧光也具有偏振特性。

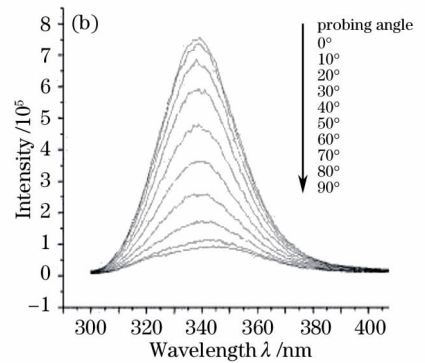
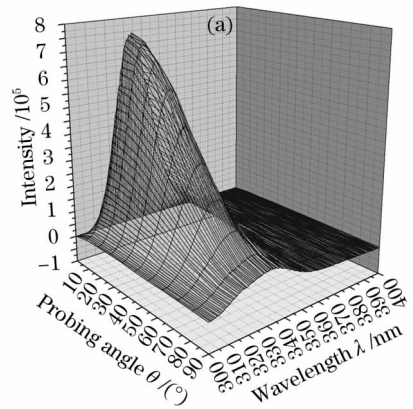


图 4 不同检偏角检测得到的三维(a), 二维(b) 荧光偏振图谱

Fig. 4 Three-dimensional (a), two-dimensional (b) polarized fluorescence spectrum of acid orange II solution under different probing angles

图 5 给出不同检测角下的荧光偏振峰强度和检测角度的关系。作出线性回归拟合方程:

$Y = 884038 - 84204X$ , 其中相关系数  $R = 0.9898$ , 实验数据呈很好的线性关系, 直线即为拟合直线。

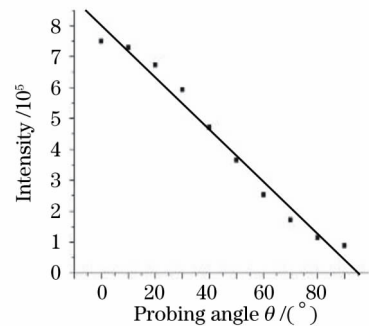


图 5 偏振荧光峰强度和检测角度的关系及线性拟合结果  
Fig. 5 Fitting line and relation of peak intensity of fluorescence polarization spectrum with change of probing angle

## 4 讨论分析

由上述实验结果可知, 在波长短于 290 nm(最

佳 250 nm) 的紫外光激励下, 酸性橙 II 水溶液能够吸收激励光的能量并发出荧光, 荧光峰值波长为 350 nm。根据物质吸收紫外光理论, 当分子吸收一定的能量时, 就发生相应能级间的电子跃迁。有机物在紫外-可见光区域内电子跃迁的方式一般有  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  两种类型。酸性橙 II 分子必须有相应的吸收结构, 分子结构式如图 6 所示。该结构式中一个偶氮键将一个苯环和一个萘环连接在一起, 形成大共轭结构(用字母 A 表示),  $\pi$  轨道几乎扩散至整个分子, 但苯环和萘环之间无其他键连接, 分子不易保持平面, 这对荧光的产生起到抑制作用。激发波长为 230~290 nm, 这样的波段对于 A 这种长共轭结构的紫外吸收过短。酸性橙 II 分子结构中含有苯环和萘环, 是常见的紫外吸收结构, 对 230~290 nm 的波长都有很好的吸收, 产生  $\pi \rightarrow \pi^*$  电子跃迁, 发射荧光光子。萘环在 286 nm 有最强吸收峰<sup>[12]</sup>, 与实验 3.3 中酸性橙 II 水溶液吸收光谱的第二吸收峰位波长 285 nm 十分接近。观察苯和萘的吸收光谱<sup>[13]</sup>, 发现苯环在 230~260 nm 形成吸收带, 萘环在 250~290 nm 形成吸收带, 并且萘环的荧光峰位波长在 321 nm<sup>[13]</sup>, 落在 310~390 nm 之间。另外, 酸性橙 II 作为偶氮类染料, 结构中的氮键在光子作用下形成顺式异构体的激发单线态, 产生 350 nm 左右波长的荧光光子<sup>[14]</sup>, 也是产生荧光的原因。

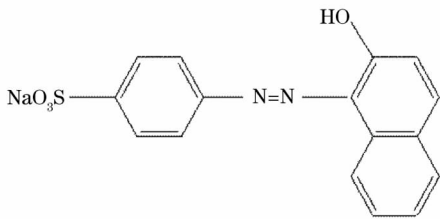


图 6 酸性橙 II 的分子结构式

Fig. 6 Structural formula of acid orange II

根据荧光偏振公式  $P = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$ , 其中  $I_{//}$  为检测角为  $0^\circ$  时测得的荧光强度,  $I_{\perp}$  为检测角为  $90^\circ$  时测得的荧光强度。将实验数据代入公式得:  $P = (748700 - 91150) / (748700 + 91150) = 0.783$ 。表明去偏效果不明显, 发射荧光团较好的记忆了激发光的偏振信息。另一方面也说明吸收跃迁偶极距和发射跃迁偶极距之间的夹角很小, 可近似看作平行<sup>[15]</sup>。

图 7 为酸性橙 II 水溶液荧光偏振光谱的  $I_{//}$  和  $I_{\perp}$  检测光路。偏振光沿 Z 轴偏振, 从 X 轴入射, 在 Y 轴检测  $I_{//}$ 、 $I_{\perp}$ , 分子取向以吸收跃迁偶极距和发射跃迁偶极距表示。假设酸性橙 II 水溶液为随机取

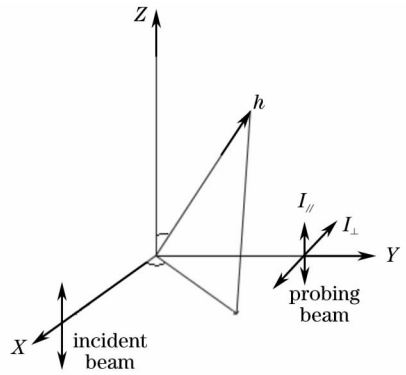


图 7 酸性橙 II 溶液荧光偏振光谱的  $I_{//}$  和  $I_{\perp}$  检测光路  
Fig. 7 Light path for detecting  $I_{//}$  and  $I_{\perp}$  in fluorescence polarization spectrum of acid orange II

向的分子, 激发分子取向在  $\theta + d\theta$  和  $\phi + d\phi$  之间的概率为<sup>[13]</sup>

$$f(\theta)d\theta = \cos^2\theta \sin\theta d\theta, \quad (1)$$

发射的沿 Z 轴方向偏振的荧光概率正比于  $|\mathbf{h} \cdot \mathbf{k}|^2$ ,  $\mathbf{h}$  为吸收跃迁偶极距矢量,  $\mathbf{k}$  为 Z 轴单位矢量, 即发射概率正比于  $\cos^2\theta$ 。则沿 Z 轴偏振的荧光相对强度  $I_{//}$  为

$$I_{//} \propto M \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} \cos^2\theta f(\theta) d\theta = M \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} \cos^4\theta \sin\theta d\theta = \frac{4}{5}\pi M, \quad (2)$$

其中 M 为假设比例系数。发射的沿 X 轴方向偏振的荧光概率正比于  $\sin^2\theta \cos^2\phi$ <sup>[16]</sup>, 则沿 X 轴偏振的荧光相对强度  $I_{\perp}$  为:

$$I_{\perp} \propto M \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} \cos^2\phi \sin^2\theta f(\theta) d\theta = M \int_0^{2\pi} \cos^2\phi d\phi \int_0^{\pi} \cos^2\theta \sin^3\theta d\theta = \frac{4}{15}\pi M, \quad (3)$$

将  $I_{//}$  和  $I_{\perp}$  代入  $P = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$  得到  $P = 0.5$ 。

将酸性橙 II 溶液分子假设为随机取向的分子, 推导得到的荧光偏振度与实验测得的相差很大, 所以认为酸性橙 II 溶液分子为具有确定取向的分子, 具有一定方向性的链式、环式结构。

## 5 结 论

在 230~290 nm 紫外激发下, 酸性橙 II 水溶液在 310~390 nm 范围内发射荧光光子, 峰位在 350 nm, 最佳激励波长为 250 nm。

垂直偏振片(起偏角为  $0^\circ$ )起偏照射样品, 采用

不同检偏角(分别设置为  $0^\circ, 10^\circ, 20^\circ, 30^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 60^\circ, 70^\circ, 80^\circ, 90^\circ$ )进行荧光检测,偏振荧光的峰位和波形基本无变化,荧光强度随检偏角增大而越来越小,呈现出十分明显的线性关系。

根据实验结果分析,初步认为:酸性橙 II 产生荧光,是由于分子中含有苯环和萘环结构,吸收紫外光能量后发射出荧光光子;氮键在光子作用下形成顺式异构体的激发单线态,产生 350 nm 波长附近的荧光光子。

由实验数据通过偏振公式求得  $P=0.783$ , 与随机取向分子荧光偏振度相差很大,认为酸性橙 II 水溶液分子为具有一定确定取向的分子,各向异性度  $r=2P/(3-P)=0.74$ 。

### 参 考 文 献

- Ling Qi. *Green Foods Additive and Forbidden Additive* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 97~98  
梁 琪. 绿色食品添加剂与禁用添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 97~98
- Zhang Yaowu, Gu Huiying, Lu Junhui. Determination of acid orange II in food by high performance liquid chromatography[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2005, **1**(14): 48~49  
张耀武, 顾慧莹, 路军辉. 高效液相色谱法测定食品中的酸性橙 II[J]. *化学分析计量*, 2005, **1**(14): 48~49
- M. A. Prado, H. T. Godoy. Validation of the methodology to determine synthetic dyes in food and beverages by HPLC[J]. *J. Liquid Chromatography*, 2002, **16**(25): 2455~2472
- F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri *et al.*. Development and in-house validation of a liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli product[J]. *J. Chromatography A*, 2004, **1042**: 123~130
- Chen Wen, Wang Zhengmeng, Wu Xiaorong *et al.*. Simultaneous determination of micro-amounts of acid orange and acid red in food by single sweep polarography[J]. *Food Science*, 2005, **6**(26): 210~212  
陈 文, 王正猛, 吴晓蓉 等. 单扫描极谱法连续测定食品中非食用色素酸性金黄和酸性大红[J]. *食品科学*, 2005, **6**(26): 210~212
- Xiang Zhongchao, Long Guanglong. Study on analysis and contamination of acid orange II in food[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2003, **2**(30): 172~173  
向仲朝, 龙光隆. 食品中酸性橙 II 测定法的研究及污染调查[J]. *现代预防医学*, 2003, **2**(30): 172~173
- Xiao Baiman, Liu Nin, Zhu Zhenhao. Determination of inedible pigment acid orange II in foods by HPLC[J]. *Chin. J. Food Hygiene*, 2005, **5**(17): 422~424  
肖白曼, 刘 宁, 朱正浩. HPLC 法测定食品中非食用色素酸性橙 II[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, **5**(17): 422~424
- Dai Songhui, Li Ping, Yang Xiaozhan *et al.*. Fluorescence spectra of lycopene in different solvents[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **1**(25): 141~146  
戴松晖, 李 萍, 杨晓占 等. 不同溶剂中番茄红素的荧光光谱及其特性研究[J]. *光学学报*, 2006, **1**(25): 141~146
- Gao Bowen, Yu Jiwen, Gao Zhonghe *et al.*. Study on the spectrum property of the photodynamic therapy photosensitizer hydrocortisone in a different acidity and basicity[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(6): 928~932  
高博文, 禹继文, 高仲合 等. PDT 光敏剂 HA 在不同液相体系下的光谱特性研究[J]. *光学学报*, 2006, **26**(6): 928~932
- Liliana Radu, Vasile Preoteasa, Irina Radulescu *et al.*. Fluorescence lifetime, precision calorimetry, and fluorescence energy transfer measurements in the study of normal and tumoral chromatin structure [J]. *J. Molecular Structure*, 1997, **408**(409): 191~194
- Song Lexin, Ke Xiaokang, Guo Zijian. Study on inclusion behavior of labeling CD dimers with a fluorescence tracer to small peptide derivatives[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2002, **8**(60): 1419~1427  
宋乐新, 柯晓康, 郭子建. 荧光标识的环糊精二聚体与小肽衍生物之间的包合行为研究 [J]. *化学学报*, 2002, **8**(60): 1419~1427
- Wang Yanji, Song Zengfu. *Spectrum Analysis and Chromatogram Analysis* [M]. Beijing: Peking University Press, 1995. 85~86  
王彦吉, 宋增福. 光谱分析与色谱分析[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995. 85~86
- Xu Jingou, Wang Zunben *et al.*. *Analysis Method of Fluorescence* [M]. Beijing: Science Press, 2006. 22~185  
许金钧, 王尊本 等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 2006. 22~185
- Wang Guangbin, Gan Fuxi, Wang Jiangang *et al.*. Fluorescence spectral properties of azo dye-doped polymer film[J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(4): 495~498  
王光斌, 干福熹, 王建岗 等. 偶氮染料掺杂高分子薄膜的荧光光谱特性[J]. *光学学报*, 2001, **21**(4): 495~498
- Liu Ying, Song Chunyuan, He Wenliang *et al.*. Characterization of the orientation of ethanol-water clusters by polarized fluorescence spectrum[J]. *Acta Physica Sinica*, 2007, **56**(5): 2965~2967  
刘 莹, 宋春元, 何文亮 等. 用偏振荧光光谱表征乙醇-水团簇分子的取向[J]. *物理学报*, 2007, **56**(5): 2965~2967
- Peng Changde, Liu Ying, Lan Xiufen *et al.*. Research on static fluorescence polarization spectrum of whole blood [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(10): 1546~1548  
彭长德, 刘 莹, 兰秀凤 等. 血液静态荧光偏振光谱研究[J]. *光学学报*, 2006, **26**(10): 1546~1548