

抑制荧光猝灭法测定痕量双酚 S 的研究

刘宝亮*, 姚成龙, 翟翔熊, 陈正玲

(常州工学院化工与材料学院, 江苏常州 213032)

摘要:建立了一种吡啶橙-Fenton 试剂荧光光谱法测定双酚 S 含量的方法。在酸性介质中,吡啶橙能被 Fenton 试剂产生的羟自由基氧化并引起荧光猝灭,而双酚 S 能够抑制羟自由基对吡啶橙的氧化作用,其抑制荧光猝灭程度在一定范围内与 BPS 的浓度呈线性关系。研究表明,在最佳实验条件下,双酚 S 浓度在 $2.5 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-7}$ mg/L 范围内与吡啶橙荧光强度变化 ΔF 呈良好的线性关系 ($R=0.996\ 55$),检出限为 2.661×10^{-9} mg/L。该测定方法简便、快速、需样量少、灵敏度高,加标回收率为 96.02%~101.4%。

关键词:双酚 S;吡啶橙;Fenton 试剂;荧光分光光度法

中图分类号:O657.3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)08-0248-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.08.049

Determination of trace bisphenol-S (BPS) by inhibitory fluorescence quenching method

LIU Bao-liang*, YAO Cheng-long, ZHAI Xiang-xiong, CHEN Zheng-ling

(School of Chemical Engineering and Materials, Changzhou Institute of Technology, Changzhou 213032, China)

Abstract:A new method is established for the determination of trace bisphenol-S based on the inhibition effect of bisphenol-S on the reaction between Fenton reagent and acridine orange. In sulfuric acid medium, acridine orange can be oxidized by hydroxyl radical produced by Fenton reagent, causing fluorescence quenching, while bisphenol S can inhibit the oxidation of hydroxyl radical on acridine orange. There is a linear relationship between the inhibitory effect on fluorescence quenching and the concentration of bisphenol-S within a certain range. Experimental results show that there exists a good relationship ($R=0.996\ 55$) between the concentration of bisphenol S in the range of 2.5×10^{-8} mg·L⁻¹– 1.5×10^{-7} mol·L⁻¹ and the change of acridine orange fluorescence intensity (ΔF) under the optimum conditions, the detection limit is 2.661×10^{-9} mg·L⁻¹, and the recoveries are between 96.02%–101.4%. This method is fast, simple and high selectivity, and need few amount of samples.

Key words:bisphenol-S; acridine orange; Fenton reagent; fluorescence spectrophotometry

双酚 S (bisphenol S, BPS), 化学名 4,4'-二苯酚, 由于双酚 S 的热稳定性和光化学稳定性, 可作为聚碳酸酯、环氧树脂、聚酯和酚醛树脂等的前体物质, 以及聚砜、聚醚砜的原料^[1]。随着双酚 S 的大量生产与使用, 不可避免地进入到环境中。近年来, 已有许多文章报道了双酚 S 在纺织品和皮革^[2-3]、环境样品^[4-5]、生物样品^[6-8] 中被检出。此外, 近年来研究发现, BPS 是一种内分泌干扰物, 过量摄入对动物和人体健康产生负面影响, 如内分泌失调^[9]、代谢系统紊乱^[10]、神经系统^[11] 异常, 还会严重干扰人和动物的生殖系统发育和遗传功能^[12]。所以双酚 S 检测方法的发展迫在眉睫。

国内外诸多学者已经开发了许多针对双酚 S 的检测方法, 应用比较广泛的方法为气相色谱-质谱法、高效液相色谱法^[13-15], 色谱法的优点是测定结果精确度高, 且广泛应用于雌激素双酚的量化。但

是色谱法检测过程中, 样品制备复杂, 涉及有毒溶剂的使用, 仪器的成本高、耗时长, 日常维护费用比较昂贵。

荧光分析的主要特点是高选择性、高灵敏度、样品用量少、操作简单。另外, 荧光分析法的灵敏度通常可以达到 10^{-10} g/mL, 最多能达到 10^{-12} g/mL, 因此荧光分析法常用于微量甚至痕量毒物的定量分析。有关染料荧光光度法测定双酚 S 方法未见报道。本文中利用吡啶橙为荧光染料, 建立了荧光光度法测定双酚 S 含量的新方法。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

DF-1 型集热式磁力搅拌器 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), F-4600 FLSPECTROPHOTO MET (Hitachi High - Technologies corporation

收稿日期:2021-09-14;修回日期:2022-07-01

基金项目:江苏省高等学校自然科学研究面上项目(19KJB530004)

作者简介:刘宝亮(1977-),男,博士,副教授,从事环境污染物测定方法的研究,通讯联系人,lbliang1977@163.com。

Tokyo Japan), FA1004B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司), PHS-3C 精密酸度计(上海大浦仪器有限公司)。

双酚 S, 吡啶橙, 硫酸亚铁, 十六烷三甲基溴化铵, 十二烷基苯磺酸钠, 十二烷基磺酸钠, β -环糊精, 醋酸钠, 醋酸, Tris, 盐酸, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 无水乙醇、双氧水、硫酸等均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液的配制

分别配制浓度为 1.0×10^{-4} mg/L 的吡啶橙储备液, 2.5×10^{-4} mg/L 的双酚 S 储备液(用 5 mL 无水乙醇溶解后, 用怡宝纯净水定容), 1% 的过氧化氢的储备液, 5% 的硫酸的储备液。使用时, 将吡啶橙储备液稀释至 1.0×10^{-5} mg/L; 将双酚 S 储备液用怡宝纯净水稀释至 1.0×10^{-5} mg/L(用移液管移取上述储备液 1 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用怡宝纯净水定容至刻度线, 备用); 将 1% 的过氧化氢储备液稀释至 0.01%; 称取硫酸亚铁 0.069 5 g, 再用 5% 的硫酸储备液溶解硫酸亚铁, 并定容至 25 mL 容量瓶中, 得到 1.5×10^{-4} mg/L 的硫酸亚铁溶液。

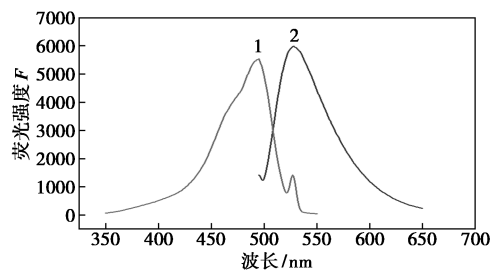
1.2.2 实验方法

于 10 mL 比色管中加入 1.0 mL 吡啶橙溶液 (1.0×10^{-5} mg/L), 0.3 mL 硫酸亚铁溶液 (1.5×10^{-4} mg/L), 0.36 mL 的 0.01% 过氧化氢溶液, 其中一支比色管中不加作为试剂空白, 其余的试管中加入不同浓度的双酚 S 标液 (1.0×10^{-5} mg/L), 用怡宝纯净水定容, 放置 30 min 后, 在 F-4600 型荧光分析仪上, $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm 为激发波长, $\lambda_{\text{em}} = 528$ nm 为发射波长, 测量试剂空白的荧光强度 $F_{\text{空白}}$, 试剂试样荧光强度 $F_{\text{试样}}$, 计算荧光分析值 $\Delta F = F_{\text{试样}} - F_{\text{空白}}$ 。

2 结果与讨论

2.1 吡啶橙荧光激发和发射波长的选择

图 1 为吡啶橙的激发光谱和发射光谱图, 曲线 1



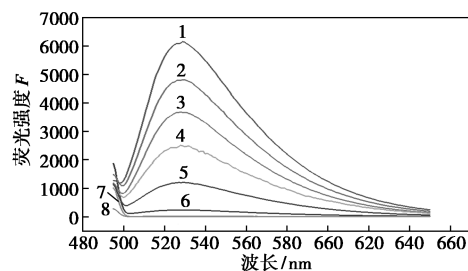
1—吡啶橙的荧光激发光谱;
2—吡啶橙的荧光发射光谱(吡啶橙 1.0×10^{-5} mg/L)

图 1 吡啶橙的激发与发射光谱

为吡啶橙的激发光谱, 当 $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm 时, 吡啶橙的荧光信号较强, 所以该实验中选择吡啶橙的荧光激发波长为 495 nm。以 495 nm 作为激发波长, 在波长为 500~700 nm 范围内, 对试样吡啶橙进行扫描如曲线 2, 发现在波长 528 nm 处荧光信号最强, 因此, 选择吡啶橙的荧光发射波长为 528 nm。

2.2 抑制荧光猝灭光谱图

以 495 nm 作为激发波长, 不同溶液的荧光光谱图如图 2, 实验结果表明, 在激发波长 495 nm 条件下, 双酚 S 和硫酸亚铁溶液与过氧化氢溶液本身无荧光信号, 向吡啶橙中加入适量双酚 S 标液后, 吡啶橙-双酚 S 荧光分析体系的荧光分析现象并不显著。然而, 向吡啶橙溶液中加入适量的 Fenton 试剂(硫酸亚铁溶液与过氧化氢溶液)后, 发生了显著的荧光猝灭现象, 在这个体系中加入不同量双酚 S, 荧光信号再次恢复, 且随着双酚 S 的增加, 荧光信号有规律地增加。



1—1 mL 吡啶橙; 2—1 mL 吡啶橙+1 mL (1.0×10^{-4} mg/L) 双酚 S + Fenton 试剂; 3—1 mL 吡啶橙+1 mL (1.0×10^{-5} mg/L) 双酚 S + Fenton 试剂; 4—1 mL 吡啶橙+1 mL (1.0×10^{-6} mg/L) 双酚 S + Fenton 试剂; 5—1 mL 吡啶橙+1 mL (1.0×10^{-7} mg/L) 双酚 S + Fenton 试剂; 6—1 mL 吡啶橙+1 mL Fenton 试剂; 7—Fenton 试剂; 8—1 mL 双酚 S

$\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm; 吡啶橙 (1.0×10^{-5} mg/L);

双酚 S (1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-7} mg/L);

硫酸亚铁溶液 (1.5×10^{-4} mg/L); 过氧化氢溶液 (0.01%)

图 2 吡啶橙-Fenton 试剂-双酚 S 荧光特征光谱图

2.3 反应条件

2.3.1 硫酸亚铁溶液用量的影响

取 1 只 10 mL 比色管, 加入 1.0 mL 吡啶橙工作液, 用怡宝纯净水定容, 摇匀, 静置 30 min, 测定荧光强度为 $F_{\text{空白}}$; 再取 6 只 10 mL 比色管, 向这 6 只试管中依次分别加入 1.0 mL 吡啶橙, 硫酸亚铁溶液 (0~0.5 mL), 0.36 mL 过氧化氢溶液 (0.01%), 定容, 摇匀, 静置 30 min, 所测得的荧光强度为 $F_{\text{试样}}$ ($F_0 \sim F_6$), 计算 ΔF , $\Delta F = F_{\text{空白}} - F_{\text{试样}}$ ($F_0 \sim F_6$), 结果如图 3 所示。

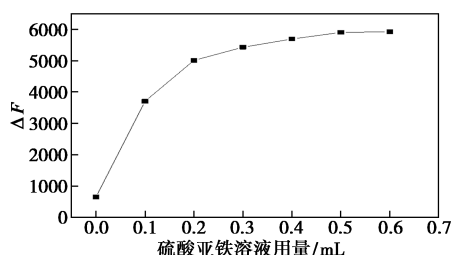


图 3 硫酸亚铁溶液用量的影响

从图 3 可以看出,随着硫酸亚铁溶液用量的增加,ΔF 呈现增加至平稳的趋势,在硫酸亚铁用量为 0.5 mL 时,ΔF 达最大值,即该条件下的现象最为显著。硫酸亚铁溶液的最佳用量为 0.5 mL。

2.3.2 过氧化氢溶液用量的影响

取 6 只 10 mL 比色管,依次分别加入 1.0 mL 吡啶橙,硫酸亚铁溶液 0.5 mL,过氧化氢溶液(0.01%) 0~0.60 mL,定容,静置 30 min,分别测定各种溶液的荧光强度为 $F_{\text{试样}}(F_0 \sim F_6)$,计算 ΔF , $\Delta F = F_{\text{空白}} - F_{\text{试样}}(F_0 \sim F_6)$,结果如图 4 所示。

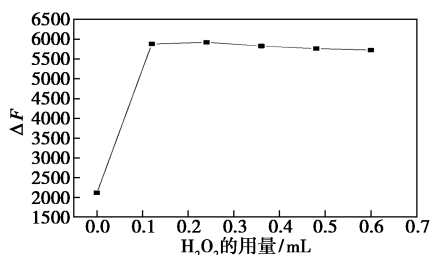


图 4 过氧化氢溶液用量的影响

从图 4 可以看出,随着过氧化氢溶液用量的增加,ΔF 呈现突然增加至平稳的趋势,在过氧化氢溶液用量为 0.1 mL 时,ΔF 达最大值,即该条件下的现象最为显著。且实验现象表明,过氧化氢用量小范围地增加一点,Fenton 试剂产生的羟基自由基就会与吡啶橙立即发生反应,氧化吡啶橙,使其荧光猝灭。本实验过氧化氢溶液最佳用量为 0.1 mL。

2.3.3 吡啶橙用量的影响

取 5 只 10 mL 比色管,依次加入 0.2~1.0 mL 吡啶橙,硫酸亚铁溶液 0.5 mL,0.1 mL 过氧化氢溶液(0.01%),定容,摇匀,静置 30 min,分别测定其荧光强度,所测得的荧光强度为 $F_{\text{空白}}$,再取 5 只 10 mL 比色管,上述同样条件下分别加入 1.0 mL 双酚 S (1.0×10^{-7} mg/L),分别测定其荧光强度,记作 $F_{\text{试样}}$,计算 ΔF , $\Delta F = F_{\text{试样}} - F_{\text{空白}}$,结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出,随着吡啶橙溶液用量的增加,ΔF 呈现递增至平稳的趋势,在吡啶橙的用量为 0.8 mL 时,ΔF 差值最大,现象最为显著,且吡啶橙

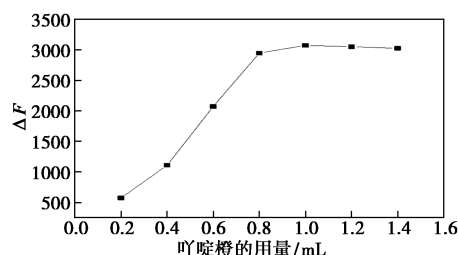


图 5 吡啶橙溶液用量的影响

溶液加入量在 0.80 mL 以后时,该反应会更完全,该体系较为稳定。本实验吡啶橙溶液的最佳用量为 0.8 mL。

2.3.4 试剂加入次序的影响

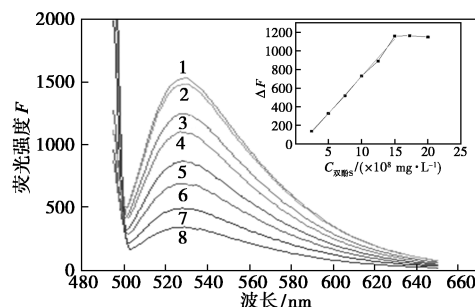
试剂加入次序不同,吡啶橙-Fenton 试剂-双酚 S 荧光体系的荧光强度不同。实验结果表明,按吡啶橙+双酚 S+硫酸亚铁与过氧化氢为加入次序时,反应更完全,故测得的 ΔF 最大,现象最显著,所以选择试剂的加入次序为:吡啶橙+双酚 S+硫酸亚铁与过氧化氢。

2.3.5 反应时间的影响

考察反应时间对荧光强度的影响,结果表明,随着反应时间增加,ΔF 在缓慢增加,反应 30 min 时又开始快速降低,即 30 min 时 ΔF 最大,因此,该实验中选择让双酚 S 与吡啶橙、硫酸亚铁与过氧化氢反应 30 min,然后测定其荧光强度。

2.4 标准曲线与线性范围

最佳条件下,对不同质量浓度双酚 S 标准系列溶液进行测定,结果如图 6 所示。从图 6 可以看出,



1—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S+Fenton 试剂;2—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S (2.002×10^{-7} mg/L)+Fenton 试剂;3—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S (1.502×10^{-7} mg/L)+Fenton 试剂;4—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S (1.251×10^{-7} mg/L)+Fenton 试剂;5—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S (1.0×10^{-7} mg/L)+Fenton 试剂;6—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S (7.508×10^{-8} mg/L)+Fenton 试剂;7—1 mL 吡啶橙+双酚 S (5.005×10^{-8} mg/L)+Fenton 试剂;8—为 1 mL 吡啶橙+双酚 S (2.503×10^{-8} mg/L)+Fenton 试剂

图 6 吡啶橙-Fenton 试剂-双酚 S 荧光特征光谱图

当双酚S用量在 $2.5 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-7}$ mg/L 范围内时,双酚S的用量与 ΔF 呈现较好的线性关系。工作曲线的线性回归方程是: $\Delta F = 7.9854 \times 10^9 C - 71.96843$ (C 为 mg/L), 相关系数 $R = 0.99655$ 。

2.5 检测限的计算

取10只10 mL比色管,依次加入0.8 mL吡啶橙、0.5 mL硫酸亚铁、0.1 mL过氧化氢,用怡宝纯净水定容,摇匀,静置30 min,测定其荧光强度,记作 $F_{\text{空白}}$ 。计算10次空白的标准偏差 S_0 。

检测限 = $3S_0/K$, 其中 K 是双酚S标准曲线的斜率。检测限为 2.661×10^{-9} mg/L。

2.6 分析应用

取实验室里的自来水1.0 mL于10.0 mL的比色管中,再加入1.0 mL吡啶橙、0.5 mL硫酸亚铁溶液与0.1 mL过氧化氢溶液,加怡宝纯净水定容至刻度,摇匀,静置30 min,测定其荧光强度,同时进行回收实验,结果如表1。

表1 样品分析及回收率实验

本地值/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	加入量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	测量值/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.000	5.005×10^{-8}	4.935×10^{-8}	98.60	101.40	2.54
0.000	5.005×10^{-8}	5.096×10^{-8}	101.80		
0.000	5.005×10^{-8}	5.191×10^{-8}	103.70		
0.000	1.001×10^{-7}	9.619×10^{-8}	96.09	99.59	2.99
0.000	1.001×10^{-7}	1.0007×10^{-7}	99.97		
0.000	1.001×10^{-7}	1.020×10^{-7}	101.90		
0.000	1.502×10^{-7}	1.435×10^{-7}	95.53	96.02	2.13
0.000	1.502×10^{-7}	1.416×10^{-7}	94.27		
0.000	1.502×10^{-7}	1.476×10^{-7}	98.27		

从实验结果发现,实验测得的回收率在96.02%~101.4%,相对标准偏差在2.13%~2.54%。

3 结论

对吡啶橙-Fenton试剂-双酚S荧光体系进行了研究,通过单因素实验法探讨了硫酸亚铁的用量、过氧化氢的用量、硫酸的用量、时间、溶液的放入顺序对实验结果的影响,确立了最佳反应条件:硫酸亚铁溶液的最佳用量为0.5 mL,过氧化氢溶液的最佳用量为0.1 mL,吡啶橙的最佳用量0.8 mL;最佳的试剂加入次序为:吡啶橙+双酚S+硫酸亚铁与过氧化氢;最佳反应时间为30 min。在最优条件下进行实验,得到标准曲线方程式为 $\Delta F = 7.9854 \times 10^9 C - 71.96843$, 相关系数 $R^2 = 0.99655$ 。该实验方法的检出限能够达到 2.661×10^{-9} mg/L, 双酚S的回收率能够达到96.02%~101.4%。

参考文献

- [1] Liao C Y, Liu F, Kannan K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(12): 6515-6522.
- [2] 吴泽颖, 罗世鹏, 朱焯, 等. 纺织品中双酚S的高效液相色谱法测定[J]. *印染*, 2015, (2): 39-41.
- [3] 吴泽颖, 罗世鹏, 杨柳, 等. 高效液相色谱法测定皮革中的双酚S[J]. *皮革科学与工程*, 2016, 26(2): 72-75.
- [4] Yang Y J, Lu L B, Zhang J. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1328: 26-34.
- [5] 张明, 唐访良, 徐建芬, 等. UPLC-MS/MS法同时测定地表水中6种双酚类化合物残留[J]. *质谱学报*, 2017, 38(6): 690-697.
- [6] Grandin F, Picard-hagen N, Gayraud V, et al. Development of an on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography technique coupled to tandem mass spectrometry for quantification of bisphenol S and bisphenol S glucuronide: Applicability to toxicokinetic investigations[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1526: 39-46.
- [7] Sosvorova L K, Chlupacova T, Vitku J, et al. Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS[J]. *Talanta*, 2017, 174: 21-28.
- [8] Rocha B A, De O, Anderson R M, et al. A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2018, 183: 94-101.
- [9] Skledar D G, Schmidt J, Fic A, et al. Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S[J]. *Chemosphere*, 2016, YH157: 152-159.
- [10] Peyre L, Rouimi P, Sousa G, et al. Comparative study of bisphenol A and its analogue bisphenol S on human hepatic cells: A focus on their potential involvement in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 70: 9-18.
- [11] Castro B, Sánchez P, Torres J M, et al. Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5 α -reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats[J]. *Environmental Research*, 2015, 142: 281-287.
- [12] Naderi M, Wong M, Gholami F. Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 148: 195-203.
- [13] 顾纓纓, 梅勇, 任雨萌, 等. 尿中双酚S测定的涡旋辅助液微萃取-高效液相色谱法[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2021, 39(1): 51-54.
- [14] 张来颖, 张志荣, 尉秀霞, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定食品接触材料中双酚A、双酚F和双酚S的迁移量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(9): 1039-1042.
- [15] 刘丽艳, 白洁, 王亚文, 等. 高效液相色谱法测定厨房用纸中双酚S[J]. *理化检验: 化学分册*, 2019, 55(5): 584-590. ■