

# 水中痕量双酚 A 的罗丹明 6G-动力学共振荧光测定法

易艳妮<sup>1</sup>, 唐律<sup>2</sup>, 陈浩波<sup>3</sup>, 李节康<sup>2</sup>, 徐梦媛<sup>2</sup>, 李贵荣<sup>2</sup>

1. 广州医科大学公共卫生学院, 广东 广州 510182 2. 南华大学公共卫生学院 3. 中国科学院广州能源研究所

**摘要:**目的 建立环境水样中双酚 A (bisphenol A, BPA) 的罗丹明 6G-动力学共振荧光测定法。方法 向水样品中依次加入 0.1 mol/L 硫酸溶液 0.6 ml,  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 罗丹明 6G 溶液 0.4 ml, 0.1 mol/L 溴酸钾溶液 0.5 ml, 70 °C 水浴加热 12 min, 流水冷却 3 min, 在 524.2 nm 处测定共振荧光强度。结果 在 0.02~1.40  $\mu\text{g/ml}$  线性范围内, 该方法所得 BPA 的回归方程为  $\Delta F = 1708.4c + 33.2$ ,  $r = 0.9998$ 。该方法的检出限为 0.014  $\mu\text{g/ml}$ , 回收率为 97.5%~106.5%, RSD 为 3.9%~5.0%。结论 该方法简单、方便、灵敏, 适用于饮用水中 BPA 的测定。

**关键词:** 双酚 A; 罗丹明 6G; 动力学共振荧光法

中图分类号: O657.6 文献标志码: A 文章编号: 1001-5914(2017)01-0075-03

## Kinetic-resonance fluorescence determination of trace bisphenol A residue in water based on rhodamine 6G

YI Yan-ni\*, TANG Lü, CHEN Hao-bo, LI Jie-kang, XU Meng-yuan, LI Gui-rong

\*School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China

Corresponding author: LI Gui-rong, E-mail: liguirong525@126.com

**Abstract: Objective** To establish a method of kinetic-resonance fluorescence based on rhodamine 6G for the determination of bisphenol A (BPA) in water sample. **Methods** In water sample, 0.6 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution of 0.1 mol/L, 0.4 ml Rh 6G solution of  $1 \times 10^{-4}$  mol/L, 0.5 ml  $\text{KBrO}_3$  solution of 0.1 mol/L was added in turn, the resonance fluorescence of BPA was determined at 524.2 nm after reaction 12 min at the temperature of 70 °C heating in water bath and water cooling for 3 min. **Results** The linear range of the method was 0.02–1.40  $\mu\text{g/ml}$ , the linear regression equation was  $\Delta F = 1708.4c + 33.2$ , with the correlation coefficient of 0.9998 for BPA. The limit of detection of the method was 0.014  $\mu\text{g/ml}$ , the rates of recovery were 97.5%–106.5% and RSDs were 3.9%–5.0%. **Conclusion** This method is simple, convenient, sensitive and applicable to accurate determination of bisphenol A residue in water.

**Key words:** Bisphenol A; Rhodamine 6G; Kinetic-Resonance fluorescence

双酚 A (bisphenol A, BPA) 作为环境内分泌干扰物, 是制造环氧树脂、聚碳酸酯树脂、聚苯乙烯树脂的主要原料, 制成的产品广泛用于饮料包装、金属涂层, 包括食用油、食品罐头、瓶盖和供水管等。动物试验发现, BPA 有模拟雌激素的效果, 即使很低的剂量也能使动物产生雌性早熟、精子数下降、前列腺增长等作用<sup>[1-2]</sup>, 同时, 它对人的皮肤、呼吸道、消化道和角膜有刺激性。当体内的 BPA 达到一定量会造成慢性中毒, 使人出现不同程度的头昏、皮疹、精神不安、腹泻等症状。BPA 原本在自然界并不存在, 但近年来在世界各地各种水体和空气中都有发现, 甚至在用作牙齿填充材料的聚合物中也发现了 BPA<sup>[3]</sup>, 尤为严重的是, 在食用聚碳酸酯(PC) 包装材料、婴儿奶瓶和桶装饮用水瓶中均发现有双酚 A 溶出, 危害人类健康。因此, 食品材料和环境样品中双酚 A 等环境雌激素的残留检测方法研

究已引起人们的关注。近年来, BPA 的检测方法主要包括分光光度法<sup>[4]</sup>、气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术<sup>[5]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[6]</sup>、传感器检测法<sup>[7]</sup>和荧光免疫法<sup>[8]</sup>等。但存在仪器昂贵、操作繁琐、不易普及、易出现假阳性结果等缺点。催化动力学技术因具有灵敏度高、简便快速且成本相对低廉的特点, 而被用于各种物质的检测分析<sup>[9]</sup>; 同时, 分子共振荧光光谱具有信号强、共振荧光峰尖且对称、受干扰因素少的特点<sup>[10]</sup>, 但其结合动力学技术用于分析双酚 A 却罕见报道。在硫酸介质中, 罗丹明 6G (rhodamine 6G, Rh 6G) 能产生很强的分子共振荧光, 而痕量的 BPA 能阻抑溴酸钾氧化罗丹明 6G 的反应, 使其共振荧光减弱的程度明显减慢, 催化反应与非催化反应的共振荧光差值与 BPA 浓度在一定范围内呈线性关系。本研究建立了水中痕量 BPA 的罗丹明 6G-动力学共振荧光测定法。

## 1 材料与方法

**1.1 主要仪器与试剂** RF-4500 型荧光分光光度计 (日本岛津公司), PB-20 精密酸度计 (德国赛多利斯公

DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2017.01.018

基金项目: 广州市属高校科技项目 (1201430177)

作者简介: 易艳妮 (1986-), 女, 实验师, 从事环境毒理学和卫生检验研究。

通讯作者: 李贵荣, E-mail: liguirong525@126.com

司) TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂) MVS-1 旋涡混合器(北京北德科学仪器有限公司) 三用电热恒温水浴箱(北京市永光明医疗仪器厂)。

BPA(RG 级,上海 BBi 生命科学有限公司):使用前,准确称取适量的 BPA 溶于无水乙醇中,加入二次去离子水稀释至所需浓度,超声溶解制得;罗丹明 6G(AR 级,上海金穗生物科技有限公司)。其他试剂均为分析纯,试验用水均为二次蒸馏水。

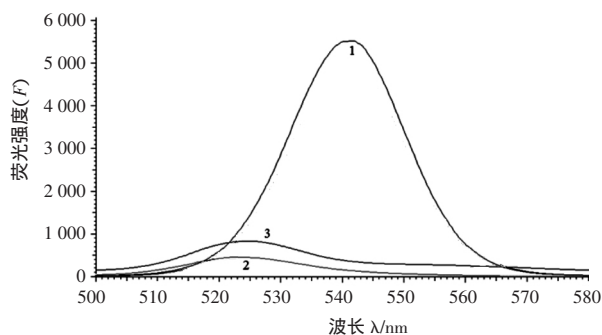
**1.2 实验方法** 移取 2.0 μg/ml 的 BPA 溶液不同体积于 5 ml 比色管中,依次加入 0.1 mol/L 硫酸溶液 0.6 ml,  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 罗丹明 6G 溶液 0.4 ml, 0.1 mol/L 溴酸钾溶液 0.5 ml,用双蒸水定容至刻度,充分摇匀,70 °C 水浴加热 12 min,流水冷却 3 min,在 500~600 nm 范围同步扫描得到共振荧光光谱。在  $\lambda = 524.2$  nm 处测定共振荧光强度( $F$ )值,以试剂空白( $F_0$ )做对照,并计算  $\Delta F$  ( $\Delta F = F - F_0$ )。

荧光光谱测定在 F-4500 型荧光分光光度计进行( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ,电压 700 V,激发和发射狭缝均为 5 nm)。

**1.3 标准曲线的绘制** 准确移取适量的双酚 A 储备液溶于双蒸水中,配制成 0、0.02、0.04、0.12、0.40、0.60、1.00、1.40 μg/ml 的 BPA 标准系列溶液。以浓度( $c$ )对荧光强度改变值( $\Delta F$ )绘制标准曲线。

## 2 结果与讨论

**2.1 共振荧光光谱** BPA 在不同体系中的共振荧光光谱图见图 1。由曲线 1 可见,Rh 6G 在 525~555 nm 具有强共振荧光,最大荧光波长为 540.8 nm。当在 Rh 6G 溶液中加入溴酸钾后,由于溴酸钾能氧化罗丹明 6G,使其共振荧光强度迅速减弱,同时体系最大荧光波长发生蓝移至 524.2 nm(曲线 2);当同时加入溴酸钾和痕量 BPA 时,溶液共振荧光值减弱速率明显降低(曲线 3),表明 BPA 对溴酸钾氧化 Rh 6G 的反应具有阻抑作用。

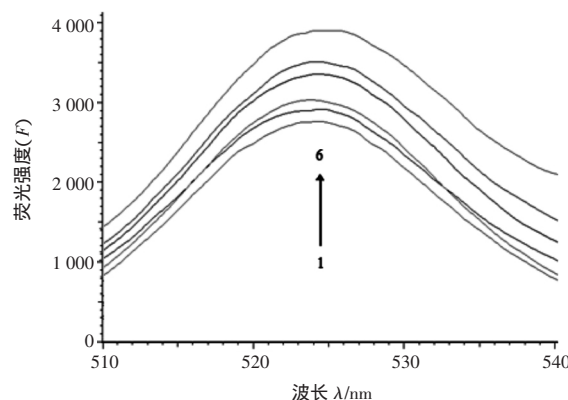


注:1 Rh 6G+硫酸 2 Rh 6G+硫酸+溴酸钾 3 Rh 6G+硫酸+溴酸钾+BPA。

图 1 BPA 在不同体系中的共振荧光光谱图

由图 2 可见,在 524.2 nm 处体系的共振荧光强度变化值随 BPA 浓度的升高而增大,并呈良好的线性关

系,据此可以用于 BPA 的定量测定。推测可能的机理:在酸性介质中,罗丹明 6G 的存在形式为阳离子,在加入溴酸钾后,溴酸根离子氧化 Rh 6G,使其荧光猝灭;当溶液中存在 BPA 时,它作为 Rh 6G 的竞争性还原剂,抑制溴酸钾氧化罗丹明 6G 的褪色反应,这是由于 Rh 6G 结构中苯环取代基的空间位阻较大,较 BPA 不易与溴酸根离子反应。因此双酚 A 存在阻抑 Rh 6G 的荧光猝灭作用。



注:1 0 μg/ml 2 0.02 μg/ml 3 0.04 μg/ml 4 0.12 μg/ml 5 0.40 μg/ml 6 0.60 μg/ml。

图 2 不同 BPA 浓度时 Rh 6G+硫酸+溴酸钾+BPA 体系的共振荧光光谱图

**2.2 反应介质及用量的选择** 分别实验了 HCl、硫酸和磷酸等介质对反应体系共振荧光强度的影响,结果发现  $\Delta F_{\text{盐酸}} > \Delta F_{\text{硫酸}} > \Delta F_{\text{磷酸}}$ ,但由于使用 HCl 为酸性介质时体系线性较差,故最终选用硫酸为酸性介质。

分别考察了不同体积(0.1、0.3、0.5、0.6、0.7、1.0 ml)的硫酸溶液(0.10 mol/L)对体系荧光强度的影响,结果表明,当 0.10 mol/L 硫酸用量为 0.6 ml 时,体系的  $\Delta F$  最大。故选择硫酸的用量为 0.6 ml。见图 3。

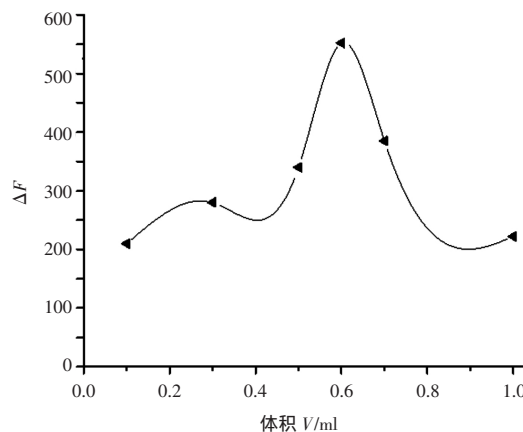


图 3 硫酸用量对体系荧光强度的影响

**2.3 罗丹明 6G 用量的确定** 分别考察了不同体积(0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 ml)的 Rh 6G 溶液( $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L)对体系荧光强度的影响,结果发现,当 Rh 6G 用

量在 0.4 ml 时,体系的  $\Delta F$  最大且稳定,故本实验选择加入  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的 Rh 6G 溶液 0.4 ml。见图 4。

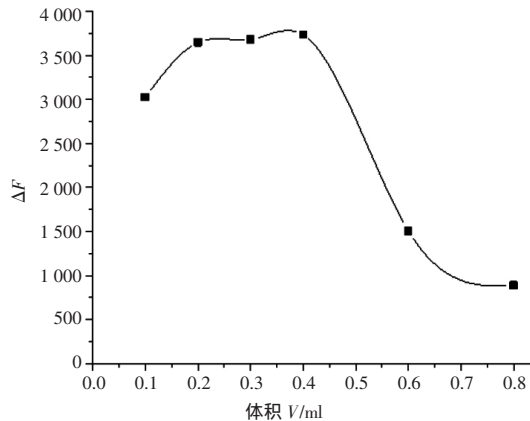


图 4 Rh 6G 用量对体系荧光强度的影响

**2.4 氧化剂及其浓度的选择** 比较了过氧化氢、高碘酸钾、溴酸钾、氯酸钾等氧化剂对反应的影响,结果发现,溴酸钾溶液的氧化效果最好。

分别考察了不同体积(0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 ml)的溴酸钾溶液(0.1 mol/L)对体系荧光强度的影响,结果显示,随着溴酸钾溶液加入量的增加,体系的荧光强度呈先上升后下降的趋势;当溴酸钾溶液加入量为 0.5 ml 时,体系的荧光强度最高。因此,本实验选择加入 0.1 mol/L 溴酸钾溶液 0.5 ml。

**2.5 反应温度的选择** 分别考察了 25、30、40、50、60、70、80、90 °C 恒温水浴对体系荧光强度的影响,结果发现,在室温下催化和非催化反应缓慢,随着温度升高,两反应均加速,  $\Delta F$  值也明显增大,至 70 °C 时,  $\Delta F$  达最大值,温度再升高,由于两反应已有较大速度,  $\Delta F$  反而减小,故选用 70 °C 水浴加热。

**2.6 反应时间的选择** 分别考察了反应时间(5、10、20、30、45、60、90、120 min)对体系荧光强度的影响,结果发现,  $\Delta F$  随反应时间的延长而增大,在 1~12 min 之间,  $\Delta F$  与  $t$  呈良好的线性关系;12 min 以后,  $\Delta F$  的变化微小。为达到最大灵敏度,选取 70 °C 水浴加热 12 min。由于在室温下催化和非催化反应缓慢,因而选用流动自来水迅速冷却终止反应,实验表明,流水冷却约 3 min 反应温度可迅速降低至室温以下,并且此时  $\Delta F$  值最大。故选用 70 °C 水浴加热,反应后迅速流水冷却 3 min。

**2.7 干扰试验** 当溶液中 BPA 浓度为 0.20  $\mu\text{g/ml}$  时,考察了常见共存离子与化学物对体系共振荧光强度的影响,干扰试验(相对误差  $\leq \pm 5\%$ )结果显示,800 倍的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ ,300 倍的  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ ,150 倍的  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{F}^-$ ,80 倍的间苯二酚、苯胺,50 倍的邻苯二酚,10 倍的  $\text{Fe}^{3+}$ 、苯酚不干扰测定。

**2.8 线性范围、检出限和回归方程** 在 0.02~1.40

$\mu\text{g/ml}$  的线性范围内,所得 BPA 的回归方程为  $\Delta F = 1708.4c + 33.2$ ,  $r = 0.9998$ ,线性关系良好。以 3 倍信噪比计算,方法的检出限为 0.014  $\mu\text{g/ml}$ 。对 0.20  $\mu\text{g/ml}$  双酚 A 标准溶液进行 11 次平行测定,  $RSD$  为 1.68%,方法重现性良好。

**2.9 加标回收试验** 向空白水样品中分别加入 0.04、0.20、0.80  $\mu\text{g/ml}$  的 BPA 标准溶液进行加标回收试验,平行测定 6 次,结果见表 1。该方法的平均回收率为 97.5%~106.5%,  $RSD$  为 3.9%~5.0%。

表 1 水中 BPA 的罗丹明 6G-动力学共振荧光测定法的加标回收试验结果( $n=6$ )

加标值( $\mu\text{g/ml}$ )	测定值( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{g/ml}$ )	平均回收率(%)	$RSD$ (%)
0.04	0.039 $\pm$ 0.002	97.5	5.0
0.20	0.213 $\pm$ 0.009	106.5	4.2
0.80	0.831 $\pm$ 0.032	103.9	3.9

**2.10 实际样品的测定** 采用该法测定了 3 种市售饮用水样品,均未检出 BPA。

### 3 小结

本研究建立了饮用水中 BPA 的罗丹明 6G-动力学共振荧光测定法。该方法灵敏、准确、简便,适用于环境水样品中 BPA 残留的检测。

### 参考文献

- [1] Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, et al. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29: 206-210.
- [2] Miao S, Gao ZX, Kou ZQ, et al. Influence of Bisphenol A on developing rat estrogen receptors and some cytokines: a two-generational study [J]. J Toxicol Environ Health A, 2008, 71: 1000-1008.
- [3] Vandenberg LN, Chahoud I, Heiddele JJ, et al. Urinary circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A[J]. Environ Health Persp, 2010, 118: 1055-1070.
- [4] Cunha SC, Cunha C, Ferreira AR, et al. Determination of bisphenol A and bisphenol B in canned seafood combining quechers extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404: 2453-2463.
- [5] 凌绍明, 颜俊, 罗丹明 B 分光光度法测定双酚 A 含量[J]. 化学世界, 2016, 57(5): 284-287.
- [6] 柳玉红, 王萍, 李洁. 超高效液相色谱法同时测定化妆品中 9 种邻苯二甲酸酯和双酚 A[J]. 卫生研究, 2012, 41(5): 846-849.
- [7] 蔡义林, 邓大庆, 丁鑫, 等. 食品及其包装材料中双酚 A 的测定方法研究[J]. 包装工程, 2015, 1(1): 33-36.
- [8] Xue F, Wu JJ, Chu HQ, et al. Electrochemical aptasensor for the determination of bisphenol A in drinking water [J]. Microchimica Acta, 2013, 180: 109-115.
- [9] 王广军, 樊静, 刘国光. 用溴酸钾-丁基罗丹明 B 体系动力学荧光法测定双酚 A[J]. 分析科学学报, 2007, 23(4): 478-480.
- [10] 李志英, 邢波, 解妹雅. 天然水中痕量苯酚的罗丹明 B-溴酸钾抑制动力学荧光光度测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(7): 624-625.

收稿日期 2016-12-02 责任编辑 韩威