

文章编号: 1000-7032(2012)07-0796-06

ZnSe 量子点增敏鲁米诺-铁氰化钾化学 发光测定牛奶中的己烯雌酚

郭 城¹, 高桂园¹, 丁小洁¹, 李建军¹, 杨 冉^{1*}, 屈凌波^{1,2}

(1. 郑州大学 化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 河南工业大学 化学化工学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 碱性介质中, ZnSe 量子点能够增强鲁米诺-铁氰化钾体系的化学发光, 己烯雌酚对该体系的化学发光有很强的抑制作用, 据此建立了测定己烯雌酚的新方法, 并对可能的反应机理进行了探讨。结果表明, 在优化实验条件下, 己烯雌酚在 $6.0 \times 10^{-9} \sim 4.0 \times 10^{-5}$ mol/L 的浓度范围内与发光强度呈良好的线性关系, 检出限为 2.0×10^{-9} mol/L (信噪比 $S/N=3$)。对于浓度为 4.0×10^{-6} mol/L 的己烯雌酚, 测定 11 次的相对标准偏差为 1.4%。将该体系用于牛奶中己烯雌酚的测定, 回收率为 94.47% ~ 107.61%。

关键词: 化学发光; ZnSe 量子点; 鲁米诺; 己烯雌酚

中图分类号: O482.31; O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3788/fgxb20123307.0796

Determination of Diethylstilbestrol in Milk with The Enhanced Chemiluminescence System of Luminol- $K_3Fe(CN)_6$ by Using of ZnSe Quantum-dots

GUO Cheng¹, GAO Gui-yuan¹, DING Xiao-jie¹, LI Jian-jun¹, YANG Ran^{1*}, QU Ling-bo^{1,2}

(1. The College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

* Corresponding Author, E-mail: yangran@zzu.edu.cn

Abstract: It was found that ZnSe quantum dots (QDs) could enhance the chemiluminescence (CL) of the luminol- $K_3Fe(CN)_6$ system. The CL from luminol- $K_3Fe(CN)_6$ -ZnSe QDs system is strongly inhibited under the presence of hydroquinone. Based on this inhibition, a novel CL method with a lower detection limit and wider linear range was developed for determining diethylstilbestrol. The possible CL mechanism was also discussed. Under the selected experimental conditions, the CL intensity was linear with the concentration of diethylstilbestrol from 6.0×10^{-9} mol/L to 4.0×10^{-5} mol/L with a detection limit of 2.0×10^{-9} mol/L ($S/N=3$). The relative standard deviation (RSD) ($n=11$) for the determination of 4.0×10^{-6} mol/L diethylstilbestrol was 1.4%. The proposed method was successfully applied to analyze diethylstilbestrol in milk samples with recoveries of 94.47% ~ 107.61%.

Key words: chemiluminescence; ZnSe quantum dots; luminol; diethylstilbestrol

收稿日期: 2012-03-27; 修订日期: 2012-05-24

作者简介: 郭城(1987-), 女, 湖北十堰人, 主要从事纳米材料的合成与应用的研究。

E-mail: gc-mars_llp@163.com

1 引 言

己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES), 化学名为(E)-4,4-(1,2-二乙基-1,2)-亚乙烯基双苯酚, 是一种人工合成的雌性激素, 常用来调节动物的生理机能, 医学上用于治疗雌激素缺乏症。其质量控制较严, 但 DES 也被不恰当地滥用于饲料添加剂中作为动物的促生长素^[1]。DES 的检测是食品安全检测的重要项目之一, 对药物、动物尿液及食品中 DES 的检测已引起了国内外的高度重视。用于 DES 检测的方法有循环伏安^[2-3]、高效液相色谱(HPLC)^[4-5]、气相色谱-质谱(GC-MS)联用^[6-7]、酶免疫测定(EIA)^[8-9]等方法。利用化学发光法结合流动注射分析检测 DES 的报道很少^[10]。

量子点(Quantum dots, QDs) 又称半导体纳米粒子(Semiconductor nanoparticles), 是一种由 II-VI 族或 III-V 族元素组成的纳米颗粒, 由于量子点的表面效应和特殊结构, 它具有很多特殊的光效应, 被广泛应用于传感器及生物标记等方面, 在分析检测领域具有广阔的应用前景。从以往报道的研究工作可以看出, 量子点可以作为能量接受体、微尺度反应平台、还原剂、催化剂等参与化学发光反应, 可以有效地提高化学发光检测的灵敏度, 弥补目前化学发光分析法普遍选择性差的缺点^[11-12]。ZnSe 量子点是在紫外到蓝光区发光的量子点, 克服了常用的镉系量子点高毒性的缺陷, 有着非常广泛的应用前景^[13], 但目前尚未见 ZnSe 量子点化学发光研究的有关报道。

本文研究了 ZnSe 量子点增强鲁米诺-铁氰化钾体系的化学发光反应, 并利用己烯雌酚对该体系的强抑制作用, 结合流动注射技术, 建立了一种直接测定己烯雌酚的新方法。实验结果表明, 结合固相萃取技术, 该方法可用于牛奶中己烯雌酚的检测。

2 实 验

2.1 仪器与试剂

IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈分析仪器公司); UV-2550 紫外光谱仪(日本岛津公司); F-4500 荧光分光光度计(日本 Hitach 公司); JEM-2100 透射电子显微镜(日本电子公司); Cleanert PAX 阴离子固相萃取柱(天津博纳

艾杰尔科技有限公司)。

鲁米诺储备溶液(1×10^{-3} mol/L): 称取 0.017 8 g 鲁米诺(luminol)(美国 Alfa Aesar 公司), 用 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液 20 mL 溶解后, 用水定容至 100 mL, 低温避光保存; 铁氰化钾储备溶液(1×10^{-3} mol/L): 称取 0.032 9 g 铁氰化钾 [$K_3Fe(CN)_6$](国药集团(上海)化学试剂有限公司)用水定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 避光保存; 己烯雌酚储备溶液(1×10^{-3} mol/L): 称取己烯雌酚(德国 Dr. Ehrensofer 公司)0.026 8 g 甲醇溶解后, 用水定容至 100 mL, 4 °C 保存, 使用时再用水按适当比例稀释成工作液; ZnSe 量子点为实验室自制。上述所用水均为二次去离子水。

2.2 ZnSe 量子点的制备

在密闭的小玻璃瓶中依次加入 0.014 8 g NaHB₄ 和 3 mL 二次蒸馏水, 振荡使之溶解, 并置于冰浴中冷却。再加入 0.007 9 g 硒粉, 迅速用带有针头的橡胶塞密闭玻璃瓶口。将 0.153 7 g 谷胱甘肽加入到 100 mL 浓度为 0.004 mol/L 的 Zn(AC)₂ · 2H₂O 水溶液中, 用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 10.5, 倒入三颈烧瓶中, 通 N₂ 并于磁力搅拌器上加热搅拌。30 min 后加入制备好的 NaHSe (10^{-4} mol) 溶液, 95 °C 下加热回流, 继续搅拌, 持续一定时间, 得到透明无色溶液, 即为制备好的 ZnSe 量子点溶液。

2.3 实验方法

流动注射化学发光分析流路参照文献[14], 分别将水、鲁米诺、铁氰化钾以及 ZnSe 量子点通过相应的管道输入分析系统, 待基线稳定后注入样品溶液, 记录反应的发光信号。将其中未加入己烯雌酚的体系所产生的化学发光强度定义为本体发光值 I_0 , 而将己烯雌酚加入到发光体系中所得到的化学发光强度定义为 I , 则降低的化学发光值 $\Delta I = I_0 - I$, 以 ΔI 作为定量分析的依据。

3 结果与讨论

3.1 ZnSe 量子点的表征

取制备好的 ZnSe 量子点溶液稀释一定倍数, 于紫外分光光度计上记录紫外吸收图谱(图 1(a)); 于荧光分光光度计上以 320 nm 为激发波长, 记录荧光光谱(图 1(b))。随着制备时回流时间的增加, ZnSe 量子点的紫外吸收光谱及荧光发射谱带均发生红移。本次实验使用的为加热 7

h 后的 ZnSe 量子点。将 ZnSe 量子点溶液滴在碳支持膜上,在 200 kV 加速电压和相应参数下通过透射电镜测定加热 7 h 后 ZnSe 量子点的形貌(图 1(c)),实验发现所制备的 ZnSe 量子点粒径约为 4 nm。

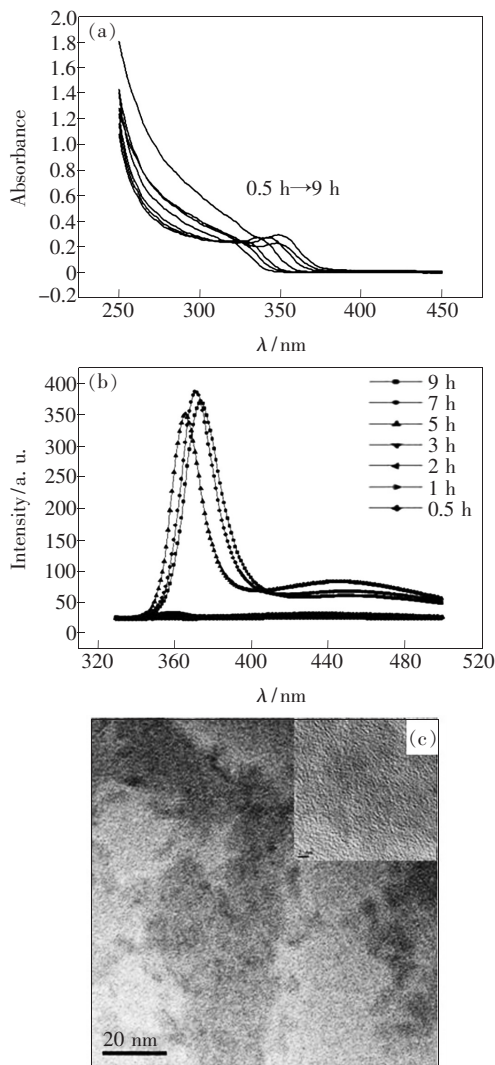


图 1 ZnSe 量子点的表征。(a)紫外吸收光谱;(b)荧光光谱;(c)透射电镜照片。

Fig. 1 Characterization of ZnSe QDs. (a) UV absorbance spectra; (b) PL spectra; (c) TEM mage of the ZnSe QDs.

3.2 化学发光动力学曲线

利用建立的流动注射化学发光体系,对己烯雌酚-ZnSe 量子点-luminol- $K_3Fe(CN)_6$ 反应体系的化学发光信号进行测定。如图 2 所示,从 luminol- $K_3Fe(CN)_6$ 、ZnSe 量子点-luminol- $K_3Fe(CN)_6$ 、己烯雌酚-ZnSe-luminol - $K_3Fe(CN)_6$ 三个体系的动力学曲线可以看出,加入 ZnSe 量子点(曲线 b)

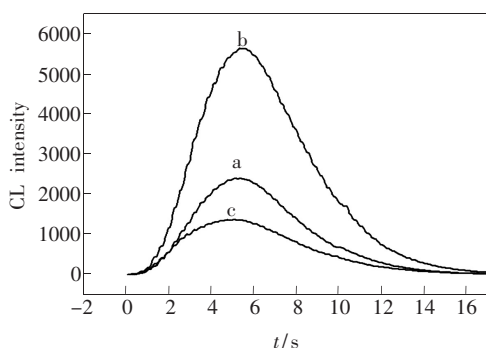


图 2 体系化学的发光动力学曲线

Fig. 2 CL kinetic curves of the systems. (a) luminol + $K_3Fe(CN)_6$; (b) luminol + $K_3Fe(CN)_6$ + ZnSe QDs; (c) luminol + $K_3Fe(CN)_6$ + ZnS QDs + diethylstilbestrol.

的化学发光强度明显大于未加 ZnSe 量子点(曲线 a)的化学发光强度,而已烯雌酚(曲线 c)的加入能明显抑制该化学发光强度。

3.3 测定条件的选择

3.3.1 氢氧化钠的浓度

以 4.0×10^{-6} mol/L 己烯雌酚实验,考察了 0.01 ~ 0.1 mol/L 的 NaOH 介质对化学发光强度抑制率的影响,如图 3(a)所示。当 NaOH 浓度为 0.04 mol/L 时,加入己烯雌酚后化学发光强度抑制率(Y)最大。确定后续实验中 NaOH 的浓度为 0.04 mol/L。

3.3.2 鲁米诺的浓度

以 4.0×10^{-6} mol/L 己烯雌酚,0.04 mol/L 的 NaOH 实验,考察了 6.0×10^{-4} ~ 6.0×10^{-3} mol/L 的鲁米诺的浓度对化学发光强度抑制率的影响,如图 3(b)所示。当鲁米诺的浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 时,加入己烯雌酚后化学发光强度抑制率(Y)最大。确定后续实验中鲁米诺的浓度为 1.0×10^{-3} mol/L。

3.3.3 铁氰化钾的浓度

以 4.0×10^{-6} mol/L 己烯雌酚,0.04 mol/L 的 NaOH, 1.0×10^{-3} mol/L 鲁米诺实验,考察了 1.0×10^{-5} ~ 8.0×10^{-4} mol/L 的铁氰化钾的浓度对化学发光强度抑制率的影响如图 3(c)所示。当铁氰化钾的浓度为 2.0×10^{-5} mol/L 时,加入己烯雌酚后化学发光强度抑制率(Y)最大。确定后续实验中铁氰化钾的浓度为 2.0×10^{-5} mol/L。

3.3.4 ZnSe 量子点的浓度

以 4.0×10^{-6} mol/L 己烯雌酚,0.04 mol/L 的 NaOH, 1.0×10^{-3} mol/L 鲁米诺, 2.0×10^{-5} mol/L

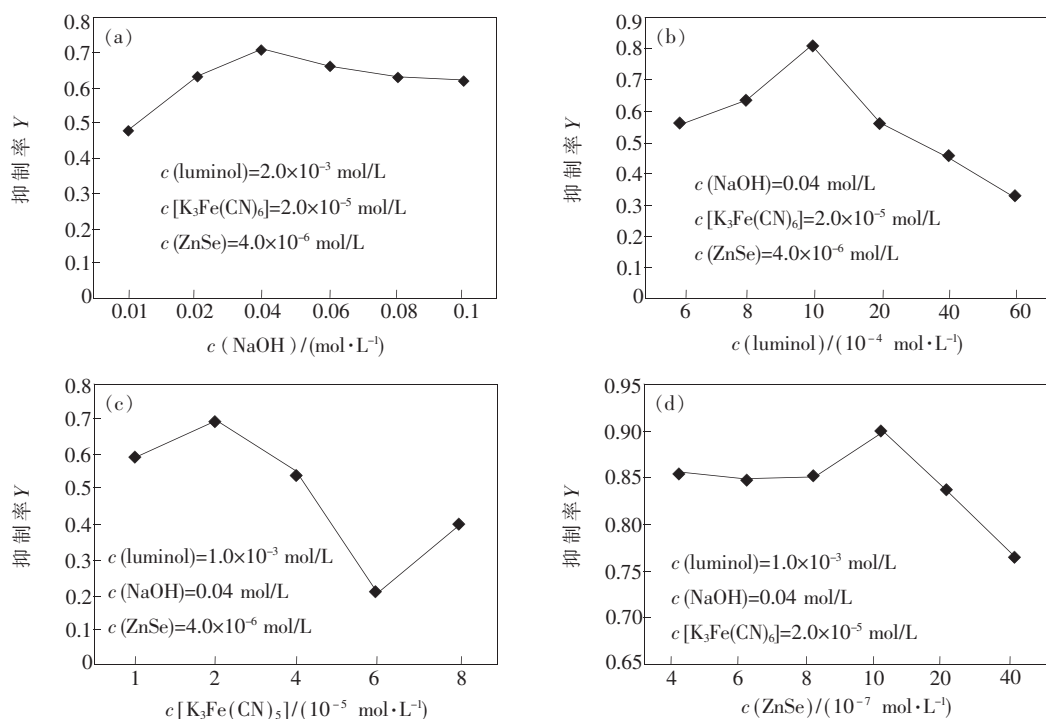


图3 实验条件的优化

Fig. 3 Optimization of the experimental conditions

铁氰化钾实验,考察了 $4.0\times 10^{-7}\sim 4.0\times 10^{-6}$ mol/L 的 ZnSe 量子点的浓度对化学发光强度抑制率的影响,如图 3(d) 所示。当 ZnSe 量子点的浓度为 1.0×10^{-6} mol/L 时,加入己烯雌酚后化学发光强度抑制率 (Y) 最大。确定后续实验中 ZnSe 量子点的浓度为 1.0×10^{-6} mol/L。

3.4 标准曲线、精密度及检出限

在选定的最佳条件下,己烯雌酚的浓度在 $6.0\times 10^{-9}\sim 4.0\times 10^{-5}$ mol/L 范围内与相对化学发光强度呈线性关系。为提高方法的准确度,标准曲线按己烯雌酚浓度的数量级分段绘制。在 $6.0\times 10^{-9}\sim 4.0\times 10^{-7}$ mol/L 范围内,其回归方程为 $\Delta I=9.9489+309.53c(\times 10^{-7}\text{ mol/L})$,相关系数 $r^2=0.9942$;在 $4.0\times 10^{-7}\sim 4.0\times 10^{-5}$ mol/L 范围内,其回归方程为 $\lg\Delta I=6089.2+2789.2\lg c(\times 10^{-7}\text{ mol/L})$,相关系数 $r^2=0.9967$ 。方法检出限($S/N=3$)为 2.0×10^{-9} mol/L,对 4.0×10^{-6} mol/L 的己烯雌酚平行测定 11 次,相对标准偏差为 1.4%。

3.5 干扰试验

在最佳实验条件下,研究了牛奶中常见物质对测定己烯雌酚的影响(测量误差在 5% 以内),结果表明:对于浓度为 4.0×10^{-6} mol/L 的己烯

雌酚,1 000 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 I^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- ,500 倍的蔗糖、糊精,100 倍的 Al^{3+} 、葡萄糖,50 倍的 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、柠檬酸、维生素 C,5 倍的 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} ,2 倍的 Ag^+ 、 Cu^{2+} 均不干扰测定,但等倍的雌二醇、雌三醇、己烷雌酚、雌酮存在时有类似的抑制效应而对测定产生干扰,建议在今后的应用中可根据 ΔI 的大小来测定样品中这些结构相近的雌激素总量。

3.6 样品分析

参照国标 GB/T 22992-2008 的方法,取 1 mL 牛奶与 4 mL 乙腈涡旋混合后,4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液于离心管中,50 °C 下氮吹至体积小于 0.1 mL 后加水 5 mL 溶解,用 1 mol/L NaOH 调至 pH=11.0,9 000 r/min 离心 5 min,备用。

将上述样品上清液上柱,流速为 1 mL/min,依次用 1 mL 淋洗液 [$V(\text{氨水}):V(\text{水})=1:19$],0.5 mL 甲醇以 3 mL/min 的速度淋洗,通入 20 mL 空气以 4 mL/min 的速度吹过 PAX 柱,用 4 mL 洗脱液 [$V(\text{甲酸}):V(\text{甲醇})=1:19$] 洗脱,流速为 1 mL/min,加入 30 mL 空气以 6 mL/min 的速度吹过 PAX 柱,收集洗脱液。将洗脱液 40 °C 下氮吹至干,加入 5 mL 水溶解用于测定。用上述实验得到的优化条件,对牛奶样品中己烯雌酚含量进行测定,结果如表 1 所示。

表 1 牛奶样品中己烯雌酚的测定

Table 1 Determination results of diethylstilbestrol in milk samples

Sample	Added / (mol · L ⁻¹)	Found / (mol · L ⁻¹)	Recovery / %	RSD / % (n = 6)
1	1 × 10 ⁻⁶	1.08 × 10 ⁻⁶	107.61	1.6
2	8 × 10 ⁻⁶	7.56 × 10 ⁻⁶	94.47	1.2
3	2 × 10 ⁻⁵	1.92 × 10 ⁻⁵	95.75	2.3

3.7 发光反应机理探讨

采用紫外可见分光光度计扫描了本发光体系中不同溶液混合后的吸收光谱(图4)。从图中可以看出,ZnSe量子点(b)最大吸收波长在350 nm处,鲁米诺-K₃Fe(CN)₆体系(c)在300 nm与346 nm处有两个最大吸收,而在体系中加入ZnSe量子点后混合液(d)的紫外图谱等于ZnSe量子点(b)的紫外吸收谱图和luminol-K₃Fe(CN)₆体系(c)的紫外吸收谱图的叠加,说明量子点的加入并没有引起新的化学反应,由此可推断出发光强度的增大可能仅仅是由于ZnSe量子点的催化作用而引起的。推测ZnSe量子点增强鲁米诺-K₃Fe(CN)₆发光体系的机理可能是ZnSe量子点与该体系的反应物或中间产物发生反应而生成了OH·及O₂⁻等自由基,这些自由基的存在加快了鲁米诺的氧化反应进程,从而促进了发光强度的增大。

在体系中加入己烯雌酚后,己烯雌酚(a)与luminol-K₃Fe(CN)₆-ZnSe量子点体系(c)的紫外吸收谱图的叠加并不等luminol-K₃Fe(CN)₆-ZnSe量子点-己烯雌酚(e)的紫外吸收谱图,己烯雌酚本身在268 nm处的最大吸收消失,表明己烯雌酚确实参与了体系的化学发光反应。推测己烯雌酚抑制该发光体系的机理可能是由于其结构中的还原性基团酚羟基,使其具有一定的还原性而对发光反应中的自由基具有清除作用,进而可能

影响鲁米诺化学发光反应历程,导致化学发光抑制信号出现。

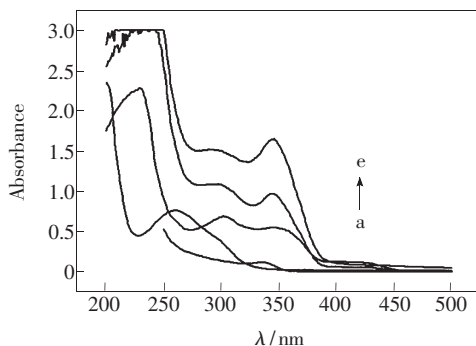


图 4 溶液紫外吸收光谱

Fig. 4 ZUV-Vis absorption spectra of some mixing solutions (a) diethylstilbestrol; (b) ZnSe QDs; (c) luminol-K₃Fe(CN)₆; (d) luminol-K₃Fe(CN)₆-ZnSe QDs; (e)luminol-K₃Fe(CN)₆-ZnSe QDs-diethylstilbestrol.

4 结 论

研究了ZnSe量子点对luminol-K₃Fe(CN)₆化学发光体系的影响,结果表明,ZnSe量子点能增强该体系的化学发光信号,己烯雌酚对该体系的化学发光有很强的抑制作用。据此建立了测定己烯雌酚的新方法,并对可能的反应机理进行了探讨。该方法具有灵敏、准确、简单的优点,适用于牛奶中己烯雌酚含量的测定。

参 考 文 献:

- [1] Pfaffi M W, Reck B, Dreher R, *et al.* Production of clenbuterol, diethylstilbestrol and trenbolone mass standards in lyophilised bovine urine [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 483(1-3):401-412.
- [2] Zhang S H, Wu K B, Hu S S. Voltammetric determination of diethylstilbestrol at carbon paste electrode using cetylpyridine bromide as medium [J]. *Talanta*, 2002, 58(4):747-754.
- [3] Biryol I, Salci B, Erdik E. Voltammetric investigation of diethylstilbestrol [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 32(6):1227-1256.
- [4] Wang S, Huang W, Fang G, *et al.* On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 606(2):194-201.
- [5] Liu M H, Qiu B, Jin X, *et al.* Determination of estrogens in wastewater using three-phase hollow fiber-mediated liquid-

- phase microextraction followed by HPLC [J]. *J. Sep. Sci.*, 2008, 31(4):622-628.
- [6] Seo J, Kim H Y, Chung B C, *et al.* Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chromatogr. A*, 2005, 1067(1-2):303-309.
- [7] Yang L H, Luan T G, Lan C Y. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1104(1-2):23-32.
- [8] Wang W J, Ling Y, Xu T, *et al.* Development of an indirect competitive ELISA based on polyclonal antibody for the detection of diethylstilbestrol in water samples [J]. *Chin. J. Chem.*, 2007, 25(8):1145-1150.
- [9] Wang W J, Li J, Zhao J X, *et al.* Development of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to the estrogen diethylstilbestrol [J]. *Chin. J. Chem.*, 2006, 24(12):1758-1765.
- [10] Wang S H, Zhuang H S, Yao X J, *et al.* Flow injection chemiluminescence method for the determination of diethylstilbestrol with N-bromosuccinimide luminol system [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析实验室)*, 2006, 25(8):10-12 (in Chinese).
- [11] LI Z, Wang Y, Zhang G, Xu W, *et al.* Chemiluminescence resonance energy transfer in the lumino-CdTe quantum dots conjugates [J]. *J. Lumin.*, 2010, 130(6):995-999.
- [12] Huang H, Tan Y, Shi J, *et al.* DNA aptasensor for the detection of ATP based on quantum dots electrochemiluminescence [J]. *Nanoscale*, 2010, 2(4):606-612.
- [13] Andrade J J, Brasil Jr A G, Farias P M A, *et al.* Synthesis and characterization of blue emitting ZnSe quantum dots [J]. *Microelectr. J.*, 2009, 40(3):641-643.
- [14] Zeng H J, Yang R, Wang Q W, *et al.* Determination of melamine by flow injection analysis based on chemiluminescence system [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(2):842-846.