

功能材料

# 基于 Fe(III)和邻苯二胺显色反应快速检测硫化物

赵灵芝<sup>1</sup>, 赵柳<sup>2</sup>, 张小清<sup>1</sup>, 罗杰<sup>1</sup>, 杨喆<sup>1</sup>

(1. 西安医学院 药学院, 陕西 西安 710021; 2. 陕西省农业检验检测中心, 陕西 西安 710003)

**摘要:** 比较了不同金属离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ ) 对邻苯二胺 (OPD) 的氧化能力, 基于  $\text{Fe}^{3+}$  能直接氧化 OPD 产生黄色发荧光的产物而构建了  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系。结合硫化物的还原性以及金属离子较强的亲和性, 开发了一种通过比色法选择性检测硫化物的方法。结果表明, 在 pH 4.0 NaAc-HAc 缓冲液中,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系的吸光度和荧光强度与 NaHS 的浓度分别在 10~200  $\mu\text{mol/L}$  和 5~150  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系, 荧光法的检出限可达 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 体系内其他还原性物质及硫醇对 NaHS 的检测无干扰。将  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系结合纸芯片构建的纸基比色体系蓝色分析色道值 ( $B$  值) 与 NaHS 的浓度在 20~150  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系, 检出限为 2  $\mu\text{mol/L}$ , 并可用于定量检测加标自来水和胎牛血清中的硫化物。

**关键词:** Fe(III); 邻苯二胺; 硫化物; 硫化氢; 纸基比色法; 功能材料

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 06-1319-06

## Rapid detection of sulfide based on the chromogenic reaction of Fe(III) and *o*-phenylenediamine

ZHAO Lingzhi<sup>1</sup>, ZHAO Liu<sup>2</sup>, ZHANG Xiaoqing<sup>1</sup>, LUO Jie<sup>1</sup>, YANG Zhe<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Agricultural Inspection and Testing Center, Xi'an 710003, Shaanxi, China)

**Abstract:** A  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system was developed based on the formation of yellow and fluorescent product from direct oxidation of OPD via  $\text{Fe}^{3+}$ , which was selected from investigation on the oxidation ability of different metal ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ) towards *o*-phenylenediamine (OPD). A colorimetric method for selective detection of sulfide was then developed combining the reducibility of sulfide and its strong affinity towards metal ions. The results showed that, in NaAc-HAc buffer solution at pH 4.0, the absorbance and fluorescence intensity of  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system showed a good linear relationship with NaHS concentration ranging 10~200  $\mu\text{mol/L}$  and 5~150  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. The fluorescence method exhibited a detection limit of 0.1  $\mu\text{mol/L}$  with no observed interference from other reducing substances and thiols. The paper-based colorimetric system, constructed from  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system in combination with test paper, displayed a good linear relationship between blue color value ( $B$  value) and the concentration of NaHS in the range of 20~150  $\mu\text{mol/L}$ , and a detection limit of 2  $\mu\text{mol/L}$ . The paper-based colorimetric system was further applied for sulfide quantification in spiked tap water and fetal calf serum.

**Key words:** Fe(III); *o*-phenylenediamine; sulfides; hydrogen sulfide; paper-based colorimetry; functional materials

硫化氢是一种无色、易燃、有臭鸡蛋气味的酸性气体。在以往的认知中,  $\text{H}_2\text{S}$  是环境污染物。近年来, 内源性  $\text{H}_2\text{S}$  的重要性被发现,  $\text{H}_2\text{S}$  是继 NO

和 CO 之后的第三种气体信号分子<sup>[1]</sup>。由于  $\text{H}_2\text{S}$  是二元弱酸 ( $\text{p}K_{a1}=6.96$ ,  $\text{p}K_{a2}=12.90$ ), 因此  $\text{H}_2\text{S}$  在体内一般有两种存在形式: 1/3 以气体  $\text{H}_2\text{S}$  形式存

收稿日期: 2022-09-06; 定用日期: 2023-01-06; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220834

基金项目: 陕西省科技厅项目 (2022JM-094, 2021JM-502); 西安医学院杰出人才青年计划配套项目 (2021PT08)

作者简介: 赵灵芝 (1985—), 女, 教授, E-mail: oldskyhappy\_zlz@163.com。

在；2/3 以硫氢根离子( $\text{HS}^-$ )形式存在。即在生理条件下， $\text{H}_2\text{S}$  与  $\text{HS}^-$  形成一种动态平衡， $\text{pH}=7.4$  时， $\text{HS}^-$  是  $\text{H}_2\text{S}$  主要存在形式。 $\text{NaHS}$  和  $\text{Na}_2\text{S}$  常作为  $\text{H}_2\text{S}$  供体。 $\text{H}_2\text{S}$  作为人体内硫化物的主要存在形式之一，其含量的异常与多种疾病包括冠心病、唐氏综合征、肝硬化、阿尔兹海默症等密切相关<sup>[2-4]</sup>。鉴于  $\text{H}_2\text{S}$  重要的生理和病理作用，发展简单、准确测量  $\text{H}_2\text{S}$  和硫化物含量的方法显得极为重要。

国内外用于检测  $\text{H}_2\text{S}$  和硫化物的方法主要有化学法（亚甲基蓝法和碘量法）<sup>[5-6]</sup>、色谱法<sup>[6-7]</sup>、电化学测定法<sup>[8-11]</sup>、荧光法<sup>[12-13]</sup>、比色法<sup>[14-18]</sup>等，这些方法或多或少存在一些缺陷。例如：碘量法基于硫离子的还原性，所以选择性不高，其他还原性物质均可造成干扰；色谱法检测准确性高，但需对硫化物进行衍生，且所需仪器昂贵；荧光法灵敏度高、可用于活细胞或组织中直接检测，但需繁琐的化学合成和分离提纯步骤。

在众多检测方法中，比色法不需要昂贵的仪器和复杂的操作，可实现裸眼检测，进一步结合纸芯片可成为即时检测设备。比色法检测大部分  $\text{H}_2\text{S}$  和硫化物一般是基于硫化物具有较强的还原性<sup>[14]</sup>、亲核性<sup>[17]</sup>，以及硫化物对多种金属离子较强的亲和力<sup>[15-16]</sup>。如，HE 等<sup>[14]</sup>基于  $\text{H}_2\text{S}$  良好的还原性，可促使二氧化锰纳米片层和多巴胺组成的显色液褪色，建立了比色法检测  $\text{H}_2\text{S}$  的方法；CHA 等<sup>[15]</sup>基于硫化物与  $\text{Pb}^{2+}$  较强的亲和力生成深棕色  $\text{PbS}$ ，通过比色法检测硫化物。但是仅基于硫化物单一化学性质建立的比色法选择性不高，其他还原性物质和硫醇均会造成干扰。

本研究系统地比较了不同金属离子对邻苯二胺（OPD）的氧化能力，拟结合硫化物的还原性以及金属离子较强的亲和性构建一种比色法选择性检测硫化物的方法。检测原理为： $\text{Fe}^{3+}$  能氧化 OPD 成 2,3-二氨基吩嗪（oxOPD），oxOPD 溶液显黄色，在 560 nm 处发射橙色荧光，从而构建  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系。硫化物的加入促使  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液颜色褪去，吸光度和荧光强度降低，从而构建检测硫化物的比色和荧光法。以期作为硫化物的临床分析和现场快速检测提供简便、快捷和准确的方法和手段。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

邻苯二胺（OPD）盐酸盐、 $\text{NaHS}$ 、半胱胺、L-半胱氨酸（L-Cys）、同型半胱氨酸（Homo）、还原型谷胱甘肽（GSH）、氧化型谷胱甘肽（GSSG）、1,4-二巯基苏糖醇（DTT）、尿酸（UA）、蛋氨酸、

邻苯二酚、甲醇，AR，上海阿拉丁生化科技股份有限公司； $\text{NaCl}$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{NaHSO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{NaF}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ ，AR，国药集团化学试剂有限公司；胎牛血清（南美血源），美国 HyClone 公司； $\text{NaAc}$ ，分析纯，天津欧博凯化工有限公司； $\text{HAc}$ ，分析纯，天津河东区红岩试剂厂。实验中所用水均为超纯水。

UV-6000T 型紫外-可见分光光度计，上海元析仪器有限公司；FL-4600 荧光分光光度计，日立高新技术有限公司；NOVA 8Pro 手机自带相机，华为公司。

### 1.2 $\text{NaHS}$ 的测定和干扰实验分析

以超纯水为溶剂，配制浓度为  $1 \times 10^{-2}$  mol/L 的  $\text{NaHS}$  溶液作为储备液。其他干扰物包括常见阴离子（ $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ）、硫醇以及常见的还原性物质（GSH、L-Cys、Homo、GSSG、DTT、尿酸、半胱胺、蛋氨酸、邻苯二酚）也分别配制成  $1 \times 10^{-2}$  mol/L 的溶液作为储备液。以 20 mmol/L  $\text{pH} 4.0$   $\text{NaAc-HAc}$  缓冲液为溶剂，配制浓度为  $1 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Fe}^{3+}$  和  $1 \times 10^{-2}$  mol/L OPD 的标准溶液。依次向 1.5 mL 离心管中加入 316  $\mu\text{L}$   $\text{pH} 4.0$   $\text{NaAc-HAc}$  缓冲液，40  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  mol/L OPD 的储备液，40  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Fe}^{3+}$  的标准溶液，混匀反应，待混合液显色稳定后，再加入 4  $\mu\text{L}$  不同浓度的  $\text{NaHS}$  或其他干扰物水溶液，使混合液最终总体积为 400  $\mu\text{L}$ ，待显色稳定后拍照，记录溶液颜色，测定其紫外-可见吸收光谱以及荧光光谱。

### 1.3 纸芯片上 $\text{NaHS}$ 的显色实验

采用 Watman 1 号定性滤纸作为芯片的固体支撑。滤纸用一个打孔机切割成小圆片，每个圆片的直径为 60 mm。在圆片上依次滴加 10  $\mu\text{L}$  OPD（3 mmol/L）和 10  $\mu\text{L}$   $\text{Fe}^{3+}$ （1.5 mmol/L），反应 3 min 后再滴加 12  $\mu\text{L}$  不同浓度的  $\text{NaHS}$  溶液，反应 5 min 后拍照，记录实验数据。纸芯片置于台灯下方，台灯保持 A4 纸高度即 29.7 厘米，由于使用手机软件 CS 扫描全能王进行扫描，每次仅需拖动边框确定扫描区域，即可获得和扫描仪类似效果，故拍照距离对测定结果无影响。使用 Adobe Photoshop 中的颜色分析功能，在显色区选择 5 个相同大小的区域，读取 RGB 中蓝色通道（即红、绿、蓝中蓝色通道）的显示图像亮度值。

### 1.4 实际样品分析

吸取胎牛血清 1 mL 置于离心管中，加入 2 mL 的甲醇，振荡 5 min 使其充分混合，置于高速离心机上离心 5 min（12000 r/min），取上清液，在 40  $^\circ\text{C}$

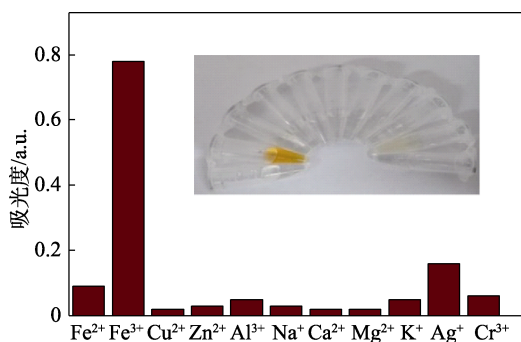
水浴锅上水浴挥干上清液。用 1 mL pH 4.0 的 NaAc-HAc 缓冲液再次溶解上清液的固体作为血清样品, 以血清样品为溶剂, 配制不同浓度 NaHS 溶液。

在 1.5 mL 离心管中加入 280  $\mu\text{L}$  pH 4.0 NaAc-HAc 缓冲液, 40  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  mol/L OPD 的标准溶液, 40  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Fe}^{3+}$  的标准溶液, 混匀反应, 待混合液显色稳定后, 再加入 40  $\mu\text{L}$  血清样品或加入溶有不同浓度 NaHS 的血清样品, 使混合液最终总体积为 400  $\mu\text{L}$ , 待显色稳定后拍照, 记录溶液颜色, 测定其紫外-可见吸收光谱以及荧光光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 各种金属离子对 OPD 的氧化能力考察

通过溶液颜色和吸光度对比 11 种金属离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ ) 对 OPD 的氧化能力, 结果见图 1。从图 1 看出, 仅有  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Ag}^{+}$  可氧化 OPD 使混合液显黄色, 其他离子均不能氧化 OPD 而显色。OPD 可被氧化生成 2,3-二氨基吩嗪 (oxOPD), oxOPD 具有鲜艳的亮黄色, 可用于肉眼可视化检测。此外, oxOPD 具有黄色荧光, 可进一步用于定量分析。经过对比可知, 相同浓度下  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 体系的颜色比  $\text{Ag}^{+}$ -OPD 体系的颜色更深, 说明  $\text{Fe}^{3+}$  对 OPD 的氧化能力更强。鉴于以上实验现象, 选择  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 混合液作为显色体系用于后续的比色研究。



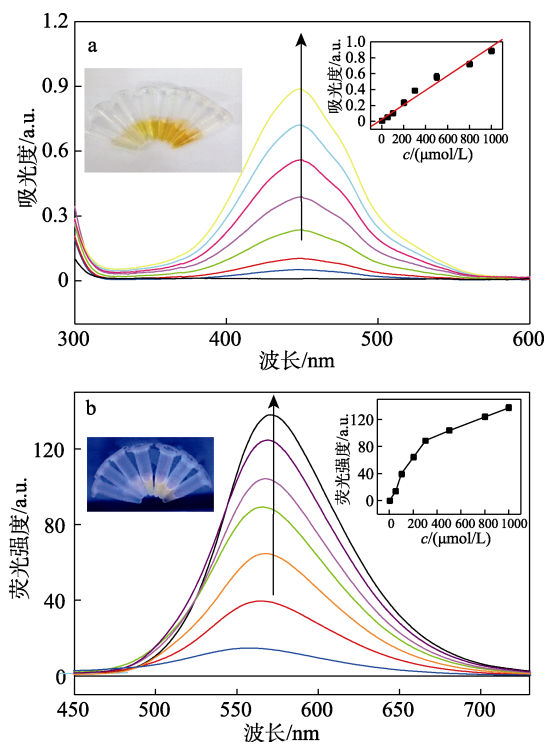
注: 插图中从左到右依次为:  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$

图 1 不同金属离子 (800  $\mu\text{mol/L}$ ) 共存下 OPD (1.0 mmol/L) 的溶液颜色及在 450 nm 处的吸光度

Fig. 1 Solution color and absorbance of 1.0 mmol/L OPD in the presence of various cations (800  $\mu\text{mol/L}$ ) at 450 nm

图 2a 为 OPD 溶液与不同浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  混合后的 UV-Vis 吸收光谱和溶液颜色。由图 2a 可知, 在含有 1.0 mmol/L OPD 的 pH 4.0 NaAc-HAc 缓冲液中, 随着  $\text{Fe}^{3+}$  浓度上升, 混合液颜色从无色变为黄色, 吸光度逐渐增加, 吸光度与  $\text{Fe}^{3+}$  浓度 (50~1000  $\mu\text{mol/L}$ ) 呈线性关系, 线性方程为  $y=0.04519+8.797 \times 10^{-4}x$

( $R^2=0.988$ ), 检出限为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。图 2b 为 OPD 溶液与不同浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  混合后的荧光发射光谱。由图 2b 可知, 在 412 nm 光激发下,  $\text{Fe}^{3+}$  与 OPD 混合液在 570 nm 处的荧光强度随着  $\text{Fe}^{3+}$  浓度上升而逐渐增强。但是  $\text{Fe}^{3+}$  的浓度过大时, 如图 2b 插图照片所示,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度上升至 1200  $\mu\text{mol/L}$ , 混合液荧光不升反降。所以, 显色体系组成最终定为 1.0 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$  和 1.0 mmol/L OPD。



注:  $\text{Fe}^{3+}$  浓度从下到上依次为 0、50、100、200、300、500、800、1000  $\mu\text{mol/L}$ ; 插图照片为不同浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  (从左到右浓度依次为 0、100、300、500、800、1000、1200  $\mu\text{mol/L}$ ) 与 OPD (1.0 mmol/L) 混合液的溶液颜色 (a) 和荧光 (b)

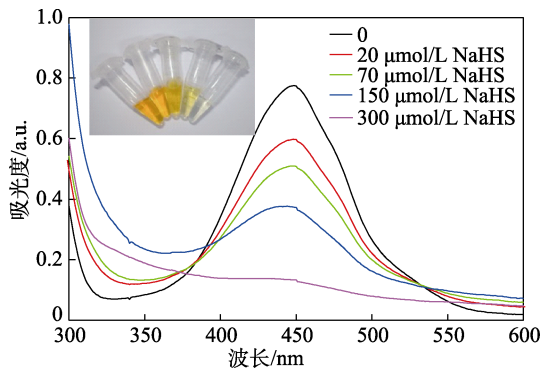
图 2 不同浓度  $\text{Fe}^{3+}$  与 OPD (1.0 mmol/L) 混合液的 UV-Vis 吸收光谱 (a) 和荧光光谱 (b), 插图为吸光度 (a) 和荧光强度 (b) 与  $\text{Fe}^{3+}$  浓度的依赖关系图

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra (a) and fluorescence spectra (b) of 1.0 mmol/L OPD in the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  with different concentrations, the inner graphs show the dependence of absorbance (a) and fluorescence intensity (b) on  $\text{Fe}^{3+}$  concentration

### 2.2 以 $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系检测 NaHS 的可行性分析和检测原理

为探究  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系检测 NaHS 的可行性, 分别向  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液中加入 0、20、70、150、300  $\mu\text{mol/L}$  的 NaHS 溶液, 观察混合液颜色和紫外-可见吸收光谱变化。图 3 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液在加入不同浓度的 NaHS 溶液后的紫外-可见吸收光谱。在 pH 4.0 NaAc-HAc 缓冲液中, NaHS 以  $\text{H}_2\text{S}$  形式存在<sup>[19]</sup>。从图 3 可看出, 随着 NaHS 浓度的增加, 显色液的颜色逐渐褪去。当 NaHS 浓度达到 300  $\mu\text{mol/L}$  时, 显色液颜色完全褪去, 在 450 nm 处吸

光度也大幅度降低。鉴于这一实验结果,可基于  $\text{Fe}^{3+}$  和 OPD 显色液建立一种比色法检测 NaHS 的方法。



注: NaHS 浓度从左到右依次为 0、20、70、150、300  $\mu\text{mol/L}$   
图 3 不同浓度的 NaHS 和  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系反应后的溶液颜色和 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 3 Solution color and UV-Vis absorption spectra of  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system in the presence of NaHS with different concentrations

图 4 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系检测 NaHS 的原理图。OPD 可被  $\text{Fe}^{3+}$  氧化形成黄色产物 oxOPD, 从而使  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 混合液呈现黄色; 当向  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液中加入 NaHS, NaHS 将  $\text{Fe}^{3+}$  还原生成  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  不能氧化 OPD 形成黄色 oxOPD, 从而导致  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 混合液的黄色褪去, 这就构成了比色法检测 NaHS 的基础。

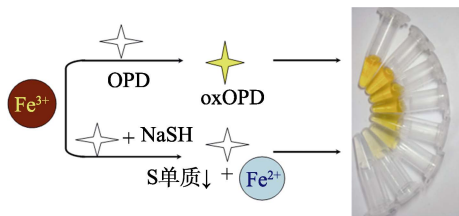


图 4 基于  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系可视法测定硫化物的原理  
Fig. 4 Proposed scheme of  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system for colorimetric detection of NaHS

### 2.3 实验条件的优化

为了提高实验的灵敏度和选择性, 通过紫外-可见吸收光谱和混合液颜色考察了 pH 对显色体系的影响。图 5 为在 pH 1~8 的缓冲液中,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系与 NaHS 的反应情况。考虑到  $\text{Fe}^{3+}$  在碱性条件下生成氢氧化铁沉淀, 所以选用 pH 1~8 的缓冲液。从图 5 可看出, 加入 NaHS 前, 以 pH 1~4 缓冲液为底液,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液均呈现深黄色, 在 450 nm 处吸光度最大; 而只有在 pH 4 缓冲液中, 加入 NaHS 后显色液褪色最为明显, 吸光度下降最多。为了提高检测的灵敏度, 在后续实验中均以 pH 4 缓冲液为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系检测 NaHS 的底液。

通过紫外-可见吸收光谱和荧光光谱考察了反应时间对  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系检测 NaHS 的影响, 结

果见图 6。由图 6 可知, 向  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液中加入 NaHS, 混合液的亮黄色快速褪去, 溶液 450 nm 处吸光度和 570 nm 处荧光强度在 3 min 左右趋于稳定。但是, 当时间超过 2 h 后混合液颜色进一步褪去, 吸光度降低, 荧光逐渐减弱。因此, 考虑到吸光度和荧光的稳定性, 反应液混合 5 min 后进行紫外-可见吸收光谱检测, 在混合 8 min 后进行荧光检测。

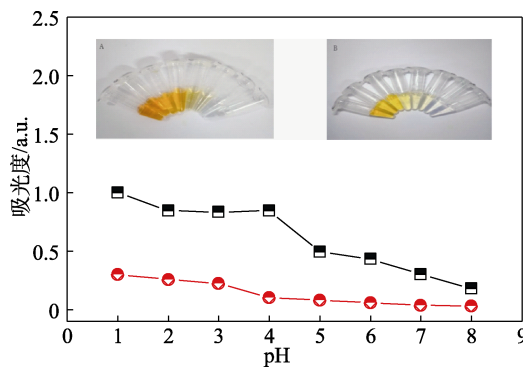


图 5 在不同 pH 的缓冲液中 OPD (1.0 mmol/L) 与  $\text{Fe}^{3+}$  (1.0 mmol/L) 混合 (黑线) 以及向该混合液加入 100  $\mu\text{mol/L}$  NaHS (红线) 后的溶液颜色和 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 5 Solution color and UV-Vis adsorption spectra of 1.0 mmol/L OPD and 1.0 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$  in the absence (black line) and the presence of 100  $\mu\text{mol/L}$  NaHS (red line)

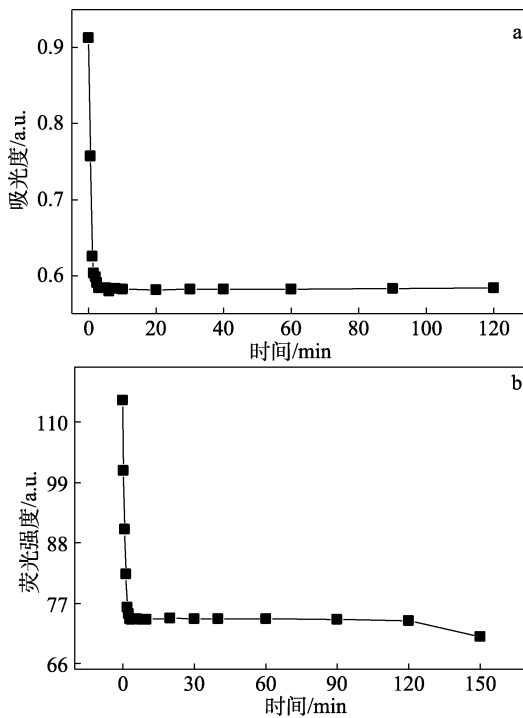
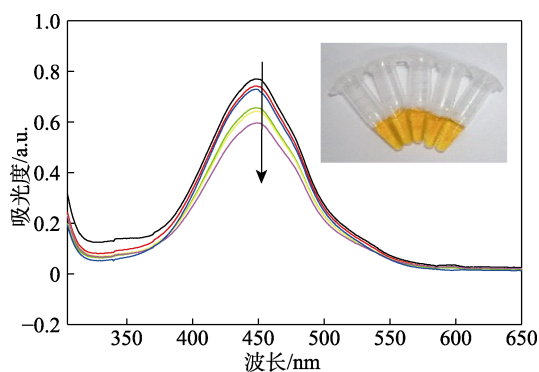


图 6 向 OPD (1.0 mmol/L) 与  $\text{Fe}^{3+}$  (1.0 mmol/L) 混合液加入 30  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 反应不同时间的 UV-Vis 吸收光谱 (a) 和荧光光谱 (b)

Fig. 6 UV-Vis absorption spectra (a) and fluorescence spectra (b) of mixture of 1.0 mmol/L OPD and 1.0 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$  in the presence of 30  $\mu\text{mol/L}$  NaHS

## 2.4 干扰实验

为了检验构建的  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系的抗干扰性能, 向  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系加入不同浓度的 L-Cys, 其紫外-可见吸收光谱和混合液颜色变化情况见图 7。从图 7 可知, L-Cys 浓度达到  $50 \mu\text{mol/L}$  以上才会引起显色体系吸光度略微下降, 而混合液颜色几乎未发生褪色。其他硫醇 (GSH、Homo、GSSG、DTT、半胱胺), 常见还原性物质 (尿酸、邻苯二酚) 和常见阴离子 ( $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) 中加入  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液, 体系颜色也几乎不发生变化。各物质加入  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系后的结果表明, GSH、L-Cys、DTT、半胱胺、Homo 等浓度达到  $50 \mu\text{mol/L}$  以上, 尿酸、邻苯二酚浓度达到  $100 \mu\text{mol/L}$  以上,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系  $450 \text{ nm}$  处的吸光度才发生明显的下降, 说明浓度在  $50 \mu\text{mol/L}$  以下的上述物质均不干扰 NaHS 的检测。常见阴离子浓度高达  $100 \mu\text{mol/L}$  也不能引起  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系吸光度下降, 说明这些阴离子不干扰 NaHS 的检测。



注: L-Cys 浓度 (从上到下, 插图从左到右) 依次是  $0$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $300$ 、 $500 \mu\text{mol/L}$

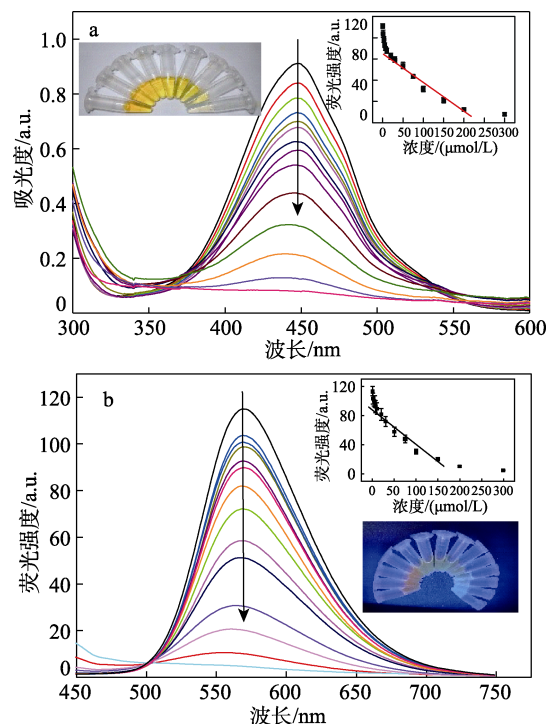
图 7  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系加入不同浓度 L-Cys 反应后的 UV-Vis 吸收光谱和溶液颜色 (插图)

Fig. 7 UV-Vis absorption spectra and solution color (inset) of  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system in the presence of L-Cys with different concentrations

## 2.5 $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系用于比色检测 NaHS

图 8a 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液在加入不同浓度的 NaHS 溶液后的紫外-可见吸收光谱。从图 8a 可看出, 随着 NaHS 浓度上升, 混合液颜色逐渐褪去,  $450 \text{ nm}$  处吸光度逐渐下降。吸光度与 NaHS 的浓度在  $10 \sim 200 \mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系, 线性方程为  $y=0.6783-0.00299x$  ( $R^2=0.987$ ), 检出限为  $0.3 \mu\text{mol/L}$ 。图 8b 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液在加入不同浓度的 NaHS 溶液后的荧光光谱图。由图 8b 可知, 在  $412 \text{ nm}$  光激发下, 向  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系加入 NaHS 后, 荧光强度逐渐降低, 荧光强度与 NaHS 的浓度在  $5 \sim$

$150 \mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系, 线性方程为  $y=88.72-0.5057x$  ( $R^2=0.984$ ), 检出限为  $0.1 \mu\text{mol/L}$ 。



注: NaHS 浓度从上到下依次为  $0$ 、 $1$ 、 $3$ 、 $5$ 、 $7$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $75$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $300 \mu\text{mol/L}$ ; 插图为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系与不同浓度的 NaHS 混合后的溶液颜色 (a, 浓度从左到右依次为  $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $300 \mu\text{mol/L}$ ) 和荧光光谱 (b, 浓度从左到右依次为  $0$ 、 $1$ 、 $3$ 、 $5$ 、 $7$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $50$ 、 $75$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $300 \mu\text{mol/L}$ )

图 8  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系中加入不同浓度的 NaHS 溶液的紫外-可见吸收光谱图 (a) 和荧光光谱 (b)

Fig. 8 UV-Vis absorption spectra (a) and fluorescence spectra (b) of  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system in the presence of NaHS with different concentrations

图 9a 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系在纸芯片上检测不同浓度 NaHS 的比色法检测结果。由图 9a 可知, 在最佳的实验条件下 ( $\text{Fe}^{3+}$  和 OPD 加样体积  $10 \mu\text{L}$ , 分析物 NaHS 体积  $12 \mu\text{L}$ , 反应时间  $5 \text{ min}$ , 反应底液为  $20 \text{ mmol/L}$  pH  $4.0$  NaAc-HAc 缓冲液), 在纸芯片上滴加不同浓度的 NaHS 溶液后, 纸芯片颜色随 NaHS 浓度升高逐渐变浅。RGB 中蓝色分析色道值 ( $B$  值) 随 NaHS 浓度变化的关系如图 9b 所示。由图 9b 可知, 纸芯片颜色与 NaHS 浓度在  $20 \sim 150 \mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系, 线性回归方程为  $y=0.8058x+29.725$  ( $R^2=0.9929$ ,  $n=3$ )。将 NaHS 标准溶液稀释, 在纸芯片上按上述方法进行显色反应, 当颜色差异肉眼可区别, 即  $B$  值大于空白值 ( $10$ ) 时为检出限, NaHS 的检出限为  $2 \mu\text{mol/L}$ 。这说明可基于  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系在纸芯片上对 NaHS 进行快速的定量检测。

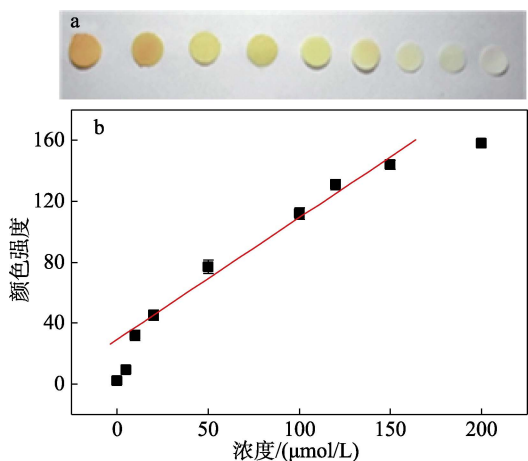


图 9 纸基比色用于不同浓度 NaHS (从左到右依次为 0、5、10、20、50、100、120、150、200  $\mu\text{mol/L}$ ) 的定量分析 (a); 颜色强度与不同浓度 NaHS 依赖关系的线性图(误差条表示  $n=3$  时的标准偏差) (b)

Fig. 9 Paper-based colorimetric sensor for the quantitative analysis of NaHS with different concentration(a); Calibration plot of color intensity and concentrations of NaHS (error bar represents the standard deviation at  $n=3$ ) (b)

### 2.6 实际样品分析

为考察  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系的实际应用性能, 利用  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液检测了自来水和胎牛血清中的硫化物。图 10 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液在加入不同体积的自来水 (2、5、12  $\mu\text{L}$ ) 后的紫外-可见吸收曲线和纸芯片显色结果。从图 10 可知, 在  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液中加入不同体积的自来水 (2、5、12  $\mu\text{L}$ ) 后,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液 450 nm 处吸光度保持不变, 纸芯片不褪色, 均表明当地自来水中的硫化物含量应在建立的检测方法的检出限之下。

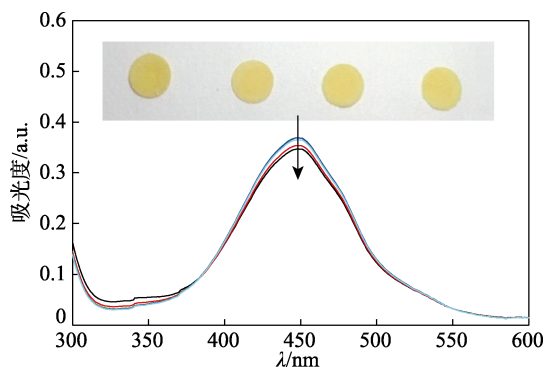


图 10  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系中加入自来水 (从上到下体积为 0、2、5、12  $\mu\text{L}$ ) 后的 UV-Vis 吸收光谱, 插图为在纸芯片上加入不同体积 (从左到右依次为 0、2、5、12  $\mu\text{L}$ ) 自来水的照片

Fig. 10 UV-Vis absorption spectra of  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD chromogenic system after addition of tap water (the volume from top to bottom is 0, 2, 5, 12  $\mu\text{L}$ ), the inset is the photos of paper chips after addition of tap water with different volumes (the volume from top to bottom is 0, 2, 5, 12  $\mu\text{L}$ )

表 1 为  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系对加标自来水和胎牛血清中的 NaHS 的检测结果。由表 1 可知, 显色体系对加标样品测定 3 次, 自来水加标回收率为 101%~104%, 对胎牛血清样品回收率为 102%~104%。与常用的检测硫化氢和硫化物的  $\text{Fe}^{3+}$ -邻菲罗啉法结果一致<sup>[20]</sup>。与  $\text{Fe}^{3+}$ -邻菲罗啉法相比,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系不但可以基于颜色和吸光度定量检测 NaHS, 还可以基于 oxOPD 的荧光来定量检测硫化物, 因为荧光法具有更高的灵敏度和更低的检测限。 $\text{Fe}^{3+}$ -邻菲罗啉法可以检测许多还原性物质, 方法的选择性不高, 但  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系可选择性地检测 NaHS, 其他还原性物质不干扰。

表 1 加标自来水和胎牛血清中 NaHS 含量测定  
Table 1 Determination of NaHS in spiked tap water and fetal calf serum

样品	加入 NaHS 浓度/ $\mu\text{mol/L}$	检测 NaHS 浓度/ $\mu\text{mol/L}$	回收率/%	RSD/%	$\text{Fe}^{3+}$ -邻菲罗啉法测得 NaHS 浓度/ $\mu\text{mol/L}$
自来水 1	0	0	—	—	0
自来水 2	5	5.06	101.2	2.22	2.95
自来水 3	50	51.90	103.8	3.51	48.10
胎牛血清 1	0	6.93	—	2.13	6.65
胎牛血清 2	5	12.13	104.0	3.55	11.90
胎牛血清 3	50	57.95	102.1	3.18	57.12

注: “—”代表无数据; RSD 为相对标准偏差。

### 3 结论

本研究系统地比较了不同金属离子对邻苯二胺 (OPD) 的氧化能力, 并基于  $\text{Fe}^{3+}$  和 OPD 组成的显色体系构建了比色法检测 NaHS 的方法。结果表明,  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色液中加入 NaHS, 可使吸光度和荧光强度下降, 溶液的黄色褪去, 从而实现对 NaHS 的定量检测。将  $\text{Fe}^{3+}$ -OPD 显色体系结合纸芯片所构建的纸基比色体系蓝色分析色道值 (B 值) 与 NaHS 的浓度在 20~150  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系, 检出限为 2  $\mu\text{mol/L}$ , 可用于定量测定自来水和血清中 NaHS 含量。该显色体系无需纳米材料, 省去了复杂的材料合成步骤, 方法简单、反应迅速、肉眼可视、体系稳定且成本低, 可通过紫外-可见吸收光谱和荧光实现双重定量测定 NaHS。将该显色体系结合纸芯片可用于临床或环境分析中 NaHS 的快速检测, 在临床分析和即时检测中具有较大的应用潜力。

### 参考文献:

[1] TAN B H, WONG T H, BIAN J S. Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the central nervous system[J]. Neurochemistry International, 2010, 56(1): 3-10.

(下转第 1392 页)