

基于荧光光谱的2,4,6-三硝基苯酚(TNP)快速检测体系

廉洁¹, 任翼飞², 杨瑞琴^{1*}, 郝红霞³

1. 中国人民公安大学侦查与刑事科学技术学院, 北京 100038
2. 中国人民公安大学信息技术与网络安全学院, 北京 100038
3. 中国政法大学证据科学教育部重点实验室, 北京 100192

摘要 2,4,6-三硝基苯酚(TNP)是一种威力强于2,4,6-三硝基甲苯(TNT)的猛炸药,同时染料、医药、皮革等行业中被大量使用,由于TNP强大的爆炸威力和环境毒性,使得近年来TNP的快速检测受到越来越多的关注。该研究通过一步反应合成了TNP荧光探针,利用探针的荧光光谱实现了TNP的快速检测。研究了该荧光探针的荧光特性,探针在水溶液中具有较高的荧光强度,在493 nm激发波长下发射波长为547 nm。荧光探针体系与TNP作用后,其发射光谱有明显的减弱,可能是由于荧光探针与TNP结合后,发生了荧光猝灭而改变了其聚集状态。在实验中,测试了荧光探针体系与不同浓度TNP溶液的作用,荧光光谱分析结果表明TNP对荧光探针体系具有良好的猝灭效果,在20~80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内,547 nm处的荧光强度 I_{547} 值与TNP的浓度呈现出良好的线性关系,线性回归方程 $I_{547} = 907\ 521.6 - 9\ 955c$ ($R^2 = 0.992\ 1$),并推算出了检测限为4.55 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该荧光光谱在探针与TNP的作用1 min后即达到稳定,响应时间短,可以实现快速检测;TNP检测的荧光光谱不受对苯酚(PHE)、2,4-二硝基甲苯(DNT)、2,4,6-三硝基甲苯(TNT)、2,4-二硝基苯酚(DNP)、4-硝基苯酚(NP)等结构类似干扰物和 Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- 常见阴阳离子的干扰。考察了尘土基质对荧光探针荧光光谱的影响,在实验室内制作了添加TNP的模拟爆炸尘土样本,使用上述荧光探针体系进行检测,实验表明尘土对该荧光探针发射光谱的稳定性及其与TNP的相互作用均无干扰,该体系的荧光发射光谱可以用于尘土中TNP的定量分析,具有较好的实际应用前景。

关键词 2,4,6-三硝基苯酚(TNP); 水溶性荧光探针; 荧光发射光谱; 荧光猝灭

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)03-0804-05

引言

近年来,境内外爆炸恐怖袭击事件仍不断发生,恐怖分子利用各类爆炸物蓄意在人员密集的地铁、火车、飞机等交通工具以及车站、商场等公共场所制造爆炸事件^[1],实施恐怖主义行为,给国家安全和社会稳定造成了重大影响。世界各国对于打击恐怖主义空前重视,各类爆炸物的现场快速检测技术已越来越受到重视^[1-3]。

2,4,6-三硝基苯酚(2,4,6-Trinitrophenol, TNP),又称苦味酸,是一种常见的猛炸药,其威力甚至强于2,4,6-三硝基甲苯(2,4,6-Trinitrotoluene, TNT); TNP除了作为炸药外,其在染料、医药、杀虫剂、橡胶、皮革等行业中也被大量

使用,在生产生活中使用广泛,获取来源多样。在使用过程中,TNP极易泄露到环境中,造成地下水和土壤污染,可经皮肤、呼吸道、消化道等途径侵入人体,TNP是一种环境污染物,毒性较大且难于生化降解^[4]。

由于TNP和TNT等物质具有爆炸性和环境毒性,目前相关的检测技术多种多样,常见方法包括离子迁移光谱、气相色谱分析^[5]、液相色谱质谱分析^[6]、电化学方法、X射线衍射、毛细管电泳法、表面增强拉曼光谱^[7-9]等方法,但是这些检测方法普遍存在一些弊端,例如依赖实验室大型仪器、样品的前处理过程繁琐、对操作人员要求较高等。与以上方法相比,荧光光谱法因其快速、灵敏、成本低廉、操作简便等优势而倍受青睐。近年来科研人员开发了大量荧光共轭聚合物,将其荧光光谱应用于不同领域^[10-12],利用荧光探针与

收稿日期: 2019-01-30, 修订日期: 2019-05-11

基金项目: 国家重点研发计划(2017YF0820303, 2017YF0803806), 中央在京高校基本科研业务费(2019JKF221)资助

作者简介: 廉洁, 女, 1986年生, 中国人民公安大学侦查与刑事科学技术学院讲师 e-mail: rlianjie@163.com

* 通讯联系人 e-mail: yangruiqin@ppsuc.edu.cn

待测物作用,二者发生特异性结合,因其物理、化学性质的改变而引起荧光光谱的显著变化,从而可以通过直观的溶液颜色变化、荧光光谱改变等来判断待测物及其浓度信息,实现快速检测的目的。本文合成了小分子茈酰亚胺衍生物荧光探针,探针与 TNP 结合后形态变化,导致荧光光谱变化,可以通过分析荧光光谱来快速检测 TNP。该荧光探针水溶液的荧光光谱具有较高的选择性和稳定性,对 TNP 的检测灵敏度高,荧光光谱强度与 TNP 的浓度呈良好的线性关系,可实现 TNP 的快速定量分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SENS-9000 分子荧光光谱仪(北京卓立汉光仪器有限公司);DHG-9123A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DF-101S 集热恒温加热磁力搅拌器(长城科工贸有限公司);TGL-20B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);CP224S 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);10 mm 石英比色皿(江苏宜兴分析实验器件厂);50Conc 紫外-可见分光光度计(VARIAN);S210 pH 计(Mettler Toledo);KQ-3200DE 高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2,4,6-三硝基苯酚、2,4,6-三硝基甲苯、4-硝基苯酚、2,4-二硝基苯酚购于上海安谱实验科技股份有限公司;茈-3,4,9,10-四羧酸二酐、2-溴乙胺氢溴酸盐、咪唑、硝基苯、2,4-二硝基甲苯、4-羟乙基哌啶乙磺酸购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;苯酚、甲苯、氢氧化钠、氯化钠、氯化钾、氯化钡、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硝酸钠、硫酸钠、无水乙醇、二氯甲烷、甲醇、丙酮、四氢呋喃、二甲基亚砜、盐酸均为分析纯,购自北京化工厂;实验用超纯水取自 Millipore 超纯水系统。

1.2 荧光探针的制备

茈-3,4,9,10-四羧酸二酐(Perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic dianhydride, PDI)、2-溴乙胺氢溴酸盐和咪唑在圆底烧瓶中混合搅拌反应 7 h 后,冷却至 90 °C 无水乙醇清洗产物后,取下层粉末状沉淀固体干燥箱得到暗红色固体荧光探针 PDI-M。荧光探针中加入 0.01 mol · L⁻¹ 稀盐酸,用超纯水配制成 1 mmol · L⁻¹ 的荧光探针溶液,避光保存。

1.3 探针荧光光谱用于 TNP 的检测

使用 pH 5 磷酸盐缓冲溶液配制浓度为 10 μmol · L⁻¹ 的荧光探针溶液,在比色皿中观察并测定其荧光特性。配制荧光探针溶液(10 μmol · L⁻¹)与不同浓度的 TNP 标准溶液,在激发波长为 493 nm 条件下测定其荧光发射强度。

2 结果与讨论

2.1 探针的光谱特征

荧光探针 PDI-M 在不同激发波长下,其荧光光谱会有所不同,因此首先对荧光光谱的激发波长进行了探究。在荧光比色皿中,用荧光光谱仪对探针水溶液激发波长进行了考

察,在 493 nm 激发波长下溶液有较高的荧光强度,发射波长范围为 513~700 nm,其中最大发射波长为 547 nm,荧光发射光谱如图 1 所示。

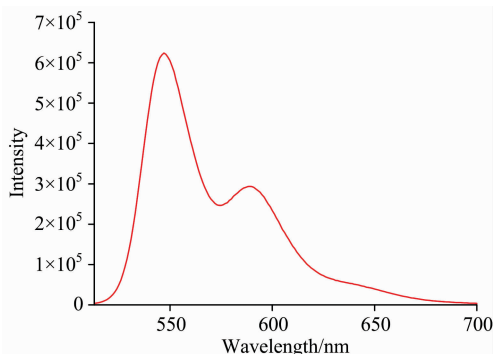


图 1 探针 PDI-M 溶液的荧光发射光谱

Fig. 1 Fluorescence emission spectrum of probe PDI-M in phosphate buffer solution

测定荧光探针溶液(10 μmol · L⁻¹)、TNP 溶液及 TNP 溶液和荧光探针溶液(10 μmol · L⁻¹)混合溶液的紫外可见光谱,如图 2。荧光探针 PDI-M 的最大吸收峰位置在 499 nm, TNP 溶液的最大吸收峰位置在 354 nm 处;混合溶液中 TNP 的存在,使得探针的吸收峰强度迅速减弱,同时混合物的紫外吸收峰发生红移,这应该是由溶液内分子空间结构发生变化所致。在更长的波长(约 511 nm)附近有新的宽肩线,可能是由于分散状态的探针转化为聚集态而产生的。

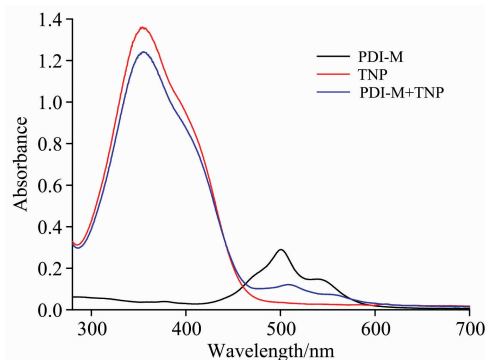


图 2 荧光探针缓冲溶液、TNP 溶液以及二者混合后的紫外可见吸收光谱

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of probe buffer solution, TNP solution and the mixture

本研究中使用的荧光探针 PDI-M 是阳离子型茈的衍生物,具有较大的刚性共轭基团,具有较大的电子离域体系,在酸性条件下其五元杂环基团能够接受质子而使探针带正电荷,进一步提高了探针的水溶性,正电荷间斥力使得探针分子间分散性较好,荧光效果较好。TNP 分子有硝基和酚羟基官能团,是具有吸电子效应的缺电子化合物,因酚羟基的存在在水溶液中以带负电荷的阴离子形式存在。当 TNP 分子和探针 PDI-M 在溶液中共同存在时,二者可在静电作用的驱动下,分子间不断相互靠近;同时由于分子间 π-π 作用与电子转移相互作用,整个体系的 π 电子结构重新分布,诱

导探针 PDI-M 从良好的分散状态转变为聚集态, 探针溶液内 π - π 堆积的生成, 导致了荧光的猝灭, 而达到检测 TNP 的目的。

2.2 常见芳香族化合物和阴阳离子对探针荧光光谱的影响

实验测试了常见硝基苯类化合物和阴阳离子对荧光探针检测的影响, 分别向 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光探针溶液中加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲苯 (MB)、硝基苯 (NB)、苯酚 (PHE)、2,4-二硝基甲苯 (DNT)、2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)、2,4-二硝基苯酚 (DNP) 和 4-硝基苯酚 (NP) 常见芳香族化合物和 Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} 和 NO_3^- 常见阴阳离子作为干扰物, 测定荧光探针体系的荧光光谱 [图 3(a)], 并且计算加入该物质前后探针溶液 547 nm 处的发射峰强度比值 I_0/I , 得到如图 3(b) 所示结果。

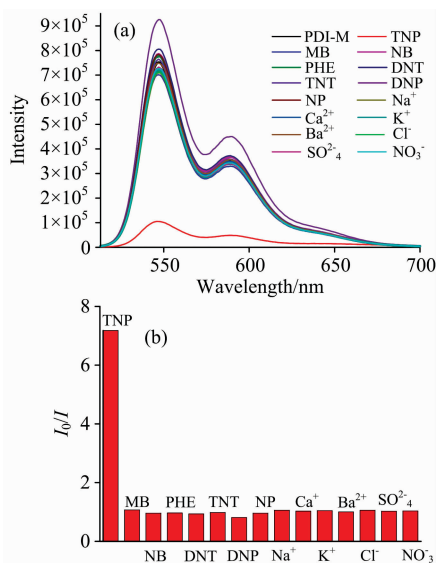


图 3 加入 TNP 以及一些干扰物作用后荧光探针体系的荧光光谱图 (a) 以及加入前后 547 nm 处的发射峰强度变化 (b)

Fig. 3 Fluorescence spectra of fluorescence probe system with TNP or several interfering compounds (a) and intensity changes of emission peak at 547 nm (b)

从图 3(a) 中可以看出探针的荧光光谱在加入甲苯 (MB)、硝基苯 (NB)、苯酚 (PHE)、2,4-二硝基甲苯 (DNT)、2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)、2,4-二硝基苯酚 (DNP) 和 4-硝基苯酚 (NP) 等常见芳香族有机物和 Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- 常见阴阳离子后基本没有变化, 探针对这些干扰物基本没有响应; 探针与 TNP 作用后荧光光谱有明显减弱。图 3b 中所有的干扰物加入前后的荧光探针体系发射强度比 I_0/I 值都很低, 均不超过 1.1, 而只有 TNP 的 I_0/I 值达到了 7.17; 其中, 2,4,6-三硝基甲苯 (TNT) 与 TNP 结构仅有甲基、酚羟基的区别, 2,4-二硝基苯酚 (DNP) 和 4-硝基苯酚 (NP) 这两个与 TNP 结构十分类似的干扰物仅减少了苯环上的硝基取代基, 从图 3 的结果看上述干扰物对 TNP 检测的荧光光谱也几乎没有影响, 表明荧光探针体系对 TNP 具有较高的选择性, 该荧光光谱用于 TNP 检测特异选择性好。

2.3 探针荧光光谱的稳定性

在浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光探针缓冲溶液中, 加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TNP 溶液, 立即记录荧光探针体系的荧光光谱随着时间的变化过程 (图 4)。在 TNP 加入之后, 在 30 s 时间内, 探针的荧光光谱在 547 nm 处的发射峰迅速下降并接近最低点, 在 1 min 后检测 I_{547} 值下降至最低点, 且溶液的荧光强度基本不再随着时间的变化而变化。通过这一实验表明, 该荧光探针体系与 TNP 的作用效率较高, 响应时间较短, 该荧光光谱稳定性好, 能够实现对 TNP 的快速检测。

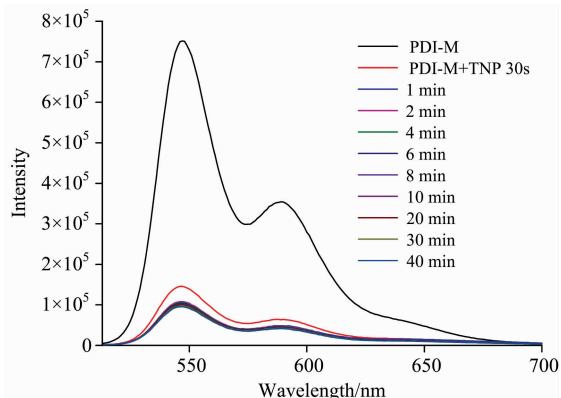


图 4 随反应时间变化的荧光探针体系荧光发射光谱
Fig. 4 Fluorescence emission spectra of fluorescence probe system with different reaction time

2.4 探针荧光光谱对 TNP 的检测

配制 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光探针缓冲溶液和一系列不同浓度的 TNP 3 mL, 493 nm 激发波长下测定荧光探针体系的荧光发射光谱, 进行 TNP 浓度与体系荧光强度变化的关系考察, 得到如图 5(a) 所示结果。由图可知, 荧光探针体系的发射光谱在 TNP 加入前后并未发生峰形的改变, 在 547 nm 处发射峰随着 TNP 浓度的增加而降低, 这是荧光猝灭的结果。随着 TNP 含量的增加, 547 nm 处发射峰的强度降低, 当 TNP 的浓度增加到 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的时候, 547 nm 处发射峰的强度已经下降了 86%, 表明荧光探针的荧光光谱对 TNP 具有很敏感的反应。如图 5(b) 所示, 在 TNP 浓度与 547 nm 处发射峰的强度 I_{547} 值的关系图中可以看到, 在 $20 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围之内, 发射光谱的发射峰强度 I_{547} 值与 TNP 的浓度 c 呈现出良好的线性关系, 其线性回归方程为 $I_{547} = 907\ 521.6 - 9\ 955c$, 线性相关系数 $R^2 = 0.992\ 1$, 计算得到 TNP 的检测限为 $4.55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)。由此可见, 在一定范围内荧光探针的荧光光谱吸收峰与 TNP 之间的相互作用具有良好的线性关系, 线性范围为 $4.55 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该荧光光谱可用于 TNP 溶液的定量分析。

2.5 使用荧光光谱检测模拟尘土中 TNP 的可行性

在 5 g 空白土壤中分别加入 0, 70, 100 和 150 μL 浓度为 $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TNP 母液, 之后向内加入 10, 9.93, 9.9 和 9.85 mL 的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光探针缓冲溶液 (pH 5 磷酸缓冲液), 上述待测尘土溶液的 TNP 浓度的理论值分别为 0, 35, 50 和 75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 将待测溶液涡旋振荡处理 3 min, 之后放入超声清洗器中超声处理 3 min, 最后以 6 000

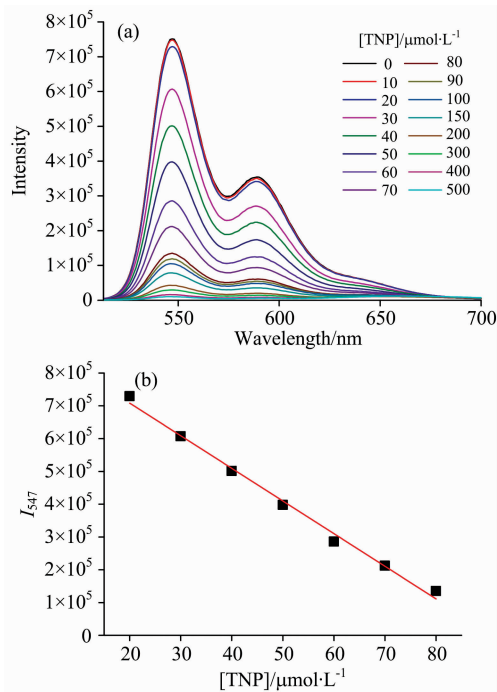


图 5 TNP 检测的荧光光谱 (a) 和 TNP 的浓度与 I_{547} 值的线性关系图 (b)

Fig. 5 Fluorescence spectra of TNP detection (a) and linear relationship between I_{547} values and concentration of TNP

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上层清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 有机滤膜进行抽滤, 所得滤液转移至样品瓶中, 493 nm 激发波长下测定滤液的荧光发射光谱 (图 6)。加标尘土的荧光探针荧光发射光谱图中, 混合溶液最强荧光发射峰仍然位于 547 nm 处, 与图 5 中一致, 说明探针的荧光光谱并没有受到尘土样品中其他干扰物质的影响而改变其性能, 能够稳定存在于待测样品

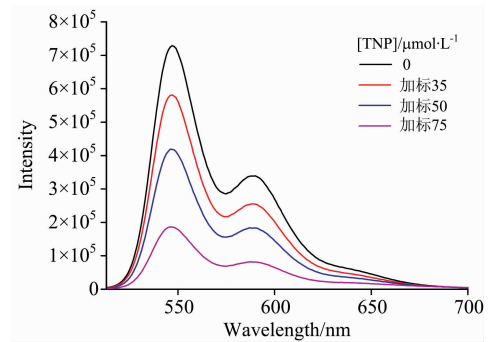


图 6 添加不同浓度 TNP 空白尘土的 TNP 检测荧光光谱图
Fig. 6 Fluorescence spectra of TNP detection with different TNP concentrations added in blank dust

溶液中; 同时, 随着加入 TNP 浓度的增大, 荧光光谱发射峰 (I_{547} 值) 不断降低, 待测溶液的荧光强度也越来越弱, 分析该荧光发射光谱可以实现对尘土中 TNP 含量的检测。

3 结 论

研究通过分析实验室制备荧光探针的光谱特性, 得到了可用于 TNP 检测的荧光发射光谱, 考察了检测常见干扰物对检测光谱的影响、荧光光谱的稳定性, 据此建立了基于荧光发射光谱的 TNP 快速检测体系。实验表明, 该荧光光谱对 TNP 检测的选择性好, 可在 1 min 达到稳定, 在 $4.55 \sim 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内荧光光谱发射峰强度 I_{547} 值与 TNP 的浓度 c 呈现出良好的线性关系, 据此拟合了线性回归方程, 该荧光光谱可用于 TNP 定量检测。研究还考察了利用荧光光谱检测尘土样品的可行性, 实验表明荧光光谱检测没有受到尘土基质的干扰, 该方法可以用于尘土中 TNP 的定量分析, 具有一定的实际应用价值。

References

- [1] REN Yi-fei, HAO Hong-xia, YANG Rui-qin(任翼飞, 郝红霞, 杨瑞琴). Forensic Science and Technology(刑事技术), 2018, 43(2): 104.
- [2] Forbes T P, Siscoa E. Analyst, 2018, 143: 1948.
- [3] LIU Li-ping, YE Shang-hui, HUANG Wei(刘丽萍, 叶尚辉, 黄 维). Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学), 2017, 34(1): 1.
- [4] Lv X J, Qi L, Gao X Y, et al. Talanta, 2016, 150: 319.
- [5] Marder D, Tzanani N, Priheda H, et al. Analytical Methods, 2018, 10: 2712.
- [6] Rapp-Wright H, McEneff G, Murphy B, et al. Journal of Hazardous Materials, 2017, 329: 11.
- [7] Liyanage T, Rael A, Shaffer S, et al. Analyst, 2018, 143: 2012.
- [8] Jamil A K M, Sivanesan A, Izake E L, et al. Sensors & Actuators B Chemical, 2015, 221: 273.
- [9] Jiang J L, Zou S M, Ma L W, et al. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018, 10(10): 9129.
- [10] Yao Z, Qiao Y, Liang H, et al. Analytical Chemistry, 2016, 88: 10605.
- [11] Liang H, Yao Z, Ge W, et al. RSC Advances, 2016, 6(44): 38328.
- [12] Jung H S, Verwilt P, Kim W Y, et al. Chem. Soc. Rev., 2016, 45: 1242.

Rapid Detection System of 2,4,6-Trinitrophenol (TNP) Based on Fluorescent Probe

LIAN Jie¹, REN Yi-fei², YANG Rui-qin^{1*}, HAO Hong-xia³

1. School of Investigation and Forensic Science, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China

2. School of Information Technology and Cyber Security, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China

3. Key Laboratory of Evidence Science, University of Political Science and Law, Beijing 100192, China

Abstract The rapid detection of 2,4,6-trinitrophenol (TNP) has attracted more and more attention in recent years, due to its powerful explosive hazard and environmental toxicity. In this study, TNP fluorescent probe based on perylene imide was synthesized by one-step synthesis, and the rapid detection of TNP was realized by the fluorescent spectra of the probe. The fluorescence characteristics were investigated, and the fluorescence intensity was high in aqueous solution, stimulated at 493 nm at the emission wavelength of 547 nm. The emission spectra of the fluorescent probe system decreased obviously after the interaction with TNP, which might be due to the fluorescence quenching after the combination of the fluorescent probe and TNP, changing the aggregation state. The fluorescence changes of the probe system after the interaction with TNP could also be observed under the 365 nm handheld ultraviolet lamp, and the results could also be judged by naked eye. In the experiment, different concentrations of TNP solution were tested and the fluorescence spectra analysis showed that TNP had good quenching effect on the fluorescent probe system. The fluorescence intensity of the probe system at 547 nm, I_{547} value, presented a good linear relationship in the concentration of 20~80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with the regression equation of $I_{547} = 907.521 - 9.955c (R^2 = 0.9921)$, and the detection limit was calculated to be 4.55 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The fluorescence spectra of the probe were stable after 1 minute of interaction with TNP and the response time was short. The fluorescence spectra of the probe were not affected by structure-like interfering compounds, such as phenol (PHE), 2,4-dinitrotoluene (DNT), 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), 2,4-dinitrophenol (DNP), 4-nitrophenol (NP) and common anions and cations (Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-). The interference of the dust matrix on fluorescence spectra was also investigated. Simulated explosive dust samples with TNP were made in the laboratory and fluorescence spectra were detected by the fluorescent probe system. The experiment showed that the fluorescence spectra of the probe and the interaction with TNP are not disturbed by dust. The fluorescence emission spectra can be applied to the quantitative analysis of TNP in dust and has good practical application prospects.

Keywords 2,4,6-trinitrophenol (TNP); Water soluble fluorescence probe; Fluorescence emission spectra; Fluorescence quenching

(Received Jan. 30, 2019; accepted May 11, 2019)

* Corresponding author