DOI:10.19789/j.1004-9398.2024.03.009
文献引用:尹欣越,邓心怡,相玉红,等.非共轭聚合物点和Eu^{3+}的比率荧光传感器检测牛奶中的四环素[J].首都师范大学学报(自然科学版),2024,45(3):97-107. YIN X Y, DENG X Y, XIANG Y H, et al. Detection of tetracycline in milk by ratio fluorescence sensor based on non-conjugated polymer dots and Eu^{3+}[J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition),2024,45(3):97-107.

非共轭聚合物点和Eu^{3+}的比率荧光传感器检测牛奶中的四环素*

尹欣越，邓心怡，相玉红**，叶能胜**
（首都师范大学化学系，北京 100048）

摘要:四环素(TC)因其广谱抗菌活性和低廉的价格被广泛应用于畜牧养殖业治疗及预防相关细菌感染,因其难以代谢而残留在动物源性食品中,影响人类健康,因此建立方便快捷的TC检测方法至关重要。本文以高支化聚乙烯亚胺(PEI)和抗坏血酸(AA)为原料,合成了一种水溶性良好且具有高稳定性蓝绿色荧光的非共轭聚合物点(NCPDs),其通过与Eu^{3+}和柠檬酸三钠的简单混合构建了检测TC含量的比率荧光探针。TC既可以通过内滤效应淬灭NCPDs在490 nm处的蓝绿色荧光,也可以通过Eu^{3+}的天线效应增敏Eu^{3+}在618 nm处的红色荧光。二者荧光强度的比值与TC的含量具有良好的线性关系。该方法具有快速的荧光响应,较宽的线性范围50.0 nmol/L~80.0 μmol/L和较低的检出限11.8 nmol/L,并且该比率荧光传感器成功地测定了牛奶样品中的TC。

关键词:非共轭聚合物点;比率荧光传感器;天线效应;内滤效应;四环素
中图分类号:O65 **文献标志码**:A

Detection of tetracycline in milk by ratio fluorescence sensor based on non-conjugated polymer dots and Eu^{3+} *

YIN Xinyue, DENG Xinyi, XIANG Yuhong**, YE Nengsheng**
(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract: In order to treat and prevent related bacterial infections, tetracycline (TC) is widely used in animal husbandry and breeding industry due to its broad-spectrum antibacterial activity and low price. Because TC is difficult to be metabolized and its residues in animal derived foods cause harm to human health. Therefore, it is crucial to establish a convenient and fast detection method for TC. In this work, a non-conjugated polymer dots (NCPDs) with good water solubility and high stability blue-green fluorescence were synthesized based on high branched polyethylene imine (PEI) and ascorbic acid (AA). The ratio fluorescence probe for detecting TC content was constructed by simple mixing NCPDs with $Eu^{3+}$and sodium citrate dihydrate. TC can quench the blue-green fluorescence of NCPDs at 490 nm through internal filtering effect, and can also sensitize the red fluorescence of Eu^{3+} at 618 nm through the antenna effect of Eu^{3+}. The ratio of fluorescence intensity of 618 and 490 nm has a good linear relationship with the concentration of TC. The method has a rapid fluorescence response with a wider

收稿日期:2023-10-11
* 北京市教育委员会科研计划项目(KM202010028006)
** 通信作者:yensh@cnu.edu.cn;xiangyh@cnu.edu.cn

linear range of 50.0 nmol/L to 80.00 μmol/L and a lower limit of detection of 11.8 nmol/L, and the ratiometric fluorescence sensor successfully determined the TC in the milk sample.

Keywords: non-conjugated polymer dots; ratiometric fluorescence sensor; antenna effect; inner filter effect; tetracycline

CLC: O65 **DC**: A

0 引 言

四环素(tetracycline,TC)是一种具有广谱抗菌特性的抗生素,因生产成本低而被广泛用于水产养殖、农业、兽医和人类医疗等领域[1-2],其产量和使用量大于其他抗生素。然而,过度的使用TC会造成其在动物源性食品和环境中的残留,且因其在环境中不易降解,通过食物链累积进入人体进而对人类健康产生负面影响[3-4]。因此,设计一种简捷高效的方法定量检测动物源性食品中的TC至关重要。

目前,TC的检测方法主要包括高效液相色谱法[5]、液相色谱-串联质谱法[6-7]、酶联免疫法[8]、毛细管电泳法[9]、电化学分析法[10-11]、比色法[12-13]和荧光分析法[14]等。与其他方法相比,荧光分析法具有操作简单、灵敏度高、反应迅速且仪器易得而被广泛用于小分子检测中。到目前为止,基于TC检测所设计的荧光传感器大多基于单发射波长产生的荧光强度变化,因可能受环境温度、电压强度和仪器仪表等因素微小的变化,影响实际应用中的可靠性。与单波长荧光信号相比,比率式荧光传感器是一种新的检测方式,其以2个不同波长发射峰位置的荧光强度之比作为响应信号来确定目标的含量,并且可以提供内置信号的自我校准,实现更准确地测定[15]。

现如今,许多荧光团应用于TC传感。Pavithra等[16]用CdS量子点检测水和牛奶中的TC;Mili等[17]以ZnS量子点作为荧光传感器定量检测TC;Chang等[18]报道了硫量子点检测TC的方法。然而,这些常见的荧光探针由于其毒性高、工艺复杂、水溶性差和光稳定性差等缺点而应用受到限制。

荧光聚合物点是一类新兴的荧光纳米材料,因其潜在的应用而备受关注[19]。根据合成的前体分子的化学结构,聚合物点(polymer dots,PDs)被分为共轭聚合物点(conjugated polymer dots,CPDs)和非共轭聚合物点(non-conjugated polymer dots,NCPDs)[20]。由于水溶性差和高毒性,PDs在实际应用中往往受到限制。现有研究近年来已证实一些具有出色的水溶性和生物相容性的NCPDs[21-22]。NCPDs具有的交联增强发射效应使其表现出了优异的荧光性能[23]。Zhu等[24]报道了超支化聚乙烯亚胺(polyethyleneimine,PEI)含有仲胺和叔胺,其是潜在的荧光团。由于在这种存在交联的NCPDs中PEI基团振动和旋转的减少,能够导致NCPDs荧光的增强。NCPDs制备简单且表面有丰富的官能团,能够很容易地被修饰,并具有良好的光学特性,是构成生物传感器的良好荧光纳米材料。

镧系金属离子(lanthanide metal ions,Ln^{3+})具有优良的荧光特性,如较大的斯托克斯位移、宽频带区域和清晰的发射光谱,这为荧光传感器的应用提供了巨大的潜力[25-26]。游离Ln^{3+}的荧光通常被O—H键引起的激发态的失活淬灭[27]。然而,引入有机配体却可敏化Ln^{3+}的荧光。Ln^{3+}的荧光是由有机配体通过非辐射跃迁有效地将能量转移到Ln^{3+}的激发态,并产生具有大斯托克斯位移的宽频带发射光谱。因此,通过对Ln^{3+}的荧光增敏,可以设计不同目标物的检测方法。据报道,TC是增敏Ln^{3+}荧光的理想化合物,因其具有一个β-二酮结构,可以与Ln^{3+}如Eu^{3+}配位发射Eu^{3+}的强特征光[28]。

综上所述,本文用PEI和L-抗坏血酸(L-ascorbic acid,AA)合成了一种具有水溶性的NCPDs,即PEI-AA NCPDs,其表现了优异的光学性能和良好的稳定性,通过将PEI-AA NCPDs与Eu^{3+}结合,制备了PEI-AA/Eu^{3+}比率荧光探针,在TC存在的情况下,PEI-AA NCPDs在490 nm处的蓝绿色荧光因内滤效应(inner filter effect,IFE)而降低,天线效应(antenna effect,AE)增敏Eu^{3+}在618 nm处的红色荧光,从而根据二者的荧光比值(F_{618}/F_{490})可对TC定量检测。当该比率荧光传感器对TC进行检测时,不同波长荧光信号的响应会导致明显的荧光颜色变化,本文基于此设计了一种便携式试纸用于TC的视觉检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超支化聚乙烯亚胺和硝酸铕($Eu(NO_3)_3$)购自

上海麦克林工业公司;TC、金霉素(chlortetracycline,CTC)、氯霉素(chloramphenicol,CHL)、土霉素(oxytetracycline,OTC)、链霉素(streptomycin,STR)、L-半胱氨酸(L-cysteine,Cys)、L-丝氨酸(L-serine,Ser)和溶菌酶(lysozyme,Lys)均购自上海阿拉丁工业公司;牛血清白蛋白(bovine albumin,BSA)购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司;AA、L-色氨酸(L-tryptophan,Try)和L-精氨酸(L-arginine,Arg)购自北京百得生物科技有限公司;KCl、$MgCl_2$、$ZnCl_2$、$CaCl_2$、$CuCl_2$、葡萄糖(glucose,Glu)和柠檬酸三钠(sodium citrate dihydrate,CitNa)购自国药化学试剂有限公司;HCl购自北京市通广精细化工公司;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(tris-(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride,Tris-HCl)购自太阳生物科技有限公司;牛奶购自生活超市。实验用水均为超纯水。

使用美国赛默飞世尔科技公司生产的Lumina型荧光光谱仪和Evolution 300型紫外分光光度计分别测量溶液的荧光光谱和紫外-可见吸收光谱,荧光激发波长为360 nm;利用日本日立公司生产的H-7650透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)分析样品形貌;使用英国马尔文仪器有限公司生产的纳米粒度电位仪检测样品的水合粒径与电位;采用英国爱丁堡公司制造的FLS920荧光分光光度计测量PEI-AA NCPDs加入不同TC后的寿命变化;使用上海三信沛瑞仪器科技有限公司生产的PHS-3C型pH计测定溶液pH;利用湖南湘仪实验室仪器开发有限公司制造的H 1650规格离心机离心溶液;使用美国默克密理博公司生产的Milli-Q系统净化实验用水。

1.2　PEI-AA NCPDs制备

参考Chen等[29]的方法合成PEI-AA NCPDs。取500 mg PEI,用H_2O稀释至5.0 mL,配制成0.10 g/mL的PEI溶液,在连续搅拌的条件下将16 mg AA加入到PEI溶液中;搅拌均匀后,向混合溶液中加入6.0 mol/L的HCl溶液,调节反应体系的酸碱度至pH 5.0,室温下连续搅拌12 h;使用超滤管透析反应液后,将制备好的棕黄色PEI-AA NCPDs溶液储存在4 ℃冰箱,备用。

1.3　条件优化

1.3.1　Eu^{3+}物质的量浓度的优化

在120 μL pH 8.0的Tris-HCl缓冲液中加入20 μL PEI-AA NCPDs、20 μL不同物质的量浓度的$Eu(NO_3)_3$溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0和4.5 mmol/L),加H_2O定容至200 μL,监测荧光强度变化。

1.3.2　CitNa物质的量浓度的优化

在120 μL pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、20 μL PEI-AA NCPDs、20 μL 2.0 mmol/L的$Eu(NO_3)_3$溶液和20 μL 0.5 mmol/L的TC的基础上加入20 μL不同物质的量浓度的CitNa溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0和3.5 mmol/L),监测其荧光强度变化。

1.3.3　pH优化

120 μL pH 6.5的Tris-HCl缓冲液、20 μL PEI-AA NCPDs、20 μL 2.0 mmol/L的$Eu(NO_3)_3$溶液、20 μL 2.0 mmol/L的CitNa溶液和20 μL H_2O作为空白样品;120 μL pH 6.5的Tris-HCl缓冲液、20 μL PEI-AA NCPDs、20 μL 2.0 mmol/L的$Eu(NO_3)_3$溶液、20 μL 2.0 mmol/L的CitNa溶液和20 μL 0.5 mmol/L的TC作为对照;对比二者荧光强度变化。改变上述步骤Tris-HCl缓冲液的pH,分别比较pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5和pH 9.0的荧光强度变化。

1.3.4　时间优化

向离心管中加入120 μL pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、20 μL PEI-AA NCPDs、20 μL 2.0 mmol/L的$Eu(NO_3)_3$溶液、20 μL 2.0 mmol/L的CitNa溶液和20 μL 0.5 mmol/L的TC,监测一段时间内的荧光强度变化。

1.4　标准溶液中TC检测

在120 μL Tris-HCl缓冲液中加入20 μL PEI-AA NCPDs、20 μL 2.0 mmol/L的$Eu(NO_3)_3$和20 μL 2.0 mmol/L的CitNa溶液作为标准溶液,然后向其中加入20 μL不同物质的量浓度(50.0 nmol/L,0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、60.0、80.0和90.0 μmol/L)的TC;搅拌均匀后,室温孵育1 min;测量样品溶液的荧光发射光谱,同时记录490和618 nm的荧光强度,计算F_{618}/F_{490}。

1.5　牛奶样品中TC检测

为了探索牛奶中可能含有的组分和抗生素对检测TC的干扰,以考察体系的选择性。牛奶中的可能组分包括金属离子(如K^+、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}和Zn^{2+}等)、葡萄糖(Glu)、蛋白质(BSA)和氨基酸(Try、Ser、Cys、Arg和Lys),抗生素包括(OTC、CTC、STR和CHL)。TC、OTC和CTC的物质的量浓度为40.0 μmol/L,其他干扰物物质的量浓度为0.4 mmol/L。取2.0 mL牛奶加入到含500 μL 3.00%醋酸的离心管中;摇匀离心,离心速度为10 000 r/min、离心半径

为5 cm、离心时间为10 min;取上清液加入Tris-HCl缓冲液至体积为100 mL,4 ℃储存备用。

为了探究基于PEI-AA/Eu^{3+}的比率荧光传感器是否能够成功应用于实际样本,在最佳实验条件下,采用上述方法对含有4个不同含量的TC牛奶加标样本进行了定量检测。分别取20 μL 0.5、10.0、40.0和70.0 μmol/L的TC标准品加入上述牛奶样品中,混匀后,分别测量实际样品溶液的荧光光谱。

1.6　纸基荧光传感器制备

在最佳实验条件下,为了提高传感器的便携性,开发了TC的纸基荧光传感器试纸。首先,将600 μL pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、100 μL PEI-AA NCPDs、100 μL 2.0 mmol/L的$Eu(NO_3)_3$溶液和100 μL 2.0 mmol/L的CitNa溶液加入到一个干净的培养皿中,然后将直径8 mm的圆形滤纸完全浸泡在培养皿中。10 min后取出滤纸,烘干,储存在干燥的环境中,用于后续实验。取干燥的滤纸,滴加不同物质的量浓度的TC(0~80.0 μmol/L),可以观察到滤纸的颜色在365 nm紫外光下发生了变化。用手机拍照记录,使用Adobe Photoshop来获取每张图像中心的红(*R*)、绿(*G*)和蓝(*B*)的色值。

2　结　果

2.1　微观结构分析

PEI-AA NCPDs的表征结果如图1所示。TEM扫描结果表明PEI-AA NCPDs呈均匀分布的球形纳米点,粒径分布结果显示其平均粒径约为6 nm。

2.2　XPS分析

PEI-AA NCPDs的组成元素和化合价态结果如图2所示。XPS能谱表明Eu^{3+}与PEI-AA成功配位;因与PEI-AA(400.1 eV)相比,PEI-AA/Eu^{3+}中的N 1s峰(400.5 eV)出现在一个较高的结合能上,其可以进一步解卷积为2个峰(图2(b)),分别对应—NH_2和N与Eu^{3+}的配位键[30]。

2.3　可行性分析

不同物质的紫外-可见光谱和荧光光谱如图3

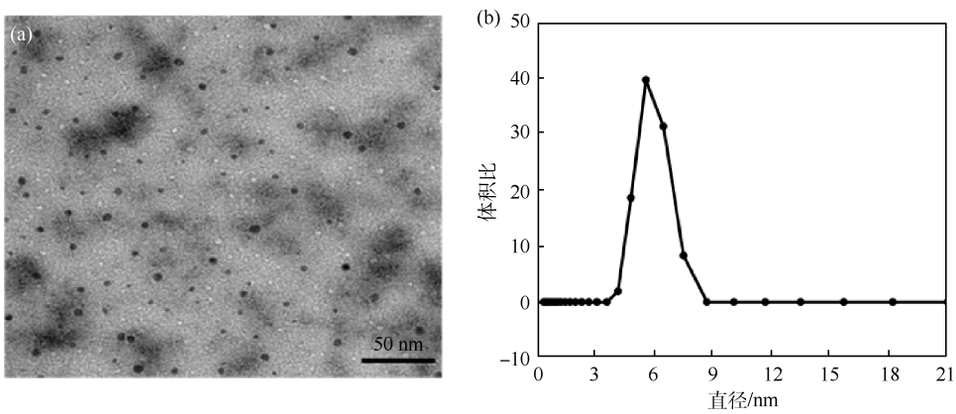


图1　聚乙烯亚胺-L-抗坏血酸非共轭聚合物点(PEI-AA NCPDs)的表征结果
(a)透射电子显微镜(TEM)图;(b)粒度分布

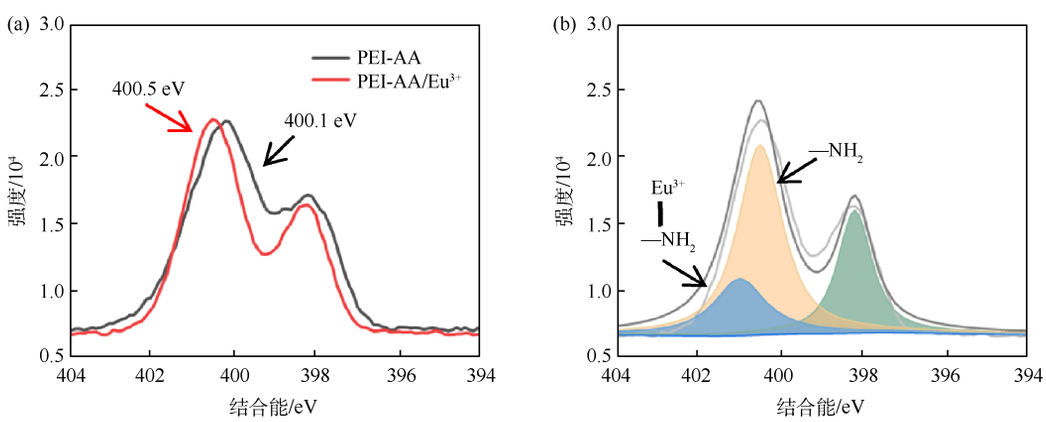
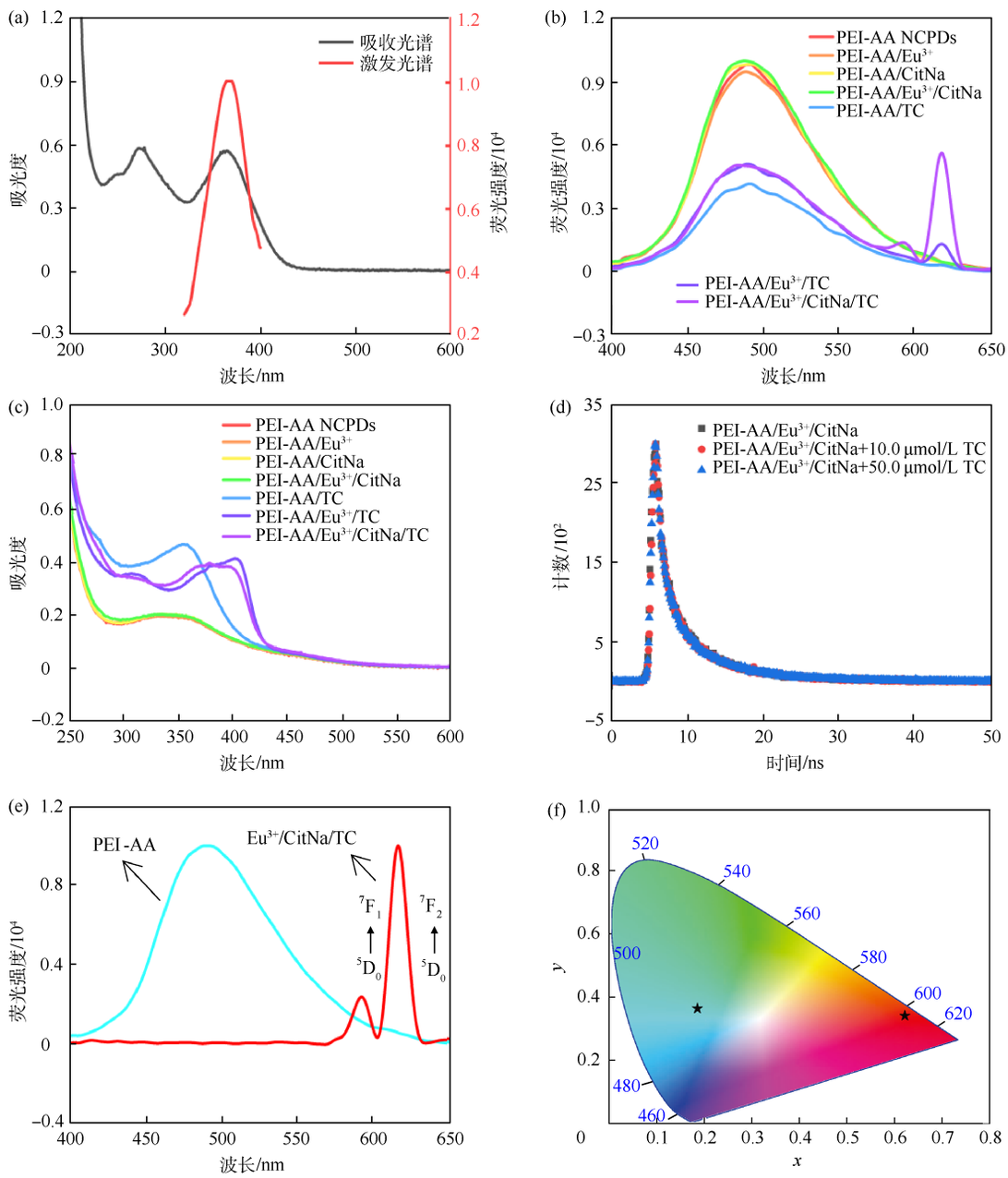


图2　PEI-AA NCPDs的X射线光电子能谱(XPS)
(a)全谱;(b) N 1s的XPS光谱

所示。吸收光谱和激发光谱结果表明,TC 的紫外-可见吸收峰位于 360 nm 处,与 PEI-AA NCPDs 的荧光激发光谱有很大的重叠;荧光光谱结果表明,Eu^{3+}和 CitNa 对 PEI-AA NCPDs 的荧光几乎没有影响;吸收光谱结果表明,加入 Eu^{3+}后,TC 的吸收峰出现了明显的红移;检测荧光寿命,加入不同物质的量浓度的 TC 后,混合物的荧光寿命基本上没有改变;发射光谱结果表明,PEI-AA NCPDs 的荧光发射光谱出峰位置在 490 nm 处,Eu^{3+}/CitNa/TC 的出峰位置在 618 nm 处;色度结果表明,随着加入不同浓度的 TC,色度图显示整个体系从 PEI-AA NCPDs 主导的蓝绿色荧光向 Eu^{3+}敏化增强的红色荧光改变。

2.4　检测 TC 的条件优化

检测 TC 的条件优化过程如图 4 所示。Eu^{3+}物质的量浓度优化表明,PEI-AA NCPDs 的荧光强度随着 Eu^{3+}浓度的增加几乎没有变化。考虑到 Eu^{3+}浓度与线性范围的关系以及成本的原因,在后续实验中选择了 0.2 mmol/L 的 Eu^{3+}构建比率荧光传感器。



注:PEI-AA 为聚乙烯亚胺-L-抗坏血酸;TC 为四环素;CitNa 为柠檬酸三钠。

图 3　PEI-AA/Eu^{3+}/TC 体系的可行性分析

(a)吸收光谱和激发光谱;(b)荧光光谱;(c)吸收光谱;(d)荧光寿命;(e)发射光谱;(f)色度图

CitNa物质的量浓度优化结果表明,CitNa可以有效地增敏Eu^{3+}的荧光,因此对加入体系的CitNa浓度进行了优化。随着CitNa物质的量浓度(0~0.4 mmol/L)的增加,F_{618}/F_{490}逐渐增大;当CitNa物质的量浓度为0.2 mmol/L时,F_{618}/F_{490}达到平衡。因此,选择0.2 mmol/L的CitNa进行后续研究。随后,探讨了pH值对实验的影响。用Tris-HCl缓冲溶液调节体系的pH(6.5~9.0)。在pH 8.0时获得了最佳的F_{618}/F_{490}(图4(c))。因此,后续实验的最佳酸碱度为pH 8.0。孵育时间(0~10 min)对荧光比值的影响结果表明,F_{618}/F_{490}在反应1 min后达到最大并趋于平衡。

2.5　标准样品中TC检测

在上述最佳实验条件下TC的定量检测结果如图5所示。测量并收集了加入不同物质的量浓度TC时PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa/TC的荧光光谱。在50.0 nmol/L~90.0 μmol/L时,F_{618}/F_{490}随着TC物质的量浓度的增大而增加。F_{618}/F_{490}与TC物质的量浓度(50.0 nmol/L~80.0 μmol/L)具有良好的线性关系,为y_1=0.054 58c+0.081 32,R^2=0.997,式中:y_1为F_{618}/F_{490}的值;c为TC物质的量浓度。根据检出限计算公式,本方法的检出限为11.8 nmol/L。同时在365 nm的紫外灯照射下,PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa探针的颜色随着TC物质的量浓度的增加从蓝绿色明显转化为红色(图5(b)的插图)。

不同荧光探针测定TC的比较结果列于表1[31-38]。本方法与比率型、开关型和关开型等荧光探针进行了比较,检出限水平(11.8 nmol/L)与其他方法相当,但检测范围较宽(50.0 nmol/L~80.0 μmol/L),且本文提出的方法可用于可视化检测。

不同检测方法测定TC的比较结果列于表2[7,9,11,39-43]。本方法与比色、高效液相色谱、电化学、毛细管电泳以及其他荧光方法比较,检出限仅次于电化学法,优于其他方法,且此荧光探针具有较宽的线性范围以及较低的检出限。

2.6　PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa探针对TC检测的选择性

不同干扰物质对PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa比率荧光传感器检测结果如图6所示。大多数干扰物质对比率荧光传感器几乎没有荧光响应,F_{618}/F_{490}均<0.1,而CTC和OTC的F_{618}/F_{490}=1.4和0.4,显示了比较弱的荧光响应。这是由于TC类抗生素包括TC、CTC和OTC具有相似的化学结构和紫外吸收光谱。OTC和CTC都可以通过触发AE和IFE有不同程度的荧

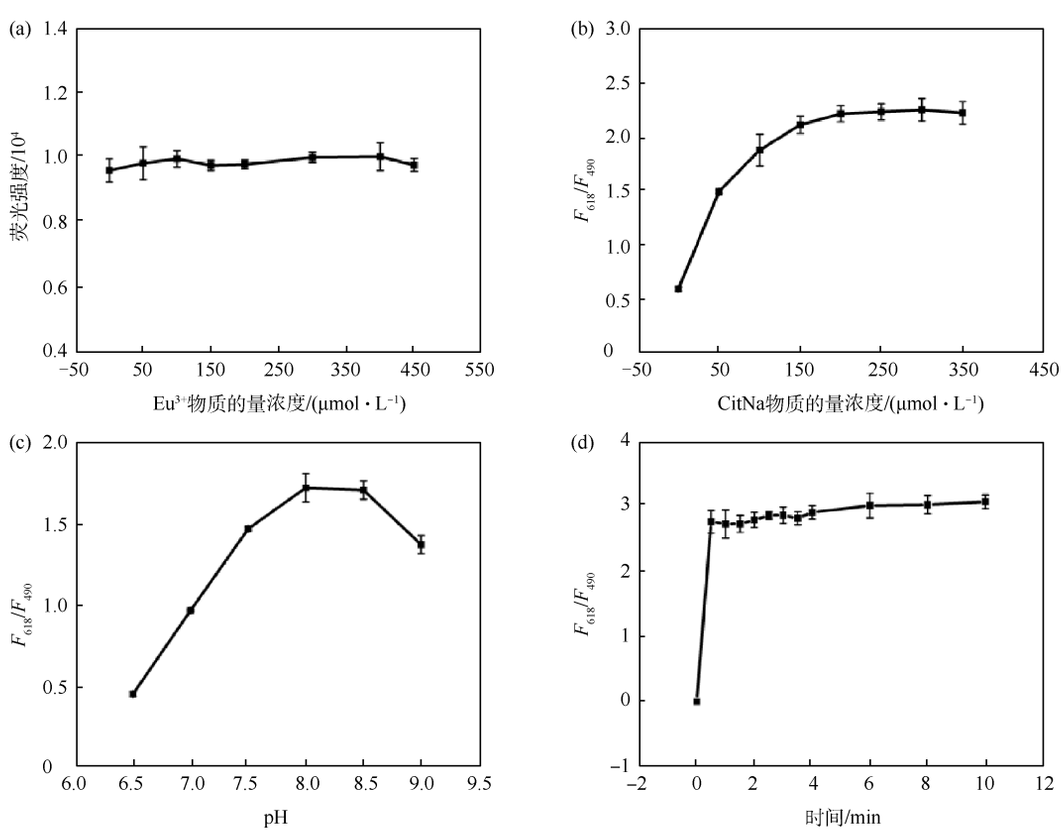
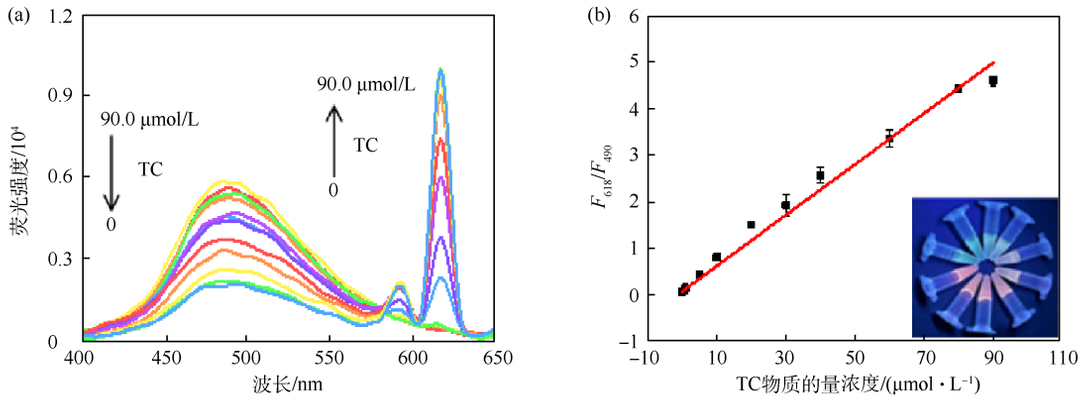


图4　检测TC的条件优化

(a)Eu^{3+}物质的量浓度;(b)CitNa物质的量浓度;(c)pH;(d)孵育时间



注:插图为比率荧光传感器在 365 nm 紫外光下 TC 不同物质的量浓度的荧光照片。

图 5　PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa 比率荧光传感器与 TC 物质的量浓度的线性相关性

(a)荧光光谱;(b)TC 物质的量浓度与 F_{618}/F_{490} 的相关性

表 1　不同荧光探针测定 TC 的比较

荧光探针	类型	线性范围	检出限/(nmol·L^{-1})	样品	可视化应用	参考文献
Eu-in-BTEC	比率型	0~6.0 μmol/L	250.0	鱼肉、尿液	否	[31]
SiO_2 -AF@MIPs	开关型	0~150.0 nmol/L	4.26	注射药剂	否	[32]
W_xO_y QD	开关型	0~50.0 μmol/L	19.0	牛奶、奶粉	否	[33]
Laponite-Eu-Cit	比率型	0~7.0 μmol/L	9.5	牛奶、蜂蜜、湖水	是	[34]
SiQDs-Cit-Eu	比率型	5.0×10^{-3}~7.0 μmol/L	7.1	湖水、自来水、蜂蜜	是	[35]
AMP/Eu-Cit	关开型	0.1~20.0 μmol/L	60.0	牛奶	否	[36]
CDs@HZIF-8	比率型	0.5~50.0 μmol/L	6.56	牛奶	否	[37]
AuCuNCs@MOF	比率型	20.0~650.0 nmol/L	4.8	牛奶	否	[38]
PEI-AA/Eu/Cit	比率型	50.0 nmol/L~80.0 μmol/L	11.8	牛奶	是	本工作

表 2　不同 TC 检测方法比较

检测方法	线性范围	检出限	样品	参考文献
比色法	1.5~30.0 μmol/L	200.0 nmol/L	血清	[39]
比色法	50.0~1 000.0 nmol/L	45.0 nmol/L	药片	[40]
比色法	1.0~1 000.0 μg/L	500.0 ng/L	牛奶、鱼肉	[41]
高效液相色谱法	1.25~500.0 μg/kg	374.0 ng/kg	蜂蜜	[7]
高效液相色谱法	50.0~500.0 μg/L	21.0 μg/L	牛奶	[42]
电化学法	5.0~120.0 μmol/L	1 150.0 nmol/L	水、牛奶、药片	[11]
电化学法	0.1~5 000.0 pmol/L	21.0 fmol/L	牛奶、鱼肉	[43]
毛细管电泳法	30.0~5 000.0 μg/L	8 130.0 ng/L	自来水	[9]
荧光法	50.0 nmol/L~80.0μmol/L	11.8 nmol/L	牛奶	本工作

光响应。由于官能团的数量、空间等因素的差别,CTC 对 TC 的定量检测影响不大。然而,因 OTC 与 TC 具有高度相似的结构,会对 TC 的检测造成一定的干扰。幸运的是,在实际应用中,具有类似抗菌能力的同种抗生素如 TC 和 OTC 一般不会同时使用。

2.7　牛奶样品分析

对牛奶样品进行了 4 个不同水平 TC 的加标实验,其回收率和相对标准偏差检测结果如表 3 所示。TC 的加标回收率为 100.00%~115.80%,相对标准偏差为 0.03%~1.08%。结果表明,该比率荧光传感器适用于牛奶样品中 TC 的检测,在实际中有较大应用潜力。

2.8　TC 可视化检测

不同物质的量浓度 TC 可视化检测如图 7 所示。当 TC 物质的量浓度很低(0.5 μmol/L)时,滤纸显示出聚合物点特有的蓝绿色的荧光,这也表明 PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa 比率荧光探针被成功固定在滤纸上。

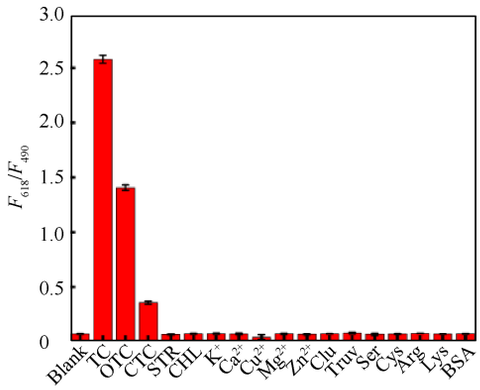


图6　不同干扰物质对PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa比率荧光传感器检测结果对比

表3　检测加标牛奶样本中的TC水平及其回收率和相对标准偏差(n=3)

加入量/(μmol·L^{-1})	测得量/(μmol·L^{-1})	回收率/%	相对标准偏差/%
0	0	—	—
0.5	0.51	102.00	0.03
10.0	11.58	115.80	0.12
40.0	42.11	105.30	0.94
70.0	70.04	100.00	1.08

注:—指无数据。

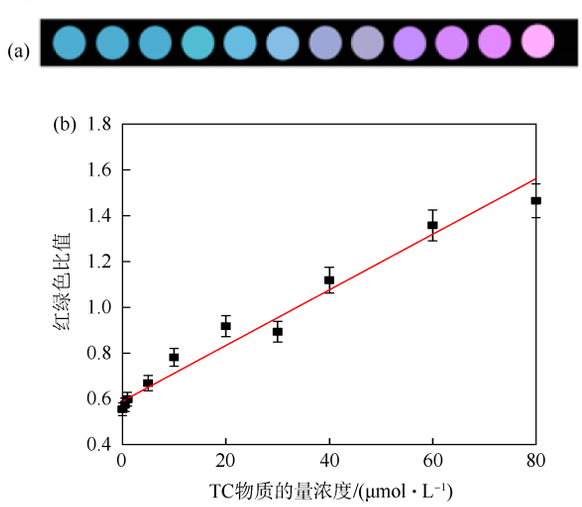


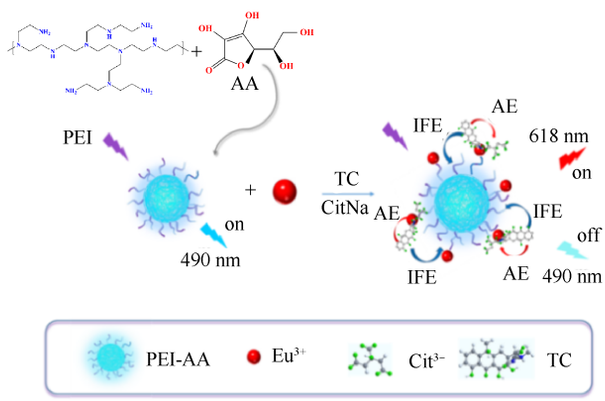
图7　不同物质的量浓度TC在紫外灯下的荧光变化
(a)颜色变化;(b)线性相关性

随着TC物质的量浓度的增加,可以清楚地观察到试纸的颜色从蓝绿色变为红色。TC物质的量浓度可以通过图像颜色的R和G的比值来计算。TC物质的量浓度与R和G的比值具有良好的线性关系,y=0.011 6c+0.607 6,R^2=0.981,式中:y为R和G的比值。表明基于试纸的TC快速半定量测定是可行的。

3　讨　论

3.1　原理推测

基于PEI-AA/Eu^{3+}的比率荧光传感器检测TC的原理推测如图8所示。PEI-AA NCPDs表面有大量的—NH_2,可以与Eu^{3+}相结合。基于PEI-AA NCPDs与TC之间的IFE,PEI-AA NCPDs在490 nm处的蓝绿色荧光可以被淬灭,而TC可以在CitNa的帮助下通过AE增强Eu^{3+}在618 nm处的红色荧光。因此,基于PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa比率荧光传感器的可以成功构建并能用于TC的定量检测。



注:IFE为内滤效应;AE为天线效应。

图8　基于PEI-AA/Eu^{3+}的比率荧光传感器检测TC的原理

3.2　原理分析

TC的紫外-可见吸收峰与PEI-AA NCPDs的荧光激发光谱有很大的重叠。因此,TC可以淬灭PEI-AA NCPDs的荧光。由于Eu^{3+} $^5D_0\rightarrow{}^7F_2$、$^5D_0\rightarrow{}^7F_1$和$^5D_0\rightarrow{}^7F_0$跃迁都是被禁止的[44],因此自由的Eu^{3+}不显示荧光。当配体的激发三重态的能级高于Eu^{3+}的$^5D_0$能级时,TC配体可以作为一个“天线”运行,将所吸收的能量转移到Eu^{3+},导致Eu^{3+}的荧光被敏化。这个过程被称为AE[45-46]。TC含有β-二酮结构,可以与Eu^{3+}特异性结合,伴随着能量转移,使得Eu^{3+}的荧光增强。因此,Eu^{3+}和PEI-AA NCPDs都可作为TC的识别单元,构建比率荧光传感器。

荧光光谱结果显示Eu^{3+}和CitNa对PEI-AA NCPDs的荧光几乎没有影响。当向PEI-AA/Eu^{3+}体系中引入TC时,在618 nm处出现了Eu^{3+}的特征荧光发射峰,而PEI-AA NCPDs在490 nm处的荧光降低。然而,此时Eu^{3+}的荧光仍然比较弱。在PEI-AA/Eu^{3+}/TC中加入CitNa后,表明Eu^{3+}的红色荧光显著增强。这可能是由于CitNa能够取代与Eu^{3+}配

位的水分子，从而抑制了螯合水分子的淬灭作用[47-48]。

随后对可能的荧光淬灭机制进行了深入的探讨。加入Eu^{3+}后，TC的吸收峰出现了明显的红移，与TC相比，吸光度明显增加，表明Eu^{3+}与TC的成功配位。在Eu^{3+}/TC溶液中加入辅助配体CitNa后，混合物的吸光度进一步增加，证实CitNa与Eu^{3+}/TC形成了三元复合物。为了探究PEI-AA NCPDs荧光淬灭的原理，对不同混合溶液的荧光寿命进行了研究。由于TC的吸收光谱与PEI-AA NCPDs的激发光谱重叠，荧光淬灭的原因可能是IFE和或荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）。由IFE引起的荧光淬灭，荧光材料的荧光寿命不变，而由FRET引起荧光淬灭时，荧光材料的荧光寿命将降低[49]。加入不同物质的量浓度的TC后，PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa荧光探针在490 nm处的荧光寿命列于表4。TC物质的量浓度不同时，荧光寿命范围为5.04~5.06 ns。混合物的荧光寿命基本上没有改变，这证明该反应过程中PEI-AA NCPDs的荧光淬灭的机制是IFE而不是FRET。此外，当加入TC时，色度图显示PEI-AA NCPDs和Eu^{3+}之间有很大的荧光色差。因此该比率荧光传感器对TC进行检测时，体系的荧光可以实现从蓝绿色到红色的颜色转化，有较强的视觉检测TC的能力。

表4　不同TC物质的量浓度下PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa荧光探针在490 nm处的荧光寿命

物质的量浓度/(μmol·L^{-1})	第1次拟合		第2次拟合		χ^2	寿命/ns
	寿命/ns	系数	寿命/ns	系数		
0	1.12	23.38	6.25	76.62	1.26	5.05
10.0	1.20	28.57	6.60	71.43	1.31	5.06
50.0	1.09	25.80	6.41	74.20	1.27	5.04

4　结束语

本文设计和制备了基于PEI-AA/Eu^{3+}/CitNa的比率荧光传感器，由于IFE和AE的协同作用，490和618 nm处的荧光信号出现了2种相反的变化，实现了TC的高灵敏地检测。本工作提出的TC检测比率荧光响应和视觉响应使其比其他具有单信号读数的TC探针更具竞争力和通用性，并且TC检测的双模式策略可提供一种新的、高效、灵敏和即时的视觉传感平台。

参 考 文 献

[1] HOU J, LI H Y, WANG L, et al. Rapid microwave-assisted synthesis of molecularly imprinted polymers on carbon quantum dots for fluorescent sensing of tetracycline in milk[J]. Talanta, 2016, 146: 34-40.

[2] ZHAO C B, JIN L X, GE H G, et al. Improvement of photovoltaic performances by optimizing π-conjugated bridge for the C217-based dyes: a theoretical perspective [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A (Chemistry), 2018, 360: 137-144.

[3] LI Y, WANG J Y, HUANG Z J, et al. An Eu-doped Zr-metal-organic framework for simultaneous detection and removal of antibiotic tetracycline [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(5): 106012.

[4] BACANLI M, BASARAN N. Importance of antibiotic residues in animal food [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 125: 462-466.

[5] XU H, MI H Y, GUAN M M, et al. Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction [J]. Food Chemistry, 2017, 232: 198-202.

[6] SERRA-COMPTE A, ALVAREZ-MUNOZ D, RODRIGUEZ-MOZAZ S, et al. Multi-residue method for the determination of antibiotics and some of their metabolitesin seafood [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 104: 3-13.

[7] PANG Y H, LYU Z Y, SUN J C, et al. Collaborative compounding of metal-organic frameworks for dispersive solid-phase extraction HPLC-MS/MS determination of tetracyclines in honey [J]. Food Chemistry, 2021, 355: 129411.

[8] WANG Z H, MI T J, BEIER R C, et al. Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk [J]. Food Chemistry, 2015, 171: 98-107.

[9] WU X Y, XU Z Q, HUANG Z, et al. Large volume sample stacking of cationic tetracycline antibiotics toward 10 ppb level analysis by capillary electrophoresis with UV detection [J]. Electrophoresis, 2016, 37(22): 2963-2969.

[10] CHEN D, YAO D S, XIE C F, et al. Development of an

aptasensor for electrochemical detection of tetracycline [J]. Food Control, 2014, 42: 109-115.

[11] DELGADO K P, RAYMUNDO-PEREIRA P A, CAMPOS A M, et al. Ultralow cost electrochemical sensor made of potato starch and carbon black nanoballs to detect tetracycline in waters and milk [J]. Electroanalysis, 2018, 30(9): 2153-2159.

[12] SONG Y Y, QIAO J, LIU W, et al. Enhancement of gold nanoclusters-based peroxidase nanozymes for detection of tetracycline [J]. Microchemical Journal, 2020, 157: 104871.

[13] TANG Y, HUANG X H, WANG X L, et al. G-quadruplex DNAzyme as peroxidase mimetic in a colorimetric biosensor for ultrasensitive and selective detection of trace tetracyclines in foods [J]. Food Chemistry, 2022, 366: 13560.

[14] YANG K R, JIA P, HOU J J, et al. Innovative dual-emitting ratiometric fluorescence sensor for tetracyclines detection based on boron nitride quantum dots and europium ions [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(46): 17185-17193.

[15] HAN L, FAN Y Z, QING M, et al. Smartphones and test paper-assisted ratiometric fluorescent sensors for semi-quantitative and visual assay of tetracycline based on the target-induced synergistic effect of antenna effect and inner filter effect [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(41): 47099-47107.

[16] PAVITHRA N, SIMRANJEET S, PRAVEEN C R. Synthesis of water-soluble CdS quantum dots for the fluorescence detection of tetracycline [J]. Environmental Pollution, 2023, 338: 122682.

[17] KHAWLA M, ZOUHOUR H, YVES C, et al. ZnS quantum dots as fluorescence sensor for quantitative detection of tetracycline [J]. Optical Materials, 2022, 125: 112103.

[18] CHANG Y N, HE R, WEI Y L, et al. Polyethyleneimine-sulfur quantum dot composites for dual-channel detection of tetracycline by colorimetric and fluorescence sensing [J]. ACS Applied Nano Materials, 2023, 6(9): 7414-7421.

[19] FAN Y, YAO J, HUANG M K, et al. Non-conjugated polymer dots for fluorometric and colorimetric dual-mode detection of quercetin [J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129962.

[20] ZHU S J, SONG Y B, SHAO J R, et al. Non-conjugated polymer dots with crosslink-enhanced emission in the absence of fluorophore units [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(49): 14626-14637.

[21] LI J G, YU X S, WANG Y, et al. A reduction and pH dual-sensitive polymeric vector for long-circulating and tumor-targeted siRNA delivery [J]. Advanced Materials, 2014, 26(48): 8217-8224.

[22] ZHANG C X, LI S, DUAN Z Q, et al. Water-soluble non-conjugated polymer dots with strong green fluorescence for sensitive detection of organophosphate pesticides [J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1206: 339792.

[23] TAO S Y, ZHU S J, FENG T L, et al. Crosslink-enhanced emission effect on luminescence in polymers: advances and perspectives [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(25): 9826-9840.

[24] ZHU S J, WANG L, ZHOU N, et al. The crosslink enhanced emission (CEE) in non-conjugated polymer dots: from the photoluminescence mechanism to the cellular uptake mechanism and internalization [J]. Chemical Communications, 2014, 50(89): 13845-13848.

[25] ELZBIECIAK-PIECKA K, SUTA M, MARCINIAK L. Structurally induced tuning of the relative sensitivity of $LaScO_3$: Cr^{3+} luminescent thermometers by co-doping lanthanide ions [J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 421: 129757.

[26] JIANG C, HU S J, ZHOU L P, et al. Lanthanide-organic pincer hosts with allosteric-controlled metal ion binding specificity [J]. Chemical Communications, 2022, 58(36): 5494-5497.

[27] MA B J, WU Y, ZHANG S, et al. Terbium-aspartic acid nanocrystals with chirality-dependent tunable fluorescent properties [J]. ACS Applied Nano Materials, 2017, 11(2): 1973-1981.

[28] ARNAUD N, GEORGE J. Sensitive detection of tetracyclines using europium-sensitized fluorescence with EDTA as co-ligand and cetyltrimethylammonium chloride as surfactant [J]. Analyst, 2001, 126(5): 694-697.

[29] CHEN Y, ZHANG Y, LYU T, et al. A facile strategy for the synthesis of water-soluble fluorescent nonconjugated polymer dots and their application in tetracycline detection [J]. Journal of Materials Chemistry C, 2019, 7(30): 9241-9247.

[30] GAO R R, QIU Q, DONG W. Visual monitoring of levofloxacin in biofluids by europium (III) -functionalized mesoporous silica nanoparticles [J]. ACS Applied Nano Materials, 2022, 5(4): 5631-5639.

[31] YU L, CHEN H X, YUE J, et al. Europium metal-organic framework for selective and sensitive detection of doxycycline based on fluorescence enhancement [J]. Talanta, 2020, 207: 120297.

[32] WANG J X, CHENG R J, WANG Y Y, et al. Surface-

imprinted fluorescence microspheres as ultrasensitive sensor for rapid and effective detection of tetracycline in real biological samples[J]. Sensors and Actuators B(Chemical),2018,263:533-542.

[33] WANG X,LI L W,JIANG H,et al. Highly selective and sensitive fluorescence detection of tetracyclines based on novel tungsten oxide quantum dots[J]. Food Chemistry, 2022,374:131774.

[34] XU J, GUO S, JIA L, et al. A smartphone-integrated method for visual detection of tetracycline[J]. Chemical Engineering Journal,2021,416:127741.

[35] ZHANG L N, WANG Y L, JIA L, et al. Ultrasensitive and visual detection of tetracycline based on dual-recognition units constructed multicolor fluorescent nano-probe[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 409:124935.

[36] TAN H L,MA C J,SONG Y H,et al. Determination of tetracycline in milk by using nucleotide/lanthanide coordination polymer-based ternary complex [J]. Biosensors & Bioelectronics,2013,50:447-452.

[37] LI Y, WANG Y, DU P Y, et al. Fabrication of carbon dots@hierarchical mesoporous ZIF-8 for simultaneous ratiometric fluorescence detection and removal of tetracycline antibiotics[J]. Sensors and Actuators B (Chemical),2022,358:131526.

[38] KHATAEE A, JALILI R, DASTBORHAN M, et al. Ratiometric visual detection of tetracycline residues in milk by framework-enhanced fluorescence of gold and copper nanoclusters[J]. Spectrochimica Acta Part A (Molecular and Biomolecular Spectroscopy), 2020, 242:118715.

[39] SONG Y Y,QIAO J,LIU W,et al. Enhancement of gold nanoclusters-based peroxidase nanozymes for detection of tetracycline[J]. Microchemical Journal, 2020, 157: 104871.

[40] WANG Y L, SUN Y J, DAI H C, et al. A colorimetric biosensor using Fe_3O_4 nanoparticles for highly sensitive and selective detection of tetracyclines[J]. Sensors and Actuators B(Chemical),2016,236:621-626.

[41] WANG X,LI J H,JIAN D,et al. Paper-based antibiotic sensor (PAS) relying on colorimetric indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative tetracycline and chloramphenicol detection [J]. Sensors and Actuators B(Chemical), 2021, 329: 129173.

[42] MOUDGIL P,BSDI J S,AULAKH R S,et al. Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk [J]. Food Analytical Methods,2019,12(2):338-346.

[43] HUANG S F, GAN N, LI T H, et al. Electrochemical aptasensor for multi-antibiotics detection based on endonuclease and exonuclease assisted dual recycling amplification strategy[J]. Talanta,2018,179:28-36.

[44] GAO R R, SHI S, LI Y J, et al. Coordination polymer nanoparticles from nucleotide and lanthanide ions as a versatile platform for color-tunable luminescence and integrating Boolean logic operations[J]. Nanoscale, 2017,9(27):9589-9597.

[45] GHORAI S K,SAMANTA S K,MUKHERJEE M,et al. Tuning of "antenna effect" of Eu(III) in ternary systems in aqueous medium through binding with protein[J]. Inorganic Chemistry,2013,52(3):1476-1487.

[46] YIN H Q, WANG X Y, YIN X B. Rotation restricted emission and antenna effect in single metal-organic frameworks[J]. Journal of the American Chemical Society,2019,141(38):15166-15173.

[47] LIN Z H,WU M,SCHAFERLING M,et al. Fluorescent imaging of citrate and other intermediates in the citric acid cycle [J]. Angewandte Chemie International Edition,2004,43(13):1735-1738.

[48] XU J, ZHANG B B, JIA L, et al. Metal-enhanced fluorescence detection and degradation of tetracycline by silver nanoparticle-encapsulated halloysite nano-lumen [J]. Journal of Hazardous Materials,2020,386:121630.

[49] YANG Y X, HUO D Q, WU H X, et al. N, P-doped carbon quantum dots as a fluorescent sensing platform for carbendazim detection based on fluorescence resonance energy transfer[J]. Sensors and Actuators B (Chemical),2018,274:296-303.

(责任编辑:王 媛)