

Eu³⁺ 参比碳点比率荧光传感器构建及用于环丙沙星检测

郑佳红, 周 艳

(长安大学材料科学与工程学院, 西安 710061)

摘 要: 以碳量子点(CQDs)和铕离子(Eu³⁺)为荧光基团, 构建比率荧光探针(CQDs/Eu³⁺), 用于环丙沙星(CIP)的检测。在 395 nm 波长激发下, CQDs/Eu³⁺ 在 459 nm 处存在较强的蓝色荧光峰, 在 616 nm 处存在较弱的红色荧光峰, 当 CIP 存在时, 基于天线效应使得 459 nm 处的 CQDS 荧光强度增强。研究优化了 CQDs 和 Eu³⁺ 比例、响应时间、稳定性等实验条件, 结果表明: 该比率荧光探针对 CIP 具有特异性识别能力, 荧光强度比(F_{459}/F_{616})与不同浓度 CIP($0\sim 7\times 10^{-6}$ mol/L)之间存在良好的线性关系, 对 CIP 的最低检测限为 0.3×10^{-6} mol/L, 随着 CIP 的加入, 成功用于牛奶中 CIP 检测。

关键词: 碳量子点; 铕离子; 比率荧光探针; 环丙沙星

中图分类号: R318.08 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2022)09-2477-06

网络出版时间: 2022-08-12



Construction of Eu³⁺ Reference Carbon Dot Ratio Fluorescence Sensor and Its Application in Detection of Ciprofloxacin

ZHENG Jiahong, ZHOU Yan

(School of Materials Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an 710061, China)

Abstract: A ratiometric fluorescent probe (CQDs/Eu³⁺) was constructed with carbon quantum dots (CQDs) and europium ions (Eu³⁺) as fluorophores for the detection of ciprofloxacin (CIP). At excitation at 395 nm wavelength, CQDs/Eu³⁺ has an intense blue fluorescent peak at 459 nm, and a weak red fluorescent peak at 616 nm in the presence of CIP. The fluorescence (FL) intensity of CQDS at 459 nm is enhanced based on the antenna effect. The major factors like ratio of CQDs and Eu³⁺, response time and stability were optimized. The results show that the ratio fluorescent probe has a specific recognition ability for CIP. And there is a linear relationship between the fluorescence intensity ratio (F_{459}/F_{616}) and concentration of CIP ($0\sim 7\times 10^{-6}$ mol/L), and the lowest detection limit for CIP is 0.3×10^{-6} mol/L. This probe can be used for the detection of CIP in milk under the addition of CIP.

Keywords: carbon quantum dots; europium ions; ratiometric fluorescent ptobe; ciprofloxacin

CIP 作为一种抗生素, 不易被人体吸收, 并且会通过人体代谢释放到水环境中, 而且 CIP 的大规模排放会导致严重的水污染^[1], 其残留物已在各种环境地表水和食物中被发现^[2]。特别是牛奶制品中残留 CIP 的情况已经被广泛报道, 并引起了社会的关注^[3], 长期食用这类含有 CIP 残留物污染的牛奶产品可能会出现细菌耐药、毒性反应、过敏反应等

不良反应。目前已有的几种检测 CIP 的分析方法, 如液相色谱^[7]和质谱^[8-9]等, 虽然检测准确性高, 但是需要复杂的预处理过程、昂贵的仪器和经验丰富的工作人员。因此, 越来越多的研究者致力于发展一个快速、敏感和可靠的 CIP 检测方法^[4-6]。

本工作从 CQDs 的制备及其应用出发, 寻找绿色环保的材料作为合成原料, 探索 CQDs 简便快捷

收稿日期: 2021-11-25。 修订日期: 2022-02-04。

基金项目: 陕西省自然科学专项基金(2020JM-221); 陕西省重点研发项目(2022GY-358)长安大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(300102310203, 300102311405, 300102312405); 大学生创新创业训练计划(S202010710207)。

第一作者: 郑佳红(1983—), 女, 博士, 副教授。

Received date: 2021-11-25. Revised date: 2022-02-04.

First author: ZHENG Jiahong (1983—), female, Ph.D, Associate Professor.

E-mail: jhzheng@chd.edu.cn

的制备方法,并研究其在 CIP 检测中的应用。对于具有单一发射中心的材料,荧光信号的变化可以用于一些分析物的定量分析,但检测过程易受外部因素的影响,从而降低了灵敏度和准确性^[10]。已有研究证明有双发射中心荧光强度特征的双发射材料,可以实现自校准效果,避免了环境干扰^[11]。

近年来,由于比率荧光探针能够克服单发射荧光传感器的局限性,提高检测结果的准确性,已在诸多领域被广泛应用^[12]。在离子检测方面, Lee 等^[13]用功能化的 CDs 以及罗丹明 6G 构建了比率荧光探针,实现了对铝离子的比率检测。Wang 等^[14]设计了一种检测镉离子的比率荧光传感器,该探针以二氧化硅球的红色荧光发射作为参比信号,并通过共价作用结合于硅球表面的碲化镉量子点的绿色荧光为识别信号,将其应用于铝离子的定量检测,检测效果良好。在有机小分子检测方面, Chen 等^[15]设计了一种检测果蔬中谷胱甘肽的比率荧光传感器,该比率探针已成功应用于果蔬中谷胱甘肽的可视化检测。卢晓慧等^[16]设计了一种检测葡萄糖的比率荧光传感器,该传感器是由染料掺杂的二氧化硅微球和量子点组成,两者通过静电相互作用连接,可对葡萄糖进行半定量的检测。在生物大分子检测方面, Zhang 等^[17]设计了一种检测双链 DNA 的比率荧光探针。实现了对双链 DNA 的定量检测。Liu 等^[18]建立了以硫酸软骨素为模板金银合金的双金属纳米团簇用于透明质酸酶的检测。

本工作结合了稀土元素配合物以及比率荧光探针的双重优点,构建了具有高灵敏度的 CQDs/Eu³⁺ 的比率荧光传感器,并将其用于 CIP 抗菌药物的定量检测,且对一些可能共存的物质做了相关的干扰探究,最后进行了牛奶样品的检测,证明了该方法在实际检测中的可行性。

1 实验

1.1 药品制备

乙醇、六水合硝酸铈、葡萄糖和环丙沙星(CIP)均从 DAMAO 化学试剂有限公司(中国天津)购买。以上药品均为分析纯。

CIP 标准溶液配置:称取 0.016 5 g CIP 溶解到 2 mL 乙酸和 8 mL 去离子水的混合液中。

以葡萄糖为碳源制备 CQDs:首先称取 0.500 g 无水葡萄糖溶解到 10 mL 去离子水(DI)中,在磁力搅拌器上持续搅拌 30 min,然后将此溶液转移到反

应釜中,置于 180 °C 鼓风干燥箱中反应 5 h,随后自然冷却至室温,即获得 CQDs 原液以备后续使用。

5 mmol/L Eu³⁺溶液制备:称取 0.111 5 g 六水硝酸铈溶解到 50 mL 去离子水中,形成浓度为 5 mmol/L 的 Eu³⁺溶液以备后续使用。

1.2 CQDs/Eu³⁺比率荧光探针的制备

用移液枪吸取 400 μ L Eu³⁺溶液加入到 200 mL 去离子水中,再加入 4 mL CQDs 储备液,搅拌 30 min,即形成 CQDs/Eu³⁺比率荧光探针溶液。

1.3 CIP 检测

取 5 mL CQDs/Eu³⁺比率荧光探针溶液加入到 10 mL 的比色皿中,然后分别与不同浓度的 CIP 水溶液混合,加去离子水定容至 10 mL,稳定一段时间后用中国棱光 F97pro 型荧光分光光度计进行荧光测试。荧光测试条件:激发波长设为 395 nm,检测波长范围为 380~650 nm,光电倍增管电压为 750 V,发射和激发的狭缝宽度为 10 nm。

2 结果与讨论

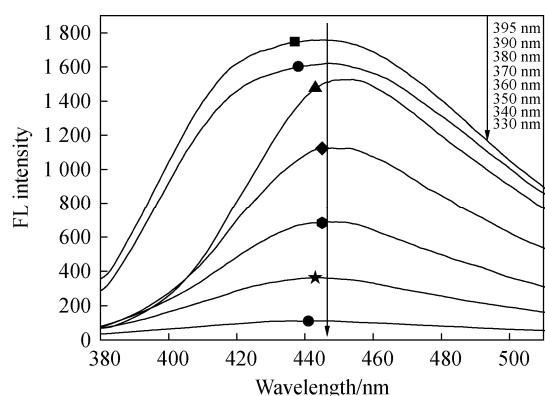
2.1 实验条件优化

首先,分别研究了 CQDs 溶液和 Eu³⁺的发射峰位置和强度与激发波长、Eu³⁺浓度与 CIP 之间相互关系曲线。图 1 为 CQDs 与 Eu³⁺在不同激发波长下的荧光光谱以及 CQDs/Eu³⁺比率荧光探针的稳定性曲线。由图 1a 可见,CQDs 的发射峰位置不会随激发波长的改变而发生明显的红移或蓝移,激发波长为 395 nm 时,CQDs 在 459 nm 处荧光发射峰强度最强。由图 1b 可见,Eu³⁺浓度为 5 mmol/L 条件下,激发波长从 360 nm 增加到 395 nm 时,Eu³⁺分别在 594 nm 和 616 nm 处的荧光发射峰强度都逐渐增强,因此,Eu³⁺的最佳激发波长为 395 nm,综合两者的激发波长考量,最终 CQDs/Eu³⁺比率荧光探针选择 395 nm 为激发波长。

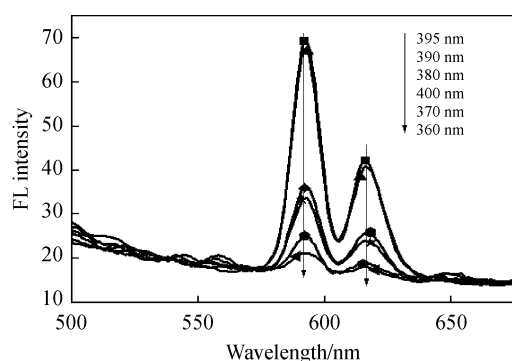
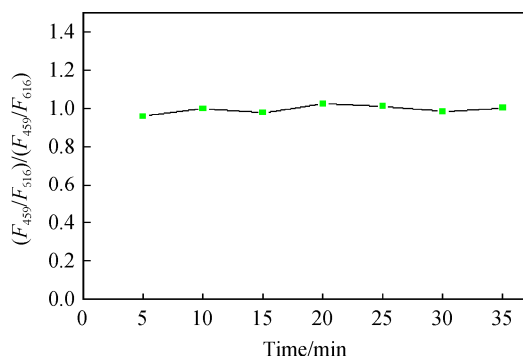
CQDs/Eu³⁺比率荧光探针的稳定性也是影响 CIP 检测的一个重要因素,研究了 35 min 内的该比率探针的荧光强度变化。由图 1c 可见,在 35 min 内,该比率探针的荧光保持稳定。

2.2 CQDs/Eu³⁺比率探针检测 CIP 机理分析

将待测物 CIP 的标准溶液按每次 1×10^{-6} mol/L 的量加入到各荧光材料的稀释液中,通过荧光强度变化值来判断检测的效果。图 2 为各荧光探针对 CIP 的荧光响应图谱以及 CIP 和 CQDs 相互作用图。由图 2a 可见,CIP 本身就有荧光,且会随着它浓度升高而逐渐增强。由图 2b 可见,CIP 的荧光强度几



(a) Fluorescence (FL) spectra of CQDs

(b) Fluorescence spectra of Eu^{3+} at different excitation wavelengths(c) Stability of CQDs/ Eu^{3+} ratiometric fluorescent probes图 1 CQDs 与 Eu^{3+} 在不同激发波长下的荧光光谱以及 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针的稳定性曲线Fig. 1 Fluorescent spectra of CQDs and Eu^{3+} at different excitation wavelengths and stability curves of CQDs/ Eu^{3+} ratio fluorescent probes

乎没有被 Eu^{3+} 影响, 而且因为 CIP 的加入, Eu^{3+} 的荧光强度也有小幅增强。由图 2c 可见, CIP 的浓度从 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 增加到 $9 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时, 459 nm 处的荧光强度变化非常明显。荧光增强机制可能归因于 CQDs 和 CIP 之间的氢键相互作用和电荷转移, 且荧光探针的荧光强度变化也与表面状态有关, CQDs 具有大的比表面积, 而且含有丰富的羧基、羟基, 这些优势为它提供了良好的水溶性, 从而基

于氢键相互作用与 CIP 结合, 氢键相互作用可能发生在 CQDs 的羟基和 CIP 的哌嗪环与羧基之间。此外, CQDs 是亲水性的, 这为与分析物产生氢键提供了有利条件, 强氢键通常包括 $\text{F} \cdots \text{H} \cdots \text{F}$ 、 $\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{O}$ 和 $\text{O}^+ \cdots \text{H} \cdots \text{O}$ 这些短距和方向性的双中心键, 能量高于 $41 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [19]。另一方面, 电荷转移也发挥了很重要的作用, 芳香环上的碳也具有较强的得电子能力。

为了使作用效果更加明显与稳定, 将 Eu^{3+} 与 CQDs 结合制备比率荧光探针, Eu^{3+} 的存在增强了 CQDs 的荧光强度, 但没有影响 Eu^{3+} 的荧光发射峰, 进一步研究了 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针对于 CIP 的高灵敏度, 图 2d 为 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针对于不同浓度 CIP 的荧光响应图谱, 由图 2d 可见, 随着 CIP 浓度从 0 增加到 $7 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 在 459 nm 处的荧光强度明显逐渐增强, 同时, 在 616 nm 处的荧光强度也有小幅增强。

图 2e 为 CIP 和 CQDs 的相互作用图。由图 2e 可见, CIP 基于强氢键相互作用和电荷转移使 CQDs 的荧光强度发生变化, 向 CQDs 中加入 CIP 可能会促进 $\text{C}=\text{C}$ 键的聚合。由该方法构造的定量荧光传感器克服了单波长荧光传感器容易受到浓度、环境、激发强度等因素的影响, 具有良好的应用前景。

2.3 荧光探针相关性实验分析

为了证明该 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针对于 CIP 的高选择性, 选取了几种常用的抗生素作为待检测物, 包括磺胺甲噁唑(SDZ)、磺胺甲基嘧啶(SM)、磺胺二甲基嘧啶(SM_2)、氯霉素等。在相同条件下, 将该比率荧光探针与相同浓度的抗生素($5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)混合, 进行荧光检测。

图 3 为 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针与不同抗生素、干扰物之间的荧光响应图谱。由图 3a 可见, 大多数抗生素不会导致比率探针荧光发生变化。图 3b 为 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针对于不同抗生素的荧光响应强度比(F_{616}/F_{459})柱状图, 通过研究混合物的荧光强度比(F_{616}/F_{459}), 由图 3b 可见, 该 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针对于 CIP 有着良好的选择性。此外, 在实际环境中检测 CIP 时, 可能存在一些离子会破坏 CQDs 与 CIP 之间的作用, 从而对检测结果产生影响, 所以选取了一些常见的阴阳离子和其它的干扰物(Na^+ , Cl^- , K^+ , SO_4^{2-} , Fe^{2+} , 葡萄糖, 柠檬酸)来研究该比率荧光探针的抗干扰性能, 将一定浓度的干扰物($5 \text{ } \mu\text{mol/L}$)与该比率荧光探针混合进行荧光测试。由图 3c 可见, 多数干扰物均不会影响该比率

荧光探针的荧光强度, 只有加入 CIP 才会导致荧光强度发生变化。此外将干扰物与 CIP 同时与 CQDs/Eu³⁺ 比率荧光探针混合后, 由图 3d 可见, 右侧矮的柱状图为单独的 CIP 与比率荧光探针混合后的荧光强度比(F_{616}/F_{459}), 当存在干扰物时荧光强度比有微小幅度变化。结果表明, 该 CQDs/Eu³⁺ 比率荧光探针对于 CIP 具有优良的选择性以及良好的抗干扰

能力。

图 4 为荧光强度比(F_{459}/F_{616})与不同浓度 CIP 之间的线性关系曲线, 线性关系可以通过修正的 Stern-Völmer 方程进行计算,

$$F_{459}/F_{616} = K_{sv} C_M + C \quad (1)$$

其中: C_M 为 CIP 的浓度; K_{sv} 为表观猝灭常数; F_{459} 和 F_{616} 分别为 459 nm 与 616 nm 处的荧光强度;

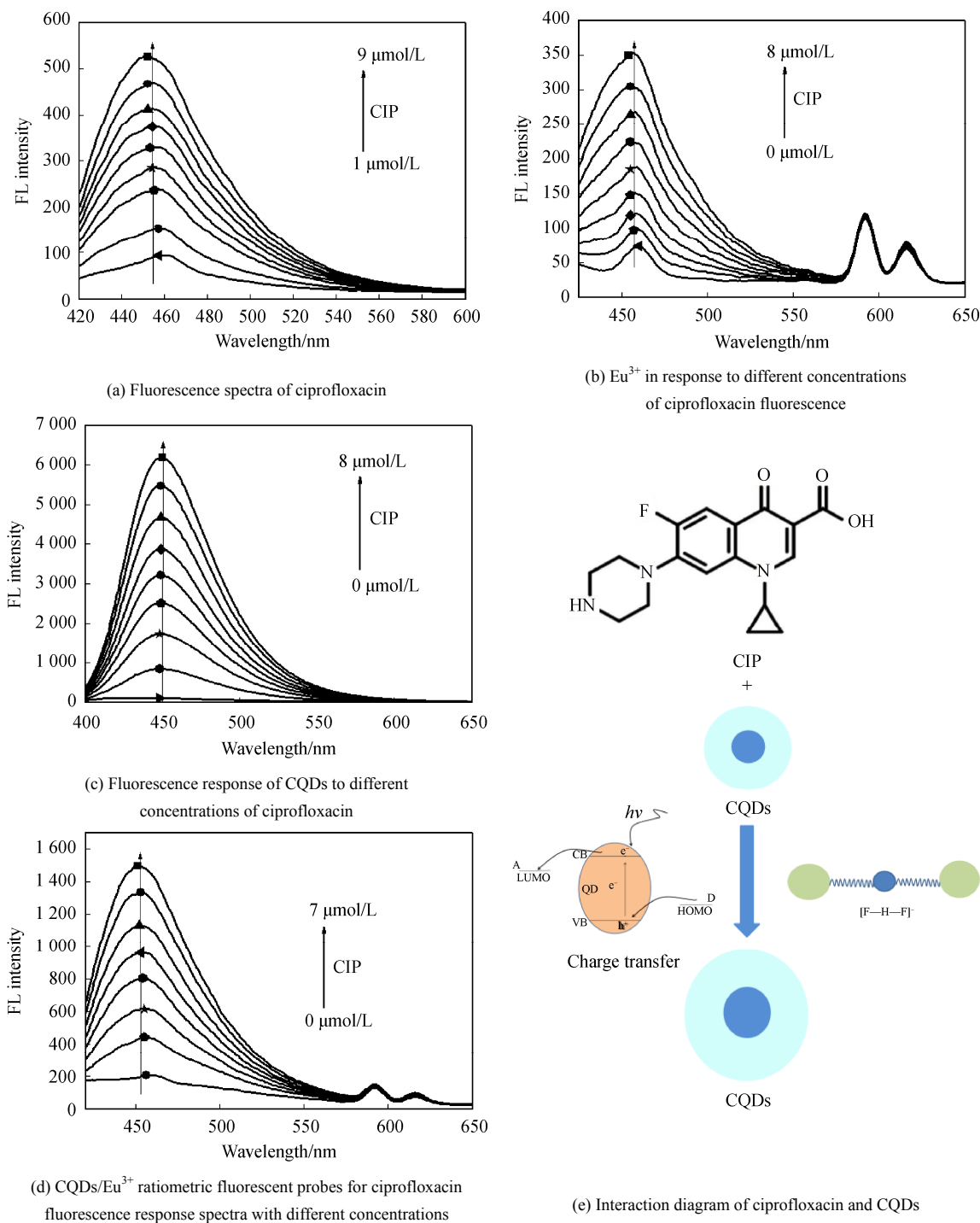
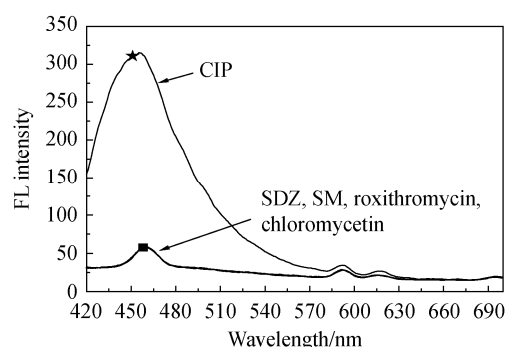
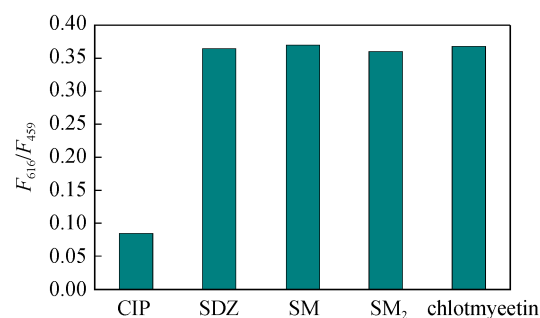
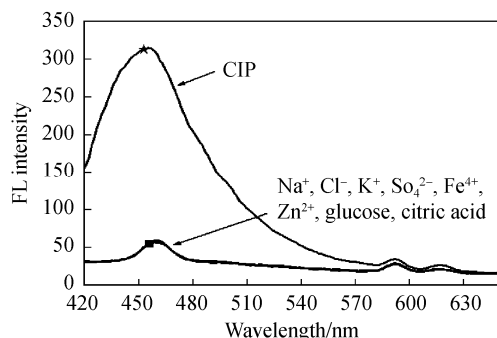
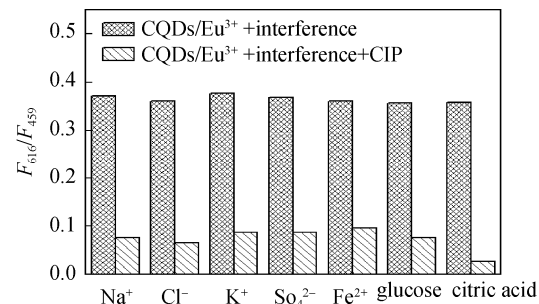


图 2 各荧光探针对于 CIP 的荧光响应图谱以及 CIP 和 CQDs 相互作用图

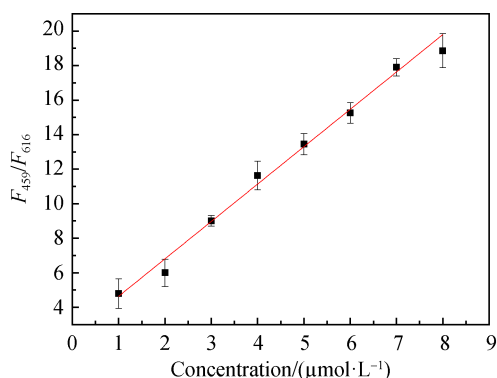
Fig. 2 Fluorescence response spectra of each fluorescent probe to ciprofloxacin and interaction diagram of ciprofloxacin and CQDs

(a) Fluorescence spectra between CQDs/ Eu^{3+} fluorescence ratio probes and different antibiotics

(b) Detection of fluorescence intensity ratio of different antibiotics

(c) Fluorescence spectra between CQDs/ Eu^{3+} fluorescence ratio probes and different interferences

(d) Detection of fluorescence intensity ratio of different interferences

图 3 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针与不同抗生素、干扰物之间的荧光谱Fig. 3 Fluorescence profiles of CQDs/ Eu^{3+} ratio fluorescent probes with different antibiotics and interfering substances图 4 荧光强度比(F_{459}/F_{616})与不同浓度 CIP 之间的线性关系曲线Fig. 4 Linear relationship between fluorescence intensity ratio (F_{459}/F_{616}) and ciprofloxacin with different concentrations

K_{sv} 计算为 $1.62747 C_M^{-1}$; 相关系数(R_2)为 0.995 11。对应的线性方程为

$$F_{459}/F_{616} = 1.62747x + 3.61793 \quad (2)$$

经计算最低检测限为 $0.3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。以上结果表明, 荧光强度比(F_{459}/F_{616})和 CIP 浓度之间有良好的线性关系, 该比率荧光探针能够很好地用于 CIP 检测。

表 1 为不同荧光和电化学传感探针对 CIP 的检测结果, 由表 1 可见, 本工作为检测 CIP 提供了低检测限以及宽校准范围, 最低检测限值为 $0.3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 优于其他报告中的数据。

2.4 实际水样中的应用

为了进一步验证 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针在实际水样中的应用, 选取了牛奶作为待检测水样。牛奶通过多次离心稀释, 通过标准加入法向一定量牛奶样品中依次加入 CIP, 得到不同 CIP 浓度(1、3、5 $\mu\text{mol/L}$)的牛奶溶液。然后, 利用 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针测定牛奶样品中的 CIP 含量。测试结果如表 2 所示, 把所测得的荧光强度代入 2.3 节的

表 1 与其他报告的结果相比当前传感器的 CIP 检测限值

Table 1 Ciprofloxacin detection limit of the present sensor in comparison with other reported results

Sensing method	Sensing probe	Linear range/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOD/ $10^6/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Reference
Fluorescence	AuNPs	50–150	12	23
Electrochemical	$\text{BiPO}_4/\text{GO-MMIPs}$	39–740	0.39	24
Fluorescence	CQDs/ Eu^{3+}	30–800	0.3	This work

表 2 实际水样中 CIP 检测
Table 2 Determination of ciprofloxacin in real sample

Samples	Spiked/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Found/ $10^6/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	Relative standard deviation/%
Milk 1	1	1.03±0.01	103.2±0.07	0.2
Milk 2	3	3.18±0.04	105.8±0.02	0.3
Milk 3	5	5.15±0.01	103.0±0.01	0.2

线性方程式(1)中, 得出浓度的值, 然后和理论浓度的比值就是加标回收率, 3 个样品的 CIP 检测回收率范围 103%~105.8%, 相对标准偏差范围为 0.2%~0.3%。

3 结论

利用 CQDs 和 Eu^{3+} 构建了 CQDs/ Eu^{3+} 比率荧光探针, 用于 CIP 的检测。研究了激发波长、 Eu^{3+} 的浓度对比率荧光探针的影响, 并探索了该比率荧光探针的稳定性以及最佳的 CIP 检测时间。

CQDs 与 CIP 之间基于电荷转移和氢键相互作用可使 CQDs 荧光增强。该比率荧光探针可用于 CIP 的快速检测, 与 CIP 存在良好的线性检测关系, 最低检测限为 $0.3\times 10^{-6}\text{ mol/L}$, 并且有着很好的抗干扰能力, 该比率荧光探针成功应用于牛奶样品中 CIP 检测。

参考文献:

- [1] SHI X D, LI Y T, ZHANG Z, et al. Enhancement of ciprofloxacin degradation in the Fe(II)/peroxymonosulfate system by protocatechuic acid over a wide initial pH range[J]. Chem Eng J, 2019, 372: 1113–1121.
- [2] HUA J H, YANG J, WANG M, et al. Determination of norfloxacin or ciprofloxacin by carbon dots fluorescence enhancement using magnetic nanoparticles as adsorbent[J]. Microchim Acta, 2018, 185(2): 1–9.
- [3] LIU X, STEELE J C, MENG X Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in chinese aquaculture: a review[J]. Environ Pollut, 2017, 223: 161–169.
- [4] LI Z M, LI Z H, ZHAO D G, et al. Smartphone-based visualized microarray detection for multiplexed harmful substances in milk[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 874–880.
- [5] WANG C, LI X M, PENG T, et al. Latex bead and colloidal gold applied in a multiplex immunochromatographic assay for high-throughput detection of three classes of antibiotic residues in milk-science[J]. Food Control, 2017, 77: 1–7.
- [6] LI Q Z, GAO J X, ZHANG Q L, et al. Distribution and risk assessment of antibiotics in a typical river in north china plain[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2017, 98(4): 478–483.
- [7] VEERAPANDIAN S, GHADIVARU S. A hptlc-fluorescent densitometry assay for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin in broiler chicken tissues[J]. Food Anal Methods, 2017, 11(4): 1–10.
- [8] DEMERY M E, ALI A, ABOULEILA Y, et al. Quantification and targeted detection of ciprofloxacin in dosage form and human urine by direct injection nano-electrospray ionization multi-stage mass spectrometry[J]. Microchem J, 2020, 153: 104534.
- [9] WANG X L, Guo T, WEI Y B, et al. Determination of quinolone antibiotic residues in human serum and urine using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. J Anal Toxicol, 2019, 43(7): 579–586.
- [10] SUN X H, YANG S H, GUO M Z, et al. Reversible fluorescence probe based on N-doped carbon dots for the determination of mercury ion and glutathione in waters and living cells[J]. Anal Sci, 2017, 33(7): 761.
- [11] XU X Y, YAN B. Fabrication and application of a ratiometric and colorimetric fluorescent probe for Hg^{2+} based on dual-emissive metal-organic framework hybrids with carbon dots and Eu^{3+} [J]. Mater Chem C, 2016, 4(7): 1543–1549.
- [12] 徐阳鑫. 基于铕离子比率荧光探针的构建及其在抗菌药物检测中的应用[D]. 渤海大学, 2021.
- [13] XU Yangxin. Construction of a ratio fluorescent probe based on europium ions and its application in the detection of antibacterial agents (in Chinese, dissertation). Jinzhou: Bohai University, 2021.
- [14] KIM Y, JANG G, LEE T S. Carbon nanodots functionalized with rhodamine and poly (ethylene glycol) for ratiometric sensing of Al ions in aqueous solution[J]. Sens Actuators B, 2017, 249: 59–65.
- [15] QIAN J, WANG K, WANG C, et al. Ratiometric fluorescence nanosensor for selective and visual detection of cadmium ions using quencher displacement-induced fluorescence recovery of CdTe quantum dots-based hybrid probe[J]. Sens Actuators B, 2017, 241: 1153–1160.
- [16] CHEN A, PENG X, PAN Z, et al. Visual assay of glutathione in vegetables and fruits using quantum dot ratiometric hybrid probes[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(25): 6431–6438.
- [17] LU X, WANG P, WANG Y, et al. A versatile dual-emission fluorescent microhybrid enabling visual detection of glucose and other oxidases-based biocatalytic systems[J]. Adv Mater Technol, 2016, 1(2): 1–7.
- [18] LIANG S S, QI L, ZHANG R L, et al. Ratiometric fluorescence biosensor based on CdTe quantum and carbon dots for double strand DNA detection[J]. Sens Actuators B, 2017, 244: 585–590.
- [19] LIU Q, YAN X, LAI Q, et al. Bimetallic gold/silver nanoclusters-gold nanoparticles based fluorescent sensing platform via the inner filter effect for hyaluronidase activity detection[J]. Sens Actuat B, 2019, 282: 45–51.
- [20] QIN H, QIU X Y, ZHAO J, et al. Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: determination of glucocorticoids in water samples[J]. J Chromatogr A, 2013, 1311(11): 11–20.