

# 荧光猝灭法快速检测金霉素的研究

毛永强<sup>1,2</sup>, 李娜<sup>1\*</sup>, 毛晶<sup>3</sup>

(1. 辽宁工程技术大学理学院, 辽宁 阜新 123000; 2. 辽宁工程技术大学安全科学与工程学院, 矿山热动力灾害与防治教育部重点实验室, 辽宁 阜新 123000; 3. 天津大学材料科学与工程学院, 天津市材料复合与功能化重点实验室, 天津 300072)

**摘要:**水热法合成巯基乙酸修饰的 CdTe 量子点发现, 金霉素的吸收光谱与 CdTe 量子点的激发光谱有较好重叠, 金霉素和 CdTe 量子点之间因发生内滤效应导致 CdTe 量子点的荧光被有效猝灭, 从而将金霉素的光吸收信号转变为高灵敏的荧光信号, 据此建立一种快速测定金霉素含量的荧光猝灭法。在最佳实验条件下, CdTe 量子点对金霉素响应的线性范围为  $5.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L, 相关系数为 0.999 4, 检出限为  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L。该方法可用于鸡肉中金霉素含量的测定, 回收率在 96.2% ~ 98.5%。

**关键词:** CdTe 量子点; 金霉素; 内滤效应; 荧光猝灭

**中图分类号:** O657.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2015)07-0167-04

## Quick determination of chlortetracycline by fluorescence quenching method

MAO Yong-qiang<sup>1,2</sup>, LI Na<sup>1\*</sup>, MAO Jing<sup>3</sup>

(1. College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China; 2. Key Laboratory of Mine Thermodynamic Disasters and Control of Ministry of Education, College of Safety Science and Engineering, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China; 3. Tianjin Key Laboratory of Composite and Functional Materials, School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** The CdTe quantum dots (QDs) are prepared using thioglycolic acid as stabilizer by hydrothermal synthesis method. It is found that absorption spectrum of chlortetracycline (CTC) could significantly overlap with fluorescence quenching excitation spectrum of CdTe QDs. The fluorescence intensity of CdTe QDs is quenched by CTC based on inner filter effect, which could convert the absorption signal of CTC into fluorescent signal. On the basis of that, a new fluorescent method for the quick determination of CTC is developed. Under the optimal conditions, the fluorescence quenching intensity of CdTe QDs is linear with the concentration of CTC in the range of  $5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L. The correlation coefficient is 0.999 4 and the limit of detection is  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L. The proposed method is applied to the determination of CTC in chicken samples, and the values of recovery test obtained by the standard addition method are in the range of 96.2% - 98.5%.

**Key words:** CdTe quantum dots; chlortetracycline; inner filter effect; fluorescence quenching

金霉素 (Chlortetracycline, CTC) 是一种广谱抗生素, 在畜牧业中广泛用做治疗疾病的兽药及促进生长的添加剂。但金霉素易在动物性食品中残留, 并经食物链危害人体健康。然而由于金霉素抗菌效果好且价格低廉, 少数商贩仍非法使用, 因此许多国家对畜禽产品中金霉素残留做出严格规定<sup>[1]</sup>。目前, 金霉素的检测方法主要有紫外光度法<sup>[2]</sup>、液相色谱法<sup>[3-4]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[5]</sup>、酶联免疫吸附法<sup>[6]</sup>等。紫外光度法操作简便但灵敏度较低, 液相色谱法灵敏度高但仪器设备昂贵, 操作成本较高, 酶联免疫吸附法简便易行但存在交叉反应、假阳性等问题, 因此有必要建立一种简便、快速、灵敏的金霉素含量检测方法。

荧光光度法因兼有操作简便、分析成本低、检测时间短、灵敏度高、选择性好等优势而成为重要的分析检测手段。与有机染料相比, 量子点具有吸收光谱

宽、发射光谱窄、光稳定性好及表面功能化等优点, 已广泛应用于重金属<sup>[7]</sup>、农药残留<sup>[8]</sup>、兽药残留<sup>[9]</sup>、致病菌<sup>[10]</sup>、生物毒素<sup>[11]</sup>等食品安全领域<sup>[12-13]</sup>。

笔者采用水热法合成巯基乙酸修饰的 CdTe 量子点, 结果发现金霉素的吸收光谱与 CdTe 量子点的激发光谱有较好重叠, 从而构建以金霉素为吸光体, CdTe 量子点为荧光体的荧光内滤效应体系, 基于金霉素对 CdTe 量子点的荧光猝灭效应, 将金霉素的光吸收信号转换为高灵敏度的荧光信号, 据此建立一种测定金霉素含量的荧光猝灭法。该方法用于鸡肉中金霉素含量的测定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

F-4500 型荧光分光光度计 (日本日立公司生产); UV-3010 型紫外-可见分光光度计 (日本日立

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAK06B07); 辽宁省教育厅科学研究项目(L2013138); 辽宁省大学生创新创业训练计划项目(201410147014)

作者简介: 李娜(1976-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为食品安全检测与分析, linamaoyongqiang@126.com。

公司生产);AUX320 型电子分析天平(日本岛津公司生产);pHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司生产)。

金霉素(CAS:57-62-5,阿拉丁试剂公司生产)、碲粉、氯化镉、硼氢化钠、巯基乙酸均为分析纯;实验用水为二次蒸馏水;Mcllvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 溶液,以 0.1 mol/L 柠檬酸溶液、0.2 mol/L 磷酸氢二钠及乙二胺四乙酸二钠配制;鸡肉样品,购自当地农贸市场。

## 1.2 水溶性 CdTe 量子点的合成

参照文献[14]合成巯基乙酸修饰的 CdTe 量子点。准确称取 0.086 g 碲粉与 0.160 g 硼氢化钠于反应瓶中,加入 5 mL 蒸馏水溶解,冰浴中反应 8 h 得到淡紫色 NaHTe 溶液。称取 0.285 4 g 氯化镉放入 500 mL 三口烧瓶中,加蒸馏水溶解后,磁力搅拌下加入 220 μL 巯基乙酸,用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 11.0。通氮除氧 10 min 后,迅速注入新制备的 NaHTe 溶液,在氮气保护下,100℃ 水浴反应 2 h,得到水溶性 CdTe 量子点,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

## 1.3 鸡肉样品的预处理

鸡肉样品去皮、去骨后取肌肉组织,捣碎机捣碎

(上接第 166 页)

艾塞那肽含量,艾塞那肽质量浓度在 0.04 ~ 0.4 mg/mL 内与峰面积呈良好的线性关系。专属性实验的结果表明,艾塞那肽在碱性及氧化条件下极不稳定,易降解;在高温条件下稳定性较差;在酸性及光照条件下稳定性相对较好,主峰与杂质峰分离效果较好。精密度实验结果显示,峰面积的 RSD 为 0.52%,表明仪器精密度良好,可信度较高。重复性实验测得的 RSD 为 0.74%,表明此 UPLC 方法重复性良好。稳定性实验表明,艾塞那肽在 8 h 内的稳定性较好。艾塞那肽的平均质量分数均在 98% 以上,满足纯度要求。

综上所述,此 UPLC 方法灵敏度高,重现性好,专属性强,并且,减少了溶剂损耗,节约了成本,提高了分析效率,为艾塞那肽的质量控制提供了可靠的检测方法。另一方面,本研究也填补了 UPLC 法测定艾塞那肽含量领域的空白,具有重要的参考价值。

## 参考文献

[1] Renate E van Genugten, Daniel H van Raalte, *et al.* Dose glucagon-

后搅拌均匀。称取 5.00 g 样品置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 Mcllvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 溶液 15 mL,涡旋混匀 1 min,超声提取 10 min,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液。残渣再重复提取 2 次,合并提取液并加入正己烷,充分震荡并静置分层后除去有机层,重复操作 1 次,取下层清液用氮气吹至近干,加入 50% 乙腈水溶液溶解残余物,涡旋混匀 1 min,经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

## 1.4 金霉素的测定

在 10 mL 比色管中,依次加入 0.4 mL CdTe 量子点、1.0 mL pH 为 6.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液和一定量的金霉素工作溶液,用蒸馏水定容至刻度,混匀。室温下放置 10 min 后,以 330 nm 为激发波长,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,测定体系在 523 nm 处的荧光强度  $F$ ;以同样方法配制不加金霉素的空白液,测定其荧光强度  $F_0$ ,计算体系相对荧光强度  $\Delta F = F_0 - F$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CdTe 量子点和金霉素的荧光光谱特性

在室温条件下,考察加入金霉素溶液前后 CdTe 量子点的荧光光谱特性,结果如图 1 所示。由图 1

like peptide-1 receptor agonist therapy add value in the treatment of type 2 diabetes? Focus on exenatide [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2009, 86: 26-34.

[2] 宣吉明,高静,黄景彬,等.艾塞那肽缓释微球的制备和体外释放的研究[J].第二军医大学学报,2011,32(7):772-775.

[3] Liu Bin, Dong Qingguang, M Wang engshu, *et al.* Preparation, characterization, and pharmacodynamics of exenatide-loaded poly(*D, L*-lactide-co-glycolic acid) microspheres [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(11):1474-1479.

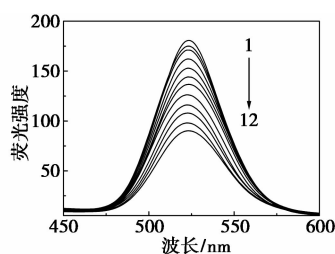
[3] 刘玉雪,付金香,赖伊丽,等. RP-HPLC 法测定醋酸艾塞那肽的含量[J].西北药学杂志,2010,25(2):90-91.

[4] Xuan Jiming, Lin Yaling, Huang Jingbin, *et al.* Exenatide-loaded PLGA microspheres with important glycemic control: In vitro bioactivity and in vivo pharmacokinetic profiles after subcutaneous administration to SD rats [J]. *Peptides*, 2013, 46: 172-179.

[5] 石琳,董庆光,王春雨,等. HPLC 法测定注射用艾塞那肽中主药的含量[J].中国当代医药,2009,16(8):122-123.

[6] Li Kun, Yu Lin, Liu Xiaojun, *et al.* A long-acting formulation of polypeptide drug exenatide in treatment of diabetes using an injectable block copolymer hydrogel [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 2834-2842.

[7] Liang Rongcai, Zhang Renyu, X Liang, *et al.* Stability of exenatide in poly(*D, L*-lactide-co-glycolide) solutions: A simplified investigation on the peptide degradation by the polymer [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 50: 502-510. ■



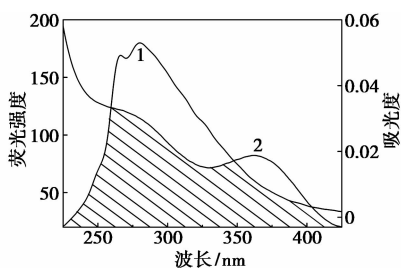
1— $0.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 2— $0.5 \times 10^{-6}$  mol/L; 3— $1.0 \times 10^{-6}$  mol/L;  
4— $2.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 5— $3.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 6— $4.0 \times 10^{-6}$  mol/L;  
7— $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 8— $6.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 9— $7.0 \times 10^{-6}$  mol/L;  
10— $8.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 11— $9.0 \times 10^{-6}$  mol/L; 12— $9.0 \times 10^{-6}$  mol/L

图1 不同浓度金霉素存在时 CdTe 量子点的  
荧光光谱

可知,加入金霉素溶液后,CdTe 量子点的发射峰波长不变,但荧光强度显著降低;且随着金霉素浓度的增加,CdTe 量子点的荧光强度逐渐降低,据此建立以 CdTe 量子点为探针荧光光度法检测金霉素。

## 2.2 金霉素对 CdTe 量子点的荧光猝灭机理

CdTe 量子点的激发光谱和金霉素的紫外-可见吸收光谱如图 2 所示。由图 2 可知,CdTe 量子点激发光谱宽而连续,最大激发峰位于 280 nm,而金霉素的紫外-可见吸收光谱峰位于 280 nm 和 375 nm 处,二者光谱在 225 ~ 425 nm 范围内有较好重叠。由此推测,金霉素吸收 CdTe 量子点的激发光能量,导致 CdTe 量子点荧光被有效猝灭,二者发生有效的内滤效应,从而构建以金霉素为吸光体、CdTe 量子点为荧光体的非共价偶联荧光传感体系。基于金霉素对 CdTe 量子点的荧光猝灭效应,将金霉素的光吸收信号转换为荧光信号,从而实现金霉素含量的高灵敏测定。



1—CdTe 量子点的激发光谱; 2—金霉素的紫外-可见吸收光谱

图2 CdTe 量子点的激发光谱和金霉素的  
紫外-可见吸收光谱

## 2.3 缓冲溶液 pH 的影响

Tris-HCl 缓冲溶液 pH 对体系相对荧光强度  $\Delta F$  的影响如图 3 所示。由图 3 可知,随着缓冲溶液 pH 的增大, $\Delta F$  逐渐增加,当 pH 为 6.5 时, $\Delta F$  达到

最大值;继续增大 pH, $\Delta F$  逐渐减小。因此选择加入 pH 为 6.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

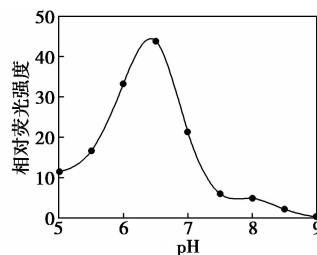


图3 pH 对体系相对荧光强度的影响

## 2.4 CdTe 量子点浓度的影响

CdTe 量子点浓度对体系相对荧光强度  $\Delta F$  的影响如图 4 所示。由图 4 可知,随着 CdTe 量子点浓度的增加, $\Delta F$  逐渐增大,当 CdTe 量子点浓度为  $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L 时, $\Delta F$  达到最大值。因此选择加入  $3.5 \times 10^{-6}$  mol/L 的 CdTe 量子点溶液。

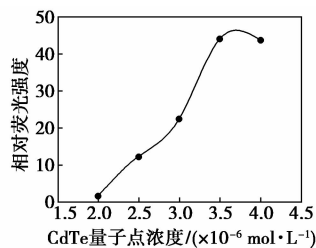


图4 CdTe 量子点浓度对体系荧光强度的影响

## 2.5 反应时间与稳定性

在室温条件下,考察反应时间对体系相对荧光强度  $\Delta F$  的影响,结果如图 5 所示。由图 5 可知,CdTe 量子点和金霉素反应很快,10 min 内  $\Delta F$  达到最大值,且在 20 min 内基本不变。因此选择反应 10 min 后测定体系荧光强度。

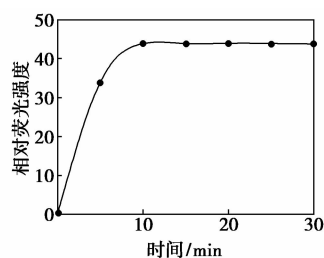


图5 反应时间对体系荧光强度的影响

## 2.6 线性范围和检出限

在最佳实验条件下,取不同浓度金霉素标准溶液加入一定量的 CdTe 量子点溶液中,考察体系相对荧光强度  $\Delta F$  随金霉素浓度的变化关系,结果如图 6 所示。由图 6 可知,金霉素对 CdTe 量子点的荧光猝灭效应明显;金霉素浓度范围在  $5.0 \times 10^{-7} \sim$

$1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 时,体系相对荧光强度  $\Delta F$  与金霉素的浓度呈良好的线性关系,其线性方程为  $\Delta F = 0.14591 + 9.08627c (\times 10^{-6} \text{ mol/L})$ ,相关系数为 0.9994,检出限为  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L(按 3 倍  $SD$ /斜率计算,其  $SD$  为 11 份空白溶液的标准偏差)。

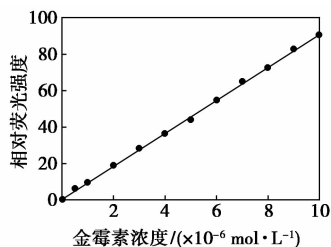


图 6 标准曲线

## 2.7 共存物质的影响

在最佳实验条件下,考察共存组分对金霉素含量测定的影响。当金霉素浓度为  $5.0 \times 10^{-6}$  mol/L,相对误差在  $\pm 5.0\%$  范围内时,500 倍的  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ 、 $NO_3^-$ 、 $SO_4^{2-}$ 、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖和 50 倍的  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、柠檬酸、甘氨酸对测定结果无明显影响;但  $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  对测定结果存在干扰,可用巯基棉处理消除其干扰。

## 2.8 样品测定及回收率实验

取鸡肉样品提取液 3 份,按实验方法和参考方法(HPLC 法)测定金霉素含量<sup>[15]</sup>,同时进行加标回收试验,结果如表 1 所示。从表 1 可知,鸡肉样品未检出金霉素,加标回收率在 96.2% ~ 98.5% 之间,该方法与 HPLC 法检测结果相符,相对标准偏差不高,说明该方法具有很好的精密度。

表 1 鸡肉样品中金霉素含量的测定结果 ( $n=6$ )

样品	空白值 <sup>①</sup> / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	加标量/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	HPLC 法	本法	
			测定值/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	测定值 $\pm$ RSD/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/%
鸡肉 1	—	2.00	1.94	$1.97 \pm 2.0$	98.5
鸡肉 2	—	5.00	4.91	$4.81 \pm 1.8$	96.2
鸡肉 3	—	8.00	7.88	$7.77 \pm 2.5$	97.1

注:①空白值以 HPLC 法检测。

## 3 结论

水热法合成巯基乙酸修饰的 CdTe 量子点,基于金霉素和 CdTe 量子点之间发生内滤效应导致 CdTe 量子点的荧光被有效猝灭,建立一种测定金霉素含量的荧光猝灭法。该方法简单,灵敏度高,选择

性好,可用于鸡肉中金霉素含量的快速检测。利用荧光内滤效应将金霉素的光吸收信号转变为高灵敏的荧光信号,将为设计该类药物的荧光光度法提供新思路。

## 参考文献

- [1] 杨琳. 动物性食品中土霉素、金霉素和四环素检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(8): 63-66.
- [2] 阿布都拉·艾尼瓦尔, 加列西, 阿布都瓦依提·玉苏甫. 紫外光度法测定蜂蜜中残留土霉素和盐酸金霉素的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(3): 182-184.
- [3] 黄志良. 高效液相色谱法测定肉中金霉素含量[J]. 食品工业科技, 2000, 21(5): 68-70.
- [4] 孙刚, 袁守军, 彭书传, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定畜禽粪便中的土霉素、金霉素和四环素[J]. 环境化学, 2010, 29(4): 739-743.
- [5] 裴燕, 魏瑞成, 陈明, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中金霉素、差向金霉素[J]. 分析实验室, 2011, 30(4): 54-58.
- [6] 张云涛, 路东, 席仲兴, 等. 金霉素单克隆抗体的制备及检测方法的建立[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(4): 55-59.
- [7] Hu X Y, Zhu K, Guo Q S, et al. Ligand displacement-induced fluorescence switch of quantum dots for ultrasensitive detection of cadmium ions[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 812: 191-198.
- [8] 黄珊, 马建强, 肖琦, 等. 油溶性 CdSe 量子点荧光探针直接检测农药水胺硫磷[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(10): 2853-2857.
- [9] 冯仕云, 张燕萍, 张秋香, 等. 基于荧光法的牛奶中单诺沙星的快速检测[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 325-329.
- [10] 晓红, 罗金平, 田青, 等. 荧光量子点免疫标记法检测炭疽芽孢杆菌[J]. 分析化学, 2011, 39(2): 163-167.
- [11] 李园园, 李培武, 张奇, 等. 量子点标记荧光免疫法检测花生中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(4): 438-442.
- [12] 武冠辉, 翟鹏, 徐茂田. 基于纳米金对荧光素的内滤光效应检测半胱氨酸[J]. 分析实验室, 2012, 31(12): 23-26.
- [13] Zhai Y M, Jin L H, Wang P, et al. Dual-functional Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dumbbell nanoparticles for sensitive and selective turn-on fluorescent detection of cyanide based on the inner filter effect[J]. Chemical Communications, 2011, 47(29): 8268-8270.
- [14] Ge S H, Lu J J, Ge L, et al. Development of a novel deltamethrin sensor based on molecularly imprinted silica nanospheres embedded CdTe quantum dots[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79(5): 1704-1709.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20764—2006 可食动物肌肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定液相色谱-紫外检测法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006. ■