

分析与测试

基于硅纳米粒子的荧光探针高灵敏检测牛奶中的青霉素

王升匀¹, 李春荣^{*1}, 孟铁宏¹, 赵鸿宾¹, 廖德君¹, 陶晨¹, 张祥令²

(1. 黔南民族医学高等专科学校 科技研发中心, 贵州 都匀 558000;

2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 561113)

摘要:以 N-氨乙基-Y-氨丙基三甲氧基硅烷和荧光素钠为原料, 水热法合成了一种在 450 nm 处发射蓝色荧光的硅纳米粒子(DFC)。利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、X-射线光电子能谱(XPS)、透射电镜(TEM)、Zeta 电位、紫外-可见吸收光谱等对 DFC 进行结构表征和光谱性能分析。通过将 DFC 与铬离子(Cr^{3+})作用, 构建了一种可以检测青霉素(Penicillin G, PG)的荧光探针 Cr^{3+} @DFC。当 PG 存在时, Cr^{3+} @DFC 的荧光回升。在 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 检测浓度范围内, 荧光回升效率与 PG 浓度呈良好的线性关系。线性方程为 $y=71.26x+0.478$, $R^2=0.99$, 检出限为 0.023 $\mu\text{g/mL}$ 。方法操作简便、灵敏度高, 可用于牛奶样品中 PG 的检测, 具有广阔的推广及应用前景。

关键词:硅纳米粒子; 青霉素; 荧光探针; 牛奶样品; 荧光检测

中图分类号: O65 文献标识码: A 文章编号: 0258-3283(2025)02-0073-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0426

Highly Sensitive Detection of Penicillin G in Milk by Fluorescence Probe Based on Silicon Nanoparticle WANG Sheng-yun¹, LI Chun-rong^{*1}, MENG Tie-hong¹, ZHAO Hong-bin¹, LIAO De-jun¹, TAO Chen¹, ZHANG Xiang-ling² (1. Technology Research and Development Center, Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558000, China; 2. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China)

Abstract: The silicon nanoparticle (DFC) that emits blue fluorescence at 450 nm was synthesized by using the reagents of N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl] ethylenediamine and fluorescein sodium salt. The structural characterization and spectral performance analysis of DFC were carried out by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), transmission electron microscope (TEM), Zeta potential and ultraviolet-visible absorption spectrum. Based on the performance DFC can be quenched by Cr^{3+} ion, a fluorescent probe of Cr^{3+} @DFC for the detection of penicillin G (PG) was prepared. The fluorescence of the Cr^{3+} @DFC probe was recovered in the presence of PG. There was a good linear relationship between fluorescence recovery efficiency and PG concentration in the range of 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$. The detection limit is 0.023 $\mu\text{g/mL}$, and the linear equation was $y=71.26x+0.478$, $R^2=0.99$. The method is easy to operate and has high sensitivity to detect PG in milk samples, which offers a promising application prospect.

Key words: silicon nanoparticle; penicillin G; fluorescence probe; milk sample; fluorescence detection

抗生素是由生物体内产生的具有抵抗病毒次级代谢物, 过量抗生素的使用不仅抑制细胞的正常生长, 同时也对人类的健康安全造成潜在的威胁^[1-3]。特别是抗生素滥用后通过动物食物链的传递而进入人体, 当积累的抗生素达到一定量之后, 就会对人体健康带来危害。青霉素(Penicillin G, PG)作为抗生素的一种, 广泛被应用于畜牧养殖和疾病防治^[4,5]。牛奶作为动物源性食品, 因其口感好、蛋白含量高, 已经成为人们日常生活中必不可少的食品之一, 因此牛奶的食品安全保障也成为了人们关心的热点。目前, 食品中抗生素检测的方法有高效液相色谱-串联质谱法^[6]、液相

色谱-紫外-质谱法^[7]、液相色谱-荧光检测法^[8,9]。仪器检测的方法灵敏度高, 准确, 但需要比较复杂的样品前处理过程, 分析时间比较长。另外抗生

收稿日期: 2024-10-04; 修回日期: 2024-11-16

基金项目: 黔南民族医学高等专科学校基金资助项目(QNYZ202144, 202105, 202106, 202201, 2022003, 2022005, 2023002); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术课题资助项目(QZYY-2024-138); 贵州省科技厅基金资助项目(黔科合基础-ZK[2022]一般552)。

作者简介: 王升匀(1968-), 男, 贵州都匀人, 学士, 副教授, 主要研究方向为食品及生化分析。

通讯作者: 李春荣, E-mail: lichunrong68@163.com。

素的检测方法又拓展到了酶联免疫分析法^[10-12]、微生物法^[13]、毛细管电泳法等^[14,15]。免疫分析是根据抗原抗体之间的特异性反应进行检测的分析方法,虽然该方法灵敏度高,样品检测数量大,重现性好,但也存在无法检测合适对应抗原的抗生素的缺陷。微生物法因操作简单、检测时间短、成本低,是目前应用最广泛的检测抗生素的方法,但检测的灵敏度比较低,不适合痕量和微量分析。毛细管电泳法虽然检测所用样品量少,检测快,但检测的灵敏度低。因此,建立一种高效、高灵敏、准确度高,低成本的抗生素检测方法是非常必要且具有重要意义。

硅纳米粒子是一种粒径较小(一般在 10 nm 以下)的纳米微粒^[16],其原料在自然界中广泛存在,来源易得。硅纳米粒子具有优异的光学、电学性能和良好的生物相容性,在化学、生物、医学领域具有良好的应用前景^[17-19]。2019 年,Wei 等^[20]通过合成绿色荧光硅纳米粒子,实现了灵敏检测血红蛋白。Reddy 等^[21]以富含硅的马尾草为前体,通过水热法制备了蓝色荧光硅纳米粒子,并通过荧光淬灭的方式实现了铁离子的检测。Huang 等^[22]通过 N 掺杂的方式,制备了硅量子点并建立了荧光开关策略,实现了银离子和过氧化氢的双检测,Ren 等^[23]通过掺杂铈制备了双发射硅点,实现了对四环素灵敏检测和手机成像分析。基于硅纳米粒子优异的荧光性能和应用,本文通过水热法制备了一种水溶性的蓝色荧光硅纳米粒子(DFC),通过金属铬离子(Cr^{3+})对 DFC 的荧光淬灭作用构建了荧光探针 Cr^{3+} @DFC,其荧光处于“OFF”状态,当 PG 存在时, Cr^{3+} @DFC 的荧光信号得到回升,荧光呈“ON”状态,因此基于荧光“开-关-开”的策略,可建立一种快速、高灵敏检测

PG 的分析方法(图 1)。该方法不仅简单、快速、而且准确度高,具有可应用于实际样品检测的良好前景。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

FL970 型荧光光谱仪、UV2500 型紫外-可见吸收光谱仪(上海天美科学仪器有限公司);Litesizer™ 500ZETA 型电位及纳米粒度分析仪(安东帕(上海)商贸有限公司);PHS-3C⁺型智能酸度计(成都世纪方舟科技有限公司);Spectrum Two™型红外光谱仪(珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司);LVO-0B 型真空干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司);EX125DZH 型电子分析天平(奥豪斯仪器(常州)有限公司);XD-52A 型旋转蒸发器(上海贤德实验仪器有限公司)。

N-氨乙基-Y-氨丙基三甲氧基硅烷(DAMO, 上海麦克林生化科技股份有限公司);荧光素钠(FS, 上海碧云天生物技术股份有限公司);柠檬酸、氯化铬、抗坏血酸、氨基酸(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);青霉素(98%,广州齐迈克林科技有限公司)。此外,实验用水均采用 Milli-Q(Millipore)超纯水净水器纯化后的超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, 25°C)。

1.2 硅纳米粒子制备

准确称取 30 mg 荧光素钠溶于 8 mL 去离子水中,向其加入 2 mL DAMO 混合,然后再加入 1 mmol 柠檬酸,充分混合均匀后,将溶液转入聚四氟乙烯反应釜内衬于 200°C 反应 4 h,得到蓝色荧光硅纳米粒子。用分子截留量 1 KD 的透析袋透析 24 h,期间每 4 h 换一次超纯水,收集透析液并减压浓缩,浓缩液预冷后进行真空冷冻干燥,得到橙色硅纳米粒子粉末。

1.3 Cr^{3+} @DFC 淬灭体系构建

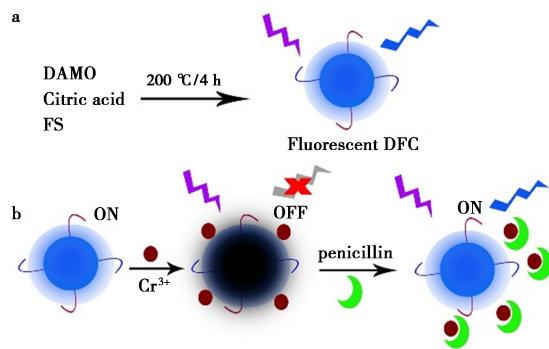
固定 DFC 体积 $20 \mu\text{L}$,加 $100 \mu\text{L}$ Cr^{3+} 标准溶液,然后加水定容至 $500 \mu\text{L}$,涡旋混合均匀,测体系的荧光强度。

1.4 DFC 对青霉素的检测

利用 DFC 与 Cr^{3+} 构建的淬灭体系(Cr^{3+} @DFC)作为检测探针,将青霉素加入 Cr^{3+} @DFC 淬灭体系,混合均匀,静置一段时间后测试荧光强度。

1.5 样品制备

以超市某品牌纯牛奶为测试对象,将 500 mL



a. DFC 的制备; b. DFC 检测 PG 的传感机理

图 1 原理示意图

Fig.1 Mechanism schematic diagrams

(0.1 mol/L)柠檬酸溶液与 312.5 mL(0.2 mol/L)磷酸氢二钠溶液混合,氢氧化钠溶液调至 pH 3.95~4.05,将 30.25 g 乙二胺四乙酸二钠放入其中,使其混合均匀。准确称取 5 g 纯牛奶,加入上述缓冲溶液定容至 50 mL,涡旋混合 1 min,冰水浴超声 10 min,转至 50 mL 离心管中冷却至 0~4 °C,5 000 r/min 离心 10 min,再用快速滤纸过滤,得到牛奶测试样品。

1.6 干扰性试验

为测试荧光探针 Cr^{3+} @DFC 对 PG 的选择性,实验测试了在相同条件下一些常见抗生素、氨基酸等小分子物质如链霉素(STR)、氯霉素(CHL)、葡萄糖(L-Glu)、甘氨酸(L-Gly)、半胱氨酸(L-Cys)、丝氨酸(L-Ser)、天冬氨酸(L-Asp)、酪氨酸(DL-Tyr)等存在下体系的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 光谱测试及结构表征

利用 UV-Vis 和荧光光谱仪对 DFC 进行了光谱性质测试。在波长 400 nm 处 DFC 具有较为明显的紫外吸收,荧光发射峰和激发峰峰型对称,强度相当,且无明显拖尾现象。说明制备的 DFC 颗粒均匀,并且在水溶液中具有较好的分散性能。在紫外暗箱下,DFC 发出明亮的蓝色荧光(图 2a 和内插图)。通过扫描不同激发波长下 DFC 的荧光发射,发现 DFC 的荧光发射峰不随激发波长的改变而改变,具有典型的硅纳米粒子特性,在 360 nm 激发下,DFC 在 450 nm 处具有最强的荧光信号,因此后续进行荧光测试实验时,均选择 360 nm 作为最佳激发波长进行扫描(图 2b)。

通过 FT-IR 对 DFC 进行红外光谱表征,在 $1\,099\text{ cm}^{-1}$ 处为 Si—O 键的吸收峰,在 $1\,366\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—N 键的伸缩振动吸收峰,在 $1\,646$ 、 $3\,242\text{ cm}^{-1}$ 处出现吸收峰,说明有 N—H 官能团(图 2c)。通过 X-射线光电子能谱仪对 DFC 进行 XPS 全谱扫描可知, Si2p、C1s、N1s、O1s 的信号分别出现在 102.4、248.8、400.08、532.22 eV 处,与 DAMO 相比,C 的含量最高达到 65.21%,Si 的含量为 18.60%,N 的含量为 13.69%,说明制备的 DFC 表面含有氨基(图 2d)。进一步通过 TEM 对 DFC 进行形貌和粒径表征,DFC 呈规则的球形,具有非常好的分散性,基本没有团聚现象,且颗粒大小比较均匀,粒径约为 4.2 nm(图 3a),通过 Zeta 电位及粒径分析仪测试了 DFC 的表面带电

性能,发现 DFC 的 Zeta 电位值为 -21.2 eV (图 3b)。

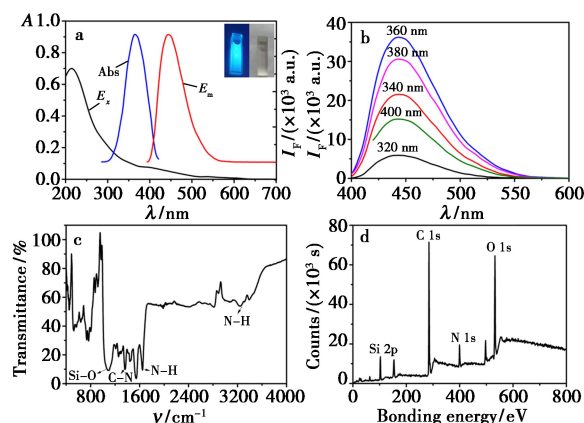


图 2 a.DFC 的 UV-Vis 及荧光光谱, Abs: 吸收光谱, E_x : 激发光谱, E_m : 发射光谱(内插图分别为在日光及暗箱下的颜色); b.DFC 在不同激发下的荧光光谱(320~400 nm); c.红外光谱图; d.XPS 扫描全谱

Fig.2 a.UV-Vis absorbance spectrum and fluorescence spectra of DFC, Abs: absorbance spectrum, E_x : excitation spectrum, E_m : emission spectrum (inset is in daylight and dark, respectively); b.Fluorescence spectra of DFC under different excitation wavelength (320~400 nm); c.FT-IR spectrum of DFC; d.XPS full scan of DFC

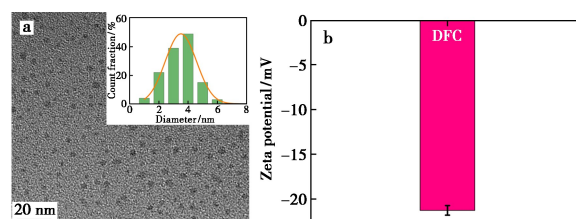


图 3 a.DFC 的透射电镜图及粒径分布; b.Zeta 电位

Fig.3 a.TEM image and diameter distribution of DFC; b.Zeta potential of DFC

2.2 反应条件优化

实验首先对 DFC 的用量进行了优化,固定 Cr^{3+} 的浓度,然后依次加入不同体积的 DFC,使其终浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 $\mu\text{g/mL}$,通过测试体系的荧光强度发现,当 DFC 浓度较低时, Cr^{3+} 对 DFC 的淬灭效率达到 90% 以上,当 DFC 在 40~70 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内时,淬灭效率几乎保持在 85% 左右,继续增大 DFC 用量,淬灭效率出现下降趋势(图 4a)。为保持 DFC 淬灭体系的稳定性和节约试剂,后续实验控制 DFC 的最终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。其次探针的稳定性是建立准确分析方法的关键因素,实验继续测试了 Cr^{3+} @DFC 随时间变化的动力学行为。当向 DFC

中加入 Cr^{3+} 后, DFC 的荧光出现显著淬灭, 并随时间延长而逐渐减弱, 当时间达到 1 200 s 后, 体系的荧光强度基本处于稳定状态。因此选择 1 200 s 作为反应时间 (图 4b)。实验进一步测试了 Cr^{3+} @DFC 探针在不同 pH 条件下的稳定性, 在 $\text{pH}<3$ 强酸和 $\text{pH}>11$ 强碱性条件下, Cr^{3+} @DFC 探针的荧光强度不稳定, 在 $\text{pH} 4\sim 10$ 时, Cr^{3+} @DFC 探针的荧光强度基本处于稳定状态 (图 4c), 水刚好处于探针稳定存在的环境, 因此后续实验选择在超纯水中进行。温度也是影响探针荧光稳定性的一个重要因素, 实验分别在 4、25、37、55 $^{\circ}\text{C}$ 4 个不同的温度下测试了探针的荧光变化。结果表明, 随温度升高探针的淬灭出现微弱上升趋势, 淬灭效率仅有 5% 的微小变化 (图 4d), 考虑后续实际样品检测, 实验选择在室温下进行。

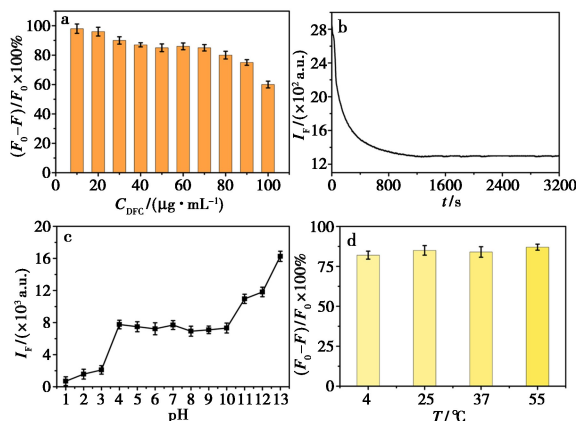


图 4 a. 不同浓度 DFC 对淬灭效率的影响;

b. Cr^{3+} 对 DFC 的动态荧光淬灭; c. pH 对 Cr^{3+} @DFC 稳定性的影响; d. 温度对 Cr^{3+} @DFC 稳定性的影响

Fig.4 a. Effect of different concentrations of DFC on the quenching efficiency; b. Dynamic fluorescence quenching of DFC in the presence of Cr^{3+} ; c. Effect of pH on the stability of Cr^{3+} @DFC; d. Effect of temperature on the stability of Cr^{3+} @DFC

2.3 Cr^{3+} 对 DFC 的荧光淬灭

为测试 Cr^{3+} 对 DFC 的荧光淬灭性能, 在优化条件下, 向固定浓度的 DFC 中加入不同浓度的 Cr^{3+} , 充分反应之后测体系的荧光强度。随 Cr^{3+} 浓度的增加, DFC 的荧光强度逐渐降低, 淬灭效率 $((F_0-F)/F_0 \times 100\%, F_0$: DFC 的荧光强度, F : 加入 Cr^{3+} 之后体系的荧光强度) 逐渐增强 (图 5a), 当 Cr^{3+} 浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$, DFC 的荧光淬灭效率接近 90%, 继续增加 Cr^{3+} 至 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 淬灭效率也只增加了 6% (图 5b), 说明 Cr^{3+} 淬

灭 DFC 荧光后形成了比较稳定的 Cr^{3+} @DFC 探针并处于稳定状态。

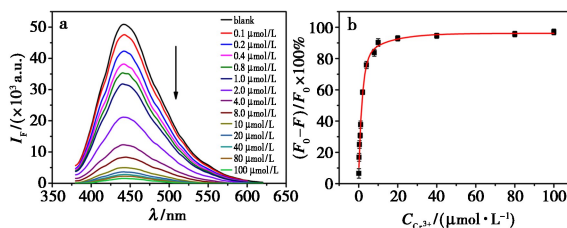


图 5 Cr^{3+} (0~100 $\mu\text{mol/L}$) 对 DFC 的荧光光谱 (a) 和淬灭效率 (b)

Fig.5 Fluorescence spectra (a) and quenching efficiency (b) of Cr^{3+} (0~100 $\mu\text{mol/L}$) toward DFC

2.4 PG 检测

固定探针 Cr^{3+} @DFC 的量, 然后加入不同浓度的 PG, 在相同条件下测试体系的荧光强度。当加入 PG 后, Cr^{3+} 与 PG 分子上的 N 与 $-\text{COOH}$ 之间形成稳定的螯合物, 使 Cr^{3+} 脱离了 DFC 的吸附, 因此 DFC 的荧光得以回升。随 PG 浓度的增加, 体系的荧光强度逐渐回升, 说明 PG 能够回升 Cr^{3+} @DFC 探针荧光, 荧光回升效率也随之增加 (图 6a), (回升效率 $(F-F_0)/F \times 100\%, F_0$: Cr^{3+} 淬灭 DFC 后的荧光强度, F : 向淬灭体系中加入青霉素后回升的荧光强度), 在 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, PG 与荧光回升效率之间呈良好线性关系, 拟合得到线性方程 $y = 71.26x + 0.478, R^2 = 0.99$, LOD 为 0.023 $\mu\text{g/mL}$, 在高浓度范围 2.0~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 内, 拟合的线性方程为 $y = 1.244x + 74.25, R^2 = 0.97$ (图 6b), 说明在较高浓度范围内也可以准确检测 PG。实验还进一步考察了 PG 加入后, Cr^{3+} @DFC 探针荧光回升随时间变化的动力学行为。可以看出, 当 PG 加入后, Cr^{3+} @DFC 的荧光逐步回升, 在前 1 000 s 内, 由于 PG 浓度比较高, 因此荧光回升比较快, 随着时间延

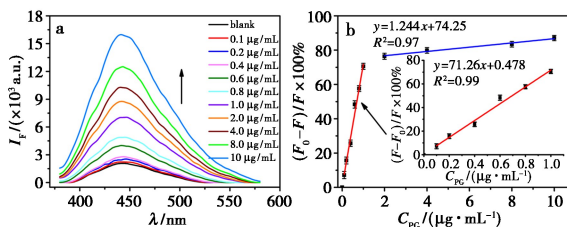


图 6 a. 加入不同浓度 PG 后, Cr^{3+} @DFC 的荧光谱图; b. 回升效率与 PG 浓度之间关系

Fig.6 a. Fluorescence spectra of Cr^{3+} @DFC with different concentrations of PG; b. Relationship between the recovery efficiency and concentrations of PG

- 65-69.
郑颜,范丽霞,董燕婕,梁京芸,苑学霞,王磊,张丙春,李峰,赵善仓.农产品质量与安全,2019,**3**:65-69.
- [14] Mohammad R, Ayatghasmi V, Mahdi L, Zahra E, Ali A R, Sajad S M. *Microchim. Acta*, 2019, **186**(6):1-10.
- [15] Li F, Wang X, Sun X, Guo Y. *RSC Adv.*, 2017, **7**(62):38 981-38 988.
- [16] Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Fujioka K, Manome Y, Sukegawa H, Iwai H, Fukata N. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**(46):18 626-18 633.
- [17] Kryievski A, Mihavlov D, Kilin D. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018, **9**(19):5 759-5 764.
- [18] Rowe D J, Kortshagen U R. *Nano Lett.*, 2013, **13**(3):1 317-1 322.
- [19] Long Y, Zhang L, Yu Y, Lin B, Cao Y, Guo M. *Luminescence*, 2019, **34**(6):544-552.
- [20] Li Q, Peng K T, Yu Y C, Ruan X Y, Wei Y. *Electrophoresis*, 2019, **40**(16):2 129-2 134.
- [21] Adinarayana T V S, Ayushi M, Ishu S, Reddy R K. *Nanoscale Adv.*, 2020, **2**:4 125-4 132.
- [22] Zhu H, Huang D Y, Liu L R, Yin Y H, Wu Y T, Huang Y Q. *Anal. Lett.*, 2020, **33**(1):1-17.
- [23] Ren X H, Ma Z B, Zhang H R, He X W, Li W Y, Zhang Y K. *Talanta*, 2024, **278**(1):126 432-126 439.