

# 基于金纳米粒子的荧光适配体传感器检测食品中的17 $\beta$ -雌二醇

韦庆益, 林轩然, 张佩瑶, 孙大文, 蒲洪彬\*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 现代食品工程研究中心,

广东省冷链食品智能感知与过程控制工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

**摘要:** 利用金纳米粒子 (gold nanoparticles, AuNPs) 对碳量子点荧光的猝灭作用, 以及适配体对靶标的特异性亲和能力构建一种荧光适配体传感器用于高灵敏和高选择性检测17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E2)。在优化条件下 (AuNPs粒径39 nm、AuNPs添加量200  $\mu$ L、猝灭时间20 min、荧光恢复时间60 min), 该传感器的荧光恢复程度与E2浓度 ( $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-9}$  mol/L) 的对数值符合线性关系 $y=58.50x+558.95$ , 决定系数 $R^2$ 为0.992, 得到E2检出限为 $3.4 \times 10^{-10}$  mol/L。最后该传感器成功应用于牛奶和环境水样中E2的加标检测, 得到良好的回收率89.67%~113.36%, 展现出实际应用的潜力。

**关键词:** 碳量子点; 金纳米粒子; 17 $\beta$ -雌二醇; 适配体传感器; 牛奶

## Detection of 17 $\beta$ -Estradiol in Foods by a Fluorescence Aptasensor Based on Gold Nanoparticles

WEI Qingyi, LIN Xuanran, ZHANG Peiyao, SUN Da-wen, PU Hongbin\*

(Academy of Contemporary Food Engineering, Engineering and Technological Research Centre of Guangdong Province on Intelligent Sensing and Process Control of Cold Chain Foods, School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** A fluorescent aptasensor was constructed for the high-sensitivity and high-selectivity detection of 17 $\beta$ -estradiol (E2) based on the fluorescence quenching effect of gold nanoparticles (AuNPs) on carbon quantum dots (CQDs) and the specific affinity of aptamers to targets. Under the optimal conditions (particle size of AuNPs = 39 nm, AuNPs amount = 200  $\mu$ L, quenching time = 20 min, and fluorescence recovery time = 60 min), a good linear relationship was observed between the fluorescence recovery degree ( $y$ ) of the sensor and the logarithmic value ( $x$ ) of E2 concentration ( $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-9}$  mol/L), which was fitted with the following equation:  $y = 58.50x + 558.95$  with a determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.992. The detection of limit (LOD) of E2 was  $3.4 \times 10^{-10}$  mol/L. Finally, the aptasensor was successfully applied to the detection of E2 spiked in milk and environmental water samples with good recoveries of 89.67%–113.36%, suggesting the potential for practical application.

**Keywords:** carbon quantum dots; gold nanoparticles; 17 $\beta$ -estradiol; aptasensor; milk

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220630-340

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 14-0368-09

引文格式:

韦庆益, 林轩然, 张佩瑶, 等. 基于金纳米粒子的荧光适配体传感器检测食品中的17 $\beta$ -雌二醇[J]. 食品科学, 2023, 44(14): 368-376. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220630-340. <http://www.spkx.net.cn>

WEI Qingyi, LIN Xuanran, ZHANG Peiyao, et al. Detection of 17 $\beta$ -estradiol in foods by a fluorescence aptasensor based on gold nanoparticles[J]. Food Science, 2023, 44(14): 368-376. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220630-340. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2020A1515010936);

广东省农产品保鲜物流共性关键技术研发创新团队项目 (2021KJ145; 2022KJ145)

第一作者简介: 韦庆益 (1977—) (ORCID: 0000-0002-5577-2513), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品品质安全检测及其控制技术。E-mail: feweiqingyi@scut.edu.cn

\*通信作者简介: 蒲洪彬 (1979—) (ORCID: 0000-0002-2062-6671), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品检测技术。

E-mail: fehbpu@scut.edu.cn

17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E2) 是一种能够促进动物生长、提高奶牛产奶量的甾体雌激素, 20世纪80年代以来在畜牧业中得到了广泛应用, 但在2003年被欧盟要求永久禁止在畜禽养殖业中使用<sup>[1]</sup>。许多研究报道, E2是一种典型的环境内分泌干扰化学物, 存在于不同国家的地表水中, 并且乳制品中也含有高量的内源性E2<sup>[2]</sup>。毒理学实验表明, 即使低浓度的E2残留物通过食物链进入生物体, 也会干扰正常的内分泌功能, 造成有害影响, 如不孕不育、血脑屏障损伤、乳腺癌和睾丸癌发病率的增加<sup>[3-4]</sup>。E2在畜牧业中的应用在中国也被禁止, 并且国际食品法典委员会和中国食品安全国家标准均规定动物性食品中不得检出E2<sup>[1]</sup>。美国国家环保局在2012年提出地表水中E2的最大残留量为1.47 pmol/L, 日本也在2015年实施了新的规定, 将饮用水中的E2限制在0.294 nmol/L<sup>[5]</sup>。因此, 发展有效的方法灵敏地检测食品样品和水环境中的E2具有重要意义。

迄今为止, 基于高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱、质谱等的仪器分析方法已被广泛应用于E2的检测, 其结果具有较高的准确性和灵敏度, 然而这些方法需要复杂的样品预处理和专业的技术技能<sup>[6-8]</sup>。此外, 基于抗体的免疫方法在E2检测中具有较高的灵敏度和特异性, 然而抗体的产生耗时, 而且易受外界环境的影响<sup>[9]</sup>。适配体是一种单链DNA或RNA, 能与靶标进行特异性结合, 它作为E2识别元件的替代品已经被开发的非常有前景<sup>[10-11]</sup>, 其中与荧光方法相结合的适体传感器因其灵敏度高、特异性强、重复性好、操作简便等优点受到了研究者的广泛关注。碳量子点 (carbon quantum dots, CQDs) 作为一种新兴荧光碳纳米材料, 具有荧光性能稳定、低毒、生物相容性好、易溶于水、易合成和生产成本低等优点, 已被广泛用于构建荧光传感器对环境和食品中的有害物质进行检测<sup>[12-15]</sup>。荧光传感器常利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 效应改变探针的荧光强度, FRET简单来说就是当荧光供体 (此为CQDs) 的发射光谱与猝灭剂的紫外-可见吸收光谱重叠, 且CQDs与猝灭剂的距离在10 nm以内, 处于激发态的CQDs就会将能量转移至处于基态的猝灭剂, 表现出CQDs荧光的猝灭<sup>[16]</sup>。常见的荧光猝灭剂种类较多, 其中金纳米粒子 (gold nanoparticles, AuNPs) 凭借其易于控制的粒径大小、良好的生物相容性和优异的荧光猝灭能力而广泛用于光学和生物传感器之中<sup>[17]</sup>。

综合考虑, 本实验拟将CQDs与AuNPs结合, 利用FRET效应构建一种荧光适体传感器用于E2的检测。首先通过酰胺反应将E2的短链适配体P1连接在CQDs上, AuNPs加入后适配体会与AuNPs靠近, 从而触发CQDs与

AuNPs间的FRET效应, 导致CQDs的荧光猝灭。当加入目标物E2后, 适配体P1与E2间更强烈的亲和力使P1从AuNPs表面脱离, CQDs的荧光得以恢复, 并以此建立荧光恢复强度与E2浓度的线性关系, 达到定量检测E2的目的。此外该荧光短链适体传感器对牛奶和环境水样中的E2进行检测, 其结果与HPLC方法结果一致, 以证明该传感器在实际应用中的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

柠檬酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)、乙二胺 (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>)、柠檬酸三钠 (trisodium citrate, Tc, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>)、1-(3-二甲胺丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS) 上海麦克林生物化学有限公司; 四氯金酸 (chloroauric acid, HAuCl<sub>3</sub>·HCl·4H<sub>2</sub>O)、双酚A (bisphenol A, BPA)、己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES)、雌酮 (estrone, E1)、三氟乙酸 上海阿拉丁试剂有限公司; E2、雌三醇 (estriol, E3) 上海源业生物科技有限公司; E2短链适配体<sup>[18]</sup> (P1, 5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-AAG GGA TGC CGT TTG GGC CCA AGT TCG GCA TAG TG-3') 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PB, pH 7.2, 10 mmol/L) 用KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O制备。除注明外, 所有试剂都是分析纯, 未进行进一步的纯化。整个实验过程使用的是由Milli-Q水净化系统净化的超纯水。DNA试剂均用超纯水溶解配制后置于-20 °C冰箱冷藏。

### 1.2 仪器与设备

AL204电子天平 梅特勒-托利多仪器公司; DKZ-2B恒温水浴摇床 上海一恒科学仪器有限公司; TW-3021HR高速冷冻离心机 安徽嘉文仪器装备公司; JUPITER-B高通量微波消解/萃取仪 上海新仪科技有限公司; RF-6000荧光分光光度计、UV-1800紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; Merlin FE-EM扫描电子显微镜 德国卡尔蔡司公司; JEM-1400 Plus透射电子显微镜 日本JEOL公司; Nicolet-iS50傅里叶红外光谱 (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) 仪 美国赛默飞科技公司; Acquity Are高效液相色谱仪 上海沃特世科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 CQDs的制备及表征

CQDs制备参照本团队之前的研究<sup>[19]</sup>, 利用高通量封

闭式微波消解/萃取仪快速完成。具体步骤是先将2 g柠檬酸和1.043 mL乙二胺分别作为碳源和氮源溶解在20 mL超纯水中,溶解完全后将其放入微波消解仪中,仪器的加热温度和加热功率分别设为200 °C、600 W,加热5 min即完成了CQDs的快速制备。获得的溶液自然冷却后首先用0.22 μm的微孔膜过滤,然后用截留分子质量为1 000 Da的透析袋透析36 h以获得纯化的CQDs溶液,将其贮存在4 °C的冰箱中备用。CQDs的形貌大小通过透射电子显微镜进行观察,其光学性质通过紫外-可见(ultraviolet-visible, UV-Vis)光谱和荧光光谱进行研究,另外通过FTIR探究CQDs表面官能团的种类。

### 1.3.2 CQDs-P1的制备及表征

E2短链适配体(P1)在CQDs上的标记参考Cao Xiaodong等<sup>[20]</sup>的步骤,首先称取40 mg EDC和20 mg NHS溶解在2 mL PB中,将上述纯化后的2 mL CQDs溶液混合并持续振荡1 h以活化CQDs上的羧基,随后加入10 μL浓度为100 μmol/L的P1溶液并于37 °C继续振荡1 h。将获得的CQDs-P1溶液透析12 h以去除多余的P1和CQDs,然后将其储存在4 °C备用。P1的连接通过UV-Vis光谱和琼脂糖凝胶电泳表征。

### 1.3.3 AuNPs的制备与表征

AuNPs制备是以经典的柠檬酸盐还原法<sup>[21]</sup>为基础,稍加调整合成,其所用的玻璃器皿在使用之前均用王水(HCl:HNO<sub>3</sub>=3:1)浸泡过夜然后用超纯水冲洗。制备的具体步骤如下:首先量取60 mL超纯水倒入150 mL锥形瓶中,随即加入1 mL 5 g/L的四氯金酸溶液并将锥形瓶置于磁力加热搅拌器上开始加热,溶液沸腾2 min时开始磁力搅拌(1 000 r/min)并加入700 μL柠檬酸三钠溶液(1%),观察溶液颜色变化,在其颜色稳定后继续加热令其保持沸腾5 min,反应结束后让其自然冷却至室温,体积浓缩5倍后4 °C冷藏待用。后续实验可通过调整柠檬酸三钠溶液的体积制备不同粒径的AuNPs。AuNPs的大小形貌通过SEM图像和UV-Vis光谱表征。

### 1.3.4 实验条件优化

为获得最佳的检测性能,对猝灭剂AuNPs的参数(包括粒径、添加体积)、荧光猝灭时间和E2与P1的孵育时间进行优化。

#### 1.3.4.1 AuNPs粒径优化

按照1.3.1节方法通过添加500、600、700、800 μL和900 μL柠檬酸三钠溶液分别合成粒径约为50、42、39、32 nm和15 nm的AuNPs,将其先作体积5倍浓缩处理,然后移取100 μL浓缩后的AuNPs溶液加入到100 μL CQDs-P1溶液中,再加入300 μL PB使反应总体积为500 μL,轻柔振荡30 min,反应结束后选用激发波长350 nm

对混合溶液在370~600 nm范围内的荧光光谱进行扫描测定,同时将100 μL CQDs-P1溶液加入到400 μL PB溶液中作为对照,观察不同粒径AuNPs对CQDs荧光的猝灭情况。

#### 1.3.4.2 AuNPs添加体积优化

在100 μL CQDs-P1溶液中分别加入100、150、200、250、300 μL浓缩后的39 nm的AuNPs溶液,之后加入PB使反应总体积为500 μL,轻柔振荡30 min,同样地将100 μL CQDs-P1溶液加入到400 μL PB溶液中作为对照,反应结束后对所制样品进行荧光测定,观察添加不同体积的AuNPs对CQDs荧光的猝灭情况。

#### 1.3.4.3 荧光猝灭时间优化

在100 μL CQDs-P1溶液中先加入200 μL浓缩后的39 nm的AuNPs溶液,再加入200 μL PB,分别轻柔振荡5、10、15、20、25、30 min,同样地将100 μL CQDs-P1溶液加入到400 μL PB溶液中作为对照,反应结束后对所制样品进行荧光测定,观察AuNPs加入不同时间后对CQDs荧光的猝灭情况。

#### 1.3.4.4 E2与P1孵育时间优化

在100 μL CQDs-P1溶液中先加入200 μL浓缩后的39 nm的AuNPs溶液,再加入100 μL PB,轻柔振荡20 min后加入100 μL浓度为10<sup>-6</sup> mol/L的E2标准溶液,分别孵育15、30、45、60、75、90 min,反应结束后测量其荧光强度(*F*),同时测量200 μL AuNPs和200 μL PB加入100 μL CQDs-P1中振荡20 min后的荧光强度(*F*<sub>0</sub>),观察E2与P1孵育不同时间后对CQDs荧光的恢复情况。

### 1.3.5 E2标准溶液检测

E2标准品用甲醇溶解成10<sup>-3</sup> mol/L的母液,然后用超纯水稀释成不同浓度待用。对于E2的检测,在100 μL CQDs-P1溶液中先加入200 μL浓缩后的39 nm的AuNPs溶液,再加入100 μL PB,轻柔振荡20 min后分别加入100 μL不同浓度的E2标准溶液(10<sup>-9</sup>~10<sup>-4</sup> mol/L),然后孵育60 min,反应结束后测量其荧光强度(*F*),同时测量200 μL AuNPs和200 μL PB加入100 μL CQDs-P1中振荡20 min后的荧光强度(*F*<sub>0</sub>),观察不同浓度E2溶液加入后对CQDs荧光的恢复情况。

### 1.3.6 实际样品加标检测

考虑到E2的实际存在情况,选用在广东广州超市购买的牛奶作为实际样品进行检测,同时收取中心湖公园(广东广州)的湖水和实验室的自来水进一步验证该荧光适配传感器的实用性。牛奶的前处理过程如下:将5 mL牛奶加入到20%三氟乙酸溶液中,调节pH 4.6,然后将该混合物置于45 °C水浴10 min使牛奶中的蛋白质沉淀,随即在10 °C、10 000 r/min离心15 min,收集上清液并用0.22 μm微孔滤膜过滤2次,然后将其与

500  $\mu\text{g/mL}$ 的E2储备溶液混合,制备E2质量浓度为5、12.5  $\mu\text{g/mL}$ 和25  $\mu\text{g/mL}$ 的实际样品加标溶液。水样的前处理过程如下:自来水简单地用0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤两次,湖水在室温25  $^{\circ}\text{C}$ 沉淀一夜,然后上清液经滤膜过滤两次,其加标溶液的制备与牛奶样品加标溶液的处理过程相同,分别得到5、12.5  $\mu\text{g/mL}$ 和25  $\mu\text{g/mL}$ 的湖水和自来水样加标溶液。实际样品的检测过程按照标准溶液中E2的检测方法(1.3.5节)进行,获得对应的荧光强度,E2最终加标质量浓度为1、2.5、5  $\mu\text{g/mL}$ 。同时对未加标的牛奶样品和水样也进行了检测。另外,采用HPLC对同样加标的实际样品进行检测,进一步验证荧光传感器的检测结果。

#### 1.4 数据分析

所有荧光测量都制备3份平行样品,并且使用平行样的荧光平均值及其标准差作为最终结果。所有数据都由Excel 2019和Origin 2019b软件进行处理和分析。实验选取 $F-F_0$ 为荧光输出信号,其中 $F_0$ 和 $F$ 分别为不存在E2和存在E2时的荧光信号,也即加入AuNPs荧光被猝灭和再加入E2荧光被恢复的荧光强度。此外,按 $3s/k$ 和 $10s/k$ 计算荧光适配传感器的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ),其中 $s$ 为空白样品在442 nm处荧光强度的标准差, $k$ 为标准曲线的斜率<sup>[22]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于AuNPs的荧光适配传感器检测E2的原理

AuNPs是一种消光系数高、具有拉曼增强特性且尺寸容易控制的金属纳米材料,并且基于其高消光系数,AuNPs还是一种优良的荧光猝灭剂,在光学传感中有着出色的表现<sup>[17]</sup>。因此本实验利用AuNPs的荧光猝灭作用建立了一种灵敏、准确、快捷的荧光适配传感器。其检测原理如图1所示,首先利用酰胺反应在CQDs上连接E2的短链适配体P1,形成CQDs-P1,然后通过柠檬酸盐还原法合成了酒红色的AuNPs,当在离心管中加入这二者时,由于适配体碱基间的金属配位作用,AuNPs对适配体具有较强的吸附亲和力<sup>[23]</sup>,CQDs-P1会吸附在AuNPs表面,而CQDs的荧光发射光谱与AuNPs的紫外吸收光谱有较大的重叠,当它们相互靠近时且CQDs与AuNPs的距离在10 nm以内时,处于激发态的CQDs就会将能量转移至处于基态的猝灭剂AuNPs,即FRET效应,表现为CQDs的荧光被猝灭;当目标物E2加入溶液体系后,适配体P1更倾向于与E2结合从而离开AuNPs表面,缺乏近距离这一条件后FRET不再发生,CQDs的荧光得以恢复,因此

可以通过建立E2浓度与荧光恢复程度的线性关系达到定量检测E2的目的。

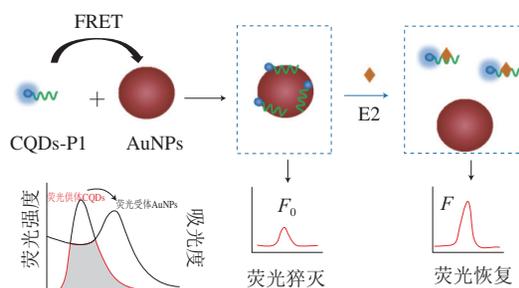
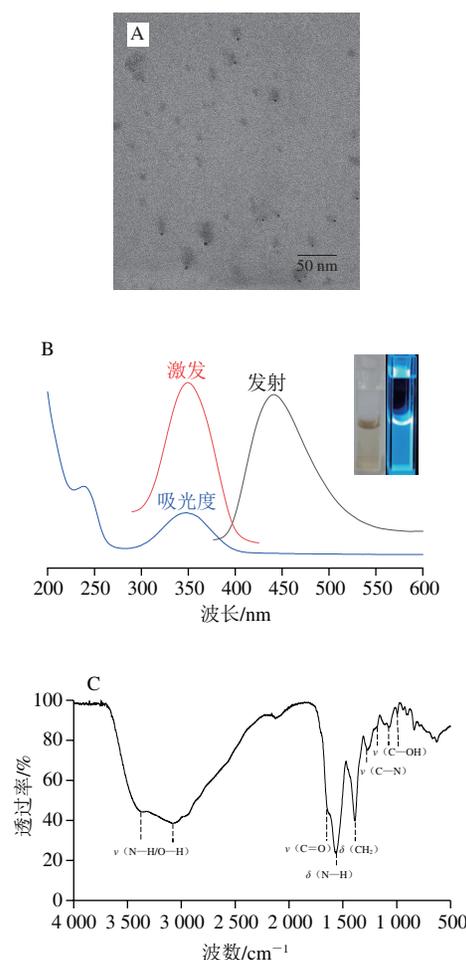


图1 基于AuNPs的荧光适配传感器检测E2的原理图

Fig. 1 Schematic diagram of the fluorescence aptasensor for E2 detection based on AuNPs

### 2.2 CQDs的表征



A.透射电子显微镜; B.荧光光谱和UV-Vis光谱图;插图左为CQDs在日光下的图片,右为365 nm紫外灯照射下的图片; C. FTIR光谱。

图2 CQDs的表征

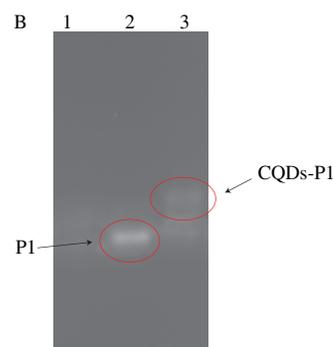
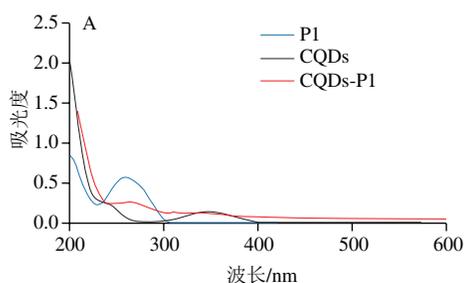
Fig. 2 Characterization of CQDs

通过微波辅助水热法快速合成荧光CQDs,其形貌特征通过透射电子显微镜图像进行观察,如图2A所示,

CQDs外观接近球形并且在溶液中分散均匀, 其粒径在2.0~6.0 nm之间, 平均值在3.5 nm左右。CQDs的紫外和荧光性能如图2B所示, 可以观察到CQDs的最佳荧光激发波长和发射波长分别位于350 nm和442 nm, 并且由于芳香族C=C键的 $\pi-\pi^*$ 跃迁和C=O键的 $n-\pi^*$ 跃迁, CQDs的UV-Vis光谱在239 nm和346 nm处分别有一个吸收峰<sup>[24]</sup>。图2B右上角的插图显示了合成的CQDs在自然光下呈现浅黄色(左), 在365 nm的紫外灯照射下会发出明亮的蓝色荧光(右), 表明制备的CQDs具有良好的荧光性能。此外, 利用FTIR光谱对CQDs表面的官能团进行研究, 结果如图2C所示, 很明显在 $3\ 250\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了一个强宽峰, 这归因于O—H和N—H的伸缩振动<sup>[25]</sup>, 另外在 $1\ 683\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 257\text{ cm}^{-1}$ 观察到的两个吸收峰分别是由C—O和C—N的伸缩振动引起, 在 $1\ 544\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 378\text{ cm}^{-1}$ 出现的吸收峰分别是N—H和—CH<sub>2</sub>的变形振动导致, 最后在 $1\ 186$ 、 $1\ 072\text{ cm}^{-1}$ 和 $992\text{ cm}^{-1}$ 处观察到的弱吸收峰是由C—OH的伸缩振动引起, 这与Liu Yingnan等<sup>[26]</sup>报道的结果一致。FTIR的结果表明CQDs表面氨基、羧基和羟基等诸多官能团的存在, 这也是CQDs具有良好水溶性的原因。

### 2.3 CQDs-P1的表征

通过UV-Vis光谱表征E2短链适配体P1在CQDs上的连接, 如图3A所示, 单独的P1由于其碱基在260 nm观察到明显的紫外吸收峰<sup>[27]</sup>, 单独的CQDs在346 nm和249 nm两个位置出现了紫外吸收峰, 而连接了P1的CQDs同时在346 nm和260 nm左右出现了归属于P1和CQDs的紫外吸收峰, 初步证明了CQDs-P1的形成。图3B是琼脂糖凝胶电泳的实验结果, 泳道1是CQDs, 在紫外灯的照射下观察不到DNA条带的存在, 泳道2是适配体P1, 可以看见清晰明亮的DNA条带出现, 泳道3代表与CQDs反应后的P1, 由于连接了CQDs, P1的迁移率降低<sup>[20]</sup>, 导致其条带明显落后泳道2, 其下方的另外一条条带应该是多余的未连接的P1, 该结果更为有力地证明了CQDs-P1的成功合成。



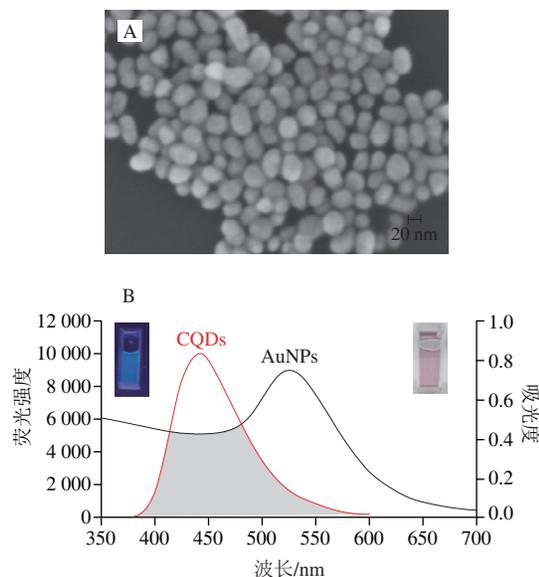
泳道1. CQDs; 2. P1; 3. CQDs-P1。

图3 CQDs、P1和CQDs-P1的UV-Vis光谱(A)和琼脂糖凝胶电泳(B)图

Fig. 3 UV-Vis absorption spectra (A) and agarose gel electropherograms (B) of CQDs, P1 and CQDs-P1

### 2.4 AuNPs的表征

从图4A可以看出, 加入700  $\mu\text{L}$ 柠檬酸盐还原出的AuNPs呈现近圆形, 粒径在30~40 nm范围内, 与理论计算值相近, 但大小均匀性不是很好, 这可能是一步还原法的不足之处。图4B中展示了所合成的AuNPs在527 nm处由于Au的表面等离子体共振所引起的宽紫外吸收带<sup>[28]</sup>, 可以观察到它和CQDs的荧光发射光谱有较大面积的重叠, 符合FRET发生的条件之一, 右上角的插图是AuNPs的图片, 可以看到AuNPs在自然光下呈现粉紫色, 以上结果证明了AuNPs的成功合成和AuNPs作为优良荧光猝灭剂的潜力。



B插图左为CQDs在365 nm紫外灯照射下的图片, 右为AuNPs在日光灯下的照片。

图4 AuNPs的SEM (A)和CQDs的荧光光谱和AuNPs的UV-Vis光谱(B)图像

Fig. 4 SEM image of AuNPs (A) and UV-vis absorption spectra of AuNPs and fluorescence emission spectra of CQDs (B)

## 2.5 E2检测的可行性分析及检测条件优化

### 2.5.1 可行性分析

为确定该荧光适体传感器的可行性，以E2终浓度为 $2 \times 10^{-7}$  mol/L的样品组进行荧光测试。如图5所示，CQDs-P1表示100  $\mu$ L CQDs-P1与400  $\mu$ L PB混合均匀后测试得到的荧光光谱，其荧光强度最高；CQDs-P1 + AuNPs表示200  $\mu$ L AuNPs与200  $\mu$ L PB加入到100  $\mu$ L CQDs-P1溶液中，然后轻柔振荡20 min后测试得到的荧光光谱，可以看出其荧光强度明显降低，证明CQDs的荧光确实能被AuNPs有效猝灭；CQDs-P1 + AuNPs + E2则表示200  $\mu$ L AuNPs与100  $\mu$ L PB加入到100  $\mu$ L CQDs-P1溶液中轻柔振荡20 min，再加入100  $\mu$ L  $10^{-6}$  mol/L E2孵育60 min后测试得到的荧光光谱，相较于被猝灭的荧光强度，能观察到加入E2后其荧光有明显的恢复，证明E2与其适配体结合并将其带离了AuNPs表面，使得CQDs荧光恢复。由此可知，将该荧光适体传感器用于E2的检测可行。

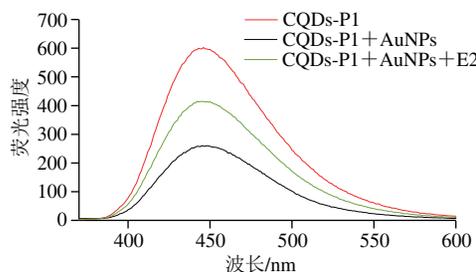
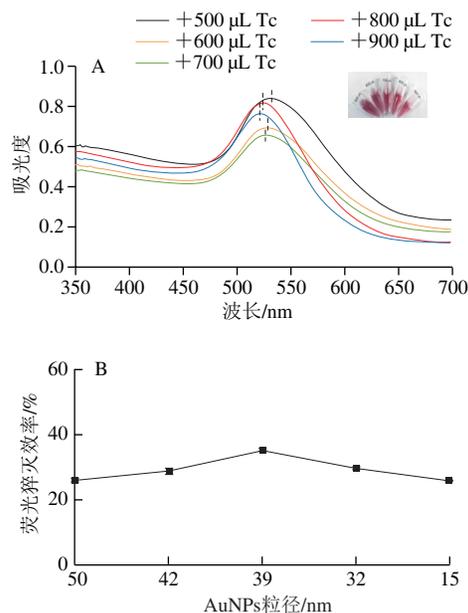


图5 CQDs-P1、CQDs-P1+AuNPs、CQDs-P1+AuNPs+E2的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of CQDs-P1, CQDs-P1 + AuNPs and CQDs-P1 + AuNPs + E2

### 2.5.2 AuNPs粒径优化

为探究不同粒径的AuNPs对CQDs荧光的猝灭效果，首先通过添加不同体积的Tc制备不同粒径的AuNPs，对应UV-Vis光谱如图6A所示，随着Tc溶液添加量从500  $\mu$ L增加到900  $\mu$ L，还原得到的AuNPs其表面等离子体共振峰位置从531 nm逐渐蓝移至522 nm，通过紫外峰位置与AuNPs粒径的关系<sup>[29]</sup>换算得知其粒径分别为50、42、39、32、15 nm，右上角的插图显示了随着粒径的减小（Tc溶液添加量的增加），AuNPs溶液的颜色逐渐由紫红色转变成亮酒红色。随后将合成的不同粒径的AuNPs溶液用于猝灭CQDs的荧光，结果如图6B所示，在AuNPs加入体积固定为100  $\mu$ L的前提下，不同粒径的AuNPs对CODs荧光的猝灭效率相差不大，都能猝灭CQDs 30%左右的荧光，39 nm的AuNPs表现出最佳的荧光猝灭效率，可能是因为这个粒径大小的AuNPs在溶液中比较稳定，并且适合吸附大量的CQDs-P1，因此AuNPs的粒径优化为39 nm。根据紫外吸光度与该粒径大小的AuNP浓度关系<sup>[29]</sup>换算得到，合成并浓缩5倍后39 nm的AuNP浓度大约为 $4.57 \times 10^{-10}$  mol/L。



插图为对应的AuNPs溶液图片。

图6 添加不同Tc体积AuNPs的UV-Vis光谱 (A) 和不同粒径AuNPs对CQDs荧光的猝灭效率 (B)

Fig. 6 UV-Vis spectra of AuNPs with different volumes of added Tc (A) and fluorescence quenching efficiency of AuNPs with different particle sizes on CQDs (B)

### 2.5.3 AuNPs添加体积和猝灭时间优化

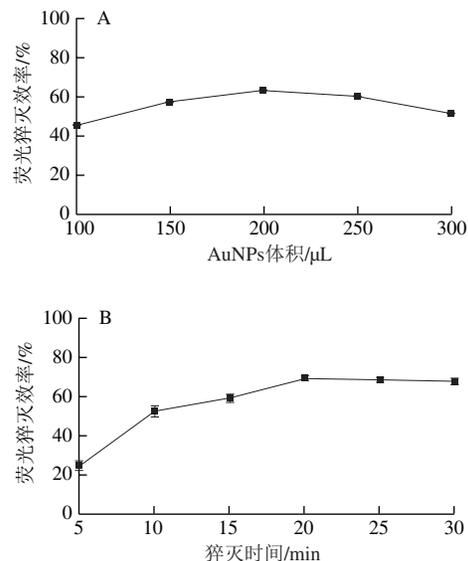


图7 不同AuNPs添加体积 (A) 和AuNPs添加不同时间后 (B) 对CQDs的荧光猝灭效率

Fig. 7 Effect of AuNPs amount (A) and quenching time (B) on fluorescence quenching efficiency of CQDs

在AuNPs粒径优化为39 nm的基础上，进一步对AuNPs的添加体积和猝灭时间进行优化。在CQDs-P1的溶液中分别加入100、150、200、250、300  $\mu$ L的AuNPs溶液进行荧光猝灭实验，结果如图7A所示，随着AuNPs

溶液的添加体积从100  $\mu\text{L}$ 增加到200  $\mu\text{L}$ , CQDs的荧光猝灭程度逐渐增加, 而当AuNPs溶液的添加体积进一步增加时, CQDs的荧光猝灭程度却在逐渐降低, 这可能是因为在溶液体系中AuNPs浓度较大, 容易发生聚集, 导致AuNPs沉降<sup>[30]</sup>, 进而影响到其对CQDs荧光的猝灭, 因此AuNPs的添加体积优选为200  $\mu\text{L}$ 。图7B是200  $\mu\text{L}$ 浓度约为 $4.57 \times 10^{-10}$  mol/L的AuNPs加入到CQDs-P1溶液中不同时间后对CQDs荧光的猝灭效率, 可以看到随着时间的延长, AuNPs对CQDs荧光的猝灭效率越来越高, 说明越来越多的CQDs-P1吸附到AuNPs上, 荧光猝灭效率在20 min之后达到平稳, 此时应该已经达到吸附饱和状态, 因此AuNPs对CQDs的猝灭时间优化为20 min。

#### 2.5.4 E2与P1孵育时间优化

为获得最佳的荧光恢复效果, 对E2加入不同时间后CQDs荧光恢复的情况进行探究。图8是E2与CQDs-P1/AuNPs溶液体系分别孵育15、30、45、60、75、90 min后的相对荧光强度 ( $F-F_0$ ,  $F_0$ 为CQDs荧光被AuNPs猝灭后的荧光强度,  $F$ 为猝灭后再加入E2的荧光强度), 即荧光的恢复程度, 随着孵育时间的延长, 体系的 $F-F_0$ 越来越高, 表明越来越多的P1与E2结合并不再吸附在AuNPs表面, 从而引起CQDs荧光的恢复, 体系的 $F-F_0$ 在60 min后趋于稳定, 表明此时E2能结合的P1达到了最大值。因此荧光的恢复时间优化为60 min。

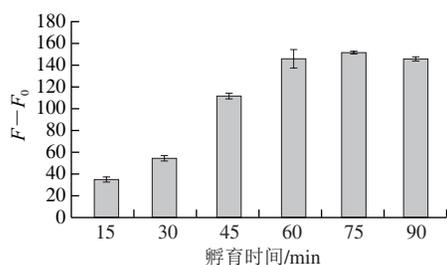


图8 E2与P1孵育不同时间后体系的相对荧光强度

Fig. 8 Effect of incubation time between E2 and P1 on relative fluorescence intensity ( $F-F_0$ ) of the system

#### 2.6 荧光适体传感器检测E2的灵敏度测试

AuNPs可以通过FRET猝灭CQDs的荧光, 而E2加入后会与其适配体P1结合从而破坏FRET, 使得CQDs的荧光有一定程度的恢复, 不同浓度的E2会引起CQDs荧光不同程度的恢复, 基于此可以实现E2的定量检测。在优化的检测条件下, AuNPs先与CQDs-P1溶液混合以猝灭其荧光, 然后加入不同浓度的E2标准溶液 ( $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$  mol/L) 孵育60 min, 反应完成后进行荧光测试, 结果如图9A所示, CQDs-P1溶液具有最高的荧光强度, 加入AuNPs后其荧光被大幅度猝灭 ( $F_0$ ), 随着加入E2浓度的增大, CQDs的荧光强度逐渐恢复的越来越高 ( $F$ ), 可以观察到E2最终浓度低至 $2 \times 10^{-10}$  mol/L

时几乎就起不到恢复CQDs荧光的作用了。以E2最终浓度 ( $2 \times 10^{-9}$ ~ $2 \times 10^{-5}$  mol/L) 的对数值为横坐标, 对应的相对荧光强度为纵坐标绘制标准曲线 (图9B), 拟合得到线性方程 $y=58.50x+558.95$ , 决定系数 $R^2$ 为0.992。在此基础上, 计算出该荧光适体传感器测定E2的LOD为 $3.4 \times 10^{-10}$  mol/L, LOQ为 $1.0 \times 10^{-9}$  mol/L。结果表明, 该传感器对痕量E2的定量检测具有宽广的检测范围和较高的灵敏度。

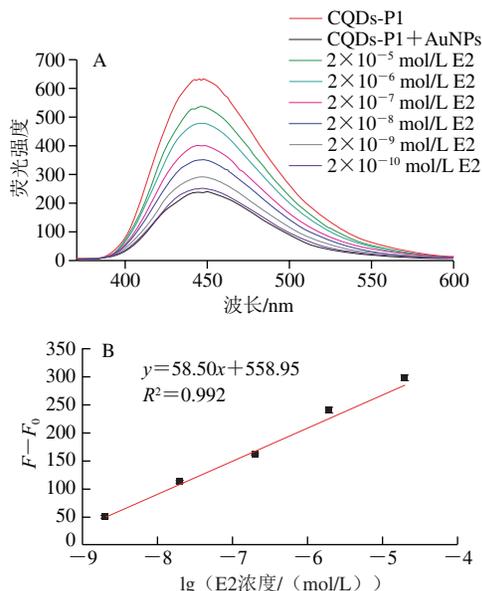


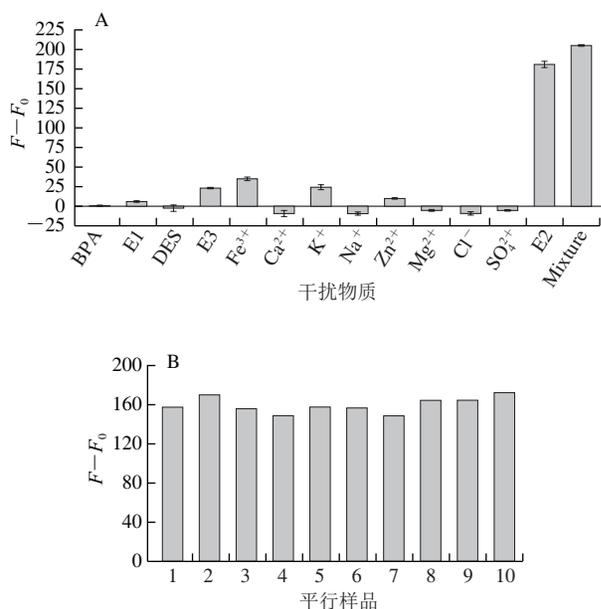
图9 E2适体传感器的荧光光谱 (A) 和适体传感器的 $F-F_0$ 与E2浓度对数值之间的线性关系图 (B)

Fig. 9 Fluorescence spectra of aptasensor with E2 concentration ranging from  $2 \times 10^{-10}$ ~ $2 \times 10^{-5}$  mol/L (A) and linear plot between  $F-F_0$  of aptasensor and logarithm of E2 concentration ranging from  $2 \times 10^{-10}$ ~ $2 \times 10^{-5}$  mol/L (B)

#### 2.7 荧光适体传感器检测E2的特异性及重复性测试

为研究该适体传感器的特异性, 同样地选用E1、E3、DES、BPA这些E2类似物和 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 这些可能与E2共存的离子进行实验, 这些干扰物质的最终浓度为 $2 \times 10^{-6}$  mol/L, E2的最终浓度为 $2 \times 10^{-7}$  mol/L。如图10A所示, 可以看出CQDs荧光被AuNPs猝灭后, 只有加入E2或者将E2连同干扰物一起加入才能引起荧光大幅度的恢复, 而单独加入上述干扰物质几乎不会引起荧光强度的变化, 表明适配体只会特异性地与E2结合从而恢复CQDs的荧光, 该结果证明了所构建的荧光适体传感器在检测E2时具有良好的选择性。另一方面, 为了研究该荧光适体传感器用于E2检测的重复性, 制备了10组E2最终浓度为 $2 \times 10^{-7}$  mol/L的平行样品用于实验, 其对应的相对荧光强度 $F-F_0$ 如图10B所示, 可以看出这10组平行样品的荧光恢复程度

接近, 计算其 $F-F_0$ 的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为5.0%, 说明该荧光适配传感器对E2的检测同样具有良好的重复性。



A: 体系中干扰物浓度为 $2 \times 10^{-6}$  mol/L, E2浓度为 $2 \times 10^{-7}$  mol/L。

图10 E2与不同干扰物加入检测体系后适配传感器(A)和10组 $2 \times 10^{-7}$  mol/L E2平行样品(B)的相对荧光强度

Fig. 10 Relative fluorescent intensities of aptasensor with  $10^{-6}$  mol/L interferences and  $10^{-7}$  mol/L E2 (A) and relative fluorescent intensities of 10 parallel samples of E2 at  $10^{-7}$  mol/L (B)

### 2.8 实际样品中E2的检测

该研究选择牛奶、湖水和实验室自来水作为实际样品对E2进行加标检测, 将其按照1.3.6节经过简单的预处理后制备成E2的加标溶液, 然后与CQDs-P1和AuNPs的混合溶液孵育60 min后进行荧光测试, 其中E2的加标终质量浓度为1、2.5、5  $\mu\text{g/mL}$ 。另外也对未添加E2的牛奶和水样进行了检测, 将其作为对照结果。表1显示在对照中未检测到E2的存在, 原因可能是所选取的牛奶和水样中E2的浓度低于该适配传感器的检出限; 此外, 不同E2加标质量浓度的牛奶样品获得的回收率为89.67%~108.66%, 对应的RSD在3.8%~6.3%之间, 两种水样中得到的E2回收率在90.34%~113.36%之间, RSD均小于5%; HPLC方法检测实际样品中的E2得到的回收率在81.53%~115.44%之间, RSD为0.6%~9.4%。从结果可以得出该荧光适配传感器的检测结果与HPLC方法得到的检测结果较为一致, 表明该荧光适配传感器在监测实际样品中E2的含量时具有良好的准确度和精度<sup>[31]</sup>, 并且有望作为一种简便快捷的传感方法在现实场景中准确灵敏地检测痕量的E2残留。

表1 适配传感器与HPLC方法测定实际样品中E2含量的回收率

Table 1 Recoveries of E2 in spiked real samples by this aptasensor and HPLC

样品	加标量/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测量/ ( $\mu\text{g/mL}$ )		回收率/%		RSD/%	
		适配传感器	HPLC	适配传感器	HPLC	适配传感器	HPLC
	0	—	—				
牛奶	1	0.90	1.09	89.67	109.55	5.3	0.8
	2.5	2.72	2.89	108.66	115.44	6.3	1.3
	5	5.28	5.19	105.65	103.81	3.8	0.6
	0	—	—				
水龙头水	1	0.90	0.82	90.34	81.53	2.6	4.8
	2.5	2.46	2.46	98.35	98.36	2.3	9.4
	5	5.67	4.62	113.36	92.30	2.6	1.1
	0	—	—				
湖水	1	0.94	0.93	93.77	92.5	4.4	4.4
	2.5	2.39	2.35	95.83	93.84	2.1	8.8
	5	5.42	4.59	108.43	91.70	1.4	6.6

注: —未检出。

### 3 结论

利用AuNPs对CQDs荧光的猝灭作用建立了一种用于E2检测的荧光适配传感器, 结果显示该传感器对E2具有宽广的检测范围( $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-9}$  mol/L), 且LOD能达到 $3.4 \times 10^{-10}$  mol/L, E2和其短链适配体的高亲和性赋予了该传感器良好的选择性, 最后将其用于牛奶和湖水等实际样品中E2的检测, 得到的回收率为89.67%~113.36%, RSD为1.4%~6.3%, 其结果与HPLC方法检测E2得到的结果较为一致, 表明该传感器具有实际的应用潜力。

### 参考文献:

- [1] 冯成洪, 林建德, 邵坚, 等. 欧美国家畜禽养殖业中雌激素管理法规及措施[J]. 环境污染与防治, 2011, 33(12): 82-86. DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2011.12.003.
- [2] PU H, HUANG Z, SUN D W, et al. Recent advances in the detection of 17 $\beta$ -estradiol in food matrices: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(13): 2144-2157. DOI:10.1080/10408398.2019.1611539.
- [3] MOORE S C, MATTHEWS C E, OU SHU X, et al. Endogenous estrogens, estrogen metabolites, and breast cancer risk in postmenopausal Chinese women[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2016, 108(10). DOI:10.1093/jnci/djw103.
- [4] NELLES J L, HU W Y, PRINS G S. Estrogen action and prostate cancer[J]. Expert Review of Endocrinology & Metabolism, 2011, 6(3): 437-451. DOI:10.1586/eem.11.20.
- [5] ZHANG G L, LI T, ZHANG J, et al. A simple FRET-based turn-on fluorescent aptasensor for 17 $\beta$ -estradiol determination in environmental water, urine and milk samples[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 273: 1648-1653. DOI:10.1016/j.snb.2018.07.066.
- [6] SHI Y, PENG D D, SHI C H, et al. Selective determination of trace 17 $\beta$ -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC[J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1916-1925. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.12.020.

- [7] ZHANG K, FENT K. Determination of two progestin metabolites (17 $\alpha$ -hydroxypregnanolone and pregnanediol) and different classes of steroids (androgens, estrogens, corticosteroids, progestins) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610-611: 1164-1172. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.08.114.
- [8] AZZOUC A, SOUHAIL B, BALLESTEROS E. Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2011, 84(3): 820-828. DOI:10.1016/j.talanta.2011.02.016.
- [9] DAVIS K A, ABRAMS B, LIN Y, et al. Use of a high affinity DNA ligand in flow cytometry[J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(4): 702-706. DOI:10.1093/nar/24.4.702.
- [10] KU T H, ZHANG T, LUO H, et al. Nucleic acid aptamers: an emerging tool for biotechnology and biomedical sensing[J]. *Sensors (Basel)*, 2015, 15(7): 16281-16313. DOI:10.3390/s150716281.
- [11] YILDIRIM N, LONG F, GAO C, et al. Aptamer-based optical biosensor for rapid and sensitive detection of 17 $\beta$ -estradiol in water samples[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(6): 3288-3294. DOI:10.1021/es203624w.
- [12] GAO X H, DU C, ZHUANG Z H, et al. Carbon quantum dot-based nanoprobe for metal ion detection[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, 4(29): 6927-6945. DOI:10.1039/c6tc02055k.
- [13] LIN X M, GAO G M, ZHENG L Y, et al. Encapsulation of strongly fluorescent carbon quantum dots in metal-organic frameworks for enhancing chemical sensing[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(2): 1223-1228. DOI:10.1021/ac403536a.
- [14] LONG F, SHI H C, WANG H C, et al. Fluorescence resonance energy transfer based aptasensor for the sensitive and selective detection of 17 $\beta$ -estradiol using a quantum dot-bioconjugate as a nano-bioprobe[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(6): 2875-2881. DOI:10.1039/C3RA45554H.
- [15] WANG C K, TAN R, CHEN D. Fluorescence method for quickly detecting ochratoxin A in flour and beer using nitrogen doped carbon dots and silver nanoparticles[J]. *Talanta*, 2018, 182: 363-370. DOI:10.1016/j.talanta.2018.02.007.
- [16] ZU F L, YAN F Y, BAI Z J, et al. The quenching of the fluorescence of carbon dots: a review on mechanisms and applications[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(7): 1899-1914. DOI:10.1007/s00604-017-2318-9.
- [17] LIU B W, LIU J W. Interface-driven hybrid materials based on DNA-functionalized gold nanoparticles[J]. *Matter*, 2019, 1(4): 825-847. DOI:10.1016/j.matt.2019.08.008.
- [18] ALSAGER O A, KUMAR S, ZHU B, et al. Ultrasensitive colorimetric detection of 17 beta-estradiol: the effect of shortening DNA aptamer sequences[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(8): 4201-4209. DOI:10.1021/acs.analchem.5b00335.
- [19] WEI Q Y, LIU T, PU H B, et al. Determination of acrylamide in food products based on the fluorescence enhancement induced by distance increase between functionalized carbon quantum dots[J]. *Talanta*, 2020, 218. DOI:10.1016/j.talanta.2020.121152.
- [20] CAO X D, ZHANG K R, YAN W W, et al. Calcium ion assisted fluorescence determination of microRNA-167 using carbon dots-labeled probe DNA and polydopamine-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles[J]. *Mikrochim Acta*, 2020, 187(4): 212. DOI:10.1007/s00604-020-4209-8.
- [21] WANG K Q, SUN D-W, PU H B, et al. Surface-enhanced Raman scattering of core-shell Au@Ag nanoparticles aggregates for rapid detection of difenoconazole in grapes[J]. *Talanta*, 2019, 191: 449-456. DOI:10.1016/j.talanta.2018.08.005.
- [22] HUSSAIN A, SUN D-W, PU H. Bimetallic core shelled nanoparticles (Au@AgNPs) for rapid detection of thiram and dicyandiamide contaminants in liquid milk using SERS[J]. *Food Chemistry*, 2020. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126429.
- [23] LIU J W. Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: surface science and applications[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14(30): 10485-10496. DOI:10.1039/c2cp41186e.
- [24] GAO Z, WANG L B, SU R X, et al. A carbon dot-based "off-on" fluorescent probe for highly selective and sensitive detection of phytic acid[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 70: 232-238. DOI:10.1016/j.bios.2015.03.043.
- [25] FENG Z B, LI Z L, ZHANG X W, et al. Nitrogen-doped carbon quantum dots as fluorescent probes for sensitive and selective detection of nitrite[J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2061. DOI:10.3390/molecules22122061.
- [26] LIU Y N, XUE H Y, LIU J H, et al. Carbon quantum dot-based fluorometric nitrite assay by exploiting the oxidation of iron(II) to iron(III)[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(2): 129. DOI:10.1007/s00604-018-2668-y.
- [27] QI X L, HU H, YANG Y S, et al. Graphite nanoparticle as nanoquencher for 17-estradiol detection using shortened aptamer sequence[J]. *Analyst*, 2018, 143(17): 4163-4170. DOI:10.1039/c8an00591e.
- [28] JIANG Y F, SUN D-W, PU H B, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): a novel reliable technique for rapid detection of common harmful chemical residues[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 75: 10-22. DOI:10.1016/j.tifs.2018.02.020.
- [29] HAISS W, THANH N T K, AVEYARD J, et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(11): 4215-4221. DOI:10.1021/ac0702084.
- [30] JIANG Y F, SUN D-W, PU H B, et al. Ultrasensitive analysis of kanamycin residue in milk by SERS-based aptasensor[J]. *Talanta*, 2019, 197: 151-158. DOI:10.1016/j.talanta.2019.01.015.
- [31] 李莹. 双酚A和17 $\beta$ -雌二醇的纳米荧光核酸适配体传感器的构建与应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.