

基于光诱导电子转移的比率型发光传感器 定量检测生物样本中的多巴胺

朱润芝, 王 怡, 纳佳雪, 曹乐乐, 张 辉, 王迎辉, 孟 哲

(宁夏大学化学化工学院, 省部共建煤炭高效利用与绿色化工国家重点实验室, 银川 750021)

摘要 长余辉发光材料是一种光致发光材料, 在激发停止后以光的形式将储存的能量缓慢释放出来, 因其优异的光学性能而在生物传感和生物成像领域得到广泛应用. 本文将发光性能优异的双发射长余辉纳米粒子 $\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8: 0.008\text{Eu}^{2+}, 0.10\text{Mn}^{2+}$ (SEM) 和酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 共价偶联, 开发了一种比率型发光传感器 (SEM-TYR), 其可避免自发荧光干扰和外部干扰, 可用于高灵敏、高选择性检测生物样本中的多巴胺 (DA). 当 DA 存在时, 酪氨酸酶将其氧化生成多巴醌, 依据光诱导电子转移 (PET) 原理, SEM-TYR 光致激发的电子部分转移至电子受体多巴醌, 导致 SEM-TYR 中 680 nm 红色余辉猝灭. 在最优实验条件下, 双发射余辉猝灭比值 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 与 DA 浓度呈良好的线性关系, 线性范围为 0.2~10 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2=0.9965$), 检出限为 40 nmol/L. 将该方法用于生物样本血清、尿液及汗液中 DA 的检测, 回收率分别为 94.8%~104.0%, 91.3%~101.6% 和 97.4%~105.2%, $\text{RSD}<6.8\%$ ($n=10$). 所开发的比率型发光传感器用于生物样本中 DA 的检测具有潜在的应用前景.

关键词 比率型发光传感器; 多巴胺; 长余辉纳米粒子; 光诱导电子转移; 无自发荧光

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20230391

A Ratiometric Luminescent Sensor Based on Photoinduced Electron Transfer for Quantitative Detection of Dopamine in Biological Samples

ZHU Runzhi, WANG Yi, NA Jiaxue, CAO Lele, ZHANG Hui,

WANG Yinghui, MENG Zhe*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, State Key Laboratory of High-efficiency Utilization of Coal and Green Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract The persistent luminescence particle material is a type of photoluminescent material that gradually emits stored energy in the form of light once excitation ceases. Owing to its exceptional optical properties, it finds extensive applications in biosensing and bioimaging. In this work, a ratiometric luminescent sensor (SEM-TYR) was developed by covalent coupling of dual-emission long-afterglow nanoparticles $\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8: 0.008\text{Eu}^{2+}, 0.10\text{Mn}^{2+}$ (SEM) with exceptional luminescence performance and tyrosinase (TYR). This innovative design effectively eliminates spontaneous fluorescence interference and external disturbances, enabling highly sensitive and selective detection of dopamine (DA) in biological samples. When DA is present, tyrosinase facilitates its oxidation to dopaquinone, and in accordance with the principle of photoinduced electron transfer (PET), the photoactivated electron moiety of

收稿日期: 2023-09-01. 网络首发日期: 2023-10-31.

联系人简介: 孟 哲, 女, 博士, 教授, 主要从事功能材料的制备及光催化方面的研究. E-mail: meng_z@nxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21966024, 21768003)、宁夏自然科学基金(批准号: 2023AAC03018, 2022AAC03045)和宁夏大学生创新创业训练项目(批准号: S202310749146)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21966024, 21768003), the Natural Science Foundation of Ningxia, China (Nos. 2023AAC03018, 2022AAC03045), and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Ningxia, China (No. S202310749146).

SEM-TYR is transferred to the electron acceptor dopaquinone, resulting in the attenuation of the 680 nm red afterglow observed in SEM-TYR. Under optimized conditions, the ratio $\Delta(I_{680}/I_{460})$ showed a good linear relationship with the dopamine concentration in the range of 0.2–10 $\mu\text{mol/L}$ and the limit of detection limit was 40 nmol/L. The developed method was applied for the detection of dopamine in human serum, urine and sweat after being verified by standard dopamine. Good agreement was achieved and the quantitative recovery was in the range of 94.8%–104.0%, 91.3%–101.6% and 97.4%–105.2%, respectively. The RSD was less than 6.8% ($n=10$). The ratiometric luminescent sensor developed in this study has a potential application prospect in the determination of DA in biological samples.

Keywords Ratiometric luminescent sensor; Dopamine; Persistent luminescence nanoparticle; Photoinduced electron transfer; Autofluorescence-free

多巴胺(DA)是大脑中含量最丰富的儿茶酚胺类神经递质,可调控中枢神经系统的多种生理功能^[1,2].多巴胺水平异常导致不同的神经性系统疾病^[3],如帕金森症^[4]、精神分裂症^[5]和抑郁症^[6]等.因此,建立一种灵敏度高、选择性好、可快速检测多巴胺的方法对神经生理学及临床疾病诊断具有重要意义.

传统的多巴胺检测方法主要包括电化学分析法^[7,8]、毛细管电泳法^[9]、荧光生物传感法^[10]和高效液相色谱法^[11]等.其中,应用荧光量子点检测DA已有诸多报道,如Wang等^[12]报道了氮掺杂碳量子点(N-CQDs)荧光探针用于DA的检测;Chen等^[13]设计了一种基于适体功能化的 MoS_2 纳米片和 MoS_2 量子点作为荧光探针,用于DA的检测.然而,单一荧光信号易受仪器效率、探针浓度等环境因素的干扰,甚至会产生假阳性结果^[14].比率型荧光分析法是通过测定两个不同波长的荧光强度之比实现的,可以有效减少甚至消除环境变化带来的影响.An等^[15]设计了碳点(CD)和7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)的双发射比率荧光传感系统,以快速检测DA.然而,荧光检测不可避免生物样品基质的自发荧光和散射光的干扰,从而影响检测的准确度^[16,17].因此,开发一种无自发荧光和外部干扰的比率型发光传感器具有重要意义.

长余辉材料通过陷阱储存能量,在停止激发后,可在紫外、可见及近红外区持续发光数分钟、数小时甚至数天^[18];因其无需原位激发,可有效避免生物基质中的自发荧光和散射光干扰^[19-21],在生物传感和生物成像方面显示出巨大的优势.Guo等^[22]报道了一种基于绿色发射 $\text{Zn}_2\text{GeO}_4:\text{Mn}^{2+}$ 和红色发射 $\text{ZnGaGeO}_4:\text{Cr}^{3+}$ 的比率型传感器,用于检测谷物中的赭曲霉毒素A;Yan等^[23]报道了一种基于 $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}_{0.001}$ 双发射长余辉纳米粒子的比率型发光适配体传感器,用于食品中黄曲霉毒素B1的测定.然而,基于长余辉的比率型发光传感器定量检测生物样本中的多巴胺目前鲜见报道.

本文制备了一种以 $\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8$ 为发光基质, Eu^{2+} 和 Mn^{2+} 为发光中心,具有发光性能优异的双发射长余辉纳米粒子 $\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8:0.008\text{Eu}^{2+},0.10\text{Mn}^{2+}$ (SEM).SEM和酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)共价偶联,构建了具有双发射的比率型发光传感器(SEM-TYR).该发光传感器在波长为360 nm紫外光的激发下,有460和680 nm两个发射峰, Eu^{2+} 掺杂的460 nm蓝色发射峰对DA浓度无显著变化,而 Mn^{2+} 掺杂的680 nm的红色发射峰被DA猝灭.当DA存在时,SEM-TYR中的TYR将目标物DA氧化生成多巴醌,依据光诱导电子转移(Photoinduced electron transfer, PET)原理,能量供体长余辉的电子转移至能量受体多巴醌,致使红色余辉(680 nm)猝灭.因此,SEM-TYR在460和680 nm处的双发射余辉猝灭比值 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 与DA浓度呈良好的线性关系.比率型余辉检测方法可以有效避免自发荧光干扰和外部干扰,从而提高检测的灵敏度和准确度,实现了复杂生物样品中多巴胺的定量检测.本研究为多巴胺检测方法提供了新思路,同时也拓宽了长余辉材料在生物医学检测领域的应用范围.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

MgO , $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaOH , NaCl , $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$ (EDC)和 N -羟基琥珀酰亚胺(NHS)(纯度>98%,

上海麦克林生化科技有限公司); SrCO₃, SiO₂和Eu₂O₃(纯度>99%, 上海麦克林生化科技有限公司); 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)、二乙醇酸酐、硅酸四乙酯(TEOS)、*N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)和H₃BO₃[纯度>99%, 阿拉丁试剂(上海)有限公司]; 多巴胺(DA)标准品购自麦克林生化科技有限公司; 酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)(1120 U/mg DW)购自生工生物工程(上海)股份有限公司. 实验室用水为超纯水[电阻率>18.2 MΩ·cm, 颇尔富迪生物分析仪器(上海)有限公司].

JEM-2100F型场发射透射电子显微镜(日本电子株式会社); SU8020型场发射扫描电子显微镜(日本日立公司); D8 ADVANCE A25型X射线衍射仪(德国布鲁克AXS有限公司); F-7100型荧光分光光度计(日本日立公司); Nicolet iS50型红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); UV-3600型紫外分光光度计(日本Shimadzu公司); 1600 °C高温管式炉(郑州科佳电炉有限公司).

1.2 比率型生物传感器的制备

1.2.1 长余辉纳米粒子的制备 采用高温固相法合成Sr_{2.992}Mg_{0.9}Si₂O₈:0.008Eu²⁺, 0.10Mn²⁺(SEM)长余辉纳米粒子. 按照化学计量比称取SrCO₃, SiO₂, MgO, Eu₂O₃和Mn(CH₃COO)₂·4H₂O粉末作为起始反应物, 并添加反应物总摩尔量10%的H₃BO₃作为助熔剂. 在玛瑙研钵中将粉末充分研磨后转移至瓷舟中, 置于高温管式炉内于氮气氛围下, 以2 °C/min程序升温至1250 °C, 煅烧3 h. 分别对Eu²⁺和Mn²⁺的掺杂量进行了优化实验, 制备得到系列Sr_{3-x}Mg_{0.85}Si₂O₈:xEu²⁺, 0.15Mn²⁺(x=0.002, 0.005, 0.008, 0.010, 0.150)和Sr_{2.992}Mg_{1-y}Si₂O₈:0.008Eu²⁺, yMn²⁺(y=0.10, 0.15, 0.20)长余辉纳米粒子.

1.2.2 长余辉纳米粒子SEM的表面功能化 将300 mg SEM超声分散在20 mL超纯水中, 剧烈搅拌下依次加入50 μL 1.5 mol/L NaOH, 100 μL APTES和250 μL TEOS, 搅拌反应12 h. 将所得产物离心分离, 用超纯水洗涤3次, 经真空干燥得到氨基功能化的长余辉纳米粒子(SEM-NH₂). 再将200 mg SEM-NH₂分散在DMF中, 加入42.7 mg二乙醇酸酐, 室温下搅拌反应12 h. 将所得产物离心分离, 用超纯水洗涤3次, 经真空干燥得到羧基功能化的长余辉纳米粒子(SEM-COOH).

1.2.3 比率型SEM-TYR传感器的制备 将10 mg SEM-COOH, 20 mg EDC和10 mg NHS分散于3 mL PBS缓冲溶液(0.1 mol/L, pH=6.0)中, 搅拌30 min, 用2 mol/L NaOH将pH调至7.4, 再加入10 mg TYR, 于室温孵育2 h. 将所得产物离心分离, 用PBS缓冲溶液洗涤3次, 收集沉淀, 得到SEM-TYR的传感器, 最后分散在2 mL超纯水中, 得到浓度为5 mg/mL的SEM-TYR溶液, 于4 °C下保存, 备用.

1.2.4 比率型余辉猝灭检测多巴胺 配制10 mmol/L的DA储备液, 用PBS缓冲溶液稀释DA储备液至不同浓度, 将200 μL PBS缓冲溶液(pH=6.8, 10 mmol/L)、100 μL 1.5 mg/mL的SEM-TYR溶液和不同浓度的DA在37 °C下孵育2 h. 使用荧光分光光度计记录余辉信号的变化, 狭缝宽度均为10 nm, 电压为500 V, 延迟时间为100 μs, 激发波长为360 nm, 双发射波长为460和680 nm, 平行测定5次.

1.2.5 选择性考察 分别配制10 mmol/L的金属离子(Na⁺, Ca²⁺, K⁺)溶液和20 mmol/L的生物活性物质尿酸(UA)、抗坏血酸(AA)及葡萄糖(Glu), 参照1.2.4节方法考察传感器的选择性.

1.2.6 生物样本中多巴胺的检测 血液、尿液样本均取自宁夏回族自治区人民医院. 本研究已得到伦理委员会批准, 参与者知情同意. 在室温下令血液自然凝固10~20 min, 以10000 r/min转速离心10 min, 收集上层清液得到血清. 用无菌管收集尿液, 以10000 r/min转速离心10 min, 取上层清样; 用无菌管收集汗液, 以10000 r/min转速离心10 min, 取上层清样. 血清、汗液及尿液样品均用PBS磷酸盐缓冲溶液(10.0 mmol/L, pH=6.8)稀释100倍. 人血液、尿液和汗液中多巴胺含量检测按照1.2.4节方法进行.

2 结果与讨论

2.1 结构及形貌表征

采用高温固相法在Sr₃MgSi₂O₈基质中共掺杂发光中心Eu²⁺和Mn²⁺. 依据Sr_{3-x}Mg_{0.85}Si₂O₈:xEu²⁺, 0.15Mn²⁺(x=0.002, 0.005, 0.008, 0.010, 0.015)和Sr_{2.992}Mg_{1-y}Si₂O₈:0.008Eu²⁺, yMn²⁺(y=0.10, 0.15, 0.20)对Eu²⁺和Mn²⁺的掺杂量进行优化. 如图1(A)所示, 当x=0.008时, 460 nm处的余辉发光强度达到

最大；如图 1(B) 所示， $y=0.10$ 时，460 和 680 nm 处的荧光强度均达到最大。即 $\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8:0.008\text{Eu}^{2+},0.10\text{Mn}^{2+}$ 为最佳制备化学计量比的长余辉纳米粒子。

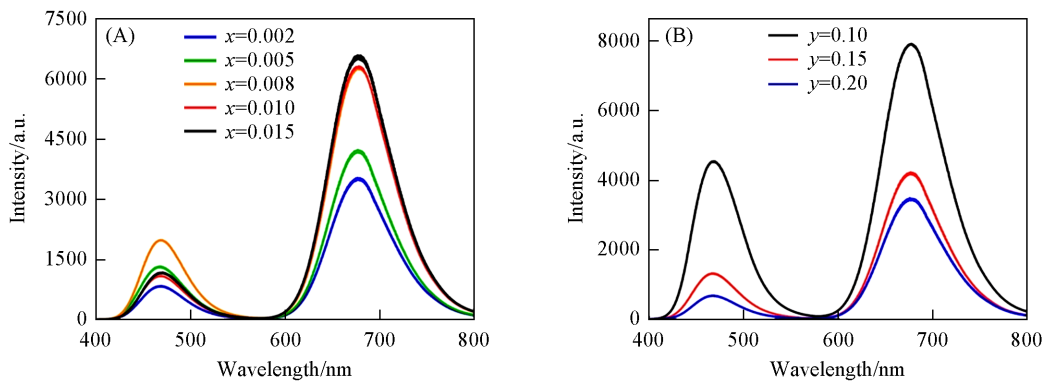


Fig. 1 Emission spectra of SEM with different doping contents of Eu^{2+} (A) and Mn^{2+} (B)

根据文献[24~26]报道，在 $\text{Sr}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$ 中 Sr^{2+} 存在 3 种不同格位，分别为十配位的 Sr(I)、八配位的 Sr(II) 和九配位的 Sr(III)。 Mg^{2+} 和 Si^{4+} 的配位数分别为 6 和 4。其中 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Si^{4+} 的离子半径分别为 0.101、0.072 和 0.040 nm，而掺杂元素 Eu^{2+} 和 Mn^{2+} 的离子半径分别为 0.112 和 0.066 nm。由于 Eu^{2+} 与 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 与 Mg^{2+} 半径相似，当 Eu^{2+} 、 Mn^{2+} 离子掺入 $\text{Sr}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$ 基质时，将分别取代 Sr^{2+} 和 Mg^{2+} 的格位。如图 2(A) 所示，所制备 SEM 的 X 射线衍射谱图的所有衍射峰与 $\text{Sr}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$ 标准卡片 (PDF#10-0075) 基本一致，表明其具有较好的结晶度，属四方晶系。图 2(B) 中透射电子显微镜照片 (TEM) 显示，SEM 为海胆状结构，其海胆核的分布小于 500 nm。由图 2(C) 中 X 射线能谱 (EDS) 元素分布图结果可见，SEM 长

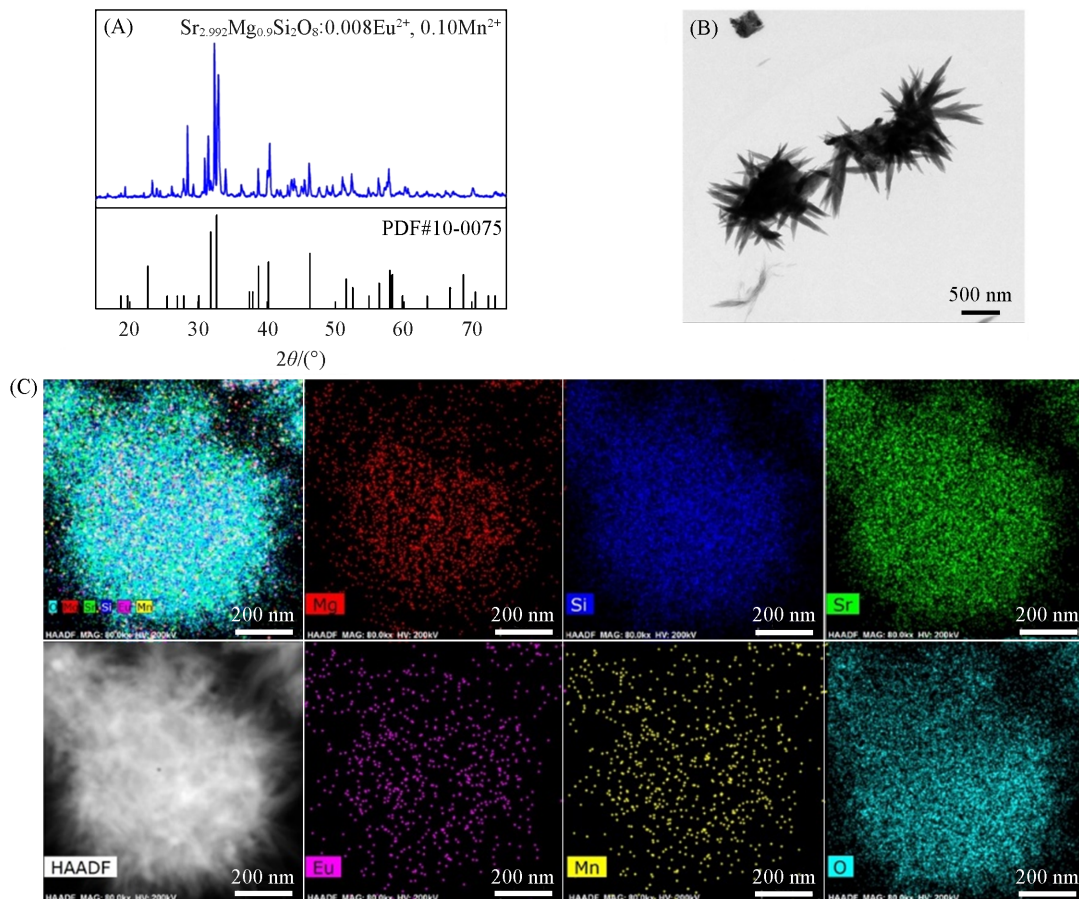


Fig. 2 XRD pattern(A), TEM image(B) and EDS element mapping analysis(C) of SEM

余辉纳米粒子骨架中元素 Sr, Mg, Si, O, Mn 和 Eu 呈均匀分布, 表明 Eu^{2+} 和 Mn^{2+} 已掺杂到基质 $\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8$ 的晶格中.

2.2 长余辉粒子的余辉发光光谱性能

如图 3(A) 所示, SEM 在 290 和 360 nm 处有 2 个激发峰, 由于 DA 在 280 nm 处有紫外吸收, 与长余辉材料 290 nm 激发有较大重叠, 产生内滤效应而猝灭长余辉材料, 因此选择 360 nm 作为激发条件. 在 360 nm 的激发下, SEM 出现 2 个发射峰, 分别位于 460 和 680 nm. 460 nm 处的发射峰是由 Eu^{2+} 的 $4f^65d^1 \rightarrow 4f^7(S_{7/2})$ 跃迁所致^[27], 680 nm 处的发射峰是由 Mn^{2+} 的 ${}^4T_1({}^4G) \rightarrow {}^6A_1({}^6S)$ 跃迁所致^[28]. 由图 3(B) 所示余辉衰减曲线可以看出, 在用 365 nm 紫外灯照射 10 min 后, 所制备的 SEM 在 2 个波长处的余辉发光均可持续 600 s 以上, 证明 SEM 具有良好的余辉发光性能.

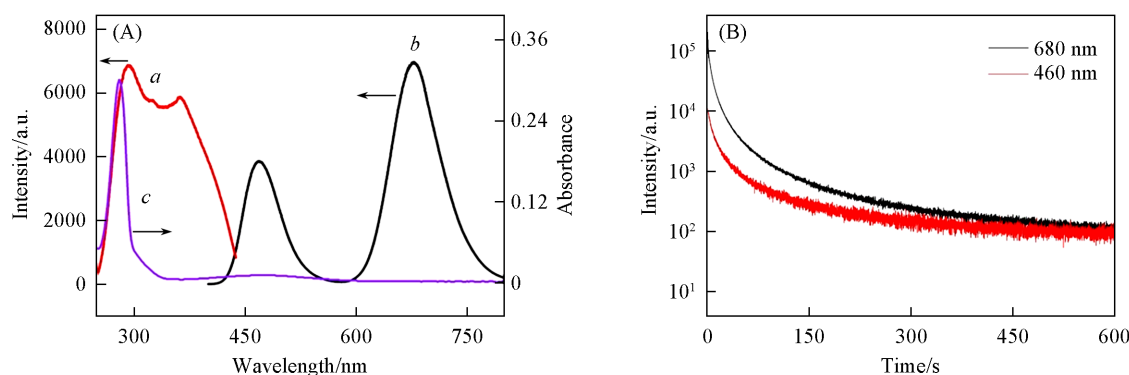


Fig. 3 Excitation spectrum(a), emission spectrum(b) of SEM and UV absorption(c) of DA(A), persistent-luminescence decay curves of SEM nanoparticles monitored at 680 and 460 nm after 365 nm UV light illumination for 5 min(B)

2.3 SEM-TYR 生物传感器的表征

SEM 与 TYR 的偶联通过 SEM-COOH 的羧基与 TYR 的伯胺之间的酰胺缩合来实现. 采用傅里叶变换红外光谱对 SEM 的氨基化和羧基化进行了分析. 如图 4(A) 所示, 3369 cm^{-1} 处的特征红外吸收峰归属于 N—H 的伸缩振动峰, 1660 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C=O 伸缩振动峰, 以上结果表明 SEM-COOH 确已制备. 如图 4(B) 所示, 利用紫外吸收光谱观察了 SEM 与 TYR 的偶联, 偶联物 (即 SEM-TYR) 在 270 nm 处出现了一个典型的 TYR 吸收峰, 证明 TYR 已偶联. 此外, 通过 SEM-TYR 洗脱前后紫外吸收峰强度变化得出偶联效率为 76.28%. 同时观察到在 198 nm 处发生蓝移, 可能归因于 SEM—COOH 和 —OH 之间的氢键作用.

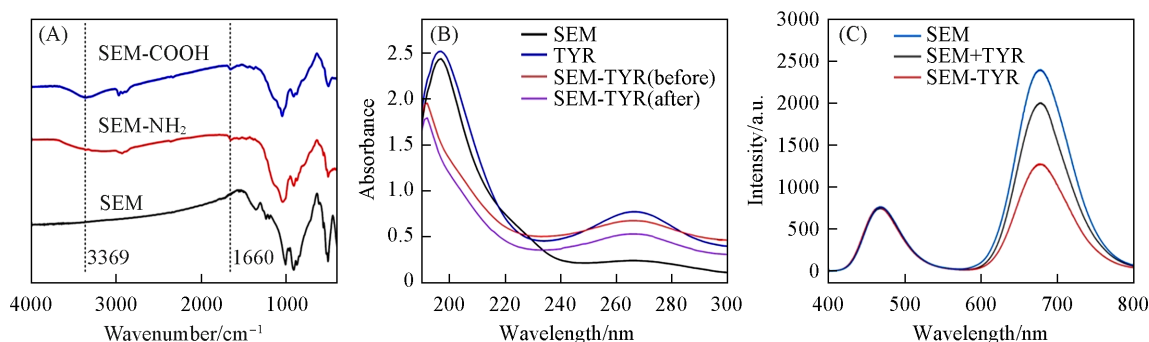


Fig. 4 FTIR spectra of SEM(A) and UV-Vis spectra of SEM, TYR, SEM-TYR(B) and phosphorescence emission spectra of SEM, SEM+TYR and SEM-TYR(C)

为了验证酶偶联后催化活性的变化, 进行了对照实验. 首先, 将 SEM 与 TYR 简单混合 (SEM+TYR), 并将 SEM+TYR 与传感器 SEM-TYR 分别加入 DA (10 $\mu\text{mol/L}$) 后在相同条件下进行检测, 结果如图 4(C) 所示. SEM+TYR 在 680 nm 处的磷光强度仅下降 12%, 下降值明显低于传感器 SEM-TYR. 因

此, 磷光猝灭的显著差异主要原因是TYR与SEM偶联后催化活性的增加.

2.4 光诱导电子转移增强余辉猝灭机制

酶具有专一催化特性, 多巴胺在酪氨酸酶催化下生成多巴醌^[29], 为了探讨SEM/多巴醌体系导致余辉猝灭的机理进行了以下实验. 如图5(A)所示, 多巴胺和多巴醌在300~800 nm范围内均无吸收, 因此排除内滤效应和能量共振转移. 当SEM-TYR受到360 nm紫外光激发时, Eu^{2+} 掺杂的460 nm的蓝色发射峰的强度对DA浓度的变化无显著改变, 而 Mn^{2+} 掺杂的680 nm的红色发射峰的强度被DA猝灭. 从图5(B)可以观察到, 随着DA的浓度从0.1, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 增加到10 $\mu\text{mol/L}$, 680 nm处信号强度发生不同程度地猝灭, 而460 nm处的信号强度基本保持不变, 即SEM-TYR在460和680 nm处双发射余辉猝灭比值 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 与DA浓度呈良好的线性关系, 从而建立比率型发光传感器.

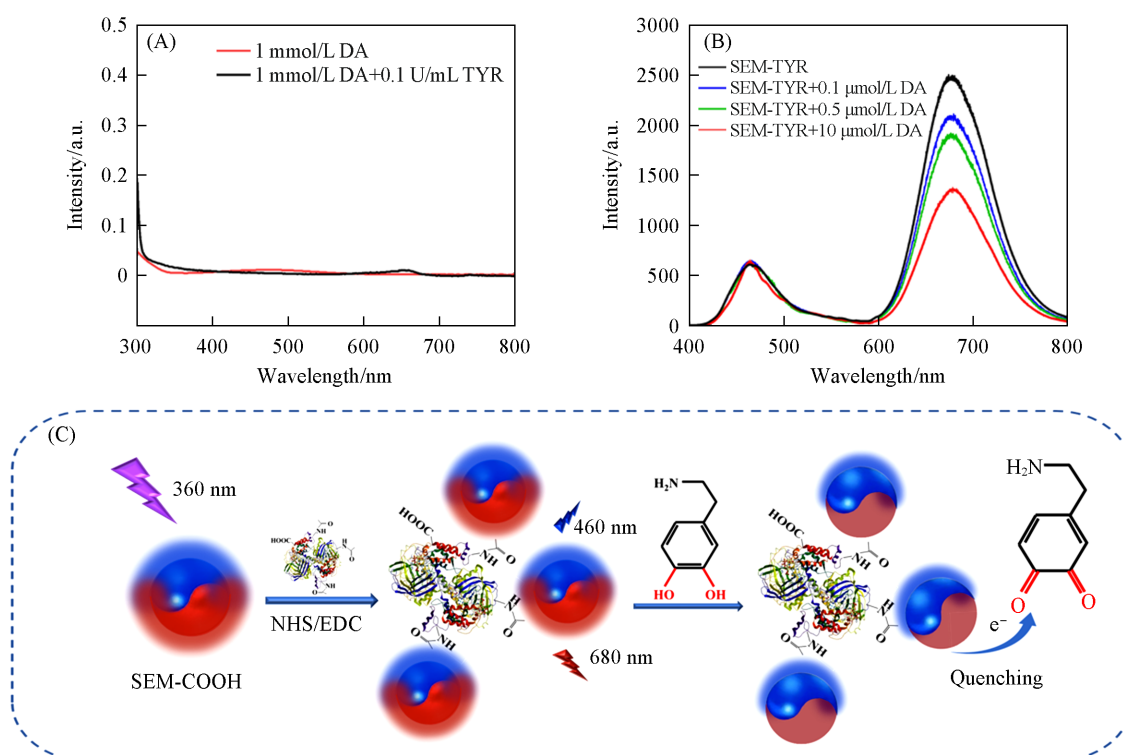


Fig. 5 UV-Vis spectra of DA and the TYR catalyzed DA oxidation product(A), emission spectra of SEM-TYR, SEM-TYR+ 0.1 $\mu\text{mol/L}$ DA, SEM-TYR+ 0.5 $\mu\text{mol/L}$ DA, SEM-TYR+10 $\mu\text{mol/L}$ DA(B), and PET system for the detection of DA(C)

光诱导电子转移增强余辉猝灭机制如图5(C)所示, 发光传感器SEM-TYR的构建是通过功能化SEM与TYR的共价偶联, 其中460和680 nm处的余辉强度均无显著变化. 当目标物DA存在时, TYR氧化DA为多巴醌, 多巴醌作为电子受体可猝灭荧光^[30]. 当SEM-TYR传感器在360 nm激发停止后, 发光中心 Eu^{2+} 的激发态电子从 $4f^7(S_{7/2})$ 回落至轨道 $4f^65d^1$ 过程产生480 nm的蓝色余辉, 而 Mn^{2+} 的激发态电子从 ${}^6A_1({}^6S)$ 轨道回落至 ${}^4T_1({}^4G)$ 轨道过程中, 部分电子转移至电子受体多巴醌, 导致680 nm发光强度减弱, 最终实现SEM-TYR余辉猝灭比值 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 与DA浓度呈良好的相关性. 基于上述推测, SEM-TYR向多巴醌的能量转移是通过光诱导电子转移实现的.

2.5 SEM-TYR在不同干扰条件下的发光性能

为了消除单发射峰强度受实验参数的干扰, 分别考察了SEM-TYR的浓度与测试电压对460和680 nm处的发光强度和发光强度比值(I_{680}/I_{460})的影响. 如图6所示, 随着SEM-TYR浓度和测试电压的增加, 460和680 nm处的发光强度均逐渐增大, 而发光强度比值(I_{680}/I_{460})仍然保持恒定, 表明比率型发光传感器SEM-TYR可有效消除外部干扰.

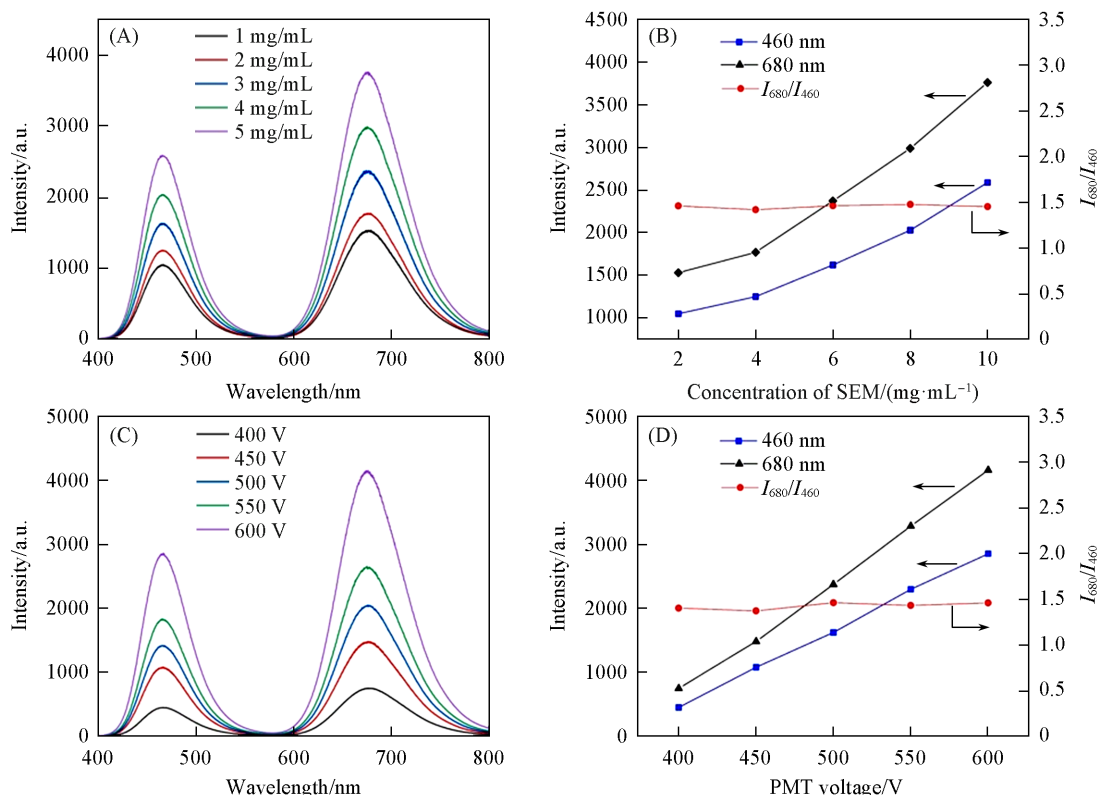


Fig. 6 Emission(excitation at 360 nm) spectra of SEM with different concentrations(A), effect of the concentrations of SEM on the luminescence intensity of 460 nm and 680 nm and the luminescence ratio I_{680}/I_{460} (B), emission(excitation at 360 nm) spectra of SEM at different test voltage(2 mg/mL)(C), and effect of the test voltage on the luminescence intensity of 460 nm and 680 nm and the luminescence ratio(I_{680}/I_{460})(D)

2.6 DA检测条件的优化

为了提高检测多巴胺的灵敏度,对pH值和孵育时间进行了优化.将SEM-TYR在不同pH值的缓冲溶液中对2 $\mu\text{mol/L}$ DA进行测定.如图7(A)所示,随着PBS缓冲溶液pH值的增大,DA引起的余辉猝灭比值 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 在pH=6.8时达到最大,此结果与人体正常的生理pH值相接近,然后逐渐减小.如果pH>7.5,多巴胺在碱性溶液中处于酚酮形态和胺形态,这两个形态中的O—H和N—H键可以与其它带有亲电性的官能团反应,极易发生聚合反应生成聚多巴胺而不利于DA的准确检测^[31],因此选择检测DA最佳pH值为6.8.如图7(B)所示,SEM-TYR在pH=6.8的缓冲溶液中对1.5 $\mu\text{mol/L}$ DA进行测定,随着孵育时间的增加,2 h时余辉猝灭比值 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 趋于稳定,因此选择2 h为最佳孵育时间.实

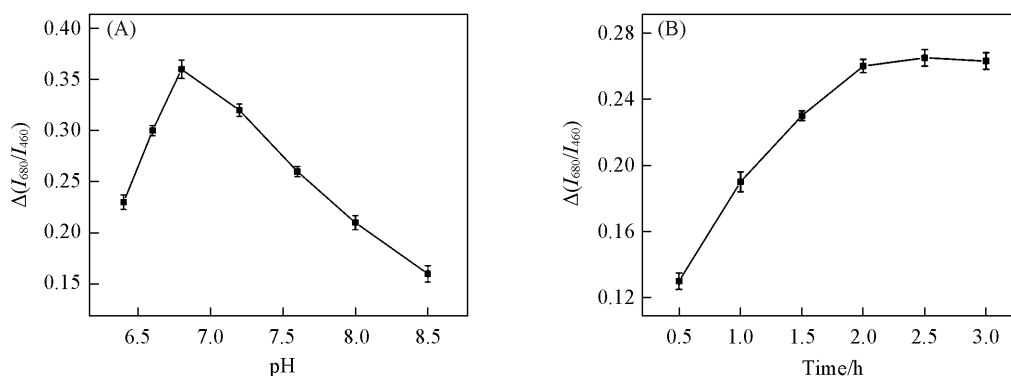


Fig. 7 Optimization of experimental conditions

(A) Effect of pH of SEM-TYR on $\Delta(I_{680}/I_{460})$ of sensor; (B) effect of reaction time on $\Delta(I_{680}/I_{460})$ of sensor.

验结果表明, DA测定的最佳实验条件为pH=6.8, 孵育时间为2 h.

2.7 SEM-TYR比率型发光传感器定量检测多巴胺

在最佳检测条件下, 采用SEM-TYR比率型发光传感器检测了不同浓度的DA. 如图8(A)所示, 随着DA浓度的增加, 680 nm处的余辉强度逐渐减弱, 而460 nm处的余辉强度基本保持不变. 在0.2~10 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内, $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 与DA浓度呈良好的线性关系[图8(B)], 线性方程为 $\Delta(I_{680}/I_{460}) = 0.02912c_{\text{DA}} + 0.1478$, $\Delta R^2 = 0.9965$, 检出限为40 nmol/L.

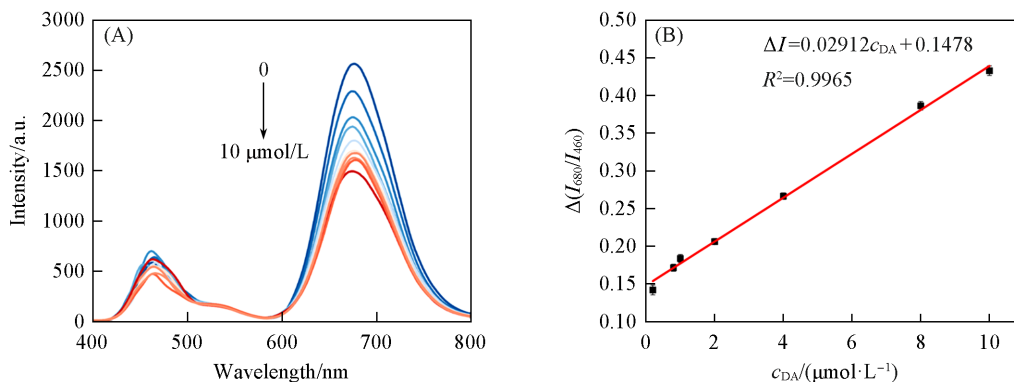


Fig. 8 Phosphorescence spectra(A) and corresponding linear calibration curve(B) of SEM-TYR with various concentrations of DA

由表1可见, 与文献[32~36]报道的DA检测方法相比, 本文方法线性范围较宽、检测限较低, 在无背景干扰下不但能检测人体血液和尿液中的多巴胺, 还能检测无损样品汗液中的多巴胺.

Table 1 Comparative analysis of methodologies for quantitative determination of dopamine

Material	Method	Linear range/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Ref.
CQDs	Fluorescent sensor	0.65—52	0.20	[32]
CDs	Fluorescent sensor	0.1—6.0	0.06	[33]
BCQDs	Fluorescent sensor	0.28—1.5	6	[34]
$\text{Bi}_2\text{Fe}_4\text{O}_9$ NPs	Colorimetric	0.15—50	0.051	[35]
rGO/PPy	Electrochemical sensor	200—1200	0.061	[36]
$\text{Sr}_{2.992}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_8:0.008\text{Eu}^{2+}, 0.10\text{Mn}^{2+}$	Phosphorescent sensor	0.2—10	0.04	This work

2.8 生物样本中多巴胺的定量检测

为了验证该方法在实际生物样本检测中是否具有可行性和准确性, 将其应用于不同生物样本(血清、尿液和汗液), 通过在生物样品中添加DA标准溶液(1, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$)评价了该发光传感器的适用性. 如表2所示, 实际血清样本中DA的加标回收率在94.8%~104.0%之间, 尿液样本中DA的加标回收率在91.3%~101.6%之间, 汗液样本中DA的加标回收率在97.4%~105.2%之间, $\text{RSD} < 6.8\%$ ($n=10$), 表明该方法准确可靠, 可用于实际样品中DA的高灵敏检测.

Table 2 Recoveries(%) and precisions(RSD %, $n=10$) of dopamine in three real samples

Analyte	Spiked/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery $\pm\text{SD}(\%, n=10)$
Serum	1	94.8 \pm 5.4
	10	102.3 \pm 3.1
	20	104.0 \pm 3.8
Urine	1	91.3 \pm 4.2
	10	98.7 \pm 3.7
	20	101.6 \pm 6.3
Sweat	1	97.4 \pm 3.0
	10	101.5 \pm 5.3
	20	105.2 \pm 6.7

2.9 重复性、稳定性及选择性分析

在相同条件下制备7个批次SEM-TYR传感器用于检测相同浓度的DA, 记录460和680 nm处的磷光光谱, 计算 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 值. 如图9(A)所示, 7个批次传感器 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 相对标准偏差在1.6%~2.3%之间, 表明该传感器具有良好的重复性. 为了考察SEM-TYR传感器的稳定性, 用同一批次SEM-TYR传感器每日检测同浓度的DA, 并记录460和680 nm处的磷光强度. 如图9(B)所示, 连续7日测定 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 下降约0.5%, 相对标准偏差在1.6%~2.5%之间, 表明该生物传感器具有优异的稳定性.

为了确定该发光传感器SEM-TYR对DA的选择性, 对多种干扰金属离子和其它生物活性物质进行了检测. 在相同实验条件下, 分别加入10 $\mu\text{mol/L}$ DA、10 mmol/L金属离子(Na^+ , K^+ , Ca^{2+})以及20 mmol/L生物活性物质尿酸(UA)、抗坏血酸(AA)和葡萄糖(Glu). 如图9(C)所示, 只有DA存在的情况下观察到 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 的明显变化, 而其它干扰物均未引起 $\Delta(I_{680}/I_{460})$ 发生明显变化, 说明该生物传感器对DA具有高灵敏度和高选择性.

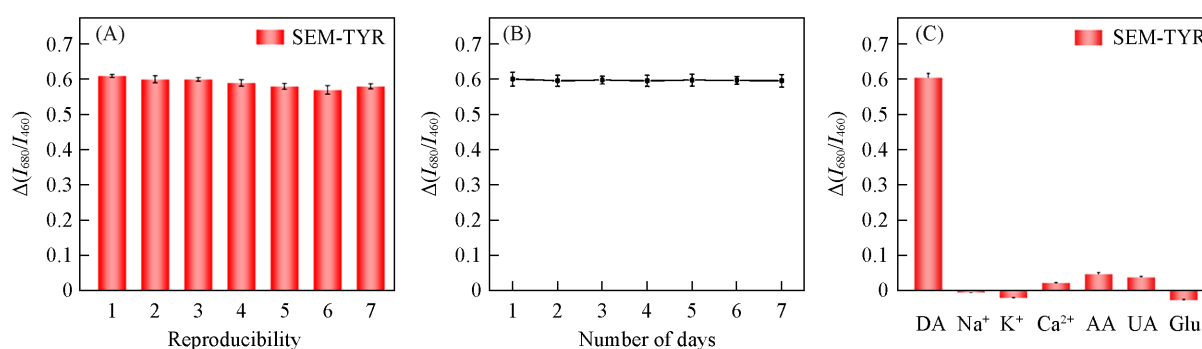


Fig. 9 Reproducibility(A), stability(B) and selectivity(C) experiments of SEM-TYR

3 结 论

构建了一种基于光诱导电子转移的比率型发光传感器SEM-TYR, 用于复杂生物样品中多巴胺的定量检测. SEM-TYR传感器对DA的检出限为40 nmol/L, 线性范围为0.2~10 $\mu\text{mol/L}$. 对实际生物样品人血清、尿液及汗液中DA的定量检测具有较好的准确度和稳定性. 该SEM-TYR发光传感器有望为开发操作简便、灵敏度高、避免背景干扰和外部干扰的多巴胺检测提供新思路.

参 考 文 献

- [1] Huang H. L., Shi S., Gao X., Gao R. R., Zhu Y., Wu X. W., Zang R. M., Yao T. M., *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, *79*, 198—204
- [2] Kiss B., Laszlovszky I., Krámos B., Visegrády A., Bobok A., Lévy G., Lendvai V., Román V., *Biomolecules*, **2021**, *11*(1), 104
- [3] Klein M. O., Battagello D. S., Cardoso A. R., Hauser D. N., Bittencourt J. C., Correa R. G., *Cell. Mol. Neurobiol.*, **2019**, *39*(1), 31—59
- [4] Chung S. J., Yoo H. S., Oh J. S., Kim J. S., Ye B. S., Sohn Y. H., Lee P. H., *Parkinsonism Relat. Disord.*, **2018**, *51*, 43—48
- [5] Hanif F., Amir Q., Washdev W., Bilwani F., Simjee S. U., Haque Z., *Arch. Med. Res.*, **2021**, *52*(3), 348—353
- [6] Yu X. J., Han L. L., Hun X., *Chem. J. Chinese Universities*, **2017**, *38*(12), 2169—2175(于锡娟, 韩璐璐, 混旭. 高等学校化学学报, **2017**, *38*(12), 2169—2175)
- [7] Jiang Y. L., Wang B. X., Meng F. D., Cheng Y. X., Zhu C. J., *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, *452*, 199—202
- [8] Abu-Ali H., Ozkaya C., Davis F., Walch N., Nabok A., *Chemosensors*, **2020**, *8*(2), 28
- [9] Zhao Y. S., Zhao S. L., Huang J. M., Ye F. G., *Talanta*, **2011**, *85*(5), 2650—2654
- [10] Sangubotla R., Won S., Kim J., *J. Photochem. Photobiol. A*, **2023**, *438*, 114542
- [11] Wei N., Zhao X. E., Zhu S. Y., He Y. R., Zheng L. F., Chen G., You J. M., Liu S., Liu Z. Q., *Talanta*, **2016**, *161*, 253—264
- [12] Wang C. J., Shi H. X., Yang M., Yan Y. J., Liu E. Z., Ji Z., Fan J., *J. Photochem. Photobiol. A*, **2020**, *391*, 112374
- [13] Chen J., Li Y. C., Huang Y. N., Zhang H. J., Chen X. G., Qiu H. D., *Microchimica Acta*, **2019**, *186*, 1—9
- [14] Armstrong-Price D. E., Deore P. S., Manderville R. A., *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, *68*(7), 2249—2255
- [15] An J., Chen M. Z., Hu N., Hu Y. Q., Chen R. B., Lyu Y., Guo W. X., Li L. J., Liu Y. F., *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2020**, *243*, 118804

- [16] Su B. C., Zhang Z., Sun Z. C., Tang Z. W., Xie X. X., Chen Q., Cao H. M., Yu X., Xu Y., Liu X., Hammock B. D., *J. Hazard. Mater.*, **2022**, *422*, 126838
- [17] Guo Z. J., Tian J., Cui C. B., Wang Y., Yang H. H., Yuan M., Yu H., *Food Control*, **2021**, *123*, 107741
- [18] Zhao H. X., Liu C. X., Gu Z., Dong L. X., Li F., Yao C., Yang D. Y., *Nano Lett.*, **2019**, *20*(1), 252—260
- [19] Yan L. X., Wang B. B., Zhao X., Chen L. J., Yan X. P., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, *13*(51), 60955—60965
- [20] Jiang Y. Y., Zhao X., Chen L. J., Yang C., Yin X. B., Yan X. P., *Talanta*, **2020**, *218*, 121101
- [21] Yan L. X., Chen L. J., Zhao X., Yan X. P., *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, *30*(14), 1909042
- [22] Guo J. X., Pan L. M., Wang M. C., Chen L. J., Zhao X., *Food Chem.*, **2023**, *413*, 135611
- [23] Pan L. M., Zhao X., Wei X., Chen L. J., Wang C., Yan X. P., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(16), 6387—6393
- [24] Medintz I. L., Stewart M. H., Trammell S. A., Susumu K., Delehanty J. B., Mei B. C., Melinger J. S., Blanco-Canosa J. B., Dawson P. E., Mattoussi H., *Nat. Rev. Mater.*, **2010**, *9*(8), 676—684
- [25] Aitasalo T., Hietikko A., Hölsä J., Lastusaari M., Niittykoski J., Piispanen T., *Z. Kristallogr. Suppl.*, **2007**, *26*, 461—466
- [26] Shannon R. D., *Acta Crystallog. Sect. A*, **1976**, *32*, 751—767
- [27] Xiong X. B., Yuan X. M., Song J. Q., Yin G. X., *Appl. Spectrosc.*, **2016**, *70*(6), 995—1000
- [28] Gong Y., Wang Y. H., Xu X. H., Li Y. Q., Xin S. Y., Shi L. R., *Opt. Mater.*, **2011**, *33*(11), 1781—1785
- [29] Ma W., Long Y. T., *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*(1), 30—41
- [30] Qu Z. Y., Na W. D., Liu X. T., Liu H., Su X. G., *Anal. Chim. Acta*, **2018**, *997*, 52—59
- [31] Wang Y. X., Kang K., Wang S., Kang W. J., Cheng C., Niu L. M., Guo Z. Y., *Sens. Actuators B Chem.*, **2020**, *305*, 127348
- [32] Gao X. W., Feng S. L., *Chemical Research and Application*, **2023**, *35*(5), 1225—1230(高晓文, 冯素玲. 化学研究与应用, **2023**, *35*(5), 1225—1230)
- [33] Tang Z. D., Jiang K., Sun S., Qian S. H., Wang Y. H., Lin H. W., *Analyst*, **2019**, *144*(2), 468—473
- [34] Anju Rais A., Rawat K., Prasad T., Bohidar H. B., *Nanotechnology*, **2020**, *32*(2), 025501
- [35] Razavi M., Barras A., Ifires M., Swaidan A., Khoshkam M., Szunerits S., Kompany-Zareh M., Boukherroub R., *J. Colloid Interface Sci.*, **2022**, *613*, 384—395
- [36] Akin M., Bayat R., Bekmezci M., Coguplugil Z. K., Sen F., Baghayeri M., Kafash A., Tehranejad-Javazmi F., Sheikhshoae I., *Carbon Lett.*, **2023**, *33*, 1—9

(Ed.: N, K)