

碳点对四环素类抗生素的荧光检测

史泽琨¹,姜良妹^{2*},郝晨昱²,李丹³,王明林^{1**},侯芹^{2**}

1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018

2. 山东农业大学化学与材料科学学院, 山东 泰安 271018

3. 山东医药技师学院, 山东 泰安 271016

摘要: 四环素类抗生素(TCs)是常用的一类广谱抗生素,因其具有广谱抗菌性在医疗、畜牧等多个行业广泛应用,但过度使用会造成TCs的残留,对生态环境和人类健康产生严重威胁。因此,开发简便、高效、快捷、灵敏的检测TCs残留的方法,对环境及食品安全的监测具有重要意义。荧光传感法具有现象明显、灵敏度高和操作方便等优点。本文采用柠檬酸与乙二胺为前驱体,采用水热法一步合成荧光强度高,检测响应明显的碳点。对碳点进行了红外光谱、紫外光谱、粉末X射线衍射、荧光光谱表征。确定其荧光最佳激发波长为350 nm,最大发射波长为450 nm,为蓝色荧光。利用碳点对四环素、金霉素、土霉素进行荧光检测,当碳点与TCs相互作用时,蓝色荧光逐渐猝灭,在0-250 μM范围内,四环素、金霉素、土霉素的检出限分别为720 nM、747 nM、765 nM。考察了最佳检测条件,可能存在的干扰离子对TCs检测的影响,结果表明该碳点对TCs具有明显的选择性。

关键词: 四环素; 碳点; 荧光检测; 高灵敏; 高选择

中图分类号: O652.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2025)05-0774-07

Fluorescence Detection of Tetracycline Antibiotics by Carbon Dots

SHI Ze-kun¹, JIANG Liang-mei^{2*}, HAO Chen-yu², LI Dan³, WANG Ming-lin^{1**},
HOU Qin^{2**}

1. College of Food Science and Engineerin/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2. College of Chemistry and Material Science/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

3. Shandong Medicine Technician College, Tai'an 271016, China

Abstract: Tetracycline antibiotics (TCs) are a commonly used class of broad-spectrum antibiotics. Due to their broad-spectrum antibacterial properties, they are widely applied in multiple industries such as medical treatment and animal husbandry. However, excessive use can lead to the residue of TCs, posing a serious threat to the ecological environment and human health. Therefore, it is of great significance to develop a simple, efficient, rapid, and sensitive method to detect TCs residues for monitoring the environment and food safety. Fluorescence sensing methods have the advantages of obvious phenomena, high sensitivity and convenient operation. This paper synthesizes carbon dots by one-step hydrothermal method with citric acid and ethylenediamine as precursors. It characterizes the carbon dots by infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, powder X-ray diffraction, and fluorescence spectroscopy. Their optimal excitation wavelength is determined as 350 nm, with the maximum emission wavelength of 450 nm, exhibiting blue fluorescence. Moreover, this paper employs carbon dots for fluorescence detection of tetracycline, chlortetracycline, and oxytetracycline. The blue fluorescence gradually quenches when carbon dots interact with TCs. Within the range of 0-250 μM, the detection limits of tetracycline, chlortetracycline, and oxytetracycline are 720 nM, 747 nM, and 765 nM, respectively. This paper also investigates the optimal detection conditions and the influence of possible interfering ions on TCs detection. The results show that the carbon dots exhibit significant selectivity for TCs.

Keywords: Tetracycline antibiotics; carbon dots; fluorescence detection; high sensitivity; high selectivity

四环素类抗生素(TCs)是环境中常见的污染物之一,在自然水系、土壤中都检测到以TCs为主的残留物^[1]。TCs的残留可通过食物链

在人和动物体内累积,在低浓度下也会对健康产生影响。因此开发便携简单的TCs检测方法具有重要研究价值。常用的TCs检测方法有:液相

收稿日期: 2024-07-12

修回日期: 2025-08-20

第1作者简介: 史泽琨(1998-),女,硕士研究生,研究方向:食品质量控制及荧光检测。E-mail:szk1998163@163.com

*同等贡献作者简介:姜良妹(2003-),女,本科生,研究方向:荧光材料的制备及应用。E-mail:2993160663@qq.com

**通讯作者: Author for correspondence. E-mail:houqin@sdau.edu.cn;mlwang@sdau.edu.cn

色谱-质谱联用,酶联免疫吸附测定和表面增强拉曼光谱法。虽然这些方法能够以较高的精度和灵敏度检测 TCs,但存在操作复杂、耗时等缺点^[2]。荧光检测法具有灵敏度高,选择性好、响应速度快、成本低和操作方便等优点,在 TCs 检测领域具有广阔的应用前景^[3]。荧光猝灭是最常见的荧光检测类型,其原理是基于检测物与传感材料之间的相互作用导致传感材料的荧光关闭。碳点的荧光猝灭机理主要包括荧光共振能量转移(FRET)、光诱导电子转移(PET)、内滤效应(IFE)、静态猝灭(SQ)和动态猝灭(DQ)^[4]。FRET是从供体激发态到受体的非辐射能量转移,在荧光供体的发射光谱与受体的吸收光谱重叠时产生^[5]。PET是一种激发态电子转移过程,通过该过程激发态电子从供体转移到受体导致碳点的荧光猝灭^[6]。IFE是由于样品对激发/发射光的吸收而导致荧光信号的减少^[7]。由于碳点和猝灭剂之间的电子转移,SQ与非荧光基态复合物的形成一起发生。猝灭剂的加入引起碳点吸收的变化,即信号强度的增加或波长的偏移^[8]。系统FL的衰减和平均寿命的变化表明碳点与猝灭剂之间存在DQ^[9]。

碳点(CDs)是一类新型的碳基纳米材料,因其合成简单、化学稳定性高、检测方便、响应速度快、灵敏度高而引起人们的极大兴趣^[10]。碳点也被用于检测四环素类抗生素,胡等制备了基于锌掺杂碳点的比例荧光探针实现快速、特异、直观地测定盐酸四环素^[11]。王等制备了氮掺杂的碳点,实现在较宽线性范围内对TCs的较低检测限^[12]。本实验以柠檬酸与乙二胺为前驱体,采用水热法一步合成荧光强度高、选择性高、荧光响应明显的蓝色荧光碳点,并将其应用到对四环素类抗生素的特异性荧光检测中。由于IFE及SQ,碳点的荧光可被四环素类抗生素猝灭,具有较低的检出限。本工作可实现对四环素类抗生素的高灵敏检测,并为荧光传感器的设计提供了一种新的材料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柠檬酸、乙二胺、氢氧化钠、硫酸氢钠、磷酸二氢钠、甲醇、乙醇、氯仿购于天津市凯通化学试剂有限公司,四环素、金霉素、土霉素、诺氟沙星、

甲硝唑购于阿拉丁生化科技有限公司,其它试剂购于天津市巴斯夫化工有限公司。

1.2 碳点的制备

用20 mL去离子水溶解1.204 g柠檬酸,后加入1 mL乙二胺,将混合物转移到聚四氟乙烯衬里的高压反应釜中,在180 °C烘箱中加热6 h。冷却至室温,12 000 r/min的速度离心10 min,得深黄色溶液备用。利用旋转蒸发仪进行旋蒸处理,得红棕色粉末。

1.3 碳点的表征方法

利用傅里叶变换红外分光光度计(Tensor II,美国Thermo公司)、X-射线粉末衍射仪(D8 Advance,德国Bruck公司)、紫外可见分光光度计(Cary 60,日本Shimadzu公司)、荧光分光光度计(Cary Eclipse,美国Varian公司)对碳点进行结构及性能表征。

1.4 碳点荧光检测TCs条件优化

为得到最佳的分析结果,对激发波长、溶液pH值、溶剂种类和反应时间等相关变量进行了优化。对四环素(TC)、土霉素(OTC)、金霉素(CTC)分别进行了检测。分别配制了浓度为 10^{-2} mol·L⁻¹的四环素、土霉素、金霉素溶液,向3 mL碳点溶液中以10 μL/次加入,共加入100 μL,通过荧光响应强度变化确定检测效果。

1.5 干扰离子对荧光检测TCs的影响

对可能影响碳点检测效果的其他抗生素以及常见的阴、阳离子分别进行了荧光检测,分别配制 10^{-2} mol·L⁻¹的干扰离子溶液,检测过程中各项待测物加入量均为250 μM,与碳点混合时间为3 min,然后进行荧光光谱测试。

1.6 实际样品处理

为评估碳点检测TC的实际应用性,本实验选择牛奶和河水作为实际样品,衡量对TC的检测效果。牛奶为超市购买,河水为奈河水。河水/实验室水样品:样品经0.22 μm的滤膜过滤,得滤液留存备用。牛奶样品:5 mL牛奶与5 mL乙腈混合,超声10 min后离心5 min(10 000 rpm)得上清液,后用0.22 μm的滤膜过滤,滤液用超纯水稀释10倍后备用。回收实验中,在样品处理和测试前,通过加入TC溶液,分析含有已知浓度TC的样品。

2 结果与分析

2.1 碳点的表征

对与 TCs 作用前后的碳点进行了 FT-IR、PXRD、UV 表征。如图 1a 所示, 3 409 cm^{-1} 处的峰归属于碳点的 O-H 伸缩振动, C=O 双键的拉伸振动和 COO⁻ 不对称振动峰位于 1 551 cm^{-1} , 1 384 cm^{-1} 为 C-H 弯曲振动和 COO⁻ 对称振动峰; 1 298 cm^{-1} 为 C-N 伸缩振动峰, 1 050 cm^{-1} 为

C-C/C-O 的拉伸振动峰^[13]。与 TC 作用后, 在 1 597 cm^{-1} 处出现新峰。如图 1b 所示, 24.5° 处出现一个明显的尖峰, 归因于无序碳原子, 对应石墨烯碳的 (0 0 2) 晶面^[14], 表明碳点可能存在层状结构。研究了碳点与 TCs 作用前后紫外光谱的变化, 如图 1c 所示, 当 TCs 加入量均为 250 μM , 反应时间为 3 min, 与 CTC 作用后的碳点紫外吸收峰位偏移较小, 但碳点与 TC 及 OTC 作用后峰位发生明显红移, 且碳点与 TCs 作用后紫外吸收峰增强, 表明碳点与 TCs 之间存在静态猝灭^[8]。

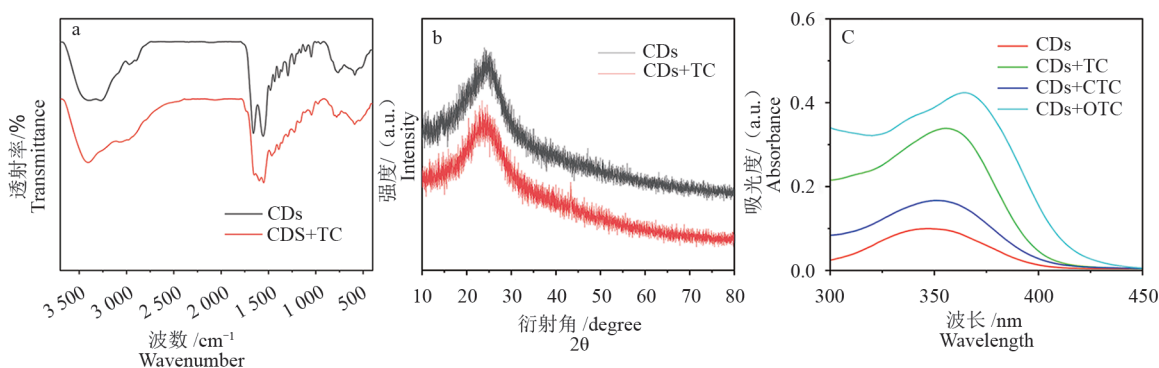


图 1 碳点与四环素作用前后的红外谱图(a); PXRD 谱图(b); 紫外光谱图(c)

Fig. 1 Spectra of FT-IR (a); PXRD (b) and UV-Vis (c) of CDs before and after interaction with TCs

2.2 条件优化

碳点与氮、硫、磷等非金属原子以及与金属原子掺杂或官能化可显著提高其荧光性能, 因此, 在合成碳点的过程中, 尝试加入碘化亚铜制备掺杂的碳点。但通过水热合成、透析后进行 FT-IR 分析发现, 碘化亚铜的掺杂, 并没有产生新

的吸收峰, 如图 2a 所示。

在整个荧光检测过程中, 考察了接触时间对碳点荧光强度的影响, 发现当 TCs 与碳点溶液混合后, 碳点荧光强度降低, 在反应 3 min 后荧光强度基本趋于稳定, 所以选择的接触时间为 3 min, 其整个过程的荧光强度变化如图 2b 所示。

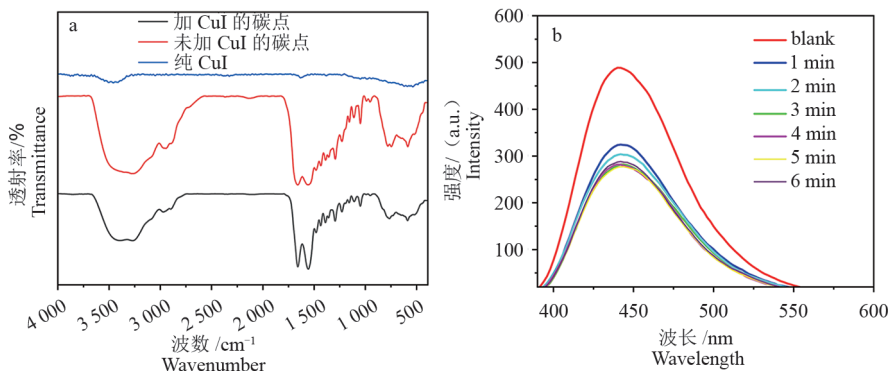


图 2 碘化亚铜的加入对碳点红外谱图的影响(a); 接触时间对碳点检测 TCs 的影响(b)

Fig. 2 Infrared spectra of CDs before and after interacting with CuI (a); Contact time on the detection of TCs by carbon dots (b)

探究了不同激发波长下碳点的发光性能。如图 3a 所示, 当改变激发波长时, 碳点的荧光发

射峰没有明显偏移, 但荧光强度发生改变。当激发波长在 330-390 nm 范围内时, 荧光响应强度

先增后降,在350 nm时,响应强度最高,故后续检测均选择350 nm作为激发波长。图3b显示了碳点在不同溶剂中的发光性能,在水、乙醇和甲醇中的荧光强度最强,在丙酮、氯仿、DMF和DMSO中荧光强度减弱,在乙腈中显示出弱的荧光。碳点荧光发射强度随溶剂极性的变化可能与表面电子重排导致偶极矩明显改变有关^[15]。

该荧光碳点由于存在荧光聚集猝灭现象,因此需对制得的初始溶液进行稀释,以获得多个配比溶液。如图3c所示,当稀释到10 000倍时荧

光强度达到最大,但为了减少实际检测中待检测物溶液中溶剂水对荧光强度的影响,选择了1:16 000的比例作为进行后续一系列检测的固定配比。考察了碳点在不同pH值的水溶液中的荧光性能,如图3d所示,在初始溶液pH为6.5的条件下荧光响应最强,在弱酸及中性范围内(pH = 4-10),荧光强度接近,但在强酸及强碱性条件下,碳点的荧光强度减弱。因此,在后续的检测过程中没有改变碳点溶液的pH,保持溶液的pH为6.5左右。

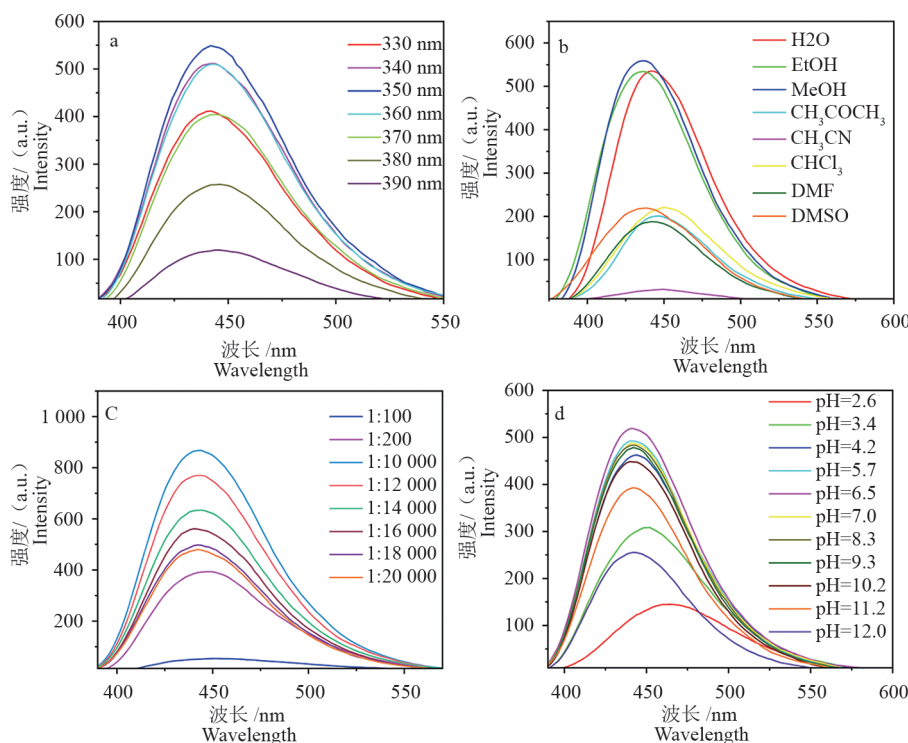


图3 CDs的荧光发射:不同激发波长(a);不同溶剂(b);不同稀释浓度(c);不同pH(d)

Fig. 3 Fluorescence spectra of CDs: different excitation wavelengths (a); different solvents (b); different dilution concentrations (c) and different pH (d)

2.3 碳点对TCs的荧光检测

在优化条件下测定了基于碳点对四环素、金霉素、土霉素的荧光检测性能。加入各种四环素类抗生素后,记录了碳点的荧光强度变化。如图4a-4c所示,碳点浓度固定不变,TCs的浓度变化范围为0-250 μM ,随着TCs浓度的增加,碳点的荧光强度逐渐减弱,荧光发生猝灭。图4d-4f显示了碳点与一定浓度TCs混合后线性拟合曲线,具有良好的线性关系。利用公式 $\text{LOD}=3\sigma/K$ 计算了TCs的LOD值(σ 为空白测定的标准差, K 为线性回归方程的斜率)。四环素、金霉素和土

霉素的LODs值分别为720 nM、747 nM、765 nM,分别对应的线性范围为20-40 μM 、10-100 μM 及30-200 μM 。

2.4 选择性和抗干扰性

在最优条件下,通过对比添加不同类型的离子、其他抗生素及小分子与碳点作用前后的相对荧光强度,考察了碳点对TCs的荧光选择性。所选择的阳离子为(Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+)、阴离子为(Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 HSO_4^- 、 SO_3^{2-} 、 HSO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 H_2PO_4^- 、 NO_2^- 、 Ac^-)、其他抗生素(诺氟沙星、甲硝

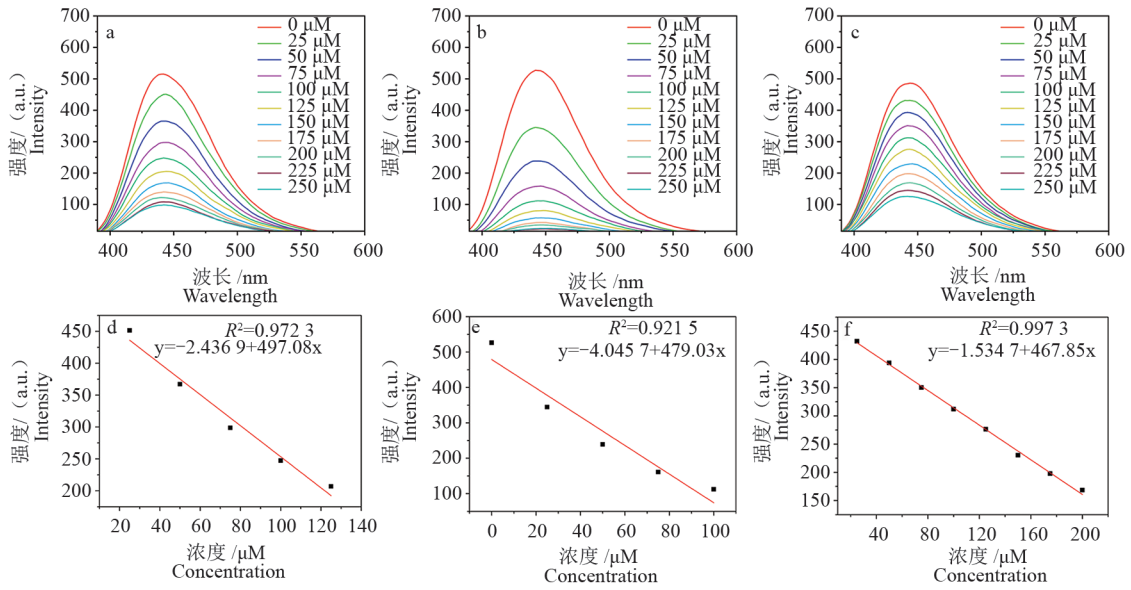


图 4 加入不同浓度(a)四环素;(b)金霉素;(c)土霉素后碳点的发射光谱;碳点对TCs浓度的线性拟合曲线(d-f)
 Fig. 4 Emission spectra of CDs after adding different concentrations of (a) TC; (b) CTC and (c) OTC; Linear fitting curves of CDs to TCs concentrations (d-f)

唑)、小分子(葡萄糖、尿素)。如图 5a 所示,碳点对四环素类抗生素表现出独特的荧光选择性响应,相对荧光强度比(F/F_0)显著下降,对其他抗生素及阴、阳离子及小分子表现出较低的荧光传感行为。表明该碳点对四环素类抗生素具有较高的荧光特异性识别,可以作为一种有效的 TCs 荧光传感器。

2.5 检测机理

考虑到 TC、CTC 和 OTC 属于结构相似的 TCs,因此我们选择 TC 为目标分析物,探讨 TCs

引起碳点荧光猝灭的机理。研究了碳点的荧光光谱、紫外-可见吸收光谱,如图 5b 所示,TC 溶液的紫外吸收光谱与碳点的发射光谱重叠可忽略不计,因此不存在荧光共振能量转移。然而,TC 的强吸收有效抑制了 350 nm 处碳点的激发能吸收,导致碳点处于低填充发射状态,从而显著猝灭了碳点的荧光,表明碳点与 TC 间存在内滤效应。结合图 1c 所示的加入 TC 后紫外吸收峰的增强及明显红移,可知碳点对 TC 的荧光猝灭是由静态猝灭及内滤效应引起。

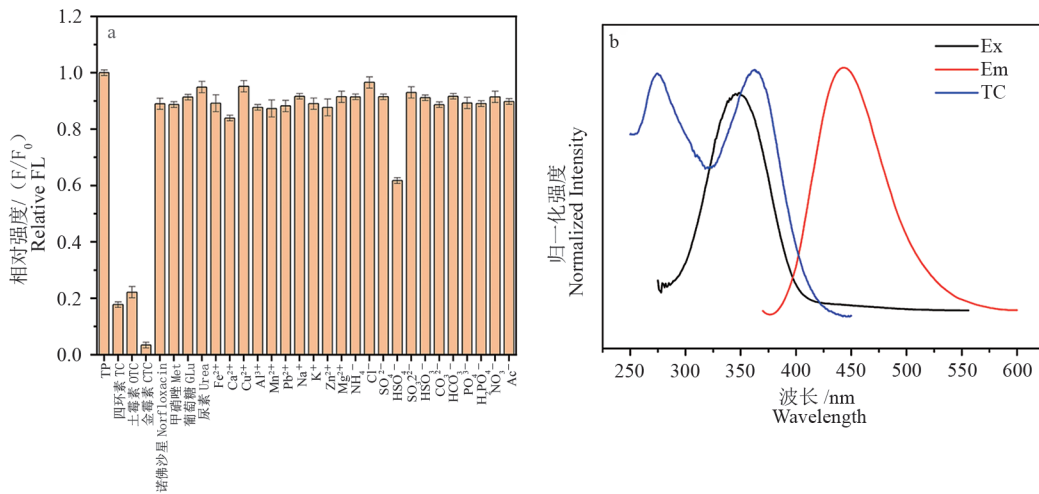


图 5 碳点对不同干扰物的荧光强度变化(a);TC 及碳点的紫外-可见吸收光谱及碳点的激发、发射光谱(b)
 Fig. 5 Fluorescence intensity changes of CDs for different interferents (a); UV-vis absorption spectra of TC and CDs, along with excitation and emission spectrum of CDs (b)

2.6 实际样品检测

鉴于碳点在 TCs 检测方面的良好性能,采用标准添加法检测了牛奶、河水、实验室自来水中的

TC 含量。结果如表 1 所示,在自来水、河水、牛奶中检测回收率为 98.8%-102%,98.4%-100.08% 和 98%-99.74%,具有较好的检测实用性。

表 1 实际样品中 TC 的检测
Table 1 Detection of TC in actual samples

样品 Sample	TC 加入量/ μM TC spiked amount	TC 检测量/ μM TC detected amount	回收率/% Recovery rate
自来水 Tap water	0.5	0.51 \pm 0.02	102
	5	4.94 \pm 0.17	98.8
	50	49.60 \pm 0.58	99.2
牛奶 Milk	0.5	0.49 \pm 0.03	98
	5	4.93 \pm 0.21	98.6
	50	49.87 \pm 0.30	99.74
河水 River water	0.5	0.50 \pm 0.06	100
	5	4.92 \pm 0.16	98.4
	50	50.04 \pm 0.46	100.08

3 结论

综上所述,本文以柠檬酸和乙二醇为前驱体,水热法合成了具有良好溶解度及稳定性的蓝色荧光的碳点,实现了对四环素类抗生素的灵敏及选择性检测。在 0-250 μM 范围内,随着 TCs 浓度的增加,碳点的荧光强度呈线性降低。对四环素、金霉素、土霉素的检出限分别为 720 nM、747 nM、765 nM。该碳点显示出对四环素类抗生素的高选择及高灵敏检测,其检测机理为静态猝灭和内滤效应,这为 TCs 的定量分析奠定基础。

参考文献

- [1] Li C, Zeng C, Chen Z, et al. Luminescent lanthanide metal organic framework test strip for immediate detection of tetracycline antibiotics in water [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384:121498.
- [2] Tang HZ, Wang YH, Li S, et al. Development and application of magnetic solid phase extraction in tandem with liquid-liquid extraction method for determination of four tetracyclines by HPLC with UV detection [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57: 2884-2893.
- [3] Li Y, Wang Y, Du P, et al. Fabrication of carbon dots@hierarchical mesoporous ZIF-8 for simultaneous ratiometric fluorescence detection and removal of tetracycline antibiotics [J]. *Sensors and Actuators. B: Chemical.*, 2022, 358:131526.
- [4] Kaur I, Batra V, Bogireddy NKR, et al. Detection of organic pollutants, food additives and antibiotics using sustainable carbon dots [J]. *Food Chemistry*, 2023, 406: 135029.
- [5] Chatzimarkou A, Chatzimitakos TG, Kasouni A, et al. Selective FRET-based sensing of 4-nitrophenol and cell imaging capitalizing on the fluorescent properties of carbon nanodots from apple seeds [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 258: 1152-1160.
- [6] Wan Y, Wang M, Zhang K, et al. Facile, green synthesis of fluorescent carbon dots from the flowers of *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medicus for sensitive detection of 2, 4, 6-trinitrophenol and cellular imaging [J]. *Microchemical Journal*, 2019, 148: 385-396.
- [7] Li WK, Feng JT, Ma ZQ, et al. Nitrogen, sulfur, boron and flavonoid moiety co-incorporated carbon dots for sensitive fluorescence detection of pesticides [J]. *Carbon*, 2020, 161: 685-693.
- [8] Qu Y, Yu L, Zhu B. Green synthesis of carbon dots by celery leaves for use as fluorescent paper sensors for the detection of nitrophenols [J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44: 1500-1507.
- [9] Hou J, Wang X, Lan S, et al. A turn-on fluorescent sensor based on carbon dots from *Sophora Japortica* leaves for the detection of glyphosate [J]. *Analytical Methods*, 2020, 12: 4130-4138.
- [10] Jia L, Chen R, Xu J, et al. A stick-like intelligent multicolor nano-sensor for the detection of tetracycline:

- The integration of nano-clay and carbon dots [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413:125296.
- [11] Hu FJ, Fu QB, Li YJ, et al. Zinc-doped carbon quantum dots-based ratiometric fluorescence probe for rapid, specific, and visual determination of tetracycline hydrochloride [J]. *Food Chemistry*, 2024, 431: 137097.
- [12] Wang JM, An J, Zhang ZQ, et al. High fluorescent nitrogen - doped carbon dots derived from *Sanghuangporus lonicericola* for detecting tetracyclines in aquaculture water and rat serum samples [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 189, 108517.
- [13] Zhang XQ, Chen CY, Peng DP, et al. pH-Responsive carbon dots with red emission for real-time and visual detection of amines [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2020, 8: 11563-11571.
- [14] Yun S, Kang ES, Choi JS. Zn-assisted modification of the chemical structure of Ndoped carbon dots and their enhanced quantum yield and photostability [J]. *Nanoscale Advances*, 2022, 4: 2029-2035.
- [15] Sun ZS, Zhou WY, Luo JB, et al. High-efficient and pH-sensitive orange luminescence from silicon-doped carbon dots for information encryption and bio-imaging [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 607: 16-23.