

## 氮掺杂碳量子点荧光法检测猪肉中的四环素

周彤<sup>1</sup>, 毋晨<sup>1</sup>, 赵文<sup>1</sup>, 李明<sup>2</sup>, 彭汝艳<sup>1</sup>, 周茜<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院 河北保定 071001

<sup>2</sup>河北农业大学理学院 河北保定 071001)

**摘要** 四环素(TC)作为一种广谱抗生素,用于预防和治疗细菌性疾病,以及作为饲料添加剂促进动物生长。本文旨在建立一种菠萝皮来源的氮掺杂碳量子点(N-CQDs)荧光猝灭法快速检测 TC。以菠萝皮和二乙烯三胺为原料,通过水热法制备高量子产率的蓝色荧光 N-CQDs。通过透射电子显微镜、傅里叶红外光谱、X 射线光电子能谱对 N-CQDs 进行结构表征。结果表明,N-CQDs 的平均粒径为 3.53 nm,主要由 C、N、O 3 种元素组成,表面具有含氧和含氮基团。主要猝灭机理为静态猝灭和内滤效应。在最优试验条件下,该方法在 0.3~40  $\mu\text{g/mL}$  范围线性良好,检出限为 89.26  $\mu\text{g/L}$ 。该检测方法被用于猪肉中四环素的检测,回收率在 98.40%~106.02%之间,相对标准偏差 1.29%~3.88%。

**关键词** 菠萝皮; 氮掺杂碳量子点; 荧光检测; 四环素

**文章编号** 1009-7848(2024)02-0303-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.02.029

四环素(Tetracycline, TC)一种由链霉菌产生的广谱抗生素,对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、支原体、衣原体、立克次体和螺旋体等有抵抗作用<sup>[1]</sup>。TC 为一种常见的抗生素,因具有抗菌活性、口服吸收特性、毒性低和成本低等优势而被应用于动物细菌性疾病的预防和治疗<sup>[2-3]</sup>。此外,TC 还可作为促进生长剂添加到饲料中,以促进动物的生长<sup>[4]</sup>。然而,一些畜牧业养殖者为了追求利益,在动物饲养过程中过度使用 TC,使其在动物源性食品中积累,对人类健康造成重大威胁<sup>[5]</sup>。长期摄入含 TC 残留的食物会导致牙齿发黄、胃肠道紊乱、过敏反应、肝损伤等不良反应,增加细菌对抗生素的耐药性<sup>[6-9]</sup>。监测动物产品中 TC 的残留对于确保食品安全至关重要。

到目前为止,毛细管电泳法<sup>[10]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[11]</sup>和高效液相色谱法<sup>[12]</sup>都是检测 TC 的传统方法。以上方法虽然灵敏度高,结果更为精确,但是对于仪器精密性、样品预处理过程和操作人员的专业水平要求较高。近年来,基于酶联免疫<sup>[13]</sup>、电化学<sup>[14]</sup>、比色<sup>[15]</sup>和荧光<sup>[16]</sup>法的 TC 检测策略被开发出来。例如:荧光法是一种操作简便、反应迅速、灵

敏度高、成本低的分析方法,它以有机荧光染料或荧光纳米材料为信号平台。由于碳量子点、量子点、金属纳米团簇、核苷酸/铜系配位聚合物和金属有机框架等荧光纳米材料可以被 TC 有效猝灭,因此基于荧光猝灭的方法得到广泛的探索。

碳量子点(Carbon quantum dots, CQDs),也称为碳点,是 Xu 等<sup>[17]</sup>在电泳法纯化单壁碳纳米管过程中意外发现的。CQDs 是一种新型荧光纳米材料,尺寸小于 10 nm,具有优异的光稳定性、良好的水溶性、毒性低和生物相容性好的特性。此外,其前驱体材料来源广泛,成本低廉,制备方法简便且环保,在不同的领域得到广泛的应用。

本文以菠萝皮为碳源,二乙烯三胺为氮原子供体,采用水热法制备氮掺杂碳量子点(Nitrogen-doped carbon quantum dots, N-CQDs)。通过对 pH 值、BR 缓冲溶液用量、N-CQDs 用量、反应温度以及反应时间的优化,旨在建立一种基于内滤效应和静态猝灭原理的 TC 荧光检测方法,并将该方法用于猪肉样品中 TC 的检测。

## 1 材料与方

### 1.1 材料与试剂

菠萝皮、新鲜猪肉,保定农贸市场;四环素标准品( $\geq 95\%$ ),上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖(Glucose, Glu)、果糖(Fructose, Fru, 99%)、乳糖(Lactose, Lac, 99%)、蔗糖(Sucrose, Suc)、赖氨

收稿日期: 2023-02-07

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系生猪创新团队项目(HBCT2018110205)

第一作者: 周彤,女,硕士生

通信作者: 周茜 E-mail: zhouqian@hebau.edu.cn

酸(Lysine, Lys,  $\geq 99\%$ )、精氨酸(Arginine, Arg, 98%)、丙氨酸(Alanine, Ala, 99%)、酪氨酸(Tyrosine, Tyr,  $\geq 99\%$ )、半胱氨酸(Cysteine, Cys, 99%)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH, 99%)、抗坏血酸(Ascorbic acid, AA, 99.7%)、金霉素(Chlortetracycline, CTC,  $>95\%$ )、土霉素(Oxytetracycline, OTC,  $\geq 95\%$ )、强力霉素(Doxycycline, DOX, 95%)、氟苯尼考(Florfenicol, FF,  $\geq 98\%$ )、青霉素(penicillin, PEN)、链霉素(Streptomycin, SM)、磺胺嘧啶(Sulfadiazine, SDI,  $\geq 98\%$ )、氨苄西林(Ampicillin, AMP, 96%)、阿奇霉素(Azithromycin, AZI, 98%)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR, 98%)、头孢氨苄(Cephalexin, CEF, 98%),上海源叶生物科技有限公司;二乙烯三胺(99%),上海吉至生化科技有限公司;硫酸奎宁(ST, 98%),上海麦克林生化科技有限公司;甲醇、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化锰、五水合硫酸铜、氯化锰、硫酸锌、三氯化铁、碳酸钠均为分析纯级,天津市科密欧化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

F-320 荧光分光光度计,天津港东科技公司;高压反应釜,西安常仪实验室仪器商行;GZX-9240MBE 电热鼓风干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;TGL-16G 台式离心机,上海安亭科学仪器厂;SB-5200DT 超声清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;UV-2802H 紫外-可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;Tecnaï G2 F30 S-TWIN 透射电子显微镜,美国 FEI 公司;IRAFFinity-IS 光谱仪,日本岛津公司;Thermo escalab 250Xi 射线光电子能谱仪,美国赛默飞公司;FLS1000 稳态瞬态荧光光谱仪,英国爱丁堡公司;PiloFD8-4.3V 真空冷冻干燥机,美国 Siemon 公司;0.22  $\mu\text{m}$  水相针式过滤器,上海安谱实验科技有限公司;Oasis HLB 固相萃取柱,美国 Waters 公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 N-CQDs 的制备 以菠萝皮为碳源,二乙烯三胺为氮源,通过水热法制备 N-CQDs<sup>[18]</sup>。在聚四氟乙烯内衬中加入 0.25 g 冻干菠萝皮粉、300  $\mu\text{L}$  二乙烯三胺和 20 mL 超纯水,混合均匀后超声波处理 10 min。将内衬密封在高压反应釜中,移入

电热鼓风干燥箱中在 180  $^{\circ}\text{C}$  下加热 10 h。加热完成后自然冷却至室温。在 10 000 r/min 下将所得溶液离心 10 min,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤上清液,得到棕色 N-CQDs 溶液,并在 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 1.3.2 N-CQDs 的结构表征

1.3.2.1 紫外-可见吸收光谱 采用紫外可见分光光度计对 N-CQDs 溶液进行光谱扫描,设置扫描波长为 200~500 nm,扫描间隔为 1 nm,扫描速度为中速。

1.3.2.2 荧光光谱 采用荧光分光光度计测定 N-CQDs 溶液的荧光光谱,设置扫描速度为 1 200 nm/min,电压为 300 V,狭缝宽度为 10 nm,增益为 2。

1.3.2.3 透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 首先,将 N-CQDs 溶液进行稀释并超声处理 15 min。其次,将铜网放置在盖有封口膜的载玻片上,并把样品滴在铜网上,10 min 后把多余的液体吸走,约 1 h 后铜网自然晾干。最后采用 TEM 对 N-CQDs 的形貌、粒径分布进行分析。

1.3.2.4 傅里叶红外光谱 (Fourier infrared spectroscopy, FTIR) 取 10~20  $\mu\text{L}$  N-CQDs 滴在 0.2 g 溴化钾上,120  $^{\circ}\text{C}$  干燥 4 h 以上。将干燥后的样品研磨均匀压片后,采用 IRAFFinity-IS 光谱仪记录 4 000~500  $\text{cm}^{-1}$  范围内的 FTIR 并对 N-CQDs 所含官能团进行分析。

1.3.2.5 X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 采用 Thermo escalab 250Xi 射线光电子能谱仪对 N-CQDs 所含的各种元素含量及表面基团进行分析。将样品滴在硅片上,把硅片固定在样品台后送入快速进样室。选用铝单色器,10 mA 的发射电流,15 kV 的阳极电压。开启 X-射线源扫描,进行数据采集。

1.3.2.6 荧光量子产率 (Quantum yield, QY) 的测定 选用硫酸奎宁 (360 nm 激发波长下的 QY 为 54%) 作为计算 N-CQDs 荧光量子产率的参照物<sup>[19]</sup>。将硫酸奎宁溶于 0.1 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中,通过紫外-可见吸收光谱得到硫酸奎宁和 N-CQDs 的吸光度 (两种溶液的吸光度都小于 0.1)。然后,通过荧光光谱得到两种溶液的荧光积分面积。按照下列公式计算 N-CQDs 的 QY。

$$QY_{N-CQDs} (\%) = QY_{ST} (I_{N-CQDs}/I_{ST}) (A_{ST}/A_{N-CQDs}) (\eta_{N-CQDs}/\eta_{ST})^2$$

式中,  $QY$ ——荧光量子产率, %;  $I$ ——荧光积分面积;  $A$ ——360 nm 激发波长处的吸光度;  $\eta$ ——溶液的折射率, 其中水的折射率为 1.33, 0.1 mol/L  $H_2SO_4$  的折射率为 1.33。

### 1.3.3 检测条件的优化

**1.3.3.1 pH 值的优化** 取 75  $\mu\text{L}$  N-CQDs 置于离心管中, 分别加入 300  $\mu\text{L}$  不同 pH 值(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 的 BR 缓冲溶液和适量的 TC 溶液, 超纯水定容至 3 mL。记录不同 pH 值下的  $(F_0-F)/F_0$ , 其中  $F$  为不含 TC 时检测体系的荧光强度,  $F_0$  为含有 TC 时检测体系的荧光强度。以此来确定该检测体系的最佳 pH 值。

**1.3.3.2 BR 缓冲溶液用量的优化** 取 75  $\mu\text{L}$  N-CQDs 置于离心管中, 分别加入不同体积(100, 300, 600, 900, 1 200, 1 500  $\mu\text{L}$ ) 最佳 pH 值的 BR 缓冲溶液和适量的 TC 溶液, 超纯水定容 3 mL。记录不同 BR 缓冲溶液用量下的  $(F_0-F)/F_0$  以此来确定该检测体系 BR 缓冲溶液的最佳用量。

**1.3.3.3 N-CQDs 用量的优化** 取不同体积的 N-CQDs 置于离心管中, 分别加入最优的 BR 缓冲溶液和适量的 TC 溶液, 超纯水定容至 3 mL。记录不同 N-CQDs 用量下的  $(F_0-F)/F_0$  以此来确定该检测体系 N-CQDs 的最佳用量。

**1.3.3.4 反应温度的优化** 在最优 pH 值、BR 缓冲溶液用量和 N-CQDs 用量下, 将反应体系分别置于不同温度下(20, 25, 30, 35, 40, 45, 50  $^{\circ}\text{C}$ ) 反应 10 min。记录不同反应温度下的  $(F_0-F)/F_0$  以此来确定该检测体系的最佳反应温度。

**1.3.3.5 反应时间的优化** 在最优 pH 值、BR 缓冲溶液用量、N-CQDs 用量和反应温度下, 将反应体系摇匀后分别反应不同时间(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min)。记录不同反应时间下的  $(F_0-F)/F_0$  以此来确定该检测体系的最佳反应时间。

**1.3.4 TC 标准曲线的建立** 取 75  $\mu\text{L}$  N-CQDs 和 300  $\mu\text{L}$  pH=7 BR 缓冲溶液置于离心管中, 再加入不同质量浓度的 TC 标准溶液, 并用超纯水定容至 3 mL。将溶液完全混合后, 测定 375 nm 激发波长下的荧光强度  $F$ 。同时, 设置不加 TC 的对照

组, 用来对比 TC 加入前、后检测体系的变化情况。最后, 以 TC 质量浓度为横坐标, 猝灭率  $(F_0-F)/F_0$  为纵坐标绘制标准曲线。

**1.3.5 选择性和干扰性试验** 选择实际样品中可能存在的共存物质, 对 N-CQDs 的选择性进行考察, 如离子 ( $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $CO_3^{2-}$ )、糖类(Glu、Fru、Lac、Suc)、小生物分子(Lys、Arg、Ala、Tyr、Cys、GSH、AA)以及其它种类抗生素(CTC、OTC、DOX、FF、PEN、SM、SDI、AMP、AZI、ENR、CEF)。将上述干扰物质与 N-CQDs 混合后测定其荧光强度。此外, 分别将上述干扰物质加入到 N-CQDs 和 TC 的混合体系中测定其荧光强度, 进一步评价该检测方法的抗干扰能力。

**1.3.6 检测机理的探究** 为了揭示 TC 对 N-CQDs 荧光猝灭的机理, 首先, 采用稳态瞬态荧光光谱仪测定 TC 加入前、后 N-CQDs 的荧光寿命。其次, 采用紫外荧光分光光度计测定 N-CQDs、TC 以及 N-CQDs+TC 的紫外-可见吸收光谱。最后, 采用荧光分光光度计对 N-CQDs 的荧光光谱进行测定。

**1.3.7 实际样品的分析** 选择当地市场的新鲜猪肉为实际样品进行添加回收试验。将 TC 标准溶液添加到均质后的猪肉样品中, 静置 10 min 后, 对猪肉样品进行预处理。猪肉的预处理方式参照 GB/T 21317-2007《动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法》, 将 5 g(精确至 0.01 g) 均质后的猪肉样品置于含有 20 mL  $Na_2EDTA$ -McIlvaine 缓冲溶液的离心管中, 涡旋 1 min 后, 冰水浴超声 10 min, 使用低温离心机在 8 000 r/min 下离心 10 min。重复 3 次,  $Na_2EDTA$ -McIlvaine 缓冲溶液用量分别为 20, 20, 10 mL, 合并上清液, 用滤纸过滤。最后, 采用 Oasis HLB 固相萃取柱对滤液进行纯化后, 进行检测。

## 1.4 数据统计与分析

本试验所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 试验数据均为 3 次平行试验的平均值, 以平均值 $\pm$ 标准差表示, 并采用 Origin 2018 进行绘图。

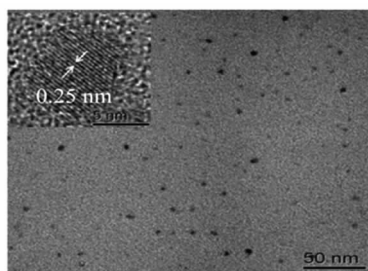


## 2 结果与分析

### 2.1 N-CQDs的结构表征

2.1.1 紫外-可见吸收光谱和荧光光谱分析 N-CQDs的光学性质如图1所示。N-CQDs在波长365 nm紫外光照射下呈现亮蓝色荧光,而在自然光下呈淡黄色。N-CQDs紫外-可见吸收光谱的最大吸收峰为340 nm,这归因于结构中C=O的 $n-\pi^*$ 跃迁<sup>[20]</sup>。通过荧光光谱发现N-CQDs的最大激发波长为375 nm,在375 nm激发波长下最大发射峰在448 nm处呈现。

2.1.2 TEM形貌分析和荧光量子产率 通过TEM可以直观地表征N-CQD的形态和尺寸分布。如图2a所示,N-CQD整体呈现球形,尺寸均匀,分散性良好,具有明显的晶格结构,晶格间距为0.25 nm,对应于石墨碳的(020)衍射面<sup>[21]</sup>。随机选取300个N-CQDs,对粒径分布进行统计,结果表明该N-CQDs直径分布范围为1~6 nm,平均直径为3.53 nm(图2b)。以上结果与先前文献报道的相一致,通过水热法制得的CQDs分散性好,平



(a)

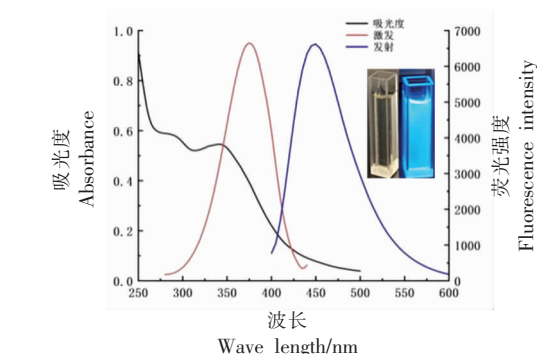
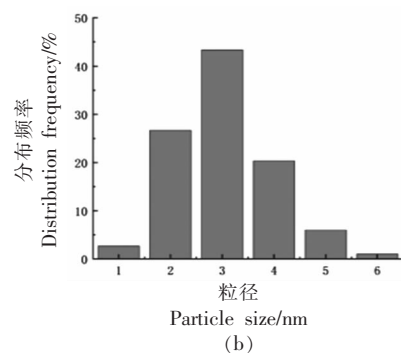


图1 N-CQDs紫外-可见吸收光谱、荧光激发和发射光谱

Fig.1 UV-Vis spectrum, fluorescence excitation and emission spectra of N-CQDs

均直径在4 nm左右。

荧光量子产率是评价CQDs发光性能的重要参数。相关文献表明,荧光量子产率在10%~100%之间才有应用价值,而目前合成CQDs的荧光量子产率超过15%的还比较少<sup>[22]</sup>。根据1.3.2.6节中的公式计算N-CQDs的荧光量子产率为41.54%,表明以菠萝皮为反应前体制得的N-CQDs荧光量子产率较高。



(b)

图2 N-CQDs的TEM形貌分析(a)和粒径分布直方图(b)

Fig.2 TEM morphology analysis (a) and size distribution (b) of N-CQDs

2.1.3 FTIR结构分析 采用FTIR对N-CQDs表面的官能团进行了评价。如图3所示,N-CQDs表面存在多个官能团,3444  $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收带是因为N-H和O-H发生了伸缩振动<sup>[23]</sup>;COOH和C=C的存在表现为在1640  $\text{cm}^{-1}$ 附近出现吸收峰<sup>[24]</sup>;1435  $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应C-N的伸缩振动;C-O-C和C-O的伸缩振动表现为在1126  $\text{cm}^{-1}$ 和1103  $\text{cm}^{-1}$ 处出现吸收峰<sup>[25]</sup>;621  $\text{cm}^{-1}$ 的宽振动表明CH<sub>2</sub>的存在<sup>[26]</sup>。FTIR分析结果表明,N-CQDs表面具有不饱和碳结构、含氧基团和含氮基团,这可以增强N-CQDs的亲水性。因此,N-CQDs具有优

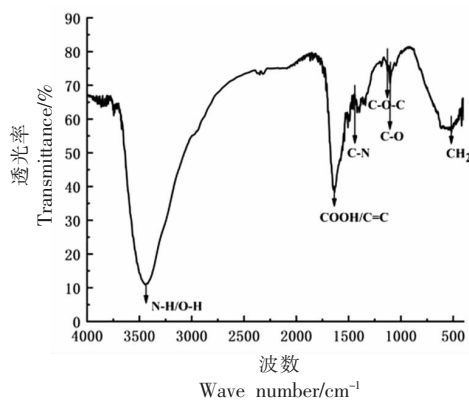


图3 N-CQDs的红外光谱图

Fig.3 FTIR spectrum of N-CQDs

异的水溶性。

2.1.4 XPS 成分分析 通过 XPS 表征了 N-CQDs 的元素类型和化学环境,结果如图 4 所示。图 4a 显示了 N-CQD 全范围 XPS 分析结果,XPS 全扫描谱中在 284.84,398.93 eV 和 530.91 eV 处有 3 个主要峰,分别对应于 C1s、N1s 和 O1s 3 种元素,元素组成分别为 68.44%,15.85%和 15.70%。如图 4b 所示,C1s 的高分辨 XPS 谱图在 284.2,285.3

eV 和 287.1 eV 处出现 3 个峰,分别是 C-C、C-O/C-N 和 C=O 键的特征峰。如图 4c 所示,在高分辨 N1 中 398.5,399.6 eV 和 400.8 eV 处的 3 个特征峰,表明 C=N-C、N-(C)<sub>3</sub> 和 N-H 的存在<sup>[27-28]</sup>。如图 4d 所示,O1s 高分辨 XPS 光谱中 530.3 eV 和 531.5 eV 的 2 个特征峰,分别代表 O-C 和 O=C 键<sup>[29-30]</sup>。

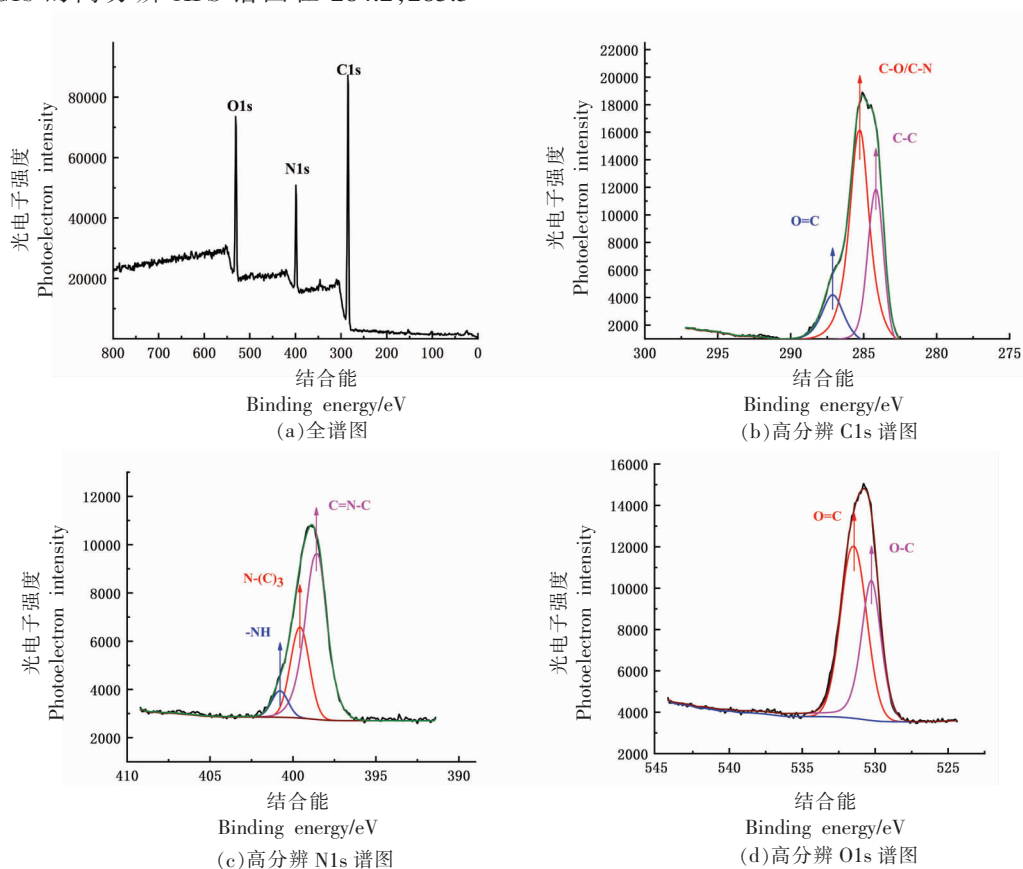


图 4 N-CQDs 的 XPS 光谱图

Fig.4 XPS spectra of N-CQDs

## 2.2 检测条件的优化

为了获得更宽的线性范围和灵敏度,本试验对 pH 值、BR 缓冲液用量、N-CQDs 用量、反应温度和反应时间进行了优化,并以  $(F_0-F)/F_0$  为指标确定最佳检测条件。

2.2.1 pH 值对检测体系的影响 pH 值对 TC 检测的影响如图 5 所示。在 2~12 的 pH 值条件下,  $(F_0-F)/F_0$  随 pH 值的变化而变化。当 pH 值为 7 时,  $(F_0-F)/F_0$  值达到最大值。因此,选择 pH 值为 7 的 BR 缓冲溶液作为检测 TC 的最佳 pH 值。

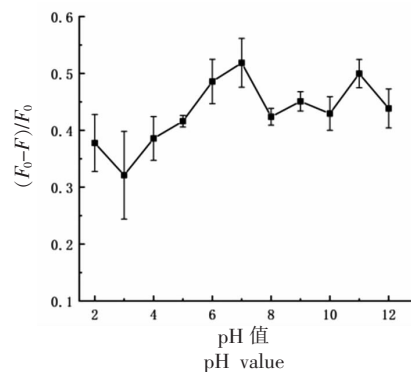


图 5 pH 值对检测体系的影响

Fig.5 Effects of pH value on the detection system

2.2.2 BR 缓冲溶液用量对检测体系的影响 BR 缓冲溶液用量对 TC 检测的影响如图 6 所示。当检测体系中加入不同体积的 BR 缓冲溶液,  $(F_0-F)/F_0$  值发生改变。当 BR 加入体积为 0.3 mL 时,  $(F_0-F)/F_0$  为最大值。因此, 选择 0.3 mL 作为检测 TC 的最佳 BR 缓冲溶液用量。

2.2.3 N-CQDs 用量对检测体系的影响 N-CQDs 用量对 TC 检测的影响如图 7 所示。当检测体系中加入不同体积的 N-CQDs,  $(F_0-F)/F_0$  值发生变化。当  $(F_0-F)/F_0$  到达最大值时 N-CQDs 的用量为 75  $\mu\text{L}$ 。因此, 选择 75  $\mu\text{L}$  作为检测 TC 的最

佳 N-CQDs 用量。

2.2.4 反应温度对检测体系的影响 反应温度对 TC 检测的影响如图 8 所示。当反应温度在 20~50  $^{\circ}\text{C}$  范围内, 温度越高, 反应越剧烈,  $(F_0-F)/F_0$  在 40  $^{\circ}\text{C}$  时最大。因此, 选择 40  $^{\circ}\text{C}$  作为检测 TC 的最佳反应温度。

2.2.5 反应时间对检测体系的影响 反应时间对 TC 检测的影响如图 9 所示。 $(F_0-F)/F_0$  在 60 min 内无明显变化。因此, 为了节省时间最佳反应时间定为 1 min。

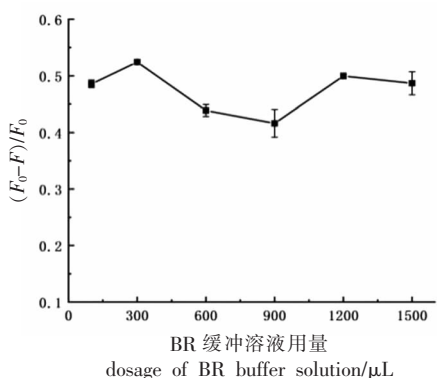


图 6 BR 缓冲溶液用量对检测体系的影响

Fig.6 Effects of dosage of BR buffer solution on the detection system

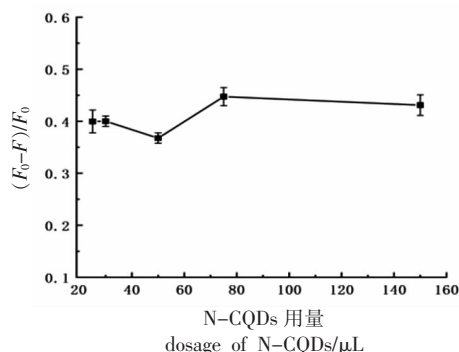


图 7 N-CQDs 用量对检测体系的影响

Fig.7 The effect of dosage of N-CQDs on detection system

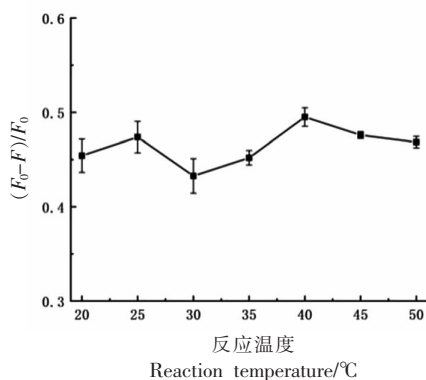


图 8 反应温度对检测体系的影响

Fig.8 Effects of reaction temperature on the detection system

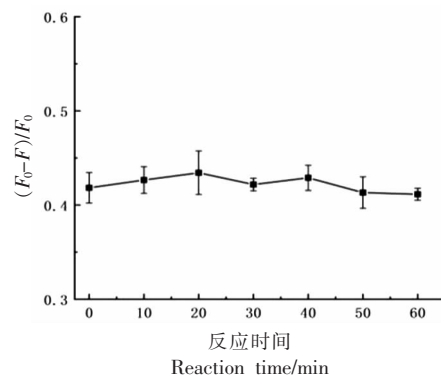


图 9 反应时间对检测体系的影响

Fig.9 Effects of reaction time on the detection system

### 2.3 TC 标准曲线的建立

为了验证该检测方法的灵敏度, 在最佳试验条件下建立了 TC 的标准曲线。如图 10a 所示, 随着 TC 质量浓度的增加, N-CQDs 的荧光强度不断降低。如图 10b 所示, 当 TC 质量浓度在 0.3~40

g/mL 范围内时,  $(F_0-F)/F_0$  与 TC 质量浓度呈良好的线性关系, 线性方程为  $y=0.0121x+0.0224$ ,  $R^2=0.9982$ , 检出限为 89.26  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2.4 选择性和干扰性试验

如图 11 所示, 只有 TCs(TC、CTC、OTC、DOX)

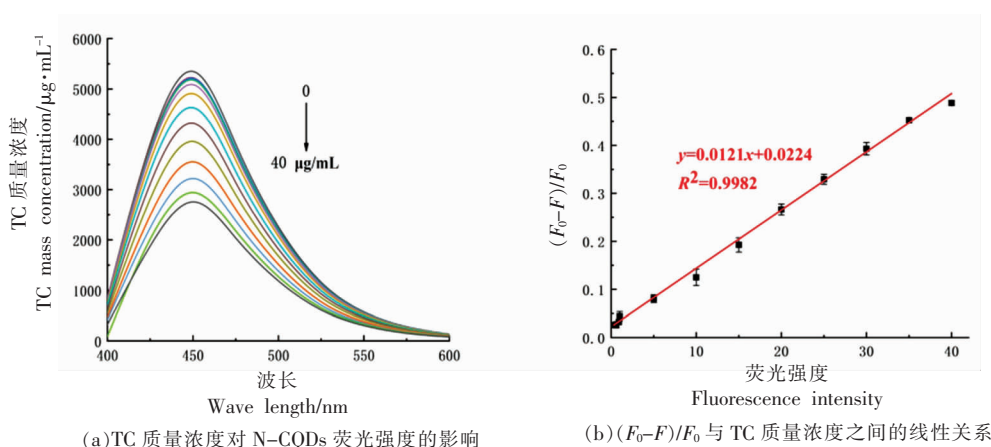


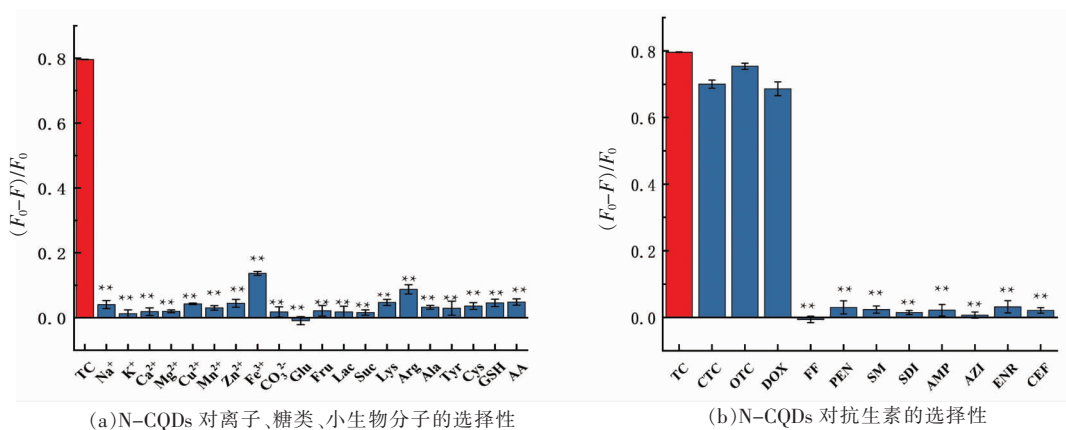
图 10 TC 质量浓度对 N-CQDs 荧光强度的影响及该方法的线性关系

Fig.10 The effect of TC mass concentration on the fluorescence intensity of N-CQDs and the linear relationship of this method

可以猝灭 N-CQDs 的荧光,而一些离子、糖类和氨基酸等干扰物质对 N-CQDs 的荧光强度影响很小,并且磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类和  $\beta$ -内酰胺类抗生素对 N-CQDs 的荧光强度影响也很小,与 TC 相比可以忽略不计,甚至表现出荧光增强。结果表明,N-CQDs 对 TCs 具有高选择性。此外,将上述干扰物质分别添加到检测体系中比较荧光响应,进一步评估该荧光检测方法对 TC 检测的抗干扰能力。如图 12 所示,当干扰物质与 TC 共存时,没有观察到猝灭率的明显变化,只有 CTC、OTC 和 DOX 加入到检测体系中时会引起猝灭率增加。

### 2.5 检测机理

本试验探讨了 TC 对 N-CQDs 的荧光猝灭机理。首先,测定了 TC 加入前、后 N-CQDs 的荧光寿命,N-CQDs 的荧光寿命为 13.20 ns,TC 加入后的荧光寿命为 13.43 ns(表 1),提示 TC 存在与否对 N-CQDs 的荧光寿命无明显影响,说明该猝灭过程为静态猝灭,不存在动态猝灭和荧光共振能量转移<sup>[31]</sup>。N-CQDs、TC 以及 N-CQDs+TC 的紫外-可见吸收光谱如图 13a 所示,N-CQDs+TC 的紫外-可见吸收光谱较 N-CQDs 和 TC 而言出现了新的吸收峰,这验证了该猝灭过程为静态猝灭<sup>[32]</sup>。如图 13b 所示,TC 的紫外-可见吸收光谱出现了



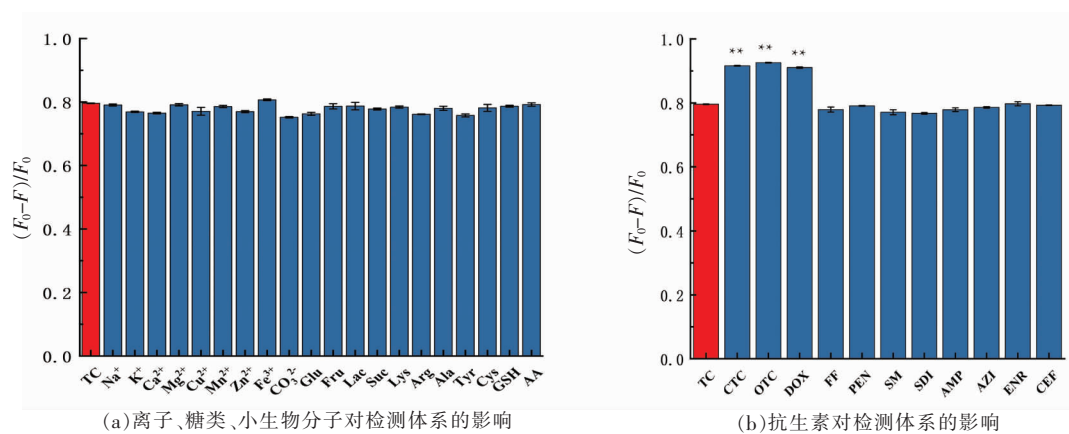
(a) N-CQDs 对离子、糖类、小生物分子的选择性

(b) N-CQDs 对抗生素的选择性

注:与 TC 组相比,\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ 。

图 11 N-CQDs 对离子、糖类、小生物分子和抗生素的选择性

Fig.11 The selectivity of N-CQDs for cations and anions, carbohydrate, small molecules and other antibiotics



注:与TC组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图 12 离子、糖类、小生物分子和抗生素对检测体系的影响

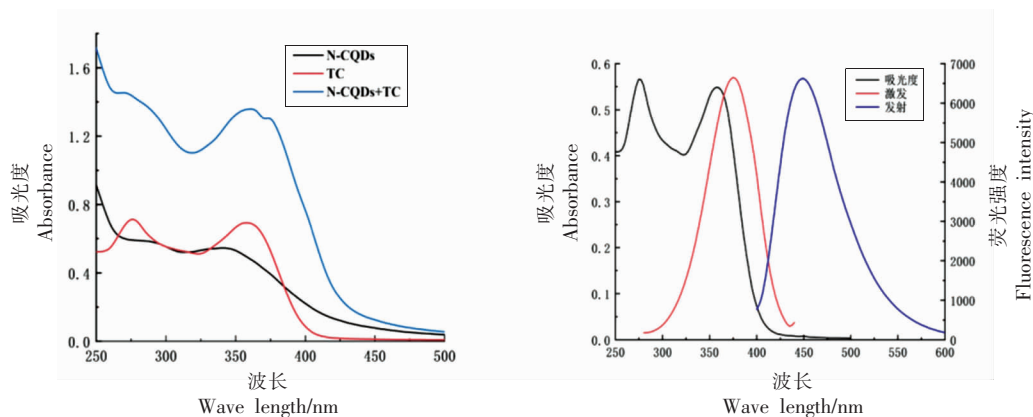
Fig.12 The influence of ions, sugars, small biomolecules, and antibiotics on the detection system

2 个特征吸收峰,分别在波长 276 nm 和 358 nm 处,与 N-CQDs 的激发光谱有良好的重叠。一般来说,吸光体的吸收光谱与碳量子点的激发或发射光谱重叠时会发生内滤效应使 CQDs 的荧光猝灭<sup>[33]</sup>。以上结果表明,TC 对 N-CQDs 的荧光猝灭是静态猝灭和内滤效应的共同作用。

表 1 TC 加入前、后 N-CQDs 的荧光寿命

Table 1 Fluorescence lifetime of N-CQDs in the absence and presence of TC

	$\tau_1/\text{ns}$	$\tau_2/\text{ns}$	$\tau_{\text{avg}}/\text{ns}$
N-CQDs	2.78	12.95	13.20
N-CQDs+TC	3.43	13.01	13.43



(a)N-CQDs、TC 和 N-CQDs+TC 的紫外-可见吸收光谱 (b)TC 的紫外-可见吸收光谱和 N-CQDs 的荧光光谱

图 13 N-CQDs 针对 TC 的检测机理

Fig.13 The detection mechanism of N-CQDs for TC

## 2.6 实际样品检测

为了评价该检测方法在实际样品中的适用性,本试验将该方法用于猪肉样品中 TC 的检测。将 5, 15, 30  $\mu\text{g/mL}$  TC 标准液添加到猪肉提取液中,在最优试验条件下对 TC 进行检测。如表 2 所示,猪肉中 TC 的回收率在 98.40%~106.02%内,相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)为

1.29%~3.88%,均小于 5%,说明该检测方法对猪肉样品中 TC 的检测,具有良好的准确性和精密度。

## 3 讨论

CQDs 作为一种新型纳米材料,由于其优异的水溶性、光学特性、化学稳定性和低毒性,越来越



表 2 猪肉样品中 TC 检测  
Table 2 Determination of TC in pork

样品	加标量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
猪肉 1	5	$4.92 \pm 0.19$	$98.40 \pm 3.82$	3.88
猪肉 2	15	$15.90 \pm 0.46$	$106.02 \pm 3.07$	2.89
猪肉 3	30	$29.74 \pm 0.38$	$99.14 \pm 1.27$	1.28

受到研究人员的关注。CQDs 的合成方法众多,可将其分为“自上而下”和“自下而上”两类方法<sup>[34]</sup>,其中“自下而上”法中的水热法因资源易得、制备简单、过程绿色环保等优点而备受研究者关注<sup>[35]</sup>。通过水热法制备 CQDs 的原料来源广泛,一般源自化学前体。近年来,由于经济和环境的迫切需要,人们开始关注利用废弃农产品合成 CQDs 的相关研究<sup>[36]</sup>。Atchudan 等<sup>[37]</sup>以香蕉皮为原料,通过水热法合成了 N-CQDs。制得的 N-CQDs 呈球形,单分散,无明显聚集,表明存在含氧和含氮基团,其量子产率为 23%。此外,还有人用稻壳、麦秸、西瓜皮等废弃农产品制备 N-CQDs。本试验以菠萝皮为原料,通过水热法制备 N-CQDs 并通过 TEM、FTIR 和 XPS 对 N-CQDs 进行结构表征。结果与以上报道具有一致性,制得的 N-CQDs 呈球形,分散性良好,尺寸分布均匀,其表面具有不饱和的碳结构、含氧和含氮基团,亲水性良好。与以上报道相比,本研究中 N-CQDs 具有较高的量子产率 41.54%,令其使用范围更加广泛,打破了量子产率低限制使用的局面。

初步探究其猝灭机理发现,TC 存在与否对 N-CQDs 的荧光寿命无明显影响,并且 TC 的紫外-可见吸收光谱与 N-CQDs 的激发光谱有部分重叠。以上两点表明,N-CQDs 的荧光猝灭主要是由静态猝灭和内滤效应共同作用的结果。这与刘影<sup>[38]</sup>的研究结果具有相似性,即通过荧光 CQDs 猝灭的方式来检测四环素,其检测机理为内滤效应和静态猝灭。

近年来,基于 N-CQDs 的快速检测方法得到了科学家越来越多的关注。Cao 等<sup>[6]</sup>以红甜菜色素为原料,采用水热法合成了红甜菜色素荧光碳点 (Red beet pigment carbon dots, RBP-CDs) 并应用于四环素的检测。TC 的线性范围为 0.5~30 mol/L 和 30~90  $\mu\text{mol/L}$ ,检测限为 0.36  $\mu\text{mol/L}$ 。当李义梅等<sup>[39]</sup>等通过水热法制备了一种 N-CQDs。在

TC 存在下,N-CQDs 荧光强度明显降低,当 TC 浓度在 1.6~16  $\mu\text{mol/L}$  和 16~100  $\mu\text{mol/L}$  范围内与荧光猝灭强度呈现良好的线性关系,检出限为 0.45  $\mu\text{mol/L}$ 。本研究建立一种基于 N-CQDs 荧光猝灭法测定 TC 的方法,在 0.3~40  $\mu\text{g/mL}$  范围内,  $(F_0-F)/F_0$  与 TC 质量浓度呈良好的线性关系,检出限为 89.26  $\mu\text{g/L}$ ,两种方法相比检测范围与检测限在同一水平。对本方法进行了成本估算,0.25 g 菠萝皮粉制得的 N-CQDs 约可完成 300 余样品中 TC 的快速检测,其检测时间可控制在 2 min 内,表明该检测方法成本低、性能高、时间短,不仅可以避免农产品废弃物的大量浪费,也为开发新型食品安全快速检测技术提供了一种新思路。

#### 4 结论

本研究以菠萝皮为碳源,二乙烯三胺为氮源,通过水热法制备了具有蓝色荧光的 N-CQDs。基于静态猝灭和内滤效应引起的荧光猝灭机理,建立了 N-CQDs 荧光猝灭法测定 TC 的方法。该方法的线性范围为 0.3~40  $\mu\text{g/mL}$ ,检出限为 89.26  $\mu\text{g/L}$ 。将该检测方法应用到猪肉样品中 TC 的检测,加标回收率为 98.40%~106.02%,相对标准偏差为 1.29%~3.88%,结果较理想。本研究建立的基于菠萝皮来源的 N-CQDs 荧光猝灭 TC 快速检测方法,具有绿色环保、成本低、操作简便、灵敏度高、选择性好以及响应速度快等优点,为拓宽 TC 的食品快速检测方法的研究提供了新思路。

#### 参 考 文 献

- [1] SCARIA J, ANUPAMA K V, NIDHEESH P V. Tetracyclines in the environment: An overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management[J]. Science of the Total Environment, 2021, 771: 145291.

- [2] WANG T L, MEI Q S, TAO Z H, et al. A smart-phone-integrated ratiometric fluorescence sensing platform for visual and quantitative point-of-care testing of tetracycline[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 148: 111791.
- [3] ZHOU Y, YANG Q, ZHANG D N, et al. Detection and removal of antibiotic tetracycline in water with a highly stable luminescent MOF[J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2018, 262: 137-143.
- [4] AHMED S R, KUMAR S, ORTEGA G A, et al. Target specific aptamer-induced self-assembly of fluorescent graphene quantum dots on palladium nanoparticles for sensitive detection of tetracycline in raw milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128893.
- [5] QU F, SUN Z, LIU D Y, et al. Direct and indirect fluorescent detection of tetracyclines using dually emitting carbon dots[J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(9): 2547-2553.
- [6] CAO Y Y, WANG X R, BAI H J, et al. Fluorescent detection of tetracycline in foods based on carbon dots derived from natural red beet pigment[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 157: 113100.
- [7] HAN L, FAN Y Z, QING M, et al. Smartphones and test paper-assisted ratiometric fluorescent sensors for semi-quantitative and visual assay of tetracycline based on the target-induced synergistic effect of antenna effect and inner filter effect[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(41): 47099-47107.
- [8] JIA L, CHEN X Z, XU J, et al. Europium-based aminoclay containing carbon dots: A new visual fluorescence platform for visual point-of-care testing of tetracycline in various real samples[J]. *Journal of Luminescence*, 2022, 241: 118497.
- [9] LI C, ZHU L, YANG W, et al. Amino-functionalized Al-MOF for fluorescent detection of tetracyclines in milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(4): 1277-1283.
- [10] 邢晓平. 毛细管电泳-电化学检测法测定鸡蛋中残留四环素类抗生素[J]. *食品科学*, 2007, 28(10): 470-473.
- XING X P. Antiseptics trace determination of tetracyclines in eggs by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. *Food Science*, 2007, 28(10): 470-473.
- [11] MORENO-GONZALEZ D, GARCIA-CAMPANA A M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1763-1769.
- [12] 鲍会梅. 猪肉中四环素残留快速检测法的研究[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(13): 107-111.
- BAO H M. Pork in tetracycline residues rapid detection method research[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(13): 107-111.
- [13] 国占宝, 武玉香, 田文礼, 等. 食品中四环素类残留的酶联免疫检测试剂盒的研制[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 333-337.
- GUO Z B, WU Y X, TIAN W L, et al. Development of a new ELISA kit for tetracycline residue detection in foods[J]. *Food Science*, 2011, 32(2): 333-337.
- [14] JALALIAN S H, KARIMABADI N, RAMEZANI M, et al. Electrochemical and optical aptamer-based sensors for detection of tetracyclines[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 73: 45-57.
- [15] TANG Y, HUANG X H, WANG X L, et al. G-quadruplex DNAzyme as peroxidase mimetic in a colorimetric biosensor for ultrasensitive and selective detection of trace tetracyclines in foods[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130560.
- [16] XU N, MENG L, LI H W, et al. Polyethyleneimine capped bimetallic Au/Pt nanoclusters are a viable fluorescent probe for specific recognition of chlortetracycline among other tetracycline antibiotics[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(6): 294.
- [17] XU X Y, RAY R, GU Y L, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(40): 12736-12737.
- [18] ZHANG H F, ZHOU Q, HAN X, et al. Nitrogen-doped carbon dots derived from hawthorn for the rapid determination of chlortetracycline in pork samples[J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 255: 119736.
- [19] ZHANG R Z, CHEN W. Nitrogen-doped carbon quantum dots: Facile synthesis and application as a 'turn-off' fluorescent probe for detection of  $Hg^{2+}$  ions[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 55: 83-90.
- [20] 陆婷婷. 基于荧光碳量子点的适配体传感器构建与

- 农残检测研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2020.
- LU T T. Construction of aptamer based on fluorescent carbon dots aptasensor for pesticide residue detection[D]. Guizhou: Guizhou University, 2020.
- [21] LU M C, DUAN Y X, SONG Y H, et al. Green preparation of versatile nitrogen-doped carbon quantum dots from watermelon juice for cell imaging, detection of  $\text{Fe}^{3+}$  ions and cysteine, and optical thermometry[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2018, 269: 766-774.
- [22] 王士凡, 范亮飞, 董黎明, 等. 新型氮掺杂碳点材料的合成及其光学性能[J]. *材料科学与工程学报*, 2021, 39(3): 415-419, 425.
- WANG S F, FAN L F, DONG L M, et al. Synthesis and optical properties of N-doped carbon dots materials[J]. *Journal of Materials Science and Engineering*, 2021, 39(3): 415-419, 425.
- [23] SHEN T Y, JIA P Y, CHEN D S, et al. Hydrothermal synthesis of N-doped carbon quantum dots and their application in ion-detection and cell-imaging [J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 248: 119282.
- [24] LIU Q S, DONG Z C, HAO A J, et al. Synthesis of highly fluorescent carbon dots as a dual-excitation ratiometric fluorescent probe for the fast detection of chlorogenic acid [J]. *Talanta*, 2021, 221: 121372.
- [25] QI H J, TENG M, LIU M, et al. Biomass-derived nitrogen-doped carbon quantum dots: Highly selective fluorescent probe for detecting  $\text{Fe}^{3+}$  ions and tetracyclines [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 539: 332-341.
- [26] YANG Q M, DUAN J L, YANG W, et al. Nitrogen-doped carbon quantum dots from biomass via simple one-pot method and exploration of their application [J]. *Applied Surface Science*, 2018, 434: 1079-1085.
- [27] JAYAWEERA S, YIN K, HU X, et al. Facile preparation of fluorescent carbon dots for label-free detection of  $\text{Fe}^{3+}$  [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2019, 370: 156-163.
- [28] ZOU C Y, LIU Z P, WANG X F, et al. A paper-based visualization chip based on nitrogen-doped carbon quantum dots nanoprobe for  $\text{Hg}(\text{II})$  detection [J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 265: 120346.
- [29] LIAO S, DING Z, WANG S, et al. Fluorescent nitrogen-doped carbon dots for high selective detecting p-nitrophenol through FRET mechanism [J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 259: 119897.
- [30] XU Q, PU P, ZHAO J G, et al. Preparation of highly photoluminescent sulfur-doped carbon dots for Fe (III) detection [J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2015, 3(2): 542-546.
- [31] CAI R Y, MIAO C F, ZHANG L, et al. Determination and the pharmacokinetic study of tigeicycline by fluorescence strategy with F, N codoping carbon dots as probe [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2022, 361: 131721.
- [32] ZHOU C Q, HE X X, YA D M, et al. One step hydrothermal synthesis of nitrogen-doped graphitic quantum dots as a fluorescent sensing strategy for highly sensitive detection of metacycline in mice plasma [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2017, 249: 256-264.
- [33] 钱敏捷, 孙慧娟, 何海林, 等. 氮硫磷氯共掺杂荧光碳点探针用于食品中胭脂红的快速检测 [J]. *现代食品科技*, 2022, 38(6): 36, 288-295.
- QIAN M J, SUN H J, HE H L, et al. Nitrogen, sulfur, phosphorus and chlorine co-doped carbon dots probe for the rapid determination of carmine in food samples [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(6): 36, 288-295.
- [34] DONG Y Q, SHAO J W, CHEN C Q, et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid [J]. *Carbon*, 2012, 50(12): 4738-4743.
- [35] WANG B Y, SONG H Q, QU X L, et al. Carbon dots as a new class of nanomedicines: Opportunities and challenges [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 442: 214010.
- [36] THANGARAJ B, SOLOMON P R, RANGANATHAN S. Synthesis of carbon quantum dots with special reference to biomass as a source - A review [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2019, 25(13): 1455-1476.
- [37] ATCHUDAN R, EDISON T N J I, PERUMAL S, et al. Hydrophilic nitrogen-doped carbon dots from biowaste using dwarf banana peel for environmental and biological applications [J]. *Fuel*, 2020, 275: 117821.

- [38] 刘影. 可调谐发光碳点的制备及其在抗生素, 环境污染检测中的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.  
LIU Y. Preparation of tunable luminescent carbon dots and its application in food, environmental detection[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [39] 李义梅, 陈谦. 基于氮掺杂碳量子点荧光探针检测四环素[J]. 化学研究与应用, 2021, 33(5): 813-818.  
LI Y M, CHEN Q. Fluorescence detection of tetracycline based on nitrogen doped carbon quantum dots[J]. Chemical Research and Application, 2021, 33(5): 813-818.

### Fluorescent Determination of Tetracycline in Pork Based on Nitrogen-doped Carbon Quantum Dots

Zhou Tong<sup>1</sup>, Wu Chen<sup>1</sup>, Zhao Wen<sup>1</sup>, Li Ming<sup>2</sup>, Peng Ruyan<sup>1</sup>, Zhou Qian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei

<sup>2</sup>College of Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei

**Abstract** As a common antibiotic, tetracycline (TC) is extensively used in the prevention and treatment bacterial diseases in animals and is also used as a feed additive to promote the growth of animals. In this paper, a fluorescence quenching method based on nitrogen doped carbon quantum dots (N-CQDs) derived from pineapple peel was established for the rapid detection of TC. The blue fluorescent N-CQDs with high quantum yield were prepared by the hydrothermal method using pineapple peel and diethylenetriamine as precursors. The structure of N-CQDs was characterized by transmission electron microscope, fourier infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. The results showed that the average particle size of N-CQDs was about 3.53 nm, which was mainly composed of C, N and O, and the surface has oxygen-containing and nitrogen-containing groups. The fluorescence of N-CQDs was effectively quenched by static quenching and internal filtering effect. Under the optimal experimental conditions, the method had good linearity within 0.3-40  $\mu\text{g/mL}$ , and the detection limit was calculated to be 89.26  $\mu\text{g/L}$ . Moreover, the detection method has been applied to the determination of TC in pork, the recovery rate was 98.40% -106.02%. The results showed that the detection method could be applied to the rapid determination of TC in pork.

**Keywords** pineapple peel; nitrogen doped carbon quantum dots; fluorescent detection; tetracycline