

上转换发光纳米技术检测食品中磺胺类药物含量

桂丽娟^{1,2}, 梁紫璐², 罗永文³, 庄健乐⁴, 毕水莲¹

(1. 广东药科大学食品科学学院, 广东中山 528458) (2. 广东药科大学公共卫生学院, 广东广州 510006)

(3. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642) (4. 华南农业大学材料与能源学院, 广东广州 510642)

摘要: 本文基于上转换发光纳米技术建立了一种灵敏、稳定的检测食品中含五元杂环磺胺类药物的方法。利用上转换发光纳米材料作为能量供体, 金纳米颗粒作为能量受体, 构建荧光共振能量转移体系, 通过荧光量的恢复量来定量游离抗原以达到快速检测含五元杂环磺胺类药物。结果表明, 与抗体相偶联的上转换发光纳米材料和包被抗原的金纳米颗粒能够很好地结合在一起, 具有良好的灵敏度和特异性。荧光的恢复量与磺胺类抗原浓度(范围在 0.08~100 ng/mL)呈现出良好的线性关系, 相关系数为 0.99371, 可以检测到磺胺类药物的最低检出限为 0.08 ng/mL。同时, 该方法成功应用于牛奶中, 能够识别出含五元杂环磺胺类的药物, 且操作简单、特异性好。基于上转换发光纳米技术构建荧光共振能量转移体系检测含五元杂环磺胺类药物残留的方法可为食品中兽药残留的检测提供新思路。

关键词: 上转换发光纳米材料; 荧光共振能量转移; 磺胺类药物; 五元杂环

文章编号: 1673-9078(2021)01-243-250

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0667

Detection Sulfonamide in Food by Upconversion Fluorescence Nanotechnology

GUI Li-juan^{1,2}, LIANG Zi-lu², LUO Yong-wen³, ZHUANG Jian-le⁴, BI Shui-lian¹

(1.College of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

(2.College of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

(3.College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(4.College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, a sensitive and stable method for detecting five-membered heterocyclic sulfonamides in foods was established based on up-conversion fluorescent nanoparticles technology. Using upconverting nanoparticles as energy donors and gold nanoparticles as energy acceptors, a fluorescence resonance energy transfer system was constructed, and the free antigen was quantified by the amount of recovered fluorescence to achieve rapid detection of five-membered heterocyclic sulfonamides. The results showed that the upconverting luminescent nanomaterials conjugated with the antibody and the gold nanoparticles coated with the antigen can be well combined with good sensitivity and specificity. The fluorescence quenching of the upconversion fluorescent nanoparticles was linearly correlated with the concentration of the sulfonamide antigens (in the range of 0.08~100 ng/mL) present in the system, the correlation coefficient was 0.99371, enabling quantification of the sulfonamides and the lowest detection limit was 0.08 ng/mL. At the same time, this method has been successfully applied to milk, and can identify drugs containing five-membered heterocyclic sulfonamides, with simple operation and good specificity. The method of constructing a fluorescence resonance energy transfer system based on upconversion fluorescent nanoparticles technology can provide new ideas to detect residues of five-membered heterocyclic sulfonamides in food.

Key words: upconversion fluorescence nanomaterials; fluorescence resonance energy transfer; sulfonamides; five-membered heterocyclic
引文格式:

桂丽娟,梁紫璐,罗永文,等.上转换发光纳米技术检测食品中磺胺类药物含量[J].现代食品科技,2021,37(1): 243-250

GUI Li-juan, LIANG Zi-lu, LUO Yong-wen, et al. Detection sulfonamide in food by upconversion fluorescence nanotechnology [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 243-250

收稿日期: 2020-07-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31401596);广东省科技计划项目(2014A040401087;2016A020210132);广州市珠江科技新星专项资助项目(201710010003)

作者简介: 桂丽娟(1995-),女,硕士研究生,研究方向:食品安全;通讯作者: 毕水莲(1982-),女,博士,副教授,研究方向:食品安全

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)是一种具有对氨基苯磺酰胺结构的人工合成抗菌药物, SAs由于对氨基苯磺酰基上的R基能够被不同的杂环所取代, 可形成含五元杂环的SAs和含六元杂环的SAs^[1]。SAs抗菌谱广, 对多数革兰氏阳性菌、阴性球菌及某些革兰氏阴性杆菌均有抑制作用^[2]。SAs因抗菌广、成本低而被广泛用于畜牧业和水产养殖业以防治疾病和促进生长^[3,4], 随着抗生素的广泛和过度使用, 导致动物性食品中SAs的残留十分严重, 人类通过长期摄入这些动物性食品会引起过敏、抗生素耐药性、菌群紊乱甚至细胞癌变等问题^[5-7]。而我国农业部规定动物性食品中磺胺类药物的残留限量不能超过100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。

SAs的检测方法常见的有微生物检测法^[9,10]、免疫检测法^[11,12]、毛细管电泳^[13,14]、高效液相色谱法^[15,16]和液相色谱-质谱法等^[17,18]。微生物检测法是通过抗生素药物对微生物抑制作用来测定抗生素药物残留量的方法, 该方法价格低廉、简单, 但操作过程繁琐且易受主观因素影响导致结果不够准确。免疫学分析法操作简单, 适用范围广; 而高效液相色谱法和液相色谱-质谱等方法虽然灵敏度和特异度较高, 但这些方法均存在成本高、对操作人员要求高以及样品前处理过程复杂等问题^[19], 不利于快速检测目标物, 因此, 有必要建立一种快速检测食品中残留SAs的有效方法。

上转换发光纳米材料(Upconverting nanoparticles, UCNPs)是一种在近红外光激发下能发出可见光的发光材料, 即能够将近红外长波长的激发光转换为短波长的紫外或可见光^[20,21]。该类材料不仅具有低毒性、高抗光漂白性、没有生物样品背景荧光干扰等优点, 还具有很大的反斯托克斯效应和较强的细胞组织穿透力^[22,23], 因此成为了很多上转换发光纳米技术(Upconversion fluorescence nanotechnology, UPNT)中理想的荧光供体, 在生物成像、生物传感、生物检测、光动力治疗和食品安全等方面被广泛运用^[24-27]。而大多数应用于生物检测领域的上转换纳米材料都是基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET), FRET是一种通过分子间偶极-偶极耦合从被激发的供体荧光团转移到受体荧光团的能量转移现象^[28]。为了提高FRET的效率和灵敏度, 合适的能量供体与受体显得尤为重要, UCNPs因其独特的光学特性常被用作能量供体^[29,30], 而金纳米颗粒(Gold nanoparticles, GNPs)因具有良好的荧光淬灭能力被广泛用作能量受体^[31]。基于UCNPs所构建的FRET体系已被用于检测各种目标物^[32-34]。Hu等^[29]人利用与抗体相结合的上转换纳米粒子 $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Tm}$ 和被抗原包被的单分散磁性聚苯乙烯微球

(MMPMs)建立了一种用于检测食品中磺胺喹啉的荧光免疫测定法, 得到检测限0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。随后该研究团队基于UCNPs或量子点和包被抗原的胶体金纳米建立了荧光猝灭免疫色谱条用于检测磺胺类药物, 其中磺胺喹啉和磺胺甲恶唑的检测限分别为1 ng/mL 和5 ng/mL ^[35], 虽然该方法成本低, 易于判断, 但通过目测色谱带的变化易受主观因素的影响, 且灵敏度和特异度有待提高。因此, 本文基于上转换纳米粒子 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 和GNPs来构建更为灵敏、稳定的检测食品中含五元杂环磺胺类药物的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

稀土氧化物(氧化钇, 氧化镱, 氧化铒, 99.99%)、硝酸(HNO_3)、氟化钠(NaF)、柠檬酸钠、氢氧化钠(NaOH)、正硅酸乙酯(TEOS)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、氨水($\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, 25%)均为分析纯, 购买于国药集团化学试剂有限公司; 氯金酸(HAuCl_4 , $\text{Au}\geq 47.5\%$)、PVP(平均分子量58000)、戊二醛(25%, AR)、硼氢化钠(NaBH_4 , GR)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim, TMP)、磺胺甲恶唑(Sulfamethoxazole, SMZ)、乙醇(分析纯), 均购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磺胺类抗原(SAs Ag-BSA, -20°C 保存)、含五元杂环磺胺类药物抗体(SAs-Ab, -20°C 保存)、牛血清白蛋白(BSA, 4°C 保存), 购于美国Sigma-Aldrich公司; 磷酸缓冲溶液(0.01 mol/L PBS, 实验室自制); 牛奶(伊利牛奶, 500 mL); 实验中用水均为超纯水。

1.2 主要仪器和设备

Nicolet iS5 傅立叶变换红外光谱仪、低温高速离心机 and 溴化钾压片, 均购自美国ThermoFisher公司; XD-2X/M4600 型号X射线衍射仪, 北京普析通用仪器有限公司; JEM-2100F 型号透射电子显微镜, 日本电子株式会社; UV-1800 紫外分光光度计, 日本Shimadzu公司; Nova Nano SEM 430 场发射扫描电子显微镜, 荷兰FEI公司; KQ-2200DB 型超声波清洗器, 反应釜, 均相反应器和磁力加热搅拌器, 均购自郑州巩义仪器设备公司; pH计, 上海雷磁仪器厂; 配备有R928光电倍增管探测器的JOBIN YVON TRIAX 320 光谱仪, 法国HORIBA Jobin Yvon公司; 976 nm 激光二极管, 美国Coherent Corp公司。

1.3 方法

1.3.1 上转换发光材料 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的制备及修饰^[36,37]

通过水热法制备 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$, 具体步骤如下: 称取一定量的稀土氧化物氧化钇、氧化铕和氧化钪分别放入不同的烧瓶中, 然后向烧瓶中滴加 HNO_3 溶液直到氧化物溶解, 通过加热蒸发去除多余的 HNO_3 溶液, 最后加入去离子水即可配成稀土硝酸溶液。然后分别取 2.5 mL 硝酸钪溶液, 1.5 mL 硝酸铕和 1.2 mL 硝酸钇溶液, 混合均匀; 再取 2 mL 的柠檬酸钠溶液和 25 mL NaF 溶液, 在磁力搅拌下缓慢滴加到上述混合溶液中, 然后将混合溶液转移到高压反应釜中, 用 NaOH 调节溶液的 pH 值 ($\text{pH}=5$), 磁力搅拌 1 h。搅拌完后将反应釜放入烘箱干燥, 180°C 加热 4 h, 然后使反应釜冷却至室温, 将得到的沉淀物转移到离心管中进行离心, 离心后弃上清液并用二次蒸馏水、乙醇清洗 3 次, 最后收集洗涤好的沉淀于 60°C 烘箱中烘干 24 h, 即可获得上转换发光材料 ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$), 研磨成粉末备用。

为使合成的上转换纳米材料具备良好的生物相容性, 需对其进行表面修饰。采用改良的 Stöber 法^[38] 对其进行修饰, 取制备好的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 粉末 40 mg 溶于 60 mL 正丙醇溶液中, 搅拌均匀后将混合溶液放入恒温水浴锅中 35°C 下搅拌 40 min, 然后分别量取 20 mL 纯水和 2.5 mL 25% 的氨水加入上述混合溶液中, 反应 1 h。取 25 μL 正硅酸乙酯并将其溶于 20 mL 的正丙醇溶液中, 然后将其逐滴滴加至上述溶液, 继续反应 4 h。为了表面修饰上氨基, 将 0.2 mL 的 APTES 溶液溶于 30 mL 的正丙醇溶液, 并滴入到上述溶液中, 剧烈搅拌 1 h, 接着将反应后的溶液转移至离心管中离心, 离心后弃上清, 得到的沉淀物用乙醇和蒸馏水洗涤 3 次。最后将其放入 60°C 烘箱中烘干 12 h, 即可获得氨基化的上转换纳米粒子 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,ErUCNPs}$ 。

1.3.2 UCNPs 连接抗磺胺类抗体的制备

参照文献^[39], 采用经典的戊二醛交联法稍作修饰进行制备, 具体为: 取制备好的氨基化上转换纳米粒子粉末 20 mg, 利用超声将其分散在 5 mL PBS 溶液中, 然后加入 1.25 mL 25% 戊二醛溶液和 100 mg NaBH_4 , 混合后在室温下振荡 1 h。反应结束后, 将反应后的产物进行离心, 得到的沉淀用 PBS 洗涤 3 次, 洗涤完后将沉淀物再次超声分散在 PBS 中, 然后将 25 μL SAs-Ab 和 100 mg NaBH_4 加入上述溶液, 在室温摇床上振荡 1 h。最后, 加入 100 mg Tris 作为封闭剂, 室温下缓慢振荡 1 h。反应结束后通过离心得到沉淀物, 用 PBS 洗涤 3 次后去掉上清液并用 1 mL PBS 收集沉淀, 得到的 $\text{SAs-Ab-NaYF}_4:\text{Yb,ErUCNPs}$ 于 4°C

下保存。

1.3.3 金纳米材料 (Gold nanoparticles, GNPs) 制备及偶联磺胺类抗原

GNPs 是通过利用柠檬酸钠作为还原剂进行制备^[40,41], 具体为: 先用 0.0216 g HAuCl_4 和 240 mL 去离子水混合以制备 HAuCl_4 水溶液, 然后将溶液转移到三颈圆底烧瓶中, 剧烈搅拌下升温到 100°C , 保持 10 min。然后取柠檬酸钠 0.125 g 溶解于 12.5 mL 去离子水中制备成柠檬酸钠水溶液, 接着迅速将柠檬酸钠溶液加入到上述溶液中, 溶液颜色由黄色变成酒红色后, 保持反应 30 min, 自然冷却到室温后加入 1 mL 去离子水和 0.0042 g PVP, 混合后室温下搅拌过夜, 即可得到的 GNPs 溶液。

取上述制备好的 GNPs 10 mL, 用 PBS 将溶液的 pH 值调至 8, 然后往溶液中加入 20 μL SAs Ag-BSA , 冰浴中搅拌 1 h。接着加入 50 mg BSA 作为封闭剂, 继续搅拌 1 h。反应后将溶液在 10000 r/min 下离心 10 min, 得到沉淀用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 弃上清液, 最后分散在 10 mL 0.01 mol/L PBS 中, 得到 GNPs 偶联 SAs Ag BSA 的溶液, 即 SAs Ag BSA-GNPs 。

为使 SAs Ag BSA-GNPs 能够很好的与 $\text{SAs Ab-NaYF}_4:\text{Yb,ErUCNPs}$ 结合到一起, 通过固定 GNPs 的量, 调整磺胺类抗原的含量, 使其添加量由 20 μL 增加到 60 μL , 以得到最合适的 SAs Ag BSA-GNPs 含量。

1.3.4 构建 UCNPs-GNPs 体系, 检测不同含量的 SAs

将含有 100 μL 25 $\mu\text{g/mL}$ $\text{SAs Ab-NaYF}_4:\text{Yb,ErUCNPs}$ 溶液分别添加到一系列含有 SAs Ag-BSA 溶液的小试管中, 反应 0.5 h 后取制备好的 20 $\mu\text{g/mL}$ SAs Ag-BSA-GNPs 溶液适量加入上述小试管中, 然后加入 PBS 溶液定容至 1 mL, 室温下振荡 40 min, 用光谱仪进行荧光测定。

1.3.5 检测牛奶中含五元杂环 SAs

将相同浓度的 SAs Ag-BSA 、BSA、抗生素 SMZ 和 TMP 分别加入到牛奶中, 形成混合溶液。然后将等量的牛奶混合溶液分别加入到含有 100 μL 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{SAs Ab-NaYF}_4:\text{Yb,ErUCNPs}$ 溶液的若干小试管中, 反应 0.5 h, 接着将适量 20 $\mu\text{g/mL}$ SAs Ag-BSA-GNPs 溶液加入上述混合溶液中, 并用 PBS 溶液将溶液定容至 1 mL, 同时使混合物浓度调整为 20 ng/mL, 置于摇床上反应 40 min 后, 进行荧光测定。

1.3.6 数据处理

利用扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 和 X 射线衍射 (X-ray diffraction,

XDR)分别对 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 的形貌和晶型结构进行表征;对 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 修饰前后的表征通过傅立叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR);利用透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 和紫外吸收光谱 (Ultraviolet visible spectroscopy, UV-vis) 检测合成的 GNP 以及偶联磺胺类抗原的金纳米颗粒。在 976 nm 激发光下对偶联了磺胺类抗体 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 进行荧光测试,观察其是否成功连接上抗体。

2 结果与讨论

2.1 UCNP-GNP 体系的原理

UCNP-GNP 体系的原理实际上是荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的过程, FRET 是一种通过分子间偶极-偶极耦合从被激发的供体荧光团转移到受体荧光团的非辐射能量转移现象^[28]。其作用机理如图 1 所示, 通过将 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 作为能量供体, GNP 作为能量受体, 分别结合 SAs 抗体和抗原, 由于能量供体的发射光谱与能量受体的吸收光谱能够发生重叠, 抗原抗体会发生特异性结合, 因此能够缩短供受体分子之间的间距, 使二者足够靠近, 从而实现能量淬灭。通过添加一定量的游离抗原, 让其和 GNP 上的抗原发生免疫竞争, 从而破坏 UCNP 和 GNP 的 FRET 体系, 使荧光量得以恢复, 因此可根据荧光强度的变化对游离的抗原进行量化。而实现 FRET 主要需满足以下 2 个条件: (1) 供体的发射光谱和受体的吸收光谱要有重叠; (2) 供体必须足够靠近受体, 二者之间的间距要足够小^[42]。

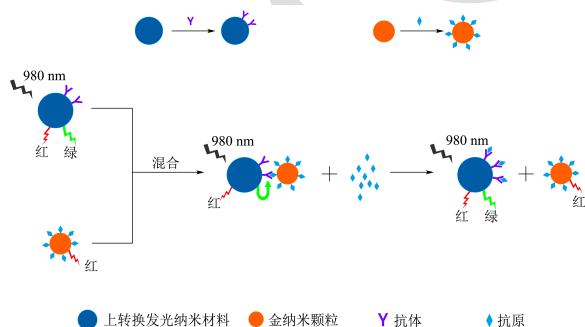


图 1 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 和 GNP 的 FRET 过程

Fig.1 The FRET Process Between $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP and GNP

2.2 UCNP 和 GNP 的合成表征

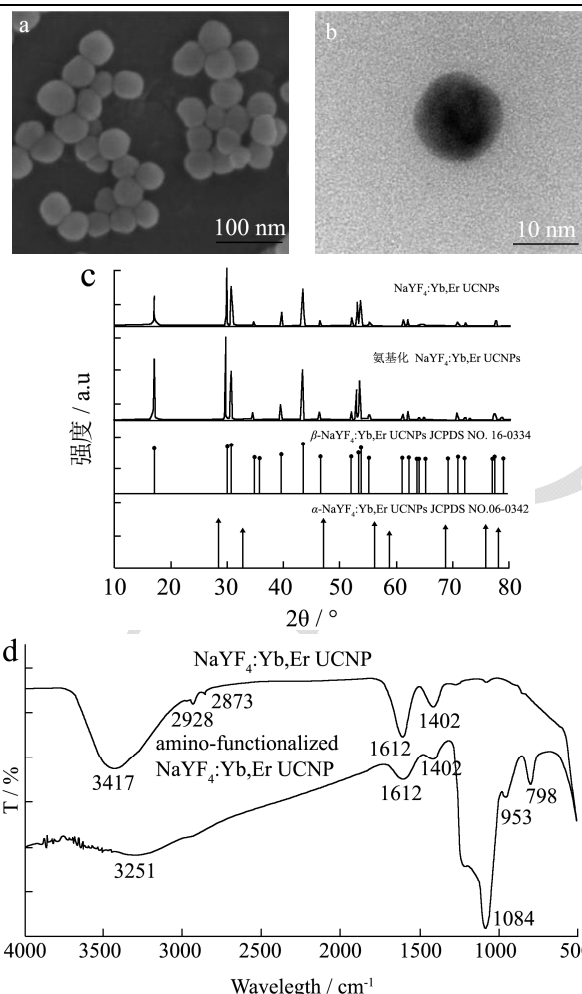


图 2 (a) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 的 SEM 图; (b) GNP 的 TEM 图; (c) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 的 XRD 图; (d) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 修饰前后的红外谱图

Fig.2 (a) The SEM image of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP; (b) the TEM image of GNP; (c) The XRD patterns of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP; (d) The image of FT-IR spectrum of the $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP before and after surface modification (amino- $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP)

利用扫描电子显微镜 (SEM) 对 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 的形貌进行表征, 图 2a 为 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 的 SEM 图。从图中可看出通过水热法制备的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 粒径均一, 约为 80 nm。由于合成的上转换发光材料表面没有羧基或氨基等亲水性的官能团, 不能与生物大分子材料相结合, 因此需对其表面进行氨基化修饰^[43]。利用 X 射线衍射 (XDR) 对 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 晶型结构进行表征, 结果如图 2c 所示。从图 2c 中可看出, 采用二氧化硅壳包被并用 TEOS 和 APTES 进一步功能化修饰 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP 后, 所得的氨基功能化 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNP

与标准卡片 JCPDS No.16-334 一致, 且没有明显的杂质峰, 这表明 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 具有纯正六方相晶型, 同时氨基化修饰后与修饰前相比, 上转换纳米材料的结构没有受到影响, 修饰后的荧光强度增强, 这为后续构建 FRET 体系提供了良好的基础。图 2d 为 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 修饰前后的红外图谱 (FT-IR), 从 FT-IR 中可看出, 修饰前, 在 3417 、 2928 、 2873 cm^{-1} 处出现了强度不一的吸收峰, 其中在 3417 cm^{-1} 观察到羟基的伸缩振动特征峰; 2928 和 2873 cm^{-1} 等处出现了属于亚甲基的不对称和对称伸缩振动特征峰。氨基修饰后, 出现了一个位于 1084 cm^{-1} 处新的吸收峰, 同时伴随 2928 、 2873 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 这归结于二氧化硅键的对称伸缩振动, 说明上转换纳米材料已成功被二氧化硅包覆。而在 3251 和 1612 cm^{-1} 处均出现了由氨基引起的振动峰, 这也证明了所制备的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 氨基化修饰成功。

用透射电镜 (TEM) 对 GNP 的合成进行表征, 结果如图 2b 所示。通过柠檬酸钠合成法制备的 GNP 表面带有负电荷, 形状近似为球形, 尺寸相对均匀, 为 10 nm , 具有良好的分散性^[38]

2.3 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 连接 SAs Ab 和 GNP

连接 SAs Ag-BSA 的表征

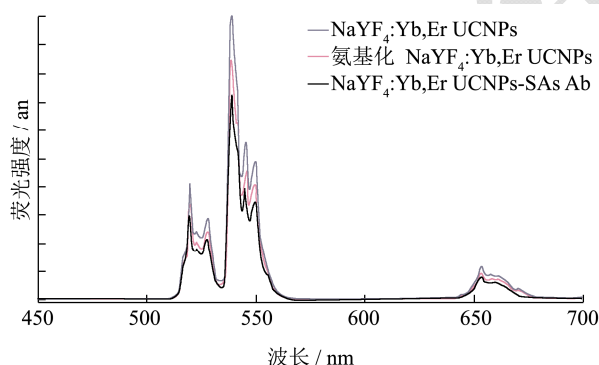


图 3 976 nm 激发下 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 荧光图谱和 GNP 的紫外吸收光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs in the 976 nm excitation and the UV absorption spectra of GNP

上转换发光纳米材料在 976 nm 激发光下发射出绿光, 如图 3 所示。从图中可看出 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 具有三个荧光特征发射峰, 分别位于 525 nm 、 541 nm 和 660 nm 处, 这是由于离子与离子之间发生能级跃迁所致。其中 541 nm 处的荧光强度最强, 呈现出明显的绿色荧光, 故将其作为响应光谱, 后续平台的构建主要看此处的荧光强度变化。此外, 通过对 UCNPs 和 SAs-Ab 偶联前后的荧光图进行对比, 发现偶联后

的波长和形状与偶联前相一致, 发射峰的位置没有改变, 但位于 541 nm 处荧光强度有所减弱, 说明 UCNPs 已经成功连接上抗体。

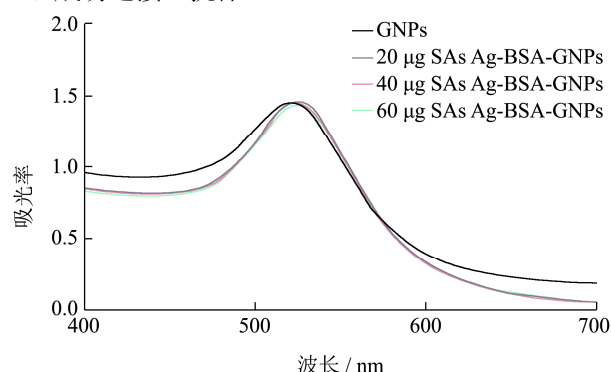


图 4 不同 SAs Ag-BSA 含量结合 GNP 的可见吸收光谱图
Fig.4 The visible absorption spectrum of different SAs Ag-BSA amount binding with GNP

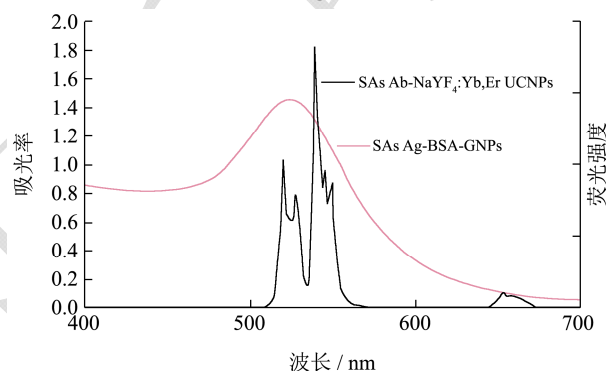


图 5 SAs Ag-BSA GNP 的紫外-可见吸收光谱和 SAs Ab- $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs 的荧光发射光谱图

Fig.5 The fluorescence recovery UV-vis absorption spectrum of SAs Ag-BSA GNP and the UC fluorescence emission spectrum of SAs Ab- $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ UCNPs

图 4 为不同含量的 SAs Ag-BSA 与 GNP 结合后可见吸收光谱图, 可看出 GNP 的紫外可见吸收光谱由偶联前的 520 nm 红移到偶联后的 525 nm 处, 这种红移现象与 YOU 等^[40]人的研究相似, 说明 GNP 已成功偶联上了 SAsAg-BSA, 在红移的过程中没有明显的峰展宽, 说明 GNP 不仅没有聚集现象而且具有良好的分散性, 同时, 偶联 SAs Ag-BSA 后的 GNP 所产生的红外的吸收光谱红移后有利于提高 FRET 体系的灵敏度^[44]。从图中也可看出, 随着 SAs Ag-BSA 的增加, 吸收峰位置发生了变化, 其位置变为 528 nm 处。当抗原浓度增加到 $40\text{ }\mu\text{L}$ 和 $60\text{ }\mu\text{L}$ 时, 吸收峰位置不再随之改变, 可见当抗原浓度为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 时是最适宜浓度。当 UCNPs 和 GNP 结合后引起能量共振转移时, GNP 的吸收光谱和 UCNPs 的荧光发射光谱具有重叠的光谱 (如图 5 所示), 能够发生荧光淬灭, 说明 UCNPs 与 GNP 之间存在静电吸引, 能很好的结合到

一起。

2.4 基于 UCNPs-GNPs 体系检测磺胺类药物的结果

的结果

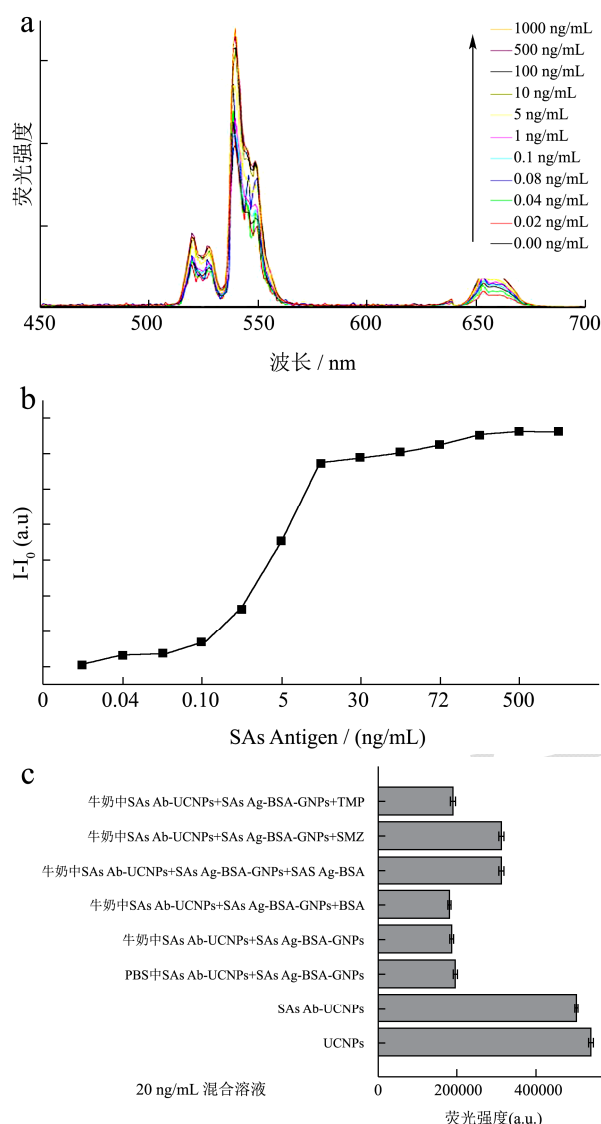


图 6 (a) 不同浓度的 SAs Ag-BSA 在 FRET 体系的荧光强度; (b) 不同浓度 SAs Ag-BSA 中 FRET 体系的荧光强度关系; (c) 20 ng/mL 浓度下 BSA、SAs Ag-BSA、SMZ 和 TMP 的荧光强度

Fig.6 (a) The fluorescence spectra in the FRET system with different concentrations of SAs Ag-BSA; (b) The relationship between the different concentration of SAs Ag-BSA and the fluorescent intensity in FRET system; (c) The differential fluorescence response of the aptasensor to BSA, SAs Ag-BSA, antibiotic of SMZ and TMP at the same concentration (20 ng/mL)

为了定量检测磺胺类药物, 改变游离抗原的加入量, 检测在 976 nm 的红外光激发下的发光强度变化量。如图 6a 所示, 荧光量随着游离抗原浓度的增加而

逐渐增加。图 6b 为不同浓度 SAs Ag-BSA 下 UCNPs-GNPs 体系的荧光强度关系, 其中 $I-I_0$ 代表荧光淬灭-恢复量 (I : 加入不同浓度 SAs Ag-BSA 后的 UCNPs-GNPs 体系荧光量, I_0 : 没有加 SAs Ag-BSA 的 UCNPs-GNPs 体系荧光量), 随着 SAs Ag-BSA 浓度的增加, 体系中的荧光恢复量逐渐增加, 直到 100 ng/mL 荧光强度开始趋于平稳。在 0.08~100 ng/mL 范围内抗原浓度与 UCNPs 的荧光强度显示出了良好的线性相关, 相关系数 (R^2) 为 0.99371, 且当浓度高于 100 ng/mL 时, UCNPs 的荧光强度逐渐平稳, 检测限为 0.08 ng/mL, 比文献报道的基于 NaYF₄: Yb/Tm 和 MMPMs 所构建的检测方法的检测限低^[29], 这说明本文所构建的 FRET 体系能够用于磺胺类药物的免疫测定。

2.5 牛奶中磺胺类药物检测结果

图 6c 为 20 ng/mL 浓度下 BSA、SAs Ag-BSA、TMP 和 SMZ 的荧光强度变化图。如图所示, 在 UCNPs-GNPs 体系中, 添加了牛奶的溶液的荧光强度比添加了 PBS 的荧光强度略有减弱, 但总体上影响不大, 说明牛奶并不会改变上转换发光材料的发光性质。而添加了 BSA 和 TMP 的混合溶液与未添加抗原的牛奶混合溶液相比, 荧光强度基本保持一致, 没有明显改变, 说明二者不会与体系中的 SAs Ab-UCNPs 发生免疫反应, 也不会和 SAs Ag-BSA-GNPs 形成免疫竞争。而添加了 SAs Ag-BSA 和 SMZ 的溶液, 荧光强度均增强, 说明二者能够与体系中的抗体发生免疫反应。同时, 也证明所构建的 FRET 体系具有良好的特异性。BSA 和 TMP 都不含有五元杂环, 不能与体系中的抗体发生反应, 而 SAs Ag-BSA 和 SMZ 都含有五元杂环, 能够与 UCNPs-GNPs 体系中的抗体发生特异性结合, 使得 UCNPs 和 GNPs 的 FRET 体系破坏, 荧光淬灭消失, 使得荧光量得以恢复, 这说明基于 UCNPs-GNPs 所构建的 FRET 体系可以运用到牛奶样品中含五元杂环磺胺类药物的检测。

3 结论

本研究利用 UCNPs 发光性能好、低毒性、抗光漂白、对生物样品无损伤等特点, 结合 GNPs 构建 FRET 体系, 为 SAs 检测提供了一种快速、灵敏、稳定的方法, 能够检测痕量含五元杂环 SAs 残留, 得到最低检测限为 0.08 ng/mL, 线性相关度在 0.08~100 ng/mL 之间, 同时也适用于牛奶中含五元杂环 SAs 的检测, 为食品安全检测提供技术支持与良好的保障, 也为 UPNT 运用于检测食品中更多的有害物质提供了

新思路和良好的基础。

参考文献

- [1] Feng M, Baum J C, Nesnas N, et al. Oxidation of sulfonamide antibiotics of six-membered heterocyclic moiety by ferrate (VI): kinetics and mechanistic insight into SO_2 extrusion [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(5): 2695-2704
- [2] Dmitrienko S G, Kochuk E V, Apyari V V, et al. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection-a review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 850: 6-25
- [3] Herrera-Herrera A V, Hernández-Borges J, Afonso M M, et al. Comparison between magnetic and non magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples [J]. *Talanta*, 2013, 116: 695-703
- [4] Chen J, Xie S. Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 640-641: 1465-1477
- [5] Companyó R, Granados M, Guiteras J, et al. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methodologies [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(4): 877-891
- [6] Dorn J M, Alpern M, McNulty C, et al. Sulfonamide drug allergy [J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2018, 18(7): 38
- [7] Dmitrienko S G, Kochuk E V, Tolmacheva V V, et al. Determination of the total content of some sulfonamides in milk using solid-phase extraction coupled with off-line derivatization and spectrophotometric detection [J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 51-56
- [8] 中华人民共和国农业部.第 235 号公告:动物性食品中兽药最高残留限量(EB/OL). [2008-03-04]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/nybz/200803/t20080304_1028649.htm.
- [9] Bohn T, Pellet T, Boscher A, et al. Developing a microbiological growth inhibition screening assay for the detection of 27 veterinary drugs from 13 different classes in animal feedingstuffs [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, 30(11): 1870-1887
- [10] Wu Q, Peng D, Liu Q, et al. A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotics residues in milk, chicken egg and honey [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 436
- [11] Li C, Luo X, Li Y, et al. A class-selective immunoassay for sulfonamides residue detection in milk using a superior polyclonal antibody with broad specificity and highly uniform affinity [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 443
- [12] Chen M, Wen K, Tao X, et al. A novel multiplexed fluorescence polarisation immunoassay based on a recombinant bi-specific single-chain diabody for simultaneous detection of fluoroquinolones and sulfonamides in milk [J]. *Food Additives & Contaminants*, 2014, 31(12): 1959-1967
- [13] Wu C, Sun Y, Wang Y, et al. 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid as derivatization reagent for 405 nm laser-induced fluorescence detection: A case study for the analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis [J]. *Talanta*, 2019, 201:16-22
- [14] An J, Wang X, Ming M, et al. Determination of sulfonamides in milk by capillary electrophoresis with PEG@ MoS_2 as a dispersive solid-phase extraction sorbent [J]. *Royal Society Open Science*, 2018, 5(5): 172104
- [15] Song Y P, Zhang L, Wang G N, et al. Dual-dummy-template molecularly imprinted polymer combining ultra performance liquid chromatography for determination of fluoroquinolones and sulfonamides in pork and chicken muscle [J]. *Food Control*, 2017, 82: 233-242
- [16] Patyra E, Przeniosło-Siwczyńska M, Kwiatek K. Determination of sulfonamides in feeds by high-performance liquid chromatography after fluorescamine precolumn derivatization [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 452
- [17] Gavilán R E, Nebot C, Patyra E, et al. Simultaneous analysis of coccidiostats and sulphonamides in non-target feed by HPLC-MS/MS and validation following the Commission Decision 2002/657/EC [J]. *Food Additives & Contaminants*, 2018, 35(6): 1093-1106
- [18] Suo D, Wang P, Xiao Z, et al. Multiresidue determination of 27 sulfonamides in poultry feathers and its application to a sulfamethazine pharmacokinetics study on laying hen feathers and sulfonamide residue monitoring on poultry feathers [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(40): 11236-11243
- [19] Liu X, Gao T, Gao X, et al. An aptamer based sulfadimethoxine assay that uses magnetized upconversion nanoparticles [J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184: 3557-3563
- [20] Li H, Wang X, Huang D, et al. Recent advances of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biological applications [J]. *Nanotechnology*, 2020, 31(7): 072001

- [21] Xu S, Huang S, He Q, et al. Upconversion nanophosphores for bioimaging [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2015, 66(8): 72-79
- [22] Wang F, Banerjee D, Liu Y, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy [J]. The Analyst, 2010, 135(8): 1839-1854
- [23] Wen S, Zhou J, Zheng K, et al. Advances in highly doped upconversion nanoparticles [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 2415
- [24] Jin B, Wang S, Lin M, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 90: 525-533
- [25] Choi S Y, Baek S H, Chang S J, et al. Synthesis of upconversion nanoparticles conjugated with graphene oxide quantum dots and their use against cancer cell imaging and photodynamic therapy [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 93: 267-273
- [26] Panikar S S, Ramírez-García G, Vallejo-Cardona A A, et al. Novel anti-HER2 peptide-conjugated theranostic nanoliposomes combining NaYF₄:Yb,Er nanoparticles for NIR-activated bioimaging and chemo-photodynamic therapy against breast cancer [J]. Nanoscale, 2019, 11(43): 20598-20613
- [27] Luo C H, Huang C T, Su C H, et al. Bacteria-mediated hypoxia-specific delivery of nanoparticles for tumors imaging and therapy [J]. Nano Letters, 2016, 16(6): 3493-3499
- [28] Wang C, Li X, Zhang F. Bioapplications and biotechnologies of upconversion nanoparticle-based nanosensors [J]. The Analyst, 2016, 141(12): 3601-3620
- [29] Hu G, Sheng W, Zhang Y, et al. Upconversion nanoparticles and monodispersed magnetic polystyrene microsphere based fluorescence immunoassay for the detection of sulfaquinoxaline in animal-derived foods [J]. Journal Of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(19): 3908-3915
- [30] Wu S, Duan N, Li X, et al. Homogenous detection of fumonisin B(1) with a molecular beacon based on fluorescence resonance energy transfer between NaYF₄:Yb, Ho upconversion nanoparticles and gold nanoparticles [J]. Talanta, 2013, 116: 611-618
- [31] Wang Y, Wu Z, Liu Z. Upconversion fluorescence resonance energy transfer biosensor with aromatic polymer nanospheres as the label-free energy acceptor [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(1): 258-264
- [32] Sun L, Wang T, Sun Y, et al. Fluorescence resonance energy transfer between NH₂-NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄@SiO₂ upconversion nanoparticles and gold nanoparticles for the detection of glutathione and cadmium ions [J]. Talanta, 2020, 207: 120294
- [33] Liu Y, Ouyang Q, Li H, et al. Turn-on fluorescence sensor for Hg²⁺ in food based on FRET between aptamers-functionalized upconversion nanoparticles and gold nanoparticles [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(24): 6188-6195
- [34] Chen M, Hassan M, Li H, et al. Fluorometric determination of lead(II) by using aptamer-functionalized upconversion nanoparticles and magnetite-modified gold nanoparticles [J]. Mikrochimica Acta, 2020, 187(1): 85
- [35] Hu G, Sheng W, Li J, et al. Fluorescent quenching immune chromatographic strips with quantum dots and upconversion nanoparticles as fluorescent donors for visual detection of sulfaquinoxaline in foods of animal origin [J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 982: 185-192
- [36] Rafique R, Baek S H, Phan L, et al. A facile hydrothermal synthesis of highly luminescent NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconversion nanoparticles and their biomonitoring capability [J]. Materials Science & Engineering. C, Materials For Biological Applications, 2019, 99: 1067-1074
- [37] Li C, Quan Z, Yang J, et al. Highly uniform and monodisperse beta-NaYF(4):Ln³⁺(Ln =Eu, Tb, Yb/Er, and Yb/Tm) hexagonal microprism crystals:hydrothermal synthesis and luminescent properties [J]. Inorganic Chemistry, 2007, 46(16): 6329-6337
- [38] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1968, 26: 62-69
- [39] Wang M, Hou W, Mi C C, et al. Immunoassay of goat antihuman immunoglobulin G antibody based on luminescence resonance energy transfer between near-infrared responsive NaYF₄:Yb, Er upconversion fluorescent nanoparticles and gold nanoparticles [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(21): 8783-8789

(下转第 338 页)