

文章编号: 1000-7032(2021)12-1951-10

基于类芬顿反应的锌掺杂碳量子点荧光探针 测定过氧化氢和胆固醇

孙雪花*, 强 瑜, 郝都婷, 田 锐

(延安大学化学与化工学院 延安市绿色合成材料与化学安全检测重点实验室, 陕西 延安 716000)

摘要: 通过一步水热法合成了荧光量子产率高达 34% 的锌掺杂碳量子点 (Zinc doped carbon quantum dots, Zn-CQDs), 并对 Zn-CQDs 的结构性能进行分析。基于 Cu^{2+} 与 H_2O_2 产生羟基自由基可有效猝灭 Zn-CQDs, 构建了 Zn-CQDs- Cu^{2+} 荧光探针检测过氧化氢和胆固醇浓度。实验发现, 在 $\text{pH} = 7.60$ 的 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) 缓冲溶液中, 于 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 孵化 40 min 时, 体系的 $(F_0 - F)/F_0$ 与 H_2O_2 浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内, 与胆固醇浓度在 $3.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-7}$ mol/L 范围内分别呈良好的线性关系, 检出限分别为 7.2×10^{-7} mol/L 和 6.8×10^{-7} mol/L。该方法用于水样中 H_2O_2 和牛奶中胆固醇含量的测定, 回收率分别可达 98.55% ~ 105.4% 和 98.00% ~ 103.0%, 结果满意。该方法也为检测 H_2O_2 生成反应的其他代谢物提供了有效的检测思路。

关键词: 锌掺杂碳量子点; 过氧化氢; 胆固醇; 荧光猝灭

中图分类号: O657.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20210271

Detection of Hydrogen Peroxide and Cholesterol Based on Zinc Doped Quantum Dots and Fenton-like Reaction Fluorescent Probe Preparation

SUN Xue-hua*, QIANG Yu, HAO Du-ting, TIAN Rui

(Yan'an Key Laboratory of Green Synthetic Materials and Chemical Safety Testing, College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

* Corresponding Author, E-mail: happyxh908080@163.com

Abstract: Zinc doped carbon quantum dots (Zn-CQDs) with fluorescence quantum yield up to 34% were synthesized by one step hydrothermal method, and the structural properties of Zn-CQDs were analyzed. Based on the fact that hydrogen peroxide produced by Cu^{2+} and H_2O_2 can effectively quench Zn-CQDs, a Zn-CQDs- Cu^{2+} fluorescent probe was constructed to detect hydrogen peroxide and indirectly detect cholesterol concentration. The effects of buffer type, pH, reaction time and temperature on the determination of H_2O_2 and cholesterol were investigated. The results showed that $(F_0 - F)/F_0$ of the system has good linear relationship with the concentration of H_2O_2 when incubated at $50\text{ }^\circ\text{C}$ for 40 min in HEPES buffer solution with $\text{pH} = 7.06$. The linear range was $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L. The detection limit was 7.2×10^{-7} mol/L. The $(F_0 - F)/F_0$ of the system also has good linear relationship with concentration of cholesterol. The linear range was $3.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-7}$ mol/L, and the detection limit was 6.8×10^{-7} mol/L. The method was used for the

收稿日期: 2021-08-26; 修订日期: 2021-09-15

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金(2020JQ-789); 陕西省教育厅重点科学研究项目(20JS156)资助

Supported by The Natural Science Special Project of Shaanxi Province(2020JQ-789); Key Scientific Research Projects of Shaanxi Provincial Department of Education(20JS156)

determination of H_2O_2 in water samples and cholesterol content in milk, the detection recovery rate can reach 98.55% - 105.4% and 98.00% - 103.0% respectively, and the result was satisfactory. It can also provide effective detection ideas for the detection of other metabolites in the H_2O_2 reaction.

Key words: zinc doped carbon quantum dots; hydrogen peroxide; cholesterol; fluorescence quenching

1 引 言

碳量子点 (Carbon quantum dots, CQDs) 是一种新型零维碳纳米材料, 表面含有丰富的含氧官能团, 作为电子受体和电子给予体, 在光电子学^[1-2]、催化发光^[3]以及传感器^[4-6]领域具有广泛应用。近年来, 为了改变 CQDs 表面结构单一、内部电子传递性能较差的问题, 多采用表面功能化和杂原子掺杂的策略。但使用聚合物或有机小分子的表面功能化不能在特定分析中占据功能化位置^[7], 而杂原子掺杂易于操作是改善 CQDs 的发光特性和电子结构的更有利的方法。随之金属掺杂 CQDs 渐有出现, 且能很好地提高 CQDs 的荧光量子产率。如 Xu 等^[8]以锰掺杂首次成功合成了具有可逆切换蓝色荧光的高光稳定性 Mn-CQDs, 荧光量子产率高达 54.4%。Yue 等^[9]采用水热法制备的钕掺杂的 CQDs 具有 20.79% 的较高发光效率和高效的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 生成。这是由于金属不同的外层电子轨道能很好地调节 CQDs 的能带结构, 作为 CQDs 的电子给体, 促进电子转移, 从而提高了 CQDs 的荧光量子产率。同时, 研究还发现金属掺杂的 CQDs 除了实现荧光量子产率提高和荧光调制, 还具有一些新的物理化学性质, 如催化性能和弛豫性能。因此, 合成并探究新型金属掺杂 CQDs 的性能还是很有必要的。

过氧化氢 (Hydrogen peroxide, H_2O_2) 是一种典型的 ROS, 作为细胞周期内的胞内信使, 起着至关重要的作用^[10]。细胞内 H_2O_2 的过量产生与多种疾病有关, 如心血管疾病、阿尔兹海默病、神经退行性疾病和各种癌症。此外, 人体中多种代谢物, 如胆固醇、黄嘌呤、葡萄糖、乳糖、胆碱、L-赖氨酸、丙酮酸等, 通过酶催化反应会生成 H_2O_2 , 而胆固醇 (Cholesterol) 的过量摄入可能导致心肌缺血、冠状动脉粥样硬化等疾病, 因此, 开发一种有效的工具来检测 H_2O_2 并间接检测胆固醇是十分有必要的。目前, H_2O_2 和胆固醇的检测方法有电

解分析、高效液相色谱法和分光光度法等^[11]。荧光分析法^[12-13]由于响应快、简单、灵敏被认为是最有效的检测手段, 已有基于模拟酶活性^[14]检测 H_2O_2 和胆固醇含量的荧光分析法。但传统的有机染料和半导体量子点等多种荧光染料在荧光分析中存在细胞相溶性差、水溶性低的缺点, 因此具有易于合成、水溶性高、细胞毒性低、发光性能优越等特点的 CQDs 备受关注。

本文以醋酸锌作为金属源, 盐酸乙二胺为络合剂, 柠檬酸为碳源, 通过一步水热法合成了发射峰位于 428 nm 的 Zn-CQDs, 荧光量子产率达到 34%。基于 Cu^{2+} 与 H_2O_2 构成类芬顿体系产生羟基自由基进一步猝灭 Zn-CQDs 的荧光强度, 构建了检测 H_2O_2 含量的 Zn-CQDs- Cu^{2+} 传感器。此外, 胆固醇在胆固醇氧化酶作用下可产生 H_2O_2 , 因而可间接检测胆固醇。这为参与 H_2O_2 生成反应的代谢物 (胆固醇, 黄嘌呤, 葡萄糖等) 的检测也提供了有效的方法。

2 实 验

2.1 主要仪器和试剂

UV-2550 型紫外-可见吸收光谱仪 (日本岛津); FLSP920 型稳态瞬态荧光光谱仪 (英国爱丁堡); LS-55 型荧光分光光度计 (美国珀金埃尔默); IR Prestige-21 傅里叶变换红外光谱仪 (日本岛津); ESCALAB 250XI 型 X 射线光电子能谱仪 (美国赛默飞世尔科技); XRD-7000 X 粉末衍射仪 (日本岛津); Tecnai G2 F20 S-Twin 型高分辨透射电子显微镜 (美国 FEI)。

胆固醇标准溶液: 1.0×10^{-3} mol/L, 取 0.019 g 胆固醇标准品 (上海麦克林生化科技有限公司) 用无水乙醇溶解定容至 50 mL 容量瓶。用时逐级稀释。胆固醇氧化酶: 0.5 mg/mL。HEPES (北京索莱宝科技有限公司) 缓冲溶液: pH = 7.60。过氧化氢、盐酸乙二胺、胆固醇氧化酶 (上海麦克林生化科技有限公司)。试剂级别均为分析纯, 实验用水为超纯水。

2.2 Zn-CQDs 合成

准确称取 0.66 g 醋酸锌、0.63 g 柠檬酸和 0.40 g 盐酸乙二胺置于烧杯中, 加入 30 mL 水使其超声溶解, 将其转移至 50 mL 的反应釜中, 在 180 °C 下反应 6 h, 冷却至室温后, 将溶液以 12 000 r/min 的转速离心 10 min, 除去沉淀, 用滤膜(0.22 μm)过滤, 在 4 °C 下冷藏保存备用。将滤液稀释 100 倍得 Zn-CQDs 工作液。表征中将所得到的滤液进行真空冷冻干燥得到 Zn-CQDs 固体样品进行测试。

2.3 过氧化氢荧光探针建立

于 10 mL 比色管中, 加入 HEPES 缓冲溶液 1.00 mL、稀释 100 倍的 Zn-CQDs 溶液 160 μL、0.1 mol/L Cu²⁺ 标准溶液 2.50 mL、适量的 H₂O₂ 溶液。在 50 °C 下孵育 40 min 后, 于 λ_{ex} = 340 nm 和 λ_{em} = 428 nm 处测定体系的荧光强度 *F* 以及试剂空白溶液的荧光强度 *F*₀, 狭缝宽度均为 5 nm。

2.4 胆固醇荧光探针建立

在 2.3 同样体系 Zn-CQDs-Cu²⁺ 中加入 100 μL 胆固醇氧化酶、适量胆固醇标准溶液, 于 50 °C 下孵育 40 min 后, 在 λ_{ex} = 340 nm 和 λ_{em} = 428 nm 下测定体系的荧光强度 *F* 以及试剂空白溶液的荧光强度 *F*₀, 狭缝宽度均为 5 nm。

3 结果与讨论

3.1 Zn-CQDs 结构表征

3.1.1 透射电镜

通过高分辨率透射电镜分析合成的 Zn-CQDs 的尺寸和形貌。由图 1(a) 可看出 Zn-CQDs 呈现球形, 粒径均一, 尺寸规则, 单分散性能较好。插图中清晰的晶格条纹间距为 0.32 nm。从图 1(b) 看出 Zn-CQDs 尺寸主要分布在 1.0 ~ 3.0 nm 范围内, 平均尺寸为 2 nm 左右, 颗粒度较小。

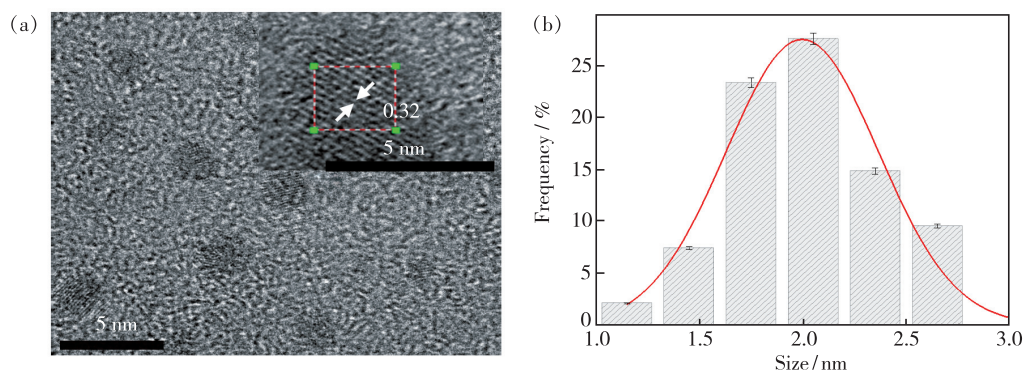


图 1 Zn-CQDs 的透射电镜图(插图为高分辨透射电镜图)(a)及粒径分布图(b)

Fig.1 TEM image of Zn-CQDs (inset is high-resolution TEM image)(a) and the particle size distribution images of Zn-CQDs(b)

3.1.2 X 射线粉末衍射

粉末衍射能很好地确定物质的晶体结构以及结晶度, 如图 2 所示。Zn-CQDs 的 X 射线粉末衍

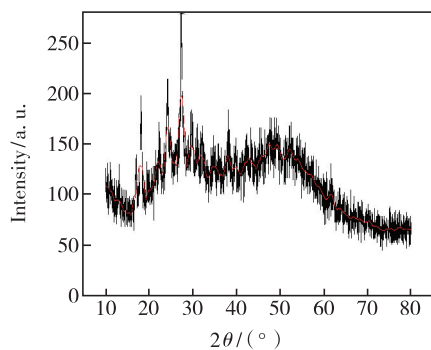


图 2 Zn-CQDs 的 X 射线粉末衍射图

Fig.2 XRD spectrum of Zn-CQDs

射图分别在 $2\theta = 27.54^\circ$ 、 $2\theta = 51.15^\circ$ 两处有明显的衍射峰, 归为碳的特征衍射峰, 表明所制备的 Zn-CQDs 具有良好的结晶度。

3.1.3 红外光谱

通常认为荧光发射是由于 CQDs 表面电子和空穴的复合而产生的, 因此研究 CQDs 的表面结构对分析其发光机理十分重要。采用傅里叶红外光谱对 Zn-CQDs 和 CQDs 的表面官能团进行表征分析, 结果如图 3 所示。Zn-CQDs 与未掺杂 CQDs 相比, 除了在 $3\ 448\ \text{cm}^{-1}$ 处有一个明显的宽于 CQDs 的吸收带, 可归因于 N—H/O—H 的伸缩振动, 其余官能团位置未发生明显变化, 该处变化可能归因于 Zn 的掺杂使得 CQDs 表面—NH₂ 的数量增多, 从而导致其荧光强度增强。 $2\ 352\ \text{cm}^{-1}$

处的强峰可能为 $O=C=O$ 的伸缩振动, 1658 cm^{-1} 为 $C=O$ 的伸缩振动和 $N-H$ 键弯曲振动峰, $C=C$ 键的伸缩振动在 1556 cm^{-1} 处, 1144 cm^{-1} 处的峰可能为醚键 $C-O-C$ 的伸缩振动。以上分析表明 Zn-CQDs 表面富有羰基、羟基、醚

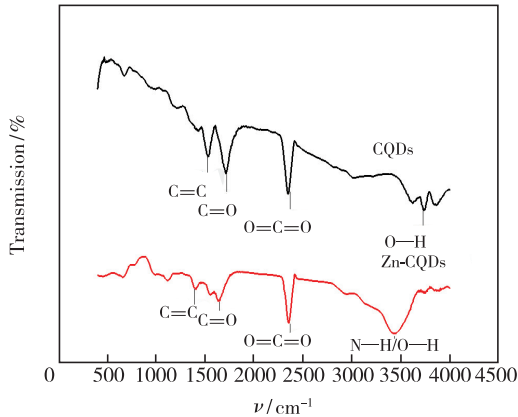


图 3 Zn-CQDs 及 CQDs 的红外光谱
Fig. 3 FT-IR spectra of Zn-CQDs and CQDs

键以及含氮官能团等, 这些官能团使得 Zn-CQDs 表面易于修饰, 且增加了其在水溶液中的亲水性及强荧光性。

3.1.4 X 射线电子能谱

利用 X 射线电子能谱分析 Zn-CQDs 样品的组成。图 4(a) 中, Zn-CQDs 的全谱图显示 4 个主峰, 分别是 284.8 eV 的 $C\ 1s$ 峰、 400.11 eV 的 $N\ 1s$ 峰、 531.65 eV 的 $O\ 1s$ 峰、 1022.19 eV 的 $Zn\ 2p$ 峰。图 4(b) 表明 Zn-CQDs 中的锌掺杂为 Zn^{2+} 掺杂, 对应 Zn 含量为 1.47% 。从图 4(c) 中可以看出 Zn-CQDs 的 $C\ 1s$ 光谱主要由 $287.94, 285.38, 284.5\text{ eV}$ 3 个子峰组成, 这 3 个子峰分别对应于 $O-C-O/C=O, C=C, C-C$ 键。如图 4(d) 所示, $O\ 1s$ 峰由位于 $532.9, 531.6\text{ eV}$ 处的两个子峰组成, 分别对应于 $C=O, C-O$ 键。如图 4(e) 所示, $N\ 1s$ 峰由 $399.93, 401.42\text{ eV}$ 处两个峰组成, 分别对应于 $C-N$ 和 $N-H$ 键。这与红外光谱分析一致。

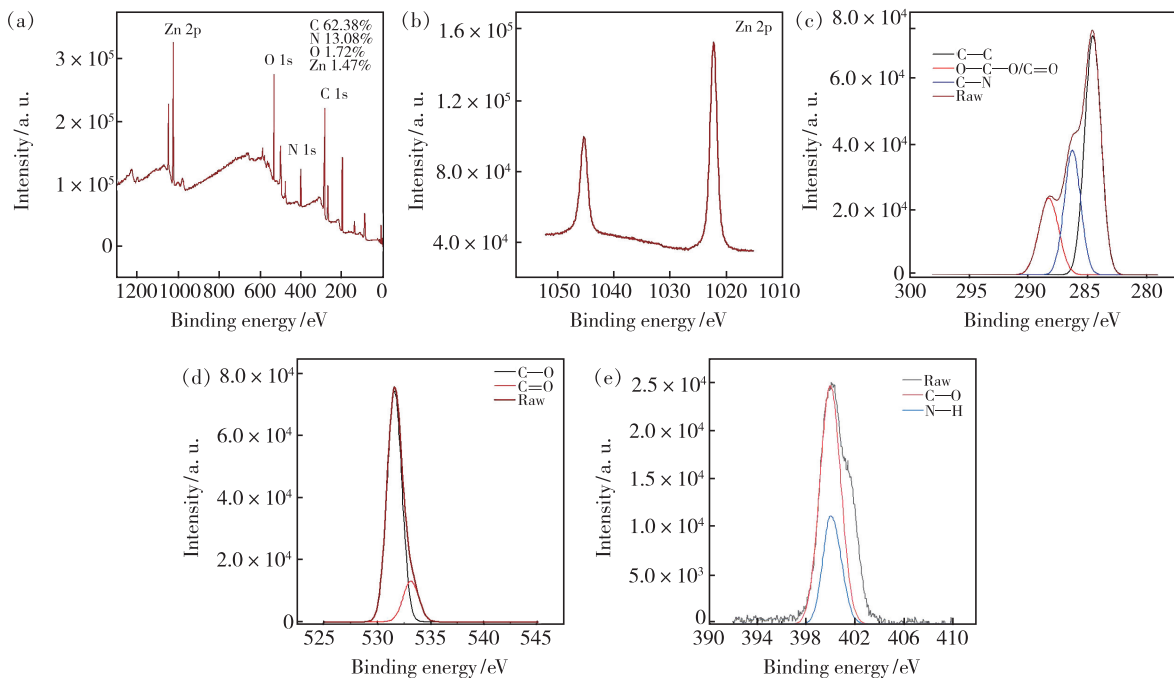


图 4 Zn-CQDs 的 XPS 全谱(a)、Zn 2p 谱(b)、C 1s 谱(c)、O 1s 谱(d)及 N 1s(e)。

Fig. 4 (a) XPS spectrum of Zn-CQDs full spectrum. (b) Zn 2p spectrum. (c) C 1s spectra. (d) O 1s spectra. (e) N 1s spectra.

3.1.5 Zn-CQDs 的光学性能

Zn-CQDs 在不同激发波长下的荧光光谱如图 5(a) 所示, 发现 Zn-CQDs 的发射具有很强的激发依赖性, 当激发波长从 250 nm 增加到 390 nm 时, Zn-CQDs 的发射峰从 431 nm 蓝移至 296 nm , 并

且荧光强度出现先增大后降低趋势, Zn-CQDs 的激发依赖性可能是由于金属锌本身的性质所决定。图中显示在激发波长为 340 nm 处时, 428 nm 处的荧光发射最强。在图 5(b) 中完整呈现了发射光谱与激发光谱的镜像对称性。从图 5(b) 插

图可以看出,Zn-CQDs 在自然光下为无色,在强紫外线照射下发射强的蓝色荧光,与最佳激发波长 340 nm 激发下发射蓝色荧光一致。而且 Zn-

CQDs 在紫外区有 238 nm 和 340 nm 两处特征吸收,可能是由于 -OH、-NH 的 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁和 $C=O$ 的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起。

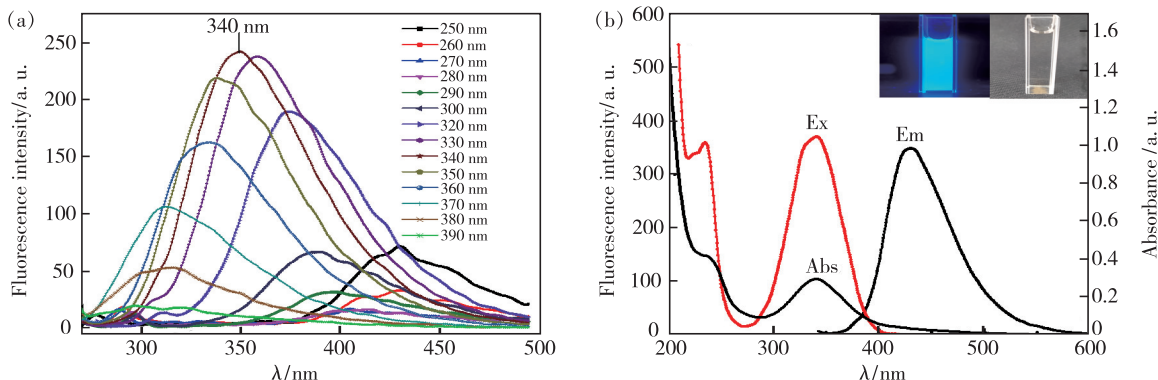


图 5 (a)不同激发波长下 Zn-CQDs 的荧光光谱;(b) Zn-CQDs 紫外吸收和荧光光谱(插图:在紫外线和自然光下的照片)。

Fig. 5 (a) Fluorescence spectra of Zn-CQDs at different excited wavelength. (b) UV-Vis absorption spectrum and the fluorescence spectra of Zn-CQDs (Insets: photographs under UV light and natural light).

3.1.6 荧光量子产率

以硫酸奎宁为参比物^[15],在 340 nm 相同激发波长下,检测待测物 (u) 与参比物 (s) 的荧光强度和该波长激发光的吸光度,利用公式 (1) 计算得到 Zn-CQDs 的荧光量子产率 (Y_u) 为 34%,未掺杂 CQDs 荧光量子产率为 2.6% (表 1)。说明金属掺杂大大提高了碳量子点的荧光量子产率。

$$Y_u = Y_s \left(\frac{F_u}{F_s} \right) \left(\frac{A_s}{A_u} \right), \quad (1)$$

其中, Y 表示物质的荧光量子产率, F 表示物质的荧光强度, A 表示物质的吸光度。

表 1 Zn-CQDs 荧光量子产率

Tab. 1 Fluorescence quantum yield of Zn-CQDs

名称	λ_{ex}/nm	λ_{em}/nm	A	F	Y
Zn-CQDs	340	428	0.000 9	156.37	0.34
CQDs	340	441	0.012 3	159.34	0.026
硫酸奎宁	340	428	0.002 3	640.45	0.55

3.2 H₂O₂ 测定体系构建

基于 Cu^{2+} 与 H_2O_2 的类芬顿反应产生的高活性 $\cdot OH$ 有效猝灭 Zn-CQDs 荧光而建立了测定 H_2O_2 和生成 H_2O_2 的代谢物 (如胆固醇,黄嘌呤,葡萄糖等) 的体系。如图 6(a) 所示,发现相同浓度的 Zn-CQDs 与未掺杂 CQDs 都在最大激发波长 340 nm 激发下于 428 nm 处有强发射,但 Zn-CQDs 的激发与发射强度更强。 H_2O_2 本身对 Zn-CQDs

与 CQDs 荧光几乎没有作用, Cu^{2+} 对 Zn-CQDs 荧光有一定的猝灭作用^[16],对未掺杂 CQDs 也具有猝灭效果。但当加入 H_2O_2 后, Zn-CQDs- Cu^{2+} - H_2O_2 体系的猝灭效果明显大于 CQDs- Cu^{2+} - H_2O_2 体系。由图 6(b) 发现, Cu^{2+} 加入前后 Zn-CQDs 紫

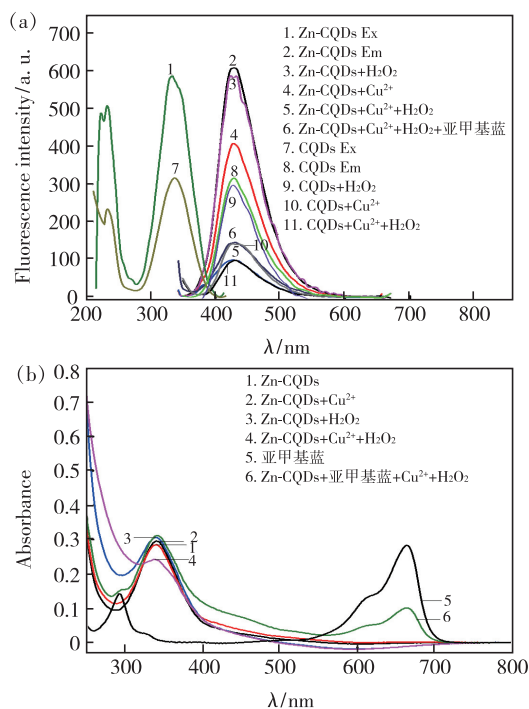


图 6 不同 Zn-CQDs 体系的荧光光谱 (a) 与紫外-可见吸收光谱 (b)

Fig. 6 Fluorescence (a) and UV-visible absorption (b) for different Zn-CQDs systems

外吸收光谱并无变化,说明 Cu^{2+} 与 Zn-CQDs 表面的一OH、一COOH、一NH 等基团发生电荷转移仅改变了 Zn-CQDs 激发态的能量,产生动态猝灭作用。但当同时加入 Cu^{2+} 与 H_2O_2 后,Zn-CQDs 的荧光显著降低(图 6(a)),推断是 Cu^{2+} 与 H_2O_2 发生芬顿反应产生高活性的 $\cdot\text{OH}$ 所致。由于亚甲基蓝(MB)分子中有一个中间价态的硫原子对 $\cdot\text{OH}$ 有高度亲和性^[17],因此发现当加入 1.00 mL 1.0×10^{-4} mol/L 亚甲基蓝于体系中时,原 MB 在 664 nm 的最大吸收有明显降低(图 6(b)曲线 6),体系的荧光强度恢复 10%(图 6(a)中曲线 6),极可能是 Cu^{2+} 和 H_2O_2 产生的 $\cdot\text{OH}$ 被亚甲基蓝捕获,导致体系荧光有一定恢复,然而亚甲基蓝对 Zn-CQDs 本身有抑制作用导致恢复能力较弱。由此推理得出该反应机理如图 7。

采用 FLS920 稳态瞬态荧光光谱仪测定 Zn-CQDs、Zn-CQDs + Cu^{2+} 体系和 Zn-CQDs + Cu^{2+} + H_2O_2 体系的荧光衰减曲线(图 8)和加权平均荧光寿命(表 2)。其平均荧光寿命分别为 8.20,

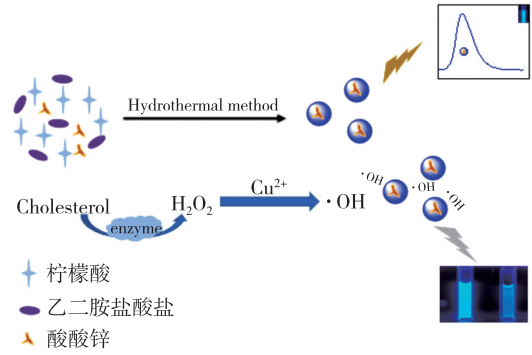


图 7 体系反应机理图

Fig. 7 System reaction mechanism diagram

15.13, 6.80 ns。Zn-CQDs 和 Zn-CQDs + Cu^{2+} 荧光寿命比值 $\tau_1/\tau_2 = 0.54$; Zn-CQDs + Cu^{2+} 体系和 Zn-CQDs + Cu^{2+} + H_2O_2 体系的荧光寿命比值 $\tau_2/\tau_3 = 2.23$,说明 Cu^{2+} 对 Zn-CQDs 的荧光猝灭以及 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 产生的 $\cdot\text{OH}$ 对 Zn-CQDs 的荧光猝灭过程都为动态猝灭。且根据文献[18]可知, Cu^{2+} 与 H_2O_2 发生类芬顿反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 促使 Zn-CQDs 的荧光发生动态猝灭一致。

表 2 荧光寿命对照表

Tab. 2 Fluorescence lifetime comparison table

体系	$\tau_1/\text{ns}(\%)$	$\tau_2/\text{ns}(\%)$	τ/ns	χ^2
Zn-CQDs	0.47 (2.02)	8.36 (97.98)	8.20	1.174
Zn-CQDs + Cu^{2+}	1.17 (1.76)	15.38 (98.24)	15.13	1.113
Zn-CQDs + Cu^{2+} + H_2O_2	0.65 (5.89)	7.19 (94.11)	6.80	1.136

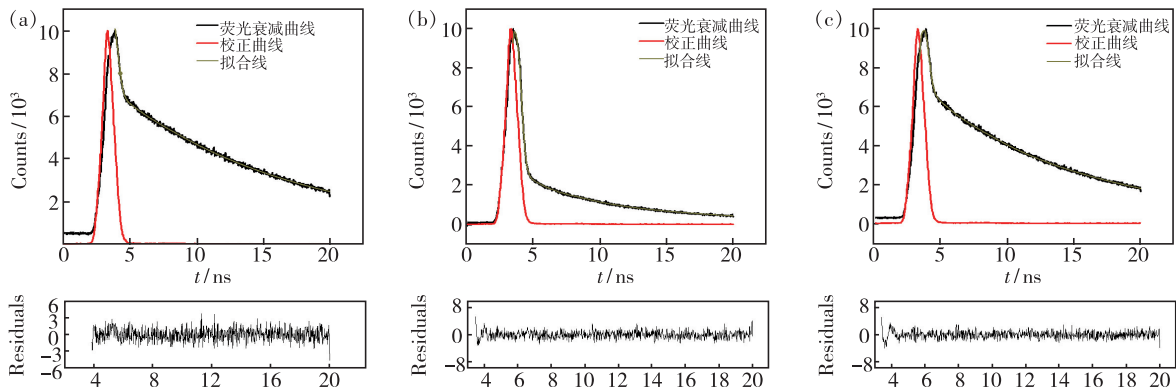


图 8 Zn-CQDs(a)、Zn-CQDs + Cu^{2+} (b)、Zn-CQDs + Cu^{2+} + H_2O_2 (c) 的荧光衰减曲线。

Fig. 8 Fluorescence decay curves of Zn-CQDs(a), Zn-CQDs + Cu^{2+} (b), Zn-CQDs + Cu^{2+} + H_2O_2 (c).

3.3 反应体系条件优化

3.3.1 pH 优化

考察了酸碱度及缓冲种类(HEPES, 巴比妥钠, Tris-HCl, BR, 磷酸氢二钠-柠檬酸, PBS)对

体系测定的影响。结果如图 9 所示,酸度在 6.8 ~ 8.0 之间时,体系的荧光猝灭性能最强。实验选择 pH = 7.60 HEPES 缓冲溶液,由于 Cu^{2+} 与 H_2O_2 作用对 Zn-CQDs 的猝灭达到最优状态。

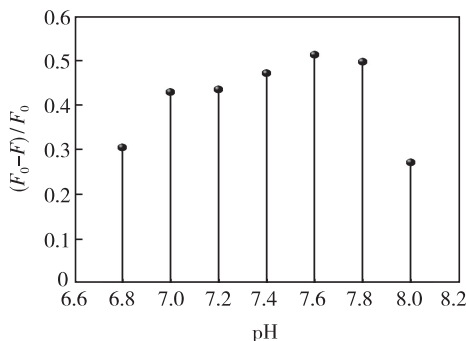


图 9 pH 值对 Zn-CQDs-Cu²⁺ 体系荧光强度的影响

Fig. 9 Effect of the pH on the fluorescence intensity of the Zn-CQDs-Cu²⁺ system

3.3.2 Cu²⁺ 量的优化

体系加入不同体积 0.01 mol/L Cu²⁺ 溶液, 结果如图 10 所示。发现随着 Cu²⁺ 用量的增加, 体系荧光猝灭强度逐渐增大, 在 1.00 ~ 2.50 mL 之间时达到最优。当 Cu²⁺ 浓度太大时, 催化产生羟基自由基的反应受到限制, 体系荧光猝灭程度显著下降。体系选择加入 0.01 mol/L Cu²⁺ 溶液 2.50 mL。

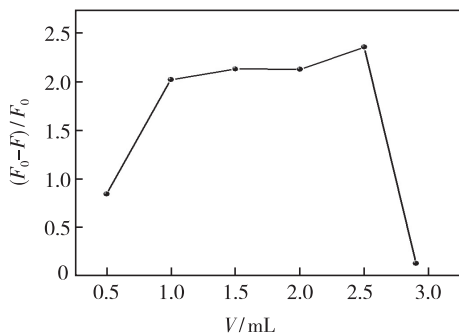


图 10 Cu²⁺ 的量对 Zn-CQDs-Cu²⁺ 体系荧光强度的影响

Fig. 10 Effect of the amount of Cu²⁺ on the fluorescence intensity of the Zn-CQDs-Cu²⁺ system

3.3.3 Zn-CQDs 的量优化

考察了稀释 100 倍的不同体积的 Zn-CQDs

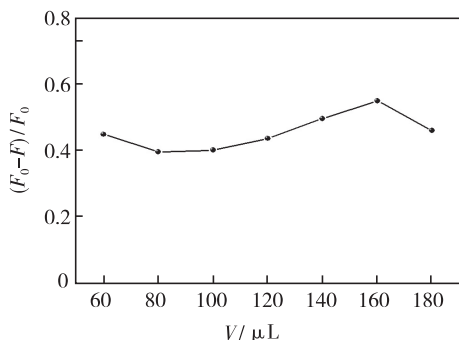


图 11 Zn-CQDs 的量对 Zn-CQDs-Cu²⁺ 体系荧光强度的影响

Fig. 11 Effect of the amount of Zn-CQDs on the fluorescence intensity of the Zn-CQDs-Cu²⁺ system

对体系荧光强度的影响。从图 11 发现, 随着 Zn-CQDs 的用量增加, 体系荧光猝灭程度显著增强, 在 0.16 mL 时达到最佳。随着 Zn-CQDs 浓度的持续增加, 可能是 Zn-CQDs 自身出现团聚, 导致体系荧光猝灭受到影响。故本实验选取 0.16 mL 为最佳用量。

3.3.4 反应时间及温度优化

反应时间及反应温度对体系的影响至关重要。本实验分别考察了不同反应时间(0 ~ 120 min)及不同反应温度(30 ~ 90 °C)对体系的影响。如图 12, 可知体系在 50 °C 孵化 40 min 后逐步趋于稳定。

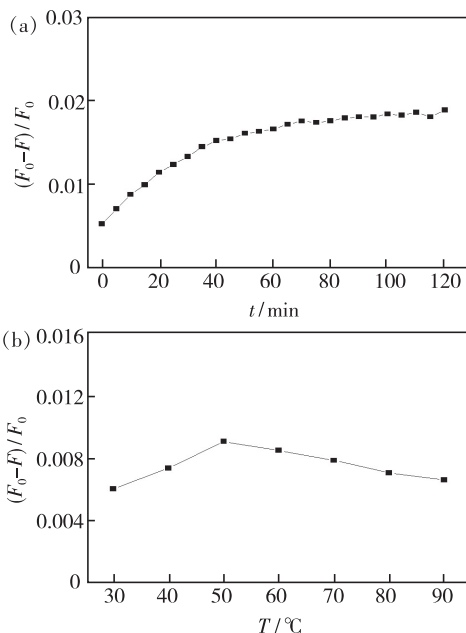


图 12 Zn-CQDs-Cu²⁺ 体系反应时间 (a) 与反应温度 (b) 的影响

3.3.5 共存物质及干扰

在最佳实验条件下, 考察了胆固醇浓度为 1.0 ×

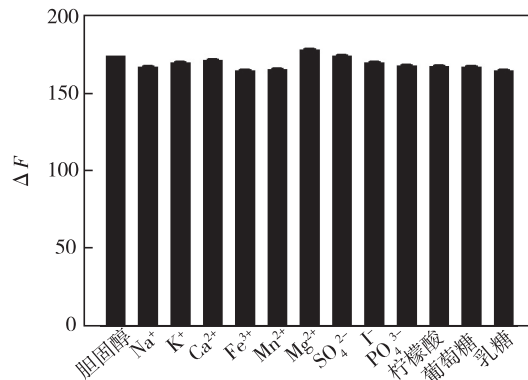


图 13 干扰物质对 Zn-CQDs-Cu²⁺ 体系的影响

Fig. 13 Influence of interfering substances on the Zn-CQDs-Cu²⁺ system

10^{-5} mol/L 的体系中,常见离子及糖类对体系测定的相对误差控制在 5% 范围内的影响。如图 13, 结果发现 1 250 倍的柠檬酸, 250 倍的乳糖, 40 倍的葡萄糖, 120 倍的 PO_4^{3-} 、 I^- 、 Na^+ 、 K^+ , 65 倍的 SO_4^{2-} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} , 200 倍的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对体系几乎没有干扰, 故本方法检测胆固醇具有较好的选择性。

3.3.6 标准曲线

按照实验方法, 在最佳实验条件下测定 H_2O_2 和胆固醇, 结果如图 14 所示。从图 14(a) 发现体

系 $(F_0 - F)/F_0$ 与 H_2O_2 浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系, 图 14(b) 显示线性方程为 $(F_0 - F)/F_0 = 1.26 \times 10^4 c + 6.16 \times 10^{-4}$, r 为 0.994 7, 检出限 ($3S_0/S$) 达到 7.2×10^{-7} mol/L; 图 14(c) 中体系 $(F_0 - F)/F_0$ 与胆固醇浓度在 $3.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-7}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系, 图 14(d) 显示线性方程为 $(F_0 - F)/F_0 = 1.38 \times 10^4 c + 0.04$, r 为 0.992 4, 检出限为 6.8×10^{-7} mol/L。

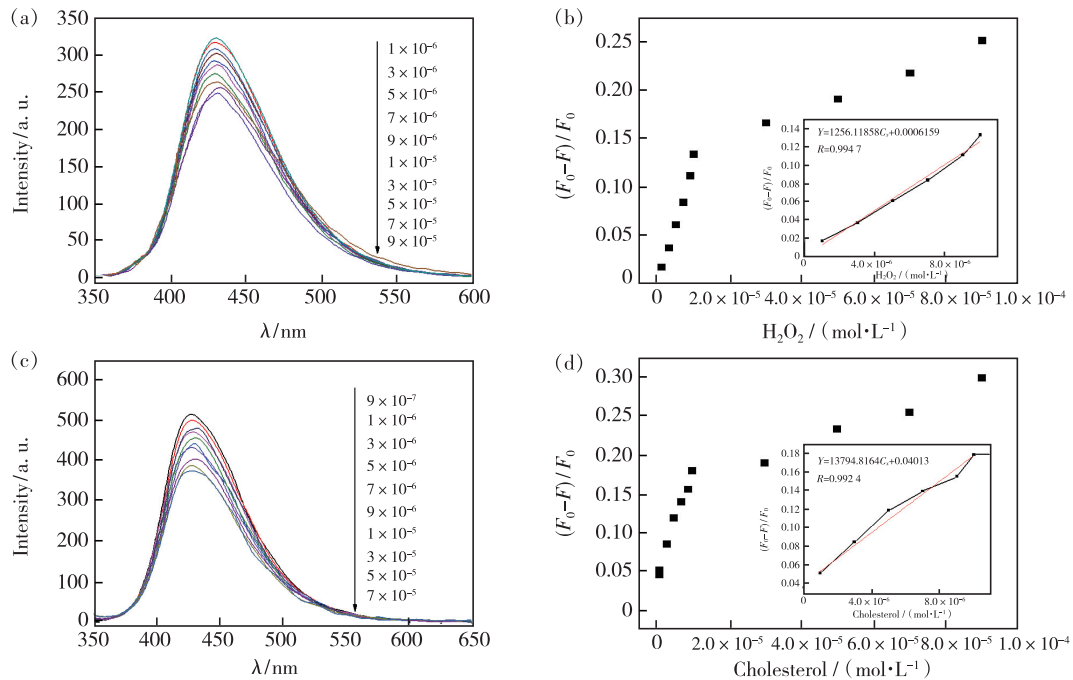


图 14 H_2O_2 浓度的荧光光谱(a)和线性关系(b);胆固醇浓度的荧光光谱(c)和线性关系(d)。

Fig. 14 Fluorescence spectra(a) and linear relationship(b) for H_2O_2 concentration. Fluorescence spectra(c) and linear relationship(d) for cholesterol concentration.

3.4 样品检测及回收率

为考察过氧化氢体系的实用性, 以延河水为模拟水样经过滤处理之后, 在最佳实验条件下进

行测试并做加标回收实验。结果如表 3 所示, H_2O_2 的回收率在 98.55% ~ 105.4%, 表明该体系可用于实际样品的检测。

表 3 延河水中过氧化氢的加标回收实验 ($n=3$)

Tab. 3 Standard addition and recovery experiment of H_2O_2 in Yan He River samples ($n=3$)

Sample	Determined/ ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	Added/ ($10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recycling amount/ ($10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/%
1	0	1.36	1.29	105.4	2.1
2	0	2.72	2.76	98.55	1.7
3	0	3.40	3.35	101.5	1.5

将超市购买的伊利纯牛奶分别从 3 袋中取 5.00 mL 于离心管中, 加入 25 mL (乙腈: 水 = 84: 16) 提取液, 漩涡混匀 1.0 min, 振荡 2 ~ 3 次并超

声提取 20 min, 取出于 10 000 r/min 离心机上离心 5 min, 分别取上清液 10 μL 在最佳实验条件下进行测试, 并进行加标回收实验。结果如表 4 所

表 4 牛奶样品中胆固醇的加标回收实验 ($n=3$)Tab. 4 Standard addition and recovery experiment of cholesterol in milk samples ($n=3$)

Sample	Determined/ ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	Added/ ($10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recycling amount/ ($10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/%
1	14.48	1.93	1.99	103.0	2.0
2	15.83	1.16	1.22	98.00	0.7
3	14.77	0.39	0.44	102.0	3.8

示,该方法检测牛奶中胆固醇总含量平均值为 15.03 mg/100 g,与刘等^[19]采用 CuNCs 比色法检测牛奶中胆固醇含量平均值 13.46 mg/100 g 结果相近。该方法对实际样品的检测回收率为 98.00% ~ 103.0%,

表 5 不同牛奶中胆固醇检测方法的比较

Tab. 5 Comparison of cholesterol detection methods in different milk

Test method	Check-out range/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Detection limit/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Reference
荧光光度法	10 ~ 360	1.57	[20]
比色法	2 ~ 200	0.76	[21]
HPLC	5 ~ 20	5.00	[22]
伏安法	10 ~ 5 000	4.30	[23]
荧光光度法	0.9 ~ 90	0.68	本文

RSD \leq 3.8%, 结果满意。与文献方法比较,如表 5,在低浓度范围内灵敏度更高。

4 结 论

本研究引入金属源,通过水热法一步合成了具有良好稳定性和高荧光强度的 Zn-CQDs。基于 Cu^{2+} 与 H_2O_2 构成类芬顿体系产生羟基自由基可进一步猝灭 Zn-CQDs 荧光强度,建立了类 Fenton 体系的 Zn-CQDs 荧光探针用于 H_2O_2 和有 H_2O_2 生成的反应代谢物的测定。该方法用于牛奶中胆固醇的测定,具有较好的实用价值。

本文专家审稿意见及作者回复内容的下载地址:
<http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20210257>.

参 考 文 献:

- [1] LIN L P, LUO Y X, TSAI P, *et al.* Metal ions doped carbon quantum dots: synthesis, physicochemical properties, and their applications [J]. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2018, 103: 87-101.
- [2] ZHU C, YANG S W, SUN J, *et al.* Deep ultraviolet emission photoluminescence and high luminescence efficiency of ferric passivated graphene quantum dots: strong negative inductive effect of Fe [J]. *Synth. Met.*, 2015, 209: 468-472.
- [3] LIN X, XU D, ZHAO R, *et al.* Highly efficient photocatalytic activity of g-C₃N₄ quantum dots (CNQDs)/Ag/Bi₂MoO₆ nanoheterostructure under visible light [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2017, 178: 163-168.
- [4] WANG L, WANG Y T, SUN X F, *et al.* Versatile self-assembly and biosensing applications of DNA and carbon quantum dots coordinated cerium ions [J]. *Chem-Eur. J.*, 2017, 23(43): 10413-10422.
- [5] MENG A L, XU Q H, ZHAO K, *et al.* A highly selective and sensitive "on-off-on" fluorescent probe for detecting Hg(II) based on Au/N-doped carbon quantum dots [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2018, 255: 657-665.
- [6] ZHUO S J, GAO L L, ZHANG P, *et al.* Living cell imaging and sensing of hydrogen sulfide using high-efficiency fluorescent Cu-doped carbon quantum dots [J]. *New J. Chem.*, 2018, 42(24): 19659-19664.
- [7] DING H, YU S B, WEI J S, *et al.* Full-color light-emitting carbon dots with a surface-state-controlled luminescence mechanism [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 484-491.
- [8] XU Q, SU R G, CHEN Y S, *et al.* Metal charge transfer doped carbon dots with reversibly switchable, ultra-high quantum yield photoluminescence [J]. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2018, 1(4): 1886-1893.
- [9] YUE L L, LI H L, SUN Q, *et al.* Red-emissive ruthenium-containing carbon dots for bioimaging and photodynamic cancer therapy [J]. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2020, 3(1): 869-876.

- [10] WEI J F, QIANG L, REN J, *et al.* Fluorescence turn-off detection of hydrogen peroxide and glucose directly using carbon nanodots as probes [J]. *Anal. Methods*, 2014, 6(6):1922-1927.
- [11] LIU J W, LUO Y, WANG Y M, *et al.* Graphitic carbon nitride nanosheets-based ratiometric fluorescent probe for highly sensitive detection of H₂O₂ and glucose [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8(49):33439-33445.
- [12] QIAN Z S, SHAN X Y, CHAI L J, *et al.* Si-doped carbon quantum dots: a facile and general preparation strategy, bioimaging application, and multifunctional sensor [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6(9):6797-6805.
- [13] 满华盛, 吕霞敏, 黄建颖. 壳聚糖基碳量子点的制备、表征及其对过氧化氢的荧光检测研究 [J]. *核农学报*, 2021, 35(5):1147-1153.
MANH S, LYU X M, HUANG J Y. Preparation and characterization of chitosan-based carbon dots and its application in hydrogen peroxide analysis [J]. *J. Nucl. Agric. Sci.*, 2021, 35(5):1147-1153. (in Chinese)
- [14] 王令臣, 洪诚毅, 黄志勇. 基于氯化血红素模拟酶活性的荧光分析法检测牛奶中胆固醇含量 [J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5):363-368.
WANG L C, HONG C Y, HUANG Z Y. Fluorescence detection of cholesterol in milk based on hemin as peroxidase mimetic [J]. *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.*, 2021, 21(5):363-368. (in Chinese)
- [15] 孙雪花, 张锦婷, 郝都婷, 等. 基于 Ag⁺ 修饰氮掺杂碳量子点用于组氨酸的荧光开启检测 [J]. *分析实验室*, 2021, 40(4):399-403.
SUN X H, ZHANG J T, HAO D T, *et al.* Determination of histidine by a signal-on strategy based on Ag⁺ modified N-doped carbon quantum dots [J]. *Chin. J. Anal. Lab.*, 2021, 40(4):399-403. (in Chinese)
- [16] 占霞飞, 唐建设, 吴军, 等. 硅掺杂碳量子点荧光猝灭法测定水样中铜(II) [J]. *分析测试学报*, 2016, 35(11):1461-1465.
ZHAN X F, TANG J S, WU J, *et al.* Determination of copper ions in water samples by silicon doped carbon quantum dots [J]. *J. Instr. Anal.*, 2016, 35(11):1461-1465. (in Chinese)
- [17] 任瑞妮, 付柯, 冯巩, 等. 分光光度法测定羟基自由基捕获剂的研究进展 [J]. *安徽化工*, 2014, 40(3):19-21.
REN R N, FU K, FENG G, *et al.* Research progress of spectrophotometric method to determine the hydroxyl free radical scavenger [J]. *Anhui Chem. Ind.*, 2014, 40(3):19-21. (in Chinese)
- [18] 古桃. 铜系催化剂类芬顿氧化法处理染料废水的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
GU T. *Study on the Fenton-like Oxidation of Dye Wastewater with Copper Based Catalysts* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018. (in Chinese)
- [19] 刘迪, 尚华. 基于铜纳米团簇的纳米探针比色法检测牛奶中胆固醇含量 [J]. *食品科学*, 2014, 35(12):143-147.
LIU D, SHANG H. Copper nanoclusters-based nanoprobes for colorimetric detection of cholesterol in milk [J]. *Food Sci.*, 2014, 35(12):143-147. (in Chinese)
- [20] GORASSINI A, VERARDO G, FREGOLENT S C, *et al.* Rapid determination of cholesterol oxidation products in milk powder based products by reversed phase SPE and HPLC-APCI-MS/MS [J]. *Food Chem.*, 2017, 230:604-610.
- [21] LIN T R, ZHONG L S, CHEN H, *et al.* A sensitive colorimetric assay for cholesterol based on the peroxidase-like activity of MoS₂ nanosheets [J]. *Microchim. Acta*, 2017, 184(4):1233-1237.
- [22] ZHU L, XU L L, TAN L, *et al.* Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes and cholesterol sensing [J]. *Talanta*, 2013, 106:192-199.
- [23] CHANG H C, HO J A A. Gold nanocluster-assisted fluorescent detection for hydrogen peroxide and cholesterol based on the inner filter effect of gold nanoparticles [J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87(20):10362-10367.



孙雪花(1975 -), 女, 陕西延安人, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 2010年于延安大学获得硕士学位, 主要从事光谱分析方面的研究。
E-mail: happyxh908080@163.com