

文章编号: 1000-7032(2024)01-0177-07

一种新型比率荧光毛细管 pH 传感器的制备及性能

许盼英¹, 李天依¹, 王小卉^{1*}, 黎 喆¹, 王贵生^{2*}

(1. 北京邮电大学 电子工程学院, 安全生产智能监控北京市重点实验室, 北京 100876;

2. 解放军总医院第三医学中心 放射诊断科, 北京 100039)

摘要: 实时便捷的 pH 检测对于环境监测和医学诊断等领域具有重要应用价值。本文通过溶胶-凝胶法制备了一种比率荧光毛细管 pH 传感器。该传感器以 2,8-羟基芘-1,3,6-三磺酸钠盐(8-hydroxy-pyrene-1,3,6-trisulfonate, HPTS)作为 pH 敏感的荧光探针, 利用 HPTS 与十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)结合形成 HPTS-IP 离子对, 然后将离子对分散于溶胶-凝胶中, 并将其固定于毛细管内壁即制得比率荧光毛细管 pH 传感器。该传感器利用 HPTS 在双激发带下的发射强度比值实现比率荧光检测, 当 pH 从 5.0 上升至 8.0 时, HPTS 的荧光强度比率随 pH 值增加逐渐增强, pKa 值为 6.95, 通过分析 HPTS 的比率荧光强度变化可间接监测 pH 波动。该传感器具有较好的 pH 敏感性、稳定性和可逆性, 且可快速、灵活、便捷地进行实际操作, 在环境保护和生物医学领域的 pH 监测分析方面拥有良好的应用前景。

关键词: 荧光探针; 光学传感器; pH 检测; 毛细管; 比率荧光

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20230238

Preparation of a Novel Ratiometric Fluorescent Capillary-based pH Sensor

XU Panying¹, LI Tianyi¹, WANG Xiaohui^{1*}, LI Zhe¹, WANG Guisheng^{2*}

(1. Beijing Key Laboratory of Work Safety Intelligent Monitoring, School of Electronic Engineering, Beijing University of Posts and Telecommunications, Beijing 100876, China;

2. Department of Radiology, the Third Medical Centre, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China)

* Corresponding Authors, E-mail: wangxiaohui@bupt.edu.cn; wgs1996@sina.com

Abstract: Real-time and convenient pH detection plays an important role in environmental monitoring, medical diagnosis and other fields. In this paper, a ratiometric fluorescent capillary-based pH sensor was prepared by sol-gel method. The sodium 8-hydroxy-pyrene-1,3,6-trisulfonate (HPTS) acts as a pH sensitive fluorescent probe, and combines with hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) to form HPTS-IP ion pairs. Then the ion pairs were dispersed in the sol-gel, and further fixed in the inner wall of capillary to obtain the ratiometric fluorescent capillary pH sensor. Based on the dual excitation bands of HPTS, the referenced excitation ratiometric sensor is realized. When the pH value rises from 5 to 8, the fluorescence intensity ratio of HPTS gradually increases with the increase of pH, with a pKa value of 6.95. By analyzing the changes in fluorescence intensity ratio of HPTS, pH can be indirectly detected. This sensor has high pH sensitivity, good stability, and excellent reversibility, which can be applied quickly, flexibly, and conveniently in practical operations. All in all, it is promising in pH monitoring at environmental protection and biomedical fields.

Key words: fluorescence probe; optical sensor; pH detection; capillary; ratiometric fluorescence

收稿日期: 2023-10-12; 修订日期: 2023-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(62071178)

Supported by National Natural Science Foundation of China(62071178)

1 引 言

酸碱度是生物医学、临床分析、食品安全和环境工程等领域的重要测量参数,对其进行准确、快捷的测定在实际应用中尤为重要^[1-3]。目前基于荧光分析方法的生物检测技术因为响应速度快、空间分辨率高、操作简单等优点常被应用于 pH 检测^[4-6]。荧光 pH 传感器通常由对 pH 敏感的荧光探针、载体薄膜和固定基质组成。在检测过程中,待测分析物透过薄膜与荧光传感探针发生相互作用,通过分析荧光探针光学信号变化来检测 pH 变化^[7-9]。目前常用的 pH 荧光探针主要有荧光素及其衍生物^[10-11]、萘酰亚胺类衍生物^[12]和 1-羟基-3,6,8-三磺酸(HPTS)^[13-15]等。其中,HPTS是一种应用广泛的水溶性 pH 指示剂染料,水溶液中 pKa 约为 7.3,具有绿光波段发射,且拥有两种具有不同 pH 依赖性的激发带^[13],分别对应于质子化(酸性,405 nm 左右)模式及去质子化(碱性,460 nm 左右)模式,这两种激发带有利于进行比率荧光测量。目前,将 pH 敏感的荧光探针与纳米材料、有机物膜、光纤等基质结合制作的荧光传感器得到了广泛的关注^[16-17]。石英毛细管在材料方面与光纤具有结构一致性,由中空部分和石英管壁等组成,常被用于制作整体结构简单、稳定性好、灵敏度高的传感器件^[18-20]。此外,石英毛细管可同时实现液体传输和光线传输双重功能,其不仅可有效减少样品的用量,而且因将荧光探针分子固定于毛细管的内壁,在管壁的保护下性能更稳定。近年来利用毛细管作为固定基质的荧光 pH 传感器逐渐应用于酸碱度监测^[21],然而,基于单一荧光强度的检测方式常受到探针浓度、激发光强度和探测器波动等因素影响。引入参比荧光的比率检测方法可避免各种外部因素对测试数据的影响,进而有效提高检测精度^[15,22-23]。但是,目前围绕比率型荧光毛细管传感器的 pH 检测工作尚未见报道,因此亟需发展精准稳定的比率荧光毛细管 pH 传感器以便开展方便灵活的 pH 监测分析。

本文利用溶胶-凝胶法制备了以 HPTS 作为荧光探针的石英毛细管比率 pH 传感器。首先将 HPTS 与 CTAB 结合形成 HPTS-IP 离子对,然后将其均匀分散于 ETEOS 和 GPTMS 的溶胶混合样品中,并将其涂抹于毛细管内壁,加热干燥后在毛

细管内壁成功固定包覆 HPTS 的溶胶-凝胶薄膜,即制得比率荧光毛细管 pH 传感器。HPTS 在 405 nm 和 460 nm 分别激发下的荧光信号具有不同的 pH 响应,二者的荧光强度比率具有较强的 pH 敏感性,根据毛细管传感器的比率荧光信号变化可有效检测 pH 值变化,进而在生物医学 and 环境保护领域的 pH 监测与分析方面具有巨大潜力。

2 实 验

2.1 试剂与仪器

试剂:8-羟基芘-1,3,6-三磺酸三钠盐(HPTS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、乙基三乙氧基硅烷(ETEOS)、(3-缩水甘油氧丙基)三甲氧基硅烷(GPTMS)和 1-甲基咪唑(MI)购自麦克林化学试剂有限公司。无水乙醇和盐酸购自国药集团化学试剂有限公司。在实验过程中均使用去离子水,所有化学试剂未进行处理。

仪器:利用 Hitachi S-4800 扫描电子显微镜表征毛细管内壁薄膜形貌(SEM),通过 Hitachi F-4600 荧光分光光度计测试比率荧光毛细管传感器的激发和发射光谱。

2.2 负载 pH 敏感薄膜的毛细管传感器制备方法步骤

第一步合成 HPTS-IP 离子对,在 50 °C 条件下,将 0.76 mmol 的 CTAB 溶解在 25 mL 的去离子水中,随后,将 0.38 mmol HPTS 溶解在 25 mL 去离子水中,并加入到 CTAB 溶液中合成离子对。然后将离子对沉淀(HPTS-IP)过滤并在烘箱中干燥,并将样品溶于乙醇中备用。第二步制备基于 ETEOS 的溶胶,将 ETEOS、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸水溶液和乙醇按 1:0.007:6.25 的量比混合。第三步制备基于 GPTMS 的溶胶,以 GPTMS、MI、去离子水和乙醇为原料,配制 1:0.69:4:6.25 量比混合溶液。最后将上述第二步和第三步的两种溶胶以等量比混合后,与 HPTS-IP 乙醇溶液以 1 000:1 的溶胶染料比混合,搅拌均匀后涂抹于毛细管内壁,在 140 °C 条件下加热 4 h,即制得负载 pH 敏感薄膜的毛细管传感器。

3 结果与讨论

3.1 比率荧光毛细管 pH 传感器的构建和表征

基于 HPTS 的比率荧光毛细管 pH 传感器通过溶胶-凝胶法制备^[13,21,24],将基于 ETEOS 和基于

GPTMS的两种溶胶与HPTS-IP混合后涂抹于毛细管内壁,干燥后在毛细管内壁成功负载pH敏感的溶胶-凝胶薄膜,即制得比率荧光毛细管pH传感器。由于HPTS-IP离子对疏水性强于HPTS,因此可减少HPTS在待测液中的浸出。

比率荧光毛细管pH传感器示意图和实物照片如图1(a)所示,黄绿色部分为固定于毛细管内壁的负载HPTS染料的溶胶-凝胶薄膜,该薄膜无明显的裂缝,厚度较为均匀。通过扫描电镜对毛细管传感膜的剖面进行成像(图1(b)黄色标框区域),结果表明该传感膜表面致密、光滑且比较均匀。HPTS的激发光谱如图2(a)中虚线所示,其拥有两种具有不同pH依赖性的激发带^[13],分别位于405 nm左右和460 nm左右。HPTS的发射光谱如图2(a)中实线所示,其仅拥有单个发射带,在513 nm左右具有较强的发射峰。当环境pH值由5上升至8时,460 nm和405 nm左右的激发峰位

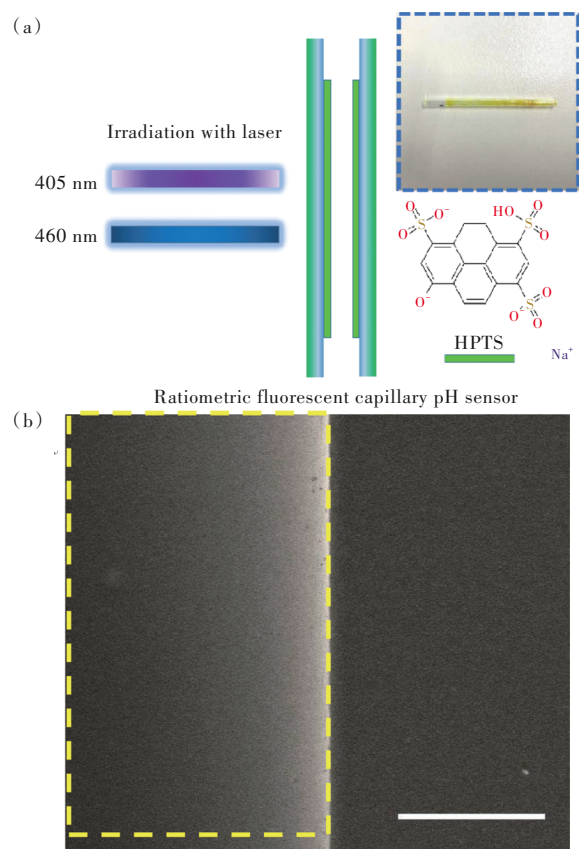


图1 (a)比率荧光毛细管pH传感器的结构示意图,右上角插图为实物照片;(b)pH传感膜的SEM图像,标尺20 μm

Fig.1 (a) Schematic illustration of ratiometric fluorescent capillary sensor. The inset is photo image. (b) SEM image of pH sensing film, scale bar: 20 μm

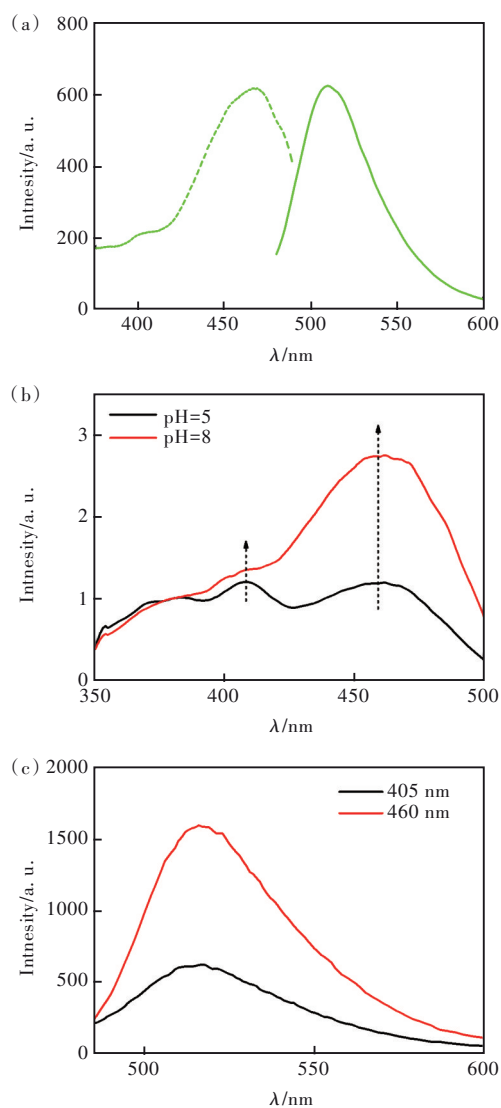


图2 (a)HPTS的激发光谱(虚线, $\lambda_{\text{em}}=513\text{ nm}$)和发射光谱(实线, $\lambda_{\text{ex}}=460\text{ nm}$);(b)pH为5和8时,比率荧光毛细管传感器的激发光谱($\lambda_{\text{em}}=513\text{ nm}$);(c)在405 nm和460 nm光激发下,传感器的发射光谱

Fig.2 (a) Excitation spectra (dashed lines, $\lambda_{\text{em}}=513\text{ nm}$) and emission spectra (solid lines, $\lambda_{\text{ex}}=460\text{ nm}$) of HPTS loaded on the capillary sensor. (b) Excitation spectra of capillary sensor in different pH concentrations ($\lambda_{\text{em}}=513\text{ nm}$). (c) Emission spectra of capillary sensor under excitation at 405 nm and 460 nm

置未发生明显变化(图2(b)),在405 nm和460 nm光激发下,传感器的发射光谱峰值位置未发生变化(图2(c))。HPTS的双激发峰为基于参比激发模式的比率荧光pH检测提供了条件。利用该传感器进行pH检测时,待测溶液可与毛细管内壁的传感膜充分发生反应,并最终通过光谱仪检测到荧光信号变化,根据荧光信号可有效地分析pH值变化。

3.2 比率荧光毛细管传感器的 pH 敏感性

为分析比率荧光毛细管传感器的 pH 敏感特性,我们利用荧光光谱仪依次表征该毛细管传感器在 pH 值为 5.0, 6.0, 6.6, 7.0, 7.4, 8.0 的缓冲溶液中的发射光谱变化。在 405 nm 激发光作用下,该毛细管传感器的发射光谱如图 3(a)所示。当缓冲溶液的 pH 由 5.0 上升至 7.0 时,传感器的荧光发射强度随环境 pH 值的上升而逐渐升高;当 pH 从 7.0 上升至 8.0 时,荧光强度又略微下降,可能是由于激光辐照时间增加影响光稳定性所致。在 460 nm 激发光作用下,该毛细管传感器的发射光谱如图 3(b)所示。随着缓冲溶液的 pH 由 5.0 上升至 7.0,传感器

的荧光发射强度逐渐升高;而当 pH 从 7.0 上升至 8.0 时,荧光强度则略微下降,该现象也归因于激光辐照时间增加影响荧光探针的发光强度。取图 3(a)和图 3(b)在 513 nm 处的发光强度之比进行比率荧光分析(图 4),发现从 pH=5.0 上升至 pH=8.0 时,比率荧光强度大约升高 2.6 倍。将比率荧光信号与不同 pH 进行 Sigmoidal 曲线拟合^[25], pKa 值为 6.95, 拟合度(R^2)为 0.99。以上实验结果表明,该比率荧光毛细管传感器具有较好的 pH 敏感性,可有效避免单一荧光强度检测所受的长时间激光辐照影响,基于 HPTS 在双激发带下的发射强度比值变化可实现对 pH 的灵敏检测。

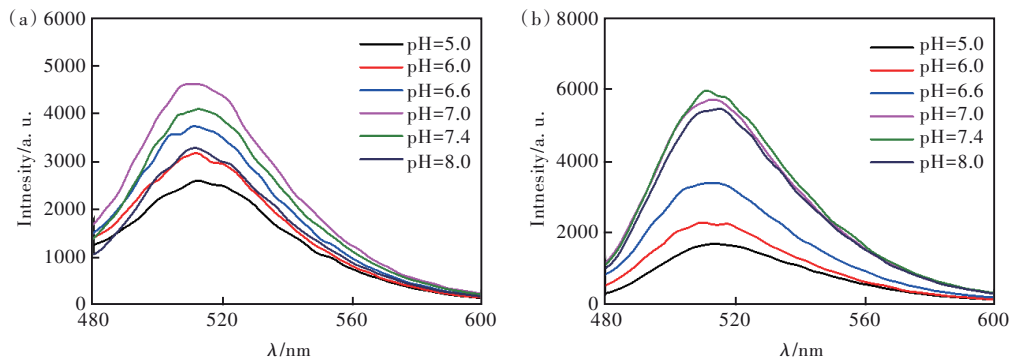


图 3 在 405 nm(a)和 460 nm(b)光激发下,比率荧光毛细管传感器在不同 pH 值环境中的发射光谱

Fig.3 Emission spectra of capillary sensor in different pH concentrations under excitation at 405 nm(a) and 460 nm(b)

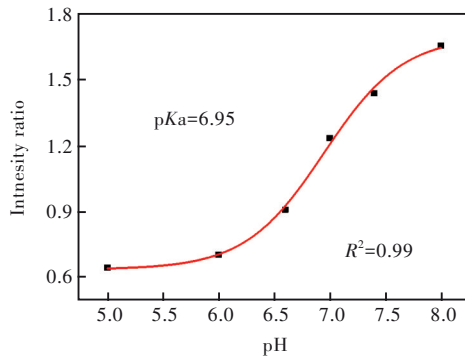


图 4 图 3(b)与 3(a)中 513 nm 处荧光强度的比率在不同 pH 环境下的响应拟合曲线

Fig.4 Sigmoidal fitting plot of fluorescence intensity ratios of Fig.3(b) and Fig.3(a) at 513 nm

3.3 比率荧光毛细管传感器的稳定性和可逆性

传感器件的良好稳定性是实际应用的基本要求。为分析比率荧光毛细管 pH 传感器的稳定性,我们将制得的毛细管传感器在避光的条件下储存,分别在第 0, 2, 4, 6, 8, 10, 40, 42, 44, 46 d 监测其荧光发射光谱变化。图 5(a)是取不同储存时间发射光谱的比率荧光信号绘制的时

间-比率荧光强度相关曲线,图中表明该传感器的比率荧光强度随时间延长未发生明显改变,在储存 46 d 后依然具有较稳定的比率荧光信号,证明该传感器具有较好的稳定性。此外,我们进一步分析了比率荧光传感器在水溶液中的稳定性(图 5(b))和在光源辐照下的稳定性(图 5(c))。如图 5(b)所示,在 75 min 时间内,比率信号未发生明显变化,证明该传感器在水溶液中具有较好的稳定性。如图 5(c)所示,在光源辐照 90 min 后,比率荧光信号几乎不变,证明该传感器在光源辐照下具有较好的稳定性。该传感器良好的稳定性主要取决于荧光染料 HPTS-IP 离子对与溶胶-凝胶基质的共价结合、石英毛细管较好的固定作用以及比率荧光的检测方式。

传感器的可逆性是可重复监测的重要依据。为分析该比率荧光毛细管 pH 传感器的可逆性,将毛细管传感器多次交替放入 pH=5.0 和 pH=8.0 的缓冲溶液中,然后测试该传感器的比

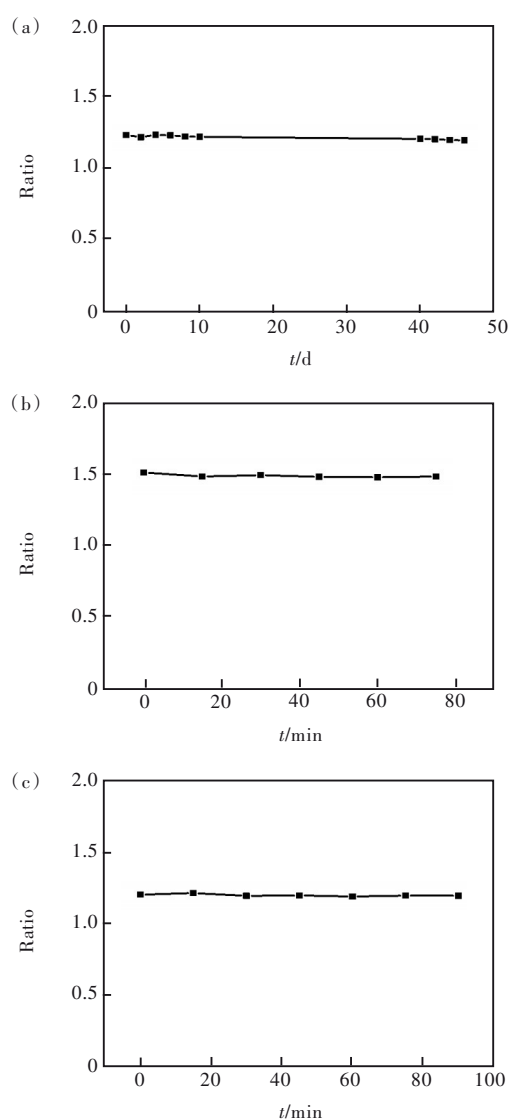


图 5 比率荧光毛细管 pH 传感器的稳定性研究。(a) 贮存 46 d 后的稳定性;(b) 在水溶液中贮存 75 min 后的稳定性;(c) 光源辐照后的稳定性

Fig.5 Stability of ratiometric fluorescent capillary sensor stored for 46 d(a), stored in aqueous solution for 75 min(b) and after irradiation by 460 nm light(c)

率荧光信号强度变化。如图 6 所示,取 513 nm 处的荧光发射强度比值,分析其随测量环境 pH 改变的波动情况。当环境 pH 在 5.0 和 8.0 之间

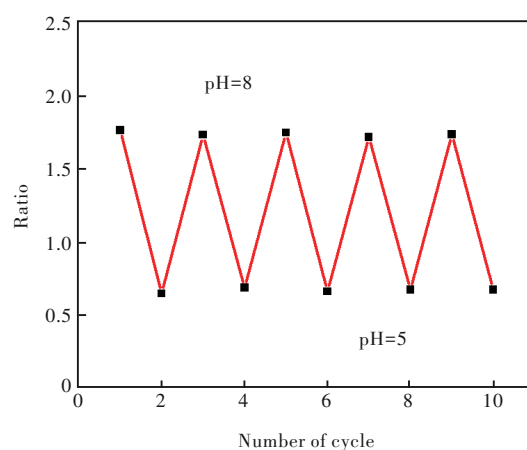


图 6 毛细管传感器比率荧光信号对 pH 响应的可逆性
Fig.6 Reversibility of the responsiveness of capillary sensor to pH changes

交替变化时,传感器的比率荧光强度具有较好的可重复性。实验结果表明,该比率荧光毛细管 pH 传感器拥有良好的可逆性,便于多次重复进行 pH 监测。

4 结 论

本文通过溶胶-凝胶法制备了一种比率荧光毛细管 pH 传感器,该传感器以 HPTS 作为 pH 敏感的荧光探针,在毛细管内壁固定含有 HPTS 的溶胶-凝胶薄膜。该传感器在 460 nm 和 405 nm 激发光分别作用下的荧光发射峰强度比值具有较高的 pH 灵敏度,当 pH 从 5.0 升至 8.0 时,比率荧光信号增强大约 2.6 倍, pKa 值为 6.95。该比率荧光毛细管 pH 传感器具有良好的稳定性、高的 pH 敏感性、较好的可逆性和便携性,在环境科学和生物医学领域的 pH 监测分析方面拥有广泛的应用前景。

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.20230238>.

参 考 文 献:

- [1] WERNER J, BELZ M, KLEIN K F, *et al.* Fiber optic sensor designs and luminescence-based methods for the detection of oxygen and pH measurement [J]. *Measurement*, 2021, 178: 109323.
- [2] YOUSEFI H, SU H M, IMANI S M, *et al.* Intelligent food packaging: a review of smart sensing technologies for monitoring food quality [J]. *ACS Sens.*, 2019, 4(4): 808-821.
- [3] VENKATESAN M, VEERAMUTHU L, LIANG F C, *et al.* Evolution of electrospun nanofibers fluorescent and colorimetric

- sensors for environmental toxicants, pH, temperature, and cancer cells: A review with insights on applications [J]. *Chem. Eng. J.*, 2020, 397: 125431.
- [4] NIVENS D A, ZHANG Y K, ANGEL S M. A fiber-optic pH sensor prepared using a base-catalyzed organo-silica sol-gel [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1998, 376(2): 235-245.
- [5] 聂方, 聂雅坤, 王小卉, 等. 荧光过氧化氢酶纳米传感器的制备及性能 [J]. *发光学报*, 2020, 41(7): 826-833.
NIE F, NIE Y K, WANG X H, *et al.* Ratiometric fluorescent enzymatic nanosensors for intracellular hydrogen peroxide [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(7): 826-833. (in English)
- [6] RADUNZ S, TSCHICHE H R, MOLDENHAUER D, *et al.* Broad range ON/OFF pH sensors based on pKa tunable fluorescent BODIPYs [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2017, 251: 490-494.
- [7] WENCEL D, ABEL T, MCDONAGH C. Optical chemical pH sensors [J]. *Anal. Chem.*, 2014, 86(1): 15-29.
- [8] BOZKURT E, GUL H I, OZGUN D O. Pyrazoline derived new “off-on-off” fluorescent pH sensors [J]. *Opt. Mater.*, 2018, 84: 550-555.
- [9] STEINEGGER A, WOLFBEIS O S, BORISOV S M. Optical sensing and imaging of pH values: spectroscopies, materials, and applications [J]. *Chem. Rev.*, 2020, 120(22): 12357-12489.
- [10] WANG X H, FENG Y X Y, LIU J H, *et al.* Fluorescein isothiocyanate-doped conjugated polymer nanoparticles for two-photon ratiometric fluorescent imaging of intracellular pH fluctuations [J]. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2022, 267: 120477.
- [11] 杨步高, 赵一, 韦晓菲, 等. 一种基于异硫氰酸荧光素的 pH 纳米传感器制备 [J]. *发光学报*, 2020, 41(6): 729-733.
YANG B G, ZHAO Y, WEI X F, *et al.* Preparation of fluorescent pH nanosensor based on fluorescein isothiocyanate [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(6): 729-733. (in Chinese)
- [12] HAN J Y, BURGESS K. Fluorescent Indicators for Intracellular pH [J]. *Chem. Rev.*, 2010, 110(5): 2709-2728.
- [13] WENCEL D, MACCRAITH B D, MCDONAGH C. High performance optical ratiometric sol-gel-based pH sensor [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2009, 139(1): 208-213.
- [14] ERICSON M N, SHANKAR S K, CHAHINE L M, *et al.* Development of neutral red as a pH/pCO₂ luminescent sensor for biological systems [J]. *Chemosensors*, 2021, 9(8): 210.
- [15] BAI Z H, CHEN R, SI P, *et al.* Fluorescent pH sensor based on Ag@SiO₂ core-shell nanoparticle [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5(12): 5856-5860.
- [16] WANG X D, WOLFBEIS O S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors(2008—2012) [J]. *Anal. Chem.*, 2013, 85(2): 487-508.
- [17] XU M, OBODO D, YADAVALLI V K. The design, fabrication, and applications of flexible biosensing devices [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2019, 124-125: 96-114.
- [18] WANG J, SU X Q, GAO D W, *et al.* Capillary sensors composed of CdTe quantum dots for real-time *in situ* detection of Cu²⁺ [J]. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2021, 4(9): 8990-8997.
- [19] LI Y S, MEN X J, GAO G W, *et al.* A distance-based capillary biosensor using wettability alteration [J]. *Lab Chip*, 2021, 21(4): 719-724.
- [20] ROWLAND K J, FRANÇOIS A, HOFFMANN P, *et al.* Fluorescent polymer coated capillaries as optofluidic refractometric sensors [J]. *Opt. Express*, 2013, 21(9): 11492-11505.
- [21] WANG X H, FENG Y X Y, LI Z, *et al.* A novel multifunctional fluorescent capillary-based sensor for simultaneous monitoring of pH, O₂ and CO₂ [J]. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2024, 304: 123349.
- [22] 李庆芝, 周奕华, 陈袁, 等. 比率型碳点荧光传感器检测机理与应用研究进展 [J]. *发光学报*, 2020, 41(5): 579-591.
LI Q Z, ZHOU Y H, CHEN Y, *et al.* Research progress on detection mechanism and application of carbon dots-based ratiometric fluorescence sensor [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2020, 41(5): 579-591. (in Chinese)
- [23] KE J X, LU S, SHANG X Y, *et al.* A strategy of NIR dual-excitation upconversion for ratiometric intracellular detection [J]. *Adv. Sci.*, 2019, 6(22): 1901874.

- [24] JIN W Z, WU L X, SONG Y L, *et al.* Continuous intra-arterial blood pH monitoring by a fiber-optic fluorosensor [J]. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2011, 58(5): 1232-1238.
- [25] GE J Y, FAN L, ZHANG K, *et al.* A two-photon ratiometric fluorescent probe for effective monitoring of lysosomal pH in live cells and cancer tissues [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2018, 262: 913-921.



许盼英(2000-),女,山西临汾人,硕士研究生,2022年于北京邮电大学获得学士学位,主要从事信息功能器件领域的研究。

E-mail: xupanying@bupt.edu.cn



王贵生(1970-),男,内蒙古呼和浩特人,博士,教授,2005年于第一军医大学获得博士学位,主要从事生物医学影像领域的研究。

E-mail: wgs1996@sina.com



王小卉(1987-),女,山东烟台人,博士,副教授,2015年于北京交通大学获得博士学位,主要从事发光纳米材料和生物荧光分析领域的研究。

E-mail: wangxiaohui@bupt.edu.cn