

荧光光谱法研究苯乙醇胺 A 与 CdTe 纳米材料的相互作用

熊艳^{1,2}, 徐俊^{1,2}, 邱素艳^{1,2}, 魏益华^{1,2}, 张金艳^{1,2*}

1. 江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所, 江西 南昌 330200

2. 农业农村部农产品畜禽产品质量安全风险评估实验室(南昌), 江西 南昌 330200

摘要 苯乙醇胺 A 属于 β -受体激动剂类药物, 被不法分子应用到动物的饲料中, 可使动物体内的营养成分由脂肪向肌肉转移, 显著提高胴体瘦肉率, 但是人食用后, 可引起头痛, 心律失常, 甚至威胁生命。目前主要的检测方法是液相色谱串联质谱法, 但有关它与 CdTe 纳米材料的相互作用少见报道。研究直接提出应用荧光光谱法实现对兽药残留苯乙醇胺 A 的检测。首先利用巯基丙酸作为稳定剂, 采用微波辐射加热 10 min 即可合成 CdTe 纳米材料。该 CdTe 纳米材料具有良好的荧光性能, 以 365 nm 为激发波长时, 在 650 nm 处有明显的荧光发射峰, 荧光强度达 3 000, 量子产率约 52.341%, 半峰宽为 45 nm。其次将苯乙醇胺 A 加入到 CdTe 纳米材料的体系里, 发现随着苯乙醇胺 A 浓度的增大, 该体系的荧光强度得到增强。随后对二者之间的影响因素如体系的缓冲溶液、反应时间、反应体系的 pH、试剂加入顺序、共存离子、温度等进行考察。建立了一种检测猪尿中的苯乙醇胺 A 的荧光增敏方法, 并对反应机理进行了初步探讨。当苯乙醇胺 A 溶液的浓度为 8~120 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与 CdTe 纳米材料体系的荧光增强强度具有一定的线性关系。其线性回归方程 $F/F_0 = 0.0019C + 1.0321$, 线性相关系数为 0.996, 检出限为 3.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时, 将该方法与传统的液相色谱-串联质谱联用法相比较, 研究结果表明, 采用荧光增敏方法对猪尿中的苯乙醇胺 A 进行检测分析是快速和可行的。

关键词 CdTe 纳米材料; 微波加热合成; 苯乙醇胺 A; 荧光光谱法

中图分类号: O644.17 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)05-1402-05

引言

苯乙醇胺 A 属于 β -受体激动剂, 又称为克伦巴胺, 克伦巴胺, 学名为 2-(4-(4-硝基苯基)丁基)-2-羟基氨基-1-甲氧基乙醇, 是一种人工合成的化学物质。2010 年 9 月四川省广安市广安区枣山镇畜牧兽医站对某养猪场例行违禁药物监测中, 用莱克多巴胺测试卡分别检测母猪、仔猪和育肥猪尿液, 发现该场育肥猪尿检呈阳性, 之后确认是新型添加物苯乙醇胺 A。同时也在破获的瘦肉精事件中, 发现饲料中检测出以前从未出现过的苯乙醇胺 A。苯乙醇胺与其他瘦肉精品种如莱克多巴胺等相比, 同样可使动物体内的营养成分由脂肪向肌肉转移, 显著提高胴体瘦肉率和饲料报酬^[1-3]。但是, β -受体激动剂易在动物组织, 特别是内脏中蓄积残留, 其通过食物链进入人体后可引发肌肉震颤、心律失常、头痛等症

状, 严重者可能危及生命^[4-5]。鉴于以上原因, 中华人民共和国 1519 号公告规定, 禁止在饲料和动物饮水中使用苯乙醇胺 A 等物质^[6]。欧盟已于 1996 年禁止在畜牧生产中使用该类药(ECDirective 96/22/EC)。但是, 目前仍有养殖者将其违法使用在畜牧业中, 引发药物残留, 从而对消费者健康造成严重损害。

目前的检测分析方法有液相色谱串联质谱法^[7]、气相色谱串联质谱法^[8]、ELISA 法^[9]、免疫法^[10]等。以上分析方法都分别存在样品前处理过程复杂、需要进行衍生化, 分析时间过长, 涉及使用大型精密仪器设备等缺点, 无法满足现场检验检测需求。而胶体金试纸法存在灵敏度过低等缺陷。因此迫于开发一种无需复杂的前处理过程, 无需昂贵精密的仪器设备, 在普通的实验室就能够开展的分析方法, 鉴于该类药物的监测最常采集的活体样本是尿液, 基层监督检测中也多以尿液为样本进行速测筛选。因此, 建立健全对此类药物

收稿日期: 2019-04-24, 修订日期: 2019-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(21605063), 江西省科技厅青年基金项目(20161BAB214186), 江西省协同创新项目(JXXTCX201702-05), 江西省科技厅重点研发项目(2018BBF68013)资助

作者简介: 熊艳, 女, 1979 年生, 江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所助理研究员 e-mail: 343227756@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: zhangjinyana@126.com

快速并行之有效的检测方法是十分重要和必要的,这将对基层执法监测提供快速、准确、有效的技术支撑,来满足农产品质量安全日常监督监管的需要。

量子点作为现代科技的研究前沿,具有荧光产率高、光稳定性强、荧光寿命长、生物相容性好、激发波长范围宽等优点,与生物学、免疫学等结合运用到现有检测方法中成为农产品质量安全研究领域的发展趋势^[11-13]。在目前已报道的应用研究中,量子点已成功的应用部分 β -受体激动剂的检测分析中,如沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺,但应用到苯乙醇胺 A 的检测还并不多见。基于此,本文以简化样品前处理过程,在一定浓度的 CdTe 溶液里,苯乙醇胺 A 能够使体系的荧光强度增强,并呈现良好的线性关系,因此建立一种检测猪尿中的苯乙醇胺 A 的荧光增敏方法。

1 实验部分

1.1 设备与试剂

F-7000 型荧光分光光度计(日立公司);U3900 型紫外可见分光光度计(日立公司);pHS-3C 酸度计(上海雷磁公司);波消解仪(美国 CEM 公司)。

碲粉(Te99.999%,中国医药集团上海化学试剂公司);氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$,国药集团化学试剂有限公司);硼氢化钠(96%,中国医药集团上海化学试剂公司);氢氧化钠(分析纯,中国医药上海化学试剂公司);罗丹明 6G(分析纯,上海纪宁实业有限公司),克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、苯乙醇胺 A、特布他林、氯丙那林、妥布特罗、喷布特罗、西马特罗、非诺特罗标准品,巯基丙酸等均购自 Sigma-Aldrich 公司;实验用水由 Milli-Q 水处理系统(Millipore)制的。

1.2 方法

1.2.1 CdTe 纳米材料的制备

具体制备过程参见文献[14],在此基础上,略作改动,以巯基丙酸作为稳定剂。称取 0.07 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 190 mL 高纯水中,再加入 80 μL 巯基丙酸,形成悬浊液体系;用 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节所述悬浊液体系的 pH 为 11,通高纯氮气 30 min,在氮气保护下,加入 200 μL NaHTe 溶液(通过 Te 粉与硼氢化钠反应所得),控制溶液中 Cd^{2+} , HTe^- , 巯基丙酸的摩尔比为 1.0 : 1.0 : 3.0,得 CdTe 纳米材料前驱体;将所述 CdTe 纳米材料前驱体转移至微波消解仪中,功率设定 800 W,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,经冷却、洗涤、离心,即得所述 CdTe 纳米材料。

1.2.2 制作荧光增敏标准曲线

配制一系列不同浓度的苯乙醇胺 A 标准溶液,并将其分别移至 5 mL 的比色管中,向每个所述比色管中均加入 1.0 mL 浓度为 7.25×10^{-4} mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdTe 溶液,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液定容,摇匀后,室温放置 15 min,用分子荧光光度计检测上述各个体系的荧光强度 F;同时,取 1.0 mL 浓度为 7.25×10^{-4} mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdTe 溶液加入到 5 mL 的比色管中,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液定容,摇匀后室温放置 15 min,用分子荧光光度计检测体系的荧光强度 F_0 ;

以苯乙醇胺 A 浓度为横坐标,以 F/F_0 为纵坐标,得苯乙醇胺 A 对 CdTe 纳米材料荧光增敏的线性回归方程。

1.2.3 样品的测试

分别取 1.0 mL 7.25×10^{-4} mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdTe 溶液和含苯乙醇胺 A 的样品液加入到 5 mL 的比色管中,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液定容,摇匀使其充分反应,室温放置 15 min,用分子荧光光度计检测得到体系的荧光强度,与所述苯乙醇胺 A 对 CdTe 纳米材料荧光增敏的线性回归方程对照,即得所述样品液中苯乙醇胺 A 的含量。

1.2.4 猪尿样品的前处理

取猪尿样品液,用 NaOH 溶液调节 pH 为 7.0,过滤并将收集滤液,即得。

2 结果与讨论

2.1 CdTe 纳米材料的 TEM 和荧光光谱图

图 1 和图 2 是微波合成的 CdTe 纳米材料的 TEM 图谱和荧光光谱图。从图中可以看出,微波辐射法合成的 CdTe 纳米材料大小粒径比较均匀,粒径约为 4.5 nm,参照 Demas^[15]的方法来测试该量子点的量子产率达 52.341%。该 CdTe 纳米材料的最大发射波长为 650 nm,半峰宽为 45 nm。

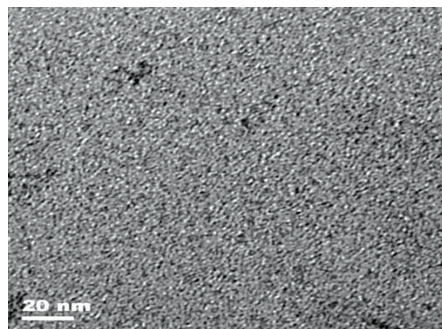


图 1 CdTe 纳米材料的 TEM 图

Fig. 1 The TEM of CdTe nanomaterials

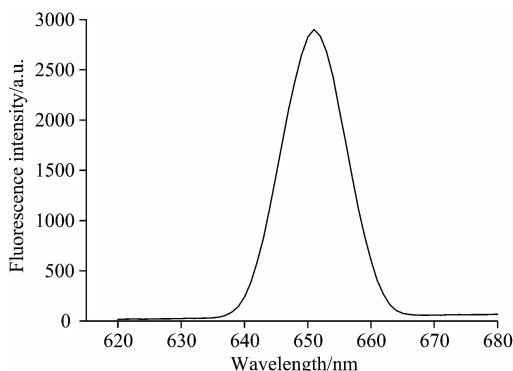


图 2 CdTe 纳米材料的荧光光谱图

Fig. 2 The fluorescence spectrum of CdTe nanomaterials

2.2 CdTe 纳米材料与苯乙醇胺 A 的相互作用图谱

图 3 为不同浓度的苯乙醇胺 A 与 CdTe 纳米材料的相互作用荧光图谱。从图中可以发现,在 CdTe 纳米材料体系里,

当加入 8, 16, 32, 40, 60, 80 和 120 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的苯乙醇胺 A 溶液, 体系的荧光强度出现了有规律的增强, 而且体系的最大的荧光波长没有变动。以苯乙醇胺 A 浓度为横坐标, 以 F/F_0 为纵坐标, 得苯乙醇胺 A 对 CdTe 纳米材料荧光增敏的线性回归方程见图 4, 其荧光增敏标准曲线回归方程 $F/F_0 = 0.0019c + 1.0321$, 线性相关系数为 0.996。不同浓度的苯乙醇胺 A 能够使 CdTe 体系的荧光强度增强的可能原因是由于苯乙醇胺 A 能够有效的填补 CdTe 纳米材料的表面缺陷, 进而增强了体系的荧光强度。

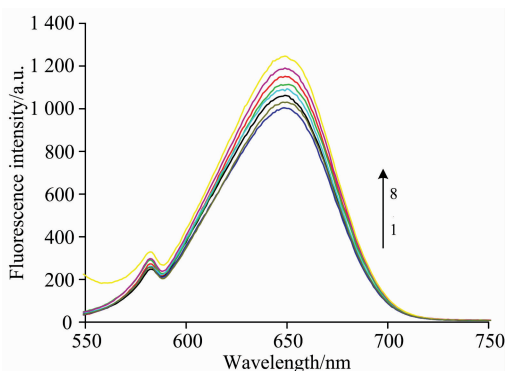


图 3 CdTe 纳米材料与不同浓度苯乙醇胺 A 的光谱变化图

1—8 体系中苯乙醇胺 A 的浓度分别为 0, 8, 16, 32, 40, 60, 80 和 120 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 The spectrum between CdTe nanomaterials and phenylethanolamine A

The concentration of phenylethanolamine A was 0, 8, 16, 32, 40, 60, 80 and 120 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively

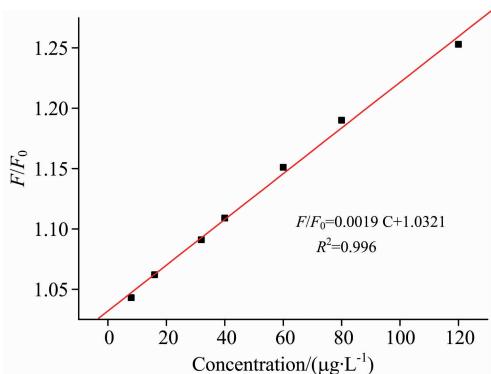


图 4 苯乙醇胺 A 对 CdTe 纳米材料的荧光增敏标准曲线

Fig. 4 Standard curve for fluorescence enhancement of CdTe nanomaterials by Phenylethanolamine A

2.3 影响因子

在体系优化的过程中, 固定体系内的苯乙醇胺 A 的浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.1 缓冲溶液的影响

实验考察了 KH_2PO_4 -NaOH, Tris-HCl, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , Na_2HPO_4 -柠檬酸 4 种缓冲溶液(相同的 pH 值, 相同的浓度)对体系的 ΔF 的影响。结果发现了在 KH_2PO_4 -

Na_2HPO_4 缓冲溶液中, 体系的荧光强度相对稳定。本实验将其作为缓冲溶液, 当该缓冲溶液的浓度为 0.06 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的荧光强度最大。

2.3.2 缓冲溶液 pH 的影响

在 pH 值 7.2~9.8 之间考察了 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液对体系 ΔF 的影响。结果表明当 pH 值为 7.4 时, 体系的荧光强度 ΔF 最大。故本实验选择 pH 为 7.4 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液。

2.3.3 反应时间、反应温度、试剂加入顺序的影响

实验选择不同浓度的苯乙醇胺 A 溶液与固定浓度的 CdTe 溶液先混合, 用磷酸盐缓冲溶液定容, 最佳的反应时间是 15 min, 最佳的反应温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.4 线性范围、精密性、检出限

实验结果表明, 体系的荧光强度与苯乙醇胺 A 在 8~120 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 范围内呈良好的线性关系。其回归方程为 $F/F_0 = 0.0019c + 1.0321$, 线性相关系数为 0.996, 方法检出限为 3.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 相对标准偏差为 0.8% ($n=6$)。

2.3.5 共存物质的影响

以苯乙醇胺 A 的浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为例, 相对误差 $\leq 6\%$ 时, 以下物质(倍量)不干扰测定: K^+ , Na^+ , NO_3^- , Cl^- (300); Zn^{2+} , SO_4^{2-} (150); Al^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} (15)。

2.4 机理探讨

以巯基丙酸作为稳定剂合成 CdTe 纳米材料, 表面具有很多缺陷。在一定的条件下, 引入不同浓度苯乙醇胺 A, 耦合作用链接到表面具有羧基的 CdTe 量子点表面上, 能够有效地弥补 CdTe 纳米材料的表面缺陷, 从而使得体系的荧光强度增强。因此能够基于此原理, 建立一种检测分析猪尿中的苯乙醇胺 A 的荧光增敏方法。

2.5 样本的测定

利用 CdTe 纳米材料荧光增敏法和液相色谱串联质谱法连用对添加的 CLE 的猪尿样品进行检测, 每个浓度检测 6 次。结果见表 1, 该荧光增敏法能够用于猪尿样品中苯乙醇胺 A 的检定, 方法令人满意。

表 1 猪尿样品不同添加浓度的 HPLC-MS-MS 和荧光增敏法测定结果的比较

Table 1 Comparison of detection results of pork sample by HPLC-MS-MS and Fluorescence enhancing methods

添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	HPLC-MS-MS 测定/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	荧光增敏法测/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
10	10 \pm 2.3	10 \pm 1.2
20	20 \pm 1.6	20 \pm 3.8
30	30 \pm 3.1	30 \pm 4.7
35	35 \pm 4.2	35 \pm 6.8
60	60 \pm 5.2	60 \pm 7.9
80	80 \pm 8.9	80 \pm 10.2

3 结论

以巯基丙酸作为稳定剂, 微波辐射合成的 CdTe 纳米材

料性能优良, 粒径均匀, 约 4.5 nm, 荧光强度高, 量子产率达 52.341%, 半峰宽为 45 nm。基于苯乙醇胺 A 在一定的条件下, 能够填充 CdTe 纳米材料的表面缺陷, 使得体系的荧光强度增强, 从而建立一种检测苯乙醇胺 A 的荧光增敏方法。苯乙醇胺 A 在 8~120 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈良好的线

性关系。其回归方程为 $F/F_0 = 0.0019c + 1.0321$, 线性相关系数为 0.996, 方法检出限为 3.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 相对标准偏差为 0.8% ($n=6$), 经与高效液相色谱-串联质谱法相比, 结果满意。为苯乙醇胺 A 的检测提供一种分析方法。

References

- [1] Elbert A H, Piet V Z, Aldo P, et al. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 1362.
- [2] Howells L, Sauer M, Sayer R, et al. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 275: 275.
- [3] Shao B, Jia X F, Zhang J, et al. *Food Chemistry*, 2009, 114: 1115.
- [4] Wang P, Liu X, Su X, et al. *Food Chem.*, 2015, 184: 72.
- [5] Wang B B, Wang Q, Cai Z X, et al. *LWT—Food Science and Technology*, 2015, 61: 368.
- [6] Announcement No. 1519 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(中华人民共和国农业部 1519 号公告). 2010.
- [7] SUN Wu-yong, ZHAO Bing-lin, ZHANG Shou-jie, et al(孙武勇, 赵冰琳, 张守杰, 等). *Chinese Journal of Chromatography(色谱)*, 2012, 30(10): 1008.
- [8] XIANG Zi-lai(项自来). *Development of Monoclonal Antibody to Phenylethanolamine A and Establishment of ELISA Method(苯乙醇胺 A 单克隆抗体的研制及 ELISA 检测方法的建立)*. Yangzhou: Yangzhou University(扬州: 扬州大学), 2018.
- [9] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(中华人民共和国农业部). *Determination of Phenylethanolamine A in Feed by High Performance Liquid Chromatography: NY/T3140—2017(饲料中苯乙醇胺 A 的测定 高效液相色谱法: NY/T3140—2017)*. Beijing: China Agricultural Press(北京: 中国农业出版社), 2018. 5.
- [10] ZHANG Chun-yan, WANG Pei-long, SHI Lei, et al(张春艳, 王培龙, 石雷, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2016, 44(12): 1859.
- [11] Wu Le, Lin Zhengzhong, Zhong Huiping, et al. *Food Chemistry*, 2017, 229: 847.
- [12] Raksawong Phannika, Chullasat Kochaporn, Nurerk Piyaluk, et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409: 4697.
- [13] Xu Xixi, Dong Liu, Luo Lijun, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 251: 564.
- [14] ZHANG Jin-yan, WEI Yi-hua, LIAO Qie-gen, et al(张金艳, 魏益华, 廖且根, 等). *Quality and Safety of Agricultural Products(农产品质量与安全)*, 2015, (2): 51.
- [15] Taylor D G, Demas J N, Taylor R P, et al. *Biophysical Journal*, 1978, 24(1): 77.

Study on Interaction Between Phenylethanolamine A and CdTe Nanomaterials by Fluorescence Spectroscopy

XIONG Yang^{1,2}, XU Jun^{1,2}, QIU Su-yan^{1,2}, WEI Yi-hua^{1,2}, ZHANG Jin-yan^{1,2*}

1. Institute for Quality & Safety and Standards of Agricultural Products Research, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China
2. MOA Laboratory of Quality Institute & Safety Risk Assessment for Livestock and Poultry Products(Nanchang), Nanchang 330200, China

Abstract Phenylethanolamine A (PA) is a new adrenergic agonist and can improve feed utilization and the lean meat percentage of carcasses of livestock. But the drug residue would lead to a great threaten to human, such as nausea, dizziness, limb weakness, hand tremor and other symptoms of poisoning. Long-term consumption may lead to mutations in the body's chromosomes, induced malignant tumor etc. At present, the main detection method is liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). The interaction between PA and CdTe nanomaterials is rarely reported. In this study, the water-soluble CdTe nanomaterials were prepared by microwave heating method, using mercaptopropionic acid as a stabilizer. The products have good fluorescence properties. The quantum yield of the CdTe nanomaterials was measured to be 0.5234, and the half-peak width was about 45 nm. By using CdTe nanomaterials as fluorescent probe, based on the enhancement of the fluorescence intensity of CdTe nanomaterials by PA, a simple, rapid and sensitive method for the determination of PA was proposed and validated. Furthermore, the possible mechanism of interaction between CdTe nanomaterials and PA was discussed. Effects of experimental conditions were investigated. The optimal conditions were as follows: buffer: pH 7.4 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ solution, concentration of

PA; $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, reaction time: 15 min, reaction temperature: $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Under the optimal conditions, a good linearity was obtained between fluorescence intensity and PA concentration in the range of $8 \sim 120 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.996. The obtained linear regression equation was: $F/F_0 = 0.0019c + 1.0321$ and the limit of detection was $3.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The proposed method was successfully applied in the determination of PA in swine urine samples, at the same time, the method is compared with the traditional liquid chromatography tandem mass spectrometry. The result indicated that the combination of CdTe nanomaterials and PA produced a nice labelling effect, and this method is fast, feasible and effective.

Keywords CdTe nanomaterials; Microwave synthesis; Phenylethanolamine A; Fluorescence enhancem

(Received Apr. 24, 2019; accepted Aug. 16, 2019)

* Corresponding author