

用于抗结核药物异烟肼检测的碳点/二氧化锰 纳米探针的构建

王新旭¹, 樊柄君¹, 闫晓辉², 王 宁^{3*}

(1. 山西医科大学 第一临床医学院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学 法医学院, 山西 太原 030001;
3. 山西医科大学 基础医学院, 山西 太原 030001)

摘要: 采用微波法快速合成了一种生物相容性好、稳定性高的荧光碳点(CDs), 并将该碳点与二氧化锰纳米片(MnO₂)混合形成纳米荧光探针用于抗结核药物异烟肼(INH)的检测。采用透射电子显微镜(TEM)、X射线光电子能谱(XPS)、X射线衍射(XRD)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、紫外可见光谱(UV-Vis)和荧光光谱等手段对碳点和二氧化锰纳米片的形貌、成分、表面基团进行了表征。实验发现, MnO₂纳米片通过荧光共振能量转移(FRET)猝灭CDs的荧光, 而加入的INH可与MnO₂纳米片发生氧化还原反应使后者降解, 进而使CDs的荧光得以恢复, 基于此构建了一种定量检测INH的纳米荧光探针。该探针对于INH表现出良好的灵敏度和选择性, 对INH检测的线性范围为0.5~60 μmol/L, 检出限为0.02 μmol/L, 并成功地应用于血样、尿样以及片剂中INH的测定, 回收率分别为94.8%~116%, 99.0%~105%和96.8%~102%, 相对标准偏差均小于5%, 结果令人满意。该探针为INH的检测提供了新的思路, 在生物样品检测方面具有广阔的应用前景。

关键词: 碳点/二氧化锰纳米探针; 异烟肼; 荧光共振能量转移; 抗结核药物

中图分类号: O657.3; R978.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)07-1058-08

Construction of a Carbon Dot/MnO₂ Nanoprobe for Detection of Anti-tuberculosis Drug Isoniazid

WANG Xin-xu¹, FAN Bing-jun¹, YAN Xiao-hui², WANG Ning^{3*}

(1. First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. School of Forensic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 3. School of Basic Medical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Isoniazid (INH) is an indispensable drug in the treatment of tuberculosis at this stage. The determination of INH content is of great significance in drug quality control and drug safety. In this paper, carbon dots (CDs) were synthesized rapidly by a microwave method using citric acid as the carbon source and thiourea as the nitrogen source. The carbon dots emit blue fluorescence under UV light, which have the advantage of biocompatibility and high stability. The carbon dots were mixed with manganese dioxide nanosheets (MnO₂) to form a fluorescent nanoprobe for the sensitive detection of INH. The morphology, composition and surface groups of the carbon dots and manganese dioxide nanosheets were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X ray photon spectroscopy (XPS), X ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) and fluorescence spectroscopy, respectively. TEM results indicated that the carbon dots were nearly spherical with particle sizes of 2.0-3.0 nm, while the manganese dioxide nanosheets had a typical two-dimensional flake morphology. Fourier transmission infrared spectroscopy revealed that there were hydroxyl, amino, and carboxyl groups on the surface of carbon dots. The fluorescence spectrum of carbon dots demonstrated a maximum emission at 445 nm with an excitation wavelength of 360 nm. Meanwhile, manganese dioxide nanosheets had a wide absorption band of 250-600 nm, which had a large overlap with the fluorescence emission spectra of carbon dots. The fluorescence of carbon dots was quenched by fluorescence resonance energy transfer (FRET) between carbon dots and manganese dioxide nanosheets. After the addition of trace INH, the redox reaction between INH and manganese dioxide nanosheets occurred, which degraded man-

收稿日期: 2021-10-08; 修回日期: 2021-12-11

基金项目: 山西省自然科学基金项目(201901D111210); 山西省高等学校大学生创新创业训练计划项目(2020181); 山西医科大学博士启动基金项目(03201514)

* 通讯作者: 王 宁, 硕士, 副教授, 研究方向: 纳米生物医药材料, E-mail: wangning@sxmu.edu.cn

ganese dioxide nanosheets and restored the fluorescence of carbon dots. This allowed the development of a nanoprobe for the quantitative detection of INH, which showed good sensitivity and selectivity for INH. The fluorescence intensity of carbon dots at 360 nm excitation under different pH of PBS solution, different concentration of sodium chloride solution and UV irradiation was studied. The experimental results showed that carbon dots had good stability. After optimization of the experimental conditions, the linear range of the nanoprobe for INH detection in pH 7.4 PBS buffer solution was 0.5 – 60 $\mu\text{mol/L}$, with a detection limit of 0.02 $\mu\text{mol/L}$. Selectivity and interference experiments presented that the nanoprobe was highly selective for INH. Moreover, common metal ions, amino acids, and sugars did not interfere with INH detection. The CDs/ MnO_2 probe was used for the determination of INH in normal human blood, urine samples, and tablets. The recoveries of blood samples, urine samples and tablets were 94.8% – 116%, 99.0% – 105% and 96.8% – 102%, respectively. Relative standard deviations (RSDs) were less than 5% for all samples. It is highly sensitive, selective, simple to prepare, economical, and environmentally friendly. The probe provides a new idea for the detection of INH and has a promising application prospect in the detection of biological samples.

Key words: CDs/ MnO_2 nanoprobe; isoniazid (INH); fluorescence resonance energy transfer (FRET); anti-tuberculosis drug

肺结核是一种严重威胁人类健康的呼吸道传染病,每年全球范围内有数百万人口罹患结核病^[1]。异烟肼(Isoniazid, INH)作为主要的抗结核药物之一,在现阶段肺结核的治疗中通常与其他药物联合使用。临床上,每个成年人每天服用INH的最佳剂量约为4 ~ 6 mg/kg,不合理使用不仅会增加耐药性风险,还会导致肝毒性^[1]、神经系统毒性^[2]、过敏性皮疹^[3]等副作用,甚至死亡。INH含量的测定在药品质量控制或用药安全方面具有重要意义。

目前为止,已报道了各种测定INH的分析方法,包括滴定法^[4]、紫外分光光度法^[5]、流动注射化学发光法^[6-7]、毛细管电泳^[8]、电化学技术^[9-10]、高效液相色谱(HPLC)^[11-12]等。这些方法各有优势,但也有局限性,如传统的分光光度法、化学发光法和毛细管电泳法灵敏度不高;高效液相色谱法通常需要先进行复杂的仪器、大量的有机试剂和复杂的操作;电化学电极表面易受污染,影响测定的重复性和灵敏度。与上述方法相比,荧光光谱法具有选择性强、成本较低、操作简单、灵敏度高的优势,在检测领域引起了广泛关注,现已用于INH的定量检测。Zahra等^[13]合成了壳聚糖纳米碳点作为荧光探针检测INH; Qin等^[14]将叶酸热解合成碳点,以荧光法实现了生物样本中INH的检测。这些荧光探针检测异烟肼的检出限为 μmol 水平。为进一步降低检出限,提高灵敏度,构建一种能够简单、快速、灵敏检测INH的纳米荧光探针显得非常重要。

CDs是一种尺寸小于10 nm的新型碳纳米材料,具有较高的荧光量子产率、较强的抗光漂白性能和良好的生物相容性,近年来已成为生物成像^[15]、生化分析^[16]、微量分析^[17]等领域的研究热点,在荧光检测领域也受到了广泛的关注^[18]。 MnO_2 纳米材料具有比表面积大、制备方便、紫外和可见光区吸收能力强等优点,优异的光吸收性能赋予其作为猝灭剂构建纳米荧光探针的潜能,在分析领域引起了极大关注^[19-21]。基于 MnO_2 纳米片对CDs荧光的良好猝灭效果,许多研究人员将这两种纳米材料结合用于检测,并在分子^[22]、离子^[23]和药物^[24-25]分析领域展现出卓越的应用价值和广阔的发展前景。

本文使用微波法快速合成了CDs,通过在该CDs溶液中加入 MnO_2 纳米片构建了一种检测INH的纳米荧光探针。采用透射电子显微镜(TEM)、X射线光电子能谱(XPS)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、X射线衍射(XRD)、紫外可见吸收光谱(UV-Vis)和荧光光谱对材料的形貌和结构进行表征。 MnO_2 纳米片可通过荧光共振能量转移(FRET)猝灭CDs的荧光;但加入INH之后,INH与 MnO_2 发生氧化还原,碳点的荧光得以恢复,据此可对INH进行测定。该纳米探针不仅成本低、易于制备、绿色环保,且对INH具有高选择性和高灵敏度的优势,在生物样品INH的检测中具有广阔的应用前景。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

4500型荧光分光光度计、U3900紫外可见分光光度计(日本日立公司);JEM-1011透射电子显微镜(日本电子光学公司);Paragon 1000型红外光谱仪(美国Perkin Elmer公司);微波炉(700 W, 中国格

兰仕微波生活电器有限公司); FA1004N 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); PHSJ3F 型实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂); 791 磁力加热搅拌器(北京科伟永兴仪器有限公司); 透析袋购自上海桥星贸易有限公司。

无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂, 分析纯); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯, 天津市北辰方正试剂厂); 磷酸(85%)、磷酸钠(分析纯)(南京化学试剂有限公司); 乙腈(天津市博迪化工股份有限公司); 异烟肼(INH)、柠檬酸、硫脲、奎宁、四甲基氢氧化铵(TMA·OH)、四水合氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、N-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM)、葡萄糖、尿素、尿酸、甘氨酸、组氨酸、半胱氨酸、草酸、NaOH、 H_2O_2 、 KNO_3 、 CaCl_2 、NaCl 均购自阿拉丁工业公司(中国上海)。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 CDs 及 MnO_2 纳米片的制备

CDs 的制备^[26]: 将柠檬酸(1 g)和硫脲(1 g)溶于去离子水(DI, 20 mL)中, 将该溶液在 700 W 微波炉中加热 5 min, 得到深色的粘性固体。将固体产物加水溶解, 离心 10 min(8 000 r/min)去除沉淀。棕色上清液以 15 000 r/min 离心 10 min, 得到的上清液再用去离子水以透析膜(1 000 Da)透析 12 h, 冷冻干燥得到固体粉末。

MnO_2 纳米片的制备^[27]: 将 10 mL 四水合氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mol/L)和 20 mL 四甲基氢氧化铵(TMA·OH, 0.6 mol/L, 含 3%(质量分数)的 H_2O_2)混合, 25 °C 搅拌反应 12 h, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀。最后, 将所得产物分别用超纯水和甲醇各洗涤 3 次, 收集沉淀, 50 °C 下干燥 1 h。

1.3 荧光检测 INH

将 50 μL MnO_2 纳米片溶液(9.5 mg/mL)加入 500 μL CDs 溶液(0.1 mg/mL)中, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)定容至 20 mL, 形成 CDs/ MnO_2 溶液。取 10 μL INH 溶液于荧光比色皿中, 用配制好的 CDs/ MnO_2 溶液定容至 2 mL。室温下反应 15 min 后, 测定体系的荧光强度, 在 360 nm 激发波长下记录荧光发射光谱(激发和发射狭缝均为 10 nm)。

1.4 荧光量子产率的测定

以硫酸奎宁为参比样品, 分别记录 CDs 溶液和硫酸奎宁($QY_s = 0.54$, $\eta_s = 1.33$)的紫外可见吸光度值和荧光发射光谱, 用公式 $QY = QY_s \times (I_u/I_s) \times (A_s/A_u) \times (\eta_u/\eta_s)^2$ 计算 CDs 的荧光量子产率。式中, QY 为荧光量子产率; I 为积分强度, A 为吸光度; η 为溶液的折光率, 下标 u 和 s 分别代表 CDs 和硫酸奎宁。通过计算得到 CDs 的荧光量子产率为 22.34%。

1.5 实际样品的制备

尿样和血样的制备: 人的尿样和血样由健康志愿者提供。首先将尿液以 10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 用超纯水稀释 100 倍, 置于 4 °C 冰箱中备用。采血后立即取血浆, 于 3 000 r/min 离心 5 min, 保存于 4 °C 冰箱。使用时向血浆中加入等体积乙腈, 搅拌 1 min 后, 在 4 000 r/min 下离心 15 min, 得到上清液, 向上清液中加入 NEM(150 $\mu\text{mol/L}$)以阻断巯基物质的干扰。

片剂样品的制备: 在研钵中将 INH 片剂充分研磨, 将得到的粉末溶解于 50 mL 蒸馏水中, 稀释 100 倍, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得到澄清溶液。

2 结果与讨论

2.1 CDs 与 MnO_2 纳米片的结构表征

用透射电子显微镜(TEM)对 CDs 和 MnO_2 纳米片的形貌进行表征。如图 1A 所示, CDs 颗粒形状接近球形, 分散性良好, 粒径分布在 2.0 ~ 3.0 nm。HRTEM 图像(图 1A 插图)显示, CDs 晶格间距为 0.21 nm。图 1B 显示, MnO_2 纳米片具有典型的二维片状形貌。X 射线衍射(XRD)图谱(图 1C)显示 CDs 在 22.9° 处有一个较宽衍射峰, 表明 CDs 存在无序的碳结构; MnO_2 纳米片在 12.1°、24.5°、36.6° 和 65.6° 处有特征峰, 与文献中 α - MnO_2 纳米片的特征峰一致, 说明制备的为 α 晶型的 MnO_2 纳米片^[28]。

此外, FT-IR 光谱(图 1D)表明 CDs 表面存在多种官能团。3 431 cm^{-1} 处的峰代表 N—H/O—H 的伸缩振动, 表明 CDs 含有大量的氨基和羟基, 这些基团赋予 CDs 良好的亲水性。3 600 ~ 3 100 cm^{-1} 处的宽吸收峰属于 O—H 和 N—H 的伸缩振动, 位于 3 182、1 663、1 415 cm^{-1} 处的峰分别属于 C—H、C=C 和 C—N 的伸缩振动, 1 709 cm^{-1} 处的吸收峰代表 —COOH 中 C=O 的伸缩振动, 2 060 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C≡N

的伸缩振动, $2\,366\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,185\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别代表S—H和C=S的伸缩振动。 MnO_2 纳米片的FT-IR图(图1D)在 $3\,405$ 、 $1\,643$ 、 521 cm^{-1} 处的峰分别归属于O—H、C=O和Mn—O的伸缩振动。

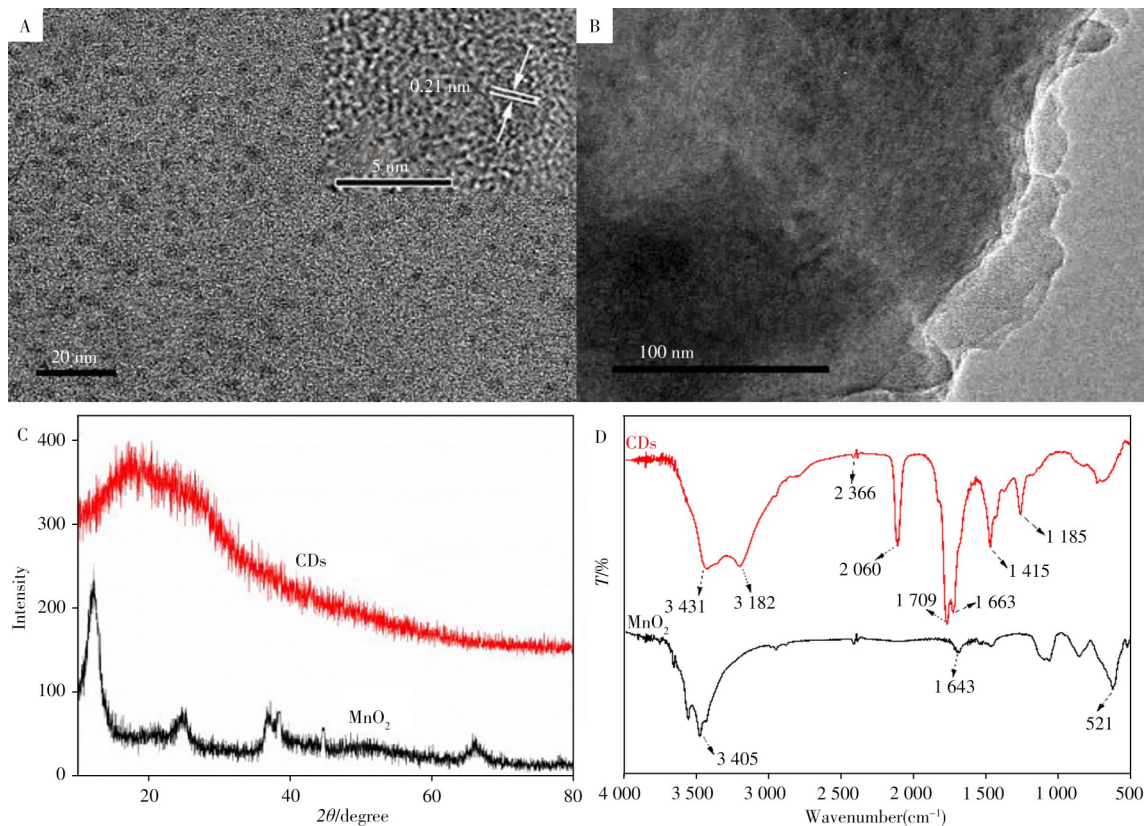


图1 CDs(A)、 MnO_2 纳米片(B)的TEM图谱及其XRD图谱(C)和FT-IR图(D)

Fig. 1 TEM images of CDs(A) and MnO_2 nanosheets(B), and their XRD(C) and FT-IR(D) patterns
the inset A shows the HRTEM image of CDs

CDs的X射线光电子能谱(XPS)如图2A所示, 161.7 、 225.0 、 282.0 、 398.1 、 528.9 eV 处出现的尖峰分别对应 $\text{S}2\text{p}$ 、 $\text{S}2\text{s}$ 、 $\text{C}1\text{s}$ 、 $\text{N}1\text{s}$ 和 $\text{O}1\text{s}$, 表明所得到的CDs主要由碳、氮、氧和硫元素组成。将CDs的XPS总谱分解得到 $\text{C}1\text{s}$ 、 $\text{N}1\text{s}$ 、 $\text{O}1\text{s}$ 和 $\text{S}2\text{p}$ 的精细图谱。 $\text{C}1\text{s}$ 在 284.5 、 285.6 、 287.8 、 288.8 eV 处的吸收分别代表C=C、C—N/C—O、C=N/C=O和O—C=O基团。 $\text{N}1\text{s}$ 谱在 399.1 、 399.8 eV 处有两个峰, 分别对应C—N—C和N—C键。 $\text{O}1\text{s}$ 的拟合谱图在 531.6 、 533.7 eV 处有两个峰, 分别归属于C=O和C—OH/C—O—C键^[28]。在 $\text{S}2\text{p}$ 的拟合谱图中有4个峰, 分别对应亚砷(164.9 eV)、—C=S—(163.9 eV)、—C—Sn—C(163.0 eV , $n=1$ 或 2)和—SH(163.5 eV)键。

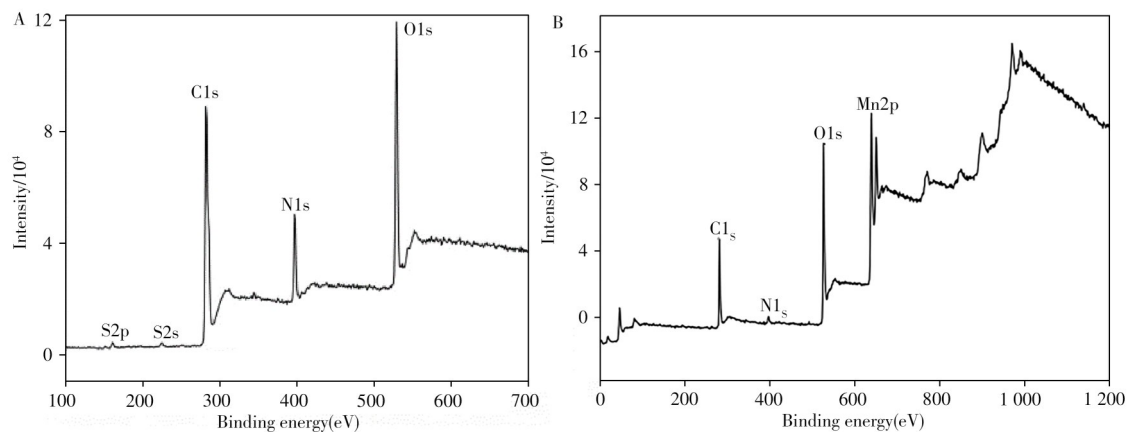


图2 CDs(A)和 MnO_2 纳米片(B)的XPS全谱图谱

Fig. 2 XPS spectra of CDs(A) and MnO_2 nanosheets(B)

MnO₂纳米片的XPS如图2B所示,在282.0、397.1、527.9、640.1 eV处的4个峰,分别对应C1s、N1s、O1s和Mn2p。将MnO₂的XPS总谱进一步分解得到Mn2p和Mn3s的精细谱图。Mn2p在642.0 eV和653.9 eV处有两个峰,分别为Mn2p_{3/2}和Mn2p_{1/2}的特征峰。此外,Mn3s光谱的 ΔE 约为4.97 eV,表明MnO₂纳米片主要以Mn(IV)价态存在^[29]。这些结果表明MnO₂纳米片成功合成。通过紫外可见吸收光谱(图3A曲线a)进一步证实了MnO₂纳米片的光学特性,其在360 nm处有1个峰,在250~600 nm处有较宽的吸收带;荧光图谱(图3A曲线b、c)显示,CDs的激发和发射与MnO₂纳米片的吸收有很大的重叠区域。

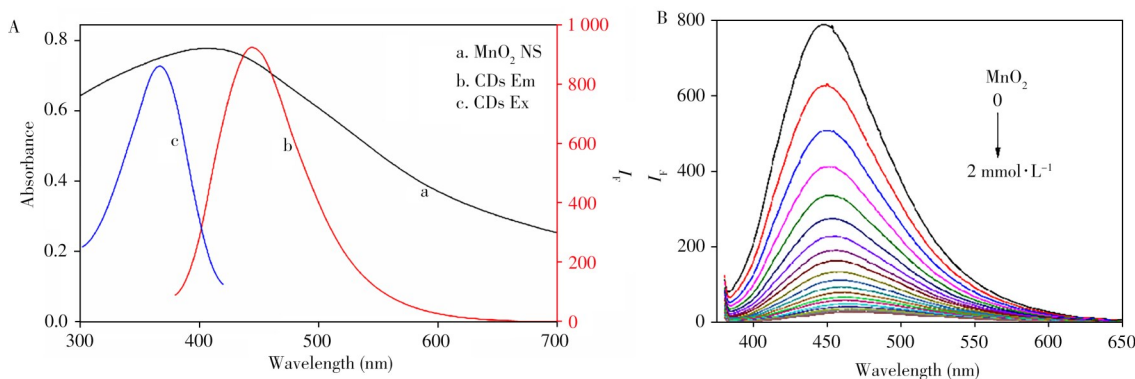


图3 CDs的荧光激发和发射光谱及MnO₂纳米片的紫外可见吸收光谱(A)与不同浓度的MnO₂纳米片对CDs荧光强度的影响(B)

Fig. 3 Fluorescence excitation and emission spectra of CDs, UV-Vis absorption spectra of MnO₂ nanosheets (A), and effect of different concentrations of MnO₂ nanosheets on the fluorescence intensity of CDs (B)

2.2 CDs的稳定性

研究了CDs在不同pH值的PBS溶液、不同浓度的氯化钠溶液和紫外照射条件下于360 nm激发光下的荧光强度,发现CDs的荧光强度受环境影响较小,只在酸性较强的环境中荧光值降低,证明CDs具有良好的稳定性。

2.3 实验条件的优化

为获得INH的最佳测定条件,分别对pH值、反应时间和MnO₂纳米片的浓度进行了优化。考察了不同pH值(4.0~11.0)对CDs/MnO₂-INH体系荧光强度的影响,以 I_{F0} 为CDs的荧光强度, I_{F1} 为加入MnO₂纳米片后的荧光强度, I_{F2} 为MnO₂纳米片和INH共同存在时CDs的荧光强度。在pH 4.0~7.4范围内,随着pH值的增加, I_{F0}/I_{F1} 与 I_{F1}/I_{F2} 的值均不断增大,并在pH 7.4时达到最大值;随着pH值继续增大,两比值均逐渐减小,即PBS缓冲液的pH值为7.4时INH的检测灵敏度最高。

在加入MnO₂纳米片后CDs的荧光强度迅速降低,1 min后趋于稳定。在CDs/MnO₂纳米片中加入20 μ mol/L的INH,荧光强度随孵育时间的延长而增加,15 min后达到稳定,故15 min为最佳反应时间。

为研究MnO₂纳米片浓度对CDs荧光的影响,将一系列浓度的MnO₂纳米片与CDs混合,并加入20 μ mol/L的INH。结果显示CDs的荧光强度随着MnO₂纳米片浓度的增加而逐渐减弱,当MnO₂纳米片的浓度为2 mmol/L时,猝灭效率达到99%左右(图3B)。而MnO₂纳米片浓度为0.2 mmol/L时,INH对于CDs荧光的恢复最灵敏,其浓度大于2 mmol/L时不利于CDs荧光的恢复。综合考虑,确定MnO₂纳米片的最佳浓度为0.2 mmol/L。

2.4 方法检出限

加入INH后,CDs/MnO₂检测体系的荧光明显恢复。而无MnO₂纳米片存在时,即使INH浓度增至100 mmol/L,CDs的荧光也不发生变化,表明INH对CDs的荧光没有影响。向CDs/MnO₂检测体系中加入INH,溶液颜色由棕色变为无色,这是由于MnO₂纳米片与INH发生氧化还原反应分解为Mn²⁺,令MnO₂溶液的棕色消失,CDs的荧光恢复。

考察了最佳条件下,不同浓度的INH对CDs/MnO₂荧光光谱的影响。结果表明,CDs/MnO₂纳米探针的荧光恢复效率与INH的浓度在0.5~60 μ mol/L范围内呈线性关系,其回归方程为 $y = 0.0626x + 1.0988$,相关

系数 $r^2 = 0.998$, 其中 x 表示异烟肼的浓度 ($\mu\text{mol/L}$), y 表示 $I_{\text{F}}/I_{\text{F0}}$ (I_{F0} 和 I_{F} 分别为加入 INH 前后 CDs/MnO₂ 的荧光强度)。以 $3\sigma/K$ 计算检出限 (LOD) (σ 为空白样本的标准方差, K 为线性方程的斜率), 得到 LOD 为 $0.02 \mu\text{mol/L}$ 。与大多数已报道的 INH 测定方法 (表 1) 相比, 本方法具有较低的检出限。

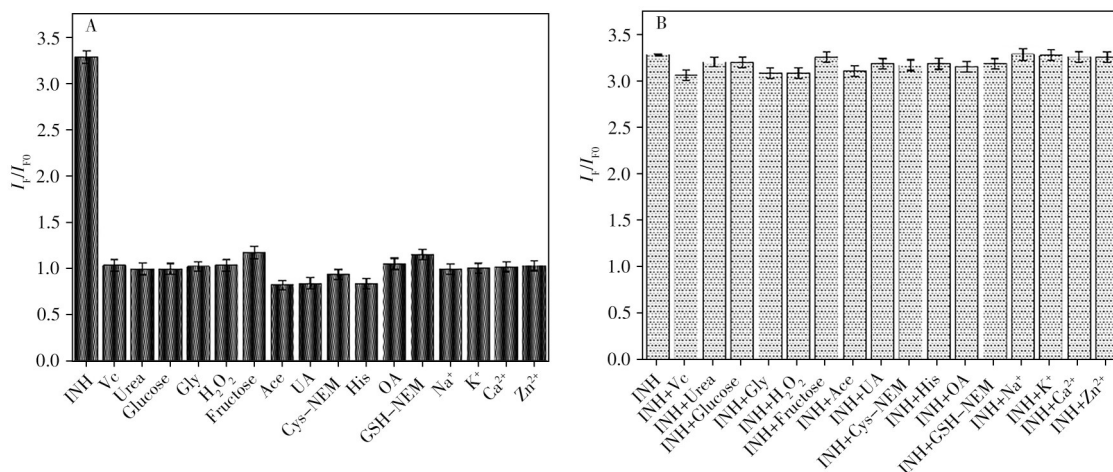
表 1 与其他检测方法的对比

Table 1 Comparison with other detection methods

Method	Detection range ($\mu\text{mol/L}$)	Detection limit ($\mu\text{mol/L}$)	Sample
Ultraviolet spectrophotometric method ^[30]	2.2 ~ 25.5	1.9	Tablet
Electrochemical method ^[6]	5 ~ 500	2.6	Urine
High efficacy liquid phase method ^[31]	0.029 ~ 29	0.029	Blood
Capillary electrophoresis ^[32]	5 ~ 218	2.2	Blood
This paper	0.5 ~ 60	0.02	Blood, urine and tablet

2.5 CDs/MnO₂对 INH 检测的选择性及抗干扰能力

考察了常见糖类、生物大分子和金属离子对 CDs/MnO₂ 检测 INH 的影响, 结果如图 4 所示。图中 IF0 与 IF 分别代表加入 INH 前后 CDs/MnO₂ 的荧光强度。从图 4A 可观察到只有 INH 能显著恢复 CDs/MnO₂ 体系的荧光, 其它常见糖类 (Glu 和 Fru)、生物大分子 (Vc、Ace、UA、H₂O₂、Gly、His、Cys - NEM、GSH - NEM、OA、urea) 和金属离子 (K⁺、Ca²⁺、Na⁺ 或 Zn²⁺) 不会使 CDs/MnO₂ + INH 体系的荧光强度发生明显恢复。探究了干扰物质存在下, INH 对 CDs/MnO₂ 体系的荧光恢复情况, 结果如图 4B 所示, 当 INH 浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$, 控制相对误差在 $\pm 5\%$ 以内时, 浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$ 的常见糖类、生物大分子和金属离子对 CDs/MnO₂ 检测 INH 无明显干扰。上述实验结果表明 CDs/MnO₂ 可特异性识别 INH, 常见糖类、生物大分子和金属离子在 $0 \sim 500 \mu\text{mol/L}$ 范围内对 INH 测定的干扰性较小。

图 4 CDs/MnO₂对 INH 的选择性检测(A)及常见糖类、生物大分子和金属离子对 CDs/MnO₂ 检测 INH 的干扰性(B)Fig. 4 Selective detection of INH by CDs/MnO₂ (A), interference of common carbohydrates, biomacromolecules and metal ions on the detection of INH by CDs/MnO₂ (B)

2.6 实际样品测定

选取人尿样和血清样品作为研究对象, 考察探针在实际样品中检测 INH 的适用性和可靠性。向空白尿样和血清样品中加入 INH 标准溶液, 制成不同浓度 (4、20、 $50 \mu\text{mol/L}$) 的加标样品, 进行加标回收实验, 每个浓度重复测定 3 次, 得到空白血样和尿样中 INH 的回收率分别为 $94.8\% \sim 116\%$ 、 $99.0\% \sim 105\%$, 相对标准偏差 (RSD) 均不超过 5% (表 2)。此外, 将该方法用于市售片剂中 INH 的检测, 得到的 INH 浓度与片剂的标示量非常接近, 加标回收率为 $96.8\% \sim 102\%$, RSD 小于 5% (表 3), 满足《中华人民共和国药典》(2020 年版)^[35] 对同一片剂中 INH 含量的要求。

表 2 血样和尿样中 INH 的检测

Table 2 Detection of INH in blood and urine samples

Sample	Added ($\mu\text{mol/L}$)	Found ($\mu\text{mol/L}$)	Recovery (%)	RSD ($n = 3$, %)
Blood	4	4.64	116	1.6
	20	18.97	94.8	1.4
	50	49.20	98.4	1.3

(续表2)

Sample	Added($\mu\text{mol/L}$)	Found($\mu\text{mol/L}$)	Recovery(%)	RSD($n=3$, %)
Urine	4	4.20	105	1.5
	20	20.42	102	1.1
	50	49.50	99.0	1.2

表3 片剂中INH的检测

Table 3 Detection of INH in tablets

Labeled($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Detected($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Added($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Total found($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=3$)	Recovery(%)	RSD($n=3$, %)
10.0	10.12	10.0	20.27	102	2.3
		15.0	24.94	98.8	1.0
		20.0	29.47	96.8	1.1

2.7 机理研究

CDs的荧光可被 MnO_2 纳米片猝灭, 由于CDs的荧光发射光谱与 MnO_2 纳米片的紫外吸收光谱重叠, 初步推断猝灭机理为FRET或者内滤光效应(IFE)。FRET是一种通过分子间的电偶极相互作用将供体激发态能量转移到受体的非辐射能量跃迁过程^[33]。供体在能量发生转换后, 荧光强度减弱, 荧光寿命缩短; 受体荧光被激发, 荧光寿命增加; 若受体无荧光特性, 则表现为供体荧光被受体猝灭^[34]。而IFE是指由于荧光体的激发光谱或者发射光谱与吸收体的吸收光谱重叠, 导致荧光体发射强度降低的现象, 但荧光体的荧光寿命不会发生变化^[36]。 MnO_2 纳米片在200~800 nm范围内有宽的吸收, 与CDs的发射光谱有很大的重叠, 供体CDs的荧光被受体 MnO_2 猝灭; 供体CDs的荧光寿命为2.6 ns, 加入受体 MnO_2 后其荧光寿命缩短为1.7 ns(图6); 而受体 MnO_2 无荧光特性, 表现为猝灭供体CDs的荧光。综上所述, CDs与 MnO_2 相互作用的机理主要为FRET。其中荧光共振能量转移效率(E)可以由公式 $E = 1 - \tau_a/\tau_0$ (τ_a , τ_0 分别代表受体存在和不存在时供体的荧光寿命)获得^[25], 经计算 E 为34.62%。

3 结论

MnO_2 纳米片与CDs之间存在的FRET效应可将CDs的荧光猝灭, 而INH可将 MnO_2 纳米片还原为 Mn^{2+} , 从而使CDs的荧光恢复, 基于此构建了一种简单快速地检测INH的纳米荧光探针。在优化条件下, CDs/ MnO_2 纳米探针的荧光恢复效率与INH浓度在0.5~60 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性关系, 对INH的检出限为0.02 $\mu\text{mol/L}$ 。CDs/ MnO_2 纳米探针对INH有高选择性, 常见糖类、生物大分子和金属离子对INH的检测基本无干扰。该探针已成功应用于血样、尿样以及片剂中INH的测定, 检测结果准确可靠。CDs/ MnO_2 纳米探针灵敏度高、选择性好、制备简单、成本低廉且对环境友好, 在临床上能够帮助肺结核病患者合理控制药量, 降低药物副作用。作为一种极具应用前景的纳米荧光探针, CDs/ MnO_2 纳米探针在生物医学领域必将具有更广泛的用途。

参考文献:

- [1] Nicoletti P, Devarbhavi H, Goel A, Venkatesan R, Eapen C E, Grove J I, Zafer S, Bjornsson E, Lucena M I, Andrade R J, Pirmohamed M, Wadelius M, Larrey D, van der Zee A H M, Ibanez L, Watkins P B, Daly A K, Aithal G P. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2021**, 109(4): 1125–1135.
- [2] Ruan L Y, Fan J T, Hong W, Zhao H, Li M H, Jiang L, Fu Y H, Xing Y X, Chen C, Wang J S. *Toxicol. Lett.*, **2018**, 295: 256–269.

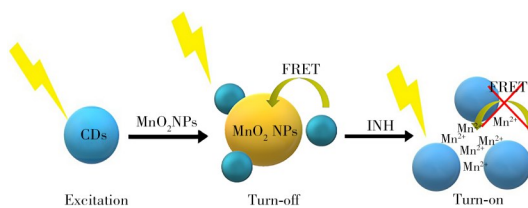
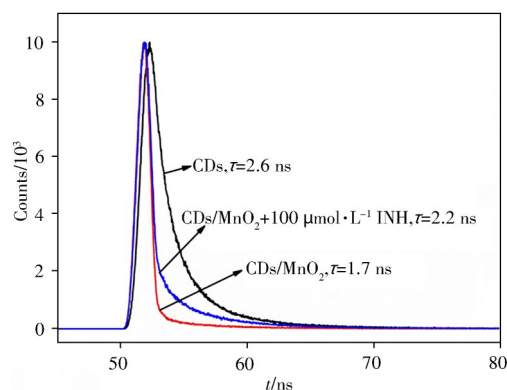


图5 反应机理示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the reaction mechanism

图6 CDs和CDs/ MnO_2 、CDs/ MnO_2 +INH的时间分辨荧光衰减光谱Fig. 6 Time-resolved fluorescence decay spectra of CDs and CDs/ MnO_2 , CDs/ MnO_2 +INH

- [3] Ye Y M, Hur G Y, Kim S H, Ban G Y, Jee Y K, Naisbitt D J, Park H S, Kim S H. *Br. J. Dermatol.*, **2017**, 176(2): 378 – 386.
- [4] Swamy N, Basavaiah K, Vinay K B. *J. Anal. Chem.*, **2015**, 70(6): 696 – 699.
- [5] Marcellos L F, Faria A F, de Souza M V N, Almeida M R, Sabin G P, Poppi R J, de Oliveira M A L. *Cent. Eur. J. Chem.*, **2012**, 10(6): 1808 – 1816.
- [6] de Oliveira P R, Oliveira M M, Zarbin A J G, Marcolino L H, Bergamini M F. *Sens. Actuators B*, **2012**, 171: 795 – 802.
- [7] Gopinathan M, Thiyagarajan N, Thiruppathi M, Zen J M. *Electroanalysis*, **2018**, 30(7): 1400 – 1406.
- [8] Zhang X F, Xuan Y L, Sun A M, Lv Y, Hou X D. *Luminescence*, **2009**, 24(4): 243 – 249.
- [9] Botelho C N, Pavao D P E, Damos F S, Luz R D S. *Electroanalysis*, **2021**, 33(8): 1936 – 1944.
- [10] Qian L T, Thiruppathi A R, van der Zalm J, Chen A C. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2021**, 4(4): 3696 – 3706.
- [11] Fernandes G F D, Salgado H R N, dos Santos J L. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2017**, 47(4): 298 – 308.
- [12] Yan H L, Zhou Y P, Xie Q J, Zhang Y, Zhang P, Xiao H L, Wang W, Yao S Z. *Anal. Methods*, **2014**, 6(5): 1530 – 1537.
- [13] Zahra S, Negin F, Mohabbat A, Mohsen S, Sajad M. *Spectrochim. Acta A*, **2020**, 228: 117848.
- [14] Qin J, Zhang L M, Yang R. *J. Nanopart. Res.*, **2019**, 21: 3.
- [15] Ali H, Ghosh S, Jana N R. *Wiley Interdisciplinary Rev. – Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2020**, 12(4): e1617.
- [16] Li H X, Su D D, Gao H, Yan X, Kong D S, Jin R, Liu X M, Wang C G, Lu G Y. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(4): 3198 – 3205.
- [17] Sharma V, Tiwari P, Kaur N, Mobin S M. *Environ. Chem. Lett.*, **2021**, 19(4): 3229 – 3241.
- [18] Zheng Q H, Sheng Y L, Zhang S B, Huang Z N, Chen W, Peng H P. *J. Instrum. Anal.* (郑琼华, 盛依伦, 张善彪, 黄种南, 陈伟, 彭花萍. 分析测试学报), **2022**, 41(4): 618 – 624.
- [19] Tian F Y, Zhou J, Ma J, Liu S Y, Jiao B N, He Y. *Microchim. Acta*, **2019**, 186(1): 7.
- [20] Qaitoon A, Yong J X, Zhang Z X, Liu J, Xu Z P, Zhang R. *New J. Chem.*, **2021**, 45(28): 12377 – 12383.
- [21] Wu M Y, Hou P F, Dong L N, Cai L L, Chen Z D, Zhao M M, Li J J. *Int. J. Nanomed.*, **2019**, 14: 4781 – 4800.
- [22] Jia R N, Jin K F, Zhang J M, Zheng X J, Wang S, Zhang J. *Sens. Actuators B*, **2020**, 321: 128506.
- [23] Li D Y, Wang S P, Azad F, Su S C. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2020**, 190: 110141.
- [24] Liu L F, Hu Q, Sun H J, Han J, Pan Y N, Yang Z Q. *J. Food Composit. Anal.*, **2020**, 94: 103639.
- [25] Su Q, Gan L, Zhu Y, Yang X M. *Sens. Actuators B*, **2021**, 335: 129715.
- [26] Zhou Z J, Ushakova E V, Liu E S, Bao X, Li D, Zhou D, Tan Z N, Qu S N, Rogach A L. *Nanoscale*, **2020**, 12(20): 10987 – 10993.
- [27] Liu J J, Chen Y L, Wang W F, Feng J, Liang M J, Ma S D, Chen X G. *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64(1): 371 – 380.
- [28] Han Z, Yu T S, Liu W T, Zhang M, Jin H X, Ge H L, Wang X Q, Jin D F. *J. China Univ. Metrol.* (韩哲, 俞天寿, 柳宛彤, 张明, 金红晓, 葛洪良, 王新庆, 金顶峰. 中国计量大学学报), **2021**, 3201: 124 – 131.
- [29] Chen J, Meng H M, Tian Y, Yang R, Du D, Li Z H, Qu L B, Lin Y H. *Nanoscale Horiz.*, **2019**, 4(2): 321 – 338.
- [30] Abolhasani J, Hassanzadeh J. *Luminescence*, **2014**, 29(8): 1053 – 1058.
- [31] Chen W Z, Zhang Y P, Fang H, Chen H, He J L, Yi R Z, Hong Z. *Biomed. Chromatogr.*, **2020**, 34(9): e4900.
- [32] Liu Y, Fu Z F, Wang L. *Luminescence*, **2011**, 26(6): 397 – 402.
- [33] Wang L, Zhang Y Q, Tao X Q, Song E Q. *J. Instrum. Anal.* (王玲, 张亚青, 陶晓奇, 宋尔群. 分析测试学报), **2022**, 41(4): 639 – 645.
- [34] Ghosh S, Chen Y H, George A, Dutta M, Strosio M A. *Front. Chem.*, **2020**, 8: 594.
- [35] Pharmacopoeia Committee of People's Republic of China. *Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part II*. Beijing: China Medical Science and Technology Press(中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部. 北京: 中国医药科技出版社), **2020**.
- [36] Wan Z X, Cai Z Z, Dou X C. *J. Instrum. Anal.* (万知欣, 蔡珍珍, 窦新存. 分析测试学报), **2022**, 41(2): 290 – 298.

(责任编辑: 盛文彦)