

比率荧光法传感 pH 检出限的探讨

文慧 刘珣 张尚青 杨婷 陈明丽* 王建华*

(东北大学理学院化学系, 沈阳 110819)

摘要 检出限是判断或评价一种分析方法灵敏度的重要参数,与普通荧光探针相比,比率型荧光探针检出限的计算则比较复杂,多数情况下采用空白标准偏差的 3 倍与标准曲线斜率的比值作为检出限。而当比率荧光探针用于 pH 检测时,检出限尚无统一定义。本研究通过归纳总结发现,根据检测所得数据形式,可将比率型荧光探针分为 3 种,并据此设计了一种激发波长为 365 nm、发射波长为 600 nm/450 nm 的模拟探针。通过对 3 种不同类型的 pH 比率型荧光探针检测的模拟数据进行分析,以光谱方法的检出限计算公式为原型,提出了检出限的计算公式。本方法可用于不同种类 pH 比率型探针方法灵敏度的比较。

关键词 比率型荧光探针; pH 传感; 灵敏度; 模拟数据

1 引言

荧光光谱法具有灵敏度高、选择性强、快速简便等优点,广泛应用于温度^[1]、pH^[2-4]、环境污染物^[5,6]、重金属离子^[7,8]、生物小分子^[9-11]、细胞内物质^[12,13]的传感分析,以及生物体^[14]和细胞^[15-17]成像。比率型荧光法以两个不同波长处荧光强度的比值作为响应信号,使得分析方法本身受外部环境等因素的影响大大减小。因此,比率荧光法的样品适用范围比直接荧光光谱分析法更广泛,通常具有更高的灵敏度和更好的选择性^[18,19]。根据两个波长处荧光强度变化趋势的不同,可将比率型荧光探针分为四类:(1)一个波长处的荧光强度不变,另一个波长处的荧光强度变小^[20,21]; (2)一个波长处的荧光强度不变,另一个波长处的荧光强度变大^[22]; (3)一个波长处荧光强度变小,另一个波长处荧光强度变大^[14,23]; (4)两个波长处的荧光强度同时变大或变小^[24]。

国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)1998年发表的《分析术语纲要》中规定:“检出限(LOD)以浓度或质量表示,是指由特定的分析步骤能够合理地检测出的最小分析信号 x 求得的最低浓度 c (或质量 q)”。具体到光谱分析方法,科研人员通常采用分析物产生信号为噪声信号 3 倍的表达方式。而 pH 检测与传统的检测不同,它不以某种分析物的浓度为量纲,因此,pH 检测应该以最小能够响应的 pH 单位为检出限。检出限是判断或评价一种分析方法灵敏度的重要参数,比率型荧光探针 LOD 的计算则比较复杂。在已报道过的文献中,关于比率型探针 LOD 的计算方法有多种,比较常见的表达方式包括:空白标准偏差的 3 倍(3σ)^[25]、标准曲线的斜率^[21]、空白标准偏差的 3 倍(3σ)与标准曲线斜率的比值^[26,27]和信噪比的 3 倍^[8,9]等。其中,空白标准偏差的 3 倍与标准曲线斜率的比值是光谱分析中比较认可的检出限计算方法。而在比率荧光 pH 传感方法中没有空白样品,所以空白标准偏差的 3 倍与标准曲线斜率比值的算法无法应用,目前文献中常用的灵敏度表征参数是标准曲线斜率,即 $\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH}$ 。

灵敏度是指某方法对单位浓度或单位量待测物质变化所致的响应量变化程度,即标准曲线的斜率,因此,在多数情况下会采用标准曲线的斜率直接表征荧光探针的灵敏度,但是,仅用标准曲线斜率表征比率荧光 pH 传感方法的检出限难以正确评价同类方法的灵敏度,对比较不同方法间的灵敏度造成困扰。如前述荧光探针中的第(1)类, $\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH}$ 多数情况下均小于 1;而对于第(2)类, $\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH}$ 多数情况下均大于 1。若仅用 $\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH}$ 表征,则第(2)类方法的灵敏度多数情况下均优于第(1)类,这种结论显然不正确。由此可见,荧光探针响应信号不同,导致比率荧光 ΔRatio 之间相差较大,在这 4 种分类中,有时整个线性区间对应的 ΔRatio 包含 1,无论是直接用 $\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH}$,还是用 $1/(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$ 表

征方法检出限,均不能准确评价同类方法的灵敏度。

本研究以比率荧光法传感测定 pH 时常遇到的 3 种情况为例,基于模拟的检测数据数据,探讨了表征比率荧光法检出限的方法,提出了适用于不同情况的计算比率荧光方法检出限的方案。本方法可用于同类比率荧光 pH 传感方法检出限的比较,以合理评价方法灵敏度。由于在非比率荧光 pH 传感中也涉及无空白样品的问题,因此,本方法同样适用于非比率荧光 pH 传感方法检出限的计算及比较。

2 原理和方法

通常,光谱方法的检出限计算公式为: $LOD = 3\sigma/K$ 其中, σ 为空白样品多次测定的标准偏差; K 为标准曲线的斜率。

比率型荧光探针 LOD 的计算在本质上与常见的荧光探针相同。根据比率型荧光探针的变化形式,比率荧光探针可分为 4 类,其所获得的检测数据可归结为 3 种:第 I 种,信号比率值 $Ratio > 1$; 第 II 种,信号比率值 $Ratio < 1$; 第 III 种,信号比率值 $Ratio$ 包含 1。因此,建立一种合适的检出限计算方法,即可对不同的比率荧光传感 pH 方法的灵敏度进行比较。

本研究假设有一种激发波长为 365 nm、发射波长为 600 nm/450 nm 的荧光探针,其 450 nm 处的荧光强度保持不变。根据检测数据可能出现的形式,模拟出 3 种不同形式的 6 个比率型荧光探针的检测数据。以相关参考文献中 pH 探针的类型为依据,设计出各探针的检测范围及标准曲线,在标准曲线上选取合适的数据点后,再按照模拟探针本身的特点要求,通过倒推的方法获得模拟数据。对比模拟数据,探讨不同形式的比率荧光探针用于 pH 传感时,方法的检出限计算方案。

3 结果与讨论

3.1 比率信号值均大于 1

以比率信号值均大于 1 的情况为例进行计算。Liu 等^[21]以上转换纳米粒子为核心,二氧化硅为壳层,在二氧化硅表面偶联 BSA,合成了核-壳-壳结构,在壳层表面结合 pH 敏感型染料,即可获得比率型 pH 荧光探针。本研究选用 $Ratio$ 为 540 nm 处的荧光强度与 655 nm 处的荧光强度的比值 ($I_{540\text{ nm}}/I_{655\text{ nm}}$),结果表明,此探针的比率信号值均大于 1。本研究以真实探针荧光光谱图的类型为基础,虚构了和它相同类型的模拟探针的荧光光谱图,如图 1 所示。模拟的探针发射波长在 450 nm 处的荧光强度保持不变,600 nm 处的荧光强度逐渐增大,且均大于 450 nm 处的荧光强度,因此,比率信号值均大于 1。后续其它各类型的模拟探针数据均采用此方法获得,为了保持本研究讨论的一致性,无论何种类型的荧光探针,均假定其激发波长为 365 nm,发射波长为 600 nm/450 nm,且 450 nm 处的荧光强度不变。

以 $Ratio(I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}})$ 为纵坐标, pH 值为横坐标,建立 pH 传感方法,假设有两种不同灵敏度的探针 A_1 和 A_2 ,其在不同 pH 值处对应的 $Ratio(I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}})$ 数据见表 1(探针 A_1) 和表 2(探针 A_2)。两种探针对应的标准曲线如图 2 所示,线性方程分别为 $Y_{A_1} = 2X_{A_1} - 4$ 和 $Y_{A_2} = X_{A_2} - 1$ 。

按照“ $3\sigma/K$ ”的方式计算检出限时,首先遇到的问题是,对于 pH 传感方法,没有空白样品,无法定义空白样品多次测量的标准偏差。本研究推荐的方法为将线性范围中间值 11 次测量的标准偏差作为公式中的 σ ,探针 A_1 和 A_2 的标准偏差测量结果如表 3 所示,对应于探针 A_1 和 A_2 ,其标准偏差分别为 $\sigma_{A_1} = 0.4494$ 和 $\sigma_{A_2} = 0.1183$ 。根据线性方程公式,两个 pH 探针对应的传感方法标准曲线的斜率分别为 $K_{A_1} = 2$ 和 $K_{A_2} = 1$ 。分别计算两种方法的检出限,即可得到 $LOD_{A_1} = 0.67$, $LOD_{A_2} = 0.35$ 。如仅比较斜

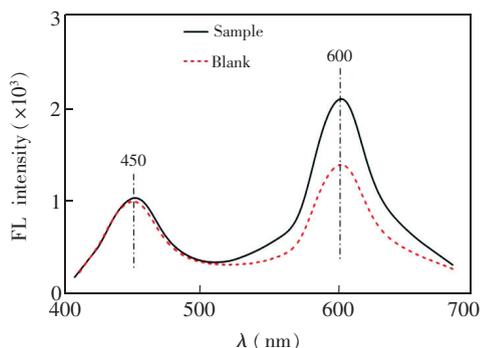


图 1 比率信号值均大于 1 探针的荧光光谱图
Fig. 1 Fluorescence spectra of probe with fluorescence intensity ratio > 1

表1 探针 A₁ 在不同 pH 值的模拟数据
Table 1 Simulation data of probe A₁ at different pH values

pH	I _{450 nm}			I _{600 nm}			I _{600 nm} /I _{450 nm}			平均 Average	标准偏差 SD
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
3	618	582	607	1174	1339	1093	1.9	2.3	1.8	2	0.2646
4	600	579	614	2580	2374	2210	4.3	4.1	3.6	4	0.3606
5	591	629	607	3664	3460	3824	6.2	5.5	6.3	6	0.4359
6	623	589	619	5171	4653	4828	8.3	7.9	7.8	8	0.2646
7	604	583	615	5980	5597	6458	9.9	9.6	10.5	10	0.4583
8	593	627	606	6938	7649	7333	11.7	12.2	12.1	12	0.2646
9	605	623	589	8168	8847	8423	13.5	14.2	14.3	14	0.4359
10	607	588	620	9773	9467	9796	16.1	16.1	15.8	16	0.1732

表2 探针 A₂ 在不同 pH 值的模拟数据
Table 2 Simulation data of probe A₂ at different pH values

pH	I _{450 nm}			I _{600 nm}			I _{600 nm} /I _{450 nm}			平均 Average	标准偏差 SD
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
3	837	795	806	1590	1670	1612	1.9	2.1	2.0	2	0.1000
4	798	769	813	2314	2461	2358	2.9	3.2	2.9	3	0.1732
5	792	779	825	3247	3116	3218	4.1	4	3.9	4	0.1000
6	783	803	829	4072	4095	3896	5.2	5.1	4.7	5	0.2646
7	790	788	830	4977	4728	4731	6.3	6	5.7	6	0.3000
8	768	796	813	5453	5731	5447	7.1	7.2	6.7	7	0.2646
9	817	796	769	6291	6527	6229	7.7	8.2	8.1	8	0.2646
10	800	835	813	7520	7348	7154	9.4	8.8	8.8	9	0.3464

率,探针 A₁ 的灵敏度高;如考虑标准偏差,探针 A₂ 的检出限更低。对比可知,即使同类型的探针,仅评价标准曲线的斜率 $K(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$,不能客观全面地反映方法的灵敏度。因此,计算方法检出限时,需要考虑偏差,即方法数据波动的情况。引入标准偏差的计算方式,得到的结果更能客观评价方法的灵敏度。

3.2 比率信号值均小于 1

由于荧光探针的类型不同,得到的数据形式也不同。如 Nareoja 等^[14]以 PEI 包覆的上转换纳米粒子为核心,连接 pH 敏感分子制备的比率型荧光探针用于传感 pH,同样是在近红外区激发,并在生物体

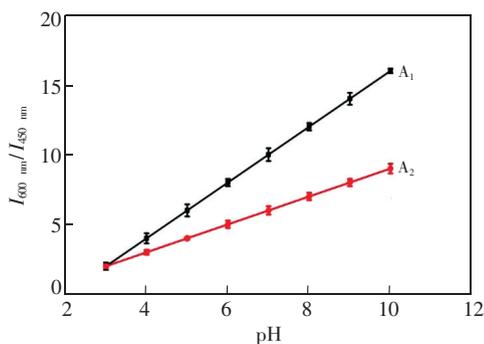


图2 pH 探针 A₁ 和 A₂ 的标准曲线
Fig. 2 Calibration curves of probe A₁ and probe A₂

表3 探针 A₁ 和 A₂ 标准偏差的模拟数据
Table 3 Standard deviation simulation data of probe A₁ and A₂

探针 Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均 Average	标准偏差 SD
A ₁	8.6	9.5	8.5	8.7	9.5	8.5	8.8	9.4	8.6	9.4	9.5	9.0	0.449
A ₂	5.3	5.4	5.6	5.4	5.5	5.7	5.4	5.5	5.6	5.5	5.6	5.5	0.118

内 pH 传感中域有较好的应用。这个研究工作中,选用的 ΔRatio 为 590 nm 处的荧光强度与 550 nm 处的荧光强度的比值 ($I_{590\text{ nm}}/I_{550\text{ nm}}$),文中探针的比率信号值均小于 1。本研究以真实探针荧光光谱图为基础,虚构了与它相同类型的模拟探针的荧光光谱图。如图 3 中荧光光谱所示,模拟探针在 450 nm 处的荧光强度不变,随 pH 值变化,600 nm 处的荧光强度逐渐增大,且均小于 450 nm 处的荧光强度,因此,比率信号值均小于 1。

以 $\text{Ratio}(I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}})$ 为纵坐标, pH 值为横坐标, 建立 pH 传感方法, 假设有两种不同灵敏度的探针 B_1 和 B_2 , 其在不同 pH 值处对应的 $\text{Ratio}(I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}})$ 数据见表 4 和表 5, 标准偏差测量结果见表 6。根据表 4 和表 5 数据可以得到探针 B_1 和 B_2 对应的标准线性方程分别为 $Y_{B_1} = 0.5X_{B_1} - 2.3$ 和 $Y_{B_2} = 0.625X_{B_2} - 3.005$, 对应斜率分别为 $K_{B_1} = 0.5$ 和 $K_{B_2} = 0.625$ (图 4)。

如仅用标准曲线的斜率 $K(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$ 衡量方法的灵敏度, 则第 II 种探针的斜率 $K(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$ 都小于 1, 而第 I 种探针的斜率 $K(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$ 都大于 1, 从数字上看, A 类 > B 类, 即第 II 种传感方法的灵敏度低于第 I 种传感方法。这个结果明显不正确, 因此, 在计算这种类型探针的检出限时, 需要对数据进行数学处理。

表 4 探针 B_1 在不同 pH 值时的模拟数据

Table 4 Simulation data of probe B_1 at different pH values

pH	$I_{450\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}}$			平均 Average	标准偏差 SD
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
5.0	9500	9135	9516	1900	1900	1827	0.200	0.208	0.192	0.2	0.0080
5.2	9241	9148	8731	2680	2653	2794	0.290	0.290	0.320	0.3	0.0173
5.4	9165	8690	8998	3501	3537	3698	0.382	0.407	0.411	0.4	0.0157
5.6	8474	8954	8612	4237	4298	4478	0.500	0.480	0.520	0.5	0.0200
5.8	8740	9219	9103	5349	5587	5298	0.612	0.606	0.582	0.6	0.0159
6.0	8947	8665	9071	6084	6187	6404	0.680	0.714	0.706	0.7	0.0178
6.2	8923	8638	9067	6987	6988	7326	0.783	0.809	0.808	0.8	0.0147
6.4	8960	8652	9042	7921	7865	8201	0.884	0.909	0.907	0.9	0.0139

表 5 探针 B_2 在不同 pH 值时的模拟数据

Table 5 Simulation data of probe B_2 at different pH values

pH	$I_{450\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}}$			平均 Average	标准偏差 SD
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
5.0	8984	9358	9174	1123	1123	1055	0.125	0.120	0.115	0.120	0.0050
5.2	8767	9344	9234	2279	2149	2170	0.260	0.230	0.235	0.245	0.0161
5.4	8977	8851	8456	3142	3098	3298	0.350	0.350	0.390	0.370	0.0231
5.6	8474	8954	8612	4406	4253	4134	0.520	0.475	0.480	0.495	0.0247
5.8	9145	9397	8931	5487	5826	5716	0.600	0.620	0.640	0.620	0.0200
6.0	8947	8665	9071	6844	6412	6622	0.765	0.740	0.730	0.745	0.0180
6.2	8811	8473	8849	7401	7465	7876	0.840	0.880	0.890	0.870	0.0265
6.4	9037	8652	8866	8856	8523	9043	0.980	0.985	1.02	0.995	0.0218

表 6 探针 B_1 和 B_2 标准偏差的模拟数据

Table 6 Standard deviation simulation data of probe B_1 and B_2

探针 Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均 Average	标准偏差 SD
B_1	0.54	0.54	0.56	0.56	0.54	0.56	0.54	0.55	0.54	0.53	0.58	0.55	0.0145
B_2	0.587	0.573	0.528	0.587	0.529	0.522	0.586	0.583	0.588	0.53	0.521	0.558	0.0307

当然, $\Delta\text{Ratio} < 1$ 的方法, 如果用数据的倒数 $1/\Delta\text{Ratio}$ 即 $I_{450\text{ nm}}/I_{600\text{ nm}}$ 直接拟合, $1/\Delta\text{Ratio} \sim \Delta\text{pH}$ 并非线性关系, 曲线斜率大于 1。因此, 一定程度上对检测范围两端的比率值 Ratio 取倒数后以两端为依据,

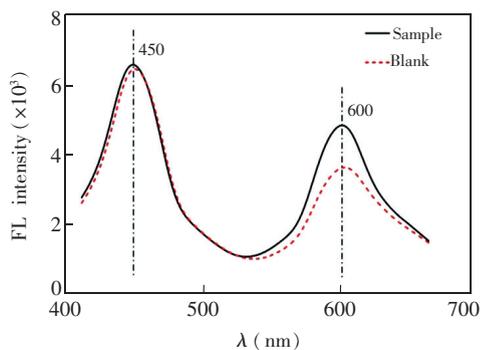


图 3 比率信号值均小于 1 的荧光光谱图

Fig. 3 Fluorescence spectra of probe with fluorescence intensity ratio < 1

计算线性斜率的方法衡量, 相对更接近两种类型探针灵敏度的真实情况, 即得到与第 I 种可以比较的灵敏度, $\Delta(1/\text{Ratio})/\Delta\text{pH}$ 。对应第 I 种探针中的 A_1 和 A_2 , 其用于 pH 传感的斜率分别为 $K_{A1} = 2$ 和 $K_{A2} = 1$, 经过处理后探针 B_1 、 B_2 数据如表 7 所示, 计

表 7 探针 B_1 和 B_2 在不同 pH 值的 $1/\text{Ratio}$ 数据列表
Table 7 $1/\text{Ratio}$ data of probe B_1 and probe B_2 at different pH values

pH	$I_{600\text{ nm}}/I_{400\text{ nm}}$		$1/(I_{600\text{ nm}}/I_{400\text{ nm}})$	
	B_1	B_2	B_1	B_2
5.0	0.2	0.120	5.00	8.33
5.2	0.3	0.245	3.33	4.08
5.4	0.4	0.370	2.50	2.70
5.6	0.5	0.495	2.00	2.02
5.8	0.6	0.620	1.67	1.61
6.0	0.7	0.745	1.43	1.34
6.2	0.8	0.870	1.25	1.15
6.4	0.9	0.995	1.11	1.01

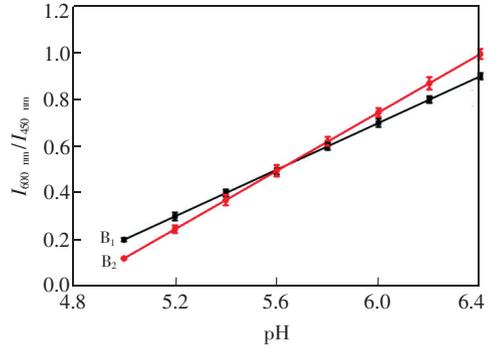


图 4 pH 探针 B_1 和 B_2 的标准曲线

Fig. 4 Calibration curves of probe B_1 and probe B_2

算可得第 II 种探针用于 pH 传感的斜率分别为 $K'_{B1} = 2.79$ 和 $K'_{B2} = 5.23$ 。这时, 若只比较标准曲线斜率, 则对应 4 个 pH 探针的灵敏度顺序为 $B_2 > B_1 > A_1 > A_2$; 若同样以线性范围中间点多次测量的标准偏差作为 σ , 由于对比率值 Ratio 进行了取倒数的处理, 则应选择分别取倒数后的数值进行标准偏差的计算, 即 $\sigma_{B1} = 0.0145$ 、 $\sigma_{B2} = 0.0307$, 计算得到对应的检出限为 $\text{LOD}_{B1} = 0.05$, $\text{LOD}_{B2} = 0.06$, 这时, 对应 4 个 pH 探针的检出限顺序为 $A_1 > A_2 > B_2 > B_1$ 。

因此, 对于 $\text{Ratio} < 1$ 的情况, 可以通过对检测范围两端的比率值 Ratio 取倒数后, 以两端为依据计算斜率的方法, 将标准曲线斜率表达成与第 I 种情况一致的形式, 即使这样, 单纯考虑标准曲线斜率的方法, 也不能全面反映方法的检出限大小, 采用综合考虑标准偏差 (即方法精度) 和标准曲线斜率的方式 ($3\sigma/K$) 可以比较客观地评价方法检出限。

3.3 比率信号值包含 1

相对于前文中讨论的比率信号值均大于 1 和均小于 1 的情况, 比率信号值包含 1 的情况更为复杂。Zhang 等^[28]以分子内电荷转移机制和荧光共振能量转移为原理, 合成了聚合物胶束比率型荧光探针, 用于体内内源性次氯酸根的传感。该研究工作选用的 Ratio 为 444 nm 与 551 nm 处荧光强度的比值 ($I_{444\text{ nm}}/I_{551\text{ nm}}$), 探针的比率信号值均包含 1。本研究以真实探针荧光光谱图为基础, 以模拟探针的自身特点为依据, 通过修改真实探针的数据得到模拟探针的荧光光谱示意图 (图 5), 模拟探针在 450 nm 处的荧光强度不变, 随 pH 值变化, 600 nm 处的荧光强度逐渐增大, 且从小于 450 nm 处的荧光强度到大于 450 nm 处的荧光强度, 因此, 比率信号值包含 1。

以 $\text{Ratio}(I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}})$ 为纵坐标, pH 值为横坐标, 建立 pH 传感方法, 假设有两种不同灵敏度的探针 C_1 和 C_2 , 其在不同 pH 值处对应的 $\text{Ratio}(I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}})$ 数据见表 8 和表 9, 标准偏差测量结果见表 10。根据表 8 和表 9 数据可以得到两种探针对应的标准线性方程分别为 $Y_{C1} = 0.5X_{C1} - 3.05$ 和 $Y_{C2} = 2X_{C2} - 13.6$, 其对应斜率分别为 $K_{C1} = 0.5$ 和 $K_{C2} = 2$ (图 6)。

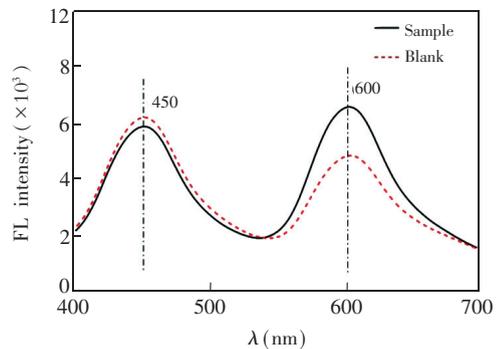


图 5 比率信号值包含 1 的荧光光谱图

Fig. 5 Fluorescence spectra of probe with fluorescence intensity ratio including 1

若仅用标准曲线斜率 $K(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$ 衡量方法灵敏度, 第 III 种探针的斜率 $K(\Delta\text{Ratio}/\Delta\text{pH})$ 有大于 1 和小于 1 的情况, 如比较 K , 那么 $C_2 > C_1$ 。因此, 在前面讨论的基础上, 可将数据进行处理, 再计算此类型探针的检出限。

表 8 探针 C₁ 在不同 pH 值的模拟数据Table 8 Simulation data of probe C₁ at different pH values

pH	$I_{450\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}}$			平均 Average	标准偏差 SD
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
7.0	5210	5031	4983	2292	2163	2392	0.44	0.43	0.48	0.45	0.0265
7.2	5203	4898	5103	2758	2743	2858	0.53	0.56	0.56	0.55	0.0173
7.4	5100	4897	5138	3213	3232	3391	0.63	0.66	0.66	0.65	0.0173
7.6	5109	4871	5031	3832	3605	3824	0.75	0.74	0.76	0.75	0.0100
7.8	5072	4873	5100	4159	4191	4437	0.82	0.86	0.87	0.85	0.0265
8.0	5210	4897	5054	4845	4652	4902	0.93	0.95	0.97	0.95	0.0200
8.2	4988	5231	5231	5287	5597	5336	1.06	1.07	1.02	1.05	0.0265
8.4	5098	5231	5001	5863	5859	5901	1.15	1.12	1.18	1.15	0.0300

表 9 探针 C₂ 在不同 pH 值的模拟数据Table 9 Simulation data of probe C₂ at different pH values

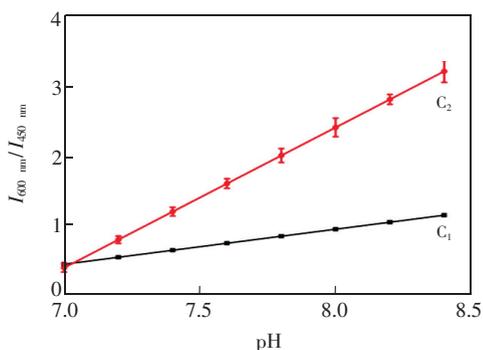
pH	$I_{450\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}$			$I_{600\text{ nm}}/I_{450\text{ nm}}$			平均 Average	标准偏差 SD
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
7.0	2988	3021	2856	1106	1088	1342	0.37	0.36	0.47	0.4	0.0608
7.2	3032	2994	2896	2335	2305	2491	0.77	0.77	0.86	0.8	0.0520
7.4	3046	2877	2988	3442	3596	3645	1.13	1.25	1.22	1.2	0.0625
7.6	2937	3025	2843	4464	4961	4663	1.52	1.64	1.64	1.6	0.0693
7.8	3004	2933	2809	5708	5866	5899	1.9	2	2.1	2	0.1000
8.0	3042	2956	2897	6997	6947	7387	2.3	2.35	2.55	2.4	0.1323
8.2	2904	2876	3019	7986	8283	8363	2.75	2.88	2.77	2.8	0.0700
8.4	2986	3012	2888	9257	9397	9761	3.1	3.12	3.38	3.2	0.1562

表 10 探针 C₁ 和 C₂ 标准偏差的模拟数据Table 10 Standard deviation simulation data of probe C₁ and C₂

探针 Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均 Average	标准偏差 SD
C ₁	0.8	0.81	0.8	0.78	0.8	0.8	0.81	0.79	0.79	0.81	0.81	0.8	0.0148
C ₂	1.71	1.85	1.87	1.75	1.71	1.85	1.88	1.76	1.71	1.85	1.86	1.8	0.0713

本研究采用部分代表整体的方法得到与第 I 种探针比较的灵敏度,即当 Ratio>1 的部分所占检测范围的比例超过 50% 时,则选用第 I 种探针的计算方法,将 Ratio>1 的部分看作整体计算斜率,而当 Ratio<1 的部分所占检测范围的比例超过 50% 时,则选用第 II 种探针的计算方法,将 Ratio<1 的部分看作整体计算斜率。对应第 I 种探针中的 A₁ 和 A₂,其用于 pH 传感的斜率分别为 $K_{A1}=2$ 和 $K_{A2}=1$; 对应第 II 种探针中的 B₁ 和 B₂,经处理后,其用于 pH 传感的斜率分别为 $K'_{B1}=2.79$ 和 $K'_{B2}=5.23$; 经处理后的第 III 种探针用于 pH 传感的斜率分别为 $K'_{C1}=1.11$ 和 $K'_{C2}=2$ 。此时,若仅比较标准曲线斜率,则对应 6 个

pH 探针的灵敏度顺序为 $B_2>B_1>A_1=C_2>C_1>A_2$; 若同样以线性范围中间点多次测量的标准偏差作为 σ , 由于计算斜率时对数据进行了处理,在计算标准偏差时应选择与斜率相同的计算方法,即当 Ratio>1 所占比例多时,可直接使用数据列表中的标准偏差; 当 Ratio<1 所占比例多时,选择分别取倒数后的数值计算标准偏差,计算得到对应的检出限为 $LOD_{C1}=0.04$ 、 $LOD_{C2}=0.12$, 对应 6 个 pH 探针的检出限顺序为 $A_1>A_2>C_2>B_2>B_1>C_1$ 。

图 6 pH 探针 C₁ 和 C₂ 的标准曲线Fig. 6 Calibration curves of probe C₁ and probe C₂

因此,对于 Ratio 包含 1 的情况,可以通过部分代表整体的方式将标准曲线斜率表达成与第 I 种探针一致的形式,即使这样,单纯考虑标准曲线斜率的方法也不能全面反映方法的检出限,用综合考虑标准偏差(即方法精度)和标准曲线斜率($3\sigma/K$)的方式可以较客观地评价方法检出限。

4 结论

本研究针对 pH 比率型荧光探针检出限的计算提出了一个数学模型,此模型可以横向比较不同种类的 pH 比率型荧光探针。以光谱法的检出限计算公式为基础,对其中的量值进行替代,可得到 pH 比率型荧光探针的检出限计算模型。空白样品的标准偏差可直接由检测范围的中间值的标准偏差替代,而标准曲线的斜率则需根据探针的类型经不同数学处理后再进行替代。根据探针的种类,标准曲线的斜率处理方式分为 3 种:第 I 种,即 Ratio>1 时,标准曲线的斜率可直接替代;第 II 种,即 Ratio<1 时,通过对检测范围两端的 Ratio 值取倒数后,以两端为依据计算斜率后再替代;第 III 种,即 Ratio 包含 1 时,通过部分代表整体的方法计算出斜率后再替代。通过对 3 种不同类型的 pH 比率型荧光探针模拟数据的计算讨论,表明此计算模型是合理的,适用于 pH 比率型荧光探针。事实上,pH 值反映了溶液中 H⁺ 的浓度,因此以 H⁺ 浓度或最小能够响应的 pH 单位作为检出限的表达更为合理,本研究仅针对目前 pH 传感时检出限表达不一致的情况,提出了一种相对合理的统一方法,更加科学合理地表达 pH 检出限仍需进一步的研究讨论。

References

- 1 Zaibudeen A W, Philip J. *Sens. Actuators B*, **2018**, 268: 338–349
- 2 Casey J R, Grinstein S, Orlowski J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, 11(1): 50–61
- 3 Li H Y, Wei Y L, Dong X Y, Zang S Q, Mak T C W. *Chem. Mater.*, **2015**, 27(4): 1327–1331
- 4 Hou J R, Jin D, Chen B, Si L L, Jin Y H, Chen L G, Yan X L, Wang B W, Li Y. *Chinese Chem. Lett.*, **2017**, 28(8): 1681–1687
- 5 Lin W, Long L, Chen B, Tan W. *Chemistry*, **2009**, 15(10): 2305–2309
- 6 Rong M, Lin L, Song X, Zhao T, Zhong Y, Yan J, Wang Y, Chen X. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(2): 1288–1296
- 7 Lu W, Qin X, Liu S, Chang G, Zhang Y, Luo Y, Asiri A M, Al-Youbi A O, Sun X. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(12): 5351–5357
- 8 Zhang Z, Wu Y, He S, Xu Y, Li G, Ye B. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1014: 85–90
- 9 Li H, Zhao Y, Chen Z, Xu D. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 87: 428–432
- 10 Xu Y, Niu X, Zhang H, Xu L, Zhao S, Chen H, Chen X. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63(6): 1747–1755
- 11 Chen H, Tang Y, Ren M, Lin W. *Chem. Sci.*, **2016**, 7(3): 1896–1903
- 12 Yin C, Zhen X, Fan Q, Huang W, Pu K. *ACS Nano*, **2017**, 11(4): 4174–4182
- 13 Lippert A R, New E J, Chang C J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(26): 10078–10080
- 14 Nareoja T, Deguchi T, Christ S, Peltomaa R, Prabhakar N, Fazeli E, Perala N, Rosenholm J M, Arppe R, Soukka T, Schaferling M. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(3): 1501–1508
- 15 Li G, Fu H, Chen X, Gong P, Chen G, Xia L, Wang H, You J, Wu Y. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(5): 2720–2726
- 16 Liu R, Zhang L, Chen Y, Huang Z, Huang Y, Zhao S. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(7): 4452–4460
- 17 Pak Y L, Park S J, Xu Q, Kim H M, Yoon J. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(15): 9510–9514
- 18 Lee M H, Kim J S, Sessler J L. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(13): 4185–4191
- 19 Huang X, Song J, Yung B C, Huang X, Xiong Y, Chen X. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, 47(8): 2873–2920
- 20 Yang Q, Ye Z, Zhong M, Chen B, Chen J, Zeng R, Wei L, Li H W, Xiao L. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8(15): 9629–9634
- 21 Liu X, Zhang S Q, Wei X, Yang T, Chen M L, Wang J H. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 109: 150–155
- 22 Cao X, Lin W, Yu Q. *J. Org. Chem.*, **2011**, 76(18): 7423–7430
- 23 Ahn H, Hong J, Kim S Y, Choi I, Park M J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7(1): 704–712
- 24 Pratiwi F W, Hsia C H, Kuo C W, Yang S M, Hwu Y K, Chen P. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 84: 133–140

- 25 Yang X F, Qi H, Wang L, Su Z, Wang G. *Talanta*, **2009**, 80(1): 92–97
- 26 Chang C, Wang F, Qiang J, Zhang Z, Chen Y, Zhang W, Wang Y, Chen X. *Sens. Actuators B*, **2017**, 243: 22–28
- 27 Gong Y J, Zhang X B, Zhang C C, Luo A L, Fu T, Tan W, Shen G L, Yu R Q. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(24): 10777–10784
- 28 Zhang P, Wang H, Hong Y, Yu M, Zeng R, Long Y, Chen J. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 99: 318–324

Discussion on Definition of Detection Limit for Ratio Fluorescence pH Sensing Methods

WEN Hui, LIU Xun, ZHANG Shang-Qing, YANG Ting, CHEN Ming-Li*, WANG Jian-Hua*
(College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, China)

Abstract The detection limit is an important parameter for evaluating the sensitivity of an analytical method. Compared with normally fluorescence probes, the calculation of detection limit of ratio fluorescence probes is more complicated. When the ratio fluorescence probe is used for pH detection, there is no universal definition of detection limit. The ratio fluorescence probes are classified into three categories based on the data types. A simulating probe with an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 600 nm/450 nm is fabricated. Based on the calculation of detection limit for spectral method, a reasonable process is proposed for definition of detection limit for ratio fluorescence probe, which paves the way for comparing the sensitivity of different kinds of pH ratio fluorescence probes.

Keywords Ratio fluorescent probe; pH sensing; Sensitivity; Simulation data

(Received 8 December 2018; accepted 16 January 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21675019, 21727881).