

基于双分子识别荧光猝灭法高选择性测定多巴胺

颜梅 葛慎光 卢娟娟 于京华*

(山东省氟材料重点实验室, 济南大学化学化工学院, 济南 250022)

摘 要 制备了以二巯基琥珀酰亚胺丙酸酯, 4-巯基苯硼酸功能化 CdTe 量子点探针, 对其进行了 X-射线光电子能谱和透射电镜表征。在 431 nm 激发波长下, 对探针及加入多巴胺后进行发射光谱扫描, 最大发射峰红移, 在最大发射波长处, 多巴胺对合成的探针具有猝灭效应, 且多巴胺对体系的猝灭程度与多巴胺的量呈良好的线性关系, 据此建立了一种直接、灵敏、选择性好的测定多巴胺的方法。在最佳条件下, 多巴胺的其线性范围为 0.02~ 20.0 mmol/L, 线性回归方程为 $\Delta F = 20.1 + 31.7C(\text{mmol/L})$, 相关系数为 $R^2 = 0.987$, 检出限为 4.9 nmol/L。本方法已成功用于多巴胺注射液、血清及尿样中多巴胺的测定, 结果满意。

关键词 双分子识别; 荧光猝灭法; CdTe; 量子点; 多巴胺

1 引言

多巴胺(DA)是一种重要的神经信息传递物质, 脑内多巴胺的释放和吸收与精神分裂症和帕金森氏症密切相关^[1]。因此, 建立快速、灵敏、高选择、可靠的多巴胺分析方法对于神经生理学研究、疾病诊断及相关药物的质量控制均有重要意义。目前, 测定多巴胺的方法有电化学法^[2~4]、色谱法^[5,6]和光谱法^[7,8], 这些方法中虽然有的灵敏度较佳、选择性较好和操作较简易, 但是仍然不能满足目前要求高选择、高灵敏和快速的检测方式, 限制了其使用范围, 对于多巴胺的检测仍是一种挑战。

量子点是一种发光纳米颗粒, 与传统的有机荧光染料相比, 量子点具有荧光量子产率高、光化学稳定性好等优良特性, 是一种很有发展潜力的荧光探针。近年来, 量子点广泛应用于生物成像^[9]、生物标记^[10]。同时, 基于量子点的荧光增强或猝灭效应, 量子点还应用于重金属离子的检测^[11]和药物含量的测定^[12]。

本研究采用二巯基琥珀酰亚胺丙酸酯(DSP), 4-巯基苯硼酸(MBA)中的巯基与 CdTe 量子点相结合, DSP 与 MBA 对 CdTe 进行功能化(MBA-DSP-CdTe QDs), 不仅能起到稳定 CdTe 的作用, 同时它们能与多巴胺作用, 具有双分子识别多巴胺的作用, 多巴胺引起功能化探针聚合, 使得探针荧光发生猝灭。双分子识别荧光猝灭法将双分子识别的选择性^[13,14]和荧光猝灭法的高灵敏度^[15,16]结合, 抗坏血酸与尿酸无需分离, 对测定结果无影响。本方法采用量子点为发光源, 多巴胺导致量子点聚集, 引起量子点荧光猝灭, 可直接测定多巴胺, 据此建立了一种测定多巴胺的新方法。

2 实验方法

2.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光光度计(日本岛津公司); pH S-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏金坛医疗器械厂); JEM-1230 透射电子显微镜(日本); PHI-5000C ESCA X-射线光电子能谱分析仪(美国 PHI 公司)。

CdCl₂ · 2.5H₂O (AR, 上海化学试剂公司); 碲粉, 二巯基琥珀酰亚胺丙酸酯(DSP)、4-巯基苯硼酸(MBA) (AR, 中国医药化学试剂公司); 硼氢化钠(AR, 天津环威精细化工有限公司); PBS 缓冲溶液: 分别准确称取 17.91 g Na₂HPO₄ · 12H₂O 和 7.80 g NaH₂PO₄ · 2H₂O 溶于水中, 定容至 100 mL, 调整两种溶液的混合比, 可得到不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液; 所有试剂纯度至少为分析纯, 实验用水为二次去离子水。

2011-04-09 收稿; 2011-05-12 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 21175058, 51003039), 山东省自然科学基金(No. ZR2011BQ019), 山东省科技发展计划(Nos. 2011GGB01153, 2009GG20003022)资助

* E-mail: chm_gesg@ujn.edu.cn

2.2 MBA-DSP-CdTe QDs 的制备

将 0.0694 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 100 mL 超纯水中, 磁力搅拌除氧 30 min 后加入 20 mL 1 mmol/L MBA 与 10 mL 1 mmol/L DSP, 磁力搅拌 30 min, 用 1 mol/L NaOH 溶液调节至 pH 9.0, 然后加入 50 mL 超纯水。在 NaHTe 溶液加入过量 50 mmol/L H_2SO_4 , 将产生 H_2Te 气体; 在磁力搅拌下, 通入 Cd^{2+} 溶液, 加热回流 1~7 h, 得到 MBA-DSP-CdTe QDs 探针。

2.3 实验方法

多巴胺的羟基和氨基分别与功能化量子点探针表面的 MBA 和 DSP 的结合, 导致探针聚集(图 1), 引起荧光猝灭, 取不同量多巴胺, 依次加入 0.4 mL MBA-DSP-CdTe QDs, 1.5 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液于 10 mL 比色管中, 稀释至刻度; 室温下放置 10 min, 于激发波长 431 nm 下进行荧光测定。在最大发射波长下测定探针(F_0)和不同浓度多巴胺与探针结合后的荧光强度(F_1), 并计算荧光强度值 $\Delta F = F_0 - F_1$ 。

2.4 样品处理

2.4.1 多巴胺注射液处理 取盐酸多巴胺注射液 (32.68×10^3 mmol/L) 10 支, 将药液混合均匀后准确移取 1 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。准确移取上述溶液 1 mL 于 10 mL 比色管中, 加入 0.4 mL MBA-DSP-CdTe QDs, 用 pH 7.4 PBS 缓冲液稀释至刻度, 摇匀后, 待测。

2.4.2 血清处理 采用本方法直接测定血清样品, 测定结果偏差稍大; 将血清进行处理后, 测定结果理想。血清处理方法: 吸取血清 1.0 mL, 加酸性正丁醇 4.0 mL, 超声波处理 3 min, 2000 r/min 离心 5 min, 准确取上清液 3.0 mL, 加入正己烷 3.0 mL 和 0.1 mol/L HCl 0.5 mL 于带塞离心管中, 超声 3 min 后, 以 3000 r/min 离心 5 min, 多巴胺被萃取到下层水相中, 同时作试剂空白试验。

2.4.3 尿液处理 尿样无需分离, 可直接进行测定。取 1.0 mL 正常人尿样, 加入 5.0 mL pH 7.0 PBS, 稀释至 10.0 mL, 按实验方法进行测定。

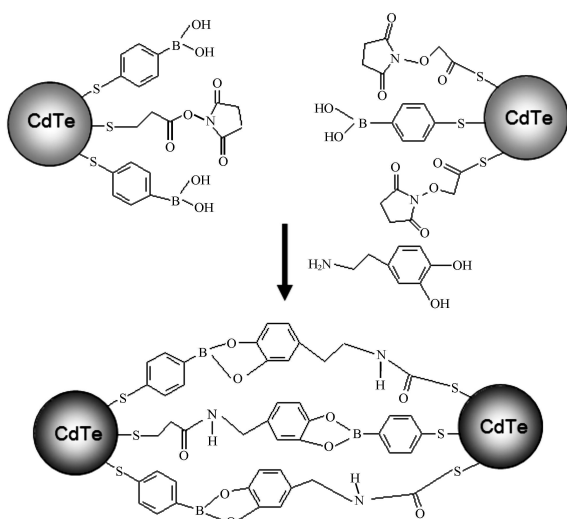


图 1 多巴胺与 MBA-DSP-CdTe QDs 探针相互作用

Fig. 1 Interaction of dopamine (DA) and 4-mercaptophenylboronic acid dithiobis succinimide propionate CdTe

quantum dots (MBA-DSP-CdTe QDs) probe

3 结果与讨论

3.1 MBA-DSP-CdTe QDs 探针的 X 射线光电子能谱和透射电镜

对于 MBA-DSP-CdTe QDs 探针的 X 射线光电子能谱见图 2。约在 163.9 eV 出现 S_{2p} 峰, 在 400.9 eV 处出现了 N_{1s} 峰, 在 191.3 eV 附近有 B_{1s} 峰。结果表明, MBA 和 DSP 成功连接到 CdTe 量子点。

采用透射电镜表征制备的 MBA-DSP-CdTe QDs 探针及加入多巴胺后的探针(图 3), 制备的探针呈球形, 颗粒均匀, 且呈现良好的分散性, 粒径约为 2.9 nm; 当向探针中加入多巴胺, 多巴胺引起探针的聚集, 形成的颗粒越来越大, 且形状不规则。

3.2 荧光光谱

合成的 MBA-DSP-CdTe QDs 探针具有光学性质稳定、发射光谱宽而且连续, 同时还具有很宽的荧光激发波长范围, 其发射峰形近似对称, 半峰宽约 60 nm; 与多巴胺结合后, MBA-DSP-CdTe QDs 探针(542 nm)到 MBA-DSP-CdTe QDs 探针的发射波长逐渐红移, 且荧光强度逐渐被猝灭(图 4)。

3.3 pH 值的影响

在邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠、醋酸-醋酸钠、磷酸氢二钠-柠檬酸、PBS 缓冲介质中进行测定。结果表明, PBS 缓冲溶液最适宜。探针荧光强度变化的适宜酸度范围为 pH 5.5~8.0。pH=7.4 时, 荧光强度高且与生物体液中酸度基本一致, 适宜用量为 1.2~1.8 mL。因此在后续实验中选择 1.5 mL pH

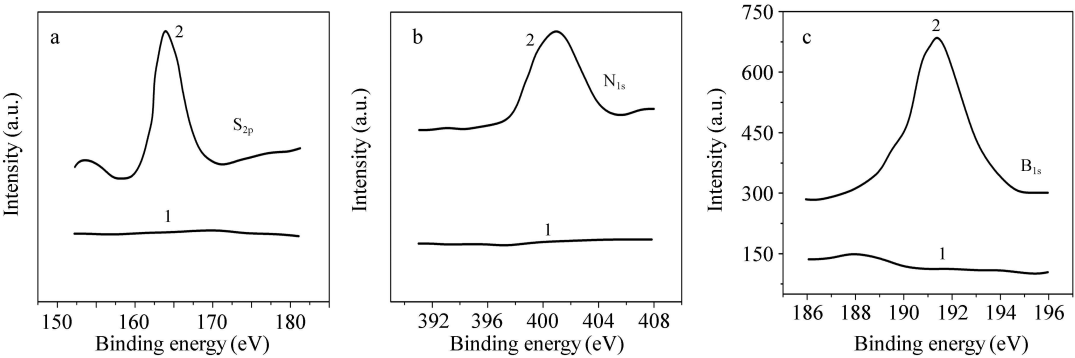


图 2 X-射线光电子能谱

Fig. 2 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra

1: CdTe; 2: MBA-DSP-CdTe QDs

7.4 的 PBS 缓冲溶液维持体系酸度。

3.4 MBA-DSP-CdTe QDs 用量的影响

MBA-DSP- CdTe QDs 作为荧光探针,其用量对荧光强度有很大影响,浓度过低,其荧光信号低,但浓度过高则会导致噪音急剧增大,信号值不稳定,灵敏度降低,所以需选择合适的 MBA-DSP-CdTe QDs 用量。实验发现,随着 MBA-DSP- CdTe QDs 用量的增大,体系的化学发光强度相应增高,当 MBA-DSP- CdTe QDs 溶液用量为 0.4 mL 时,荧光猝灭值最大,且多巴胺对发光强度的抑制效应最大。

3.5 稳定性和重现性

为了考察探针的使用寿命,将制备好的探针在 4℃冰箱中存放,利用该探针分别在 7, 30, 60 和 120 d 进行对多巴胺进行测定,测定结果的相对偏差分别为 3.8%, 4.1%, 3.5% 和 5.2%,结果表明该探针至少在 120 d 内,能够使用,且测定结果良好。为了研究制备的探针的重现性,对该探针分别用于 4 种浓度(0.5, 1.0, 5.0 和 10.0 mmol/L)多巴胺的测定,每个浓度测定 5 次,本方法检测多巴胺的相对标准偏差分别为 4.7%, 3.9%, 6.1% 和 5.2%; 分别采用不同批次制备的 4 个探针 对同一浓度的多巴胺(10.0 mmol/L)进行了测定,测定结果的相对标准偏差分别为 2.9%, 3.1%, 5.3% 和 2.7%,说明制备的探针具有很好的重现性。

3.6 干扰离子的影响

生物体液样本中 DA 可能与抗坏血酸(AA)或尿酸(UA)共存。实验表明,以 1 mmol/L DA 为研究对象,100 倍的 AA 和 UA 对 DA 测定的无明显干扰;20 倍的肾上腺素、去肾上腺素、葡萄糖和二羟基苯乙酸,50 倍的腺苷和 D-色氨酸对 DA 测定结果无影响。实验考察了 DA 制剂中其它可能共存物质的干扰,500 倍的尿酸、Al³⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、K⁺、SO₄²⁻ 和 Cl⁻ 对测定无影响;100 倍量 NaHSO₃ 无干扰;牛血清白蛋白、人血清白蛋白和卵清白蛋白也均无干扰。通过双分子识别反应大大提高了方法的选择性,只有通过多巴胺能够引起功能化量子点探针的聚集,导致其荧光猝灭,对于共存物质未能引起量子点探针的荧光猝灭与其它方法相比^[8,17],本方法可以直接、无需复杂样

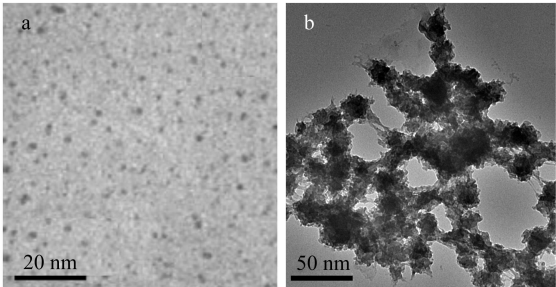


图 3 MBA-DSP-CdTe QDs 探针(a)及加入多巴胺后(b)的透射电镜

Fig. 3 TEM of MBA-DSP-CdTe QDs probe (a) and MBA-DSP-CdTe QDs + DA (b)

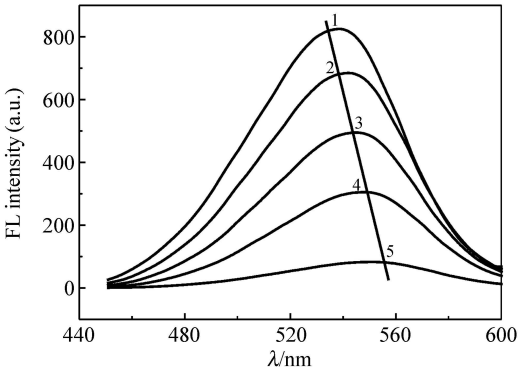


图 4 发射光谱 MBA-DSP-CdTe QDs (1) 和 MBA-DSP-CdTe QDs + DA(2~5) 4.0, 10.0, 15.0, 20.0 mmol/L

Fig. 4 Emission spectra MBA-DSP-CdTe QDs (1) and MBA-DSP-CdTe QDs + DA(2~5) 4.0, 10.0, 15.0, 20.0 mmol/L

品处理即可用于多巴胺的测定。

3.7 分析性能

将不同量的多巴胺加入到 MBA-DSP-CdTe QDs 探针中,在最佳条件下进行测定,激发波长 431 nm 时,随着多巴胺的加入,荧光发射峰逐渐红移,荧光发生猝灭;在最大发射峰位置,其荧光猝灭强度与多巴胺浓度在 0.02~ 20.0 nmol/L 内呈良好线性关系,线性回归方程 $\Delta F = 20.1 + 31.7C$ (nmol/L),相关系数 $R^2 = 0.987$ 。按照实验方法,5.0 nmol/L 多巴胺的标准偏差为 5.25($n = 11$);根据 IUPAC 规定,计算得到的检出限为 0.0049 nmol/L。

3.8 样品分析

取盐酸多巴胺注射液经处理后,按照实验方法测定,进行标准加入回收法实验,并与药典方法对照,测定结果见表 1。

表 1 多巴胺注射液的测定结果
Table 1 Determination results of DA injection

样品 Samples	测定值 Found (mmol/L)	相对标准偏差 RSD (%, $n = 6$)	加入量 Added (mmol/L)	回收量 Recovered (mmol/L)	回收率 Recovery (%, $n = 6$)	药典方法测定值 Pharmacopoeia (mmol/L)
1	31.44	4.37	19.61	18.17	92.7	30.26
2	33.14	3.59	19.61	21.24	108.3	31.50
3	31.18	5.68	19.61	20.46	104.3	32.75

采用本方法直接测定血清样品,测定结果偏差稍大。将血清进行处理后,测定结果见表 2。尿样适量稀释后测定,结果见表 2。

取 2 份血清(1[#] 和 2[#])和尿样各 1 mL,各加入 0.1 mL 浓度分别为 19.61, 32.68 和 65.36 nmol/L 的多巴胺标准液,混匀后按多巴胺测定方法操作,作回收率实验,测定结果见表 2。

表 2 血清和尿样的测定结果
Table 2 Determination results of serous and urine

样品 Samples	测定值 Found (mmol/L)	相对标准偏差 RSD (%, $n = 6$)	加入量 Added (mmol/L)	回收量 Recovered (mmol/L)	回收率 Recovery (%)
血清 Serous 1	1.18	5.01	19.61	2.03	103.6
血清 Serous 2	1.76	2.73	32.68	3.18	97.4
尿样 Urine	0.07	6.18	65.36	6.82	104.4

实验表明,本方法用于注射液、血清和尿样中多巴胺的测定,相对标准偏差小于 6.18%,回收率在 97.4%~ 104.4%之间,说明本方法具有良好的精密度和准确度。

References

1 Roitman M F, Stuber G D, Phillips P E M, Wightman R M, Carelli R M. *J. Neuroscience*, **2004**, 24: 1265~ 1271
2 WANG Chun-Yan, TANG Xiao-Feng, TIAN Jian, YOU Tian-Yan(王春燕,唐小凤,田间,由天艳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(12): 1800~ 1804
3 YAO Hong, SUN Yuan-Yuan, LIN Xin-Hua, HUANG Li-Ying, LI Guang-Wen(姚宏,孙媛媛,林新华,黄丽英,李光文). *Journal of Analytical Science*(分析科学学报), **2007**, 23(6): 673~ 676
4 LI Wei-Juan, LUO Shi-Zhong(李卫娟,罗世忠). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2009**, 28(11): 1287~ 1290
5 Abdolkarim A, Ali G. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(9): 3660~ 3664
6 Chen C P, Jong H H. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(18): 7182~ 7186
7 LI Li-Jun, ZHONG Zhao-Heng, FENG Jun, CHEN Qi-Feng, CHENG Hao, HUANG Wen-Yi, KONG Hong-Xing, WU Jian-Ling(李利军,钟招亨,冯军,陈其锋,程昊,黄文艺,孔红星,吴健玲). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2007**, 26(1): 125~ 127

- 8 WANG Yan, LONG Yun-Fei, HUANG Cheng-Zhi, LI Yuan-Fang(王 颢, 龙云飞, 黄承志, 李原芳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(12): 1741~ 1744
- 9 Betty Y S K, Wen J, John O, Christopher M Y, James T R, Warren C W C, *Nano Lett.*, **2008**, 8(11): 3887~ 3892
- 10 Dan Z, Chan W H, He Z, Ting Q, *Anal. Chem.*, **2009**, 81: 3537~ 3543
- 11 Wang C, Zhao J W, Yan W, Nan L, Qiang M, Su X G. *Sensors and Actuators B*, **2009**, 139: 476~ 482
- 12 Qu F G, Zhou X F, Xu J, Li H B, Xie G Y, *Talanta*, **2009**, 78: 1359~ 1363
- 13 MA Ceng-Yan, LI Jiang-Yuan, XIANG Wei(马曾燕, 李将渊, 向 伟). *Chinese J. Appl. Chem.* (应用化学), **2009**, 26(2): 224~ 228
- 14 SU N Deng-Ming, CHEN Gao-Li, MA Wei(孙登明, 陈高礼, 马 伟). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(7): 999~ 1003
- 15 SU N Deng-Ming, TIAN Xiang-Xing, MA Wei(孙登明, 田相星, 马 伟). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(12): 1742~ 1746
- 16 HE Xia-Ying, JIANG Xiao-Li, LI Rong, ZHANG Yan(何晓英, 蒋晓丽, 李 容, 张 艳). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报): **2009**, 28(7): 819~ 823
- 17 CHEN Zh-Bing, CHEN Yu, XU Ji-Gui, ZHANG Jun-Jun, ZHANG Li(陈志兵, 陈 玉, 徐基贵, 张俊俊, 张 莉). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析实验室): **2010**, 29(12): 5~ 7

Fluorescence Quenching Method for Determination of Dopamine Based on Double Molecular Recognition

YAN Mei, GE Shen-Guang, LU Juan-Juan, YU Jing-Hua*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Fluorine Chemistry and Chemical Materials,
School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022)

Abstract CdTe quantum dots probe with both 4-mercaptophenylboronic acid and dithiobis(succinimidylpropionate) was designed and functionalized, and characterized by XPS and TEM. Emission spectra of CdTe quantum dots probe and dopamine was scanned under 431 nm excitation wavelength. The maximum emission wavelength shift red. At the maximum emission wavelength, dopamine results in fluorescence quenching of the probe. A direct, selective, and sensitive strategy for the determination of dopamine was established. The effects of determination conditions were investigated. Under the optimal conditions, a good linearity ($R^2 = 0.987$) was obtained between fluorescence intensity and dopamine concentration in the range of 0.02– 20.0 nmol/L. The linear regression equation was $\Delta F = 20.1 + 31.7C$ (nmol/L). The limit of detection was 0.0049 nmol/L. The method has been successfully applied to determine dopamine in injection, serum and urine with satisfactory result.

Keywords Double molecular recognition; Fluorescence quenching method; Cadmium telluride; Quantum dots; Dopamine

(Received 9 April 2011; accepted 12 May 2011)