

## 碳点荧光探针的制备及其检测金银花中绿原酸含量的研究

李晚谊<sup>1</sup>, 李宏<sup>2</sup>, 李秋兰<sup>3</sup>, 杨德志<sup>3</sup>, 杨亚玲<sup>3\*</sup>

1. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 云南 昆明 650205

2. 云南省农业科学院 农产品加工研究所, 云南 昆明 650033

3. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

**摘要:** 目的 以氯、氮掺杂碳点 (Cl/N-CDs) 为荧光探针, 基于 Cl/N-CDs 和绿原酸之间的内滤效应, 猝灭 Cl/N-CDs 的荧光, 建立了绿原酸荧光检测新方法。方法 以氯化胆碱与尿素形成的低共熔溶剂及柠檬酸为原料, 通过一步水热法完成碳点制备, 并通过透射电子显微镜, 紫外-可见分光光度法, 红外光谱, X 射线衍射, X 射线光电子能谱和荧光对其光学性能、形貌及相关基团进行表征。结果 绿原酸在 0.47~62.70  $\mu\text{g/mL}$  对 Cl/N-CDs 的荧光猝灭呈良好的线性关系, 用于金银花提取液中绿原酸的检测, 其检出限可达到 36  $\text{ng/mL}$ 。在绿原酸不同提取方法中, 以氯化胆碱/尿素低共熔溶剂作为提取剂时对金银花中绿原酸的提取效率最高。结论 以低共熔溶剂作为碳点制备原料和绿原酸提取溶剂, 可实现绿原酸的提取和检测的双重作用, 为金银花的质量评价提供新的研究思路。

**关键词:** 绿原酸; 金银花; 氯、氮掺杂碳点; 荧光探针; 低共熔溶剂

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1402-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.015

## Preparation of carbon dot fluorescent probes and study on determination of chlorogenic acid in *Lonicerae Japonicae Flos*

LI Wan-yi<sup>1</sup>, LI Hong<sup>2</sup>, LI Qiu-lan<sup>3</sup>, YANG De-zhi<sup>3</sup>, YANG Ya-ling<sup>3</sup>

1. Research Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

2. Research Institute of Product Processing, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650033, China

3. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Technology, Kunming 650500, China

**Abstract: Objective** In this study, chlorine and nitrogen doped carbon dots (Cl/N-CDs) were used as fluorescent probes. Based on the internal filtration effect between Cl/N-CDs and chlorogenic acid to quench Cl/N-fluorescence of CDs, a new method for fluorescence detection of chlorogenic acid has been established. **Methods** The Cl/N-CDs was synthesized by one-step hydrothermal method using the eutectic solvent formed by choline chloride/urea and citric acid as raw materials. The optical properties, morphology and related groups of Cl/N-CDs were characterized by TEM, UV-vis, FT-IR, XRD and XPS. **Results** In the range of 0.47—62.70  $\mu\text{g/mL}$ , the fluorescence quenching of Cl/N-CDs by chlorogenic acid showed a good linear relationship, and the detection limit of chlorogenic acid in the extract could reach 36  $\text{ng/mL}$ . Among the different chlorogenic acid extraction methods, choline chloride/urea eutectic solvent used as the extractant has the highest extraction efficiency for chlorogenic acid in *Lonicerae Japonicae Flos* (LJF). **Conclusion** The eutectic solvent is used as the raw material for carbon dot preparation and the chlorogenic acid extraction solvent, which can play the dual role of chlorogenic acid extraction and detection, and provide new research ideas for the quality evaluation of LJF.

**Key words:** chlorogenic acid; *Lonicerae Japonicae Flos*; chlorine and nitrogen doped carbon dots; fluorescent probe; eutectic solvent

金银花作为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 双子叶植物的花蕾或带初开的花, 具有疏热散风、清热解毒的药理作用<sup>[1-3]</sup>, 被称为“中药抗生素”。绿原酸属于多酚类化合物, 是金银花中

收稿日期: 2021-09-04

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项 (202002AE320006-02-060); 云南主要外销蔬菜绿色关键技术研究 and 集成示范 (2019ZG001-3); 云南特色水果品质提升与优势品牌创建 (2019ZG002); 农产品加工团队培育 (202002AE320007-03)

作者简介: 李晚谊 (1965—), 女, 云南昆明人, 研究员, 主要从事食品加工及食品安全等方面的研究。

\*通信作者: 杨亚玲 (1964—), 女, 云南昆明人, 教授, 主要从事分析化学等方面的研究。

起抗菌、抗炎、抗病毒药理作用的有效成分之一<sup>[4-5]</sup>。《中国药典》2020年版及 ISO 标准 21317-2019 规定,金银花中绿原酸 $\geq 1.5\%$ <sup>[6-7]</sup>。迄今为止绿原酸含量的检测以 HPLC 法<sup>[8]</sup>、荧光光谱法<sup>[9]</sup>和近红外光谱法<sup>[10]</sup>等为主要手段<sup>[11-14]</sup>,其中荧光光谱法由于具有便于操作、耗时短、灵敏度高、低成本等优点,受到了广大研究者的关注<sup>[15-16]</sup>。

碳点 (carbon dots, CDs) 是一类新型碳纳米材料,其直径小于 10 nm,且可以通过在其表面修饰不同的官能团来改变其物理化学性能,元素掺杂形成新的表面形态可以捕获激发电子,使得碳点的量子产率及其性能得到显著提升<sup>[17-19]</sup>。低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DES) 是指由季铵盐等 (氢键受体) 和羧酸、多元醇等 (氢键给体) 根据一定的化学计量比组合而成的凝固点比原料熔点低的低共熔混合物,又称共晶溶剂。项目组前期研究表明,DES 具有良好的萃取性能<sup>[20-21]</sup>,同时以 DES 为原料制备的碳点又具有高的荧光产率及抗菌效能<sup>[22]</sup>。因此,研究以 DES 作为原料制备碳点,具有一定的研究价值。

碳点具有荧光强度高和稳定性好的优点,在紫外光的照射下可以发出强烈的荧光,使其在很多领域中都有广阔的应用前景。李志英等<sup>[23]</sup>以甘露糖为

原料,采用热解法制备的柠檬酸修饰的荧光碳点,可以实现样品中总黄酮的分析检测 (以芦丁计)。徐源等<sup>[24]</sup>探讨了利用碳点建立可用于鹿茸中活性物质测定技术的可行性分析。周已祺等<sup>[25]</sup>以荧光碳点作为探针,建立一种简便灵敏的测定中药大黄素的方法。罗康<sup>[26]</sup>以黄铁矿和氟化钙作为纳米材料实现了中药中杂质的荧光检测。所以,碳点在实现中药中成分快速检测前景广阔。

本研究是以氯化胆碱和尿素形成的 DES 及柠檬酸为原料,通过一步水热法合成氯、氮掺杂碳点 (Cl/N-CDs)。基于 Cl/N-CDs 和绿原酸之间的内滤效应,建立了绿原酸荧光检测新方法 (如图 1 所示)。为了对金银花中绿原酸进行精确检测,研究采取不同溶剂 (水、乙醇及 DES) 对金银花中的绿原酸进行提取。通过使用本方法和 HPLC 法检测检测提取液中绿原酸,结果证明本方法可信度较高。此外,共存物干扰实验也证明,本方法具有优异的抗干扰能力 (共存的其他多酚、有机酸等成分对探针几乎无干扰)。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

GS800A 分子荧光光谱仪,安捷伦科技 (中国) 有限公司; TENSOR27 型傅立叶红外光谱分析仪,

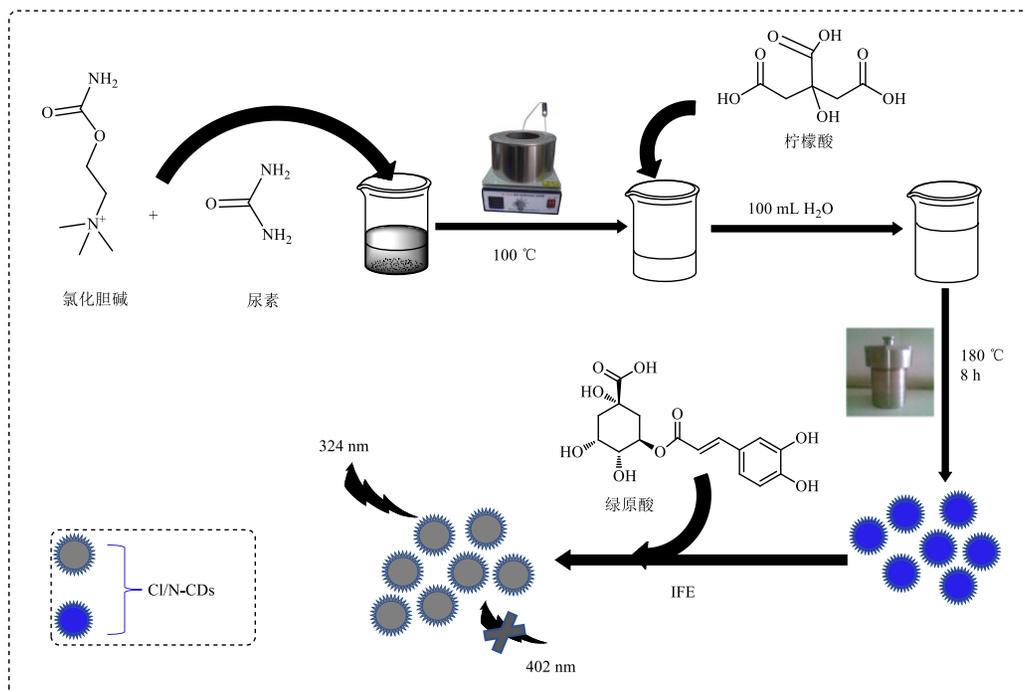


图 1 基于绿原酸对 Cl/N-CDs 荧光猝灭传感器示意图

Fig. 1 Schematic illustration of colorimetric sensor for chlorogenic acid detection based on promoting the catalytic activity of Cl/N-CDs

德国 Bmker 公司; Bruker D8 Advance 型 X 射线衍射仪, 德国 Bruker 公司; TU-1901 紫外-可见双光束分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; XW-800 快速混匀器, 上海汗诺仪器有限公司; pHs-3B 精密酸度计, 德国赛多利公司; HC-3018R 型高速离心机 (转头型号 H0650), 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 120 mL 聚四氟乙烯内衬水热反应釜, 上海-凯实验仪器有限公司; Tecnai G2 TF30 场发射透射电子显微镜, 荷兰 FEI 公司。

## 1.2 试剂

氯化胆碱 (批号 C106702276)、尿素 (批号 2150820)、柠檬酸 (批号 20200720) 购于上海国药集团化学试剂公司, 质量分数均大于 98%; 硫酸奎宁 (批号 H1623052)、绿原酸 (批号 CHB190121)、异绿原酸 A (批号 CHB180921)、异绿原酸 C (批号 CHB180925) 购于上海阿拉丁生化科技有限公司; 无水乙醇 (批号 20211101329) 购买自上海易恩化学技术有限公司; KCl (批号 20200820)、NaCl (批号 20201020)、MgCl<sub>2</sub> (批号 20171009)、ZnCl<sub>2</sub> (批号 20140320)、CaCl<sub>2</sub> (批号 20130602)、CuCl<sub>2</sub> (批号 20130509)、棕榈酸 (批号 20140510)、阿拉伯酸 (批号 20131110)、D-葡萄糖 (批号 20100801)、甘氨酸 (批号 F20120616)、半胱氨酸 (批号 F20090415)、抗坏血酸 (批号 20180402) 购自上海麦克林生化科技有限公司, 质量分数均大于 99%; 金银花由云南中医药大学陈林兴教授鉴定, 为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 购买于云南中药材批发市场; 实验用水均为去离子水, 美国 Milli-Q Academic 超纯水系统。

## 2 方法

### 2.1 Cl/N-CDs 的合成

将氯化胆碱与尿素按物质的量比 1:1 (氯化胆碱-尿素 2.8:1.2) 混合之后, 于 100 °C 油浴, 磁力搅拌至固体颗粒完全溶解为透明液体, 该透明液体即 DES<sup>[27]</sup>。将 1.9 g 柠檬酸和 100 mL 去离子水与低共熔溶剂混合, 完全溶解后, 转移至聚四氟乙烯罐中, 置于马弗炉 180 °C 条件下反应 8 h。随后将其从马弗炉中取出, 放置于室温自然冷却。得到的棕色溶液先离心 (10 000 r/min、15 min), 再用 0.22 μm 滤膜滤过, 即得氯、氮双元素掺杂的碳点 (Cl/N-CDs), 于 4 °C 下储存备用。取 1 mL Cl/N-CDs 于烧杯中, 烘干后称定质量, 扣除烧杯质量后, 即得 Cl/N-

CDs 的质量浓度为 23 mg/mL。

### 2.2 量子产率及光学特性

Cl/N-CDs 的量子产率参照文献方法<sup>[28]</sup>进行计算。用 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液溶解硫酸奎宁作为标准溶液使用 (其荧光量子效率为 54%), Cl/N-CDs 的量子产率 ( $Q$ ) 按以下公式计算。

$$Q = Q_{RIS} A_{R} \eta_{S}^2 / (I_{R} A_{S} \eta_{R}^2)$$

$A$  表示吸光度,  $\eta$  表示溶剂的折射系数 (其中  $\eta_{S}^2/\eta_{R}^2=1$ ,  $R$  和  $S$  分别表示参比硫酸奎宁和样品),  $I$  表示荧光强度

对材料光学特性的研究通过紫外和荧光仪器实现, 具体如下: 用 1.6 mg/mL 的 Cl/N-CDs 稀释溶液测定其紫外特征吸收峰。荧光仪上在激发波长为 280~360 nm, 狭缝宽度均为 5 nm 时检测其荧光发射随激发波长的位移情况。

### 2.3 荧光探针测定绿原酸的方法

量取 8 mL 合成的 Cl/N-CDs 用去离子水稀释至 115 mL, 得到质量浓度为 1.6 mg/mL 的 Cl/N-CDs 稀释溶液, 用作荧光强度检测的工作液。一般过程中, 量取 0.5 mL 的 Cl/N-CDs 稀释溶液和 0.5 mL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH 7), 加入 20 μL 不同质量浓度的绿原酸标准溶液后, 用去离子水稀释至 4 mL。涡旋混匀后, 室温下放置反应 5 min。最后在 324 nm 的激发波长下测定 402 nm 处的荧光强度。

考察不同乙醇体积分数、NaCl 浓度、pH 值、温度及共存物质对荧光探针的影响。

**2.3.1 乙醇体积分数** 量取 0.5 mL 的 Cl/N-CDs 稀释溶液, 用不同体积分数的乙醇 (0、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、100%) 稀释至 4 mL 后, 在 324 nm 的激发波长下测定 402 nm 处荧光强度的变化。

**2.3.2 NaCl 浓度** 量取 0.5 mL 的 Cl/N-CDs 稀释溶液, 用不同浓度的 NaCl (50、100、150、200、250、300、350、400、450 mmol/L) 稀释至 4 mL 后测定 402 nm 处荧光强度的变化。

**2.3.3 pH 值** 在 pH 2~10 时检测 Cl/N-CDs 荧光强度变化。

**2.3.4 温度** 在 5~65 °C 时检测 Cl/N-CDs 荧光强度变化。

**2.3.5 共存物质** 分别考察可能存在的共存物质 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、棕榈酸、阿拉伯酸、葡萄糖、甘氨酸、半胱氨酸、抗坏血酸及异构体质量浓度为 6 mg/mL 时对 60 μg/mL 的绿原酸荧光猝灭效果的影响。

## 2.4 样品的提取

精确称取 3 份 5 g 金银花粉置于圆底烧瓶中, 3 份样品中再分别加入 100 mL 的 DES (氯化胆碱/尿素)、去离子水和 60%乙醇<sup>[29]</sup>作为提取剂, 超声 (25 °C、功率 120 W) 提取 120 min 后, 8000 r/min 离心 15 min, 取上层清液, 测定绿原酸含量。

## 2.5 HPLC 法验证方法准确性

**2.5.1 对照品测试** 分别取 20 μL 不同质量浓度的绿原酸标准溶液, 注入 HPLC 系统分析, 测定相对应质量浓度下绿原酸的峰面积。以绿原酸质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线为  $Y=23.282 X-47.625$ ,  $R^2=0.9964$ , 线性范围 4~1000 μg/mL。与此同时, 取样品提取液 20 μL, 在相同色谱条件下, 通过 HPLC 法测定不同提取剂条件下提取的待测液中绿原酸含量。

**2.5.2 色谱条件** 色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液 (13 : 87); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量为 20 μL; 检测波长为 327 nm。

## 3 结果与分析

### 3.1 Cl/N-CDs 的表征

图 2-a 为 Cl/N-CDs 的 X 射线光电子能谱 (XPS)

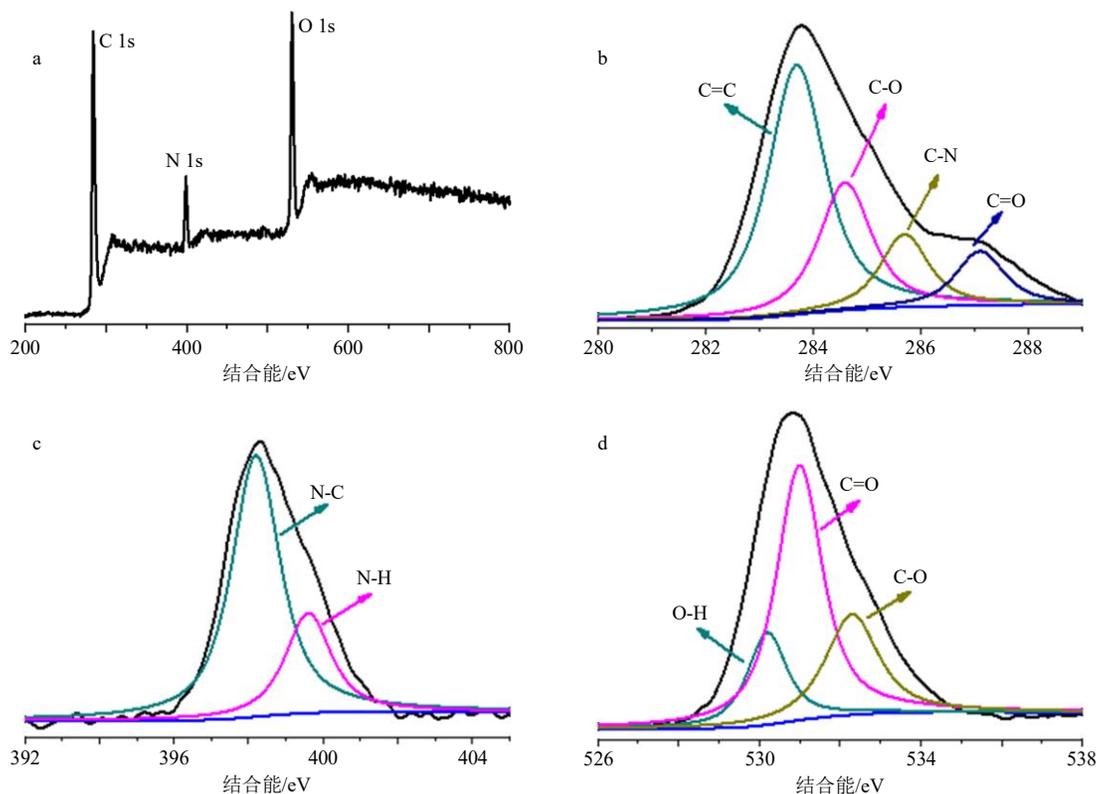


图 2 Cl/N-CDs 的 XPS 全谱图 (a) 及 C 1s (b)、N 1s (c) 和 O 1s (d) 的高分辨谱图 XPS 谱图

Fig. 2 XPS full spectrum (a), and C 1s (b), N 1s (c), O1s (d) of Cl/N-CDs

图。图中 283.8、398.3、531.0 eV 3 个主峰, 分别对应于 C1s、N1s 和 O1s。C1s 的高分辨率谱图 (图 2-b) 可分为 283.8、284.7、285.7、287.2 eV 4 个峰, 分别对应于 C=C、C-O、C-N、C=O。图 2-c 显示的 N1s 高分辨率谱图在 398.2、399.7 eV 处有 2 个典型的峰, 分别对应于 N-C 和 N-H。O1s 的高分辨率谱图 (图 2-d) 可以分解为 530.3、531.1、532.3 eV 处的 3 个峰, 分别对应 O-H、C=O、C-O。

图 3-a 为 Cl/N-CDs 的透射电子显微镜 (TEM) 图, 从图中可以看出, 所制备的 Cl/N-CDs 呈现类球形, 分散性较好, 且尺寸大小在 5 nm 左右。Cl/N-CDs 排列为晶格条纹, 相邻晶格间的间距为 0.24 nm。图 3-b 为 Cl/N-CDs 的红外光谱 (FT-IR) 图。从图中可以看出, 3259、3430、2950 cm<sup>-1</sup> 处的较强峰各自与 N-H、O-H 和 C-H 的伸缩振动相关联, C=O 和 C=C 的伸缩振动归因于 1649 cm<sup>-1</sup> 处的峰, 1400 cm<sup>-1</sup> 归因于 C-N 键的伸缩振动, 而 1089 cm<sup>-1</sup> 附近的峰来源于 C=O 键的伸缩振动<sup>[30]</sup>。

### 3.2 Cl/N-CDs 的光学性能

图 4-a 中的 2 条谱线分别为 Cl/N-CDs 的荧光激发谱线 (红线) 和荧光发射谱线 (蓝线)。如图中所示, 可以看出 Cl/N-CDs 的最大激发在 324 nm,

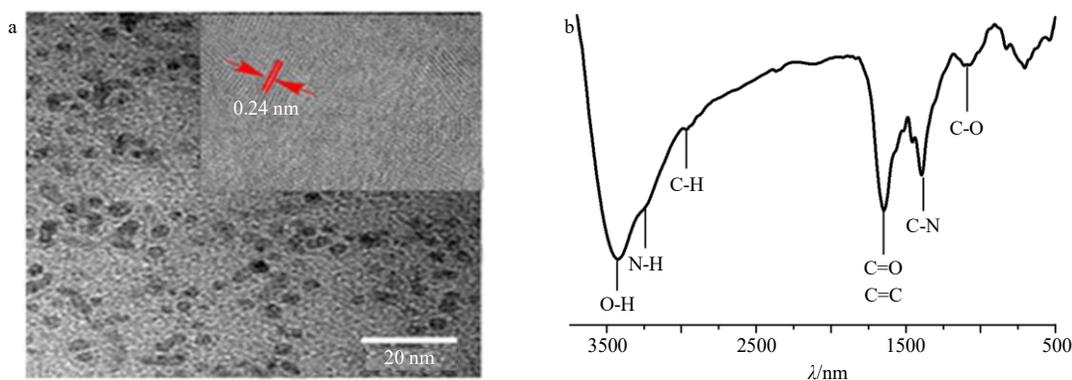


图3 TEM图 (a) 和 FTIR 谱图 (b)

Fig. 3 TEM image (a) and FTIR spectrum (b)

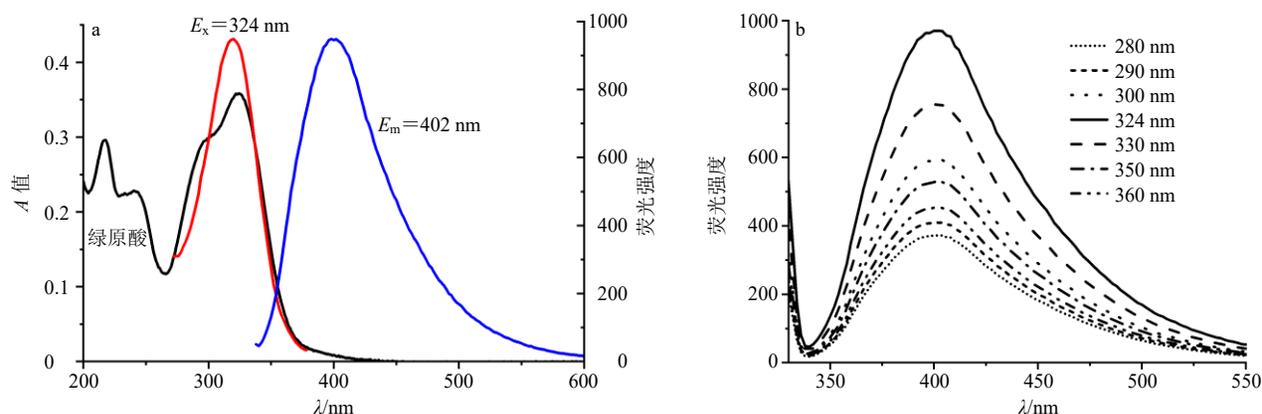


图4 绿原酸的 UV-vis 吸收光谱和 CI/N-CDs 的 FL 光谱 (a) 及 CI/N-CDs 在不同激发波长下的荧光发射光谱 (b)

Fig. 4 Fluorescence and UV-vis absorption spectra of CI/N-CDs (a) and Fluorescent emission spectra of CI/N-CDs at different excitation wavelength (b)

最大发射峰在 402 nm 处。CI/N-CDs 水溶液在自然光下接近无色，在 365 nm 的紫外光照射下呈现出明亮的蓝色荧光。图 4-b 则是在不同的激发波长下 CI/N-CDs 的荧光发射峰。而且激发波长的改变不会改变发射峰的位置，表明 CI/N-CDs 尺寸的均匀性和表面状态的稳定性。

材料荧光量子产率的测定采用相对荧光量子产率测定法，以硫酸奎宁作为标准溶液，计算得到 CI/N-CDs 荧光量子点产率为 37%。此外，研究考察了不同 5 个批次下 CI/N-CDs 的荧光强度变化，结果表明 CI/N-CDs 荧光强度相对标准偏差在 ±2.13% 以内。

### 3.3 荧光探针测定绿原酸的条件优化

考察了乙醇、NaCl、pH 值和反应温度对 CI/N-CDs 测定绿原酸的影响 (图 5)。结果表明，不同乙醇体积分数、NaCl 浓度、pH 值在 6~8 及温度 35~55 °C 时，CI/N-CDs 的荧光强度基本不变，CI/N-CDs 具有较好的稳定性、耐盐性等特性，对酸碱度和乙醇具有较强的抗干扰能力。

### 3.4 CI/N-CDs 荧光猝灭测定绿原酸

绿原酸在 0.47~62.70 μg/mL 时，CI/N-CDs 荧光的猝灭程度 (图 6-a) 与反应液中加入的绿原酸质量浓度之间呈现良好的线性关系 (图 6-b):  $(I_0 - I)/I_0 = -12.43789c + 925.38823$ ,  $R^2 = 0.99248$ 。其中  $I_0$  和  $I$  分别为加不同质量浓度绿原酸前后 CI/N-CDs 的荧光强度， $c$  为绿原酸的质量浓度。检出限根据  $3\delta/s$  计算，为 36 ng/mL ( $\delta$  为空白样品的标准偏差， $s$  为线性校准曲线的斜率)。

### 3.5 荧光猝灭机制的研究

CI/N-CDs 的荧光光谱和绿原酸的紫外吸收光谱如图 4-a 所示，绿原酸在 236、334 nm 处有 2 个 UV-vis 吸收光谱 (黑线) 特征吸收峰，CI/N-CDs 的激发和发射波长分别为 324、402 nm。从图 4-a 中可以看出，绿原酸的紫外特征吸收峰与 CI/N-CDs 的激发、发射峰有很大程度重叠，故而推测绿原酸对 CI/N-CDs 产生荧光猝灭的机制为内滤效应。

### 3.6 荧光探针测定绿原酸的选择性

研究考察了金银花样品中可能存在的共存物质

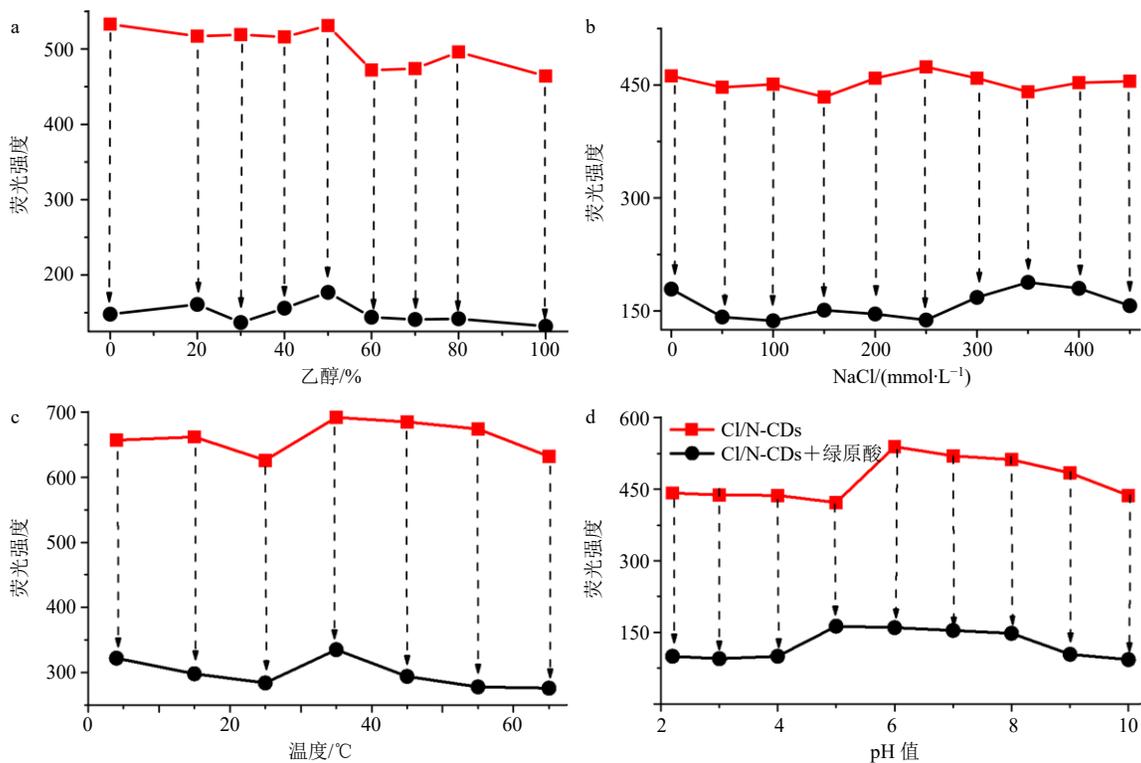


图5 乙醇体积分数 (a)、NaCl 浓度 (b)、温度 (c)、pH 值 (d) 对 CI/N-CDs 荧光强度的影响  
Fig. 5 Effects of EtOH (a), NaCl (b), temperature (c), pH (d) for fluorescence intensity of CI/N-CDs

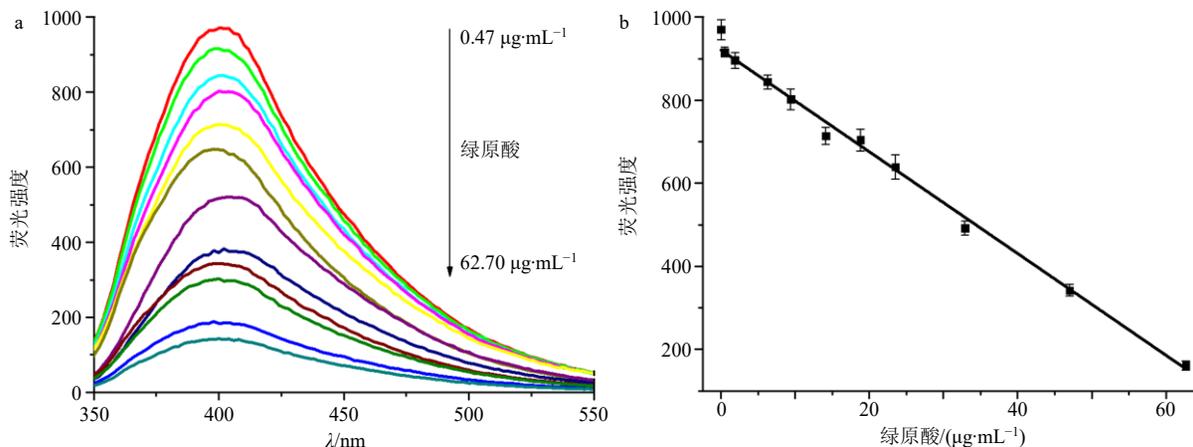


图6 不同绿原酸质量浓度和 CI/N-CDs 的荧光光谱 (a) 及线性曲线 (b)

Fig. 6 Fluorescence spectra (a) and linear curves (b) of chlorogenic acid concentrations and fluorescence intensity of CI/N-CDs

对荧光探针体系的影响。如图 7 所示，以 CI/N-CDs 为空白，其他实验组中加入等量 CI/N-CDs 和绿原酸，并分别加入 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、棕榈酸、阿拉伯酸、葡萄糖、甘氨酸、半胱氨酸、抗坏血酸。由图 7 可知，以上几种可能与绿原酸共存于金银花基体中的成分对测定基本没有干扰。绿原酸异构体对碳点荧光干扰的研究表明，异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的质量浓度高于绿原酸质量浓度 5 倍时有一定荧光猝灭效果。考虑到实际金

银花样品中异构体和金属离子的实际浓度，该结果表明本方法具有较好的抗干扰效果。

### 3.7 不同提取方法对金银花中绿原酸测定的影响

为了实现对实际金银花样品中绿原酸的精确检测，并选出对荧光分析干扰小甚至没有干扰的提取试剂，探究了 3 种不同提取试剂提取对实际绿原酸提取检测结果的影响，结果见表 1。结果表明，用氯化胆碱/尿素 DES 提取效果最好，测定的绿原酸含量最高，60%乙醇提取效果其次，水提取效果最

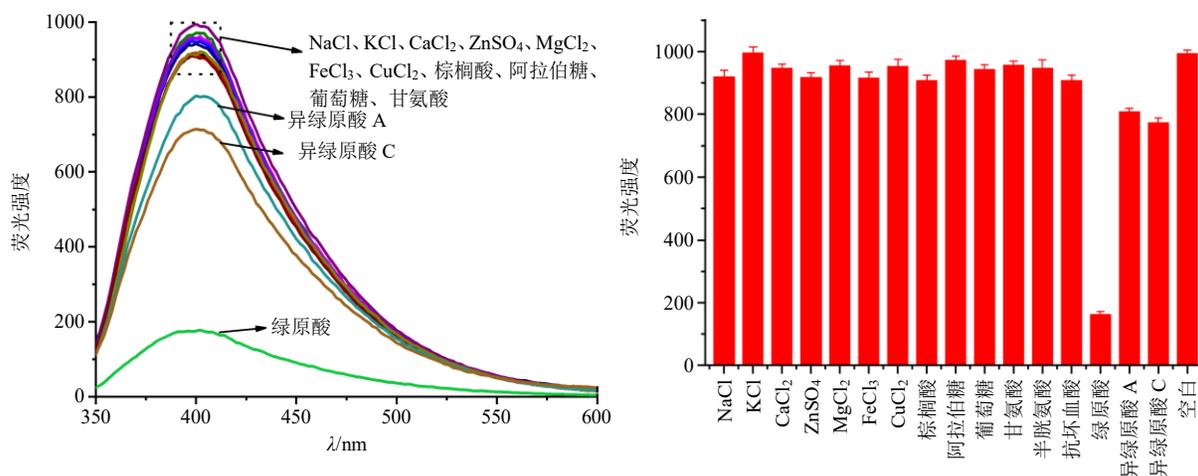


图 7 共存物质对荧光探针体系的影响

Fig. 7 Influence of coexisting ions on fluorescent probe system

表 1 金银花样品中绿原酸的含量测定比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Determination of chlorogenic acid content in LJF samples ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

提取方法	添加量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	荧光探针		HPLC 法	
		绿原酸/(mg·g <sup>-1</sup> )	回收率/%	绿原酸/(mg·g <sup>-1</sup> )	回收率/%
DES 法	0	26.80 ± 10.79	—	27.00 ± 11.82	—
	20	46.50 ± 12.00	98.5	46.70 ± 13.38	98.5
	40	65.40 ± 13.73	96.5	66.90 ± 14.90	99.8
醇提法	0	21.30 ± 11.75	—	21.50 ± 15.05	—
	20	40.90 ± 11.13	98.0	41.30 ± 10.17	99.0
	40	60.40 ± 11.51	97.8	61.10 ± 12.00	99.0
水提法	0	11.60 ± 12.71	—	12.10 ± 9.73	—
	20	31.40 ± 11.75	99.0	31.90 ± 11.29	99.0
	40	51.90 ± 16.97	100.8	52.00 ± 12.55	99.8

低。此外, DES 自身也具有一定的荧光, 如图 8-a 所示, 但其最大  $E_m = 420 \text{ nm}$ ,  $E_x = 500 \text{ nm}$ , 并不会对绿原酸的荧光测定产生干扰。

由于提取液颜色较深无法直接使用紫外方法测定 (图 8-b), 药典方法中需要通过色谱柱分离。本

研究以建立的荧光探针方法测定提取液中绿原酸, 方法加样回收率在 96.5%~100.8%, 结果也表明用本法测定金银花样品的绿原酸含量精密度高、稳定性好, 且几乎无干扰存在。为了验证方法的准确性, 研究以 HPLC 方法对相同样品进行了测定, 对比结

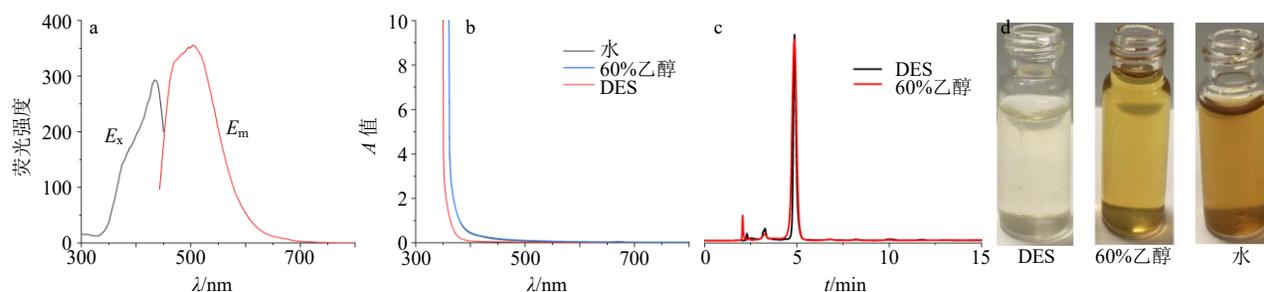


图 8 DES 的荧光激发和发射光谱 (a)、不同提取液的紫外吸收光谱图 (b)、DES 和 60%乙醇提取液的色谱图 (c)、不同提取液图片 (d)

Fig. 8 Fluorescence excitation and emission spectra of DES (a), UV absorption spectra of different extracts (b), chromatogram of DES and 60% ethanol extract (c), and pictures of different extracts (d)

果较一致。虽然本方法依然需要使用较多萃取剂提取绿原酸,但与 HPLC 法相比(图 8-c),该方法借助酶标仪可以实现高通量检测,操作简便、快速、成本低廉。HPLC 法检出限根据  $3\delta/s$  计算为 1.4 mg/kg,远高于本方法,此外,借助酶标仪检测,检测时间可以从 HPLC 法的 5 min 缩短至几秒钟范围内,相对比之下,仪器运行和测定成本也很低,具有很好的应用推广价值。

## 4 讨论

### 4.1 荧光探针条件优化

本实验分别考察了乙醇体积分数(0~100%)、NaCl 浓度(0~450 mmol/L)、pH 值(2~10)和反应温度(5~65 °C) 4 种不同条件下,对 Cl/N-CDs 的荧光和荧光探针检测体系的影响,结果表明 Cl/N-CDs 的荧光和荧光探针检测影响较弱,证明了基于 Cl/N-CDs 的荧光探针检测体系具有较强的抗干扰能力。

### 4.2 荧光探针测定猝灭机制及其选择性

通过测定 Cl/N-CDs 的荧光光谱和绿原酸的紫外吸收光谱,对比二者谱图见的差异性,实验结果发现绿原酸的吸收峰与碳点的激发峰存在很大一部分的重叠。根据此现象,可以推测 Cl/N-CDs 与绿原酸之间的荧光猝灭效果主要基于内滤效应,且其荧光猝灭效果与绿原酸含量成正比。

在检测体系种加入 7 种金属离子、6 种可能共存的物质以及绿原酸的异构体,通过测定其对碳点的荧光强度影响效果。最终发现绿原酸对体系的荧光具有非常显著的荧光猝灭效果,绿原酸的异构体仅具有非常微弱的荧光猝灭效果。结果表明该荧光探针对于绿原酸的测定具有非常强的选择性。

### 4.3 金银花样品的测定分析

研究以 3 种不同的提取液,分别提取金银花中的绿原酸,结果表明以氯化胆碱/尿素制备的 DES 萃取剂对绿原酸萃取效果最好,且其提取液颜色最浅。从色谱图上可以看出,在一定程度上 DES 作为萃取剂可以降低干扰,且 DES 的荧光不会对检测体系产生干扰。方法的加样回收率在 96.5%~100.8%,与 HPLC 方法测定的结果相一致。

## 5 结论

本研究建立了一种耐盐、耐酸碱、耐醇及高温的可检测绿原酸的荧光探针。方法具有准确性好、抗干扰能力强的特点,可用于实际金银花中绿原酸的提取和含量测定。利用荧光探针技术,可以实现

金银花中绿原酸的快速分析测定,可为中药质量评价提供新的研究思路和分析策略。

此外,关于 Cl/N-CDs 与绿原酸选择性荧光猝灭的作用机制,还需要进一步研究。探究碳点与绿原酸的作用机制,对于建立高选择性的荧光探针技术具有重要的指导意义,同时也可对其他探针技术的开发提供技术支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 夏伟,余永亮,杨红旗,等. 金银花化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(33): 126-127.
- [2] 吴娇,王聪,于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 225-234.
- [3] 方仕茂,刘忠英,杨婷,等. 金银花叶红茶加工工艺研究 [J]. 现代农业科技, 2021(3): 217-220.
- [4] 张彩云,谷静娟,周银萍,等. 金银花、连翘对金黄色葡萄球菌诱发小鼠乳腺炎的防治作用研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2015, 34(3): 44-47.
- [5] Wu Z S, Xu B, Du M, *et al.* Validation of a NIR quantification method for the determination of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* solution in ethanol precipitation process [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 1-6.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 230-232.
- [7] ISO 21317—2019 中医药—金银花 [S]. 2019: 14.
- [8] 缪艳燕,徐帮会,徐剑,等. 金银花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(20): 2497-2502.
- [9] 韩竹. 基于碳点为探针的利福平、绿原酸、 $\text{Cu}^{2+}$ 和谷胱甘肽的荧光检测新方法研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [10] 周文忠,张峻松,邹悦,等. 应用近红外光谱法结合波长筛选快速测定烟草绿原酸、萜萜亭和芸香苷含量 [J]. 江西农业学报, 2019, 31(12): 66-71.
- [11] 茅佳宁,岳倩,周雪莹,等. 基于乙二胺修饰碳点的荧光猝灭高效检测绿原酸 [J]. 化学试剂, 2020, 42(8): 954-958.
- [12] 郝海群. 近红外光谱法测定金银花中绿原酸含量 [J]. 河南中医, 2015, 35(3): 640-642.
- [13] 姜华,郭敏,徐世红,等. HPLC 法测定忍冬藤痛风颗粒中绿原酸的含量 [J]. 西部中医药, 2017, 30(4): 25-27.
- [14] 沈亚芬,杜伟锋,郑敏霞,等. HPLC 同时测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1117-1120.
- [15] Yang H, Yang L, Yuan Y S, *et al.* A portable synthesis of water-soluble carbon dots for highly sensitive and selective

- detection of chlorogenic acid based on inner filter effect [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 189: 139-146.
- [16] 张惠. 姜黄素、绿原酸和硫胺素的荧光检测新方法研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [17] 李宏, 华建豪, 侯朝祥, 等. 锌掺杂碳量子点“关-开”型荧光探针检测果蔬中谷胱甘肽的研究 [J]. *分析测试学报*, 2019, 38(1): 52-57.
- [18] Jiang J, He Y, Li S Y, *et al.* Amino acids as the source for producing carbon nanodots: Microwave assisted one-step synthesis, intrinsic photoluminescence property and intense chemiluminescence enhancement [J]. *Chem Commun*, 2012, 48(77): 9634-9636.
- [19] 李俊芬, 李鹏霞, 张琳, 等. 关于碳点性能提升的研究进展 [J]. *分析科学学报*, 2018, 34(3): 429-436.
- [20] Li X, Yuan T, Zhao T, *et al.* An effective acid-base- induced liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvents for determination of testosterone and methyltestosterone in milk [J]. *J Chromatogr Sci*, 2020, 58(9): 880-886.
- [21] Wen J Q, Lu Y G, Shi L Y, *et al.* A novel cloud point extraction based on fatty acid deep eutectic solvent combined with high-performance liquid chromatography for determination of ultraviolet absorbent in food packaging bags [J]. *Microchem J*, 2020, 153: 104466.
- [22] Gao Z, Li X, Shi L Y, *et al.* Deep eutectic solvents- derived carbon dots for detection of mercury (II), photocatalytic antifungal activity and fluorescent labeling for *C. albicans* [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 220: 117080.
- [23] 李志英, 闫慧云, 刘璐璐, 等. 柠檬酸修饰荧光碳点的合成及对中草药总黄酮的检测 [J]. *化学研究与应用*, 2017, 29(9): 1352-1356.
- [24] 徐源, 李春义, 赵海平. 碳点的研究进展及其在鹿茸研究中应用前景分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2580-2586.
- [25] 周巳祺, 席琳, 赵恒志, 等. 基于己二胺修饰荧光碳点的中药大黄素检测研究 [J]. *化学试剂*, 2016, 38(6): 536-538.
- [26] 罗康. 黄铁矿和氟化钙纳米材料在中药杂质荧光检测和制药废水处理中的应用 [D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [27] Gao Z, Li X, Shi L Y, *et al.* Deep eutectic solvents-derived carbon dots for detection of mercury (II), photocatalytic antifungal activity and fluorescent labeling for *C. albicans* [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 220: 117080.
- [28] Li Y M, Zhang X L, Zhu B C, *et al.* A highly selective colorimetric and “off-on-off” fluorescent probe for fluoride ions [J]. *Anal Sci*, 2010, 26(10): 1077-1080.
- [29] 王鑫, 李楠, 齐佳慧, 等. 金银花中绿原酸的提取工艺研究 [J]. *黑龙江大学工程学报*, 2020, 11(3): 36-39.
- [30] Chen J, Liu J, Li J, *et al.* One-pot synthesis of nitrogen and sulfur co-doped carbon dots and its application for sensor and multicolor cellular imaging [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 485: 167-174.

[责任编辑 郑礼胜]