

# 聚丙烯酸-钙(铈)纳米团簇荧光探针用于无机磷定量检测研究

陈 甲, 范依然, 闫文馨, 韩颖超

(武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** 无机磷主要以磷酸根的形式存在, 在自然界生命循环和现代工业社会中发挥重要作用。磷酸根离子的快速高效定量检测一直是临床生化分析、工业生产和环境污染监测等领域的研究热点。本工作以聚丙烯酸(PAA)为络合剂, 通过与  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Ce}^{3+}$  的络合反应, 合成了具有良好分散性和稳定性的 PAA-Ca(Ce)纳米团簇荧光探针。利用 298 nm 激发光照射该探针与磷酸根的反应产物, 建立其在 352 nm 处发射峰峰值强度与磷酸根浓度的线性关系图。实验结果表明,  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$  浓度为 37.575 mmol/L 的纳米荧光探针与磷酸根浓度的线性关系式为  $y=1.09x+2.05$ , 荧光强度可靠性范围为 13.5~66.91 mmol/L。与钼锑抗分光光度法测试磷酸根对比, 该方法具有更高的回收率。大鼠血清无机磷检测实验验证了该方法的可靠性。以上结果表明本研究所合成的荧光探针具有良好的磷酸根定量检测性能。

**关 键 词:** 稀土离子; 荧光探针; 无机磷; 检测

中图分类号: TQ174 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2024)09-1053-10

## Polyacrylate-calcium (cerium) Nanocluster Fluorescent Probes for Quantitative Detection of Inorganic Phosphorus

CHEN Jia, FAN Yiran, YAN Wenxin, HAN Yingchao

(State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Phosphorus is one of the important elements in the ecosystem and plays a vital role in the process of life cycle. Inorganic phosphorus is a major form of phosphorus, usually in the form of phosphate ions. The rapid and efficient quantitative detection of phosphate ions has always been a hot research direction in the fields of clinical chemistry, pharmacology, biochemical analysis, industrial production and environmental pollution monitoring, but still facing some challenges in accuracy and convenient in some special circumstances. In present work, PAA-Ca(Ce) nanocluster fluorescent probes with good dispersibility and stability were synthesized by complexing with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ce}^{3+}$  using polyacrylic acid (PAA) as complexing agent. The reaction product between the probe and the phosphate ion was irradiated by 298 nm excitation light, and a linear graph was established based on the correlation between the peak intensity at the emission peak of 352 nm and the phosphate ion concentration. The experimental results show that the linear relation of the nanofluorescent probe with the  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$  concentration of 37.575 mmol/L is  $y=1.09x+2.05$ , and the reliability range of fluorescence intensity is 13.5~66.91 mmol/L. Compared with molybdenum-antimony resistance spectrophotometry, this method has a higher recovery. The experimental results of inorganic phosphorus in rat serum

收稿日期: 2023-12-25; 收到修改稿日期: 2024-04-12; 网络出版日期: 2024-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(51672206)

National Natural Science Foundation (51672206)

作者简介: 陈 甲(1995-), 男, 博士研究生. E-mail: 265998@whut.edu.cn

CHEN Jia (1995-), male, PhD candidate. E-mail: 265998@whut.edu.cn

通信作者: 韩颖超, 教授. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

HAN Yingchao, professor. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

verify the reliability of the method. The results above indicate that the fluorescence probe studied in this paper has good quantitative detection performance of phosphate.

**Key words:** rare earth ion; fluorescent probe; inorganic phosphorus; detection

磷广泛分布于自然界中,是生态系统最重要的组成元素之一,在动植物乃至微生物的生命代谢过程中起到极为关键的作用<sup>[1-2]</sup>。在现代工业和农业中,磷作为农药、化肥和矿物的主要组成成分参与到工农业生产中,也作为人类的食物营养成分进入人体,大量参与骨骼与牙齿的形成、生长以及循环代谢的过程,在各种生命活动中扮演着重要角色<sup>[3]</sup>。人体中无机磷通常以磷酸根离子( $\text{PO}_4^{3-}$ )形态出现,其广泛存在于血液和组织中。 $\text{PO}_4^{3-}$ 的定量检测是疾病诊断、环境检测和工业安全等领域中的关键环节<sup>[4-6]</sup>。因此, $\text{PO}_4^{3-}$ 的快速高效定量检测一直是临床化学、药理学、生化分析、工业生产和环境污染监测等领域的研究热点<sup>[7]</sup>。

近年来,国内外提出了多种  $\text{PO}_4^{3-}$  检测方法,主要有离子色谱法、钼锑抗分光光度法、孔雀石绿-磷钼酸分光光度法、连续流动分析法等,但每种方法都有着相应的优势和局限性<sup>[8-12]</sup>。离子色谱法利用离子在固定相和流动相之间的分配系数差别,可连续分离共存的多种离子并对其进行精确的定性和定量<sup>[8]</sup>。该方法具有较高的精度和回收率,但实验过程冗长、复杂、繁琐。钼锑抗分光光度法通过磷酸钙与钼酸铵和酒石酸锑钾的混合溶液反应生成磷钼杂多酸,使用还原剂抗坏血酸对其进行还原得到一种蓝色络合物磷钼蓝,根据其吸光度大小测定  $\text{PO}_4^{3-}$  含量<sup>[9]</sup>。该方法成本较低,测试结果有着良好的重复性,但测试精度和回收率不高。孔雀石绿-磷钼酸分光光度法在钼锑抗分光光度法的基础上进行改良,具备更好的显色性能<sup>[10]</sup>,但涉及浓硫酸等危险化学品的使用,具有安全隐患。连续流动分析法同样利用了钼锑抗分光光度法的反应机理,将溶液反应和检测流程置于连续流动分析仪中自动进行,极大地降低了外界因素的影响<sup>[11]</sup>。但同时该方法设备昂贵、检测成本高。综上,要建立一种既精确又方便的  $\text{PO}_4^{3-}$  含量测定方法,还需探寻新的技术路线。

荧光探针具有选择性高、灵敏度强、实时高分辨、安全无辐射等优点,被广泛应用于标记、示踪、成像、分析等领域<sup>[13-15]</sup>。尤其是稀土荧光探针,相比于有机探针材料,具有良好的光化学稳定性、窄发射谱带、大的斯托克斯位移、不易淬灭等优点,表现出更优异的应用潜力<sup>[16-17]</sup>。此外,稀土元素具有

很高的光化学稳定性,有助于高效消除来自散射光和生物样品自发光带来的背景荧光,广泛应用于无背景发光情况下的离子测定<sup>[18]</sup>。Han 等<sup>[19]</sup>通过稀土  $\text{Tb}^{3+}$  荧光信号响应无机磷结合稀土-高分子配合物的特性,提出了一种快速检测无机磷的方法,无机磷浓度在 0.5~100 mmol/L 范围内与荧光信号强度呈线性相关。Wu 等<sup>[20]</sup>发现低浓度十二烷基苯磺酸钠(SDBS)可以显著增强环丙沙星(CIP)- $\text{Eu}^{3+}$  配合物中 CIP 向  $\text{Eu}^{3+}$  的能量转移,实现对  $\text{PO}_4^{3-}$  的超灵敏选择性检测(检出限为 4.3 nmol/L)。Li 等<sup>[21]</sup>基于“聚集诱导能量转移”特性设计制备了金属有机框架材料(邻苯二甲酸-CIP- $\text{Eu}^{3+}$ )用于测定人体尿液和湖水样品中的磷酸盐。这些方法的建立,实现了更为精确的  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度测定,但在便捷性上仍有不足。

本研究参考生物矿化中聚合物诱导液相前驱体过程,制备聚丙烯酸-钙(铈)纳米团簇荧光探针,并基于该探针建立一种  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度的检测方法,以快速定量检测  $\text{PO}_4^{3-}$ 。该方法成本低,具有较高的灵敏度和较好的稳定性,操作过程简便且容易重复,可用于化学、生物医学等领域的无机磷快速定量检测。

## 1 实验方法

### 1.1 实验试剂

二水氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , AR)、十二水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , AR)、氢氧化钠(NaOH, AR)、氯化钠(NaCl, AR)、氯化铵( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , AR)、氨水( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , AR)、柠檬酸(CA, AR)、碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , AR)、硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , AR)、氯化钾(KCl, AR)和氯化镁( $\text{MgCl}_2$ , AR)均购自国药集团化学试剂有限公司,七水氯化铈( $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , AR)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,聚丙烯酸(PAA, 分子量 $\approx 1800$ )购自 Sigma-Aldrich Corporation。胎牛血清蛋白(FBS)购自碧云天生物技术有限公司。大鼠血清购自武汉伟创达生物科技有限公司。血清无机磷检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 纳米荧光探针的制备及表征

取  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  溶于去离子水中,分别配制 0.3 mol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 、0.0334 mol/L  $\text{Ce}^{3+}$  和 0.2 mol/L  $\text{PO}_4^{3-}$  的储存液。根据

不同组别设置的 $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$ 浓度分别取对应体积 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Ce}^{3+}$ 储存液,稀释至40 mL并混合均匀,得到 $\text{Ca}(\text{Ce})$ 水溶液。 $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$ 浓度设置为18.788、37.575和75.150 mmol/L,  $\text{Ce}^{3+}/(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})=10\%$ 。取适量PAA溶于去离子水中,配制20 mL PAA水溶液,其中 $\text{COO}^-/(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})=4$ 。使用蠕动泵将PAA水溶液匀速加入到 $\text{Ca}(\text{Ce})$ 水溶液中并搅拌均匀,再加入NaOH水溶液调节pH为9。在25 °C下搅拌30 min后得到PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 纳米荧光探针。

将上述实验制备的样品透析、冷冻干燥,得到粉体材料用于下一步表征。使用200 kV冷冻电镜(Cryo-TEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, 美国)表征样品的微观形貌,放大倍数为105000倍(精度为0.085 nm/像素),并利用Nano Measurer统计100个纳米颗粒,分析其尺寸分布。利用动态光散射粒度仪(DLS; Zetasizer, 300HS, Malvern, 英国)测试样品的水合粒径,测试范围为0.3 nm~15  $\mu\text{m}$ 。采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR; Thermo Nicolet 6700, Thermo electron scientific instruments, 美国)分析样品的吸收光谱,并据此推断其化学结构。取1~2 mL纳米荧光探针溶液放入标准石英比色皿(光径为10 mm)中,并将其置入荧光分光光度计(970CRT, 上海精密科学仪器有限公司)评价其荧光性能,入射光与比色皿角度设置为90°,狭缝宽度设置为5 nm,灵敏度设置为2。

### 1.3 $\text{PO}_4^{3-}$ 的定量检测

分别配置不同浓度(0~200 mmol/L)的 $\text{PO}_4^{3-}$ 水溶液备用。将3 mL不同浓度的 $\text{PO}_4^{3-}$ 水溶液匀速滴入6 mL纳米荧光探针水溶液中。在25 °C下充分搅拌反应30 min后,取1~2 mL样品测试其荧光强度并绘制荧光强度- $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度关系图。按照公式(1)确定荧光强度- $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度线性关系的可靠性范围 $A\sim B$ <sup>[22]</sup>。

$$A = a + 15\%(b - a) \quad (1)$$

$$B = b - 15\%(b - a) \quad (2)$$

其中, $a$ 为线性区间中最低 $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度所对应的荧光强度, $b$ 为线性区间中最高 $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度所对应的荧光强度。根据荧光响应性优选荧光探针,进一步分析低浓度无机磷(0~10 mmol/L)条件下的荧光强度- $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度关系。

为评价纳米荧光探针的稳定性,考察不同反应时间(5、10、15、20、25、30、40、60、120 min)和温度(25、37、40、50、60、80 °C)对PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 纳米探针与 $\text{PO}_4^{3-}$ 溶液反应产物荧光强度的影响。同时,采用钼锑抗分光光度法与该方法进行对比,评

价其 $\text{PO}_4^{3-}$ 定量检测精确程度。进一步地,评价纳米荧光探针在不同干扰因素(如 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、CA、FBS和NaCl、氨-氯化铵缓冲液)下对 $\text{PO}_4^{3-}$ 的特异性检测能力。

为评价实际应用中荧光探针法检测无机磷结果的可靠性,分别使用两种方法测定大鼠血清中无机磷的含量。荧光探针法:取1 mL大鼠血清,加入4 mL血清沉淀剂,充分离心后取3 mL上清液,加入微量NaOH将pH调节为9左右。将上述待测液与6 mL荧光探针溶液混合,充分反应30 min。取2 mL反应后的溶液,测试其在激发光298 nm下的发射光352 nm处的荧光强度,将其代入用标准溶液制作的拟合函数中,计算得到待测液中无机磷的含量。磷钼蓝分光光度法:取大鼠血清0.1 mL,加入0.4 mL沉淀剂,充分混匀后离心,取上清液待测。按照试剂盒说明配制工作液,分别取2 mL工作液与0.2 mL待测上清液、无机磷标准溶液和去离子水在37 °C下反应30 min。测定各样品在660 nm处的吸光度,并代入试剂盒给定的标准曲线中,计算得到待测上清液中无机磷含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 纳米荧光探针的制备与表征

在Cryo-TEM下观察到PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 纳米荧光探针为点状小颗粒(图1(a))。对Cryo-TEM照片中的样品进行粒径统计分析发现,纳米荧光探针粒径集中分布在1.6~2.4 nm范围内(占总数85%),平均粒径为 $(1.91 \pm 0.23)$  nm(图1(b))。同时图1(c)显示DLS测试结果(1.83 nm)与Cryo-TEM结果基本吻合。图1(d)为纳米荧光探针的FT-IR谱图,可以推断 $3478\text{ cm}^{-1}$ 处较宽的吸收峰为PAA分子中的O-H伸缩振动峰, $1709\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为PAA中羧基( $\text{COO}^-$ )的弯曲振动峰<sup>[23-25]</sup>。与PAA相比,PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 的 $\text{COO}^-$ 振动峰移至1566和 $1393\text{ cm}^{-1}$ 处,证明 $\text{COO}^-$ 与 $\text{Ca}(\text{Ce})$ 离子结合,形成PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 络合物<sup>[25-28]</sup>。加入 $\text{PO}_4^{3-}$ 后,II和III反应产物在 $500\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 和 $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ 区间内出现 $\text{PO}_4^{3-}$ 特征吸收峰,对应 $\text{PO}_4^{3-}$ 不对称伸缩振动和不对称变角振动<sup>[29]</sup>。

考虑实际应用场景,从储存方式评价PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 纳米荧光探针探测 $\text{PO}_4^{3-}$ 的稳定性。取 $\text{Ca}(\text{Ce})$ 浓度为18.788 mmol/L的PAA- $\text{Ca}(\text{Ce})$ 纳米荧光探针悬浮液10 mL,在室温下储存12 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d时分别加入5 mL  $\text{PO}_4^{3-}$ 储存液,充分反应30 min后测定反应产物荧光强度。同时对30 mL

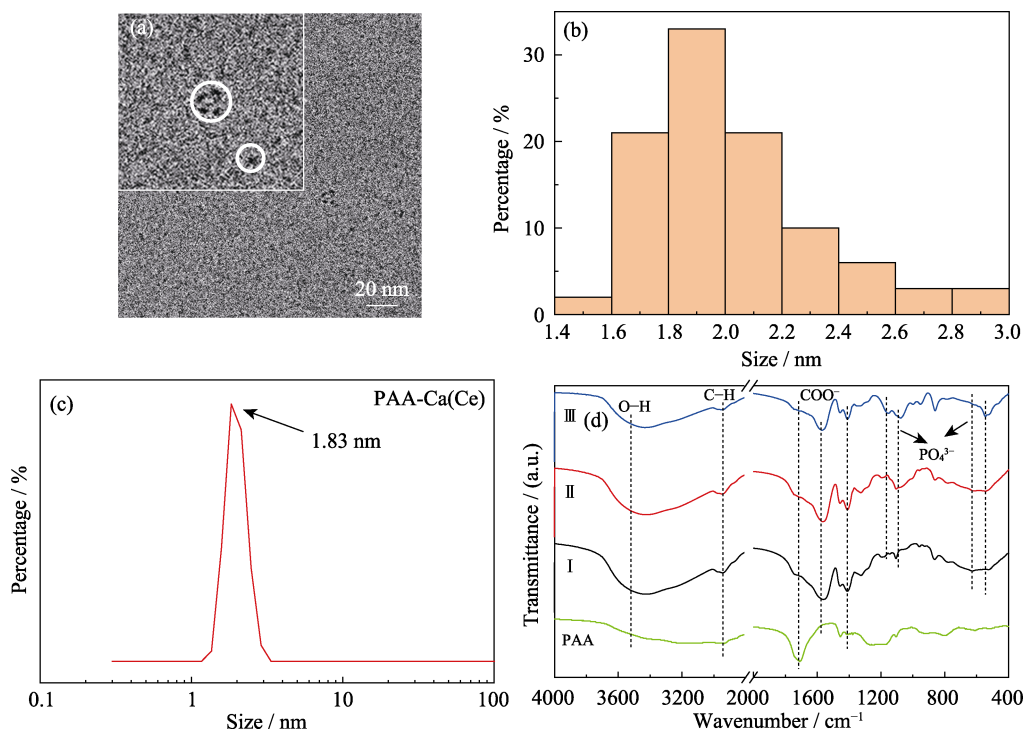
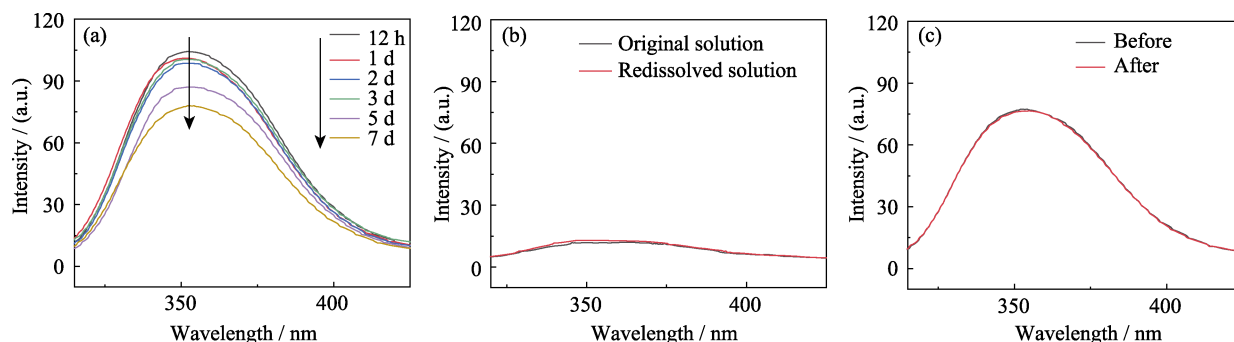


图 1 PAA-Ca(Ce)纳米荧光探针的形貌尺寸和化学结构

Fig. 1 Morphology, size and structure of PAA-Ca(Ce) nanofluorescent probe

(a) Cryo-TEM images; (b) Particle size statistical distribution calculated from cryo-TEM images; (c) DLS particle size distribution; (d) FT-IR spectra of the products of PAA-Ca(Ce) nanoprobes with  $\text{PO}_4^{3-}$  solutions at concentration of 0 (I), 10 (II) and 50 (III) mmol/L

图 2 PAA-Ca(Ce)纳米荧光探针检测  $\text{PO}_4^{3-}$  的荧光稳定性Fig. 2 Fluorescence stability of PAA-Ca(Ce) nanofluorescent probe for  $\text{PO}_4^{3-}$ 

(a) Fluorescence emission spectra of PAA-Ca(Ce) and  $\text{PO}_4^{3-}$  after reaction within 7 days; (b) Fluorescence emission spectra of the original PAA-Ca(Ce) solution and the cold-dry redissolved solution reacting with  $\text{PO}_4^{3-}$ ; (c) Fluorescence emission spectra of PAA-Ca(Ce) solution reacting with  $\text{PO}_4^{3-}$  before and after filtration by  $\phi 0.22 \mu\text{m}$  membrane

PAA-Ca(Ce)纳米荧光探针悬浮液进行冷冻干燥处理后, 加入 30 mL 去离子水将粉体样品复溶, 分别向原始悬浮液和复溶悬浮液中加入 15 mL  $\text{PO}_4^{3-}$  储存液, 充分反应 30 min 后测定反应产物荧光强度。另外取 30 mL 上述 PAA-Ca(Ce)纳米荧光探针悬浮液, 利用  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜进行过滤, 与 15 mL  $\text{PO}_4^{3-}$  储存液充分反应, 比较过滤前后检测  $\text{PO}_4^{3-}$  的荧光特征峰。从图 2(a) 可见, 通过悬浮液保存的样品与  $\text{PO}_4^{3-}$  反应产物的荧光强度在 3 d 内变化不大。但在 3 d 之后, 荧光强度随着时间延长不断衰减, 且在 5 d 时观察到 PAA-Ca(Ce) 溶液中有白色絮状物出现, 说明

PAA-Ca(Ce)不适宜以悬浮液形式长期保存。图 2(b) 则表明荧光强度几乎不因冷冻干燥再复溶操作而产生变化。因此, 冷冻干燥不会对 PAA-Ca(Ce)纳米探针的荧光性能产生影响, 可以通过冷冻干燥的方式保存 PAA-Ca(Ce)纳米探针。同样地, 图 2(c)为过滤前后的反应产物荧光发射光谱图, 荧光强度几乎不因过滤操作而产生变化。因此, 过滤几乎不对 PAA-Ca(Ce)纳米探针的荧光性能产生影响, 可以通过过滤对 PAA-Ca(Ce)纳米探针进行灭菌处理。

## 2.2 $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度-荧光强度关系

分别取 6 mL 含不同 Ca(Ce)浓度(18.788、35.575

和 75.150 mmol/L)PAA-Ca(Ce)探针溶液,逐滴加入 3 mL 特定浓度(0~200 mmol/L) $\text{PO}_4^{3-}$ 溶液,充分混合 30 min 后测定样品荧光强度。图 3(a~c)为不同 Ca(Ce)浓度下加入  $\text{PO}_4^{3-}$  的荧光发射图。随着加入  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度增大,纳米荧光探针的荧光强度呈现出整体增长趋势,且  $\text{PO}_4^{3-}$  增大到一定浓度后(70~80 mmol/L),增长趋于平缓。取 352 nm 处峰值强度绘制  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度-荧光强度关系图,可以看出在特定区间内  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度和荧光发射峰峰值强度存在一定线性关系。针对上述不同浓度 PAA-Ca(Ce)纳米荧光探针,分别取  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度区间 30~80、0~70 和 0~50 mmol/L 进行线性拟合,接着将最小和最大  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度代入拟合得到的关系式中,利用公式(1~2)计算荧光强度可靠性范围。结果表明 18.788 mmol/L 的纳米荧光探针线性关系式为  $y=0.54x+10.07$ (图 3(d)),荧光强度可靠性范围为 30.320~49.220 mmol/L。35.575 mmol/L 纳米荧光探针线性关系式为  $y=1.09x+2.05$ (图 3(e)),荧光强度可靠性范围为 13.500~66.910 mmol/L。75.150 mmol/L 纳米荧光探针线性关系式为  $y=1.13x+0.80$ (图 3(f)),荧光强度可靠性范围为 9.275~48.825 mmol/L。对比发现 35.575 mmol/L 纳米荧光探针荧光强度大,响应性好。因此,在应用中采用含 35.575 mmol/L Ca(Ce)的纳米荧光探针可得较为理想的检测结果。

为满足荧光探针法在低含量  $\text{PO}_4^{3-}$  生物样本(如血清、细胞等)中的应用,进一步探究 0~10 mmol/L

$\text{PO}_4^{3-}$  条件下  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度与荧光强度之间的关系。如图 4(a)所示,位于 352 nm 处的发射峰峰值强度仍随  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度增大而增大,增长先缓慢后迅速。分别用不同曲线模型拟合(图 4(b~d))并比较相关系数  $R^2$  后,确定一元三次函数的曲线相关系数最高,因此选用  $y=0.25+0.18x+0.17x^2-0.0076x^3$  为测定浓度在 0~10 mmol/L 范围内的  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度的标准方程。

### 2.3 反应时间与温度对测定结果的影响

为确定理想的测试环境,取 PAA-Ca(Ce)纳米探针与  $\text{PO}_4^{3-}$  溶液混合反应,探究反应时间和温度对荧光发射峰峰值强度的影响。如图 5(a, b)所示,反应在 30 min 之内荧光强度逐渐增大,超过 30 min 后强度几乎不变。因此,确定纳米荧光探针与  $\text{PO}_4^{3-}$  溶液的合适反应时间为 30 min。图 5(c, d)则表明,反应温度为 25~40 °C 时,荧光强度几乎不变,而温度高于 40 °C 时荧光强度有所减弱。因此,合适的反应温度为 25~40 °C。

### 2.4 荧光探针检测能力评价

为验证纳米荧光探针检测  $\text{PO}_4^{3-}$  含量的准确性,取一定体积的待测溶液(浓度为 0~200 mmol/L),在适宜室温下与双倍体积的 PAA-Ca(Ce)纳米荧光探针溶液反应 30 min 后测定 352 nm 处荧光发射峰峰值强度。将该待测反应产物荧光发射峰强度和可靠性范围 13.50~66.91 mmol/L 比较可知:若荧光强度位于可靠性范围区间之内,则直接将待测反应产物在

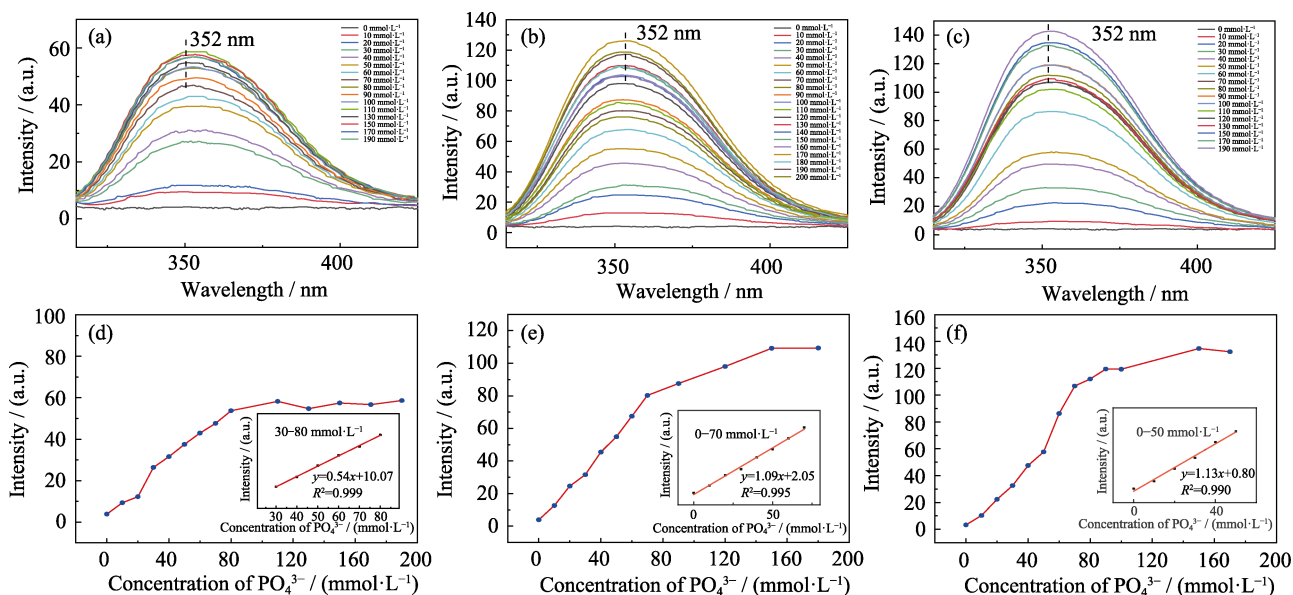


图3 不同 $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$ 浓度下 PAA-Ca(Ce)荧光探针与  $\text{PO}_4^{3-}$  反应产物的荧光发射光谱图,以及  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度-荧光强度线性关系

Fig. 3 Fluorescence emission spectra of the reaction products between PAA-Ca(Ce) fluorescent probes and  $\text{PO}_4^{3-}$  with different concentrations of  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$ , and corresponding linear relationship of  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration-fluorescence intensity

(a-c) Fluorescence emission spectra of PAA-Ca(Ce) probe and  $\text{PO}_4^{3-}$  with different concentrations excited at 298 nm excitation under the conditions of  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$  concentration of (a) 18.7875, (b) 35.575 and (c) 75.150 mmol/L, respectively; (d-f) Relationship curves and linear fitting relationships between fluorescence peak intensity at 352 nm and  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration under the conditions of  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$  concentration of (d) 18.7878, (e) 35.575 and (f) 75.150 mmol/L, respectively; Colorful figures are available on website



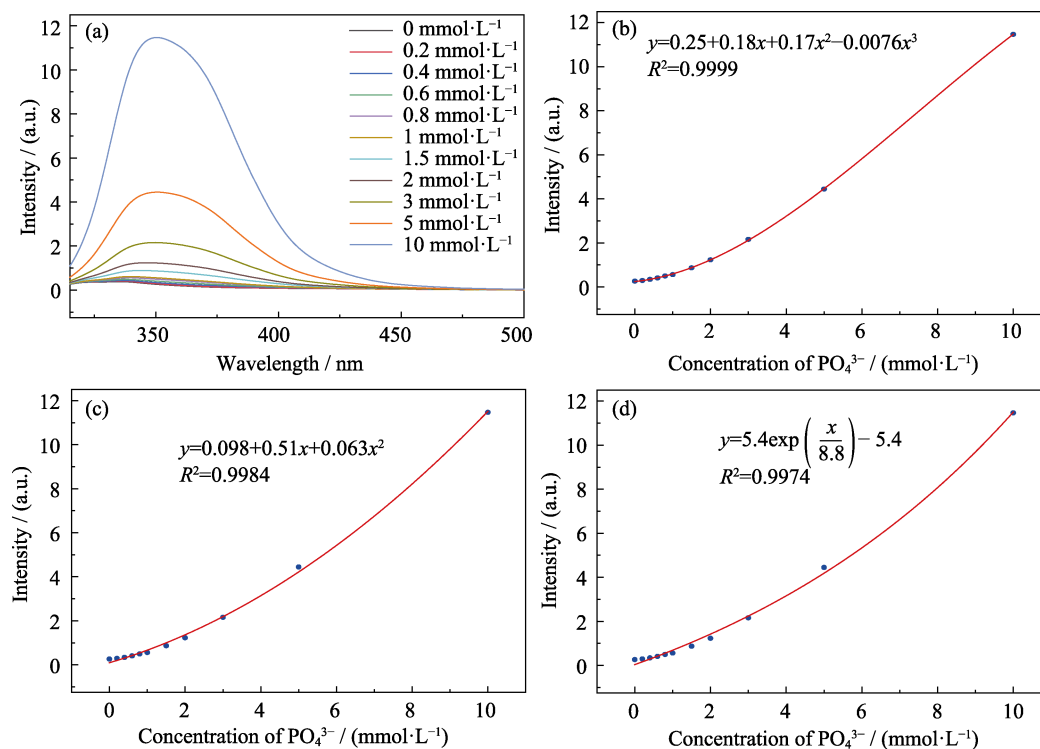
图 4 低  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度下的  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度-荧光强度关系图

Fig. 4 Relationship between  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration and fluorescence intensity at low  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration  
 (a) Fluorescence emission spectra of PAA-Ca(Ce) probe with different concentrations of  $\text{PO}_4^{3-}$  at 298 nm excitation at  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Ce}^{3+})$  concentration of 35.575 mmol/L; (b-d) Relationship between the fluorescence peak intensity at 352 nm and the concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  with their corresponding fitting curves derived from different models; Colorful figures are available on website

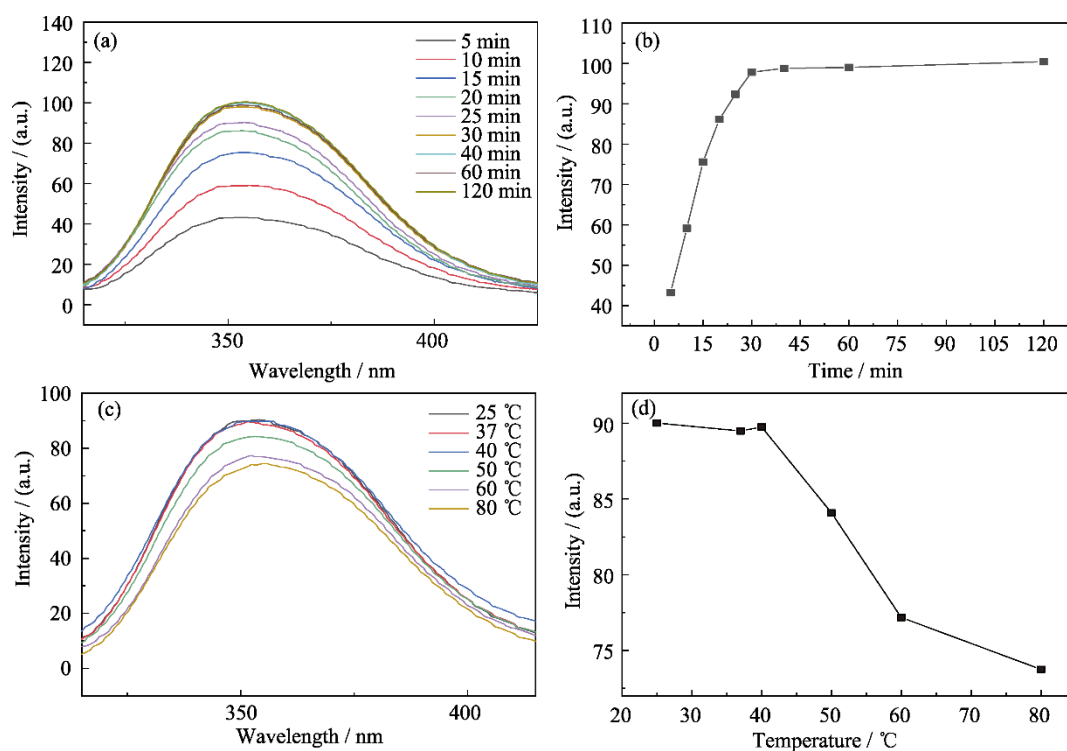


图 5 反应时间与温度对荧光强度的影响

Fig. 5 Influence of reaction time and temperature on fluorescence intensity  
 (a, b) Changes of fluorescence intensity detected at different time; (d, c) Changes of fluorescence intensity detected at different temperatures; Colorful figures are available on website

352 nm 处的发射峰荧光强度代入相应的线性关系式( $y=1.09x+2.05$ ), 得到待测溶液中  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度。若荧光强度高于或低于可靠性范围区间, 则需要相应地将待测溶液进行稀释或向其中加入  $\text{PO}_4^{3-}$ , 至其发射峰荧光强度位于可靠性范围以内, 代入对应线性关系式( $y=1.09x+2.05$ ), 得到溶液中  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度, 再按照稀释比例或添加  $\text{PO}_4^{3-}$  的量, 换算出原待测溶液中  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度。如表 1 所示, 通过 PAA-Ca(Ce) 纳米荧光探针检测  $\text{PO}_4^{3-}$  具有较高的准确性, 平均回收率为 99.155%。

为进一步验证该方法的可靠性, 采用国家环境保护部提供的无机磷检测方法——钼锑抗分光光度法测定无机磷含量, 并与荧光探针法进行对比。

钼锑抗分光光度法利用磷酸盐与钼锑抗的杂环磷钼酸盐显色反应, 测试显色液在 700 nm 下的吸光度, 从而建立无机磷与仪器响应值的线性关系。配制质量浓度为 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 mg/L 的  $\text{PO}_4^{3-}$  标准溶液进行实验, 建立并拟合仪器响应值与  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度之间的线性关系式(图 6), 结果为  $y=0.338x-0.087$ 。配制浓度为 10~200 mmol/L 的  $\text{PO}_4^{3-}$  标准溶液作为待测样品, 将一系列特定浓度的  $\text{PO}_4^{3-}$  标准溶液按照一定比例进行稀释, 保证稀释后的  $\text{PO}_4^{3-}$  溶液浓度处于 2~20 mg/L 的检测区间内。按照标准曲线换算后, 将得到的数据按照稀释比例换算回原始待测样品的浓度。使用钼锑抗分光光度法检测各待测样品的仪器响应值, 并代入  $y=0.338x-0.087$  中得到  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度。如表 1 所示, 钼锑抗分光光度法测定  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度的平均回收率为 94.093%, 测试结果准确性略差于本研究的荧光探针法。此外, 钼锑抗分光光度法要求试剂必须避光冷藏储存, 实验应在短时间内完成, 而且所用试剂(浓硫酸)具有腐蚀性, 实验步骤较多, 检测繁琐。而 PAA-Ca(Ce) 纳米荧光探针法具有较好回收率, 且

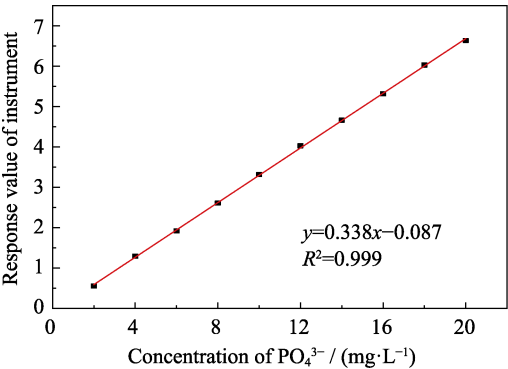


图 6 仪器响应值与  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度的关系图  
Fig. 6 Relationship between instrument response value and  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration

表 1 荧光探针法和钼锑抗分光光度法测定  $\text{PO}_4^{3-}$  的回收率  
Table 1 Recovery of  $\text{PO}_4^{3-}$  detected by fluorescence probe (FP) method in contrast to that by molybdenum-antimony resistance spectrophotometry (MARSP)

$\text{PO}_4^{3-}$ added / (mmol·L <sup>-1</sup> )	FP method		MARSP	
	$\text{PO}_4^{3-}$ detected/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Recovery/ %	$\text{PO}_4^{3-}$ detected/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Recovery/ %
10	9.633	96.326	9.096	90.962
20	20.611	103.056	18.694	93.472
30	28.856	96.186	26.634	88.780
40	40.009	100.022	37.719	94.299
50	48.634	97.269	47.779	95.559
60	60.304	100.507	55.134	91.891
70	68.462	97.802	66.391	94.844
80	79.159	98.949	75.191	93.989
90	87.964	97.737	87.080	96.755
100	100.526	100.526	94.505	94.505
110	110.024	100.022	99.928	90.844
120	116.614	97.178	115.249	96.041
130	131.590	101.223	122.934	94.564
140	139.348	99.534	125.775	89.839
150	145.318	96.879	140.961	93.974
160	161.331	100.832	156.500	97.813
170	171.033	100.608	164.876	96.986
180	176.630	98.128	170.588	94.771
190	191.582	100.832	178.270	93.826
200	198.966	99.483	196.275	98.138
Average recovery (mean±SD)/%		99.155±1.880	94.093±2.566	

SD: Standard deviation

步骤简单, 安全无害, 是一种有前景的无机磷检测方法。

2.5  $\text{PO}_4^{3-}$  检测方法特异性评价

为满足不同检测环境(如血清、水质)需求, 评价不同干扰物对纳米荧光探针检测  $\text{PO}_4^{3-}$  的影响。分别配制 10 mL, 浓度为 100 mmol/L 的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、CA 水溶液和 10% 的血清蛋白水溶液。将上述溶液分别加入到 20 mL Ca(Ce)浓度为 37.575 mmol/L 的 PAA-Ca(Ce) 纳米荧光探针溶液中, 充分反应 30 min 后测定反应产物的荧光发射图谱。PAA-Ca(Ce) 纳米探针对  $\text{PO}_4^{3-}$  表现出强烈的荧光信号, 而对其他常见离子和有机分子则没有特别明显的荧光反应(图 7(a, d))。因此, PAA-Ca(Ce) 纳米

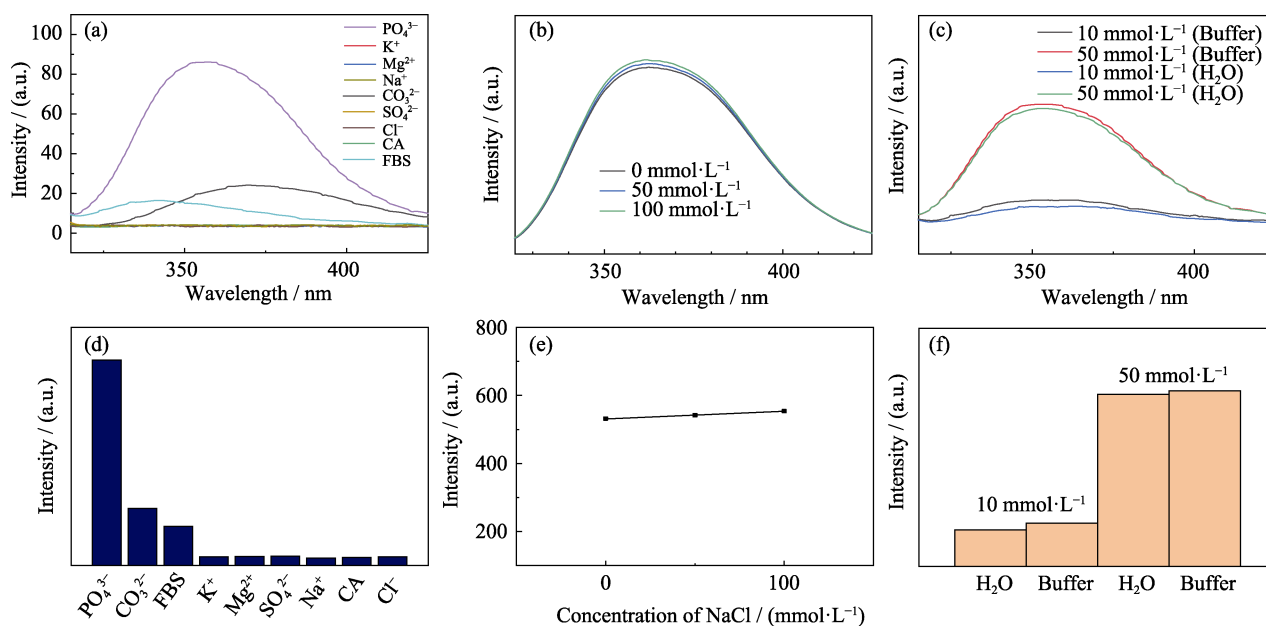


图 7 不同化学环境因素对 PAA-Ca(Ce) 纳米荧光探针的影响

Fig. 7 Influence of different chemical environmental factors on PAA-Ca(Ce) nano-fluorescent probes

(a, d) Fluorescence emission spectra of PAA-Ca(Ce) after reaction with various substances and comparison of fluorescence intensity at 352 nm emission peak, respectively; (b, e) Fluorescence emission spectra of PAA-Ca(Ce) reacting with  $\text{PO}_4^{3-}$  at different concentrations of NaCl (0–100 mmol/L) and comparison of emission peak fluorescence intensity at 352 nm, respectively; (c, f) Fluorescence emission spectra of  $\text{PO}_4^{3-}$  detected by PAA-Ca(Ce) under the conditions of  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration at 10 and 50 mmol/L while medium composed by ammonia-ammonium chloride buffer or ultra-pure water, and the fluorescence intensity comparison diagram of the emission peak at 352 nm; Colorful figures are available on website

探针对  $\text{PO}_4^{3-}$  具有较高的反应特异性和灵敏度, 可有效检测血清中  $\text{PO}_4^{3-}$  的含量。同时配制不同浓度的 NaCl (50、100 mmol/L) 和氨-氯化铵 (10、50 mmol/L) 缓冲液, 取 10 mL PAA-Ca(Ce) 纳米荧光探针与  $\text{PO}_4^{3-}$  的反应产物, 分别加入到上述缓冲液中, 探讨其对纳米荧光探针检测性能的影响。从图 7(b, c, e, f) 中可以看出, NaCl 溶液和氨-氯化铵缓冲液均对反应产物的荧光发射峰峰值强度没有明显影响。因此, 实际应用时可以使用缓冲液作为介质进行无机磷检测。

## 2.6 大鼠血清无机磷检测

为了进一步验证该 PAA-Ca(Ce) 探针在实际样品中的应用, 选择大鼠血清作为检测对象, 分别使用本研究所述纳米荧光探针和标准检测试剂盒(磷钼蓝分光光度法)进行血清无机磷检测(重复 3 次), 并对比结果显著性差异。如表 2 所示, 两种方法对相同大鼠血清无机磷含量检测结果没有显著性差异, 可以认为荧光探针法测定血清无机磷含量的结果具有可靠性。

## 2.7 荧光探针法检测无机磷机理分析

图 8 为 PAA-Ca(Ce) 纳米荧光探针检测无机磷机

理图。 $\text{Ce}^{3+}$  位于 298 nm 的激发峰归因于从基态( $^2\text{F}_{5/2}$ )到激发态( $^2\text{D}_{3/2}$ )的电偶极跃迁<sup>[30-31]</sup>。在溶液 pH 9 条件下  $\text{Ce}^{3+}$  与 PAA 侧链上带负电荷的羧基发生络合反应, 导致原本与  $\text{Ce}^{3+}$  配位的水分子损失而引发荧光猝灭<sup>[32]</sup>, 此时在 298 nm 的激发光照射下无明显荧光信号。在无机磷溶液环境中,  $\text{PO}_4^{3-}$  与 PAA 侧链羧基竞争与  $\text{Ce}^{3+}$  键合, 通过配体场效应使得  $\text{Ce}^{3+}$  表面电子分布变化, 从  $^2\text{D}_{5/2}$  到  $^2\text{D}_{3/2}$  的非辐射跃迁的能量损失减少, 而  $^2\text{D}_{3/2}$  到  $^2\text{F}_{5/2}$  (对应于 352 nm 发射峰) 的辐射跃迁增加<sup>[33]</sup>。因此, 随着加入  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度增大, 352 nm 处发射峰强度逐渐增大。

表 2 大鼠血清中  $\text{PO}_4^{3-}$  的测定Table 2 Determination of  $\text{PO}_4^{3-}$  in mouse serum

Sample	FP method	MARSP	p value
1	2.648	2.552	0.9626
2	2.375	2.451	
3	2.599	2.604	
Average±SD	2.541±0.119	2.536±0.064	

FP: Fluorescence probe; MARSP: Molybdenum-antimony resistance spectrophotometry; SD: Standard deviation



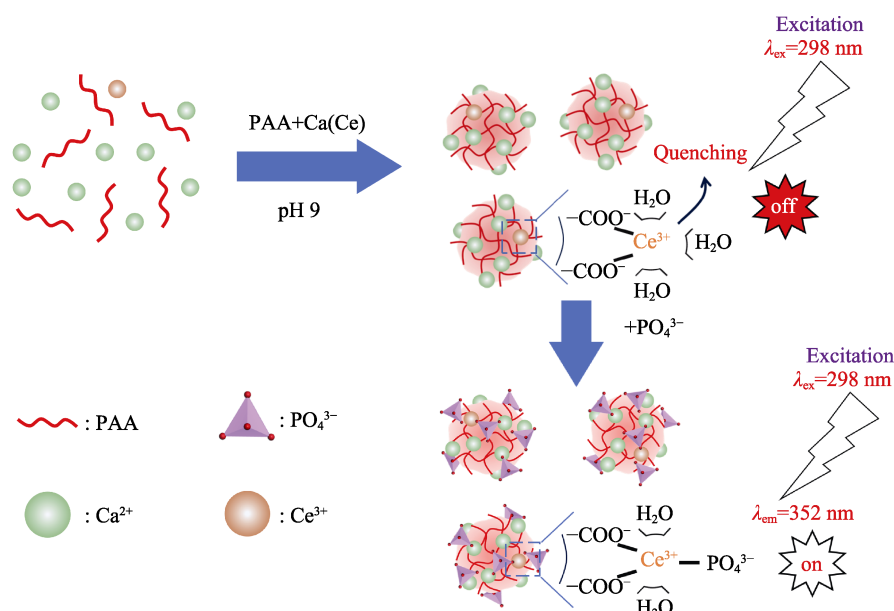


图8 荧光探针法检测无机磷的机理示意图

Fig. 8 Schematic of fluorescence probe method for sensing  $\text{PO}_4^{3-}$ 

### 3 结论

本研究利用 PAA 作为络合剂, 通过与  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Ce}^{3+}$  的络合反应制备出 PAA-Ca(Ce) 纳米团簇荧光探针。该纳米荧光探针在水相中具有良好的分散性, 并经过冷冻干燥再复溶和过滤灭菌后, 其荧光强度无明显变化。基于该探针与  $\text{PO}_4^{3-}$  反应后荧光强度变化规律, 提出了一种检测磷酸根的方法。( $\text{Ca}^{2+} + \text{Ce}^{3+}$ ) 浓度为  $37.575 \text{ mmol/L}$  的纳米荧光探针响应性好, 可靠性范围宽。与目前标准的钼锑抗分光光度法相比, 本研究提出的荧光探针法具有更高的回收率、更好的准确性和选择性, 氯化钠和氨-氯化铵缓冲液均不会对检测过程造成影响。在实际应用中, 该方法对大鼠血清无机磷检测具有高可靠性。综上, 本工作为无机磷检测提供了一种准确、安全、简便、稳定的方法。

### 参考文献:

- [1] CIESLIK B, KONIECZKA P. A review of phosphorus recovery methods at various steps of wastewater treatment and sewage sludge management. The concept of "no solid waste generation" and analytical methods. *Journal of Cleaner Production*, 2017, **142**(4): 1728.
- [2] WHYTE M P. Hypophosphatasia-aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016, **12**: 233.
- [3] PAN H, XU S, NI Y H. Rare-earth post-modified Zn-based coordination polymer microspheres: simple room-temperature preparation, fluorescent performances and application for detection of tryptophane. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, **283**: 731.
- [4] GUPTA SK, KADAM R M, PUJAR P K. Lanthanide spectroscopy in probing structure-property correlation in multi-site photoluminescent phosphors. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, **420**: 213405.
- [5] BINNEMANS K. Interpretation of europium (III) spectra. *Coordination Chemistry Reviews*, 2015, **295**: 1.
- [6] SYAMCHAND S S, SONY G. Europium enabled luminescent nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Luminescence*, 2015, **165**: 190.
- [7] XING Q, ZHANG X, WU D, et al. Ultrasound-assisted synthesis and characterization of heparin-coated  $\text{Eu}^{3+}$  doped hydroxyapatite luminescent nanoparticles. *Colloid Interface Science Communication*, 2019, **29**: 17.
- [8] LU Y, ENEA P, ZOLTÁN M. Direct determination of dissolved phosphate and silicate in seawater by ion exclusion chromatography sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(6): 3222.
- [9] SAKTHIVEL R, GANESH R, SUGANYA S. Approximate controllability of fractional neutral stochastic system with infinite delay. *Reports on Mathematical Physics*, 2012, **70**(3): 291.
- [10] 孙小鹏. 基于高光谱技术检测水体中无机磷含量的实验研究. 广州: 华南农业大学硕士论文, 2020.
- [11] 李翠婷, 王文志, 李东升, 等. 连续流动分析法测定水中总磷不确定度的评定. *环境与发展*, 2020, **32**(1): 140.
- [12] 王琴敏. 连续流动分析法同时测定水中总磷总氮. *当代化工研究*, 2021, **92**(15): 119.
- [13] HUANG Y, ZHANG Y B, HUO F J, et al. A new strategy: distinguishable multi-substance detection, multiple pathway tracing based on a new site constructed by the reaction process and its tumor targeting. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, **142**(43): 18706.
- [14] JIA Q, ZHANG R L, WANG Y D, et al. A metabolic acidity-activatable calcium phosphate probe with fluorescence signal amplification capabilities for non-invasive imaging of tumor malignancy. *Science Bulletin*, 2022, **67**(3): 288.
- [15] 胡悦, 权思齐, 李佳楠, 等. 多肽荧光探针特异性识别细胞中的  $\text{Cu}^{2+}$  和 Cys. *中国科学: 化学*, 2022, **52**(1): 117.
- [16] ZHENG B, FAN J Y, CHEN B, et al. Rare-earth doping in nanostructured inorganic materials. *Chemical Reviews*, 2022, **122**(6): 5519.
- [17] 刘文芳, 王连连, 王娜, 等. 新型稀土荧光探针的设计、合成及

- 在检测杀草强中的应用. 稀土, 2021, **42(5)**: 95.
- [18] TANG Z, CHEN H, HE H, *et al.* Assays for alkaline phosphatase activity: progress and prospects. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2019, **113**: 32.
- [19] HAN L, LIU S G, YANG Y Z, *et al.* A lanthanide coordination polymer as a ratiometric fluorescent probe for rapid and visual sensing of phosphate based on the target-triggered competitive effect. *Journal of Materials Chemistry C*, 2020, **8(37)**: 13063.
- [20] WU H F, TONG C L. A Specific turn-on fluorescent sensing for ultrasensitive and selective detection of phosphate in environmental samples based on antenna effect-improved FRET by surfactant. *ACS Sensors*, 2018, **3(8)**: 1539.
- [21] LI G Y, TONG C L. Dual-functional lanthanide metal organic frameworks for visual and ultrasensitive ratiometric fluorescent detection of phosphate based on aggregation-induced energy transfer. *Analytica Chimica Acta*, 2020, **1133**: 11.
- [22] 张小君. 磷酸钙基质中阴离子对  $\text{Eu}^{3+}$  荧光性能的影响规律及应用研究. 武汉: 武汉理工大学硕士论文, 2020.
- [23] WEI J J, ZHU C L, ZENG Z H, *et al.* Bioinspired cellulose - integrated MXene-based hydrogels for multifunctional sensing and electromagnetic interference shielding. *Interdisciplinary Materials*, 2022, **1(4)**: 495.
- [24] LI F, XING Q G, HAN Y C, *et al.* Ultrasonically assisted preparation of poly(acrylic acid)/calcium phosphate hybrid nanogels as pH-responsive drug carriers. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2017, **80**: 688.
- [25] ESCUDERO A, CALVO M E, RIVERA-FERNANDEZ S, *et al.* Microwave-assisted synthesis of biocompatible europium-doped calcium hydroxyapatite and fluoroapatite luminescent nanospindles functionalized with poly(acrylic acid). *Langmuir*, 2013, **29(6)**: 1985.
- [26] KIRWAN L J, FAWELL P D, VAN BRONSWIJK W. *In situ* FTIR-ATR examination of poly(acrylic acid) adsorbed onto hematite at low pH. *Langmuir*, 2003, **19(14)**: 5802.
- [27] DING H C, PAN H H, XU X R, *et al.* Toward a detailed understanding of magnesium ions on hydroxyapatite crystallization inhibition. *Crystal Growth & Design*, 2014, **14(2)**: 763.
- [28] LIU W Q, DU Z F, QIAN Y, *et al.* A specific colorimetric probe for phosphate detection based on anti-aggregation of gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, **176**: 927.
- [29] QIN J L, ZHONG Z Y, MA J. Biomimetic synthesis of hybrid hydroxyapatite nanoparticles using nanogel template for controlled release of bovine serum albumin. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2016, **62**: 377.
- [30] ZHOU W T, WANG L, LIU C, *et al.* Quantification of cyclic DNA polymerization with lanthanide coordination nanomaterials for liquid biopsy. *Chemical Science*, 2020, **11(14)**: 3745.
- [31] ZHANG J, WANG Y H, WEN Y, *et al.* Luminescence properties of  $\text{Ca}_{10}\text{K}(\text{PO}_4)_7:\text{RE}^{3+}$  (RE = Ce, Tb, Dy, Tm and Sm) under vacuum ultraviolet excitation. *Journal of Alloys and Compounds*, 2011, **509(14)**: 4649.
- [32] AZENHA M E, BURROWS H D, FONSECA S M, *et al.* Luminescence from cerium(III) acetate complexes in aqueous solution: considerations on the nature of carboxylate binding to trivalent lanthanides. *New Journal of Chemistry*, 2008, **32(9)**: 1531.
- [33] XU S H, LI L F, LIN D, *et al.* Rare-earth ions coordination enhanced ratiometric fluorescent sensing platform for quantitative visual analysis of antibiotic residues in real samples. *Chinese Chemical Letters*, 2023, **34(6)**: 308.