

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：孙莉倩

日期：2025年05月10日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ___ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：孙若倩

指导教师签名：丁玉洁

日期：2025 年 05 月 10 日

日期：2025 年 05 月 10 日

基于 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的上转换荧光复合材料的组装及 FRET 传感研究

摘要

上转换纳米材料(UCNPs)可通过多光子吸收过程将低能激发光转化为高能发射光。UCNPs 具有独特的光学特性,包括反斯托克斯位移大、在生物组织中的穿透力强、耐光漂白、背景荧光值小、化学稳定性良好和毒性低等,因此受到广泛关注,为传感检测、生物成像以及生物分析等领域中的分析检测提供了多种可能,推动了荧光标记探针的发展。基于荧光共振能量转移(FRET)的荧光检测具有灵敏度高、响应快、便携性好等优点,在分析中发挥着重要的作用。因此,本文基于 FRET 机理设计并合成了三种荧光探针,分别用于检测水果中残留的对氧磷(paraoxon)、人体血清中的胰岛素(Ins)以及水中的盐酸环丙沙星(CIP),其主要研究内容如下:

(1) 本实验以热分解法制备了油酸包裹的上转换纳米材料(OA-UCNPs),利用配体交换法将 OA-UCNPs 改性为易溶于水的柠檬酸钠修饰的上转换纳米材料(Cit-UCNPs)。5,10,15,20 四(4-吡啶基)卟啉(TPyP)和 Cit-UCNPs 通过静电作用复合制备出荧光复合材料 Cit-UCNPs@TPyP,该复合材料可以用于蔬菜表面 paraoxon 的检测。纳米探针以 Cit-UCNPs 作为能量供体,TPyP 作为能量受体。TPyP 的紫外-可见吸收光谱与 Cit-UCNPs 的荧光光谱有很好的重叠,因此 Cit-UCNPs 的荧光强度降低。由于 TPyP 具有芳香族结构,paraoxon

具有磷-氧双键($\text{P}=\text{O}$)和三个氧原子, 它们之间的相互作用导致形成 Π 堆叠复合物, paraoxon 与 TPyP 内环上的氮原子之间还存在氢键相互作用。因此, 由于 TPyP 和 paraoxon 的缔合, FRET 效率随着 paraoxon 的加入而逐渐降低, Cit-UCNPs 的荧光强度不断增强。该荧光复合材料可以在 0-8.6 μM 浓度范围内对 paraoxon 做定量分析, 检出限为 0.20 μM 。该上转换荧光纳米探针已成功应用于检测蔬菜表面残留的 paraoxon, 显示了探针在实际应用中的潜力。

(2) 利用配体交换法修饰 OA-UCNPs 得到 Cit-UCNPs, Cit-UCNPs 和罗丹明 B(RhB)被阳离子柱[6]芳烃(CP6)包封形成复合材料 Cit-UCNPs@CP6@RhB, 用于检测人血清中 Ins。在该复合材料中 Cit-UCNPs 作为能量供体, RhB 作为能量受体。供体 Cit-UCNPs 在 540 nm 处有很强的发射峰, 受体 RhB 在 550 nm 左右有一个宽的紫外吸收区, 通过主客体相互作用有效地被 CP6 包封, 从而缩短 UCNPs 与 RhB 之间的距离, 促使能量从 Cit-UCNPs 向 RhB 转移, 导致 FRET 过程的发生, Cit-UCNPs 的荧光猝灭, RhB 荧光强度增强。当将 Ins 分子加入到 UCNPs@CP6@RhB 复合物中时, RhB 被 Ins 置换, 荧光恢复。UCNPs@CP6@RhB 可以在 0-10 μM 浓度范围内对 Ins 进行定量检测, 检出限低至 0.32 μM 。更重要的是, 该荧光传感平台已成功应用于人血清中 Ins 的检测。

(3) 利用环糊精修饰 OA-UCNPs 得到环糊精包裹的上转换纳米材料(UCNPs@ γ -CD), 通过搅拌荧光桃红 B(PB)可以进入 γ -环糊精(γ -CD)的空腔内, 形成复合材料 UCNPs@ β -CD@PB, 用于检测 CIP。

其中 UCNPs 作为能量供体, PB 作为能量受体, PB 在 540 nm 左右有一个宽的紫外吸收区, 与 UCNPs 在 540 nm 处的荧光发射光谱有重叠, γ -CD 作为连接体可以缩短 UCNPs 与 PB 之间的距离, 使得 FRET 现象发生, 促使能量从 UCNPs 转移到 PB, UCNPs 的荧光猝灭。向体系中加入 CIP 后, CIP 可以通过与 PB 发生 n- π 荷移络合生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应, FRET 过程被中断, UCNPs 的荧光恢复。该荧光复合材料在 0-45 μ M 浓度范围内对 CIP 检测具有较高的灵敏度和选择性, 检出限低至 0.23 μ M。本文构建的荧光传感平台, 可以直接用于 CIP 的检测。

关键词: 上转换纳米材料, FRET, 对氧磷, 胰岛素, 盐酸环丙沙星, 荧光传感, 复合材料

Assembly and FRET sensing of NaYF₄:Yb,Er upconversion fluorescence composite materials

ABSTRACT

Upconversion nanomaterials (UCNPs) can convert low-energy excitation light into high-energy emission light through a multi-photon absorption process. UCNPs has unique optical properties, including large anti-Stokes shift, strong penetration in biological tissues, photobleaching resistance, small background fluorescence value, good chemical stability and low toxicity, so it has attracted wide attention, providing a variety of possibilities for the analysis and detection in the fields of sensing detection, biological imaging and biological analysis, and promoting the development of fluorescently labeled probes. Fluorescence detection based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) has the advantages of high sensitivity, fast response and good portability, and plays an important role in analysis. Therefore, based on FRET mechanism, three kinds of fluorescent probes were designed and synthesized in this paper, which were respectively used to detect paraoxon in fruits, insulin (Ins) in human serum and Ciprofloxacin hydrochloride (CIP) in water. The main research contents are as follows:

- (1) This experiment prepared oleic acid-coated upconversion

nanoparticles (OA-UCNPs) by the thermolysis method and modified them into water-soluble sodium citrate-modified upconversion nanoparticles (Cit-UCNPs) using a ligand exchange method. 5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphyrin (TPyP) and Cit-UCNPs form a fluorescent composite material, Cit-UCNPs@TPyP, through electrostatic interactions. This composite material can be used for detecting paraoxon on vegetable surfaces. The nanoprobe uses Cit-UCNPs as the energy donor and TPyP as the energy acceptor. The UV-visible absorption spectrum of TPyP overlaps well with the fluorescence spectrum of Cit-UCNPs, leading to a decrease in the fluorescence intensity of Cit-UCNPs. Because TPyP has an aromatic structure, paraoxon has a phospho-oxygen double bond ($\text{P}=\text{O}$) and three oxygen atoms, and the interaction between them leads to the formation of a π stacked complex, and there is also a hydrogen bond interaction between paraoxon and the nitrogen atoms on the inner ring of TPyP. Therefore, due to the association of TPyP and paraoxon, FRET efficiency gradually decreases with the addition of paraoxon, and the fluorescence intensity of Cit-UCNPs continues to increase. The fluorescence composite can be used for quantitative analysis of paraoxon in the concentration range of 0-8.6 μM , and the detection limit is 0.20 μM . The upconversion fluorescence nanoprobe has been successfully applied to detect paraoxon residues on vegetable surfaces, demonstrating its potential for practical applications.

(2) Oleic acid-coated upconversion nanoparticles (OA-UCNPs) were modified into Cit-UCNPs using a ligand exchange method, and Cit-UCNPs were encapsulated with rhodamine B (RhB) using cationic pillar[6]arene (CP6) to form a composite material, Cit-UCNPs@CP6@RhB, for Ins detection in human serum. In the composite material, Cit-UCNPs act as the energy donor, while RhB serves as the energy acceptor. Cit-UCNPs have a strong emission peak at 540 nm, and RhB has a broad UV absorption around 550 nm. Through host-guest interactions, CP6 effectively encapsulates RhB, shortening the distance between UCNPs and RhB, thereby facilitating energy transfer from Cit-UCNPs to RhB, which leads to the occurrence of FRET. This results in fluorescence quenching of Cit-UCNPs and fluorescence enhancement of RhB. When insulin molecules are added to the UCNPs@CP6@RhB composite, RhB is displaced by Ins, and the fluorescence recovers. UCNPs@CP6@RhB can quantitatively detect Ins in the 0-10 μM concentration range, with the detection limit as low as 0.32 μM . More importantly, this fluorescent sensing platform has been successfully applied for the detection of Ins in human serum.

(3) Cyclodextrin-modified oleic acid-coated upconversion nanoparticles (OA-UCNPs) were used to obtain γ -cyclodextrin (γ -CD) encapsulated upconversion nanoparticles (UCNPs@ γ -CD). By stirring, fluorescent pink B (PB) can enter the cavity of γ -CD, forming the

composite material UCNPs@ β -CD@PB, which is used for detecting CIP. In this system, UCNPs act as the energy donor and PB as the energy acceptor. UCNPs have a strong emission peak at 540 nm, and PB has a broad UV absorption region around 540 nm, which overlaps with the fluorescence emission spectrum of UCNPs at 540 nm. γ -CD serves as a linker that shortens the distance between UCNPs and PB, leading to the occurrence of FRET. The energy is transferred from UCNPs to PB, resulting in the fluorescence quenching of UCNPs. When CIP is added to the system, CIP can hinder the FRET effect by forming an insoluble complex with PB through n- π charge transfer interactions, interrupting the FRET process and restoring the fluorescence of UCNPs. The fluorescence composite has high sensitivity and selectivity for CIP detection in the concentration range of 0-45 μ M, and the detection limit is as low as 0.23 μ M. The fluorescence sensing platform developed in this study can be directly applied for the detection of CIP.

Author: Ruoqian Xu (Chemistry)

Supervised by Yujie Ding

KEY WORDS: upconversion nanoparices, FRET, paraoxon, insulin, ciprofloxacin hydrochloride, fluorescence sensing, composite materials

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 上转换纳米材料概述.....	1
1.2 上转换纳米材料的发光机理.....	1
1.3 上转换纳米材料的制备方法.....	2
1.3.1 高温固相合成法.....	3
1.3.2 溶胶-凝胶法.....	3
1.3.3 溶解热法.....	4
1.3.4 热分解法.....	5
1.3.5 燃烧法.....	6
1.4 上转换纳米材料的表面功能化.....	6
1.4.1 配体交换法.....	7
1.4.2 配体氧化法.....	7
1.4.3 表面硅烷基化法.....	8
1.5 上转换纳米材料的应用.....	8
1.5.1 防伪安全.....	8
1.5.2 癌症治疗和靶向运输.....	9
1.5.3 食品安全检测.....	10
1.5.4 生物传感和生物成像.....	11
1.5.5 光电探测器和光伏器件.....	11
1.5.6 基于 FRET 的荧光传感应用.....	12
1.6 本论文选题思路及主要工作.....	18
第 2 章 关于 Cit-UCNPs@TPyP 的比率式 off-on 探针对有机磷农药的传感研究	20
2.1 引言.....	20
2.2 实验部分.....	21
2.2.1 实验试剂.....	21
2.2.2 实验仪器.....	22
2.2.3 复合材料的制备.....	22
2.3 结果与讨论.....	24
2.3.1 TEM 和 DLS 表征.....	24
2.3.2 XRD 和红外光谱表征.....	25
2.3.3 Zeta 电位表征.....	26
2.4 荧光检测.....	27
2.4.1 FRET 机制.....	27
2.4.2 材料制备与传感环境的优化.....	28
2.4.3 传感过程.....	29
2.4.4 干扰试验.....	31
2.5 实际样品检测.....	32
2.6 结论.....	33
第 3 章 关于 Cit-UCNPs@CP6@RhB 的比率式 off-on 探针对胰岛素的传感研究	34

3.1 引言	34
3.2 实验部分	36
3.2.1 实验试剂	36
3.2.2 实验仪器	36
3.2.3 复合材料的制备	37
3.3 合成表征	39
3.3.1 TEM 和 XRD 相关表征	39
3.3.2 EDS、XPS 和 XRD 表征	40
3.3.3 核磁表征	41
3.3.4 红外光谱表征	42
3.3.5 Zeta 电位和热重表征	43
3.4 荧光检测	44
3.4.1 发生 FRET 的机理	44
3.4.2 实验条件的优化	45
3.4.3 传感过程	46
3.4.4 干扰试验	47
3.5 实际样品检测	48
3.6 结论	49
第 4 章 关于 UCNPs@ γ -CD@PB 的比率式 off-on 探针对盐酸环丙沙星的传感研究	50
4.1 引言	50
4.2 实验部分	51
4.2.1 实验试剂	51
4.2.2 实验仪器	52
4.2.3 荧光复合材料的制备	52
4.3 合成表征	53
4.3.1 TEM 及 XRD 的相关表征	53
4.3.2 EDS 表征	54
4.3.3 XPS 的相关表征	55
4.3.4 红外光谱表征	56
4.4 荧光检测	57
4.4.1 发生 FRET 的机理	57
4.4.2 实验条件的优化	58
4.4.3 传感过程	59
4.4.5 盐酸环丙沙星的干扰检测	61
4.5 实际样品检测	62
4.6 结论	63
第 5 章 全文总结与展望	64
5.1 全文总结	64
5.2 展望	65
参考文献	66
攻读学位期间发表的论文	79
致谢	80

第 1 章 绪论

1.1 上转换纳米材料概述

上转换纳米材料(UCNPs)是一类具有独特光学特性的功能材料,其组成和发光机制与常规发光材料存在本质区别。UCNPs 通常由无机基质材料(如 NaYF_4 等)和均匀掺杂其中的稀土离子(如 Yb^{3+} , Er^{3+} 等)共同构成^[1-3],其最显著的特征是能够通过多光子过程实现反斯托克斯发光(Stokes)^[4, 5]。具体而言,这类材料可吸收低能量的近红外光(通常为 980 nm),并通过连续的能量传递上转换过程,最终发射出高能量的紫外-可见光(如 540 nm 绿光或 660 nm 红光)。斯托克斯定律认为材料只能受到高能量的光激发,发射出低能量的光,而上转换发光则与之相反,指的是材料受到低能量的光激发,发射出高能量的光。直到目前为止自然界中并没有发现这种材料,只能经过人工合成的方法得到。

1.2 上转换纳米材料的发光机理

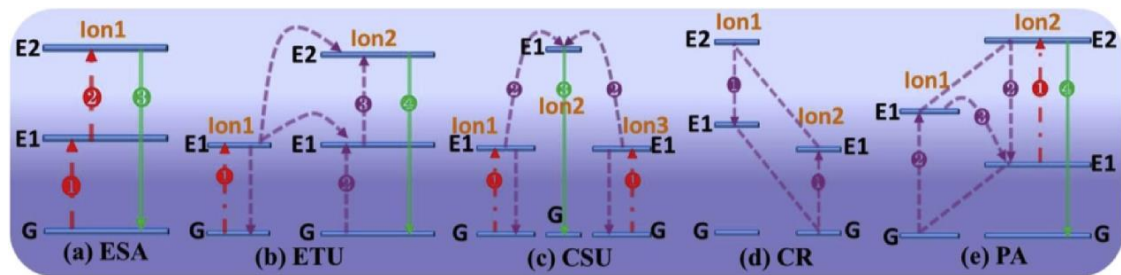


图 1-1 上转换纳米材料发光机理^[6]

Fig. 1-1 Luminescence mechanism of upconversion nanomaterials

UCNPs 发光过程本质上是一个反斯托克斯发光过程。在 20 世纪 50 年代开始研究上转换发光现象^[7],直到 60 年代 Auzel 和 Wright 等人研究了上转换发光的机制,并提出激发态吸收(ESA)、能量转移上转换(ETU)和协同敏化上转换(CSU)的三种上转换发光机制^[8, 9]。随着新材料的出现,上转换荧光纳米颗粒的发光机理不断被完善,目前主要有如下五种发光机制:ESA、ETU、CSU、交叉弛豫(CR)和光子雪崩(PA),如图 1-1 所示。

激发态吸收上转换是上转换发光的基本机制之一,是 Bloembergen 在 1959 年提出的^[10]。其原理是单个或者单种离子通过两步或者多步的能量吸收使其从

稳定的基态跃迁到极不稳定的异常活跃的高能激发态，然后以光能的形式产生辐射跃迁回到基态。

在 ETU 中，通常使用两种不同类型的稀土离子(敏化剂和发射体一同掺杂)来产生上转换。首先，满足能量匹配的两种离子，一种负责能量的吸收获取，然后通过能量共振转移的过程，无损耗的将能量传递给另外一种离子，从而触发其发生能级跃迁引起高能量的发射完成上转换。

因为 CSU 跃迁过程中涉及准虚能级对，所以 CSU 的效率通常低于 ESA 或 ETU，需借助高阶量子微扰理论解释。它虽然效率较低，但通过采用局域激发的方式补偿其效率不足，可实现其他上转换机制无法达到的高分辨成像。

CR 过程是一种非辐射过程，能量在相邻掺杂离子间重新分配是离子-离子相互作用的基本结果。其效率与掺杂剂的浓度密切相关，它是导致发光“浓度猝灭机制”的主要原因，但通过合理调控，CR 可被用于精细调节 UCNPs 的发光颜色或者构建高效的光子雪崩机制。

本质上，PA 是一个包含激发光 ESA 过程和产生反馈的高效 CR 过程的循环机制。PA 具有在临界泵浦阈值以下透射率保持稳定发射、超过阈值后荧光强度呈现数量级增长上升时间和需要秒量级的建立时间等显著特征。

1.3 上转换纳米材料的制备方法

UCNPs 种类丰富，其中以镧系离子掺杂的氟化物纳米晶体研究最为广泛，这类材料因其较高的发光效率和良好的稳定性而备受关注。相比之下，稀土氧化物基 UCNPs 通常表现出较低的发光效率；氧化物基质材料虽然易于合成，但存在机械强度不足和化学稳定性较差的缺点；而镧系离子掺杂的氯化物则对水分敏感，限制了其实际应用。得益于其独特的光物理化学性质，UCNPs 已在多个领域展现出重要应用价值，包括但不限于光催化、太阳能电池、新能源开发、生物医学及国防科技等。当前研究的关键挑战在于开发具有可控粒径和优异单分散性的荧光纳米粒子，这对实现其性能优化和实际应用至关重要。目前合成 UCNPs 主要有高温固相合成法、溶胶-凝胶法、水热溶剂热法、热分解法、燃烧法等。

1.3.1 高温固相合成法

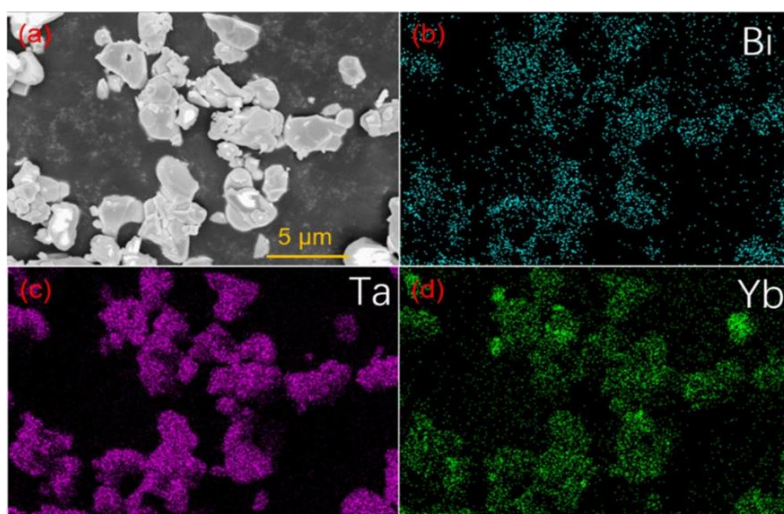


图 1-2 (a) BTO:Ho³⁺,Yb³⁺样品 SEM 图；(b)-(d)对应的元素映射^[11]

Fig. 1-2 (a) SEM graph of BTO:Ho³⁺,Yb³⁺ sample; (b)-(d) The corresponding elemental mappings.

高温固相法对原料的纯度和颗粒度有一定要求，需选择合适的原料并按比例加入助溶剂，经过球磨成细颗粒并混合均匀。然后在保护气氛下，在 1000-1600 °C 的高温下煅烧一定时间(是具体材料而定)，最后通过洗粉、筛选、真空或鼓风干燥得到成品。该方法具有不使用溶剂、操作简单、成本低、产率高，且结晶纯度高优点，是制备固体材料的常用方法。

2024 年 Fan^[11]通过高温固相法制备了一系列 BiTa₇O₁₉(BTO):Ho³⁺,Yb³⁺荧光粉，在 980 nm 激光激发下表现出出色的纯绿色上转换发光(UCL)。研究结果表明 BTO 是一种优异的 UCL 宿主，BTO:Ho³⁺,Yb³⁺可用于 UCL 显示和温度传感。图 1-2 显示了高温固相法制备的荧光粉 BiTa₇O₁₉(BTO):Ho³⁺,Yb³⁺的形貌。这为未来的传感材料和传感器的研发提供了新的思路。

1.3.2 溶胶-凝胶法

溶胶-凝胶法是在一定温度下，稀土化合物溶液通过化学反应由溶胶转变为凝胶，然后对半成品凝胶进行热干燥，得到无机或复合材料。这种方法属于湿法化学中的一种，能有效避免传统高温合成法的高温处理，因此逐渐取代了高温固相法。但溶胶-凝胶法原料具有价格昂贵、反应周期长、产品严重团聚、工序繁琐、粒径不易控制等缺点，限制了其在生物医用领域的应用。

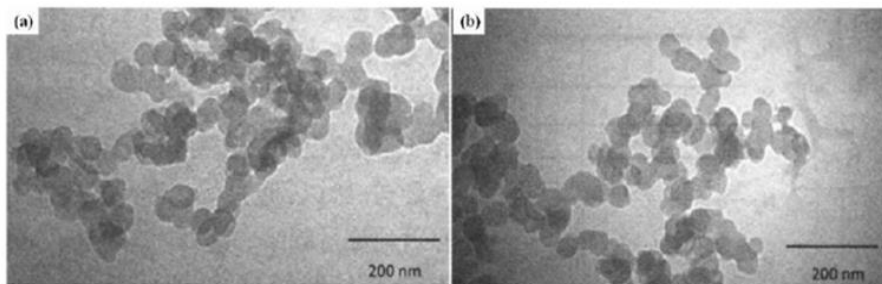


图 1-3 (a)和(b)为 $Y_{1.828}Yb_{0.16}Ho_{0.002}O_3$ 和 $Y_{1.438}Ga_{0.4}Yb_{0.16}Ho_{0.002}O_3$ 荧光纳米晶 TEM 图^[12]

Fig. 1-3 (a) and (b) are TEM images of $Y_{1.828}Yb_{0.16}Ho_{0.002}O_3$ and $Y_{1.438}Ga_{0.4}Yb_{0.16}Ho_{0.002}O_3$ fluorescent nanocrystals, respectively.

汤玲丽等人^[12]利用此方法成功合成了 Gd^{3+} 、 Ho^{3+} 和 Yb^{3+} 共掺的 Y_2O_3 纳米晶，并研究不同掺杂离子浓度对纳米晶荧光性能的影响，如图 1-3 所示。Bartha 等人^[13]利用溶胶-凝胶法制备了 $NaYF_4:Yb,Er$ 上转换纳米材料以及其结晶机理。

1.3.3 溶解热法

溶解热法是在高压反应条件下通过使用液态水或耐高温有机溶剂作为介质对材料进行合成的方法。水热合成法是一项比较久远的研究，侧重于反应过程的研究。

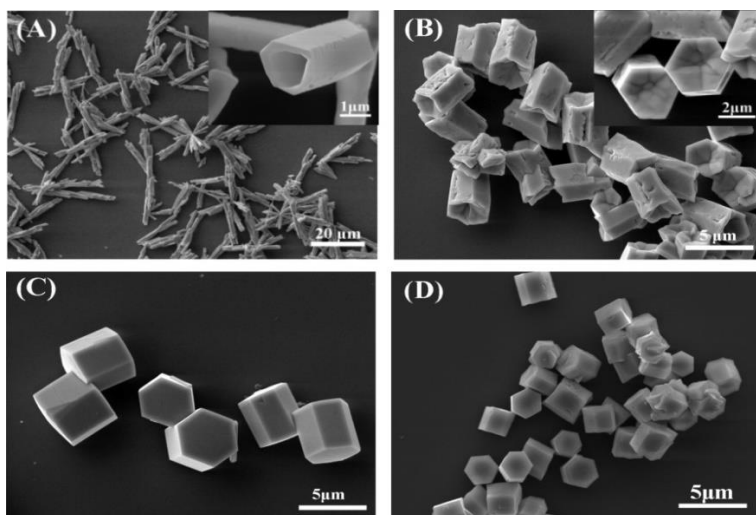


图 1-4 β - $NaYF_4$ 晶体在不同 pH 值下的 FE-SEM 图像：(A) pH = 3, (B) pH = 5, (C) pH = 7, (D) pH = 10^[14]

Fig. 1-4 FE-SEM images of the as-prepared β - $NaYF_4$ crystals obtained at different pH values: (A) pH= 3, (B) pH= 5, (C) pH= 7, and (D) pH= 10.

在 20 世纪末, 水热合成作为一种温和的合成路线逐渐应用于发光材料领域。水热合成方法具有操作简便、所需反应温度低、产物的粒径形貌易于调控等特点。例如, 王传英等人^[14]利用简便的水热法合成了具有可预测尺寸和形貌的六方 $\beta\text{-NaYF}_4:20\% \text{Yb}^{3+}, 1\% \text{Er}^{3+}$ 晶体, 并研究了 UCNP 发光特性以及不同 pH 值的影响, 该研究为合成具有可预测形态和尺寸以及可调节发光特性的 $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 晶体提供了一种简便的方法, 可适用于其他稀土氟化物化合物, 如图 1-4 所示。类似的工作, Li 及其课题组^[15]通过水热法成功合成出具有单分散性, 高结晶度, 高荧光性能, 粒径为 10 nm 特征的上转换荧光纳米颗粒 $\text{CaF}_2:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 。

1.3.4 热分解法

热分解法是制备单分散 UCNP 的经典方法。该方法通常在水无氧的惰性气氛(如氩气或氮气)保护下进行, 并以高沸点有机溶剂(如 1-十八烯、油酸、油胺或其混合物)作为反应介质。其显著优势在于所合成的纳米颗粒具有高结晶度、纯晶相、强上转换发光性能、形貌均一且单分散性优异等。然而, 该方法所得产物通常为油溶性, 需通过后续表面修饰以实现水溶性和生物相容性。

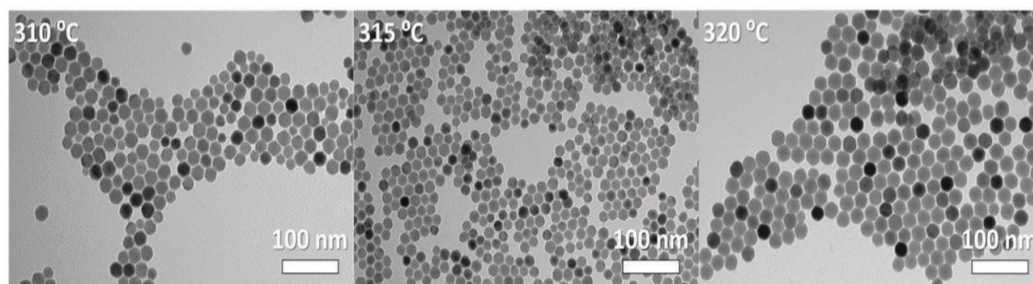


图 1-5 在 310 °C, 315 °C 和 320 °C 下制备的 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 纳米颗粒的 TEM 图像^[16]

Fig. 1-5 TEM images of $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanoparticles prepared at 310 °C, 315 °C, and 320 °C.

Nigoghossian 和同事们^[16]利用热分解法采用油酸作为溶剂, 在高温(> 300 °C)条件下分解稀土氟化物前驱体, 成功制备了单分散性掺杂的 UCNP($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$), 并研究了不同温度下制备的 UCNP 的晶相, 发现在 310 °C, 315 °C 获得立方体形式, 在 320 °C 获得六方相的形式, 如图 1-5 所示。Wu 等人^[17]采用简单的一锅热分解方法成功制备了 Yb^{3+} 和 Er^{3+} 共掺杂的单分散、均匀、空心结构的六方氟化钪钠纳米颗粒($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$), 并利用 HCl 酸化

处理得到的纳米颗粒均匀分散在水中。Ding 等人^[18]利用热分解法制备了油酸包裹的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ 纳米颗粒对其改性, 并应用于检测人体血清中的胆固醇。

1.3.5 燃烧法

燃烧法是将反应物按化学计量比混合并点燃, 利用反应过程中产生的热量维持高温直至反应完成, 燃烧产物即为目标产物。该方法克服了高温固相法粒径大、发光强度低的缺点, 工艺简单且产品纯度高。

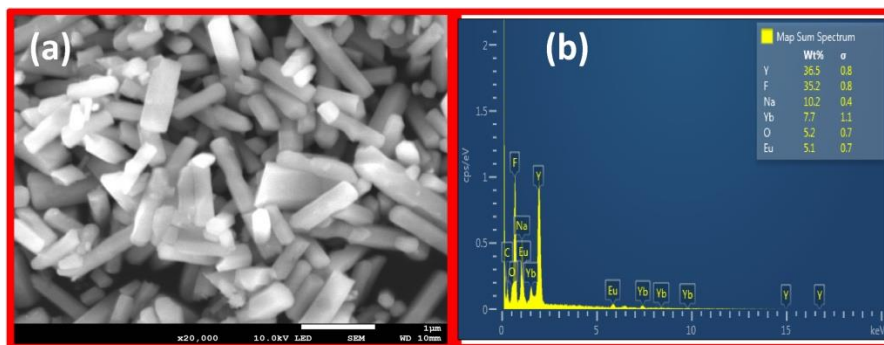


图 1-6 $\text{NaYF}_4:7\% \text{Eu}, 10\% \text{Yb}$ 荧光粉的 SEM 图(a)和 EDS 光谱图(b)^[19]

Fig. 1-6 (a) SEM image and (b) EDS spectrum of the $\text{NaYF}_4:7\% \text{Eu}, 10\% \text{Yb}$ phosphor.

Pathak 等人^[19]通过燃烧法合成了 Eu, Yb 共掺杂的 NaYF_4 荧光粉。该工作固定了 Eu 掺杂, 并研究了 Yb 掺杂浓度对结构、形态和发光性能的影响。如图 1-6 所示。所制备的荧光纳米复合材料表面形态显示具有尖锐的六角形边缘的微棒状结构, 能量色散 X 射线光谱证实了所需材料的形成。此外, 黄敏文等人^[20]也通过燃烧法合成了 $\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 共掺杂氟化钇钠微粉, 研究了发光性能。结果表明, 该方法合成的 UCNP 具有较高的上转换效率, 且荧光发射光谱峰较尖。

1.4 上转换纳米材料的表面功能化

UCNPs 的表面大部分含有丰富的油酸链, 致使其难溶于水。必须对 UCNPs 的表面进行生物相容性的改性以适应生物体组织微环境的要求。迄今为止, 研究者开发出多种方法用于 UCNPs 的表面功能化, 例如配体交换法、配体氧化法、壳层包裹法、层层组装法以及配体吸附法等。

1.4.1 配体交换法

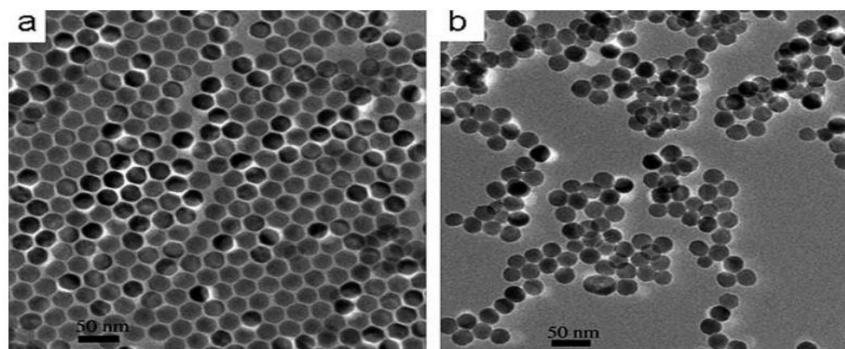


图 1-7 OA-UCNPs(a)和 DMSA-UCNPs(b)的 TEM 图^[21]

Fig. 1-7 TEM images of OA-UCNPs (a) and DMSA-UCNPs (b).

配体交换法基于不同配体与 UCNPs 表面稀土离子的相互作用。常用的配体交换试剂包括聚乙二醇(PEG)-磷酸酯、聚丙烯酸(PAA)、己二酸(HAD)、3-巯基丙酸(3MA)、二巯基琥珀酸(DMSA)、柠檬酸盐和癸二羧酸(DDA)等,用以替代原有的疏水性 OA 配体。Chen 等人^[21]在搅拌下加入大量的 DMSA, DMSA 配体通过其羧基键合作用在纳米晶体表面进行配位,得到 DMSA 修饰的 NaYF₄:Yb,Er,从 TEM 图可以看出修饰后的复合材料在尺寸上保持单分散且无明显的形状变化和聚集,如图 1-7 所示。

1.4.2 配体氧化法

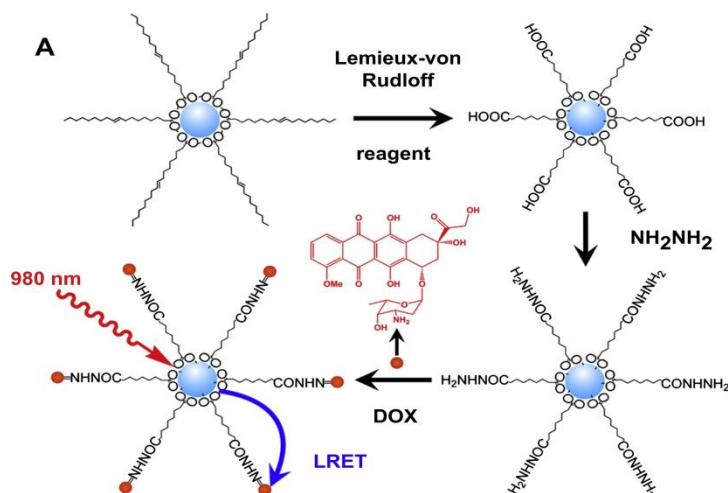


图 1-8 NaYF₄-阿霉素偶联物的合成示意图^[22]

Fig. 1-8 A diagram showing the synthesis of NaYF₄-doxorubicin conjugate.

该方法利用强氧化剂将油酸或油胺氧化成亲水基团羧基。氧化后的 UCNPs 表面会产生大量的羧基,这不仅使纳米晶在水中具有良好的溶解度,而且其表

面丰富的活性基团可以直接偶联生物分子进一步提高其生物相容性。Lin 等人^[22]将油酸包裹的上转换纳米材料通过 Lemieux-von Rudloff 试剂将油酸的双键氧化成羧基，使得疏水性的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ 纳米颗粒呈水溶性，如图 1-8 所示。

1.4.3 表面硅烷基化法

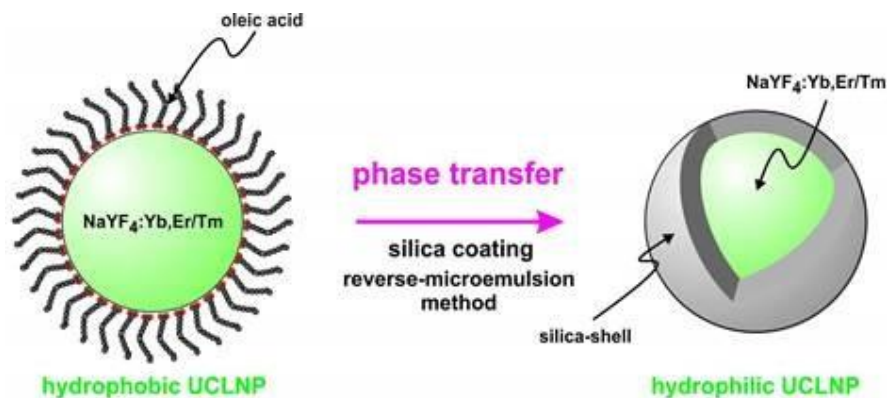


图 1-9 OA-UCNPs 表面硅烷基化的合成示意图^[23]

Fig. 1-9 Synthesis diagram of OA-UCNPs surface silanization.

UCNPs 表面硅烷基化法的基本方法是硅氧烷单体水解和凝聚后，在 UCNPs 表面生长出无定形硅壳，可以使用反相微乳液或 Stöber 法来实现这一策略。Wilhelm 等人^[23]使用反相微乳液法对纳米材料进行二氧化硅涂层，随后使用氨基反应性硅化试剂进行功能化，制备了溶于水单分散性良好的纳米颗粒，制备过程如图 1-9 所示。

1.5 上转换纳米材料的应用

1.5.1 防伪安全

近年来，科研人员提出了多种新的合成方法和策略，以优化上转换发光，广泛应用于货币、药物、高档消费品的防伪及指纹、身份证、护照等身份识别领域。将独特的上转换发光与多种形式的图形编码方法有机结合，可设计和构建出各种独特的可视化光学图案^[24]，有效实现大容量的信息加密，为革新防伪策略提供了新思路^[25, 26]。

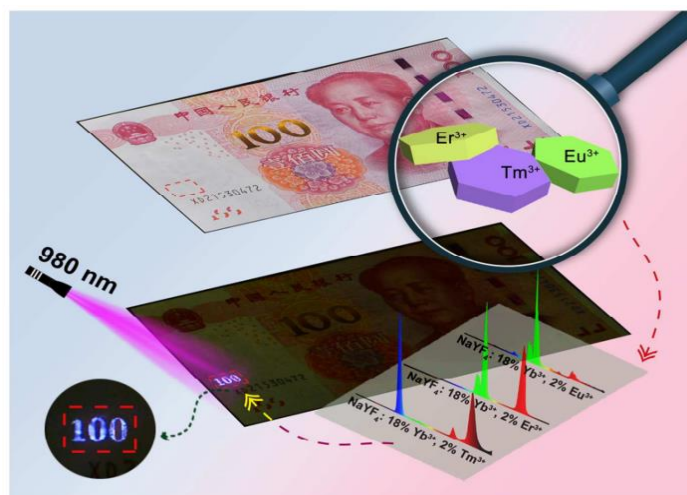


图 1-10 丝网印刷图案用于人民币防伪应用^[27]

Fig. 1-10 Screen printing patterns are applied for RMB anticounterfeiting application.

通过上转换发光油墨印制荧光图案用于货币防伪也是当前防伪领域的研究热点之一。武汉大学吴伟等^[27]通过水热法大规模合成了均一的六方相 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米晶作为荧光油墨原料，在 980 nm 照射下经丝网印刷的人民币复印纸上数字“100”发出蓝色荧光，如图 1-10。此外，Kaboli 等人^[28]将 UCNP 和无掩模光刻技术结合制备了特殊的防伪光学活性表面。他们首先合成了 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 纳米粒子，将两者混合后采用负性光刻技术制作了日光下不可见而 980 nm 光照下显示绿色荧光的二维码。

1.5.2 癌症治疗和靶向运输

癌症已成为全球主要死亡原因，因此，医学领域采用了多种生物材料来制造药物或研究合适的材料，以解决药物相关问题。有一些方法可以克服癌症治疗的副作用，最有效的方法之一是以微胶囊或纳米胶囊的形式制造生物材料。在上转换方法中，可以制造核壳配合物以获得更好的产率。

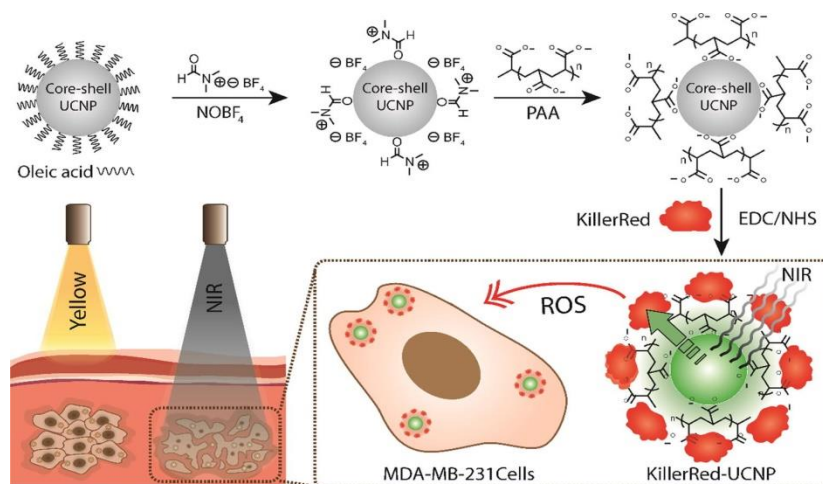


图 1-11 KillerRed-UCNPs 组装的示意图及其在深穿透光动力治疗中的应用^[29]

Fig. 1-11 A schematic illustration of KillerRed-UCNP assembly and its application in the centimetre-deep PDT

Liang 等人^[29]使用了一种新的生物光敏剂，它是一种被称为“KillerRed”的荧光蛋白。它被认为是现有光敏剂的成功替代品，适用于 PDT。这种光敏剂的缺点是，在可见光谱范围内的激发光下，它在目标组织中的穿透力有限。Liang 等人利用 UCNPs 克服了这一限制。这些 UCNPs 能够将穿透深度的近红外光转化为绿光，从而局部激发 KillerRed 产生 ROS，消除组织深层部分的癌细胞，如图 1-11 所示。

1.5.3 食品安全检测

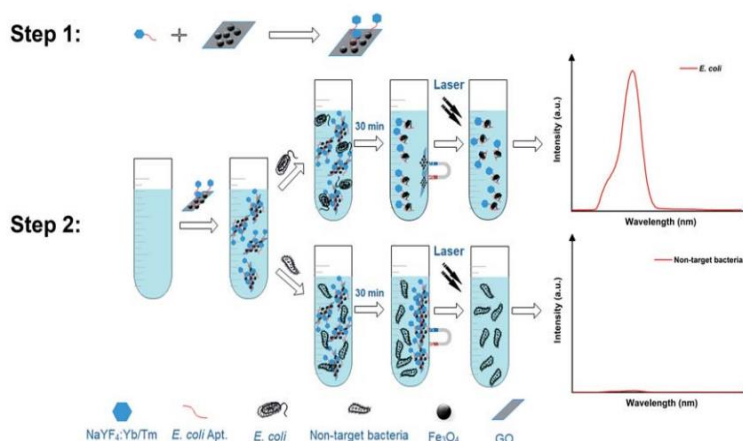


图 1-12 UCNPs 荧光生物传感器检测大肠杆菌图^[30]

Fig. 1-12 The UCNPs fluorescence biosensor for E.coli detection

化学品在农业和粮食生产中的滥用增加了食品中的污染物，最终影响人类健康。随着公众对食品安全的关注，急需快速、灵敏的检测技术。基于 UCNPs

的传感器独特的生物物理特性，成为检测食品污染物的创新方法。

Yao 等人^[30]创造了一种“开启”荧光生物传感器，用于快速检测大肠杆菌。在本研究中，所合成的 UCNPs 被用作供体，GO@Fe₃O₄ 被用作受体。在大肠杆菌的存在下，将 UCNPs-Apt 纳米探针从 GO@Fe₃O₄ 上剥离，荧光信号强度与细菌浓度呈正相关，如图 1-12 所示。

1.5.4 生物传感和生物成像

使用下移发光纳米材料的传统光学成像已经成为视觉监测细胞和组织相互作用的常用方法^[31-33]。尽管其具有高亮度等特性，但生物背景自荧光、穿透深度不足、可见光或紫外光激发下对生物样品的损伤等缺点，仍限制了它们在生物学中的应用。所以具有优异的生物成像性能、高信噪比(S/N)和无光漂白等特点的 UCNPs，可用于体外^[34, 35]和体内^[36, 37]的生物成像应用。

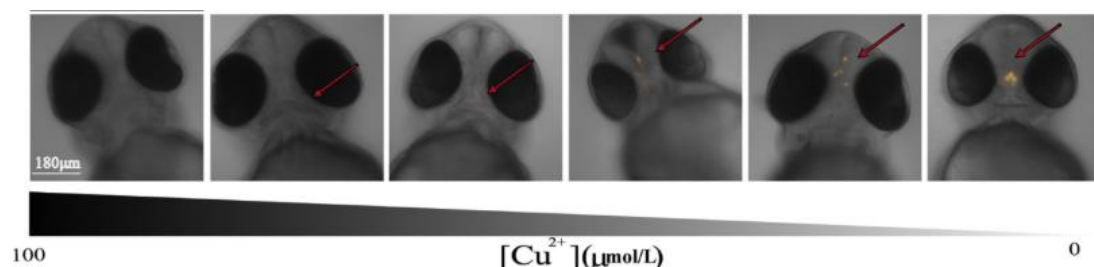


图 1-13 不同 Cu²⁺ 浓度下斑马鱼胚胎的 CLSM 图像^[38]

Fig. 1-13 CLSM images of living zebra fish embryos with different concentrations of Cu²⁺

Shi 和他的同事^[38]开发了一种基于 UCNPs 的智能纳米探针，通过基于 FRET 的发光强度变化来检测 Cu²⁺ 浓度和成像。在体内实验中，可以在斑马鱼的大脑中清楚地观察到 UCNPs 的绿色和红色发光。此外，随着注入的 Cu²⁺ 浓度的增加，相应地观察到发光猝灭，如图 1-13 所示。因此，这项作为我们提供一种结合金属离子检测和多模态生物成像的新策略。

1.5.5 光电探测器和光伏器件

由于大多数当代近红外光电探测器集中在宽带检测，所以其面临着设计高灵敏度窄带 NIR 光电探测器的挑战，其输出信号中的可见光噪声较低，用于特定用途^[39, 40]。通常，光电探测器仍在适应和修改来自新材料的输入，例如 UCNPs^[2, 41]。Yan 等人^[41]用油酸封端的 NaYF₄:Yb,Er 纳米颗粒作为种子，在油胺的存在下，由硬脂酸镉和 Bu₃PSe 前体生长 CdSe 量子点。带正电荷的胺配体有利于在 NaYF₄:Yb,Er 核上生长 CdSe。在该系统中，在 980 nm 激发下观察到

红色发射，作为能量转移的结果从上转换的 Er^{3+} 发射到 CdSe。该原理被应用于开发显示亚带隙光电导的光电器件。

为保护世界能源前景，太阳能电池的效率需要进一步提升到可持续和商业化的水平。近年来，UCNPs 被认为是提高光伏器件效率的可行选择，因为它们能够将入射光的低能量近红外上转换为高能量的可见或紫外发射范围，随后可被光伏器件吸收^[42-44]，具有良好的前景。

1.5.6 基于 FRET 的荧光传感应用

FRET 通过供体与受体长距离偶极-偶极作用实现非辐射能量转移。在光激发过程中，供体激发态的能量可以转移到基态受体上。在供体与受体均为荧光团的情况下，FRET 一般称为荧光共振能量转移^[45]，如图 1-14 所示。

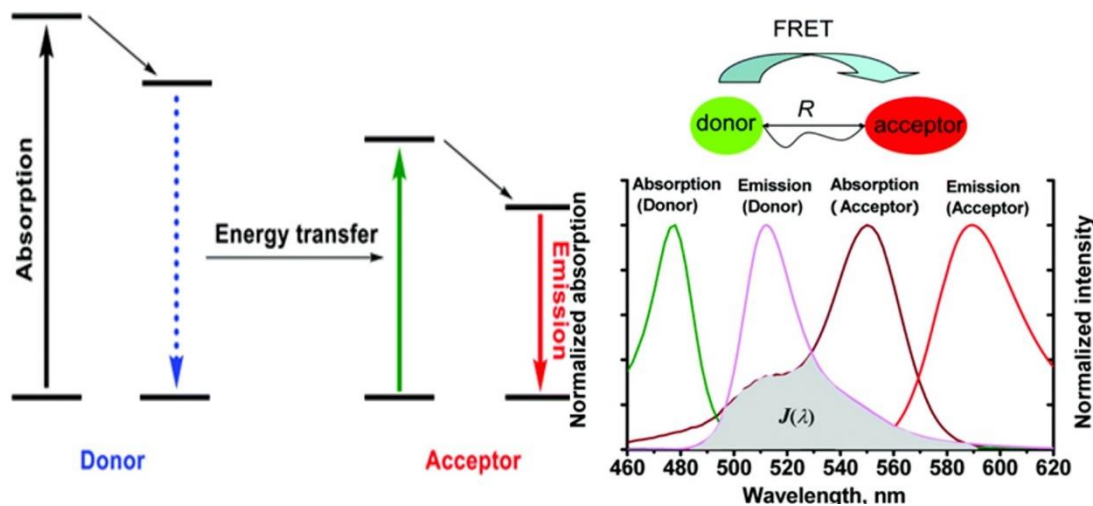


图 1-14 FRET 机理示意图^[45]

Fig. 1-14 Schematic diagram of FRET mechanism

自 1948 年 Foster 提出 FRET 理论以来，科研界对其进行了深入研究和广泛应用。FRET 体系包括能发出荧光的供体和能够猝灭荧光的受体材料。FRET 产生需要满足如下的条件：(1) 能量供体与能量受体之间的距离必须接近；(2) 供体与受体荧光团的排列方式应该满足 FRET 的要求；(3) 供体的荧光发射光谱与受体的紫外吸收光谱必须有重叠^[46]。当 FRET 系统或分子接触到特定的目标分析物时，FRET 过程被触发或阻断，引起荧光信号的改变，从而达到检测被测物质的目的。

1.5.6.1 在生物传感中的应用

生物传感器是信号传感器和生物成分的融合，在医学领域的应用具有重要意义，用于检测生物大分子^[47]、小分子、微生物^[48]、无机物^[49]和肿瘤标志物，监测酶活性，以及分析化学中的高通量筛选^[50]。在生物传感器的发展中，UCNPs 被认为是敏感的生化传感器^[51, 52]。纳米结构金属离子基生物传感器被称为纳米生物传感器，其固定化生物受体探针对目标分析物分子具有选择性，目标分析物分子通常由含有生物识别元件的敏感组分组成，或者传感器与生物识别元件共价连接。目标分析物和生物受体之间的相互耦合旨在产生纳米传感器物理化学干扰，该干扰可转化为可观察的效应，如光学/荧光信号^[51-53]。根据这些程序，检测基于表面功能化单元的不同分析物。表面功能化分子提高了分析物的检出限、灵敏度和线性范围。

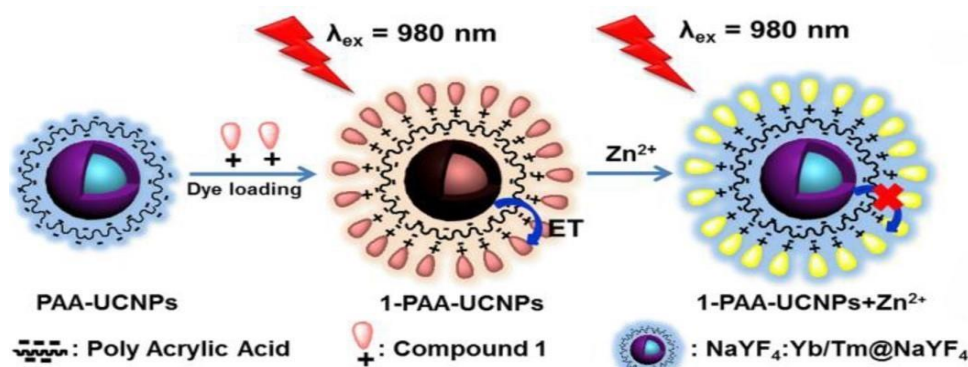


图 1-15 (a) 基于 PAA-UCNPs 和染料标记物之间的荧光能量共振转移实现对 Zn²⁺ 的检测^[49]

Fig. 1-15 Schematic illustration showing the synthesis of chromophore-assembled UCNPs and their response to Zn²⁺

生物系统中无机离子的浓度不是很高，但它们确实在新陈代谢中起着关键作用。因此，非常需要有效地监控它们。Liu 等人^[49]利用 FRET 的原理创建了一种检测 Zn²⁺的方法。该方法以聚丙烯酸修饰的上转换纳米材料(PAA-UCNPs)为能量供体，Zn²⁺响应的染料标记物 1 为能量受体。当染料标记物 1 附着于 PAA-UCNPs 表面时，发生 FRET 效应，导致荧光猝灭。染料标记物 1 与 Zn²⁺发生相互作用，其吸收光谱产生蓝移现象，从而减弱供受体间的能量转移，最终消除 FRET 效应，实现 Zn²⁺的高灵敏度检测，如图 1-15 所示。

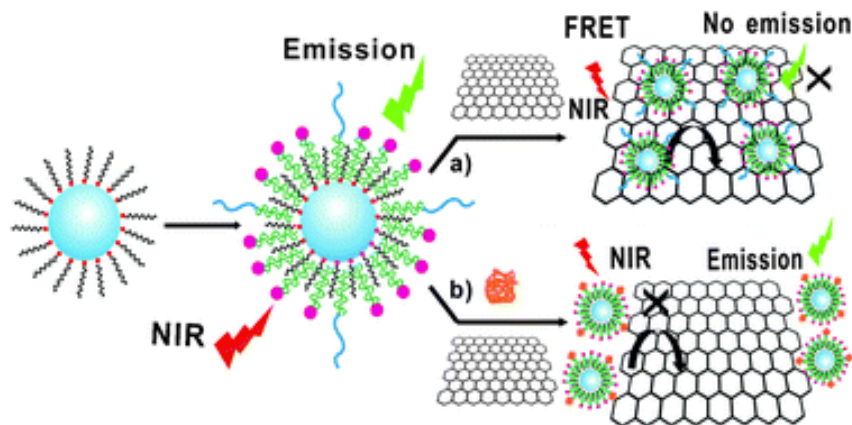


图 1-16 UCNP-氧化石墨烯荧光共振能量转移测定 HIV-1 病毒抗体的机理^[54]

Fig. 1-16 UCNP-Graphene oxide fluorescence resonance energy transfer assay of HIV-1 virus antibody mechanism.

Chu 等人^[54]构建了一个基于 UCNP 作为能量供体，氧化石墨烯(GO)作为能量受体进而监测人类血清中免疫缺陷病毒抗体的检测平台。实验通过自组装合成肽功能化的 UCNP，GO 与肽功能化的 UCNP 混合时，GO 吸附在表面导致荧光猝灭(发生 FRET)。加入待检测的抗体后，抗体与肽段形成 peptide-antibody 复合物，减弱肽功能化的 UCNP 与 GO 的相互作用，使 GO 远离肽功能化的 UCNP 表面使 UCNP 荧光恢复。UCNP 荧光强度变化与抗体浓度呈良好的线性关系，从而实现抗体检测，如图 1-16 所示。

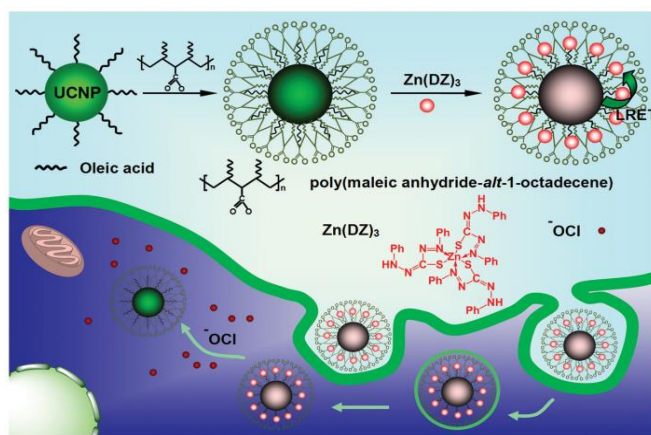


图 1-17 Zn(DZ)₃ 修饰 UCNP 的合成及其在活细胞中次氯酸盐检测中的应用^[55]

Fig. 1-17 Zn(DZ)₃-modified UCNP synthesis and their application in hypochlorite detection in living cells.

Mei 等人^[55]报告了一种基于 FRET 的 UCNP 传感器，用于敏感和选择性地检测水溶液中的次氯酸盐。在此传感器中 UCNP 充当能量供体，新型次氯酸盐

响应配位络合物 $\text{Zn}(\text{DZ})_3$ 被用作能量受体。 $\text{Zn}(\text{DZ})_3$ 配合物诱导猝灭上转换发光, 在添加次氯酸盐后, 通过 $\text{Zn}(\text{DZ})_3$ 配合物中的 Zn-S-C 键被选择性氧化断裂进而检测次氯酸盐。这种新的配位复合物工程化的上转换传感器已成功应用于活 HeLa 细胞中不同数量的外源次氯酸盐的成像, 如图 1-17 所示。

1.5.6.2 在环境科学分析中的应用

健康的水和纯净的空气是社会环境的基石, 是人类的追求。由于 UCNPs 优越的发光特性, 促进了荧光检测的应用, 逐渐发展出用于分析环境中有毒有害物质的纳米荧光探针, 可以用于分析环境中有机污染物残留^[56, 57]、重金属离子^[58, 59]、无机酸离子^[60]、空气污染物^[61]等检测

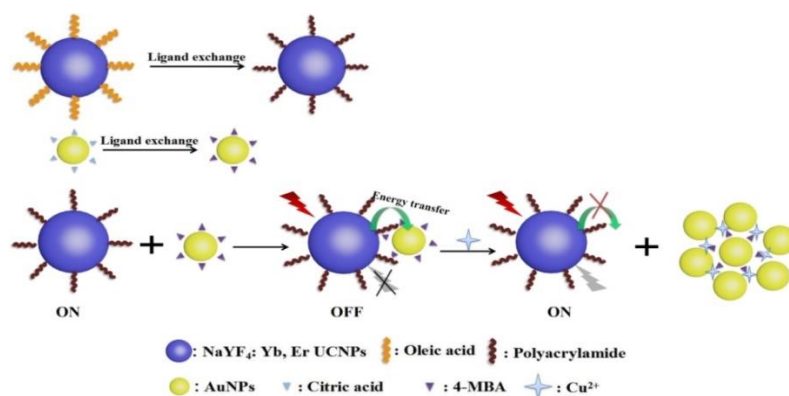


图 1-18 “off-on”型 FRET 探针的制备示意图及 Cu^{2+} 的检测^[58]

Fig. 1-18 The preparation of “off-on” typed FRET probe for the determination of Cu^{2+} .

Shao 等人^[58]设计一种 “off-on” 的荧光纳米探针用于检测 Cu^{2+} , 该研究成果为开发高灵敏度和高选择性的 “off-on” 型超灵敏荧光探针奠定了理论与技术基础, 如图 1-18 所示。

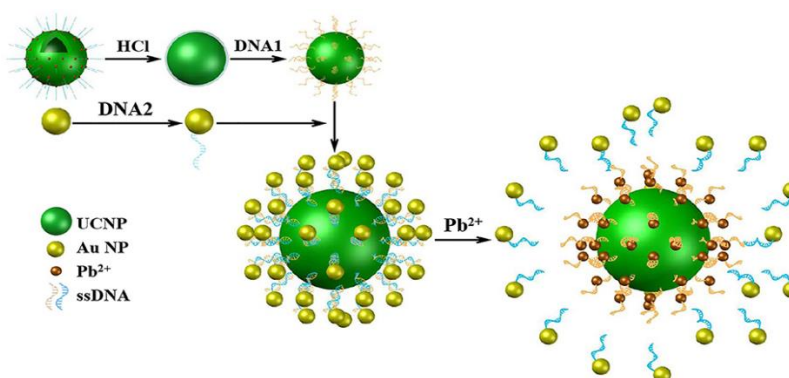


图 1-19.由 UCNPs 和 Au NPs 构建的用于 Pb^{2+} 检测的传感测定示意图^[62]

Fig. 1-19 Schematic diagram of a sensor for Pb^{2+} detection constructed with UCNPs and Au NPs.

Wang 等人^[62]制备了一种基于 FRET 机理的荧光传感器用于检测环境中的 Pb^{2+} 。首先，用盐酸处理 UCNPs 以去除疏水表面配体，并用适配体(DNA1)修饰。AuNPs 用于互补 DNA(DNA2)功能化。其次，以 UCNPs 为供体，AuNPs 为受体建立 FRET 系统。由于互补 DNA 杂交，UCNPs 和 AuNPs 之间的距离缩短到 $<10\text{ nm}$ ，导致 UCNPs 的猝灭荧光。由于适配体能够与金属离子结合，并在 Pb^{2+} 存在下变成分子间 G-四链体。因此，解开 DNA 双链体并恢复上转换荧光以确定 Pb^{2+} 的浓度，如图 1-19 所示。

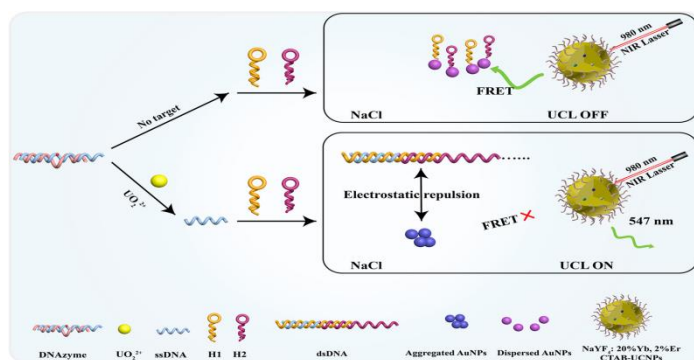


图 1-20 由 UCNPs 和 Au NPs 构建的用于 UO_2^{2+} 检测的传感测定示意图^[63]

Fig. 1-20 Schematic diagram of a sensor for UO_2^{2+} detection constructed with UCNPs and Au NPs

Zhang 等人^[63]基于 FRET 原理，开发了一种上转换荧光传感平台，以 UCNPs 作为能量供体，AuNPs 作为能量受体。它们通过放大混合链式反应(HCR)的信号来定量检测铀酰离子(UO_2^{2+})。当引入 UO_2^{2+} 时，AuNPs 和 UCNPs 之间的 FRET 被打断，UCNPs 的荧光恢复，以此实现环境样品中 UO_2^{2+} 的检测，如图 1-20 所示。

1.5.6.3 在食品安全检测的应用

食品安全是关系到人类健康的头等大事。随着科技的发展食品安全检测的方法也在不断完善。UCNPs 独特的发光机制使其成为优越的生物标志物材料。目前，UCNPs 在食品安全领域的研究主要集中在食品中微生物的检测^[64, 65]、抗生素和激素检测^[66, 67]、食品添加剂^[55]、农药残留^[68-70]等方面。

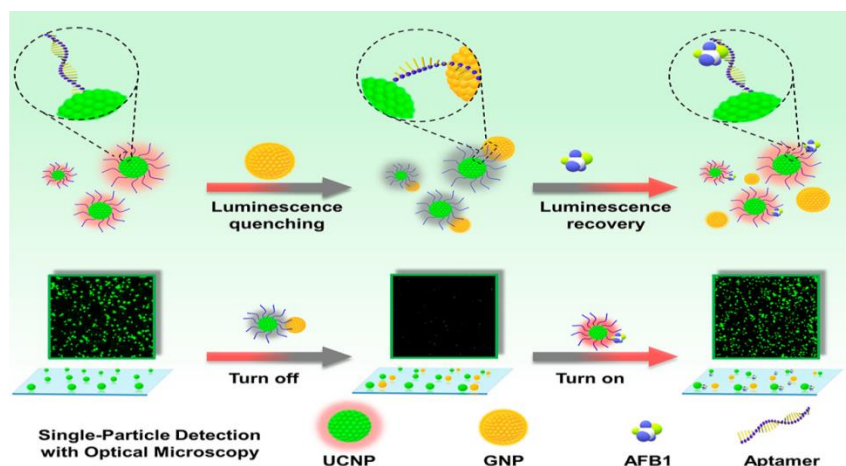
图 1-21 用 SPD 法检测 AFB1 的适配体传感器示意图^[64]

Fig. 1-21 Schematic diagram of the aptasensor for AFB1 detection with the SPD method

Wang^[64]构建了一种基于单颗粒检测(SPD)的灵敏适配体传感器。使用适配体修饰的 UCNPs(UCNPs-适配体)和 AuNPs 之间的 FRET 对花生样品中的黄曲霉毒素 B1(AFB1)进行分析,如图 1-21 所示,检测限远低于食品中的允许浓度,有望为食品安全和公共卫生做出重要贡献。

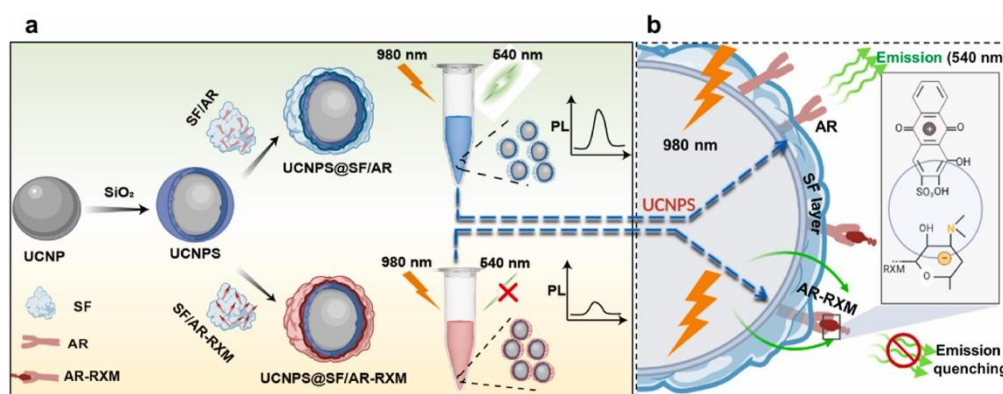
图 1-22 基于 FRET 原理定量检测抗生素的示意图^[71]

Fig. 1-22 Schematic diagram for quantitative detection of antibiotics based on the FRET principle

Shuai 等人^[71]开发了一种基于 FRET 原理快速且灵敏检测抗生素的方法。使用丝素蛋白(SF)包被的 UCNPs 成功构建了无适配体生物传感器,用于检测罗红霉素(RXM)。通过利用茜素红和 RXM 复合物作为能量受体,UCNPs 作为能量供体,并将超薄 SF 蛋白控制在 10 nm 内,实现了协同 FRET 效率。该研究是一种低成本、高灵敏度的抗生素检测方法,在环境、医疗保健和食品相关领域具有广泛的应用潜力,如图 1-22 所示。

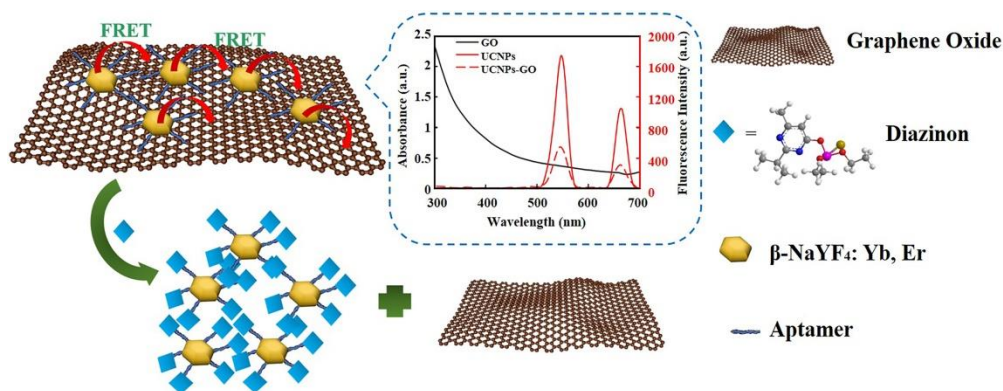
图 1-23 基于 FRET 原理定量检测二嗪农示意图^[72]

Fig. 1-23 Schematic diagram for quantitative detection of diazinon based on the FRET principle

Rong 等人^[72]开发了一种快速灵敏的 FRET 方法，用于食品中低浓度二嗪农的检测。适体修饰的上转换纳米粒子(Apt-UCNPs)通过 π - π 相互作用与氧化石墨烯(GO)共轭，因为 UCNPs 和 GO 之间的 FRET 过程，所以 UCNPs 荧光发生了猝灭。加入待测物后，适配体优先与待测物结合，FRET 过程被打断导致 UCNPs 荧光信号增强。该方法成功地用于实际样品中二嗪农的测定，在食品安全和质量控制方面具有很高的潜力，如图 1-23 所示。

1.6 本论文选题思路及主要工作

基于 FRET 的荧光检测具有灵敏度高、响应快、便携性好等优点，因此在分析中发挥着重要的作用。本论文基于 FRET 机理设计了三种荧光纳米探针用于荧光检测，具体内容如下：

(1) 构建了 Cit-UCNPs@TPyP 复合探针用于有机磷农药 paraoxon 的检测，该体系采用 Cit-UCNPs 作为能量供体，TPyP 作为能量受体，带负电荷的 Cit-UCNPs 可以与带正电的 TPyP(H_2SO_4 酸化)通过静电相互作用结合，能量从 Cit-UCNPs 向 TPyP 转移，导致 FRET 过程的发生，Cit-UCNPs 荧光猝灭。加入 paraoxon 后，FRET 过程被阻断，Cit-UCNPs 的荧光恢复。该荧光传感平台可以应用于青菜中 paraoxon 的检测。

(2) 构建了 Cit-UCNPs@CP6@RhB 探针用于人血清中 Ins 的检测，该探针采用 Cit-UCNPs 作为能量供体，RhB 作为能量受体。当激发波长为 980 nm 时，Cit-UCNPs 在 540 nm 处具有较强的荧光发射。带负电的 Cit-UCNPs 可以通过静电相互作用与带 CP6 结合，RhB 可以通过主客体相互作用进入 CP6 的空腔内，

从而缩短 Cit-UCNPs 与 RhB 之间的距离。能量从 Cit-UCNPs 向 RhB 转移, 导致 FRET 过程的发生, Cit-UCNPs 荧光猝灭, RhB 荧光强度不断增强。当将 Ins 分子加入到 Cit-UCNPs@CP6@RhB 复合物中时, RhB 被 Ins 置换, Cit-UCNPs 荧光恢复。因此该纳米探针可以作为人血清中 Ins 检测的有效荧光传感平台。

(3) 构建了 UCNPs@ γ -CD@PB 复合探针用于 CIP 的检测, 该探针以 γ -CD 修饰的 UCNPs 作为能量供体, PB 作为能量受体, PB 可以通过主客体相互作用有效的被 γ -CD 包封, 能量从 UCNPs 转移到 PB, 加入 CIP 后, CIP 可以通过与 PB 发生 n- π 荷移络合生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应, FRET 过程被中断, NaYF₄:Yb,Er 的荧光恢复。本文构建的荧光传感平台, 可以直接用于 CIP 的检测。

第 2 章 关于 Cit-UCNPs@TPyP 的比率式 off-on 探针对有机磷农药的传感研究

2.1 引言

有机磷农药(OPs)因其能高效杀死害虫而被广泛应用于农业生产中,但因其毒性、持久性和大量的滥用对人类健康安全和环境污染构成重大风险。因此,开发对 OPs 有高灵敏度和良好选择性的检测方法,对食品安全和环境监测至关重要^[73]。常用的有机磷农药检测方法包括高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱法(GC)。传统荧光分析技术由于依赖有害溶剂、前处理复杂等缺点,其应用受限。而基于 FRET 等新型荧光技术凭借高灵敏度、快速响应和便携性等优势,已成为重要分析方法。目前,已经开发出几种用于传感的荧光物质,如金属有机骨架^[74]、量子点^[3, 69, 75]、碳点^[76, 77]和金属纳米团簇等。

上转换纳米材料(UCNPs)因其独特的光学性能,如 Anti-Stokes 发射、低自发荧光和多光子容量^[78],成为荧光探针的有力候选者。作为荧光传感器,UCNPs 具有高灵敏度、快速响应和良好的生物相容性等优点。

FRET 最初是由 Theodor Förster 在 1946 年提出的,是指能量从荧光供体到荧光受体的近距离传输。由于能够检测 1-10 nm 范围内供体与受体偶极子之间的距离,荧光团与传感区域常被结合在基于 FRET 的生物传感器中,广泛应用于监测多种生物过程。为了获得更好的 FRET 效率和分析性能,可以通过主客体相互作用^[79]、层层组装^[80]、静电吸附^[81]等方式使受体与供体的距离足够接近。

目前,基于 UCNPs 的 FRET 探针已经被开发用于检测金属离子^[82]、生物分子^[83]、药物传递^[84]等。Chen 等人^[85]开发了一种组装有上转换核-壳纳米粒子和发色团钌络合物(N719@UCNPs)的荧光纳米探针检测 Hg^{2+} 反应。Guo 等人^[86]组装了氧化石墨烯(GO)和 UCNPs 建立了基于 FRET 的的荧光探针,用于快速检测常用的杀虫剂吡虫啉。Liang 等人^[87]基于 FRET 策略开发了一种用于碳水化合物抗原 153(CA153)检测的高灵敏度和选择性生物传感器。然而,目前还没有基于 UCNPs 对有机磷农药对氧磷(paraoxon)选择性检测荧光探针的研究报道。

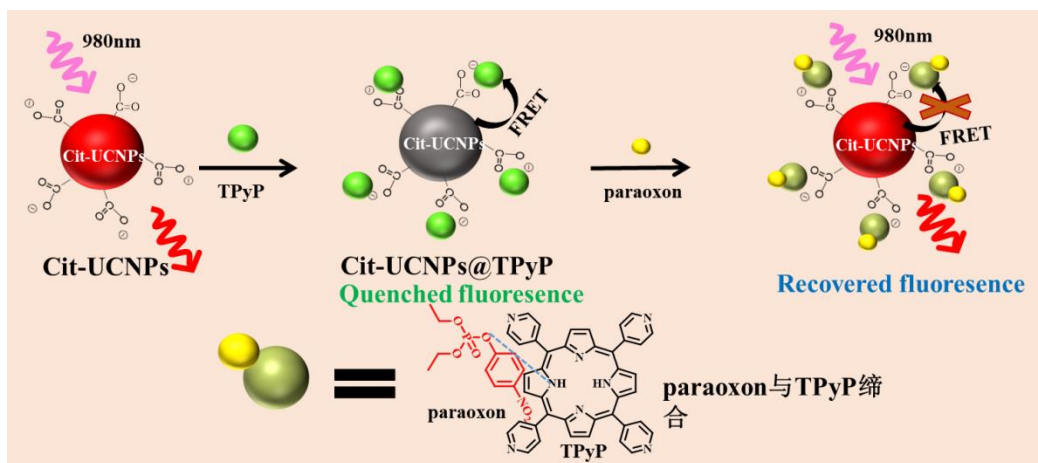


图 2-1 Paraoxon 传感器组装过程示意图

Fig. 2-1 The Schematic illustration of the assembly process for the paraoxon sensor.

为此，本研究构建了一种直接测定有机磷农药 paraoxon 的 FRET 纳米探针，如图 2-1 所示。该探针基于 FRET 原理将 5,10,15,20-四(4-吡啶基)卟啉(TPyP)与柠檬酸钠修饰的上转换纳米材料(Cit-UCNPs)结合，形成自组装纳米传感器。在 525-675 nm 处，TPyP(受体)有一个宽吸收峰，与 Cit-UCNPs(供体)的发射峰有大面积重叠，两者通过静电相互作用结合，FRET 过程发生，导致能量从 Cit-UCNPs 转移到 TPyP，Cit-UCNPs 的荧光发生猝灭。根据文献，卟啉和芳香配体(例如嘌呤和嘧啶化合物)^[88]之间的结合相互作用是通过 π - π 堆积的非共价过程发生的，这是 π 堆积复合物形成的特征^[89]。由于 TPyP 具有芳族结构，paraoxon 具有磷-氧双键(P=O)和三个氧原子，它们之间的相互作用导致形成 π 堆叠复合物^[90]，paraoxon 与 TPyP 内环上的氮原子之间还存在氢键相互作用^[91]。因此，由于 TPyP 和 paraoxon 的缔合，FRET 效率随着 paraoxon 的加入而逐渐降低。因此，一种直接检测 paraoxon 的传感平台被构建。

2.2 实验部分

2.2.1 实验试剂

所有的原材料都是购买后直接使用的。主要试剂有醋酸铒($\text{Er}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、乙酸铕($\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、醋酸钇($\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、氟化铵(NH_4F , 96%)、油酸钠($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Na}$, CP)、油酸(OA, AR)、十八烯($\text{C}_{18}\text{H}_{36}$, 90%)、对氧磷标准试剂($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, 丙酮溶液)均从阿拉丁试剂有限公司购买，甲醇(CH_3OH , 99.9%)、环己烷(C_6H_{12} , AR)、氯仿(CHCl_3 , AR)、甲苯(C_7H_8 ,

AR)由国药控股有限公司提供, 柠檬酸三钠盐二水合物($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%)、二乙二醇($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$, 98%)、5,10,15,20 四(4-吡啶基)卟啉(TPyP, 97%)、硫酸镁(MgSO_4 , 98%)、硫酸锌(ZnSO_4 , 98%)、六水合氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%)、氯化钾(KCl, 99.8%)、氯化钠(NaCl, 99.8%)、葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%)、2-硝基苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$, 99%)均从泰坦科技探索平台直接购买。

2.2.2 实验仪器

用赛默飞世尔科技公司的 Talos F200S 的透射电镜(TEM)对其形态特征和 EDS 进行了表征, 用岛津仪器技术公司的 XRD-6100 型衍射仪进行了 XRD 表征, 用德国 Bruker 公司的红外光谱仪进行了红外表征, DLS 测试在 ZETASIZER+PRO 型纳米粒度及电位分析仪上进行。采用上海精科 LS5 UV-Vis 光谱仪对样品进行了 UV-Vis 吸收谱的测定。采用爱丁堡公司提供的上转换荧光仪进行荧光光谱测定。用爱丁堡 FLS1000 荧光光谱仪, 以 980 nm 激光为激发源, 获得了时间分辨荧光衰减。

2.2.3 复合材料的制备

2.2.3.1 OA-UCNPs 的合成

根据文献方法制备 OA-UCNPs^[92]。将 0.2075 g $\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、0.0844 g $\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、0.0083 g $\text{Er}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、7 mL OA 和 15 mL 十八烯置于 100 mL 烧瓶中, 将混合物在 N_2 氛围下加热到 150 °C, 并在此温度下搅拌 40 min, 可以形成透明的黄色溶液。冷却至 50 °C 后, 加入 10 mL 含 0.1482 g NH_4F 和 0.7611 g 油酸钠的甲醇溶液, 将混合物再搅拌 40 min, 然后加热到 100 °C, 以除去低沸点溶剂。随后, 将溶液在 N_2 下加热至 290 °C 反应 1.5 h, 然后冷却至室温。将得到的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 用乙醇沉淀, 用乙醇洗涤两次, 然后分散在 5 mL 的环己烷中。

2.2.3.2 Cit-UCNPs 的合成

利用文献中的配体交换方法^[93]将油酸包裹的上转换纳米颗粒(OA-UCNPs)修饰为亲水的上转换纳米颗粒 Cit-UCNPs。简而言之, 将 2 mmol 柠檬酸三钠溶解在含有 1 mL 水和 15 mL 二乙二醇(DEG)的 50 mL 三颈烧瓶中, 并将混合物在氮气气氛下在剧烈搅拌下加热至 110 °C 持续 40 分钟。冷却至室温后, 将分散在 3 mL 氯仿和 2 mL 甲苯溶液的混合物中的 10 mg OA-UCNPs 缓慢加入到体系中,

然后加热至 130 °C 60 分钟以除去氯仿和甲苯。最后，将溶液加热至 180 °C 并在该温度下保持 2 小时。将溶液冷却至室温后，通过离心(10000 rpm, 20 min)收集产物，并用乙醇和去离子水(v/v = 1: 1)洗涤三次。将样品分散在 1 mL 去离子水中。

2.2.3.3 Cit-UCNPs@TPyP 的组装

将 10 mg mL⁻¹ 的 Cit-UCNPs 加入到 3 mL 14.9 μM 的硫酸酸化过的 TPyP 溶液中进行搅拌，搅拌 24 h。通过离心干燥得到了所需的复合材料 Cit-UCNPs@TPyP。

2.2.3.4 对氧磷的检测及选择性测试

基于 FRET 原理来检测 paraoxon 的过程如下所示。将 100 μL 300 mg mL⁻¹ 的 Cit-UCNPs@TPyP 溶液加入含有不同浓度 paraoxon 中，将混合物稀释至 3 mL，在室温下孵育 5 min。然后，用 980 nm 激发记录荧光发射光谱。根据荧光增强效率建立 paraoxon 的校准曲线，荧光增强效率由荧光复合材料在 515-534 nm 处的面积(UCL₅₁₅₋₅₃₄)和 534-683 nm 处的面积(UCL₅₃₄₋₆₈₃)比值监测。

将复合材料 Cit-UCNPs@TPyP 分别与干扰物(Mg²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、K⁺、Na⁺、C₆H₁₂O₆、2-硝基苯酚)混合对 paraoxon 的选择性进行测试。所加入的 paraoxon 浓度为 8 μM，其它物质浓度为 160 μM (20 倍)，测定了它们的荧光发射光谱。

2.2.3.5 青菜和水样品中对氧磷的测定

对青菜和自来水中的 paraoxon 进行测定，以评估该方法在实际应用中进行农药筛选的潜力。青菜由本地菜市场获得，并用去离子水洗涤，然后在青菜表面喷洒已定浓度的 paraoxon 溶液。称取 5 g 青菜样品，研碎，用 5 mL 纯净水溶解，超声 5 min，静置 3-5 min 后，收集上清液，分别加入等量 Cit-UCNPs@TPyP 至上清液中，搅拌均匀，测定荧光发射光谱。同样，将已知量的 paraoxon 注射到去自来水中，分别加入等量 Cit-UCNPs@TPyP，搅拌均匀，测定荧光发射光谱。

2.3 结果与讨论

2.3.1 TEM 和 DLS 表征

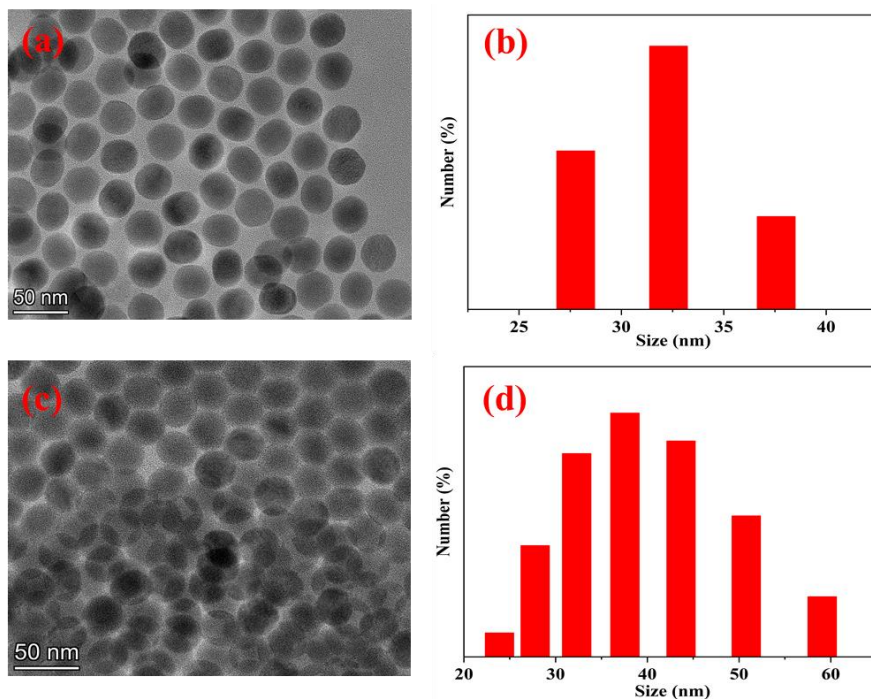


图 2-2 OA-UCNPs (a)、Cit-UCNPs (c)的 TEM 图；环己烷中 OA-UCNPs (b)、水中 Cit-UCNPs (d)的动态光散射(DLS)分析粒径图

Fig. 2-2 TEM images of OA-UCNPs (a), Cit-UCNPs (c); Dynamic light scattering (DLS) analysis of OA-UCNPs (b) in cyclohexane, Cit-UCNPs (d) in water.

通过 TEM 表征确定了所制备纳米粒子的形貌和尺寸，如图 2-2(a)所示，制备的球形 OA-UCNPs 在环己烷中分散良好。图 2-2(c)表明柠檬酸盐改性的纳米颗粒的形状和粒度 Cit-UCNPs 与 OA-UCNPs 相比几乎没有变化。Cit-UCNPs 很容易分散在水中，并对样品进行动态光散射(DLS)测量，如图 2-2(b)、2-2(d)所示，OA-UCNP 和 Cit-UCNP 的平均流体动力学尺寸分别为 31.8 nm 和 39.8 nm，不是绝对直径。

2.3.2 XRD 和红外光谱表征

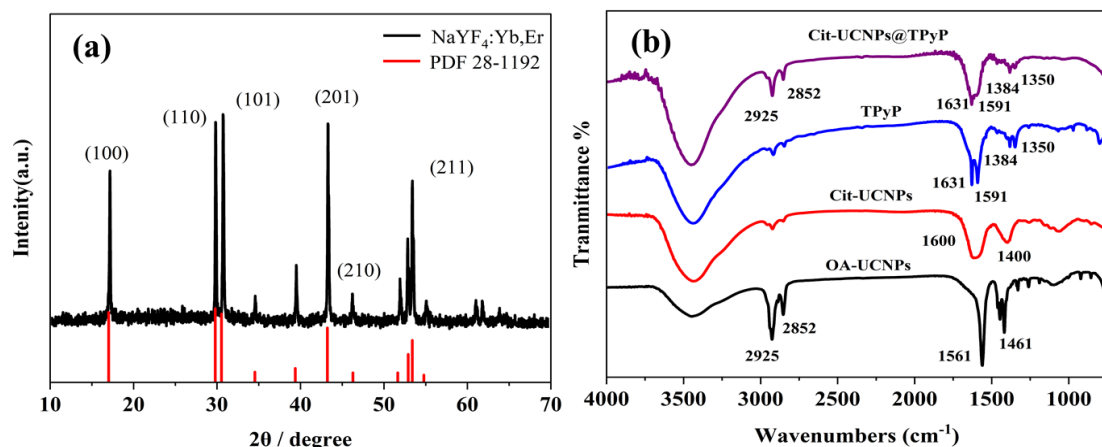


图 2-3 (a)为 OA-UCNPs 的 XRD 表征；(b)分别为 OA-UCNPs, Cit-UCNPs, Cit-UCNPs@TPyP, TPyP 的 FT-IR 光谱

Fig. 2-3 (a) XRD pattern of OA-UCNPs; (b) FT-IR spectra of OA-UCNPs, Cit-UCNPs, TPyP and Cit-UCNPs@TPyP

用 XRD 对 NaYF₄:Yb,Er 的晶体结构进行了研究,如图 2-3(a)所示,所有衍射峰均与标准 β-NaYF₄:Yb,Er 结构相同(JCPDS 28-1192)^[94],没有立方相或其他杂质的衍射峰,它表明 NaYF₄ 是纯六方相。各组装材料的红外光谱表征如图 2-3(b)所示,对于 OA-UCNPs,在 2925 和 2852 cm⁻¹ 处的宽吸收峰对应于油酸长烷基链中的亚甲基(-CH₂)不对称和对称伸缩振动。此外,在 1561 cm⁻¹ 和 1461 cm⁻¹ 处的峰归因于油酸中羧基(-COOH)的不对称和对称伸缩振动^[66]。柠檬酸三钠(Cit)对油酸(OA)进行配体交换后,在 1600 cm⁻¹ 处出现一个新的吸收峰,同时在 2925 cm⁻¹ 和 2852 cm⁻¹ 处的吸收峰消失,表明 Cit 成功地交换了 OA 配体^[93]。对于 Cit-UCNPs@TPyP, 1591 cm⁻¹ 和 1350 cm⁻¹ 可以分别归因于 TPyP 中吡啶基的伸缩振动和碳氮双键(C=N)的拉伸振动^[95],表明 TPyP 成功与 Cit-UCNPs 结合。

2.3.3 Zeta 电位表征

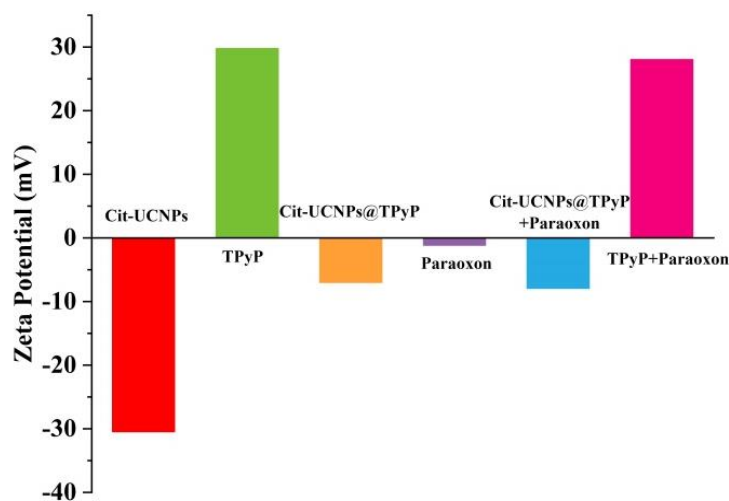


图 2-4 Cit-UCNPs, TPyP, Cit-UCNPs@TPyP, paraoxon, Cit-UCNPs@TPyP+paraoxon 和 TPyP+ paraoxon 的 Zeta 电位表征

Fig. 2-4 Zeta potential distributions of Cit-UCNPs, TPyP, Cit-UCNPs@TPyP, paraoxon, Cit-UCNPs@TPyP + paraoxon, and TPyP + paraoxon.

复合材料的组装过程中 Zeta 电位的变化, 如图 2-4 所示。Cit-UCNPs 和 TPyP(硫酸酸化)的 Zeta 电位值分别为-30.5 mV、29.7 mV, 与 Cit-UCNPs 的电位相比, Cit-UCNPs@TPyP 的电位为-7.0 mV, 这归因于 TPyP 带的正电荷, 这表明了 Cit-UCNPs 和 TPyP 是通过负电荷与正电荷之间的静电相互作用形成复合材料。paraoxon 的 Zeta 电位值为-1.2 mV, 向 Cit-UCNPs@TPyP 加入待测物 paraoxon 后, Cit-UCNPs@TPyP+ paraoxon 的 Zeta 电位值为-7.9 mV, 这与在 TPyP 中加入 paraoxon 的 Zeta 变化规律一致, 说明 paraoxon 可以与 Cit-UCNPs@TPyP 中的 TPyP 发生缔合。

2.4 荧光检测

2.4.1 FRET 机制

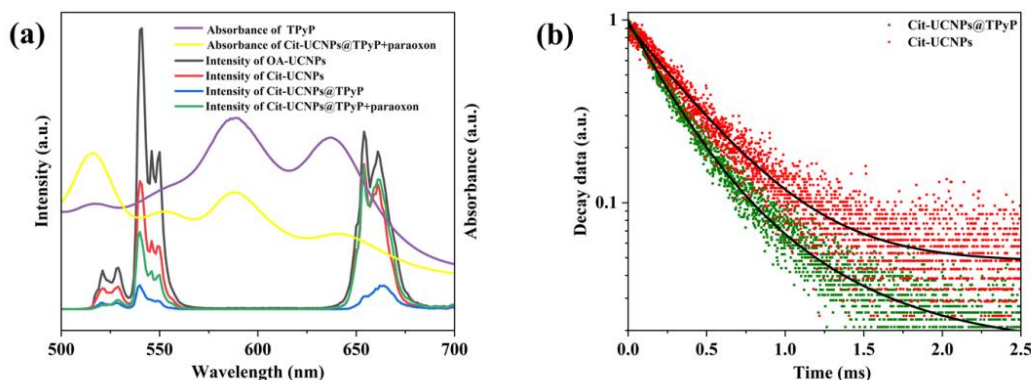


图 2-5 (a) TPyP, Cit-UCNPs@TPyP+paraoxon 溶液的紫外吸收光谱和 Cit-UCNPs, Cit-UCNPs@TPyP, Cit-UCNPs@TPyP+paraoxon 的荧光发射光谱; (b) 在 980 nm 激发下, Cit-UCNPs 和 Cit-UCNPs@TPyP 在 654 nm 处的荧光寿命

Fig. 2-5 (a) UV absorption spectrum of TPyP, Cit-UCNPs@TPyP+ paraoxon solution and the fluorescence emission spectrum of OA-UCNPs, Cit-UCNPs, Cit-UCNPs@TPyP, Cit-UCNPs@TPyP+paraoxon; (b) Fluorescence decay spectra for Cit-UCNPs and Cit-UCNPs@TPyP at 654 nm emission wavelength, under 980nm excitation wavelength.

OA-UCNPs、Cit-UCNPs、Cit-UCNPs@TPyP、Cit-UCNPs@TPyP+paraoxon 的荧光发射光谱和 TPyP、Cit-UCNPs@TPyP+paraoxon 溶液在 500-725 nm 之间的吸收光谱如图 2-5(a)所示。结果表明, OA-UCNPs 在 525 nm、540 nm 和 654 nm 处有较强的发光, 水溶性的 Cit-UCNPs 的荧光强度发生少量猝灭。在 525-675 nm 处, TPyP 有一个宽吸收峰, 由于 Cit-UCNPs(供体)的发射光谱和 TPyP(受体)的吸收光谱之间的光谱重叠, 满足 FRET 效应发生条件, Cit-UCNPs 的荧光发生猝灭。在 Cit-UCNPs@TPyP 复合材料中加入 paraoxon 后, 复合材料在 540 nm 和 654 nm 处的紫外吸收明显下降, 525 nm 处的紫外吸收有所增强。根据 FRET 理论, 从供体到受体的能量传递与距离有关^[96], Cit-UCNPs 带负电荷(由于表面上存在羧酸根基团), TPyP 分子带正电荷(由于 H_2SO_4 的酸化)。因此, 带负电荷的 Cit-UCNPs 和带正电荷的 TPyP 分子由于静电相互作用而非常接近, 导致 Cit-UCNPs 的荧光猝灭。但由于 TPyP 和 paraoxon 之间的结合,

FRET 效率随着 paraoxon 的加入而降低^[91], Cit-UCNPs 的荧光发生恢复。综合以上分析可知, 本探针可以实现 paraoxon 的传感。

采用 980 nm 激光为激发源, 在 654 nm 处测量了 Cit-UCNPs 和 Cit-UCNPs@TPyP 溶液的荧光寿命, 以进一步验证 Cit-UCNPs 与 TPyP 之间的 FRET 行为。如图 2-5(b)所示, Cit-UCNPs 呈现指数衰减过程, 最长荧光寿命为 396.6 ns。而 Cit-UCNPs@TPyP 的荧光寿命下降到 367.52 ns, 并有两次指数衰减, 进一步表明了从 Cit-UCNPs 到 TPyP 的 FRET 效应^[97]。

2.4.2 材料制备与传感环境的优化

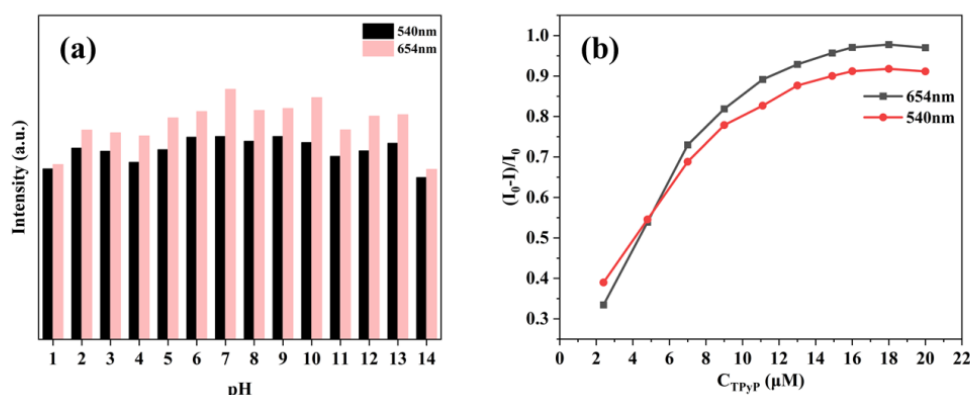


图 2-6 (a) 不同 pH 下 Cit-UCNPs 在 980 nm 激发波长下的相应荧光发射光谱的柱状图; (b) TPyP 用量对 Cit-UCNPs 相对荧光猝灭程度的影响。(I₀ 是 Cit-UCNPs 的原始强度, I 是具有相应量 TPyP 的材料的强度)(Cit-UCNPs: 10 mg mL⁻¹, TPyP: 14.9 μM)

Fig.2-6 (a) Fluorescence emission spectra of the corresponding histogram of Cit-UCNPs with different pH at excitation wavelength of 980 nm; (b) The effect of the TPyP amount on the relative fluorescence quenching degree of Cit-UCNPs. (I₀ is the original intensity of Cit-UCNPs, I is the intensity for the materials with the corresponding amount of TPyP) (Cit-UCNPs: 10 mg mL⁻¹, TPyP: 14.9 μM).

实验探究了 pH 对 10 mg mL⁻¹ Cit-UCNPs 荧光强度的影响, 不同 pH 下激发波长为 980 nm 的 Cit-UCNPs 荧光强度柱状图, 如图 2-6(a)所示。结果表明, 当 pH 值为 7 时, Cit-UCNPs 的荧光强度最好。

通过系统优化实验确定了加入 TPyP 的最佳用量。在 Cit-UCNPs@TPyP 的制备过程中, 保持其他物质的用量不变, 改变 TPyP 的浓度, 得到不同的 Cit-UCNPs@TPyP 复合材料, 如图 2-6(b)所示。结果表明, $(I_0 - I)/I_0$ 随着 TPyP 的浓

度增加而增加, 直至 TPyP 的浓度为 $14.9 \mu\text{M}$, $(I_0-I)/I_0$ 基本不变。这可能是由于随着实验中添加的 TPyP 的增加, 复合材料中 TPyP 的量也随之增加, 这会导致 Cit-UCNPs 和 TPyP 之间 FRET 效应增强。当 TPyP 用量高于 $14.9 \mu\text{M}$ 时, $(I_0-I)/I_0$ 变化不大, 这是因为加入 TPyP 的最佳浓度为 $14.9 \mu\text{M}$, 过量的 TPyP 通过纯化被洗掉。因此, 选择 TPyP 浓度为 $14.9 \mu\text{M}$ 进行实验。

2.4.3 传感过程

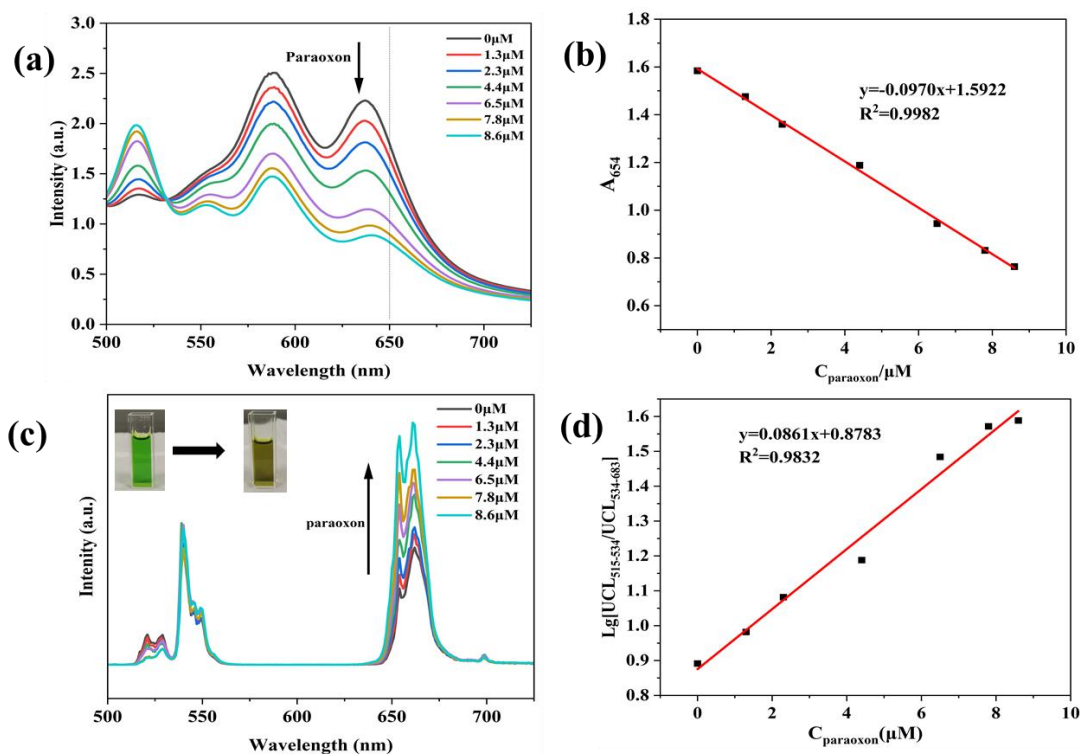


图 2-7 (a) 紫外-可见吸收光谱 Cit-UCNPs@TPyP 加入 paraoxon; (b) 在 654 nm 处, 紫外吸收与 paraoxon 浓度之间的线性关系; (c) Cit-UCNPs@TPyP 添加 paraoxon 后的荧光发射光谱; (d) $\text{Lg}[UCL_{515-534}/UCL_{534-683}]$ 与 paraoxon 浓度之间的线性关系(Cit-UCNPs@TPyP: 10 mg mL^{-1})

Fig. 2-7 (a) UV-vis absorption spectra of Cit-UCNPs@TPyP with the addition of paraoxon; (b) Linear relationship between UV-vis absorption and paraoxon concentration at 654 nm; (c) Fluorescence emission spectrum of Cit-UCNPs@TPyP with the addition of paraoxon; (d) Linear relationship between $\text{Lg}[UCL_{515-534}/UCL_{534-683}]$ and paraoxon concentration. (Cit-UCNPs@TPyP: 10 mg mL^{-1})

采用紫外-可见吸收光谱法和荧光光谱法探究 Cit-UCNPs@TPyP 对 paraoxon 的传感能力。在 $0-8.6 \mu\text{M}$ 范围内, 随着 paraoxon 浓度的增加, Cit-

UCNPs@TPyP 在 525 nm 处的紫外吸收强度有小幅增强, 在 540 nm 处的紫外吸收有小幅度的降低, 在 654 nm 处的紫外吸收强度有明显的降低, 如图 2-7(a)所示。这是由于 TPyP 和 paraoxon 之间形成缔合体系使得 TPyP 的紫外吸收发生改变, 因此 Cit-UCNPs 在 540 和 564 nm 处的荧光发射光谱与 TPyP 的紫外吸收光谱之间的重叠面积不断减小, 两者之间的 FRET 效率不断降低。Cit-UCNPs@TPyP 在 654 nm 处的吸收强度与 paraoxon 浓度具有一定的线性关系, 其线性方程为 $A_{654}=0.0970C_{\text{paraoxon}}+1.5922$ ($R^2=0.9982$), 如图 2-7(b)所示。

如图 2-7(c)所示, 在 0-8.6 μM 范围内, 随着 paraoxon 浓度的增加, Cit-UCNPs@TPyP 在 520 nm 处的紫外吸收有小幅的升高, 540 nm 处的紫外吸收有小幅度的降低, 因此 520 nm 和 540 nm 处的荧光强度变化并不明显。Cit-UCNPs@TPyP 在 654 nm 处的紫外吸收强度有明显的降低, 所以 654 nm 处的荧光强度有明显的增强, 同时溶液颜色由绿色逐渐变成黄绿色。这是由于 TPyP 与 paraoxon 相互作用形成缔合体系使 TPyP 的紫外吸收发生改变, FRET 效率降低, Cit-UCNPs 的荧光发生了恢复, 结果表明 Cit-UCNPs@TPyP 可以被用来检测 paraoxon 农药。

图 2-7(d)描述了 Cit-UCNPs 荧光恢复程度 $\text{Lg}[UCL_{515-534}/UCL_{534-683}]$ 与 paraoxon 浓度之间的线性关系。由于越来越多的 paraoxon 与 TPyP 发生反应, FRET 过程严重受到阻碍, 所以 Cit-UCNPs 荧光恢复度呈线性增加, 其线性方程为 $\text{Lg}[UCL_{515-534}/UCL_{534-683}]=0.0861C_{\text{paraoxon}}+0.8783$ ($R^2=0.9832$)。

根据该复合材料的荧光光谱的荧光恢复趋势 $\text{Lg}[UCL_{515-534}/UCL_{534-683}]$, 在 0-8.6 μM 浓度范围内加入 paraoxon 的情况下, 用公式($\text{LOD}=K \text{ Sd}/m$)计算其检测限(LOD)。其中 Sd 为空白样测量值的标准差; m 是荧光恢复度与 paraoxon 浓度的斜率。K 是可信水平, 通常设置为 3, 根据上述方程计算出的 LOD 为 0.20 μM 。

2.4.4 干扰试验

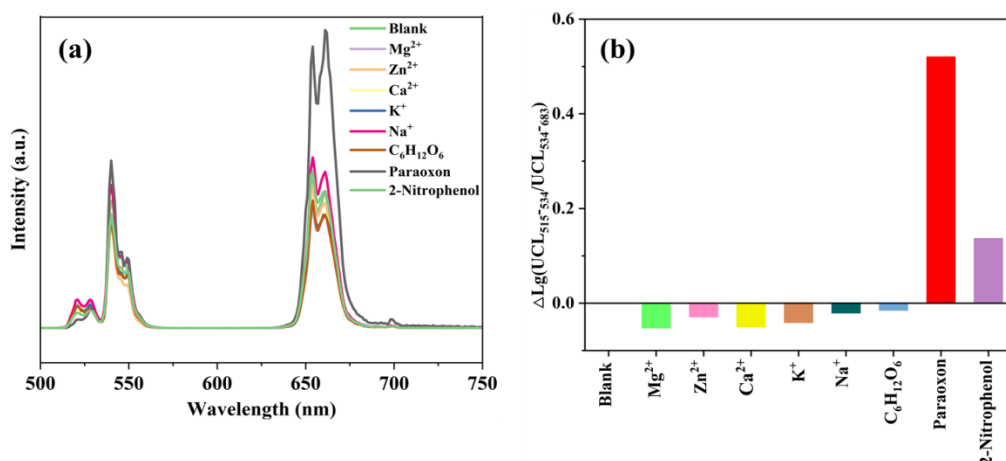


图 2-8 (a) 在 360 nm 激发下, 将各种干扰物质添加到 Cit-UCNPs@TPyP 的荧光发射光谱; (b) $Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})$ 与 paraoxon 或其他干扰物质的荧光恢复柱状图 [$Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})_0$ 是 Cit-UCNPs@TPyP 的原始强度, $Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})$ 是 paraoxon 或其他干扰物质的强度 $\Delta Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683}) = Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683}) - Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})_0$] (Cit-UCNPs@TPyP: 10 mg mL^{-1})

Fig. 2-8 (a) Fluorescence emission spectra of various interfering substances were added to Cit-UCNPs@TPyP solution under 980nm excitation; (b) Histogram of fluorescence recovery of the nanoprobe at 654 nm with paraoxon or other interfering substances [$Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})_0$ is the original intensity of Cit-UCNPs@TPyP, $Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})$ is the intensity with paraoxon or other interfering substances. $\Delta Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683}) = Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683}) - Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})_0$ (Cit-UCNPs@TPyP: 10 mg mL^{-1})

通过抗干扰实验评估了所构建的 FRET 荧光复合材料对 paraoxon 检测的选择性。加入 $160 \mu\text{M}$ (20 倍) 干扰物质 (Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、葡萄糖、2-硝基苯酚) 及 $8 \mu\text{M}$ paraoxon 进行干扰离子实验。从图 2-8 可以看出, 加入 paraoxon 后复合材料的 $Lg(UCL_{515-534}/UCL_{534-683})$ 明显增加, 而加入其他常见的干扰物质后复合材料的荧光强度基本上没有变化, 说明这些干扰物质不会对 paraoxon 的检测造成干扰。结果证明该荧光复合材料对 paraoxon 有较好的选择性。

2.5 实际样品检测

2.5.1 复合材料对水和青菜中对氧磷的检测

表 2-1 水和青菜样品中 paraoxon 的测定结果

Table 2-1 Spiked recovery results for paraoxon sensing employing the assembly materials in water and bok choy.

样品	检测 paraoxon (μM)	添加 paraoxon (μM)	检测 paraoxon (μM)	恢复率 (%)	RSD (%, n=5)
自来水	0	1.73	1.73	100	1.81
	0	4.74	4.73	99	2.37
	0	6.05	5.91	97	3.86
青菜	0	1.73	1.72	99	3.53
	0	4.74	4.78	101	1.90
	0	6.05	5.92	98	2.76

为了评价本方法的准确性、重复性和选择性，使用该探针对自来水和青菜中 paraoxon 进行检测，结果见表 2-1。添加 paraoxon 的回收率为 97%~101%，RSD 为 1.81%~3.86%。结果表明，所合成的探针可以用于水和青菜中 paraoxon 的检测。

2.5.2 与其他文献的对比

参考其他文献，对各探针的检测性能进行比较，对比结果如表 2-2 所示。

表 2-2 与其他文献的对比

Table 2-2 Comparison of the performance of different methods for paraoxon detection

方法	检测限	线性范围	文献
MC/CB	0.12 μM	0.2-8 μM	Lee et al. (2010) ^[98]
分光光度法	0.2 μM	0.5-150 μM	Tang et al. (2014) ^[99]
AChE/PB-CS/GCE	3 nM	0.01-5 μM	Song et al. (2011) ^[100]
ZnO+EDA/AChE	0.5 nM	0.0005-5 μM	Fallatah et al. (2022) ^[101]
比色法	4.52 nM	4.5-49.5 nM	Sun et al. (2011) ^[102]
Cit-UCNPs@TPyP	0.20 μM	0-8.6 μM	本文工作

此外，表 2-2 给出了该探针与在过去几年中其他探针检测 paraoxon 的对比。从表中可以看出，所建立的方法与其他已报道的方法相比，具有合适的线性范围和检测限。

2.6 结论

基于 FRET 机理，建立了一种高灵敏度、高选择性检测水和青菜中 paraoxon 的 FRET 探针。该纳米探针以 Cit-UCNPs 作为能量供体，TPyP 作为能量受体。TPyP 的紫外-可见吸收光谱与 Cit-UCNPs 的荧光光谱有很好的重叠，因此 Cit-UCNPs 的荧光强度降低。在 paraoxon 存在下，TPyP 和 paraoxon 之间形成缔合体系使 TPyP 紫外吸收峰强度下降，FRET 效率降低，使得 Cit-UCNPs 的荧光恢复。Cit-UCNPs@TPyP 纳米探针可以作为水和蔬菜中 paraoxon 的有效传感荧光平台。

第 3 章 关于 Cit-UCNPs@CP6@RhB 的比率式 off-on 探针对胰岛素的传感研究

3.1 引言

随着营养过剩和饮食消费的增加,饮食相关的慢性疾病威胁日益突出。糖尿病作为一种常见的慢性疾病,是一组以长期高血糖为特征的代谢紊乱,通常由胰岛素(Ins)分泌不足或 Ins 作用丧失引起,进而导致葡萄糖和脂质代谢的异常。Ins 可以通过促进葡萄糖从血液进入肝脏、脂肪和骨骼肌细胞,从而达到调节碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢的作用^[103, 104]。Ins 分泌异常可导致糖尿病和高胰岛素血症,增加失明、肾衰竭、心肌梗死、心脏病、肥胖、中风和神经退行性疾病等风险,成为重要的公共卫生问题^[105-107]。众所周知,Ins 水平是诊断糖尿病的重要指标。因此,Ins 的传感和检测不仅对于临床诊断至关重要,而且对于药物质量管理也至关重要。在过去的几十年里,各种分析技术,包括酶联分析^[108]、放射免疫分析^[109]、高效液相色谱^[110]、毛细管电泳^[111]、电化学分析^[112]和光电化学分析^[113]已被开发用于 Ins 检测。虽然这些方法已经表现出优异的性能,但它们中的大多数是耗时的、麻烦的、昂贵的或费力的。因此,设计一种简单、有效、快速的 Ins 测定方法是十分必要的。

在荧光传感器中,那些利用 Förster 共振能量转移(FRET)已经在生物系统中发现了广泛的效用。基于 FRET 的荧光传感器由于其快速的细胞摄取、非侵入性成像能力以及在不破坏其结构或功能的情况下原位检测生物分子的能力,在生物学研究中被广泛首选^[45, 114]。物理学家 Theodor Förster 将 FRET 描述为一种非辐射,距离依赖的能量传递过程,通过供体和受体分子之间的远距离偶极子-偶极子耦合。当供体和受体都是荧光团时,这个过程被称为“荧光共振能量转移”^[45, 115, 116]。

上转换纳米材料(UCNPs)在过去十几年中得到了蓬勃的发展。UCNPs 被认为是用作荧光标记的合适人选,因为它们具有卓越的光度特性,包括良好的光化学稳定性、低自身荧光干扰、不褪色发射、反斯托克斯位移、不闪烁发射、相对低毒性和对生物样品的深度渗透^[117]。由于其近红外激发特性,UCNPs 具

有较低的自身荧光干扰,从而大大增强了荧光分子的光度和灵敏度特性^[118]。因此,UCNPs被认为是最有前途和最灵敏的 Ins 检测荧光材料。

迄今为止,基于 UCNPs 的 FRET 探针已被制备用于癌症治疗、食品安全检测、光电化学传感^[119]和环境质量监控等。Ding 等人^[120]建立了一种用于检测复杂基质中恩诺沙星(ENR)的超灵敏和选择性生物传感器。该研究智能地融合了核壳 UCNPs 的光谱特性和金属有机框架(MOFs)的优异吸附饱和能力。Chen 等人^[121]制备了由磁性 Fe_3O_4 修饰(MNPs)金纳米粒子(GNPs)和使用适体功能化的 UCNPs 组成的荧光纳米探针用于检测 Pb^{2+} 。Li 等人^[122]成功合成了 UCNPs 并与玉米赤霉烯酮(ZEN)适体的寡核苷酸缀合后用作信号探针,用于检测玉米中 ZEN。

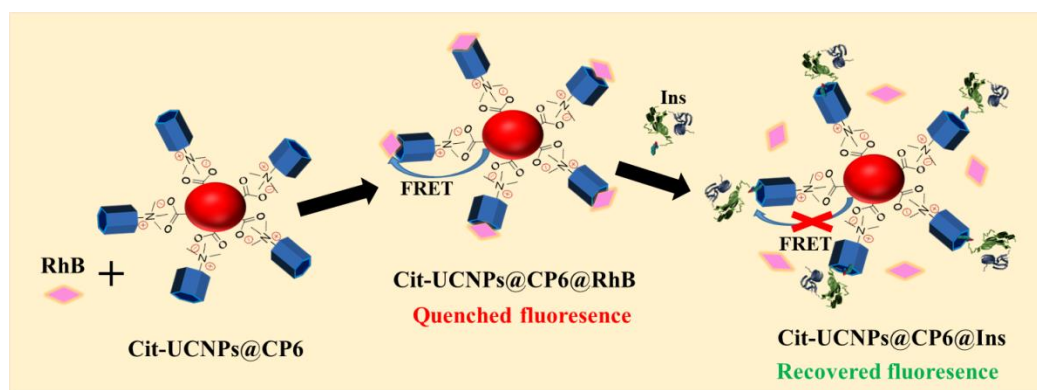


图 3-1 使用 Cit-UCNPs@CP6 作为基于竞争性主客体识别的供体的 Ins 荧光传感

Fig. 3-1 Fluorescence sensing for Ins using Cit-UCNPs@CP6 as a donor based on competitive host-guest recognition.

基于此,本研究构建了一种基于 FRET 机理对 Ins 进行检测的纳米探针,如图 3-1 所示。Cit-UCNPs 和 RhB 可以通过主客体相互作用有效地被阳离子柱[6]芳烃(CP6)包封,从而缩短 Cit-UCNPs 与 RhB 之间的距离。能量从 Cit-UCNPs 向 RhB 转移,导致 FRET 过程的发生,Cit-UCNPs 荧光猝灭。当将 Ins 分子加入到 UCNPs@CP6@RhB 复合物中时,CP6 通过腔的外部包合到 Ins 分子中,Ins 中 B 链的 N-末端的第一个氨基酸是 Phe(含苯环的氨基酸),其可被 CP6 包含,使用 Phe 1 作为 CP6 的结合位点进行分子对接,并且获得类似于晶体结构的主-客体结合模式,CP6 中三甲胺与氨基酸之间的静电相互作用也起到重要作用^[123],RhB 被 Ins 置换,Cit-UCNPs 荧光恢复。因此,基于 FRET 效应构建了直接检测 Ins 的生物传感平台。

3.2 实验部分

3.2.1 实验试剂

所有的原材料都是购买后直接使用的。醋酸铒($\text{Er}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、乙酸镱($\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、醋酸钇($\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、氟化铵(NH_4F , 96%)、油酸钠($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Na}$)、油酸(OA, AR)、十八烯($\text{C}_{18}\text{H}_{36}$, 90%)均从阿拉丁试剂有限公司购买, 氯仿(CHCl_3 , AR)、甲苯(C_7H_8 , AR)、甲醇(CH_3OH , 99.9%)、环己烷(C_6H_{12} , AR)由国药控股有限公司提供。柠檬酸三钠盐二水合物(Citrate, 99%)、乙二醇($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, 98%)、四溴化碳(CBr_4 , 99%)、1,4-双(2-羟基乙氧基)苯($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$, 98%)、三苯基膦($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{P}$, 99%)、无水乙腈(CH_3CN , 99%)、多聚甲醛、三氟化硼($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, 48%)、氯化钠(NaCl , 99.9%)、硫酸钠(Na_2SO_4 , 99%)、三甲胺($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$, RG)、硅胶、石油醚、二氯甲烷(CH_2Cl_2 , 99.9%)、氘代氯仿(CDCl_3 , 99.8%)、氘水(D_2O , 99.8%)、罗丹明 B(RhB, 98%)、胰岛素(Ins)、L-半胱氨酸(L-cysteine, 99%)、甘氨酸(Glycine, 99%)、谷胱甘肽(GSH, 98%)、尿素(Urea, 99%)、葡萄糖(Glucose, 99%)均由探索平台购买。人血清由芜湖市第一人民医院提供。

3.2.2 实验仪器

用赛默飞世尔科技公司的 Talos F200S 的透射电镜(TEM)对其形态特征和 EDS 进行了表征, 用 Escalab 250XI 光电子能谱仪进行了 XPS 表征, 用岛津仪器技术公司的 XRD-6100 型衍射仪($\text{CuK}\alpha$ 辐射)进行 XRD 表征, 用德国布鲁克科技有限公司 AVANCE ONE 500 MHz 核磁共振波谱仪进行了核磁氢谱和核磁碳谱表征, 使用德国 Bruker 公司的红外光谱仪对其红外光谱进行表征, Zeta 电位测试和 DLS 测试在 ZETASIZER+PRO 型纳米粒度及电位分析仪上进行, 热重测试在美国 TGAQ500 TA 热重分析仪上进行, 用上海精科的 LS5 UV-Vis 光谱仪进行 UV-Vis 光谱测试, 采用爱丁堡公司提供的上转换荧光仪进行荧光光谱测定, 用爱丁堡 FLS1000 荧光光谱仪, 以 980 nm 激光为激发源, 获得了时间分辨荧光衰减。

3.2.3 复合材料的制备

3.2.3.1 Cit-UCNPs 的制备

通过改进文献方法制备 OA-UCNPs^[92]。将 0.2075 g $\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、0.0844 g $\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、0.0083 g $\text{Er}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、7 mL OA 和 15 mL 十八烯置于 100 mL 烧瓶中，将混合物在 N_2 氛围下加热到 150 °C，保持 40 min。混合物冷却至 50 °C 后，加入 10 mL 含 0.1482 g NH_4F 和 0.7611 g 油酸钠的甲醇溶液，继续搅拌 40 min，然后加热到 100 °C，以除去低沸点溶剂。随后，将溶液在 N_2 下加热至 290 °C 反应 1.5 h，然后冷却至室温。将得到的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ 用乙醇沉淀，用乙醇洗涤两次，然后分散在 5 mL 的环己烷中。

利用文献中的配体交换法^[124]将油酸包裹的疏水上转换纳米颗粒(OA-UCNPs)修饰为亲水的柠檬酸钠修饰的上转换纳米颗粒(Cit-UCNPs)。简而言之，将 2 mmol 柠檬酸三钠溶解在含有 1 mL 水和 15 mL 二乙二醇(DEG)的三颈烧瓶中，并将混合物在 N_2 氛围下加热至 110 °C，剧烈搅拌 40 min。然后将混合物冷却，把分散在 3 mL 氯仿和 2 mL 甲苯溶液的混合物中的 10 mg OA-UCNPs 缓慢加入到体系中，然后加热至 130 °C 60 min 以除去氯仿和甲苯。最后，将溶液加热至 180 °C 并在该温度下保持 2 小时。将溶液冷却后，通过离心收集产物并用乙醇和去离子水(v/v = 1: 1)洗涤三次。将样品分散在 1 mL 去离子水中。

3.2.3.2 CP6 的合成

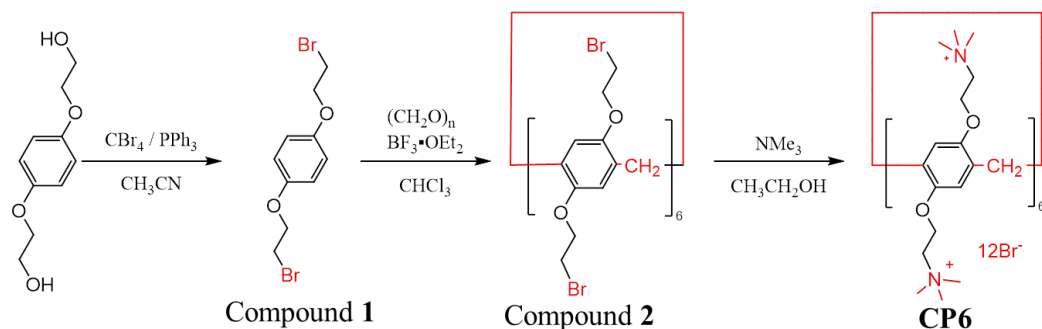


图 3-2 CP6 的合成

Fig. 3-2 Synthesis of CP6

通过文献方法^[123]，合成了 CP6，合成路线如图 3-2 所示。

化合物 1 (Compound 1) 的合成。将四溴化碳 (39.8 g, 120 mmol) 分批加入到 1,4-双(2-羟基乙氧基)苯 (10.0 g, 50.4 mmol) 和三苯基膦 (31.5 g, 120 mmol)

在无水乙腈 (0.25 L) 中的溶液中；在添加过程中，反应混合物保持在 0 °C。然后在氮气气氛下将所得混合物加热至 25 °C 4 小时。通过加入冷水 (0.2 L) 使产物沉淀，过滤固体，用甲醇/水 (3:2, 3×100 mL) 洗涤。将产物从甲醇中重结晶，得到白色片状晶体的标题化合物 (10.1 g, 65%)。

化合物 2 (Compound 2) 的合成。向化合物 1 (5 g, 15.4 mmol) 和多聚甲醛 (0.92 g, 30.8 mmol) 的氯仿 (0.3 L) 溶液中加入 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (4.38 g, 30.8 mol)。将反应混合物在 N_2 气氛下在 25 °C 下保持 3 小时。用水 (2×100 mL) 和饱和食盐水 (2×100 mL) 洗涤反应混合物，并用硫酸钠干燥。通过柱色谱法(硅胶; 石油醚; 二氯甲烷)纯化产物，得到白色固体化合物 2 (0.71 g, 14%)。

CP6 的合成。将化合物 2 (1.0 g, 0.59 mmol) 加入到三甲胺 (6.4 mL, 24 mmol) 的乙醇溶液中。然后在 N_2 气氛下将所得混合物加热至 90 °C 24 小时。冷却至 25 °C 后，在真空下除去溶剂，将残余物溶解在水中 (20.0 mL)。过滤溶液，蒸发除去溶剂。得到白色固体的 CP6 (1.16 g, 86 %)。

3.2.3.3 Cit-UCNPs@CP6@RhB 的合成及对胰岛素的检测

将 Cit-UCNPs@CP6 与 RhB 在磷酸盐缓冲溶液中搅拌过夜，最后离心干燥可得到最终产物。在 20 mg mL^{-1} 的探针溶液中加入不同浓度 Ins 溶液，搅拌，然后对其进行了荧光发射光谱测试。

3.2.3.4 胰岛素的选择性测试及对人血清中胰岛素进行检测

将 20 mg mL^{-1} 的 Cit-UCNPs@CP6@RhB 探针分别与干扰物质混合(L-cysteine、Glycine、GSH、NaCl、Urea、Citrate、Glucose)对 Ins 的选择性进行研究。所加入的 Ins 浓度为 $10 \text{ }\mu\text{M}$ ，干扰离子浓度为 $200 \text{ }\mu\text{M}$ (20 倍)，测定了它们的荧光光谱。

采用标准加入法进行定量分析。取人血清样本(正常人血清中 Ins 含量: 29-172 pmol L^{-1})用水稀释 40 倍^[125]，封闭在离心管，取等量稀释后的血清，向其中加入不同浓度的 Ins，搅拌均匀。将相同量的复合材料加入上述血清样品中孵育，进行荧光发射光谱测定。

3.3 合成表征

3.3.1 TEM 和 XRD 相关表征

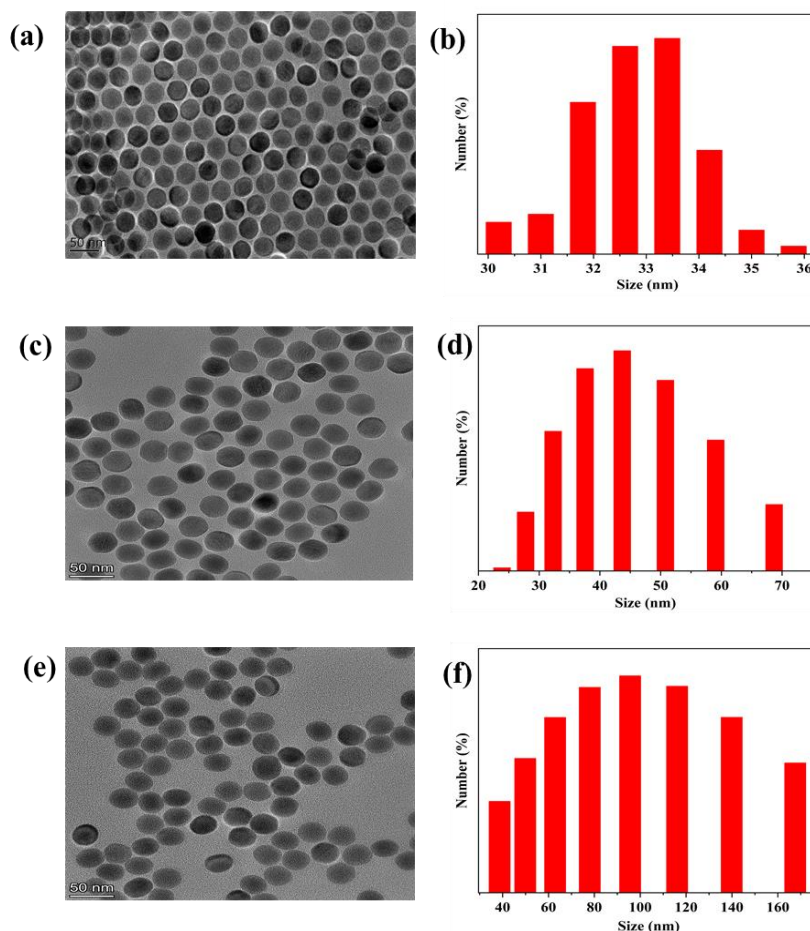


图 3-3 OA-UCNPs (a), Cit-UCNPs (c), Cit-UCNPs@CP6@RhB (e)的 TEM 图像; OA-UCNPs (b)在环己烷中, Cit-UCNP (d), Cit-UCNPs@CP6@RhB (f)在水中的动态光散射(DLS)分析图

Fig. 3-3 TEM images of OA-UCNPs (a), Cit-UCNPs (c), Cit-UCNPs@CP6@RhB (e); Dynamic light scattering (DLS) analysis of UCNP (b) in cyclohexane; Cit-UCNPs (d), Cit-UCNPs@CP6@RhB (f) in water.

采用 TEM 表征技术对所制备材料的形貌和尺寸进行了系统分析。如图 3-3(a)所示, 制备的球形 OA-UCNPs 在环己烷中分散良好, 直径约为 31.85 nm。图 3-3(c)表明柠檬酸盐改性的纳米颗粒的形状和粒度 Cit-UCNPs 与 OA-UCNPs 相比几乎没有变化, Cit-UCNPs 很容易分散在水中。从图 3-3(e)可以看出 Cit-UCNPs@CP6@RhB 在水中分散均匀, 较复合前有所增大。通过动态光散射 (DLS)测量进一步证实了粒度分布, 如图 3-3(b)、3-3(d)、3-3(f)所示, OA-UCNP、

Cit-UCNP 和 Cit-UCNPs@CP6@RhB 的平均流体动力学尺寸分别为 33.5 nm、45.5 nm 和 96.0 nm。

3.3.2 EDS、XPS 和 XRD 表征

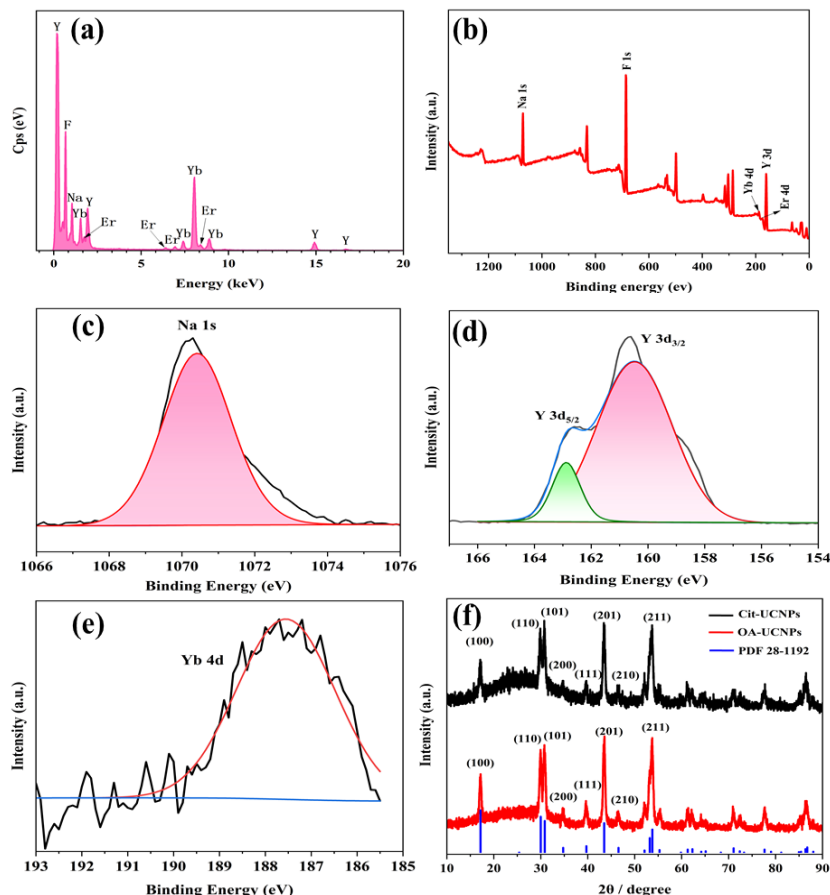


图 3-4 (a) OA-UCNPs 的能量色散 X 射线光谱(EDS); (b) OA-UCNPs 的 XPS 光谱; OA-UCNPs 的 Na 1s (c), Y 3d (d), Yb 4d (e)区域的 XPS 光谱; (f) OA-UCNPs, Cit-UCNPs 的 XRD 图

Fig. 3-4 (a) Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) of OA-UCNPs; (b) XPS spectra of OA-UCNPs; XPS spectra of the Na 1s (c), Y 3d (d), Yb 4d (e) region of the OA-UCNPs; (f) XRD pattern of OA-UCNPs, Cit-UCNPs.

通过 EDS 分析确定了所合成 UCNPs 的元素组成, 结果如图 3-4(a)所示。从图中可以看出, 该材料中含有 Na、Y、F、Yb、Er 元素, 未检测到 O 元素^[126], 证实由 $\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3\text{:Yb,Er}$ 完全转化为 $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ 。

从图 3-4(b) $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ 的全谱中可以看出在合成的材料中同时存在 Na、Y、F、Yb、Er 元素, 其中 F 的峰值位于 684.8 eV, Er 的峰值位于 172.78 eV。如图 3-4(c)所示, Na 的峰值位于 1070.5 eV。Y 的峰值位于 159.8 eV, 如图 3-

4(d)所示。Yb 4d 的峰值在 186.8 eV, 如图 3-4(e)所示。与文献中所显示的相一致^[127], 再次表明了 UCNP 的成功合成。

图 3-4(f)中为 Cit-UCNPs 和 OA-UCNPs 的 XRD 衍射图, 从该图可以看出, 样品有八个特征峰, 这些峰的位置与标准卡片 PDF:28-1192 相对应^[56], 这表明晶体形成了纯六方相, 并且 Cit-UCNPs 并不改变晶体的形貌。

3.3.3 核磁表征

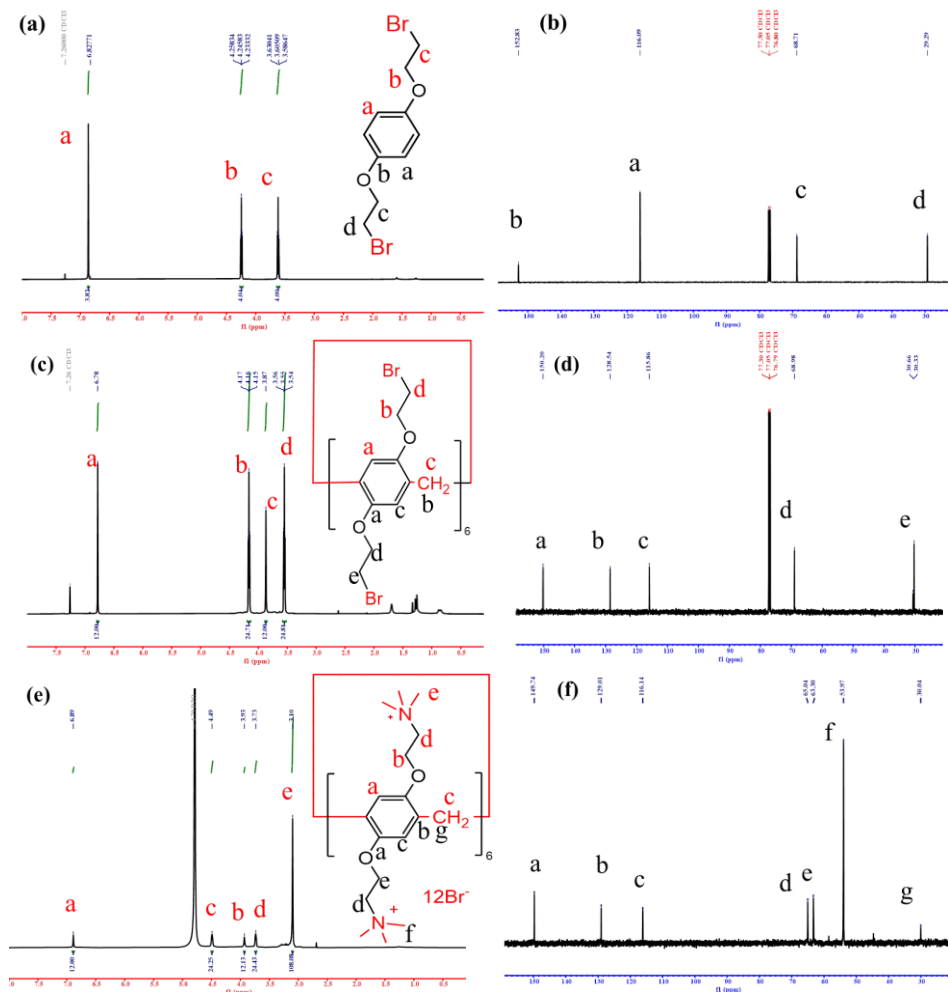


图 3-5 化合物 1 (a), 化合物 2 (c), CP6 (e) 的 ^1H NMR 表征; 化合物 1 (b), 化合物 2 (d), CP6 (f) 的 ^{13}C NMR 表征

Fig. 3-5 ^1H NMR characterization of compound 1 (a), compound 2 (c), CP6 (e); ^{13}C NMR characterization of compound 1 (b), compound 2 (d), CP6 (f).

将制备的 compound 1、compound 2 加入 CDCl_3 溶液中, CP6 加入 D_2O 溶液进行核磁氢谱和核磁碳谱表征, 如图 3-5 所示。各峰的位置与文献中各组峰的位置相一致, 实验结果表明了 CP6 的成功合成^[123]。图 3-5(a)和(b)分别为

compound 1 的核磁氢谱和核磁碳谱: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.828 (s, 4H, Ph-H), 4.258 (t, 4H, $J=6$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.605 (t, 4H, $J=6.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{Br}$) ppm. ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 152.83, 116.09, 68.71, 29.29 ppm。

图 3-5(c)和(d)分别为 compound 2 的核磁氢谱和核磁碳谱: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.789 (s, 12H, Ph-H), 4.161 (t, 24H, $J=6$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.878 (s, 12H, $-\text{CH}_2-$), 3.550 (t, 24H, $J=5.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{Br}$) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 150.20, 128.54, 115.86, 77.30, 77.05, 76.79, 68.98, 30.66, 30.33 ppm。

图 3-5(e)和(f)分别为 CP6 的核磁氢谱和核磁碳谱: ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 6.889 (s, 12H, Ph-H), 4.491 (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), 3.931 (s, 12H, $-\text{CH}_2-$), 3.735 (s, 24H, $-\text{CH}_2-$), 3.097 (s, 108H, N- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): δ 149.74, 129.01, 116.14, 65.04, 63.30, 53.97, 30.04 ppm。

3.3.4 红外光谱表征

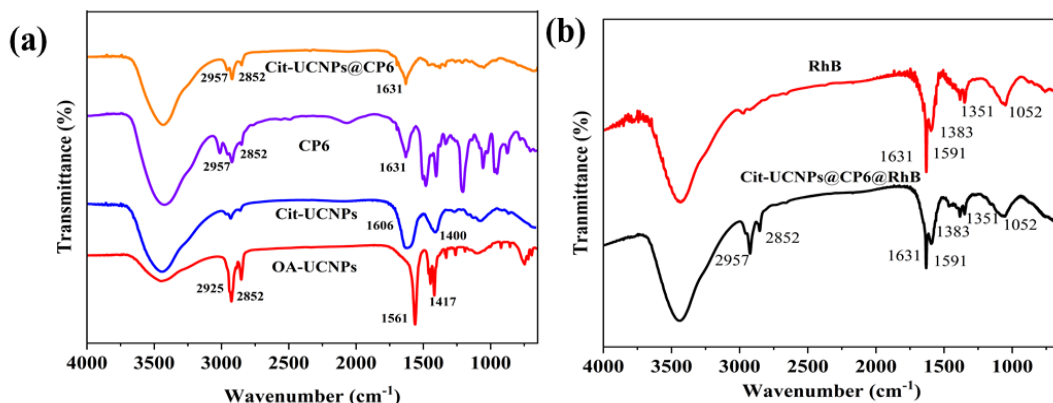


图 3-6 (a) OA-UCNPs, Cit-UCNPs, CP6, Cit-UCNPs@CP6 的红外光谱; (b) RhB, Cit-UCNPs@CP6@RhB 的红外光谱

Fig. 3-6 (a) FT-IR spectra OA-UCNPs, Cit-UCNPs, CP6, Cit-UCNPs@CP6; (b) FT-IR spectra RhB, Cit-UCNPs@CP6@RhB.

各组装材料的红外光谱如图 3-6 所示。对于 OA-UCNPs, 在 1561 cm^{-1} 和 1417 cm^{-1} 归因于油酸中羧基($-\text{COOH}$)的不对称和对称伸缩振动, 此外, 油酸长烷基链中的亚甲基($-\text{CH}_2$)不对称和对称伸缩振动对应 2925 和 2852 cm^{-1} 处的宽吸收峰^[128]。柠檬酸三钠(Cit)对 OA 进行配体交换后, 在 1606 cm^{-1} 处出现一个新的吸收峰, 同时在 2925 cm^{-1} 和 2852 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 表明 Cit 成功地交换

了油酸(OA)配体^[129]。对于 CP6, 2957 cm^{-1} 和 2852 cm^{-1} 为 CH_2 和 CH_3 的伸缩振动, 1630 cm^{-1} 和 1403 cm^{-1} 为苯基平面弯曲振动, 在 1207 cm^{-1} 为 C-O-C 拉伸振动^[130], 在 Cit-UCNPs@CP6 的红外光谱中也出现这些红外吸收峰, 这意味着 Cit-UCNPs 和 CP6 的成功结合。 1591 cm^{-1} 的吸收峰为 RhB 中(苯环骨架 C=C)的伸缩振动峰, Cit-UCNPs@CP6@RhB 中出现 RhB 的特征峰, 表明 Cit-UCNPs@CP6@RhB 的成功合成。

3.3.5 Zeta 电位和热重表征

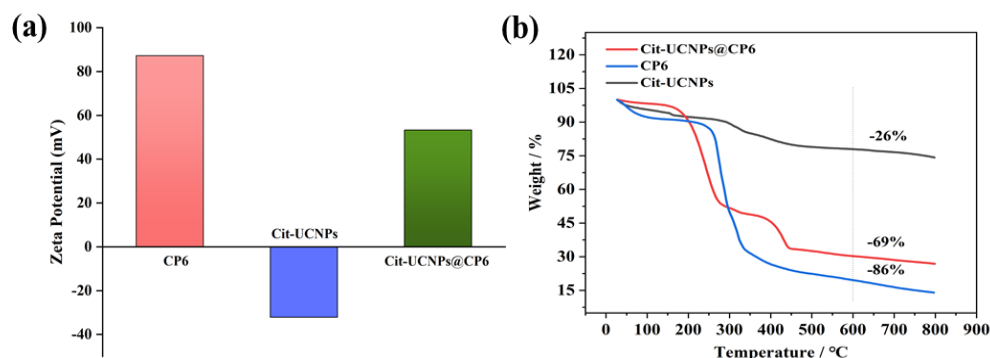


图 3-7 (a) CP6, Cit-UCNPs, Cit-UCNPs@CP6 的 Zeta 电位图; (b) Cit-UCNPs, CP6, Cit-UCNPs@CP6 的热重分析图

Fig. 3-7 (a) Zeta potentials of CP6, Cit-UCNPs, and Cit-UCNPs@CP6; (b) TGA curves of Cit-UCNPs, CP6, and Cit-UCNPs@CP6.

通过 Zeta 电位测试研究了 Cit-UCNPs 与 CP6 之间的结合特性。从图 3-7(a) 可以看出, CP6 和 Cit-UCNPs 的 Zeta 电位值分别为 87.2 mV 、 -32.1 mV , 与 Cit-UCNPs 的电位相比, Cit-UCNPs@CP6 的电位增加至 53.3 mV , 这归因于 CP6 所带的正电荷, 这表明了 Cit-UCNPs 和 CP6 是通过负电荷与正电荷之间的静电相互作用结合在了一起。

另一方面, 通过热重分析研究了 Cit-UCNPs、CP6 和 Cit-UCNPs@CP6 的热稳定性, 结果如图 3-7(b)所示。对于 Cit-UCNPs, 在约 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度下观察到 26% 的质量损失, 这是由于 Cit-UCNPs 中含氧官能团的热解。CP6 在 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时突然出现大量失重, 在 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时失重率达到 86%。Cit-UCNPs@CP6 复合材料在 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右由于 CP6 的分解而发生了急剧的质量损失, 在 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时质量损失达到了 69% 左右。因此, 由 Cit-UCNPs 和 Cit-UCNPs@CP6 之间的重量损失之差

计算出在 Cit-UCNPs 上负载的 CP6 为 43%。这一结果也表明 CP6 已被接枝到 Cit-UCNPs 上。

3.4 荧光检测

3.4.1 发生 FRET 的机理

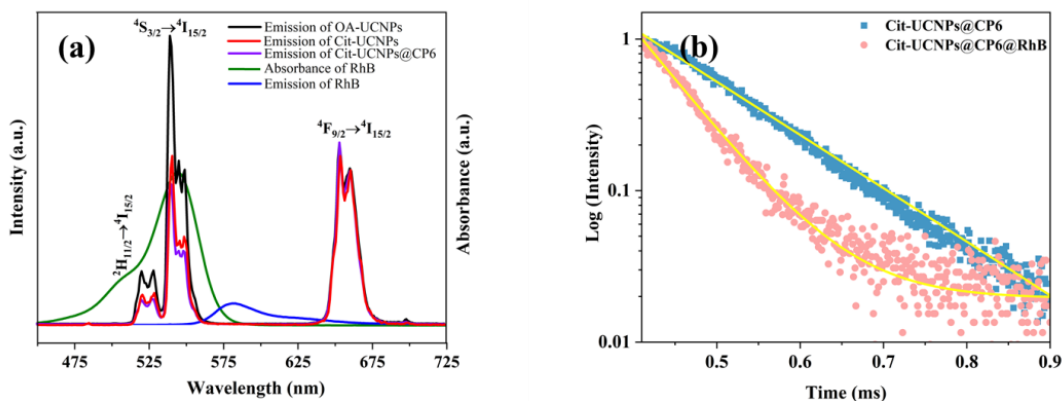


图 3-8 (a) RhB 水溶液的 UV-vis 吸收光谱以及 RhB, OA-UCNPs, Cit-UCNPs, Cit-UCNPs@CP6 的荧光发射光谱; (b) 在 980 nm 激发下, Cit-UCNPs@CP6 和 Cit-UCNPs@CP6@RhB 在 540 nm 处的荧光寿命

Fig. 3-8 (a) UV-vis absorption spectrum of RhB aqueous solution and the fluorescence emission spectrum of RhB, OA-UCNPs, Cit-UCNPs, Cit-UCNPs@CP6; (b) Fluorescence decay spectra for Cit-UCNPs@CP6 and Cit-UCNPs@CP6@RhB at 540 nm emission wavelength under excitation at 980 nm.

RhB 的紫外吸收光谱和 OA-UCNPs、Cit-UCNPs、Cit-UCNPs@CP6、RhB 的荧光发射光谱, 如图 3-8(a)所示。从图中可以看出, UCNPs 的荧光发射峰从左到右分别依次归属于 Er^{3+} 的 $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^2\text{H}_{15/2}$ (520 nm)、 $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (540 nm)、 $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (660 nm) 跃迁^[131]。柠檬酸钠对 OA-UCNPs 改性后, 水对 540 nm 处的荧光具有强烈的猝灭作用^[132]。在 CP6 复合之后, 由于有机体的振动能对稀土离子的荧光有一定的猝灭作用, 所以 UCNPs 的荧光发射强度有所降低。RhB 作为能量受体在 550 nm 左右有一个宽的紫外吸收区, 与 Cit-UCNPs 的荧光发射光谱有重叠, 此外由于 CP6 的存在, Cit-UCNPs 通过静电相互作用与 CP6 结合, RhB 通过主客体相互作用可以进入 CP6 的空腔, Cit-UCNPs 和 RhB 的距离足够接近, 使得制备的荧光复合材料可以发生 FRET 过程。由于 FRET 发生, 使得 Cit-UCNPs 在 540 nm 处的荧光猝灭, 加入 Ins 后, Ins 与 RhB 发生竞争性识别,

RhB 被置换, Cit-UCNPs 在 540 nm 处的荧光恢复。Cit-UCNPs 在 660 nm 处的荧光强度几乎没有变化, 这主要是由于 RhB 紫外吸收与 660 nm 处的荧光没有重叠, 没有产生 FRET。

Cit-UCNPs 与 RhB 之间的 FRET 效应可以通过荧光寿命测试得到进一步验证。在 980 nm 激发条件下, 对比测试结果显示, Cit-UCNPs@CP6@RhB 在 540 nm 处的荧光寿命较 Cit-UCNPs@CP6 明显缩短, 这一现象证实了能量从 Cit-UCNPs 向 RhB 的有效转移。如图 3-8(b)所示, 在没有 RhB 存在时, Cit-UCNPs@CP6 的荧光寿命为 123.8 μs 。而当 RhB 存在时, Cit-UCNPs@CP6@RhB 的荧光寿命下降到 63.5 μs , 进一步证明了从 Cit-UCNPs 到 RhB 的 FRET 效应。

3.4.2 实验条件的优化

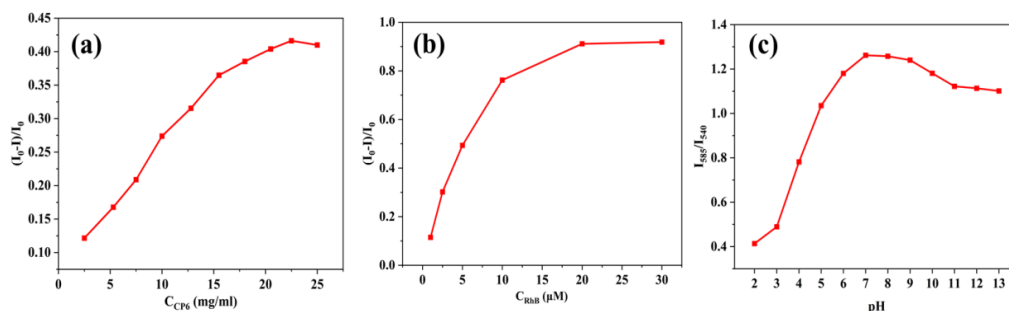


图 3-9 (a) CP6 质量对复合材料相对荧光猝灭程度 $(I_0 - I)/I_0$ 的影响 (I_0 为 Cit-UCNPs 初始荧光强度, I 是加入相应 CP6 质量后的荧光强度); (b) RhB 量对复合材料相对荧光猝灭程度的影响 (I_0 是 Cit-UCNPs@CP6 在 540 nm 的原始强度, I 是加入不同浓度 RhB 后的荧光强度); (c) 复合材料在不同 pH 下 585 nm 与 540 nm 处的荧光猝灭程度的影响

Fig. 3-9 (a) The effect of the CP6 mass on the relative fluorescence quenching degree of the composites (I_0 is the original intensity of Cit-UCNPs, I is the intensity for the materials with the corresponding amount of CP6); (b) The effect of the RhB amount on the relative fluorescence quenching degree of the composites (I_0 is the original intensity of Cit-UCNPs@CP6, I is the intensity for the materials with the corresponding amount of RhB); (c) The effect of pH on the fluorescence quenching degree at 585 nm and 540 nm for composite materials.

CP6 的用量是影响 FRET 效应的一个重要因素, 因为只有 RhB 负载到 CP6 中才能诱导 FRET 过程。研究了 CP6 的用量对 FRET 过程的影响, 如图 3-9(a)所示。在 Cit-UCNPs@CP6@RhB 制备过程中, 保持其他条件不变, 改变 CP6

的浓度, 得到不同的 Cit-UCNPs@CP6@RhB, 分别测试 540 nm 处的荧光强度并计算荧光猝灭度 $(I_0-I)/I_0$, 从图中可以看出 $(I_0-I)/I_0$ 随着 CP6 用量的增加而增加, 最高到 22.5 mg mL^{-1} 。

以同样的方式, 研究了加入 RhB 的最佳用量。在 Cit-UCNPs@CP6@RhB 的制备过程中, 保持其他物质的用量不变, 改变 RhB 的浓度, 得到不同的 Cit-UCNPs@CP6@RhB 复合材料, 如图 3-9(b)所示。结果表明, $(I_0-I)/I_0$ 随着 RhB 的浓度增加而增加, 直至 $20 \text{ }\mu\text{M}$ 。这可能是由于随着实验中添加的 RhB 的增加, 复合材料中 RhB 的量也随之增加, 这会导致 UCNPs 和 RhB 之间 FRET 效应增强。当 RhB 用量高于 $20 \text{ }\mu\text{M}$ 时, $(I_0-I)/I_0$ 变化不大, 这是因为过量的 RhB 通过纯化被洗掉。因此, 选择 RhB 浓度为 $20 \text{ }\mu\text{M}$ 进行实验。

实验确定了 Cit-UCNPs@CP6@RhB 复合材料在不同 pH 下的 FRET 传感效率, 对 Cit-UCNPs@CP6@RhB 样品进行了荧光测试, 不同 pH 下激发波长为 980 nm 的 Cit-UCNPs@CP6@RhB 在 585 nm(RhB 的发射)与 540 nm(Cit-UCNPs 的发射)处荧光强度比值 I_{585}/I_{540} 柱状图, 如图 3-9(c)所示。结果表明, 当 pH 值为 7 时, 585 nm 与 540 nm 处的比值最大, Cit-UCNPs@CP6@RhB 的 FRET 传感效率最好。

3.4.3 传感过程

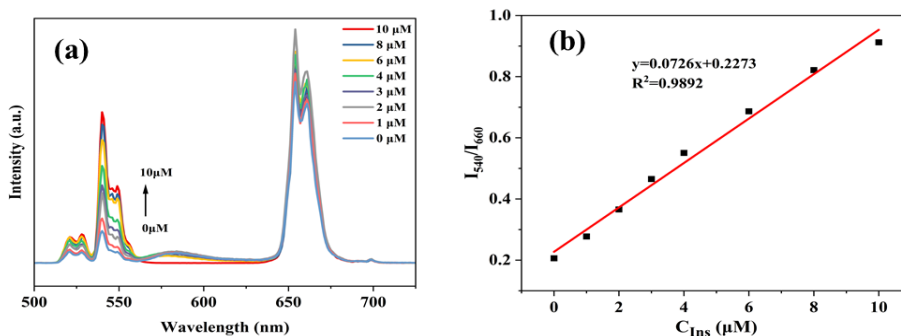


图 3-10 (a) Cit-UCNPs@CP6@RhB (20 mg mL^{-1})与不同浓度 Ins 孵育后的荧光发射光谱;
(b) I_{540}/I_{660} 与 Ins 浓度的线性关系

Fig. 3-10 (a) Fluorescence emission spectra of Cit-UCNPs@CP6@RhB (20 mg mL^{-1}) after incubation with different oncentrations of Ins; (b) Linear relationship between fluorescence emission and Ins concentration at I_{540}/I_{660} .

本研究通过考察 Ins 浓度对 Cit-UCNPs@CP6@RhB 荧光强度的影响, 评估了该荧光复合材料的检测灵敏度。在 $0\text{--}10 \text{ }\mu\text{M}$ 范围内, 随着 Ins 浓度的增加,

该荧光复合材料在 540 nm 处的荧光发射强度增强, 如图 3-10(a)所示。这主要是由于 Ins 与 CP6 的结合系数大于 RhB 与 CP6 的结合系数, Ins 可以取代 RhB, 打断了 FRET 过程^[123], Cit-UCNPs 的荧光发生恢复。Cit-UCNPs 在 540 nm 处的荧光发射峰未发生位置偏移, 表明 Cit-UCNPs@CP6@RhB 依旧分散均匀。如图 3-10(b)所示, Cit-UCNPs@CP6@RhB 在 540 nm 与 660 nm(荧光背景)处的荧光强度比值 I_{540}/I_{660} (扣除荧光背景干扰)与 Ins 浓度具有一定的线性关系, 其线性方程为 $I_{540}/I_{660}=0.0726 C_{\text{Ins}}+0.2273(R^2=0.9892)$ 。用公式 $\text{LOD}=K\text{Sd}/m$ 计算其检出限 (LOD)^[133], 其中 Sd 为空白测量值的标准差, m 是荧光恢复度与 Ins 浓度的斜率, K 是可信水平, 通常设置为 3, 根据上述方程计算出的 LOD 为 0.32 μM 。

3.4.4 干扰试验

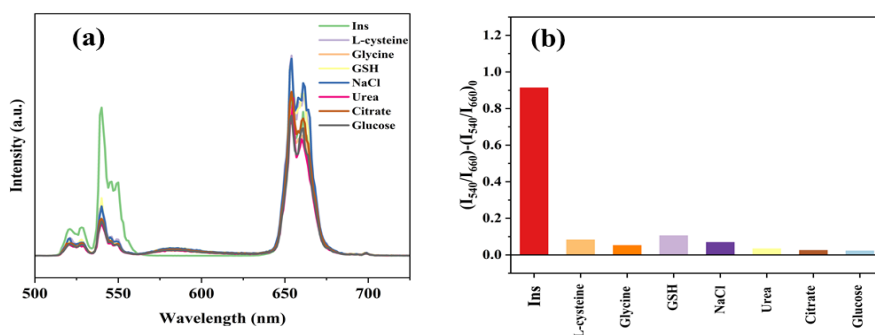


图 3-11 (a) 在 20 mg mL⁻¹ Cit-UCNPs@CP6@RhB 溶液中加入各种干扰物质的荧光发射光谱; (b) Ins 或其他干扰物质作用下复合材料在 540 nm 处的荧光恢复直方图($(I_{540}/I_{660})_0$ 为原始强度 Cit-UCNPs@CP6@RhB, I_{540}/I_{660} 为 10 μM Ins 或 200 μM 其他干扰物质作用下的强度)

Fig. 3-11 (a) Fluorescence emission spectra of various interfering substances were added to 20 mg mL⁻¹ Cit-UCNPs@CP6@RhB solution; (b) Histogram of fluorescence recovery of the nanoprobe with Ins or other interfering substances. $(I_{540}/I_{660})_0$ is the original intensity of Cit-UCNPs@CP6@RhB; I_{540}/I_{660} is the intensity with 10 μM of Ins or 200 μM of other interfering substances)

干扰化合物的影响是应用该荧光传感平台时需要考虑的一个重要方面。因此, 研究了所提出的方法用于 Ins 测定的选择性。在评价抗干扰性能时, Ins 浓度为 10 μM , 所有干扰离子(L-cysteine、Glycine、GSH、NaCl、Urea、Citrate、Glucose)为 200 μM (20 倍)。如图 3-11(a)所示, 加入 Ins 后 Cit-UCNPs 在 540 nm 处的荧光强度明显增强, 而干扰物质对荧光复合材料的荧光强度的影响相对较

小。加入干扰物后 Cit-UCNPs@CP6@RhB 复合物在 540 nm 处和 660 nm 处的荧光比 I_{540}/I_{660} 的变化,如图 3-12(b)所示。结果表明,该复合材料对 Ins 具有良好的选择性,因此, Cit-UCNPs@CP6@RhB 纳米复合材料可以用于人血清中 Ins 的直接检测。

3.5 实际样品检测

3.5.1 复合材料对人体血清中胰岛素的检测

表 3-1 复合材料对人体血清中 Ins 的检测结果

Table 3-1 Detection of Ins in human serum samples by composite materials

样本	添加 Ins (μM)	检测 Ins (μM)	恢复 (%)	RSD (%, n=5)
血清	2.0	1.92	96	1.05
	4.0	4.41	110	2.59
	8.0	7.91	98.8	1.86

采用该荧光探针对人血清中 Ins 含量进行测定(表 3-1),系统评价了分析方法的准确性、重复性和选择性等关键性能指标。添加 Ins 的回收率为 96%~110%,检测结果的相对误差 RSD 为 1.05%~2.59%。结果表明,所合成的探针可用于人血清中 Ins 的检测。

3.5.2 与其他文献的对比

参考其他文献,对各探针的检测性能进行比较,对比结果如表 3-2 所示。

表 3-2 与其他文献的对比

Table 3-2 A comparison of the proposed sensor with previous reference for Ins detection

探针	线性范围	检测限	文献
Ni(OH) ₂ /Nafion-MWCNTs	1.5-40 μM	0.44 μM	Martínez et al. (2016) ^[134]
7CB-LC	25-500 μM	25 μM	Satya et al. (2024) ^[135]
5CB	0.1-1.0 nM	0.1 nM	Chen et al. (2022) ^[136]
AgNP@ONP	0-225 nM	0.2 nM	Bhardwaj et al. (2022) ^[137]
TPE-Z-IGA3@GO	1-100 pM	0.42 pM	Zeng et al. (2023) ^[138]
CC/TiO ₂	7-1000 pM	2.7 pM	Ramya et al. (2024) ^[139]
Cit-UCNPs@CP6@RhB	0-10 μM	0.32 μM	本文工作

此外，表 3-2 给出了该探针与在过去几年中其他探针检测 Ins 的对比。从表中可以看出，所建立的方法与其他已报道的方法相比，具有合适的线性范围和检测限。

3.6 结论

建立了一种基于 FRET 机理的荧光探针对 Ins 进行检测。该纳米探针以 Cit-UCNPs 作为能量供体，RhB 作为能量受体，带负电的 Cit-UCNPs 可以通过静电相互作用与带正电的 CP6 结合，RhB 可以通过主客体相互作用进入 CP6 的空腔内，从而缩短 Cit-UCNPs 与 RhB 之间的距离。能量从 Cit-UCNPs 向 RhB 转移，导致 FRET 过程的发生，Cit-UCNPs 荧光猝灭，RhB 荧光强度不断增强。当将 Ins 分子加入到 Cit-UCNPs@CP6@RhB 复合物中时，RhB 被 Ins 置换，Cit-UCNPs 荧光恢复。因此该纳米探针可以作为人体血清中 Ins 检测的有效荧光传感平台。

第 4 章 关于 UCNPs@ γ -CD@PB 的比率式 off-on 探针对盐酸环丙沙星的传感研究

4.1 引言

盐酸环丙沙星(CIP)是一种广泛应用于人畜医学的氟喹诺酮类抗生素, CIP 较多存在于废水、地表水和污水中^[140, 141]。由于全球需求的增加和处理不当, 环丙沙星在自然水体中的存在已经变得普遍^[142]。即使 CIP 在饮用水中浓度较低, 也会对健康造成不良影响, 如头痛、恶心和呕吐, 而浓度较高则可能导致严重问题, 如急性肾衰竭和血液疾病。这种日益严重的环境污染对灵敏可靠的检测方法迫切需要。目前常用的 CIP 检测方法有电化学分析法(EA)^[143, 144]、高效液相色谱法(HPLC)^[145]和毛细管电泳(CE)^[146]等。尽管这些方法检测 CIP 的重现性和稳定性都很高, 但仍存在成本高、耗时长、操作复杂等缺点, 阻碍了其广泛应用。上转换荧光检测技术因其具有灵敏度高、操作简便、背景信号低、检测速度快等特点, 受到研究者的广泛关注。

Förster 共振能量转移(FRET)是两个光敏分子(通常称为“供体”和“受体”)之间的距离依赖性能量转移过程。当供体荧光团被外部光源激发时, 如果供受体荧光团之间的距离在 1-10 nm 范围内, 它可以将其能量非辐射性地转移到受体荧光团上。FRET 的效率对供体荧光团和受体荧光团之间的距离高度敏感, 使其成为实时检测分子相互作用和构象变化的出色方法^[147, 148]。

上转换纳米材料(UCNPs)具有独特的光谱特性, 通过吸收两个或更多低能量近红外(NIR)光子, 发射出一个高能量的紫外-可见(UV-vis)光子^[149, 150]。这种反斯托克斯位移过程, 被称为上转换。UCNPs 具有高光子效率、长寿命发光、多重发射波长等发光特性以及良好的生物相容性和化学稳定性^[151, 152]。这些特性使 UCNPs 在生物医学和分析应用中更有前景^[153]。

迄今为止, 基于 UCNPs 的 FRET 探针已经被开发用于智能传感和成像^[154]、气体检测^[155]和生物分析^[156]等。Rong 等人^[157]提出了一种以聚二甲基硅氧烷(PDMS)为基质, 以核壳 UCNPs(CS-UCNP)的 PDMS 作为指示剂的可操纵固态发光传感器来检测丙烯酰胺(AM)。异硫氰酸酯异构体(FITC)通过 FRET 有效地

猝灭了上转换发光。AM 的引入导致优先结合到适配体，导致猝灭基团和供体分离，并导致发光恢复。Han 等人^[158]设计了一种新的系统，以羟基氧化钴(CoOOH)功能化的上 UCNP 来检测抗坏血酸(AA)。Wu 等人^[159]基于 UCNP 和金纳米粒子(AuNP)之间的 FRET，设计了一种能够检测胰蛋白酶及其抑制剂的纳米传感器。

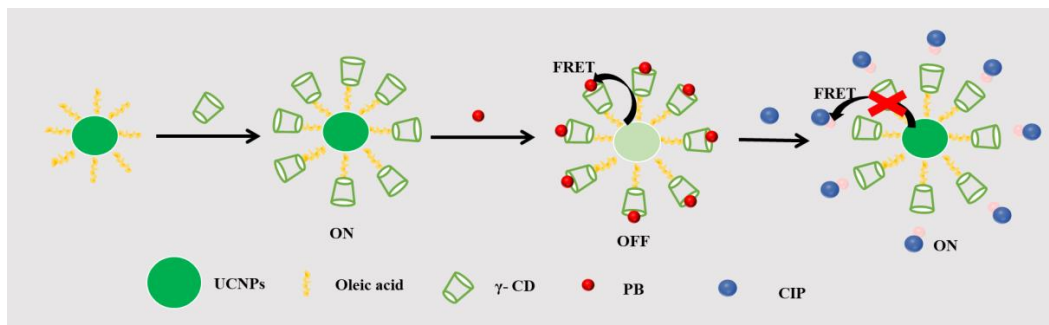


图 4-1 UCNP@ γ -CD@PB 检测 CIP 的机理图

Fig. 4-1 Mechanism diagram of the detection of CIP by UCNP@ γ -CD@PB

基于此，本研究构建了一种直接检测 CIP 的 FRET 纳米探针，如图 4-1 所示，在该系统中， γ -CD 修饰的 UCNP 作为能量供体在 540 nm 处有一个很强的荧光发射峰，荧光桃红 B(PB)作为能量受体在 540 nm 左右有紫外吸收峰， γ -CD 作为连接体可以缩短 UCNP 与 PB 之间的距离^[160]。由于供体的荧光发射光谱与受体的紫外吸收光谱之间存在良好的重叠关系，这使得 FRET 效应发生，能量从 UCNP 转移到 PB，UCNP 的荧光猝灭。在体系中加入 CIP 后，CIP 可以通过与 PB 发生 n - π 荷移络合生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应^[161]，致使 FRET 减弱，UCNP 荧光增强，从而实现对 CIP 的检测。将该方法应用于水中 CIP 的检测，获得了可靠的结果。表明该方法具有较高的应用潜力。

4.2 实验部分

4.2.1 实验试剂

所有的原材料都是购买后直接使用的。醋酸铒($\text{Er}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、乙酸镱($\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、醋酸钇($\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$, 99.9%)、氟化铵(NH_4F , 96%)、油酸钠($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Na}$)、油酸(OA, AR)、十八烯($\text{C}_{18}\text{H}_{36}$, 90%)、荧光桃红 B(PB, 97%)、盐酸环丙沙星(CIP, 97%)、氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%)、氯化镁(MgCl_2 , 99%)、氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%)均从阿拉丁试剂有限公司购买，甲醇(CH_3OH , 99.9%)、环己烷(C_6H_{12} , AR)、过氧化氢(H_2O_2 , AR)由国药控股有

限公司提供, γ -环糊精(γ -CD, 98%)、氯化铝(AlCl_3 , 99.9%)、氯化钡(BaCl_2 , 99.9%)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 99%)、聚乙烯亚胺(PEI, 99.9%)均从泰坦科技探索平台直接购买。

4.2.2 实验仪器

用赛默飞世尔科技公司的 Talos F200S 透射电镜(TEM)对其形态特征和 EDS 进行了表征, 用岛津仪器技术公司的 XRD-6100 型衍射仪进行了 XRD 表征, XPS 测试采用美国赛默飞世尔科技公司提供的 Escalab 250XI 光电子能谱仪, 用德国 Bruker 公司的红外光谱仪进行了红外光谱测试, 由上海精科的 LS5 型的紫外-可见光谱分析仪进行了紫外-可见吸收光谱测试, 采用爱丁堡公司提供的上转换荧光仪进行荧光光谱测定。

4.2.3 荧光复合材料的制备

4.2.3.1 OA-UCNPs 的制备

根据文献提供的方法可以制备 OA-UCNPs^[92]。将 0.2075 g $\text{Y}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、0.0844 g $\text{Yb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、0.0083 g $\text{Er}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$ 、7 mL OA 和 15 mL 十八烯置于 100 mL 烧瓶中, 将混合物在 N_2 氛围下加热到 150 °C, 并在此温度下保持 40 min, 可以形成透明的黄色溶液。冷却至 50 °C 后, 加入 10 mL 含 0.1482 g NH_4F 和 0.7611 g 油酸钠的甲醇溶液, 将混合物再搅拌 40 min, 然后加热到 100 °C, 除去低沸点溶剂。之后将溶液在 N_2 下加热至 290 °C 反应 1.5 h, 溶液冷却至室温后, 用乙醇洗涤两次, 然后将得到的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 分散在 5 mL 的环己烷溶液中并放置冰箱冷藏, 以备后续使用。

4.2.3.2 UCNPs@ γ -CD 的制备

UCNPs@ γ -CD 由文献中的方法制备^[162]。将 12 mL $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 γ -CD 水溶液与等体积含 60 mg OA-UCNPs 的乙醇和水(2:1, v/v)的混合。将混合物剧烈搅拌 20 h 后, 收集溶液并离心, 然后用去离子水和乙醇溶液交替洗涤三次。得到的样品分散在去离子水或其他极性溶剂中。

4.2.3.3 UCNPs@ γ -CD@PB 的组装及对 CIP 的检测

将 30 mg UCNPs@ γ -CD 与 PB 在磷酸盐缓冲溶液中搅拌 24 h, 经过离心、洗涤、干燥等步骤得到 UCNPs@ γ -CD@PB, 在 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的复合材料溶液中

加入不同浓度的 CIP 溶液，孵化 30 min，分别测量紫外吸收光谱和荧光发射光谱，并进行分析表征。

4.2.3.4 CIP 的抗干扰测试

将复合材料 $\text{UCNPs}@ \gamma\text{-CD}@ \text{PB}$ 分别与干扰物质(Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、CTAB、 H_2O_2 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、PEI)对 CIP 的选择性进行测试。所加入的 CIP 浓度为 $20 \mu\text{M}$ ，干扰物质浓度为 $600 \mu\text{M}$ (30 倍)，测定了它们的荧光光谱。

4.2.3.5 对水中 CIP 的进行检测

采用标准添加法测定实际样品中 CIP 的含量，取 10 mL 芜湖市居民楼使用自来水^[163]和芜湖市第五人民医院附近的河水^[164]，用滤纸过滤后，分别加入已知浓度的 CIP，将同等量的待测样品加入 $\text{UCNPs}@ \gamma\text{-CD}@ \text{PB}$ 溶液中，测定荧光发射光谱。

4.3 合成表征

4.3.1 TEM 及 XRD 的相关表征

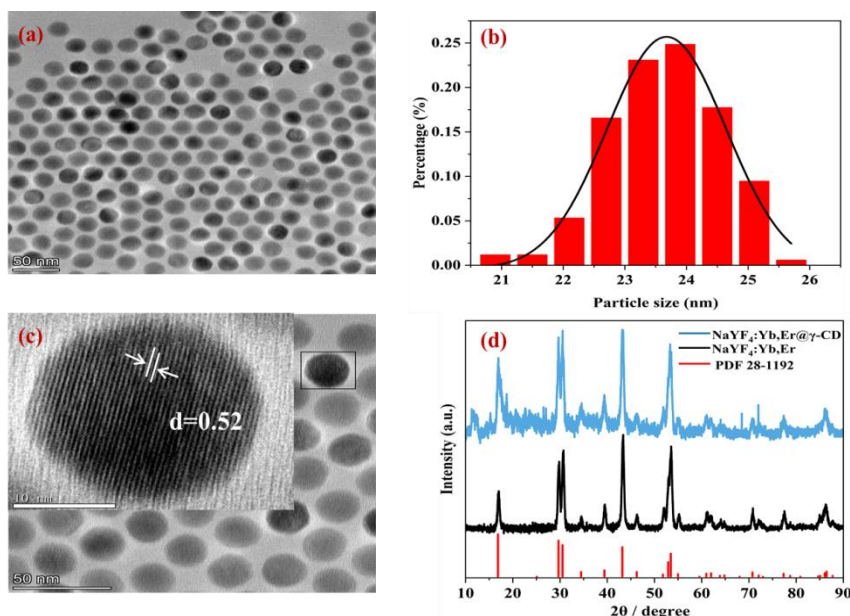


图 4-2 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的 TEM 图(a); $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的粒径分布图(b); $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的 HR-TEM 图(c); $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}@ \gamma\text{-CD}$ 的 XRD 图，其中红线为 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 的标准数据图(d)

Fig. 4-2 TEM diagram of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ (a); Particle size distribution of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ (b); HR-TEM plot of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ (c), XRD plot of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ and $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}@ \gamma\text{-CD}$, the red line is the standard data graph of $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ (d).

通过 TEM 表征, 系统分析了纳米粒子的形貌特征和尺寸分布。从图 4-2(a) 可以清楚地看出 OA-UCNPs(NaYF₄:Yb,Er)表现出均匀的球形和高单分散性。从图 4-2(b)可以看出, NaYF₄:Yb,Er 的平均粒径为 23.66 nm。从图 4-2(c)的高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)图像可以看出, NaYF₄:Yb,Er 的晶格间距为 0.52 nm, 这与 NaYF₄:Yb,Er 的(100)晶面对应。

用 XRD 对 NaYF₄:Yb,Er 的晶体结构进行了研究。图 4-2(d)为 NaYF₄:Yb,Er 和 NaYF₄:Yb,Er@ γ -CD 的 XRD 图, 从图中可以看出材料的每个衍射峰都和标准卡片(PDF 28-1192)相一致^[165], 没有其他峰出现, 说明了所制备的材料是纯的六方相的。

4.3.2 EDS 表征

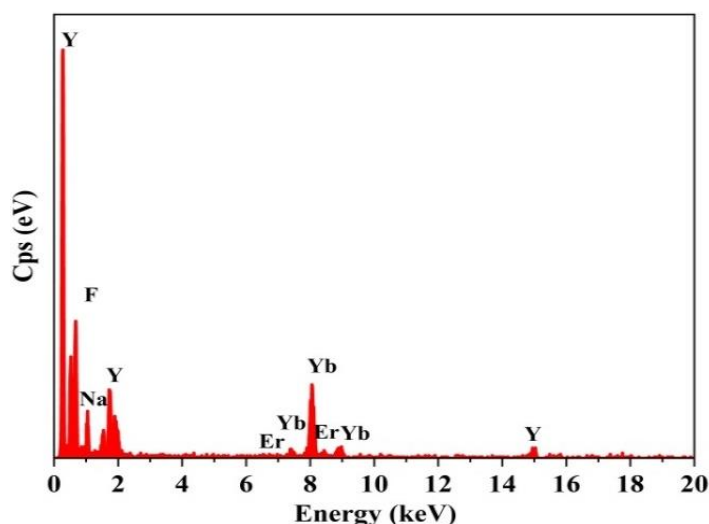


图 4-3 NaYF₄:Yb,Er 的 EDS 表征

Fig. 4-3 EDS characterization of NaYF₄:Yb,Er.

采用 EDS 对所制备的上转换纳米材料进行了元素组成分析, 如图 4-3 所示。从图中可以看出, 该材料中含有 Na、Y、F、Yb、Er 元素, 与文献相一致^[166], 再次表明了 NaYF₄:Yb,Er 的成功合成。

4.3.3 XPS 的相关表征

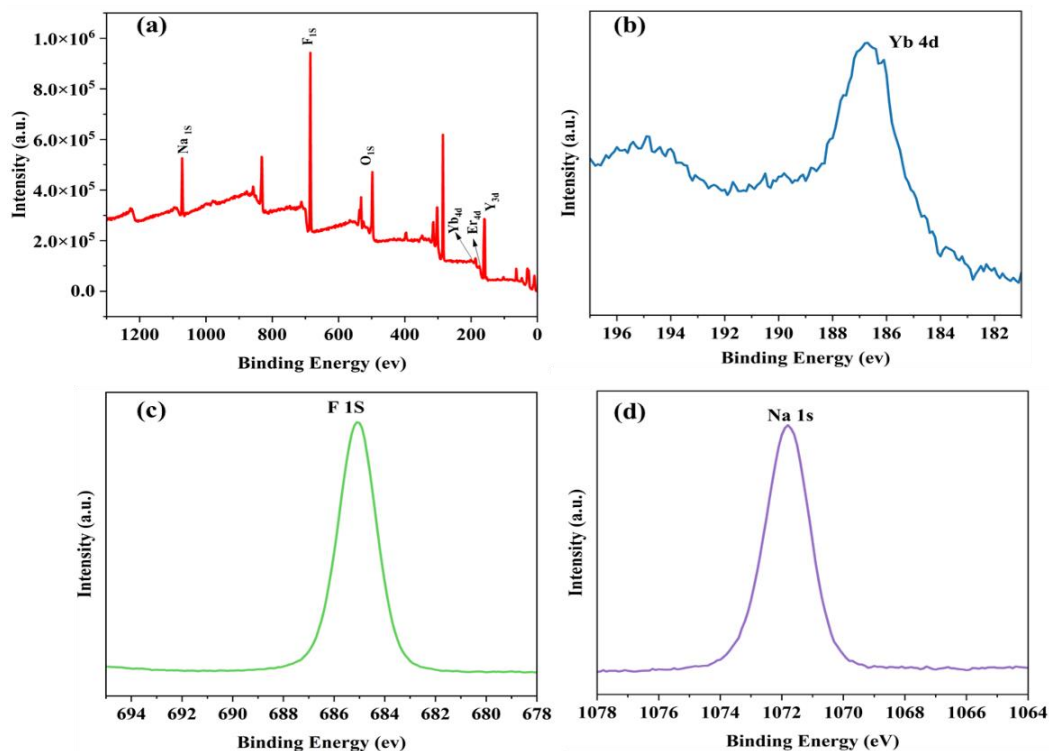
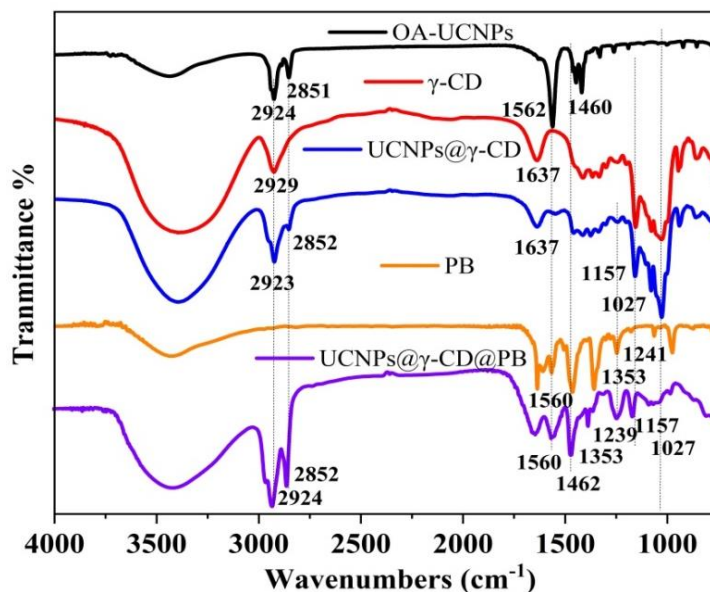


图 4-4 (a) NaYF₄:Yb,Er 的 XPS 谱图, (b) Yb 4d、(c) F 1s、(d) Er 4d 元素的 XPS 谱图

Fig. 4-4 (a) XPS spectra of (a) NaYF₄:Yb,Er, (b) Yb 4d, (c) F 1s, (d) Na 1s elements.

利用 XPS 技术, 进一步研究了 NaYF₄:Yb,Er 的元素组成, 如图 4-4 所示。从图 4-4(a) NaYF₄:Yb,Er 的全谱中可以看出在合成的材料中同时存在 Na、Y、F、Yb、Er 元素, 其中, Er 的峰值位于 174.4 eV, Y 的峰值位于 159.2 eV。如图 4-4(b)所示, Yb 4d 的峰值在 185.5 eV。F 的峰值位于 685.1 eV, 如图 4-4(c)所示, Na 的峰值位于 1071.8 eV, 如图 4-4(d)所示。与文献中所显示的相一致^[167], 表明了 OA-UCNPs 的成功合成。

4.3.4 红外光谱表征

图 4-5 OA-UCNPs、 γ -CD、UCNPs@ γ -CD、PB、UCNPs@ γ -CD@PB 的红外光谱Fig. 4-5 FT-IR spectra of OA-UCNPs, γ -CD, UCNPs@ γ -CD, PB, and UCNPs@ γ -CD@PB

各组装材料的红外光谱如图 4-5 所示，在 OA-UCNPs 光谱中， 2851 cm^{-1} 和 2924 cm^{-1} 的分别归属于亚甲基的对称和不对称伸缩振动，在 1562 cm^{-1} 和 1460 cm^{-1} 处的归属于羧基的不对称和对称伸缩振动^[168]。在 γ -CD 的光谱中， 1027 cm^{-1} 处的光谱峰为 C-O/C-C 的耦合拉伸振动， 2929 cm^{-1} 红外特征峰为 -CH 的伸缩振动^[169]。在 UCNPs@ γ -CD 的红外光谱中也出现了相同的特征峰，表明了 γ -CD 成功的包裹到了 UCNPs 上。在 PB 的红外光谱中， 1462 cm^{-1} 和 1560 cm^{-1} 为钠-2,4,5,7-四溴-6-氧原酸盐基的弯曲振动， 1241 cm^{-1} 和 1353 cm^{-1} 为钠-2,4,5,7-四溴-6-氧原酸盐基中的 C-H 的伸缩振动^[170]。在 UCNPs@ γ -CD@PB 的红外光谱中也出现了相同的特征峰，表明了 PB 已经成功和 UCNPs@ γ -CD 结合形成 UCNPs@ γ -CD@PB。

4.4 荧光检测

4.4.1 发生 FRET 的机理

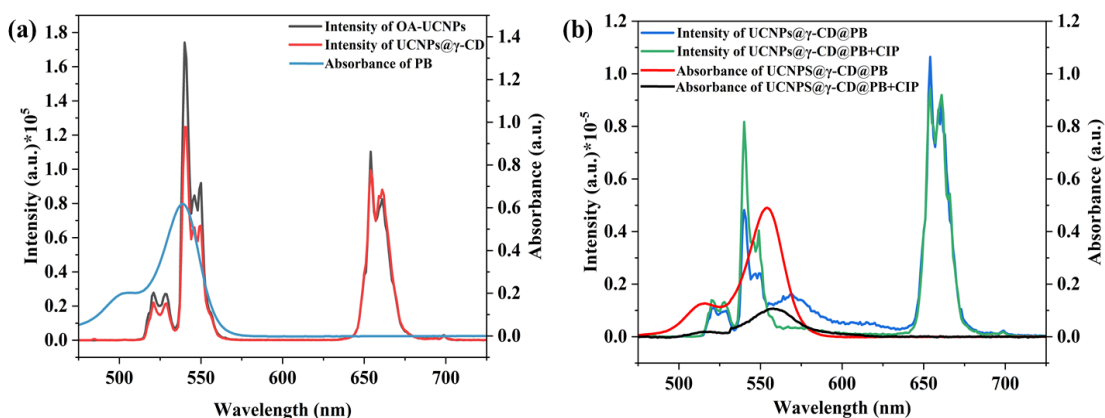


图 4-6 (a) OA-UCNPs、UCNPs@ γ -CD 的荧光发射光谱以及 PB 的紫外吸收光谱；(b) UCNPs@ γ -CD@PB、UCNPs@ γ -CD@PB+CIP 的荧光发射光谱以及紫外吸收光谱

Fig. 4-6(a) Fluorescence emission spectra of OA-UCNPs, UCNPs@ γ -CD, and UV absorption spectrum of PB; (b) UV absorption spectrum and Fluorescence emission spectra of UCNPs@ γ -CD@PB, UCNPs@ γ -CD@PB+CIP.

PB 的紫外吸收光谱和 OA-UCNPs、UCNPs@ γ -CD 的荧光发射光谱，如图 4-6(a)所示。从图中可以看出，OA-UCNPs 在 525 nm、540 nm 和 654 nm 处有发射峰^[171]。在 γ -CD 复合之后，由于有机体的振动能对稀土离子的荧光有一定的猝灭作用，所以 UCNPs 的荧光发射强度有所降低。PB 在 540 nm 左右有一个宽的紫外吸收峰，与 UCNPs 在 540 nm 处的荧光发射光谱有明显的重叠， γ -CD 作为连接体，使 UCNPs 和 PB 的距离足够接近，因此 UCNPs@ γ -CD@PB 满足发生 FRET 发生的条件。

UCNPs@ γ -CD@PB 以及 UCNPs@ γ -CD@PB+CIP 的荧光发射光谱和紫外吸收光谱，如图 4-6(b)所示。由于发生 FRET 效应，UCNPs@ γ -CD 与 PB 复合后，UCNPs@ γ -CD 在 540 nm 处荧光发生猝灭，565 nm 处出现新的 PB 发射峰，UCNPs@ γ -CD@PB 的紫外吸收峰在 555 nm 处，与 PB 的紫外吸收峰相比较 UCNPs@ γ -CD@PB 的紫外吸收峰发生了少量偏移。当加入 CIP 后，CIP 可以通过与 PB 发生 n- π 荷移络合生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应，UCNPs@ γ -CD@PB+CIP 的紫外吸收减弱，致使 FRET 减弱，PB 的荧光降低，

UCNPs 荧光增强，从而实现对 CIP 的检测。综合以上分析可知，本系统可以实现对 CIP 的传感。

4.4.2 实验条件的优化

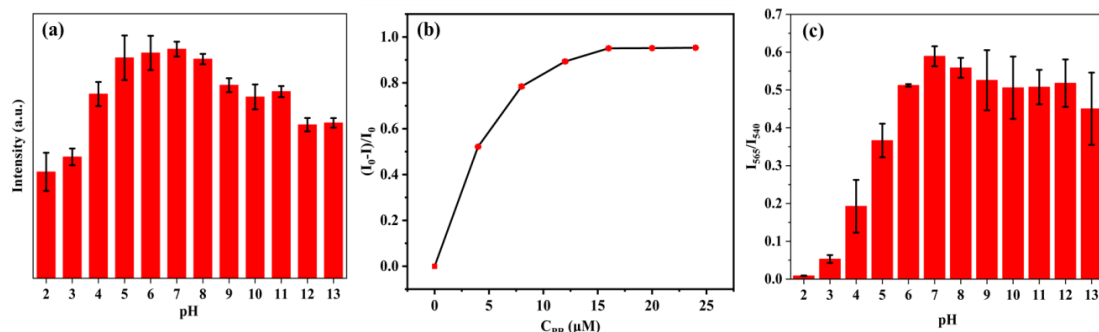


图 4-7 (a) 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD 在不同 pH 下 540 nm 处的荧光强度柱状图；(b) PB 的浓度对 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD 复合材料在 540 nm 处荧光猝灭度 (I₀-I)/I₀ 的影响, (I₀ 为初始荧光强度, I 为加入不同浓度的 PB 后的荧光强度); (c) 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD@PB 在不同 pH 下 565 nm 与 540 nm 处的荧光强度比值柱状图

Fig. 4-7 (a) Fluorescence intensity histogram of 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD at 540nm at different pH, (b) Effect of the concentration of PB on the fluorescence quenching (I₀-I)/I₀ of 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD@RhB composites at 540 nm (I₀ is the UCNPs@γ-CD fluorescence intensity, I is the fluorescence intensity after adding different concentrations of PB), (c) 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD@PB Histogram of fluorescence intensity ratio at 565 nm and 540 nm at different pH.

本研究通过系统测试不同 pH 条件下 10 mg mL⁻¹ UCNPs@γ-CD 的荧光发射特性，深入探究了 pH 值对其荧光强度的影响规律。不同 pH 下激发波长为 980 nm 的 UCNPs@γ-CD 荧光强度柱状图如图 4-7(a)所示。结果表明，当 pH 值为 7 时，UCNPs@γ-CD 的荧光强度最好。

以同样的方式，研究了加入 PB 的最佳用量。在 UCNPs@γ-CD@PB 的制备过程中，保持其他物质的用量不变，改变 PB 的浓度，得到不同的 UCNPs@γ-CD@PB 复合材料，如图 4-7(b)所示。结果表明，(I₀-I)/I₀ 随着 PB 的浓度增加而增加，直至 16 μM。这可能是由于随着实验中添加的 PB 的增加，复合材料中 PB 的量也随之增加，这会导致 UCNPs 和 PB 之间 FRET 效应增强。当 PB 用量

高于 $16\ \mu\text{M}$ 时, $(I_0-I)/I_0$ 变化不大, 这是因为加入 PB 的最佳浓度为 $16\ \mu\text{M}$, 过量的 PB 通过纯化被洗掉。因此, 选择 PB 浓度为 $16\ \mu\text{M}$ 进行实验。

UCNPs@ γ -CD@PB 复合材料的 FRET 传感性能通过 $980\ \text{nm}$ 激发光下的荧光光谱测试进行了系统研究。图 4-7(c) 展示了 $565\ \text{nm}$ 与 $540\ \text{nm}$ 处荧光发射峰强度比值随 pH 变化的规律, 该比值变化直观反映了不同 pH 条件下材料的 FRET 效率差异。结果表明, 当 pH 值为 7 时, $565\ \text{nm}$ 与 $540\ \text{nm}$ 处的比值最大, UCNPs@ γ -CD@PB 的 FRET 传感效率最好。

4.4.3 传感过程

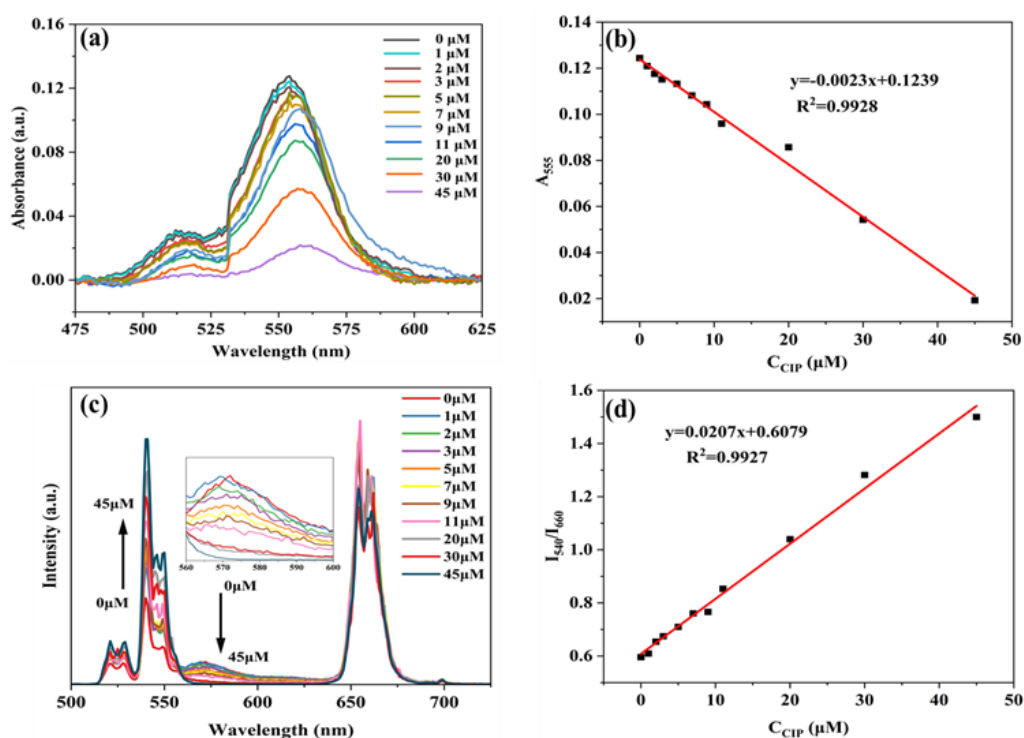


图 4-8 (a) 在加入 $0\text{--}45\ \mu\text{M}$ CIP 后 $10\ \text{mg mL}^{-1}$ UCNPs@ γ -CD@PB 水溶液的紫外吸收光谱; (b) 在 $555\ \text{nm}$ 处的紫外吸收与 CIP 浓度的线性关系图; (c) $10\ \text{mg mL}^{-1}$ 的 UCNPs@ γ -CD@PB 水溶液在加入 $0\text{--}45\ \mu\text{M}$ CIP 后的荧光光谱; (d) 荧光比值 I_{540}/I_{660} 与 CIP 浓度的线性关系图

Fig. 4-8 (a) UV absorption spectra of $10\ \text{mg mL}^{-1}$ UCNPs@ γ -CD@RhB aqueous solution with the addition of $0\text{--}45\ \mu\text{M}$ CIP; (b) Linear relationship between ultraviolet absorption and CIP concentration at $555\ \text{nm}$; (c) Fluorescence spectra of $10\ \text{mg mL}^{-1}$ UCNPs@ γ -CD@PB in water with the addition of $0\text{--}45\ \mu\text{M}$ CIP; (d) The linear relationship between the fluorescence ratio I_{540}/I_{660} and CIP concentration

本研究通过实验探究了 CIP 浓度对 UCNPs@ γ -CD@PB 紫外吸收强度和荧光强度的影响,以此来探究荧光复合材料的灵敏度。如图 4-8(a)所示,在 0-45 μM 范围内,随着 CIP 的增加,体系在 555 nm 左右的紫外吸收强度逐渐降低,这是由于随着 CIP 浓度的增加,越来越多的 PB 与 CIP 发生络合,生成难溶于水的紫红色沉淀。如图 4-8(b)所示,UCNPs@ γ -CD@PB 在 555 nm 左右的紫外吸收(A_{555})与 CIP 浓度存在一定的线性关系,其线性方程为 $A_{555}=0.1239-0.0023 C_{\text{CIP}}$ ($R^2=0.9928$)。

如图 4-8(c)所示,在 0-45 μM 范围内,当 CIP 浓度不断增大时,该荧光探针在 540 nm 处的荧光发射强度逐渐增强,这主要是由于 CIP 可以通过与 PB 发生 n- π 荷移络合,生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应,致使 FRET 减弱,UCNPs 荧光发生恢复。而 660 nm 处的荧光发射基本没有变化,主要是由于 PB 的紫外吸收光谱与 660 nm 处的荧光发射没有重叠,没有发生 FRET 过程。在 540 nm 处荧光峰位置未发生显著改变,表明在不同浓度的 CIP 作用下,UCNPs 保持了单分散和均匀的性质。这表明 γ -CD 的存在避免 UCNPs 聚集方面起着重要作用。这些结果表明,UCNPs@ γ -CD@PB 可作为检测 CIP 的灵敏性传感器。

为了实现 CIP 的定量检测,图 4-8(d)描述了 UCNPs@ γ -CD@PB 在 540 nm 与 660 nm 处的荧光强度比值 I_{540}/I_{660} 与 CIP 浓度之间的线性关系。随着越来越多的 PB 与 CIP 发生络合,FRET 过程被打断,在 0-45 μM 范围内,荧光强度比值 I_{540}/I_{660} 和 CIP 的浓度存在线性关系,其线性方程为 $I_{540}/I_{660}=0.6079+0.0207 C_{\text{CIP}}$ ($R^2=0.9927$)。根据该探针荧光光谱在 540 nm 处的荧光恢复和 660 nm 处荧光恢复比值趋势,在添加不同浓度 CIP 的情况下,用公式 $\text{LOD}=K\text{Sd}/m$ (其中 Sd 为标准差, m 是强度比值 I_{540}/I_{660} 与 CIP 浓度的斜率, K 是可信水平,通常设置为 3) 计算其检出限(LOD)^[172], 计算出的 LOD 为 0.23 μM 。

4.4.5 盐酸环丙沙星的干扰检测

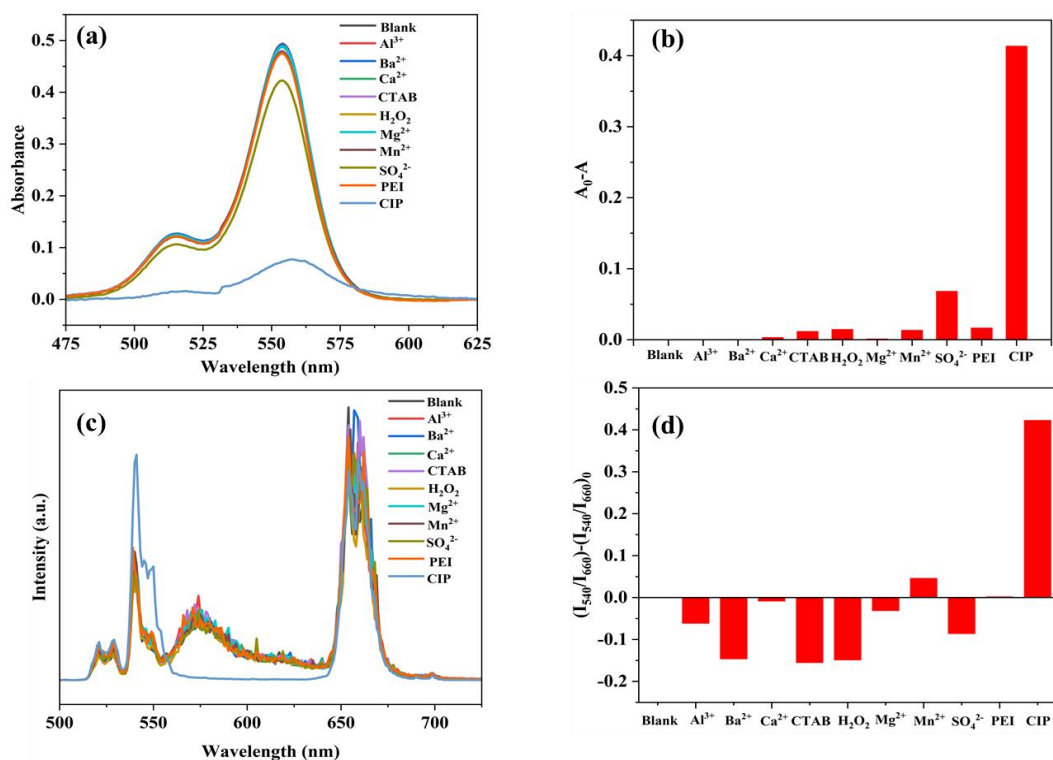


图 4-9 (a) 10 mg mL^{-1} UCNPs@ γ -CD@PB 溶液中加入 $20 \text{ }\mu\text{M}$ 的 CIP 以及 $600 \text{ }\mu\text{M}$ 各种干扰物质 (Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、CTAB、 H_2O_2 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、PEI)后在 555 nm 处的紫外吸收光谱; (b) 加入 CIP 前后或其他干扰物质的紫外吸收变化柱状图; (c) 在 980 nm 激发下, 10 mg mL^{-1} UCNPs@ γ -CD@PB 溶液中加入 $20 \text{ }\mu\text{M}$ 的 CIP 以及 $600 \text{ }\mu\text{M}$ 各种干扰物质 (Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、CTAB、 H_2O_2 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、PEI)的荧光发射光谱; (d) 加入 CIP 或其他干扰物质的荧光发射变化柱状图($I_{540}/I_{660}) - (I_{540}/I_{660})_0$, ($I_{540}/I_{660})_0$ 为原始强度 UCNPs@ γ -CD@PB, I_{540}/I_{660} 为 $20 \text{ }\mu\text{M}$ CIP 或 $600 \text{ }\mu\text{M}$ 其他干扰物质作用下的强度)

Fig. 4-9 (a) UV absorption spectra of a 10 mg mL^{-1} UCNPs@ γ -CD@PB solution with the addition of $20 \text{ }\mu\text{M}$ CIP and $600 \text{ }\mu\text{M}$ various interfering substances (Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , CTAB, H_2O_2 , Mg^{2+} , Mn^{2+} , SO_4^{2-} , PEI); (b) Histogram of UV absorption changes before and after the addition of CIP or other interfering substances. (c) Fluorescence emission spectra of $20 \text{ }\mu\text{M}$ CIP and $600 \text{ }\mu\text{M}$ various interfering substances (Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , CTAB, H_2O_2 , Mg^{2+} , Mn^{2+} , SO_4^{2-} , PEI) added to 10 mg mL^{-1} UCNPs@ γ -CD@PB solution at 980 nm excitation; (d) Histogram of fluorescence emission changes upon addition of CIP or other interfering substances $(I_{540}/I_{660}) - (I_{540}/I_{660})_0$. ($(I_{540}/I_{660})_0$ is the original strength of UCNPs@ γ -CD@PB, and I_{540}/I_{660} is the strength under the action of $20 \text{ }\mu\text{M}$ CIP or $600 \text{ }\mu\text{M}$ other interfering substances).

为评估所构建的 FRET 体系对 CIP 检测的选择性。本研究进行干扰物质测试, CIP 浓度为 20 μM , 所有干扰物质(Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、CTAB、 H_2O_2 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、PEI)为 600 μM (30 倍)。从图 4-9(a)和(b)可以看出, 加入 CIP 后 UCNPs@ γ -CD@PB 在 555 nm 处的紫外吸收明显降低, 其他常见干扰物质对荧光复合材料的紫外吸收没有明显的影响。如图 4-9(c)和(d)所示, 加入 CIP 后 UCNPs@ γ -CD@PB 在 540 nm 处的荧光强度明显增加, $(I_{540}/I_{660})-(I_{540}/I_{660})_0$ 也随之明显增强, 而其他常见干扰物质对该复合材料的荧光强度几乎没有影响。结果表明, 该荧光复合材料对 CIP 具有较好的选择性。因此, UCNPs@ γ -CD@PB 纳米探针可用于水中 CIP 的直接检测。

4.5 实际样品检测

4.5.1 复合材料对实际样品中盐酸环丙沙星的检测

表 4-1 加标水中 CIP 的荧光检测

Table 4-1 Fluorescence detection of CIP in spiked water

样本	检测 CIP (μM)	添加 CIP (μM)	检测 CIP (μM)	恢复 (%)	RSD (%, n=5)
自来水	0	5	4.89	97.8	1.85
	0	10	10.2	102	3.31
	0	15	14.9	99.3	2.73
河水	0	5	4.92	98.4	3.39
	0	10	10.1	101	3.15
	0	15	14.9	99.3	1.98

本研究通过所开发的荧光探针对水环境中 CIP 进行定量检测, 系统评估了该方法的三个关键分析性能指标: 准确性、重复性和选择性。添加 CIP 的回收率为 97.8%~102%, 检测结果的相对误差 RSD 为 1.85%~3.39%。所得的结果表明, 所合成的探针可用于水中 CIP 的检测。

4.5.2 与其他文献的对比

参考其他文献, 对各探针的检测性能进行比较, 对比结果如表 4-2 所示。

表 4-2 与其他文献的对比

Table 4-2 A comparison of the proposed sensor with previous reference for CIP detection

探针	线性范围	检测限	文献
比色法	50-200 μM	0.029 μM	Li et al. (2024) ^[173]
SF-CQDs/CuAgNCs	5-200 μM	3.3 μM	Kang et al. (2024) ^[174]
GO-SPCE	1-8 nM	0.3 μM	Pan et al. (2021) ^[175]
ZnS-PANI	0.75-50 μM	0.5 μM	Ali et al. (2023) ^[176]
CD	10-100 μM	0.56 μM	Chaudhary et al. (2023) ^[177]
CD/riboflavin	0.5-200 μM	0.13 μM	Lu et al. (2019) ^[163]
UCNPs@ γ -CD@PB	0-45 μM	0.23 μM	本文工作

此外，表 4-2 给出了该探针与在过去几年中其他探针检测 CIP 的对比。从表中可以看出，所建立的方法与其他已报道的方法相比，具有合适的线性范围和检测限。

4.6 结论

本研究设计并构建了一种用来检测 CIP 的 FRET 荧光传感器。在该探针中， γ -CD 修饰的 UCNPs 用作能量供体，PB 作为一种能量受体，可以通过主客体相互作用被 γ -CD 有效包裹，从而缩短 UCNPs 和 PB 之间的距离，能量从 UCNPs 转移到 PB，导致了 UCNPs 的荧光发生猝灭。在体系中加入 CIP 后，CIP 可以通过与 PB 发生 n- π 荷移络合生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应，FRET 过程被中断，UCNPs 的荧光恢复。本文构建的荧光传感平台，可以直接用于 CIP 的检测。

第 5 章 全文总结与展望

5.1 全文总结

本文以 FRET 机理为基础, 设计了三种不同的荧光纳米探针, 并研究了它们的传感特性。

1、将 TPyP 与 Cit-UCNPs 结合, 形成自组装纳米传感器, 并在 Cit-UCNPs 与 TPyP 之间发生 FRET 反应。该部分 Cit-UCNPs 充当能量供体, TPyP 充当能量受体, TPyP 可以通过静电相互作用与 Cit-UCNPs 结合, 使 Cit-UCNPs 与 TPyP 之间的距离足够近, FRET 过程发生, 导致能量从 Cit-UCNPs 转移到 TPyP, Cit-UCNPs 的荧光发生猝灭。然而, 由于 TPyP 和 paraoxon 的结合, FRET 过程随着 paraoxon 的加入而减弱。Cit-UCNPs 的荧光发生恢复。该传感器对 paraoxon 具有较高的灵敏度和选择性, 线性响应范围为 0-8.6 μM , 检出限为 0.20 μM 。该上转换荧光纳米探针已成功应用于检测青菜表面残留的 paraoxon, 显示了探针在实际应用中的潜力。

2、Cit-UCNPs 作为能量供体, RhB 作为能量受体, Cit-UCNPs 在 540 nm 处有很强的发射峰, RhB 在 550 nm 左右有一个宽的紫外吸收区, 通过主客体相互作用有效地被 CP6 包封, 从而缩短 Cit-UCNPs 与 RhB 之间的距离, 能量从 Cit-UCNPs 向 RhB 转移, 导致 FRET 过程的发生, Cit-UCNPs 荧光猝灭, RhB 荧光强度增强。当将 Ins 分子加入到 Cit-UCNPs@CP6@RhB 复合物中时, RhB 被 Ins 置换, 荧光恢复。因此, 构建了一种直接检测 Ins 的生物传感平台。该荧光复合材料在 0-10 μM 范围内对 Ins 具有良好的选择性和灵敏度, 检出限低至 0.32 μM 。

3、UCNPs 作为能量供体, PB 作为能量受体, UCNPs 在 540 nm 处有较强的发射峰, PB 在 540 nm 左右有一个宽的紫外吸收区, 与 UCNPs 的荧光发射光谱有重叠, γ -环糊精(γ -CD)作为连接体可以缩短 UCNPs 与 PB 之间的距离, 导致 FRET 过程发生, 能量从 UCNPs 转移到 PB, UCNPs 的荧光猝灭。在体系中加入 CIP 后, CIP 可以通过与 PB 发生 n- π 荷移络合生成难溶于水的络合物来阻碍 FRET 效应, FRET 过程被中断, UCNPs 的荧光恢复。该传感器对 CIP 具有

较高的灵敏度和选择性，线性响应范围为 0-45 μM ，检出限低至 0.23 μM 。本文构建的荧光传感平台，可以直接用于污水中 CIP 的检测。

5.2 展望

近年来，UCNPs 因其独特的光学和化学特性，吸引了越来越多的研究者关注。这些特性包括良好的光稳定性和化学稳定性、深层穿透能力、较低的自发荧光、最小的光漂白效应以及低毒性，特别是在活细胞和小动物实验中表现优异。至今，UCNPs 已被广泛应用于传感器、医学影像、多模态成像、药物释放、光热治疗、光动力治疗等领域，特别是在癌症治疗中的放射治疗上取得了显著进展。

值得一提的是，UCNPs 本身可以充当多模态成像的成像剂，避免了依赖其他造影剂的需求，这对于提高诊断的准确性和治疗的有效性具有重要意义。更进一步，UCNPs 可以根据具体的生物应用需求进行设计和定制，拓展了其在医学领域的应用潜力。随着相关技术的持续进步，预计这一领域将迎来新的突破，为精准医学和癌症治疗带来更多创新解决方案。

由于 FRET 荧光检测技术具有灵敏度高、响应快、便携性好等优势，该方法在生物医学检测中应用广泛。它不仅提升了诊断准确性，还优化了治疗效果，从而促进了生物医药产业的发展。

基于 FRET 的 UCNPs 技术有着广泛的应用潜力，特别是在生物医学领域。例如，在靶向分子检测中，利用 UCNPs 的高穿透性，能够在不干扰生物组织的情况下，精确定位目标分子。此外，该技术也能应用于细胞成像、癌症早期诊断、环境污染监测以及食品安全等多个领域。随着技术的不断发展，上转换 FRET 有可能成为多领域诊断和监测的重要工具。

本文以 FRET 机理为基础，设计了三种不同的 UCNPs 荧光纳米探针，所合成的 UCNPs 虽然已成功地对待测物进行了检测，但仍然存在一些局限性，例如量子产率低、水溶性差、表面化学复杂和材料难以宏量制备等。因此，未来研究需要集中在提高 UCNPs 的发光效率、增强 FRET 过程的效率、降低制备成本等方面。同时，如何有效地将上转换 FRET 技术与其他检测技术(如质谱、色谱等)结合，构建多维度、高通量的检测平台，也是未来发展中的一个重要方向。

参考文献

- [1] Thakur P, Sharma R, Kumar M, et al. Structural, morphological, magnetic and optical study of co-precipitated Nd^{3+} doped Mn-Zn ferrite nanoparticles [J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2019, 479: 317-325.
- [2] Zhou B, Shi B, Jin D, et al. Controlling upconversion nanocrystals for emerging applications [J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(11): 924-936.
- [3] Wang F, Liu X. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(4): 976-989.
- [4] Wang M, Abbineni G, Clevenger A, et al. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications [J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011, 7(6): 710-729.
- [5] 孟宪福, 唐忠敏, 步文博. 稀土上转换纳米颗粒及其肿瘤诊疗应用研究 [J]. *科学*, 2017, 69(05): 5-8+63+4.
- [6] Yao J, Huang C, Liu C, et al. Upconversion luminescence nanomaterials: A versatile platform for imaging, sensing, and therapy [J]. *Talanta*, 2020, 208: 120157-120179.
- [7] 何捍卫 周, 熊翔, 黄伯云. 红外-可见光的上转换材料研究进展 [J]. *中国稀土学报*, 2003, (02): 123-128.
- [8] Auzel F E. Materials and devices using double-pumped-phosphors with energy transfer [J]. *Proceedings of the IEEE*, 1973, 61(6): 758-786.
- [9] Wright J C, Zalucha D J, Lauer H V, et al. Laser optical double resonance and efficient infrared quantum counter upconversion in $\text{LaCl}_3 : \text{Pr}^{3+}$ and $\text{LaF}_3 : \text{Pr}^{3+}$ [J]. *Journal of Applied Physics*, 1973, 44(2): 781-786.
- [10] Bloembergen N. Solid State Infrared Quantum Counters [J]. *Physical Review Letters*, 1959, 2(3): 84-85.
- [11] Fan Y, Cao Y, Liu T, et al. Extremely intense pure green upconversion luminescence in $\text{Ho}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ co-doped $\text{BiTa}_7\text{O}_{19}$ phosphors under 980 nm laser excitation [J]. *Applied Physics A*, 2024, 130(6): 462-471.
- [12] 汤玲丽, 艾新玉, 李可, et al. Gd^{3+} 掺杂增强 $\text{Ho}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Y}_2\text{O}_3$ 纳米晶绿色上转换荧光发射的研究 [J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2017, 33(02): 35-40.
- [13] Bartha C, Secu C E, Matei E, et al. Crystallization kinetics mechanism investigation of sol-gel-derived $\text{NaYF}_4:(\text{Yb}, \text{Er})$ up-converting phosphors [J]. *CrystEngComm*, 2017, 19(34): 4992-5000.
- [14] Wang C, Cheng X. Controlled hydrothermal growth and tunable luminescence properties of $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ microcrystals [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2014, 617: 807-815.
- [15] Wang G, Peng Q, Li Y. Upconversion Luminescence of Monodisperse $\text{CaF}_2:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ Nanocrystals [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(40): 14200-14201.
- [16] Nigoghossian K, Ouellet S, Plain J, et al. Upconversion nanoparticle-

- decorated gold nanoshells for near-infrared induced heating and thermometry [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(34): 7109-7117.
- [17] Wu Q, Pei J, De G. One-pot synthesis of hollow structured upconversion luminescent β -NaYF₄:Yb_{0.2}Er_{0.02} nanoparticles [J]. *Journal of Luminescence*, 2014, 152: 192-194.
- [18] Ding Y, Zhu H, Zhang X, et al. An upconversion nanocomposite for fluorescence resonance energy transfer based cholesterol-sensing in human serum [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(24): 14792-14798.
- [19] Pathak T K, Kumar A, Erasmus L J B, et al. Highly efficient infrared to visible up-conversion emission tuning from red to white in Eu/Yb co-doped NaYF₄ phosphor [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 207: 23-30.
- [20] Huang M, Meng F. Synthesis of Yb³⁺/Er³⁺ co-dopants sodium yttrium fluoride up-conversion fluorescence materials [J]. *Luminescence*, 2005, 20(4-5): 276-278.
- [21] Chen Q, Wang X, Chen F, et al. Functionalization of upconverted luminescent NaYF₄: Yb/Er nanocrystals by folic acid-chitosan conjugates for targeted lung cancer cell imaging [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(21): 7661-7667.
- [22] Dai Y, Yang D, Ma P A, et al. Doxorubicin conjugated NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ nanoparticles for therapy and sensing of drug delivery by luminescence resonance energy transfer [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(33): 8704-8713.
- [23] Wilhelm S, Hirsch T, Patterson W M, et al. Multicolor Upconversion Nanoparticles for Protein Conjugation [J]. *Theranostics*, 2013, 3(4): 239-248.
- [24] Lee J, Yoo B, Lee H, et al. Ultra-Wideband Multi-Dye-Sensitized Upconverting Nanoparticles for Information Security Application [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(1): 1603169.
- [25] Ni R, Qian B, Liu C, et al. 3D printing of resin composites doped with upconversion nanoparticles for anti-counterfeiting and temperature detection [J]. *Opt Express*, 2018, 26(19): 25481-25491.
- [26] Bhardwaj A, Kaur J, Wuest M, et al. In situ click chemistry generation of cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1-14.
- [27] Yao W, Tian Q, Liu J, et al. Large-scale synthesis and screen printing of upconversion hexagonal-phase NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺/Er³⁺/Eu³⁺ plates for security applications [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, 4(26): 6327-6335.
- [28] Kaboli F, Ghazyani N, Riahi M, et al. Upconverting Nanoengineered Surfaces: Maskless Photolithography for Security Applications [J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2019, 2(6): 3590-3596.
- [29] Liang L, Lu Y, Zhang R, et al. Deep-penetrating photodynamic therapy with KillerRed mediated by upconversion nanoparticles [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 51: 461-470.
- [30] Yao Y, Xie G, Zhang X, et al. Fast detection of E. coli with a novel fluorescent biosensor based on a FRET system between UCNPs and GO@Fe₃O₄ in urine specimens [J]. *Analytical Methods*, 2021, 13(19): 2209-2214.

- [31] Tanenbaum Marvin E, Gilbert Luke A, Qi Lei S, et al. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging [J]. *Cell*, 2014, 159(3): 635-646.
- [32] Juette M F, Terry D S, Wasserman M R, et al. The bright future of single-molecule fluorescence imaging [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 20: 103-111.
- [33] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics [J]. *Science*, 2005, 307(5709): 538-544.
- [34] Jin J, Gu Y-J, Man C W-Y, et al. Polymer-Coated NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Upconversion Nanoparticles for Charge-Dependent Cellular Imaging [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(10): 7838-7847.
- [35] Wang C, Cheng L, Xu H, et al. Towards whole-body imaging at the single cell level using ultra-sensitive stem cell labeling with oligo-arginine modified upconversion nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(19): 4872-4881.
- [36] Yang T, Sun Y, Liu Q, et al. Cubic sub-20 nm NaLuF₄-based upconversion nanophosphors for high-contrast bioimaging in different animal species [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(14): 3733-3742.
- [37] Chen G, Shen J, Ohulchanskyy T Y, et al. (α -NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Core/Shell Nanoparticles with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Upconversion for High-Contrast Deep Tissue Bioimaging [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(9): 8280-8287.
- [38] Cui Z, Bu W, Fan W, et al. Sensitive imaging and effective capture of Cu²⁺: Towards highly efficient theranostics of Alzheimer's disease [J]. *Biomaterials*, 2016, 104: 158-167.
- [39] Kataria M, Yadav K, Cai S-Y, et al. Highly Sensitive, Visible Blind, Wearable, and Omnidirectional Near-Infrared Photodetectors [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(9): 9596-9607.
- [40] Cai S, Xu X, Yang W, et al. Materials and Designs for Wearable Photodetectors [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(18): 1808138.
- [41] Cao T, Yang T, Gao Y, et al. Water-soluble NaYF₄:Yb/Er upconversion nanophosphors: Synthesis, characteristics and application in bioimaging [J]. *Inorganic Chemistry Communications*, 2010, 13(3): 392-394.
- [42] Chen G, Ågren H, Ohulchanskyy T Y, et al. Light upconverting core-shell nanostructures: nanophotonic control for emerging applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6): 1680-1713.
- [43] Shalav A, Richards B S, Trupke T, et al. Application of NaYF₄:Er³⁺ up-converting phosphors for enhanced near-infrared silicon solar cell response [J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 86(1), 013505.
- [44] Van Der Ende B M, Aarts L, Meijerink A. Lanthanide ions as spectral converters for solar cells [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, 11(47): 11081-11095.
- [45] Wu L, Huang C, Emery B P, et al. Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents [J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(15): 5110-5139.

- [46] Alvarez-Curto E, Pediani J D, Milligan G. Applications of fluorescence and bioluminescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein coupled receptors [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398(1): 167-180.
- [47] Yan L, Wang Z. Near-Infrared Optical Sensing of Biomacromolecules with Upconversion Nanoplatfroms [J]. *Advanced Photonics Research*, 2023, 4(1): 2200175.
- [48] Singh H, Kumar D, Deep A, et al. Fluorescent nanosensors for detection of microbial toxins in food matrices: a review [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2024, 18(9): 7669-7699.
- [49] Peng J, Xu W, Teoh C L, et al. High-Efficiency in Vitro and in Vivo Detection of Zn^{2+} by Dye-Assembled Upconversion Nanoparticles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(6): 2336-2342.
- [50] Ansari A A, Thakur V K, Chen G. Functionalized upconversion nanoparticles: New strategy towards FRET-based luminescence bio-sensing [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 436: 213821.
- [51] Solanki P R, Dhand C, Kaushik A, et al. Nanostructured cerium oxide film for triglyceride sensor [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 141(2): 551-556.
- [52] Ansari A A, Kaushik A, Solanki P R, et al. Sol-gel derived nanoporous cerium oxide film for application to cholesterol biosensor [J]. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(9): 1246-1249.
- [53] Ansari A A, Solanki P R, Malhotra B D. Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized nanostructured cerium oxide film [J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142(2): 179-184.
- [54] Wu Y-M, Cen Y, Huang L-J, et al. Upconversion fluorescence resonance energy transfer biosensor for sensitive detection of human immunodeficiency virus antibodies in human serum [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(36): 4759-4762.
- [55] Mei Q, Deng W, Yisibashaer W, et al. Zinc-Dithizone Complex Engineered Upconverting Nanosensors for the Detection of Hypochlorite in Living Cells [J]. *Small*, 2015, 11(35): 4568-4575.
- [56] Liu X, Ding N, Wang J, et al. Rhodamine B derivative-modified up-conversion nanoparticle probes based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for the solid-based detection of copper ions [J]. *RSC Advances*, 2019, 9(53): 30917-30924.
- [57] Zhang J, Liu T, Shi T, et al. Near-infrared-driven enhanced $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}@\text{BiOCl}$ heterostructured upconversion composites for efficient degradation of organic contaminants [J]. *Applied Surface Science*, 2023, 618: 156524.
- [58] Shao H, Ma Q, Yu W, et al. “Off-On” typed upconversion fluorescence resonance energy transfer probe for the determination of Cu^{2+} in tap water [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 271: 120920.

- [59] He L, Yang L, Zhu H, et al. A highly sensitive biosensing platform based on upconversion nanoparticles and graphene quantum dots for the detection of Ag [J]. *Methods and applications in fluorescence*, 2017, 5(2): 024010.
- [60] Xu R, Hu Z, Dong X, et al. Construction of CDs@ β -CD@CCM ratiometric fluorescence probe for FRET-based ClO⁻-sensing [J]. *Nanotechnology*, 2024, 35(46): 465501.
- [61] Zhang C, Ling X, Mei Q, et al. Surface lanthanide activator doping for constructing highly efficient energy transfer-based nanoprobe for the on-site monitoring of atmospheric sulfur dioxide [J]. *Analyst*, 2020, 145(2): 537-543.
- [62] Wang Y, Lv M, Chen Z, et al. A Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Based on DNA-Modified Upconversion and Gold Nanoparticles for Detection of Lead Ions [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8:238-245.
- [63] Zhang X, Wang Y, Gong M, et al. Engineering an upconversion fluorescence sensing platform with “off-on” pattern through specific DNAzyme-mediated signal amplification for supersensitive detection of uranyl ion [J]. *Microchimica Acta*, 2024, 191(8): 503-513.
- [64] Wang F, Han Y, Wang S, et al. Single-Particle LRET Aptasensor for the Sensitive Detection of Aflatoxin B1 with Upconversion Nanoparticles [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 11856-11863.
- [65] Jin B, Wang S, Lin M, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 90: 525-533.
- [66] Wan T, Aleem A R, Huang S, et al. Autofluorescence free functionalized upconversion nanoparticles-based turn-on aptasensor for highly sensitive and selective sensing of antibiotics [J]. *Materials Today Advances*, 2023, 17: 100326.
- [67] Wu W, Mehedi Hassan M, Ding X, et al. A novel acetylcholinesterase regulated upconversion-FITC fluorescence aptasensor for supersensitive detection of sulfadiazine in aquatic products [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 191: 108765.
- [68] Yu J, Guo T, Zhang W, et al. Green upconversion nanoparticles for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and fenitrothion detection [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2019, 771: 187-194.
- [69] Yin L, Hu X, Hao M, et al. Upconversion nanoparticles-based background-free selective fluorescence sensor developed for immunoassay of fipronil pesticide [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2023, 17(3): 3125-3133.
- [70] Wang L, Haruna S A, Ahmad W, et al. Tunable multiplexed fluorescence biosensing platform for simultaneous and selective detection of paraquat and carbendazim pesticides [J]. *Food Chemistry*, 2022, 388: 132950.
- [71] Shuai Y, Li N, Zhang Y, et al. Aptamer-free upconversion nanoparticle/silk biosensor system for low-cost and highly sensitive detection of antibiotic residues [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 258: 116335.
- [72] Rong Y, Li H, Ouyang Q, et al. Rapid and sensitive detection of diazinon in

- p>food based on the FRET between rare-earth doped upconversion nanoparticles and graphene oxide [J].
- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*
- , 2020, 239: 118500.
- [73] Kumaravel A, Aishwarya S, Sathyamoorthi S. Emerging Technologies for Sensitive Detection of Organophosphate Pesticides: A Review [J]. *Current Analytical Chemistry*, 2024, 20(6): 383-409.
- [74] Xu W, Kang Y, Jiao L, et al. Tuning Atomically Dispersed Fe Sites in Metal-Organic Frameworks Boosts Peroxidase-Like Activity for Sensitive Biosensing [J]. *Nano-Micro Letters*, 2020, 12(1): 184-195.
- [75] Zhang K, Mei Q, Guan G, et al. Ligand Replacement-Induced Fluorescence Switch of Quantum Dots for Ultrasensitive Detection of Organophosphorothioate Pesticides [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(22): 9579-9586.
- [76] Carneiro S V, De Queiroz V H R, Cruz A a C, et al. Sensing strategy based on Carbon Quantum Dots obtained from riboflavin for the identification of pesticides [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 301: 127149.
- [77] Wu X, Song Y, Yan X, et al. Carbon quantum dots as fluorescence resonance energy transfer sensors for organophosphate pesticides determination [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 94: 292-297.
- [78] Nam N N, Trinh T N D, Do H D K, et al. Advances and Opportunities of luminescence Nanomaterial for bioanalysis and diagnostics [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2025, 327: 125347.
- [79] Gao S, Yang G, Zhang X, et al. β -Cyclodextrin Polymer-Based Host-Guest Interaction and Fluorescence Enhancement of Pyrene for Sensitive Isocarbophos Detection [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(15): 12747-12752.
- [80] Yang Y, Liu H, Han M, et al. Multilayer Microcapsules for FRET Analysis and Two-Photon-Activated Photodynamic Therapy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(43): 13538-13543.
- [81] Yan G, Kong B, Zhao J, et al. Fluorescence turn-on $\text{Cu}_2\text{-xSe@HA}$ -rhodamine 6G FRET nanoprobe for hyaluronidase detection and imaging [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2022, 233: 112496.
- [82] Tang X, Han Y, Zhou W, et al. A FRET Based Composite Sensing Material Based on UCNPs and Rhodamine Derivative for Highly Sensitive and Selective Detection of Fe^{3+} [J]. *Journal of Fluorescence*, 2023, 33(6): 2219-2228.
- [83] Chen H, Fang A, Zhang Y, et al. Silver triangular nanoplates as an high efficiently FRET donor-acceptor of upconversion nanoparticles for ultrasensitive “Turn on-off” protamine and trypsin sensor [J]. *Talanta*, 2017, 174: 148-155.
- [84] Xu J, He F, Cheng Z, et al. Yolk-Structured Upconversion Nanoparticles with Biodegradable Silica Shell for FRET Sensing of Drug Release and Imaging-Guided Chemotherapy [J]. *Chemistry of Materials*, 2017, 29(17): 7615-7628.
- [85] Shi L, Hu J, Wu X, et al. Upconversion core/shell nanoparticles with lowered

- surface quenching for fluorescence detection of Hg^{2+} ions [J]. Dalton Transactions, 2018, 47(46): 16445-16452.
- [86] Guo Y, Zou R, Si F, et al. A sensitive immunoassay based on fluorescence resonance energy transfer from up-converting nanoparticles and graphene oxide for one-step detection of imidacloprid [J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127609.
- [87] Liang T, Ma X, Zhang X, et al. A homogeneous biosensor for carbohydrate antigen 153 detection in human serum based on upconversion fluorescence resonance energy transfer [J]. Talanta Open, 2022, 6: 100154.
- [88] Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy [M]//Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Boston, MA; Springer US. 2006: 27-61.
- [89] Keane P M, Kelly J M. Triplet-state dynamics of a metalloporphyrin photosensitiser (PtTMPyP_4) in the presence of halides and purine mononucleotides [J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2011, 10(10): 1578-1586.
- [90] Osowski A, Pietrzak M, Wieczorek Z, et al. Natural Compounds in the Human Diet and their Ability to Bind Mutagens Prevents DNA-Mutagen Intercalation [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2010, 73(17-18): 1141-1149.
- [91] Xue G, Yue Z, Bing Z, et al. Sensitive fluorescence assay of organophosphorus pesticides based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe quantum dots and porphyrin [J]. Analyst, 2016, 141(16): 4941-4946.
- [92] Yang L, Zhang K, Bi S, et al. Dual-Acceptor-Based Upconversion Luminescence Nanosensor with Enhanced Quenching Efficiency for in Situ Imaging and Quantification of MicroRNA in Living Cells [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(42): 38459-38466.
- [93] He L, Yang L, Zhu H, et al. A highly sensitive biosensing platform based on upconversion nanoparticles and graphene quantum dots for the detection of Ag^+ [J]. Methods and Applications in Fluorescence, 2017, 5(2): 024010.
- [94] Zhang Y, Chen B, Xu S, et al. Dually functioned core-shell $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}@\text{NaYF}_4:\text{Tm}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ nanoparticles as nano-calorifiers and nano-thermometers for advanced photothermal therapy [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11849-11860.
- [95] Socol M, Preda N, Breazu C, et al. Macrocyclic Compounds: Metal Oxide Particles Nanocomposite Thin Films Deposited by MAPLE [J]. Materials, 2023, 16(6): 2480-2496.
- [96] Tripathy U, Bisht P B. Effect of donor-acceptor interaction strength on excitation energy migration and diffusion at high donor concentrations [J]. The Journal of Chemical Physics, 2006, 125(14), 144502.
- [97] Mandal U, Ghosh S, Das D K, et al. Ultrafast fluorescence resonance energy transfer in a bile salt aggregate: Excitation wavelength dependence [J]. Journal of Chemical Sciences, 2008, 120(1): 15-23.
- [98] Lee J H, Park J Y, Min K, et al. A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of

- organophosphate nerve agents [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(7): 1566-1570.
- [99] Tang X, Liang B, Yi T, et al. Cell surface display of organophosphorus hydrolase for sensitive spectrophotometric detection of p-nitrophenol substituted organophosphates [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 55: 107-112.
- [100] Song Y, Zhang M, Wang L, et al. A novel biosensor based on acetylcholinesterase/prussian blue-chitosan modified electrode for detection of carbaryl pesticides [J]. *Electrochimica Acta*, 2011, 56(21): 7267-7271.
- [101] Fallatah A, Kuperus N, Almomtan M, et al. Sensitive Biosensor Based on Shape-Controlled ZnO Nanostructures Grown on Flexible Porous Substrate for Pesticide Detection [J]. *Sensors*, 2022, 22(9): 3522-3536.
- [102] Sun J, Guo L, Bao Y, et al. A simple, label-free AuNPs-based colorimetric ultrasensitive detection of nerve agents and highly toxic organophosphate pesticide [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 28(1): 152-157.
- [103] Schirhagl R, Latif U, Podlipna D, et al. Natural and Biomimetic Materials for the Detection of Insulin [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(9): 3908-3913.
- [104] Xiong Y, Deng C, Zhang X, et al. Designed Synthesis of Aptamer-Immobilized Magnetic Mesoporous Silica/Au Nanocomposites for Highly Selective Enrichment and Detection of Insulin [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(16): 8451-8456.
- [105] Dikow R, Wasserhess C, Zimmerer K, et al. Effect of insulin and glucose infusion on myocardial infarction size in uraemic rats [J]. *Basic Research in Cardiology*, 2009, 104(5): 571-579.
- [106] Schutte E, Lambers Heerspink H J, Lutgers H L, et al. Serum Bicarbonate and Kidney Disease Progression and Cardiovascular Outcome in Patients With Diabetic Nephropathy: A Post Hoc Analysis of the RENAAL (Reduction of End Points in Non-Insulin-Dependent Diabetes With the Angiotensin II Antagonist Losartan) Study and IDNT (Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial) [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2015, 66(3): 450-458.
- [107] Yagati A K, Choi Y, Park J, et al. Silver nanoflower-reduced graphene oxide composite based micro-disk electrode for insulin detection in serum [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 307-314.
- [108] Kumada Y, Katoh S, Imanaka H, et al. Development of a one-step ELISA method using an affinity peptide tag specific to a hydrophilic polystyrene surface [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(2): 288-299.
- [109] Lindsay J R, Mckillop A M, Mooney M H, et al. Demonstration of increased concentrations of circulating glycated insulin in human Type 2 diabetes using a novel and specific radioimmunoassay [J]. *Diabetologia*, 2003, 46(4): 475-478.
- [110] Micolini L, Musenga A, Saladini B, et al. Determination of insulin in innovative formulations by means of LC coupled to fluorescence detection [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48(5): 1303-1309.
- [111] Schultz N M, Huang L, Kennedy R T. Capillary electrophoresis-based

- immunoassay to determine insulin content and insulin secretion from single islets of Langerhans [J]. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(5): 924-929.
- [112] Rafiee B, Fakhari A R. Electrocatalytic oxidation and determination of insulin at nickel oxide nanoparticles-multiwalled carbon nanotube modified screen printed electrode [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 46: 130-135.
- [113] Liu Y, Zhang Y, Wu D, et al. Visible-light driven photoelectrochemical immunosensor for insulin detection based on MWCNTs@SnS₂@CdS nanocomposites [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 301-307.
- [114] Fan J, Hu M, Zhan P, et al. Energy transfer cassettes based on organic fluorophores: construction and applications in ratiometric sensing [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(1): 29-43.
- [115] Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz [J]. *Annalen der Physik*, 1948, 437(1-2): 55-75.
- [116] Deal J, Pleshinger D J, Johnson S C, et al. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: A biological perspective of the history of FRET [J]. *Cellular Signalling*, 2020, 75: 109769.
- [117] Huang Z, Wu S, Duan N, et al. Sensitive detection of carcinoembryonic antigen with magnetic nano-bead and upconversion nanoparticles-based immunoassay [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 66: 225-231.
- [118] Liu Y, Ouyang Q, Li H, et al. Turn-On Fluorescence Sensor for Hg²⁺ in Food Based on FRET between Aptamers-Functionalized Upconversion Nanoparticles and Gold Nanoparticles [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(24): 6188-6195.
- [119] Wang G, Li L, Zheng H, et al. Bifunctional Strategy toward Constructing Perovskite/Upconversion Lab-on-Paper Photoelectrochemical Device for Sensitive Detection of Malathion [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(14): 13418-13429.
- [120] Ding X, Ahmad W, Zareef M, et al. MIL-101(Cr)-induced nano-optical sensor for ultra-sensitive detection of enrofloxacin in aquatic products using a fluorescence turn-on mechanism via upconversion nanoparticles [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 365: 131915.
- [121] Chen M, Hassan M, Li H, et al. Fluorometric determination of lead(II) by using aptamer-functionalized upconversion nanoparticles and magnetite-modified gold nanoparticles [J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(1): 85-93.
- [122] Li Y, Li Y, Zhang D, et al. A fluorescence resonance energy transfer probe based on functionalized graphene oxide and upconversion nanoparticles for sensitive and rapid detection of zearalenone [J]. *LWT*, 2021, 147: 111541.
- [123] Tan S, Han R, Wu S, et al. A novel fluorescent sensing platform for insulin detection based on competitive recognition of cationic pillar[6]arene [J]. *Talanta*, 2019, 197: 130-137.
- [124] Xu Y, Meng X, Liu J, et al. New nanoplatforms based on upconversion nanoparticles and single-walled carbon nanohorns for sensitive detection of acute promyelocytic leukemia [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(2): 1037-1041.
- [125] Ding Y, Hu Z, Zhao Y, et al. Self-assembled nanoplatforms with ZIF-8 as a

- p>framework for FRET-based glutathione sensing in biological samples [J]. Analyst, 2022, 147(24): 5775-5784.
- [126] Han Y, Gai S, Ma P A, et al. Highly Uniform α -NaYF₄:Yb/Er Hollow Microspheres and Their Application as Drug Carrier [J]. Inorganic Chemistry, 2013, 52(16): 9184-9191.
- [127] Buatong N, Ravuri B R, Pecharapa W. Synthesis of NaYF₄:Yb,Er/AgInS₂ nanoheterostructures [J]. Optik, 2022, 269: 169853.
- [128] Wan T, Song W, Wen H, et al. The exploration of upconversion luminescence nanoprobes for tobramycin detection based on Förster resonance energy transfer [J]. Materials Today Advances, 2023, 19: 100409.
- [129] Yang L, Che C, Guo M, et al. An Upconversion Fluorescent Resonant Energy Transfer Biosensor for the Detection of microRNA through DNA Hybridization [J]. ACS Omega, 2024, 9(47): 47156-47166.
- [130] Li C-P, Lu Y-X, Zi C-T, et al. Cationic Pillar[6]arene Induces Cell Apoptosis by Inhibiting Protein Tyrosine Phosphorylation Via Host-Guest Recognition [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(14): 4979-4993.
- [131] Giang L T K, Trejgis K, Marciniak L, et al. Fabrication and characterization of up-converting β -NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺@NaYF₄ core-shell nanoparticles for temperature sensing applications [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 14672.
- [132] Arppe R, Hyppänen I, Perälä N, et al. Quenching of the upconversion luminescence of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ and NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ nanophosphors by water: the role of the sensitizer Yb³⁺ in non-radiative relaxation [J]. Nanoscale, 2015, 7(27): 11746-11757.
- [133] Afshani J, Badiei A, Jafari M, et al. A single optical sensor with high sensitivity for detection of Fe³⁺ and CN⁻ ions [J]. Journal of Luminescence, 2016, 179: 463-468.
- [134] Martínez-Periñán E, Revenga-Parra M, Gennari M, et al. Insulin sensor based on nanoparticle-decorated multiwalled carbon nanotubes modified electrodes [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 222: 331-338.
- [135] Satya A, Bhattacharjee A. Proposed prototype for a quantitative biosensor for insulin detection using a liquid crystal [J]. Journal of Molecular Liquids, 2024, 404: 124968.
- [136] Chen J, Liu Z, Yang R, et al. A liquid crystal-based biosensor for detection of insulin driven by conformational change of an aptamer at aqueous-liquid crystal interface [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2022, 628: 215-222.
- [137] Bhardwaj G, Kaur R, Saini S, et al. Electrochemical and spectroscopic detection of insulin using AgNPs-decorated organic derivative [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2023, 679: 132511.
- [138] Zeng X, Wang H, Zeng Y, et al. Label-free Aptasensor for the Ultrasensitive Detection of Insulin Via a Synergistic Fluorescent Turn-on Strategy Based on G-quadruplex and AIEgens [J]. Journal of Fluorescence, 2023, 33(3): 955-963.
- [139] Ramya K, Amreen K, Goel S. Nanofiber enhanced carbon cloth based flexible

- Miniaturized electrodes for Real-Time and specific insulin detection in blood serum [J]. *Microchemical Journal*, 2024, 204: 111029.
- [140] Xu L, Li H, Yan P, et al. Graphitic carbon nitride/BiOCl composites for sensitive photoelectrochemical detection of ciprofloxacin [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, 483: 241-248.
- [141] Liu J, Wang B, Huang H, et al. Quantitative ciprofloxacin on-site rapid detections using quantum dot microsphere based immunochromatographic test strips [J]. *Food Chemistry*, 2021, 335: 127596.
- [142] Álvarez-Torrellas S, Peres J A, Gil-Álvarez V, et al. Effective adsorption of non-biodegradable pharmaceuticals from hospital wastewater with different carbon materials [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 320: 319-329.
- [143] Abass A. Synthesis New Liquid Selective Electrodes of Ciprofloxacin Hydrochloride for Determination Ciprofloxacin in Pure form and Pharmaceuticals Preparation [J]. *Baghdad Science Journal*, 2017, 14: 787-792.
- [144] Xiong Y, Zhang D, Ye C, et al. Ultra-sensitive detection of ciprofloxacin hydrochloride in milk by molecularly imprinted electrochemical sensor based on S-CoFe-MOFs/AuNPs [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2023, 122: 105439.
- [145] Gezahegn T, Tegegne B, Zewge F, et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of ciprofloxacin residues in water samples by high performance liquid chromatography-diode array detector [J]. *BMC Chemistry*, 2019, 13(1): 28-37.
- [146] Zhou X, Xing D, Zhu D, et al. Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk [J]. *Talanta*, 2008, 75(5): 1300-1306.
- [147] Kelly T, Yang X. Application of Fluorescence- and Bioluminescence-Based Biosensors in Cancer Drug Discovery [J]. *Biosensors*, 2024, 14(12): 570-593.
- [148] Soleja N, Mohsin M. Exploring the landscape of FRET-based molecular sensors: Design strategies and recent advances in emerging applications [J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 77: 108466.
- [149] Haase M, Schäfer H. Upconverting Nanoparticles [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(26): 5808-5829.
- [150] Auzel F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids [J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(1): 139-174.
- [151] Zhu X, Zhang J, Liu J, et al. Recent Progress of Rare-Earth Doped Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Optimization, and Applications [J]. *Advanced Science*, 2019, 6(22): 1901358.
- [152] Li X, Zhang F, Zhao D. Lab on upconversion nanoparticles: optical properties and applications engineering via designed nanostructure [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6): 1346-1378.
- [153] Malhotra K, Hrovat D, Kumar B, et al. Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles: Exploring A Treasure Trove of NIR-Mediated Emerging Applications [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(2): 2499-

- 2528.
- [154] Skládal P, Farka Z. Luminescent photon-upconversion nanoparticles with advanced functionalization for smart sensing and imaging [J]. *Microchimica Acta*, 2024, 191(9): 551-565.
- [155] Amilan Jose D, Sharma N, Sakla R, et al. Fluorescent nanoprobe for the sensing of gasotransmitters hydrogen sulfide (H₂S), nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) [J]. *Methods*, 2019, 168: 62-75.
- [156] Gorris H H, Resch-Genger U. Perspectives and challenges of photon-upconversion nanoparticles - Part II: bioanalytical applications [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(25): 5875-5890.
- [157] Rong Y, Hassan M M, Wu J, et al. Enhanced detection of acrylamide using a versatile solid-state upconversion sensor through spectral and visual analysis [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 466: 133369.
- [158] Han Q, Dong Z, Tang X, et al. A ratiometric nanoprobe consisting of up-conversion nanoparticles functionalized with cobalt oxyhydroxide for detecting and imaging ascorbic acid [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(1): 167-172.
- [159] Wu M, Wang X, Wang K, et al. An ultrasensitive fluorescent nanosensor for trypsin based on upconversion nanoparticles [J]. *Talanta*, 2017, 174: 797-802.
- [160] 杨豪. 基于上转换荧光材料的三种荧光共振能量转移型传感器的构建 [D]. 深圳: 深圳大学, 2020.
- [161] 李建平, 汪照辉. 荷移反应-离心光度法测定盐酸环丙沙星的研究 [J]. *分析试验室*, 1999, (01): 48-51.
- [162] 丁玉洁. 上转换纳米材料的制备、组装及荧光传感 [D]. 南京: 南京大学, 2013.
- [163] Lu C, Liu G, Yang Z, et al. A ratiometric fluorometric ciprofloxacin assay based on the use of riboflavin and carbon dots [J]. *Microchimica Acta*, 2019, 187(1): 37-45.
- [164] Wang X, Wei X, Tong R, et al. Boron-doped carbon dots with time-resolved room temperature phosphorescence for detection of ciprofloxacin hydrochloride and information encryption applications [J]. *Microchimica Acta*, 2024, 191(11): 691-701.
- [165] Ou J, Hu Y, Huang L, et al. pH-sensitive nanocarriers for *Ganoderma applanatum* polysaccharide release via host-guest interactions [J]. *Journal of Materials Science*, 2018, 53(11): 7963-7975.
- [166] Zhang X, Qin X, Zhang W. NaYF₄:Yb, Er with N-GQDs mixture: One-pot hydrothermal synthesis and its luminescent film [J]. *Optical Materials*, 2021, 114: 110910.
- [167] Zhang M, Zhai X, Lei P, et al. Selective enhancement of green upconversion luminescence from NaYF₄:Yb, Er microparticles through Ga³⁺ doping for sensitive temperature sensing [J]. *Journal of Luminescence*, 2019, 215: 116632.
- [168] Chen M, Yan Z, Han L, et al. Upconversion Fluorescence Nanoprobe-Based FRET for the Sensitive Determination of *Shigella* [J]. *Biosensors*, 2022,

- 12(10): 795-807.
- [169] Ding Y, Zhu H, Zhang X, et al. Rhodamine B derivative-functionalized upconversion nanoparticles for FRET-based Fe^{3+} -sensing [J]. Chemical Communications, 2013, 49(71): 7797-7799.
- [170] Ren P, Li Y, Zhang Y, et al. Photoelectric Properties of DSSCs Sensitized by Phloxine B and Bromophenol Blue [J]. International Journal of Photoenergy, 2016, 2016(1): 2135847.
- [171] Kang X, Cheng Z, Li C, et al. Core-Shell Structured Up-Conversion Luminescent and Mesoporous $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}@\text{nSiO}_2@\text{mSiO}_2$ Nanospheres as Carriers for Drug Delivery [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115(32): 15801-15811.
- [172] Safari S, Amiri A, Badiei A. FRET probe for selective and sensitive detection of vitamin A by cadmium free quantum dots (ZnS) [J]. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 231, 118062.
- [173] Li J, Tang X, Guo X, et al. $\text{CeO}_2/\text{NH}_2\text{-MIL-88B(Fe)}$ composites with peroxidase-like activity for colorimetric detection and photo-enzymatic synergetic degradation of ciprofloxacin hydrochloride [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024, 12(6): 114734-114748.
- [174] Kang C, Zhang C, Zhang Y, et al. Dual-emission ratio fluorescent probe based on carbon dots and copper-silver bimetallic nanoclusters for visual and fluorescent detection of ciprofloxacin [J]. Microchemical Journal, 2024, 202: 110810.
- [175] Pan M, Guo P, Liu H, et al. Graphene oxide modified screen-printed electrode for highly sensitive and selective electrochemical detection of ciprofloxacin residues in milk [J]. Journal of Analytical Science and Technology, 2021, 12(1): 55-61.
- [176] Ali S K, Alamier W M, Hasan N, et al. Synergistic nanomaterials: zinc sulfide-polyaniline for ciprofloxacin electrochemical sensing [J]. Applied Physics A, 2023, 129(12): 859-868.
- [177] Chaudhary N, Verma D, Yadav A K, et al. Rational hydrothermal-assisted green synthesis of blueish emitting carbon dots as an optical sensing platform for antibiotic detection in the milk sample [J]. Talanta Open, 2023, 8: 100259-100270.

攻读学位期间发表的论文

1. Ruoqian Xu, Zhongfei Hu, Xuemei Dong, Xuan Xiao, Yujie Ding*. Construction of CDs@ β -CD@CCM ratiometric fluorescence probe for FRET-based ClO^- -sensing. Nanotechnology, 2024, 35 (46), 465501.
2. Ruoqian Xu, Cai Shi, Xuemei Dong, Xuan Xiao, Ding, Yujie Ding*. Construction of an off-on fluorescence sensing platform for FRET-based detection of coumarin in cosmetic samples. New Journal of Chemistry, 2024, 48(37):16215-16221.
3. Wenlu Wu, Zhongfei Hu, Cai Shi, Ruoqian Xu, Yiming Zhao, Yujie Ding*. Construction of CdTe@ γ -CD@RBD nanoprobe for Fe^{3+} -sensing based on FRET mechanism in human serum. Spectrochim. Acta A, 2023, 296: 122645.
4. Cai Shi, Yiming Zhao, Ruoqian Xu and Yujie Ding*. An off-on fluorescent nanoprobe for L-cysteine sensing based on the FRET effect. Analyst, 2023, 148, 4762-4767.
5. 许若倩, 施彩, 董雪梅, 肖璇, 丁玉洁*. 关于UCNPs@TPyP的off-on探针对有机磷农药的传感研究[C]. 2024武汉分析+ 国际峰会, 2024武汉分析+ 国际峰会论文集. 湖北武汉, 2024:03-22.
6. 施彩, 许若倩, 丁玉洁*. 基于FRET的新型荧光纳米探针检测化妆品中的香豆素[C]. 中国化学会第33届学术年会, 中国化学会第33届学术年会论文集. 山东青岛, 2023:06-17.
7. Yujie Ding*, Xuemei Dong, Xuan Xiao, Ruoqian Xu. Construction of ratio fluorescence probe based on RBH@CDs nanocomposites for FRET-sensing applied in environmental water sample monitoring[C]. The 18th International Conference on Multi-functional Materials and Applications (ICMMA). Ayutthaya Thailand, 2024:11-28.

致谢

穿短衫站着的是做工人，穿长衫威武端坐着的是登科人，而我都不是。

总觉得来日方长，殊不知人生匆匆忙忙。

没有优秀过，但一直在努力。

回首过往，想要感谢的人太多，家人、朋友、导师、室友、师兄、师姐、师妹均在其列。

首先，我最想感谢的还是我的父母，他们是这个世界上唯一不求回报爱我，让我肆意生长的人。愿岁岁常欢愉，年年皆胜意。

其次，我要感谢我的导师丁玉洁教授，从论文选题到最后的定稿，每一步都离不开老师的悉心点拨与指导。感谢老师为我提供了科研平台，让我在学术方面有质的飞跃。学生不才，承蒙老师不弃，倾囊相授。

山水一程，三生有幸。感谢我的三位室友汪新月、朱亚婷、谢围围(排名不分先后)，千余个日夜里与我朝夕相伴。没有你们的陪伴和包容，我的喜怒哀乐将无处倾倒。

实验室是研究生的根据地，感谢施彩师姐、胡钟飞师兄在实验、科研方面的不厌其烦的指导。肖璇师妹、董雪梅师妹的陪伴，使实验室氛围轻松愉快。

朋友无需太多，知己两三足已。

最后感谢所有在我人生天色未明时出现的提灯人。

祝我自己未来可以像风一样张狂的流淌。

许若倩

2025年4月