

## 氮和磷共掺杂碳纳米粒子荧光猝灭选择性检测亚叶酸钙

李莉<sup>\*#1</sup> 李猛<sup>#2</sup> 杨明利<sup>1</sup> 李洪雷<sup>1</sup> 张焕<sup>1</sup> 马跃<sup>1</sup>  
林乐儿<sup>1</sup> 张明<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>(南京医科大学康达学院, 连云港 222000) <sup>2</sup>(连云港市第二人民医院胸外科, 连云港 222000)

**摘 要** 以磷酸铵((NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)和抗坏血酸钠为原料,通过一步水热法合成了氮和磷共掺杂碳纳米粒子(N/P-CNPs),量子产率为 19%。基于亚叶酸钙(CF)对 N/P-CNPs 的快速、高选择性猝灭,建立了测定 CF 的新方法。在最优实验条件下,在 0.2~108.5 μmol/L 范围内,CF 的浓度与 N/P-CNPs 的荧光猝灭程度((F<sub>0</sub>-F)/F<sub>0</sub>, F<sub>0</sub> 为 N/P-CNPs 的初始荧光强度, F 为加入 CF 后的荧光强度)呈良好的线性关系,检出限为 0.05 μmol/L。经实验验证,CF 对 N/P-CNPs 的荧光猝灭机理为内滤效应和静态猝灭效应。将本方法用于实际样品中 CF 含量的检测,所得结果与高效液相色谱法测定结果基本一致,表明本方法具有良好的实用性,为检测 CF 提供了一种新策略。

**关键词** 氮和磷共掺杂; 碳纳米粒子; 荧光; 亚叶酸钙; 内滤效应; 静态猝灭

亚叶酸钙(Calcium folinate, CF)是抗肿瘤药物的生化调节剂,可直接提供叶酸在体内的活化形式,有利于胸腺嘧啶核苷酸、DNA、RNA 以及蛋白质的合成。CF 可限制甲氨蝶呤对正常细胞的损害程度,并能逆转甲氨蝶呤对骨髓和胃肠粘膜反应,临床上主要用作叶酸拮抗剂(如甲氨蝶呤、乙胺嘧啶或甲氧苄啶等)的解毒剂,能预防甲氨蝶呤过量或大剂量治疗后所引起的严重毒性作用<sup>[1]</sup>,也可用于叶酸缺乏所引起的巨幼红细胞性贫血的治疗。CF 与 5-氟脲嘧啶合用,可用于治疗晚期胰腺癌<sup>[2-3]</sup>、结肠和直肠癌<sup>[4-8]</sup>。CF 注射液因具有疗效显著、作用迅速、毒性小、耐受性好以及副作用低等优点而在临床上应用广泛。随着临床用药量的大幅增加,对 CF 产品质量要求也有所提高,对 CF 含量测定方法的要求更准确、更精密。因此,开发准确定量检测 CF 含量的方法非常必要。目前,检测 CF 的方法有高效液相色谱法、毛细管电泳法和电化学法等<sup>[9-15]</sup>。

荧光检测法具有原位、实时和无损检测目标分子等优点,已成为疾病诊断、环境和食品安全监测领域不可或缺的工具<sup>[16]</sup>。其中,碳纳米材料可应用于荧光传感领域检测多种分析物<sup>[17-19]</sup>,成为近年来的研究热点。在早期的研究中,制备的碳纳米材料的荧光量子产率较低,并且荧光较弱。向碳纳米材料中掺入其它杂原子(如 N、S 和 P 等)或金属元素,可以显著改善其光学性能,提高荧光量子产率<sup>[20-23]</sup>。目前,有关氮和磷共掺杂碳纳米材料的研究虽已有报道<sup>[20, 24]</sup>,但尚未将氮和磷共掺杂碳纳米材料用于实际样品中 CF 的测定。

本研究以廉价易得的磷酸铵((NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)和抗坏血酸钠为原料,通过水热法合成了对 CF 具有选择性荧光响应的氮和磷共掺杂碳纳米粒子(Nitrogen and phosphorus codoped carbon nanoparticles, N/P-CNPs),探讨了其结构组成和荧光性能,并基于 CF 对 N/P-CNPs 的荧光猝灭作用,建立了定量检测 CF 的新方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

RF-6000 荧光分光光度计、AUW220D 电子天平和 AYT124 电子天平(日本岛津公司); Milli-Q 超纯

2022-08-09 收稿; 2022-12-11 接受

江苏省高校优秀中青年骨干教师和校长境外研修计划基金项目、江苏高校“青蓝工程”项目(No. KD2021qljs001)、连云港高新区科技计划项目(No. HZ201906)、连云港市“海燕计划”项目(No. 2020-QD-005)、江苏省大学生创新创业训练计划项目(Nos. 202113980012Y, 202113980014Y)和南京医科大学康达学院科研发展基金项目(Nos. KD2020KYJJZD074, KD2021KYJJZD014, KD2021KYRC003, KD2021KYRC015)资助。

<sup>#</sup> 共同第一作者

<sup>\*</sup> E-mail: lili@njmu.edu.cn; 535zhangming@163.com

水机(美国密理博公司); DHG-9070A 电热鼓风干燥箱(上海精宏实验设备公司); BioMate 3S 紫外-可见分光光度计、Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪、Heraeus Multifuge X1R 台式冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司); C-MAG HS7 磁力加热搅拌器(德国 IKA 公司); HT7800 高反差型透射电子显微镜(日本日立公司); FLS1000 稳态瞬态荧光光谱仪(英国爱丁堡公司); SHZ-DIII 循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); LC-10N-50C 真空冷冻干燥机(上海力辰邦西仪器科技有限公司); XH-C 涡旋混合器(金坛市白塔新宝仪器厂)。

(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>、KCl、MnCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NaNO<sub>2</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1,2-丙二醇、无水葡萄糖(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 抗坏血酸钠、甘氨酸、半胱氨酸、乙酸锌二水合物(分析纯,萨恩化学技术(上海)有限公司); NaCl(分析纯,南京化学试剂股份有限公司); 甲硫氨酸(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 还原型谷胱甘肽(分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司); CF 对照品(含量为 87.9%,中国食品药品检定研究院); CF 注射液(规格: 10 mL; 0.1 g,按 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub> 计,江苏恒瑞医药股份有限公司); 唑来膦酸一水合物对照品(按 C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> 计,含量为 92.7%)、多西他赛对照品(按 C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>14</sub> 计,含量为 99.2%)、奥沙利铂对照品(按 C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pt 计,含量为 99.8%)(中国食品药品检定研究院)。实验用水为超纯水(18.2 MΩ·cm)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 N/P-CNPs 的合成

准确称取 0.8 g 抗坏血酸钠和 7.2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,加入 48 mL 超纯水,搅拌溶解。将混合溶液转移至聚四氟乙烯内衬水热反应釜中,于 160 °C 下恒温加热 13 h,反应完成后自然冷却至室温。将所得褐色溶液以 12000 r/min 离心 5 min 后,上清液用 0.22 μm 水系滤膜过滤,然后用截留分子量为 3500 Da 的透析袋透析上清液 48 h,得到水溶性 N/P-CNPs。采用旋转蒸发仪蒸去大部分溶剂水,再冷冻干燥 48 h 得到褐色粉末,于 4 °C 下储存备用。

### 1.2.2 溶液的配制

**CF 对照品溶液的配制** 准确称取 CF 对照品 10.81 mg,用超纯水溶解并定容至 10 mL,得到 CF 对照品储备液(1579 μmol/L),然后再将其逐级稀释成不同浓度的 CF 对照品溶液,4 °C 下保存备用。

**CF 供试品溶液的配制** 准确量取 CF 注射液 250 μL 于 100 mL 容量瓶中,用超纯水定容,得到标示浓度为 52.9 μmol/L 的 CF 供试品溶液。

**N/P-CNPs 溶液的配制** 准确称取 N/P-CNPs 5 mg,加入 5 mL 超纯水,涡旋混合使之溶解,得到浓度为 1 mg/mL 的 N/P-CNPs 的溶液。

**10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制** 称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,用 800 mL 超纯水溶解后,用 HCl 或 NaOH 溶液调节至 pH 4.0~10.0,最后加超纯水定容至 1 L。

### 1.2.3 CF 的检测

为测试 N/P-CNPs 对 CF 的荧光响应,取 100 μL N/P-CNPs 溶液、1500 μL 不同浓度的 CF 对照品溶液和 400 μL 10 mmol/L PBS(pH=6.86),充分混合后,将样品置于荧光分光光度计的样品池中。以 308 nm 为激发波长,测试上述系列溶液的荧光光谱,记录 438 nm 处的荧光强度。测定实际样品时,用相同体积的 CF 供试品溶液替换 CF 对照品溶液,在同样的条件下进行检测。

### 1.2.4 N/P-CNPs 的荧光量子产率测定

采用比较测量法进行测试,以 QE=54% 的硫酸奎宁作为标准物,分别测量硫酸奎宁和 N/P-CNPs 的发射光谱(λ<sub>ex</sub>=350 nm)及紫外-可见吸收光谱,采用公式(1)计算量子产率。

$$QE_x = QE_{st} \times \frac{I_x}{I_{st}} \times \frac{\eta_x^2}{\eta_{st}^2} \times \frac{A_{st}}{A_x} \quad (1)$$

其中,  $x$  代表样品,  $st$  代表标准物硫酸奎宁,  $QE_x$  和  $QE_{st}$  分别为待测物质和参比标准物质的荧光量子产率;  $I$  为荧光发射光谱的积分强度,  $\eta$  为溶剂折射率(因本实验中待测未知物和参比标准物的浓度极低,可忽略溶质的影响,而视为一致,均为 1.33),  $A$  为 350 nm 处的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 N/P-CNPs 的表征

通过透射电镜(TEM)观察 N/P-CNPs 的形貌特征和粒径尺寸。图 1 是 N/P-CNPs 的 TEM 表征图,插图为其粒径分布图,可见 N/P-CNPs 的形貌近似呈球状,并且分散性良好,平均粒径约为 97 nm。

图 2A 是 N/P-CNPs 的红外光谱图,其中, 3421 和 3247  $\text{cm}^{-1}$  处的宽峰可归属于—OH 和—NH 的伸缩振动, 2927  $\text{cm}^{-1}$  归属于 C—H 的伸缩振动, 1629  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰归属于 CO 伸缩振动, 1400  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰归属于 C—H 的面内弯曲振动,在指纹区 1075  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰归属于 P—C—O 伸缩振动, 945  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰表明存在 P—O—H, 523  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰表明存在  $\text{PO}_4^{3-}$  [20, 24]。

通过 XPS 表征分析 N/P-CNPs 的元素构成,如图 2B 所示,在总谱图上出现了 4 个峰,分别对应磷、碳、氮和氧元素,结合能分别为 133.3、284.3、399.3 和 531.3 eV。结合能为 284.3 eV 的 C1s 峰(图 2C)可分为 3 个峰,对应的结合能分别为 284.4、285.0 和 287.5 eV,表明 N/P-CNPs 表面有 C—C/C=C、C—N/C—P 和 C=O 基团的存在。如图 2D 所示,对结合能为 399.3 eV 的 N1s 峰进行分峰解析,结合能分别为 398.7、399.4 和 400.6 eV 的峰分别对应 C—N—C、C—N 和 N—H 基团。结合能为 531.3 eV 的 O1s 峰(图 2E)可分为 3 个峰,对应的结合能分别为 530.6、532.0 和 535.5 eV,证明了 O=P/O—P、O—C/O—P 和—OH 基团的存在。图 2F 的 P2p 分峰后, 132.9 和 133.5 eV 的结合能分别归因于 P—C 和 P=O/P—O 基团。上述表征结果说明,成功合成了表面具有羟基、氨基、羧基及磷酸基团的 N/P-CNPs。

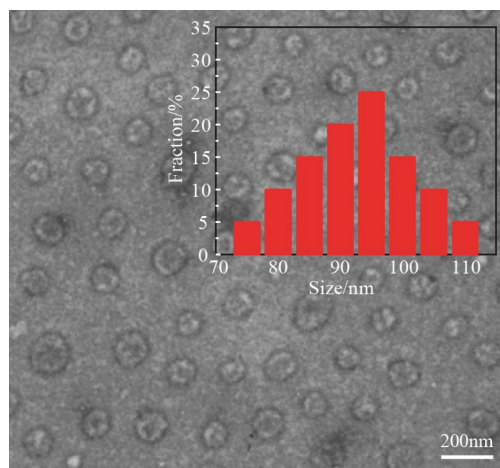


图1 氮和磷共掺杂碳纳米粒子(N/P-CNPs)的透射电镜图,插图为 N/P-CNPs 的粒径分布

Fig.1 Transmission electron microscope (TEM) image of nitrogen and phosphorus codoped carbon nanoparticles (N/P-CNPs). Inset is particle size distribution of N/P-CNPs

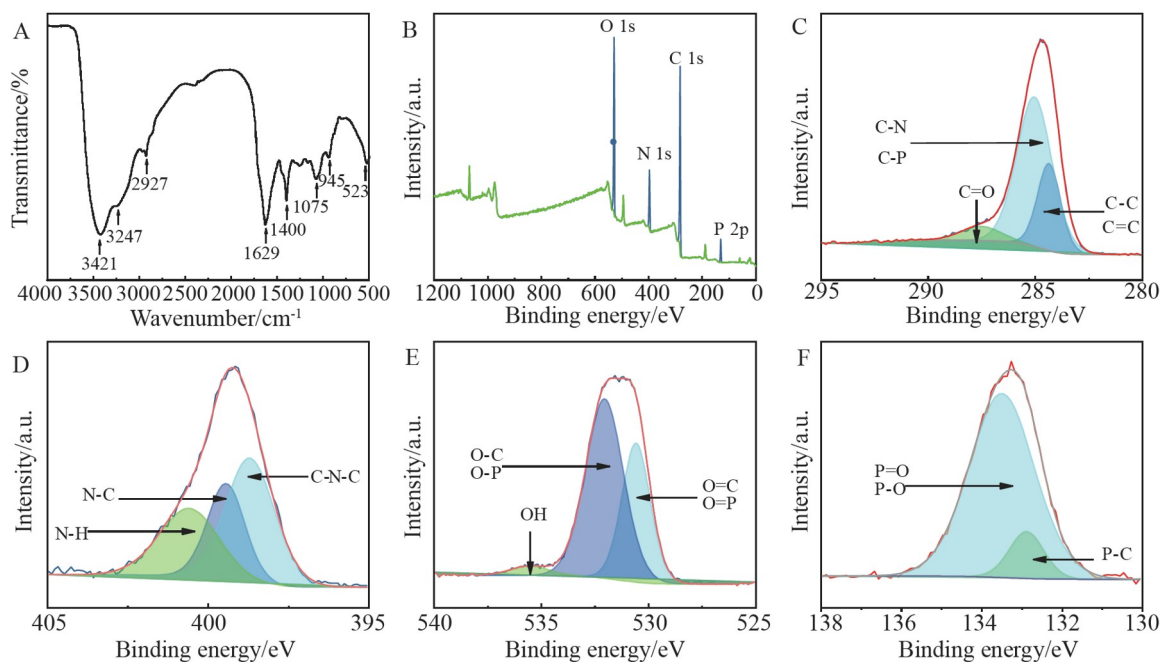


图2 (A)N/P-CNPs 的红外光谱图; N/P-CNPs 的 X 射线光电子能谱表征图: (B)总谱图、(C)C 1s 谱图、(D)N 1s 谱图、(E)O 1s 谱图和(F)P 2p 谱图

Fig.2 (A) Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum of N/P-CNPs; X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) patterns of N/P-CNPs: (B) fully scanned spectrum, (C) C 1s spectrum, (D) N 1s spectrum, (E) O 1s spectrum and (F) P 2p spectrum

## 2.2 N/P-CNPs的光谱特性

测定了 N/P-CNPs 的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱。如图 3A 所示, N/P-CNPs 在波长 273 nm 处有一个吸收峰, 可能是因为 C=O 谱带的  $n-\pi^*$  转换。N/P-CNPs 的最大激发和最大发射分别位于 308 和 438 nm。N/P-CNPs 的水溶液在自然光下呈透明的浅黄色, 而在紫外灯(365 nm)下为亮蓝色(图 3A 插图)。图 3B 为 N/P-CNPs 在不同激发波长下的发射光谱图, 最大激发波长是 308 nm, 最大发射波长是 438 nm。以硫酸奎宁(量子产率 54%, 0.1 mol/L  $H_2SO_4$ )为标准参照物质计算得到 N/P-CNPs 的荧光量子产率为 19%。

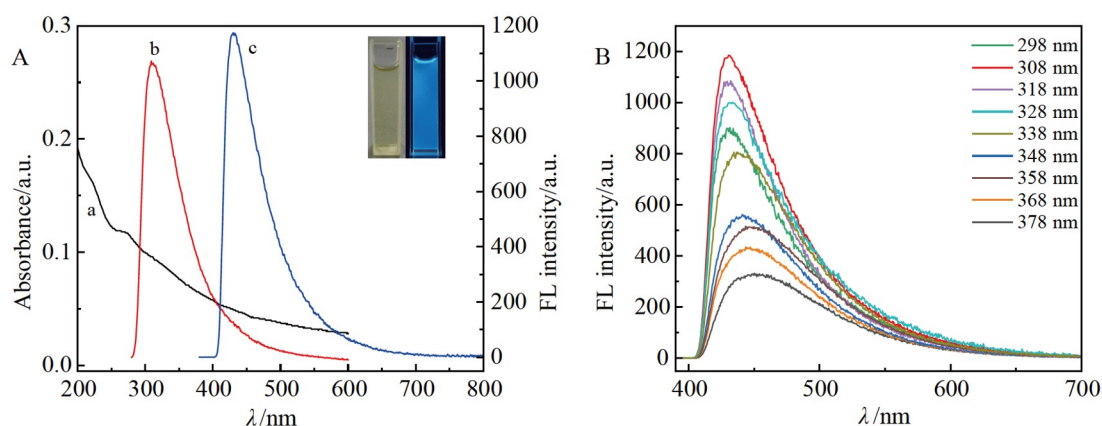


图3 (A) N/P-CNPs 的紫外-可见吸收光谱(a)、荧光激发光谱(b)和发射光谱(c)图(插图为溶液在日光灯(左)和 365 nm 紫外灯(右)下的照射图); (B) 不同激发波长下 N/P-CNPs 的荧光发射光谱图

Fig. 3 (A) Ultraviolet-visible absorption spectra (a), fluorescence excitation (b) and emission (c) spectra of N/P-CNPs. Inset is the photographs of N/P-CNPs in aqueous solution under visible light (left) and UV light (right, 365 nm); (B) Fluorescence emission spectra of N/P-CNPs under different excitation wavelengths

## 2.3 合成条件的优化

考察了原料中抗坏血酸钠与  $(NH_4)_3PO_4$  的投料摩尔比、反应时间对合成 N/P-CNPs 荧光强度的影响, 结果见图 4。由图 4A 可知, 当抗坏血酸钠与  $(NH_4)_3PO_4$  的投料摩尔比在 1:1~1:12 时, 随着比值的增大, N/P-CNPs 的荧光强度逐渐增加; 当比值为 1:12 时, 荧光强度最大; 继续增加比值, 所合成的 N/P-CNPs 荧光强度反而下降。由图 4B 可见, 随着反应时间延长, N/P-CNPs 的荧光强度逐渐增大, 反应时长为 13 h, N/P-CNPs 的荧光强度达到最大; 继续延长反应时间, 荧光强度趋于稳定。因此制备 N/P-CNPs 的最佳条件为: 抗坏血酸钠与  $(NH_4)_3PO_4$  的投料摩尔比为 1:12, 160 °C 反应 13 h。

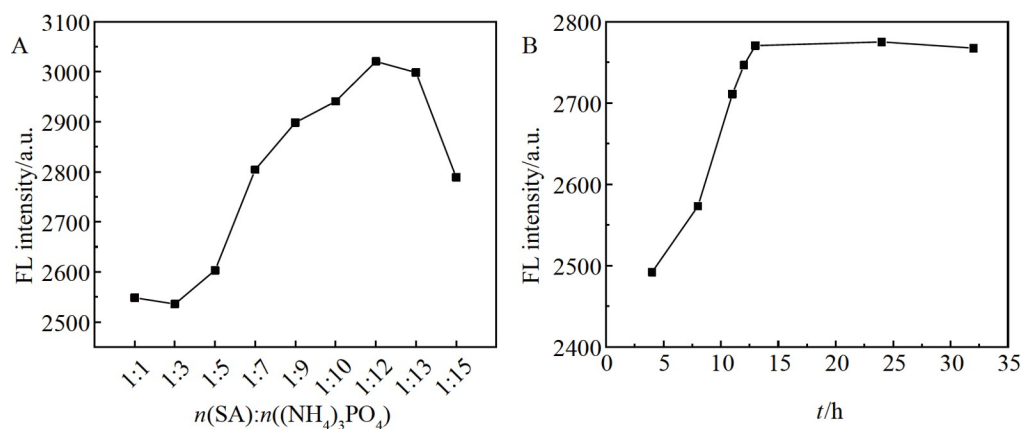


图4 合成条件的优化: (A) 抗坏血酸钠与  $(NH_4)_3PO_4$  的投料摩尔比和 (B) 反应时间对 N/P-CNPs 的荧光光谱的影响

Fig.4 Optimization of synthesis conditions: (A) Effect of molar ratio of sodium ascorbate to  $(NH_4)_3PO_4$ ; (B) Effect of reaction time on the fluorescence spectrum of N/P-CNPs

## 2.4 CF检测的条件优化

取 100  $\mu\text{L}$  1 mg/mL N/P-CNPs 溶液,加入 1900  $\mu\text{L}$  不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液,测定其荧光强度。在 pH 4~10 范围内, N/P-CNPs 在 pH=6.86 时具有最大的荧光强度。取 100  $\mu\text{L}$  1 mg/mL N/P-CNPs 溶液,加入 1500  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol/L}$  CF 对照品溶液和 400  $\mu\text{L}$  不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液,测定其荧光强度。结果表明, pH 6.86 时对体系荧光强度变化值的影响最大(图 5A),故选择 pH 6.86 为最佳反应 pH 值。

当加入 CF 后, N/P-CNPs 的荧光强度随反应时间的变化如图 5B 所示,荧光猝灭时间小于 1 min, CF 对 N/P-CNPs 的荧光猝灭效果响应极快,并且测定体系的荧光值基本不随测定时间的延长而发生大的变化,因此后续测定时,可采取配制好测定体系后直接进行测定。图 5C 为 N/P-CNPs 在 438 nm 处荧光强度随 NaCl 浓度变化的柱状图,可见 N/P-CNPs 荧光强度随 NaCl 浓度的变化较小,说明 N/P-CNPs 在高浓度离子溶液中具有较好的荧光稳定性。将 N/P-CNPs 置于 365 nm 紫外灯下持续照射 1 h,其荧光强度基本保持不变(图 5D),说明具有较好的抗光漂白性。

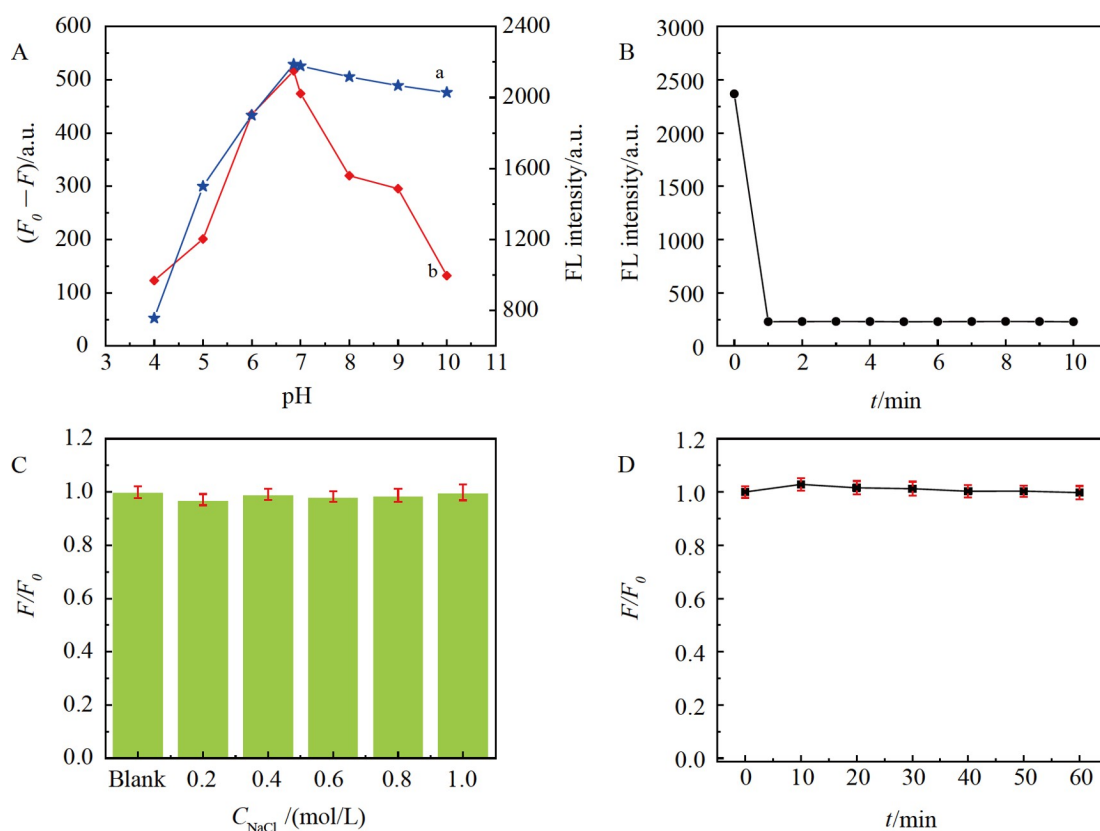


图5 (A)pH 值对测定体系的影响: (a)不同 pH 值条件下 N/P-CNPs 自身的荧光强度, (b)不同 pH 值条件下加入 CF 前后体系荧光强度变化值; (B)测定时间对测定体系的影响; (C)NaCl 浓度对 N/P-CNPs 荧光强度的影响; (D)光漂白性实验结果

Fig.5 (A) Influence of pH value on determination system: (a) fluorescence intensity of N/P-CNPs under different pH values, (b) change value of the fluorescence intensity of the system before and after adding CF under different pH values; (B) Influence of determination time on determination system; (C) Effect of concentration of NaCl on fluorescence intensity of N/P-CNPs; (D) Photobleaching experimental results

## 2.5 体系对CF的选择性

考察了 N/P-CNPs 对 CF 检测的选择性。如图 6 所示,在相同的实验条件下,当 CF 浓度为 316  $\mu\text{mol/L}$  时, N/P-CNPs 的猝灭效果可以达到近 96%,而 10 倍浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、1,2-丙二醇、半胱氨酸、谷胱甘肽、葡萄糖、甘氨酸溶液以及 5 倍浓度的  $\text{Mn}^{2+}$ 、甲硫氨酸溶液和 2 倍浓度的唑来磷酸、多西他赛、奥沙利铂溶液加入到 N/P-CNPs 体系中,并未对 N/P-CNPs 的

荧光信号产生明显的影响。当向传感体系中同时加入 CF 和其它干扰物时,其结果与单独 CF 样品组无明显差异。上述结果说明,这些金属离子和阴离子、有机物小分子不干扰对 CF 的测定,此荧光体系对 CF 具有较好的选择性。

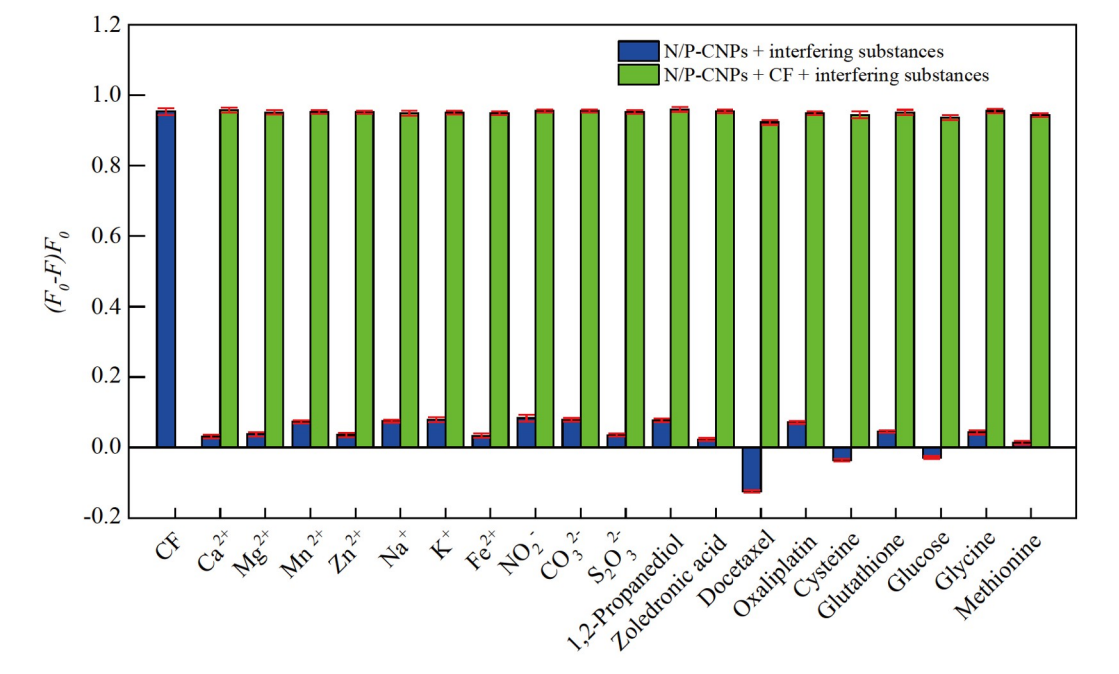


图6 体系的选择性  
Fig. 6 Selectivity of fluorescence system

2.6 N/P-CNPs用于检测CF的分析性能

在优化的实验条件下,考察了 N/P-CNPs 的荧光猝灭程度与 CF 的浓度之间的关系。如图 7A 所示,随着 CF 浓度增加, N/P-CNPs 的荧光强度逐渐减弱。如图 7B 所示,在 0.2~108.5 μmol/L 浓度范围内, CF 的浓度与荧光猝灭程度  $((F_0-F)/F_0)$  呈现良好的线性关系,线性回归方程为  $(F_0-F)/F_0=0.0059 C+0.1311$  ( $R^2=0.9990$ ),检出限为 0.05 μmol/L ( $3\sigma$ )。与其它文献报道的检测 CF 的方法相比,本方法线性范围更宽(表 1)。

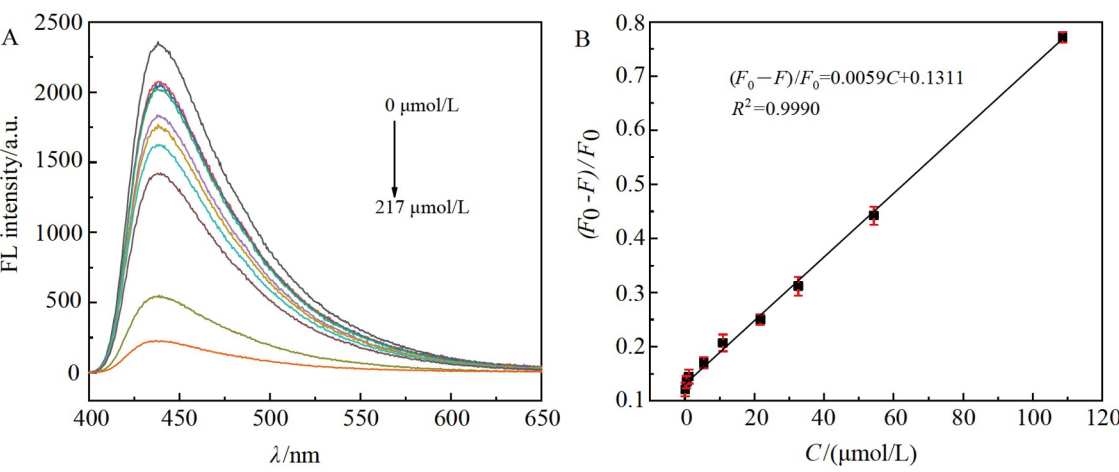


图7 (A)不同浓度 CF 存在下 N/P-CNPs 的荧光光谱; (B) N/P-CNPs 荧光强度与 CF 浓度的线性关系图  
Fig.7 (A) Fluorescence spectra of N/P-CNPs in the presence of different concentrations of CF; (B) Linear relationship between fluorescence intensity of N/P-CNPs and concentration of CF

表1 不同方法检测CF的性能比较  
Table 1 Comparison of different methods for detection of CF

| 材料<br>Materials                                                                                                    | 检测方法<br>Detection method | 线性范围<br>Linear range/<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 检出限<br>Limit of detection/<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 参考文献<br>Ref.     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|
| 聚对氨基苯磺酸/季胺官能化多壁碳纳米管复合物<br>Poly-p-aminobenzene sulfonic acid/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite | 电化学<br>Electrochemistry  | 0.1~6.5                                        | 0.020                                               | [11]             |
| 正十二烷基氯化吡啶<br>n-Dodecylpyridinium chloride                                                                          | 电化学<br>Electrochemistry  | 0.1~10.0                                       | 0.0175                                              | [12]             |
| 正十二烷基氯化吡啶<br>n-Dodecylpyridinium chloride                                                                          | 电化学<br>Electrochemistry  | 0.1~100.0                                      | 0.024                                               | [13]             |
| 羧基石墨烯修饰 CuxO/Cu 电极<br>Carboxyl graphene modified CuxO/Cu electrode                                                 | 电化学<br>Electrochemistry  | 0.2~20.0                                       | 0.076                                               | [14]             |
| 氮和磷共掺杂碳纳米粒子<br>Nitrogen and phosphorus co-doped carbon nanoparticles                                               | 荧光<br>Fluorescence       | 0.2~108.5                                      | 0.05                                                | 本工作<br>This work |

2.7 检测机理研究

图 8A 为 N/P-CNPs 的激发和发射光谱与 CF 的紫外-可见吸收光谱图,其中 CF 的吸收峰位于 283 nm,与 N/P-CNPs 的激发光谱有重叠。推测 CF 有效吸收了 N/P-CNPs 激发光的能量,导致 N/P-CNPs 的荧光减少<sup>[25]</sup>。如图 8B 所示,将 CF 添加到 N/P-CNPs 中,观察到在 200~400 nm 范围内传感体系的吸光度随着 CF 浓度增加而增大,相应地,持续添加 CF, N/P-CNPs 的发射光谱荧光强度呈现有规律的降低(图 7A),进一步证实了猝灭原理为内滤效应(IFE)<sup>[26]</sup>。

如图 8C 所示,研究了 N/P-CNPs(曲线 a)和向 N/P-CNPs 中加入 CF 后的混合体系(曲线 b)的荧光寿命,二者的平均荧光寿命分别为 5.21 和 5.26 ns,表明加入 CF 对 N/P-CNPs 的荧光寿命基本没有影响,而光致电子转移和荧光共振能量转移机制涉及能量或电子转移,在激发态下才会发生,并会改变荧光寿命。因此, N/P-CNPs 的荧光猝灭机制是由静态猝灭引起的<sup>[27-28]</sup>。

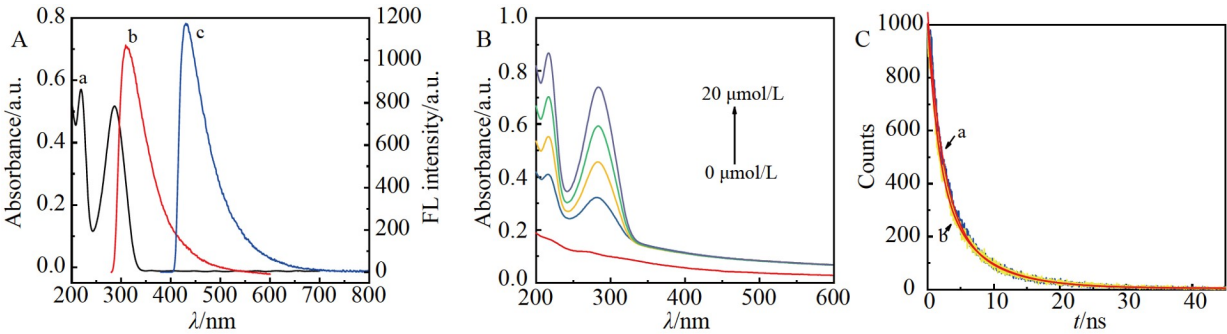


图8 (A)CF 的紫外-可见吸收光谱(a)、N/P-CNPs 的荧光激发光谱(b)和发射光谱(c); (B)加入不同浓度的 CF(0、4、8、12 和 20  $\mu\text{mol/L}$ )后 N/P-CNPs 的紫外-可见吸收光谱; (C)荧光寿命衰减曲线图: (a)N/P-CNPs; (b)N/P-CNPs 与亚叶酸钙的混合体系

Fig.8 (A) Ultraviolet-visible absorption spectra of CF (a), fluorescence excitation (b) and emission (c) spectra of N/P-CNPs; (B) Ultraviolet-visible absorption spectra of N/P-CNPs with different concentrations of CF (0, 4, 8, 12, and 20  $\mu\text{mol/L}$ ); (C) Fluorescence lifetime decay curves of (a) N/P-CNPs and (b) mixed system of N/P-CNPs and calcium folinate

综上,可以判断 CF 对 N/P-CNPs 的荧光猝灭是荧光内滤效应与静态猝灭效应共同作用的结果。

2.8 实际样品检测

为了进一步验证 N/P-CNPs 的实际应用性,将其用于 CF 注射液(规格: 10 mL:0.1g)中的 CF 含量测定,在 CF 注射液中检出 CF 含量是 21100  $\mu\text{mol/L}$ , 这与 CF 注射液的标示浓度(21142  $\mu\text{mol/L}$ )基本一致,并且采用本方法和高效液相色谱(HPLC)法<sup>[29]</sup>检测 CF 注射液样品中的 CF 含量数据基本一致。

通过对 CF 注射液进行加标回收实验,验证 N/P-CNPs 在实际样品中检测 CF 的可行性。在进行 CF 注射液加标回收率实验时,首先按照 1.2.2 节的实验方法,平行取 3 份 250  $\mu\text{L}$  CF 注射液置于 3 个不同的 100 mL 容量瓶中,分别加入 10 mL 不同浓度的 CF 对照品溶液,以 10 mmol/L PBS( $\text{pH}=6.86$ )稀释至刻度(加标水平分别为 0.5、5 和 50  $\mu\text{mol/L}$ ),摇匀后进行检测。

如表 2 所示,此荧光传感检测方法对由 CF 注射液配制而成的供试品溶液的回收率在 98.0%~100.2%之间,相对标准偏差均小于 2.0%,检测结果与 HPLC 法检测结果基本一致,证明本方法准确可靠,有望用于实际样品中 CF 的检测。

表2 CF注射液样品中CF含量的测定结果

Table 2 Determination results of CF content in CF injection samples

| 样品<br>Sample           | 初始浓度<br>Initial<br>concentration/<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 加入量<br>Added/<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 荧光法<br>Fluorescent method              |                       |                               | 高效液相色谱法<br>HPLC                        |                       |                               |
|------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
|                        |                                                            |                                        | 测得值<br>Found/<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 回收率<br>Recovery/<br>% | 相对标准偏差<br>RSD/<br>(%, $n=3$ ) | 测得值<br>Found/<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 回收率<br>Recovery/<br>% | 相对标准偏差<br>RSD/<br>(%, $n=3$ ) |
|                        |                                                            |                                        |                                        |                       |                               |                                        |                       |                               |
| CF 注射液<br>CF injection | 52.9                                                       | 0.5                                    | 53.4                                   | 98.0                  | 1.6                           | 53.4                                   | 102.0                 | 1.9                           |
|                        |                                                            | 5.0                                    | 57.9                                   | 99.0                  | 1.6                           | 58.0                                   | 101.6                 | 1.6                           |
|                        |                                                            | 50                                     | 103.0                                  | 100.2                 | 1.4                           | 102                                    | 98.2                  | 1.7                           |

3 结论

本研究采用具有良好发光性能的 N/P-CNPs 为荧光探针,基于荧光内滤效应和静态猝灭机理构建了一种检测 CF 含量的新方法。本方法的检出限为 0.05  $\mu\text{mol/L}$ ,具有灵敏度高、响应快、线性范围宽、专属性强、操作简便、成本低且绿色环保等优势。与其它方法相比,此荧光检测方法线性范围更宽。此外, N/P-CNPs 用于 CF 注射液样品中 CF 含量的检测,检测结果与 HPLC 法测定的结果基本一致。本方法在药品质量安全监测领域和临床用药安全监管领域具有良好的应用潜力和发展前景。

References

[1] TIAN N, MA W. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2020, 52(1): 101-103.

[2] GU M, GAO Y, CHANG P. *Cancers*, 2021, 13(10): 2429.

[3] RUDNO-RUDZIŃSKA J, KIELAN W, GUZIŃSKI M, PŁOCHOCKI M, KULBACKA J. *Appl. Sci.*, 2020, 10(15): 5163.

[4] HOU X, ZHANG P, DU H, CHU W, SUN R, QIN S, TIAN Y, ZHANG Z, XU F. *Front. Pharmacol.*, 2021, 12: 725583.

[5] JIAO Y W, LIU Q, ZHAO H B, HU X Z, SUN J L, LIU X H. *Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2021, 2021: 1858974.

[6] LI G D, LIU J G. *Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2021, 2021: 2280440.

[7] WANG Z, QIN W, ZHAI Z, HUANG L, FENG J, GUO X, LIU K, ZHANG C, WANG Z, LU G, DONG S. *Int. J. Cardiovasc. Imag.*, 2021, 37(4): 1203-1213.

[8] MAO J, DU P, YANG H, HU H, WANG S Y, WU X, CHENG Z B. *Medicine*, 2020, 99(14): e19420.

[9] VEZMAR S, SCHÜSSELER P, BECKER A, BODE U, JAEHDE U. *Pediatr. Blood Cancer*, 2009, 52(1): 26-32.

[10] WANG Z, MU C, KANG J, HU Z. *Chromatographia*, 2012, 75(19-20): 1211-1215.

[11] ZHU Z, WANG F, WANG F, XI L. *J. Electroanal. Chem.*, 2013, 708: 13-19.

[12] MOLLAEI M, GHOREISHI S M, KHOABI A. *Measurement*, 2020, 152: 107362.

[13] MOLLAEI M, GHOREISHI S M, KHOABI A. *Microchem. J.*, 2020, 154: 104653.

[14] WANG L, WU S, SHI T, WEI W, PAN P. *Chin. J. Chem. Phys.*, 2016, 29(6): 729-734.

[15] Calcium Folate. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 2020, Volume II. 亚叶酸钙. 中华人民共和国药典. 2020版第二部.

[16] LI X, ZHAO S, LI B, YANG K, LAN M, ZENG L. *Coord. Chem. Rev.*, 2021, 431: 213686.

[17] CHEN Yi-Feng, ZHANG Yu, JIAO Lei, YAN Hong-Ye, GU Wen-Ling, ZHU Cheng-Zhou. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(6): 907-921.

陈怡峰, 张钰, 焦雷, 严红烨, 顾文玲, 朱成周. *分析化学*, 2021, 49(6): 907-921.

- [18] ZHONG Shi-Long, ZHANG Ling-Ling, LIU Jing, LIU Xiang-Jun, CHANG Tian-Jun, SHANGGUAN Di-Hua. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2022, 50(1): 47-53.  
钟世龙, 张玲玲, 刘静, 刘祥军, 常天俊, 上官棣华. 分析化学, 2022, 50(1): 47-53.
- [19] LAGHARI S H, MEMON N, YAR KHUHAWER M, JAHANGIR T M. *Curr. Anal. Chem.*, 2022, 18(2): 145-162.
- [20] LIN L, WANG Y, XIAO Y, LIU W. *Microchim. Acta*, 2019, 186(3): 147.
- [21] ZHAO D, ZHANG Z X, LIU X M, ZHANG R, XIAO X C. *Mater. Sci. Eng., C*, 2021, 119: 111468.
- [22] HALLAJ T, AZIZI N, AMJADI M. *Microchem. J.*, 2021, 162: 105865.
- [23] LIU L, MI Z, HUO X, YUAN L, BAO Y, LIU Z, FENG F. *Food Chem.*, 2022, 368: 130829.
- [24] QU J, ZHANG X, LIU Y, XIE Y, CAI J, ZHA G, JING S. *Microchim Acta*, 2020, 187(6): 355.
- [25] NIU Jian-Li, YU Yong-Li, CAO Yan-Jie, WANG Meng. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2017, 45(6): 883-888.  
牛建丽, 于永丽, 曹艳杰, 王猛. 分析化学, 2017, 45(6): 883-888.
- [26] ZHANG Z W, LIU Y H, YAN Z Y, CHEN J Q. *Sens. Actuators, B*, 2018, 255: 986-994.
- [27] MOLAEI M J. *Anal. Methods*, 2020, 12(10): 1266-1287.
- [28] WANG X, ZHANG S. *Colloids Surf.*, 2022, 649: 129458.
- [29] Calcium Folate Injection. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 2020, Volume II.  
亚叶酸钙注射液. 中华人民共和国药典. 2020版第二部.

## Selective Detection of Calcium Folate by Fluorescence Quenching of Nitrogen and Phosphorus Codoped Carbon Nanoparticles

LI Li<sup>\*#1</sup>, LI Meng<sup>#2</sup>, YANG Ming-Li<sup>1</sup>, LI Hong-Lei<sup>1</sup>, ZHANG Huan<sup>1</sup>, MA Yue<sup>1</sup>, LIN Le-Er<sup>1</sup>,  
ZHANG Ming<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>(Kangda College, Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China)

<sup>2</sup>(Department of Thoracic Surgery, The Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222000, China)

**Abstract** Nitrogen and phosphorus codoped carbon nanoparticles (N/P-CNPs) were synthesized by one-step hydrothermal method using ammonium phosphate and sodium ascorbate as raw materials, with a quantum yield of 19%. Based on the rapid and highly selective quenching of N/P-CNPs by calcium folinate (CF), a new method for quantitative determination of CF in CF injection samples was established. Under the optimal experimental conditions, the concentration of CF in the range of 0.2–108.5  $\mu\text{mol/L}$  and the degree of fluorescence quenching of N/P-CNPs ( $(F_0-F)/F_0$ ,  $F_0$  is the initial fluorescence intensity,  $F$  is the fluorescence intensity after adding CF) showed a good linear relationship. The detection limit was 0.05  $\mu\text{mol/L}$ . Besides, it was verified that the fluorescence quenching mechanism of CF on N/P-CNPs was inner filter effect and static quenching effect. The established method was used to detect the content of CF in actual samples, and the obtained results were basically consistent with the results of high performance liquid chromatography, indicating that the method had good practicability and provided a new strategy for the detection of CF.

**Keywords** Nitrogen and phosphorus codoping; Carbon nanoparticles; Fluorescence; Calcium folinate; Inner filter effect; Static quenching

(Received 2022-08-09; accepted 2022-12-11)

Supported by the Jiangsu Overseas Research & Training Program for University Prominent Young & Middle-aged Teachers and Presidents Fund, the Qing Lan Project Fund of Jiangsu Province (No. KD2021qljs001), the Science and Technology Project Fund of Gaixin District in Lianyungang (No. HZ201906), the Petrel Plan Project Fund of Lianyungang (No. 2020-QD-005), the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Jiangsu Province (Nos. 202113980012Y, 202113980014Y) and the Science and Technology Funds of Kangda College of Nanjing Medical University (Nos. KD2020KYJJZD074, KD2021KYJJZD014, KD2021KYRC003, KD2021KYRC015).