



基于盐酸硫胺保护的荧光铜纳米簇的制备及其对微生物样品中铁离子的特异性检测

杨晓茜, 谢亚芳, 陈都, 付爱玲*

西南大学药学院, 重庆 400715

杨晓茜, 谢亚芳, 陈都, 付爱玲. 基于盐酸硫胺保护的荧光铜纳米簇的制备及其对微生物样品中铁离子的特异性检测[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1672-1680.

YANG Xiaoxi, XIE Yafang, CHEN Du, FU Ailing. Aneurine hydrochloride protected fluorescent copper nanoclusters: preparation and application in the specific detection of Fe^{3+} in microbial samples[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1672-1680.

摘要: 【目的】采用盐酸硫胺(aneurine hydrochloride, VB_1)作为保护配体和还原剂, 制备荧光稳定的 VB_1 保护的铜纳米簇(aneurine hydrochloride protected copper nanoclusters, $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$), 并用于痕量 Fe^{3+} 的检测。【方法】使用 VB_1 作为保护配体和还原剂, 合成 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 。通过紫外-可见吸收光谱、荧光光谱和粒径进行表征, 并探究了 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的 pH 响应性、对 Fe^{3+} 的选择性以及线性范围。【结果】制备的 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 具有良好的水溶性, 优异的稳定性和超细的尺寸。 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 作为荧光探针检测 Fe^{3+} , 在 $0\text{-}5\ \mu\text{mol/L}$ 和 $5\text{-}500\ \mu\text{mol/L}$ 范围内均呈良好的线性, 检测限为 $0.085\ \mu\text{mol/L}$ 。利用该方法检测实际微生物样品毛癣菌(*Trichophyton*)中的 Fe^{3+} , 回收率在 $95.67\%\text{-}107.94\%$ 之间。【结论】以 VB_1 作为保护配体和还原剂, 制备了具有稳定荧光的 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$, 基于该铜纳米簇对 Fe^{3+} 的选择性淬灭, 建立了一种简单快速且灵敏的检测 Fe^{3+} 的新方法, 并成功应用于毛癣菌中 Fe^{3+} 的检测, 在实际微生物样品中具有较好的应用前景。

关键词: 铜纳米簇; 荧光探针; Fe^{3+} ; 盐酸硫胺(VB_1)

资助项目: 国家自然科学基金(82073830)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82073830).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68251225, E-mail: fal@swu.edu.cn

Received: 2022-09-02; Accepted: 2022-11-23; Published online: 2022-12-05

Aneurine hydrochloride protected fluorescent copper nanoclusters: preparation and application in the specific detection of Fe³⁺ in microbial samples

YANG Xiaoxi, XIE Yafang, CHEN Du, FU Ailing*

College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] To prepare the fluorescent stable aneurine hydrochloride (VB₁)-protected copper nanoclusters with VB₁ as a protective ligand and reducing agent for the detection of trace amounts of Fe³⁺. [Methods] We used VB₁ as a protective ligand and reducing agent to synthesize VB₁-protected copper nanoclusters. Then, we characterized the copper nanoclusters by UV visible absorption spectrum, fluorescence spectrum, and particle size, and explored their pH responsiveness, selectivity to Fe³⁺, and linear range in the detection of Fe³⁺. [Results] The prepared VB₁-protected copper nanoclusters had good water solubility, excellent stability, and ultrafine size. As the fluorescent probes to detect Fe³⁺, the copper nanoclusters showed good linearity in the ranges of 0–5 μmol/L and 5–500 μmol/L, with the limit of detection of 0.085 μmol/L. When being used to detect Fe³⁺ in the actual microbial sample of *Trichophyton*, the copper nanoclusters showed the recovery rate between 95.67% and 107.94%. [Conclusion] We used VB₁ as a protective ligand and reducing agent to prepare fluorescent stable VB₁-protected copper nanoclusters. On the basis of the selective quenching of Fe³⁺ by the copper nanoclusters, we established a simple, rapid, and sensitive method for the detection of Fe³⁺ and successfully applied it to the detection of Fe³⁺ in *Trichophyton*. This method has a good application prospect in actual microbial samples.

Keywords: copper nanoclusters; fluorescent probes; Fe³⁺; aneurine hydrochloride (VB₁)

金属纳米簇(metal nanoclusters, MNCs)是一种新型的荧光纳米材料,由于尺寸大小与电子的费米波长相似,其与光的相互作用,通过电子在各能级间的跃迁而使得 MNCs 具有独特的化学、光学、电学性质^[1-2]。MNCs 表现出明显的分子属性,如分立的电子态和在紫外到近红外区域的尺寸依赖性荧光^[3-5]。尺寸依赖性的荧光纳米簇由于其合成简单、粒径小、生物相容性好、毒性低等优势,在生物传感成像、癌症治疗、离子和生物小分子检测分析等领域得到广泛应用^[6-10]。

相较于贵金属纳米簇 Au NCs 和 Ag NCs,

Cu NCs 因拥有良好的生物相容性、催化性能、简单易得、成本低和实用性强等特点,受到越来越多关注。然而, Cu NCs 易被氧化且尺寸难以控制^[11-13]。近年来,研究者们发现采用各种模板及稳定剂可制备稳定且荧光强度大的 Cu NCs^[14-18]。Chandran 等制备了具有强烈亮红色荧光的谷胱甘肽包覆的铜纳米簇 (glutathione-coated copper nanoclusters, Cu-GSH NCs), 可作为一种有效的基于 pH 的癌细胞生物成像探针^[19]。Huang 等以谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 为稳定剂,制备了具有稳定蓝色荧光的 Cu NCs, 用以测定实际水样中的 Fe³⁺^[20]。Liao 等以牛血

清蛋白(bovine serum albumin, BSA)为模板合成了强荧光及光学稳定的 Cu NCs, 用以测定水样中的 Hg^{2+} [21]。

铁离子是所有微生物的基本成分, 微生物的许多生物过程都离不开铁的参与, 如呼吸链中氧的转运、电子传递、转录调控等[22]。当铁离子浓度下降时, 微生物生长将受到严重抑制。并且铁是氧化还原过程的重要成分, 当铁离子浓度升高后, 铁离子在反应中可产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 导致氧化应激及启动细胞增殖与死亡的关键信号通路[23]。因此, 快速、精确检测铁离子的含量至关重要。近年来, 纳米探针常用于检测金属离子。然而, 目前尚无纳米探针用于检测微生物细胞内的铁离子。

在本研究中, 我们用盐酸硫胺(aneurine hydrochloride, VB_1)作为保护配体和还原剂, 制备了具有稳定蓝色荧光的铜纳米簇, 并详细研究了 VB_1 -Cu NCs 的性质。基于 Fe^{3+} 对其荧光的淬灭, 以 VB_1 -Cu NCs 作为荧光探针, 建立了荧光分析方法, 从而实现了对微生物样品毛癣菌(*Trichophyton*)细胞内 Fe^{3+} 的简单、快速和高灵敏度的分析检测。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

离心机 TGL-16 (长沙湘仪实验室仪器开发有限公司); 85-2 型磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); UV-2550 紫外分光光度计(岛津公司); ZETASIZER Nano-Zs 激光粒度分析仪(马尔文仪器有限公司); BSA123S 电子天平(赛多利斯公司); Synergy H1 多功能酶标仪(伯腾仪器有限公司); F-2700 荧光分光光度计(日立科学仪器有限公司)。

五水硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)购自天津永大化学试剂有限公司; 氯化锂(LiCl)、硫酸镁

(MgSO_4)、硫酸锰(MnSO_4)、氯化钙(CaCl_2)、氯化钾(KCl)、氯化铝(AlCl_3)、氯化钠(NaCl)、七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氯化钡(BaCl_2)、氯化锌(ZnCl_2)、氢氧化钠(NaOH)均购自成都市科隆化学品有限公司; 盐酸硫胺(VB_1)购自北京迈瑞达科技有限公司; 硫酸铁 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 购自天津市致远化学试剂有限公司。

1.2 VB_1 -Cu NCs 的制备和表征

将 5 mL CuSO_4 (1 mmol/L) 加入到 10 mg VB_1 中, 室温搅拌 10 min。然后在不断搅拌下加 NaOH 溶液(1 mol/L)调节 pH 至 6.0, 继续室温搅拌反应 4 h, 得淡黄色溶液。高速离心(10 000 r/min、15 min、4 °C)纯化, 纯化的产品于 4 °C 冰箱保存备用, 制备过程如图 1 所示。

采用紫外分光光度计采集 VB_1 -Cu NCs 的紫外-可见吸收光谱。采用荧光分光光度计记录 VB_1 -Cu NCs 的荧光光谱。采用 ZETASIZER Nano-Zs 激光粒度分析仪对 VB_1 -Cu NCs 的粒径进行分析。

1.3 VB_1 -Cu NCs 的 pH 稳定性

量取 100 μL 不同 pH (pH 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 和 14) 的 VB_1 -Cu NCs, 其中以 100 μL 超纯水为空白对照, 室温放置 15 min, 设定激发波长为 344 nm, 发射波长为 443 nm, 测定荧光强度。

1.4 VB_1 -Cu NCs 对 Fe^{3+} 的选择性

将 50 μL 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的不同金属阳离子(Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 和 Zn^{2+}) 的水溶液加入到 50 μL 的 VB_1 -Cu NCs 中, 室温孵育 15 min, 设置激发波长为 344 nm, 发射波长为 443 nm, 测定荧光强度。

1.5 灵敏度与线性

在 500 μL 的 VB_1 -Cu NCs 溶液中, 分别加入 500 μL 不同浓度的 Fe^{3+} (Fe^{3+} 最终浓度分别为 0、0.5、1、2、5、10、25、50、100、250 和

500 $\mu\text{mol/L}$), 室温孵育 15 min 后, 设定激发波长为 344 nm, 发射波长为 443 nm, 测定荧光强度。

1.6 毛癣菌中 Fe^{3+} 的测定

取毛癣菌(毛癣菌菌株号: 340 195)于匀浆器中, 加适量生理盐水, 充分研磨至无块状沉淀, 用移液枪吹打均匀(菌液浓度约 10^8 CFU/mL), 取菌液超声破碎, 即得毛癣菌样品溶液。

取毛癣菌样品溶液 50 μL , 加入 50 μL $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 溶液, 室温孵育 15 min 后, 设定激发波长为 344 nm, 发射波长为 443 nm, 检测荧光强度。回收率实验在毛癣菌样品溶液中分别加入浓度为 5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fe^{3+} , 其他检测条件保持不变。

2 结果与分析

2.1 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的表征

以 VB_1 作为保护配体和还原剂, 制备了

$\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$, 制备过程如图 1 所示。

通过紫外、荧光光谱和粒径对上述制备的 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 进行了表征。如图 2A 所示, 制备的 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 在可见光下为淡黄色透明液体, 在紫外光下发出强烈的蓝色荧光, 证明了荧光 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的合成。荧光光谱如图 2A 所示, $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的最大激发波长在 344 nm 处, 最大发射波长在 443 nm 处, 发射光谱峰型对称, 半峰宽较窄, 说明合成的纳米簇具有较好的发光性能。图 2B 所示为 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的紫外-可见光谱, $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 在 230 nm 和 270 nm 处有较强的吸收, 而 VB_1 在 230 nm 和 270 nm 处吸收较弱, 与 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的紫外-可见吸收光谱具有明显差别, 进一步验证了 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的合成。利用激光粒度分析仪对 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 粒径分布进行测定。如图 2C 所示, $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的平均粒径为 (0.67 ± 0.02) nm, 粒径较小且尺寸分布均匀。

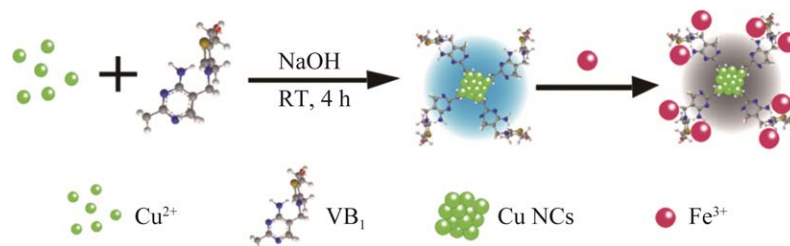


图 1 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的合成途径及 Fe^{3+} 荧光检测示意图

Figure 1 Schematic diagram of the synthetic pathway of $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ and the fluorescence detection of Fe^{3+} .

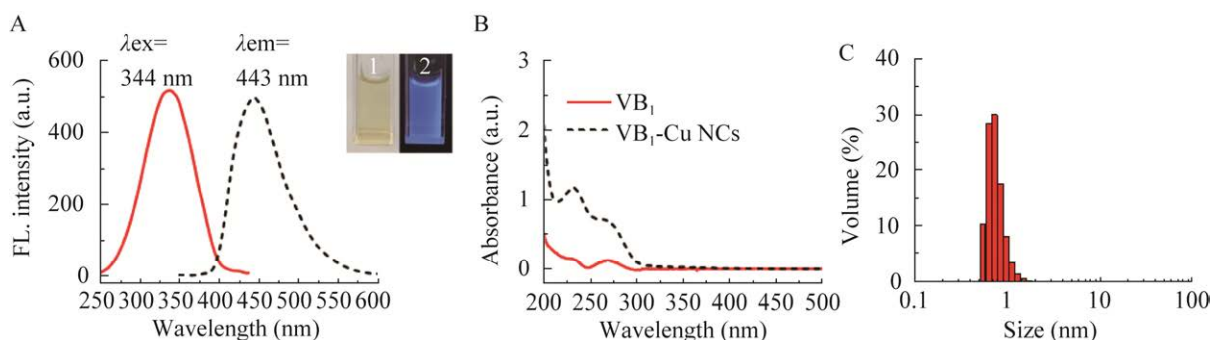


图 2 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的表征

Figure 2 Characterization of $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$. A: The excitation and emission spectra of $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$, insets show the photographs taken under day light (1) and UV light (2). B: UV-vis absorption spectra of $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ and VB_1 . C: Particle size distribution of the $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ (based on volume).

2.2 VB₁-Cu NCs 的 pH 稳定性

为考察 VB₁-Cu NCs 作为荧光探针的稳定性, 检测了其在不同 pH 条件下的荧光强度。如图 3 所示, 在 pH 5–11 范围内, VB₁-Cu NCs 的荧光强度随着 pH 的升高而升高, 当 pH 超过 11 后, 荧光强度随着 pH 的升高而降低; 当 pH 小于 5 时, VB₁-Cu NCs 的荧光强度大大降低, 接近淬灭。结果表明, VB₁-Cu NCs 在中性至碱性条件下较为稳定而酸性环境不稳定。

2.3 VB₁-Cu NCs 对 Fe³⁺ 的选择性探究

为考察 VB₁-Cu NCs 对 Fe³⁺ 的选择性, 选择了其他 10 种常见的金属离子(Li⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、K⁺、Al³⁺、Na⁺、Fe²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺) 作为对照实验中的干扰离子。结果如图 4 所示, 加入 Fe³⁺ 后 VB₁-Cu NCs 发生了明显的荧光淬灭, 而其他金属阳离子对其荧光强度均无明显影响。Fe³⁺ 的相对荧光强度 F/F_0 (F 表示加入金属离子后 VB₁-Cu NCs 的荧光强度, F_0 表示未加入金属离子时的荧光强度) 为 0.092, 结果表明该荧光纳米探针对检测 Fe³⁺ 有良好的选择性。

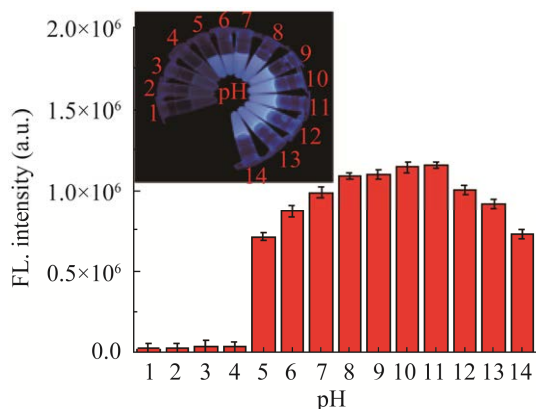


图 3 pH 值对 VB₁-Cu NCs 荧光强度的影响

Figure 3 Effect of pH on the intensity of VB₁-Cu NCs.

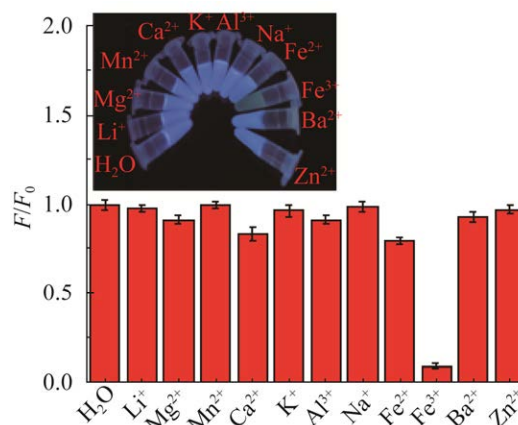


图 4 VB₁-Cu NCs 对 Fe³⁺ 和其他金属离子的选择性实验

Figure 4 Selectivity of the VB₁-Cu NCs toward Fe³⁺ and the other metal ions.

2.4 VB₁-Cu NCs 检测 Fe³⁺ 的灵敏度和线性探究

采用 VB₁-Cu NCs 对不同浓度的 Fe³⁺ 进行测定, 以探究本检测方法的线性范围与检测限。图 5A 为在不同浓度 Fe³⁺ 下 VB₁-Cu NCs 的荧光光谱, 随着 Fe³⁺ 浓度从 0 μmol/L 增加到 500 μmol/L, VB₁-Cu NCs 的荧光强度逐渐降低。由图 5C 可知, VB₁-Cu NCs 的相对荧光强度 F/F_0 与 Fe³⁺ 浓度在 5–500 μmol/L 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为 $F/F_0 = -0.001[\text{Fe}^{3+}](\mu\text{mol/L}) + 0.879$, 线性相关系数 R^2 为 0.992 8。而由图 5B 可知, VB₁-Cu NCs 的相对荧光强度 F/F_0 与 Fe³⁺ 浓度在 0–5 μmol/L 范围内也呈良好的线性关系, 其线性回归方程为 $F/F_0 = -0.023[\text{Fe}^{3+}](\mu\text{mol/L}) + 0.999$, 线性相关系数 R^2 为 0.991 3, 检测限为 0.085 μmol/L。与之前报道的检测 Fe³⁺ 的方法相比, 如碳点^[24]、CuNCs@PVP^[25]、CuNC@Trp^[26]、Au NCs^[27]、GHRP-6-Au NCs^[28], 所制备的 VB₁-Cu NCs 具有较低检测限和较宽的线性范围(表 1)。

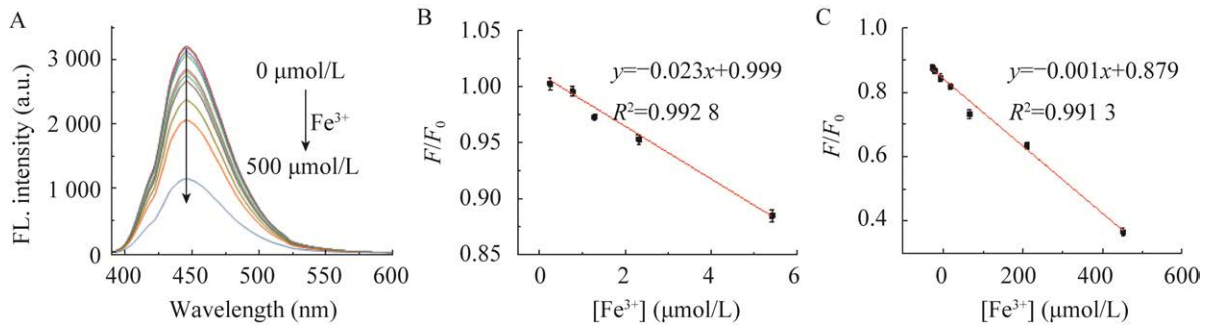


图 5 VB₁-Cu NCs 检测 Fe³⁺ 的灵敏度与线性

Figure 5 Sensitivity and linearity of VB₁-Cu NCs for detecting Fe³⁺. A: The fluorescence spectra of VB₁-Cu NCs with different concentrations of Fe³⁺ (0–500 μmol/L). B, C: The linear relationship between relative fluorescence intensity F/F_0 and Fe³⁺ concentration.

表 1 基于不同纳米材料检测 Fe³⁺ 的性能比较

Table 1 Comparison of analytical performance of analytical methods based on different nanomaterials for detection of Fe³⁺

Nanomaterials	Linear range (μmol/L)	Detection limit (μmol/L)	Reference
Carbon dots	2.500–30.000	0.800	[24]
CuNCs@PVP	0.400–20.000	0.140	[25]
CuNC@Trp	10.000–1 000.000	2.200	[26]
Au NCs	0.750–125.000	0.227	[27]
GHRP-6-Au NCs	2.000–1 000.000	1.400	[28]
VB ₁ -Cu NCs	0.000–5.000, 5.000–500.000	0.085	This work

2.5 在微生物样品中使用 VB₁-Cu NCs 检测 Fe³⁺ 的含量

为了验证本方法的实用性,以 VB₁-Cu NCs 为荧光探针,检测毛癣菌中 Fe³⁺ 的含量,并进行回收率的测定。结果如表 2 所示,回收率范

围在 95.67%–107.94% 内,相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 范围在 0.43%–1.27% 间,表明该方法具有良好的准确度,可用于实际微生物样品毛癣菌中 Fe³⁺ 的检测。

表 2 毛癣菌中 Fe³⁺ 的含量测定及回收率实验结果

Table 2 Determination of Fe³⁺ in *Trichophyton* samples and the results of recovery test

Content in sample (μmol/L)	Added (μmol/L)	Total found (μmol/L)	Recovery (%)	RSD (%)
12.16	5.00	17.56	107.94	0.43
	10.00	22.03	98.71	0.83
	25.00	38.12	103.84	1.27
	50.00	60.00	95.67	1.18

3 讨论与结论

几乎所有微生物的细胞过程都需要铁离子。铁离子参与了大量关键的细胞过程,包括氨基酸合成、氧气运输、柠檬酸循环和 DNA 生物合成等^[29],但过量的铁也可能导致细胞损伤和死亡,且不同氧化还原状态的铁可能引起不同的生理病理过程^[30]。如高氧化活性的 Fe^{3+} 可造成蛋白质的氧化变形和沉淀,而低浓度的 Fe^{2+} 具有还原性,是电子传递中不可缺少的金属离子^[30]。因此对不同氧化还原状态的铁种及其通量进行单独检测至关重要。

中国药典中采用硫代硫酸钠容量法测定 Fe^{3+} ,但该方法灵敏度较低,不能用于样品中痕量 Fe^{3+} 的测定。国家标准方法(GB7873—87)中采用邻菲罗啉比色法和原子吸收光谱法来检测铁离子。邻菲罗啉比色法可用于直接测定 Fe^{2+} ,但检测 Fe^{3+} 则需要通过测定 Fe^{2+} 和总铁,然后通过差减法获得,准确度大大降低。原子吸收光谱法可定量检测样品中的总铁量,但不能区分 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 。因此建立一种直接快速检测 Fe^{3+} 的方法尤为重要。近年来,纳米探针常用于金属离子的快速、简单分析,如 Hg^{2+} ^[31]、 Cu^{2+} ^[32]、 Ag^{+} ^[33] 等。但目前尚无纳米探针用于微生物细胞内 Fe^{3+} 的检测。

VB_1 是一种含硫化合物,其噻唑环上的硫原子易与金属 Cu^{2+} 形成 Cu-S 配位键吸附在 Cu NCs 外,形成保护层。其嘧啶环上的质子型 N^+ 易与 Cu^{2+} 形成 Cu-N 配位键,生成更稳定的 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 。因此,本研究选择以 VB_1 作为保护剂和还原剂,制备荧光铜纳米簇。随后,我们对 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的性质进行了研究,发现具有蓝色荧光的 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 能够被 Fe^{3+} 特异性淬灭,且不受 Fe^{2+} 和其他金属离子(Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Na^+ 、 Ba^{2+} 和 Zn^{2+}) 的干扰。

为探究 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 对 Fe^{3+} 选择性淬灭的机制,我们测定了加入 Fe^{3+} 前后 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的粒径,紫外吸收光谱以及不同温度下的淬灭效率。结果显示,加入 Fe^{3+} 后铜簇的粒径变为 (148.00 ± 18.54) nm,与加入前的粒径 (0.67 ± 0.02) nm 相比明显增大,说明 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 发生了聚集。且加入 Fe^{3+} 后, $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 在 270 nm 处的吸收增强,说明 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 与 Fe^{3+} 在基态发生相互作用。而温度对淬灭效率的结果显示,随着温度的升高,相对荧光强度增加,这与静态淬灭特征一致,进一步表明 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 与 Fe^{3+} 形成非荧光的基态配合物。基于上述结果,我们推断 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 对 Fe^{3+} 选择性淬灭是因为 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 表面的 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 基团,与 Fe^{3+} 形成配合物而聚集,从而导致荧光淬灭。

基于此原理,我们建立了一种以 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 作为荧光探针,简便快速灵敏地检测毛癣菌细胞内 Fe^{3+} 的方法,并与经典的硫氰酸盐法进行了比较。硫氰酸盐法测定结果为 $11.00 \mu\text{mol/L}$,与 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 的检测结果 $12.16 \mu\text{mol/L}$ 相比,相对偏差为 5.01%,两者结果一致,表明 $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 作为荧光探针检测 Fe^{3+} 具有较高的准确性。硫氰酸盐法作为检测 Fe^{3+} 常用的方法,因所用试剂具有较强的毒性,测定时吸光度会随时间的延长而降低,在应用中受到一定限制。与硫氰酸盐法比较, $\text{VB}_1\text{-Cu NCs}$ 对于环境和人体更加安全,稳定性好,结果不受测定时间的影响。而且本法检测限仅为 $0.085 \mu\text{mol/L}$,与之前报道的采用纳米材料检测 Fe^{3+} 的方法相比^[24-28],具有较高的灵敏度和较宽的线性范围,在微生物样品中有较好的应用前景。

参考文献

- [1] RESCH-GENGER U, GRABOLLE M, CAVALIERE-JARICOT S, NITSCHKE R, NANN T.

- Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(9): 763-775.
- [2] TAO Y, LI MQ, REN JS, QU XG. Metal nanoclusters: novel probes for diagnostic and therapeutic applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(23): 8636-8663.
- [3] CHEN PC, PERIASAMY AP, HARROUN SG, WU WP, CHANG HT. Photoluminescence sensing systems based on copper, gold and silver nanomaterials[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, 320-321: 129-138.
- [4] LI J, ZHU J, XU K. Fluorescent metal nanoclusters: from synthesis to applications[J]. *TRAC: Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 58: 90-98.
- [5] QIAO Z, ZHANG J, HAI X, YAN Y, SONG W, BI S. Recent advances in templated synthesis of metal nanoclusters and their applications in biosensing, bioimaging and theranostics[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 176: 112898.
- [6] YANG JL, PENG Y, LI SR, MU J, HUANG ZZ, MA JT, SHI Z, JIA Q. Metal nanocluster-based hybrid nanomaterials: fabrication and application[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 456: 214391.
- [7] TANG Q, YANG TT, HUANG YM. Copper nanocluster-based fluorescent probe for hypochlorite[J]. *Mikrochimica Acta*, 2015, 182: 2337-2343.
- [8] ZHANG S, ZHANG XY, SU ZQ. Biomolecule conjugated metal nanoclusters: bio-inspiration strategies, targeted therapeutics, and diagnostics[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(19): 4176-4194.
- [9] HAN A, XIONG L, HAO S, YANG Y, LI X, FANG G, LIU J, PEI Y, WANG S. Highly bright self-assembled copper nanoclusters: a novel photoluminescent probe for sensitive detection of histamine[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(15): 9060-9067.
- [10] BABU BUSI K, PALANIVEL M, KANTA GHOSH K, BASU BALL W, GULYÁS B, PADMANABHAN P, CHAKRABORTTY S. The multifarious applications of copper nanoclusters in biosensing and bioimaging and their translational role in early disease detection[J]. *Nanomaterials: Basel, Switzerland*, 2022, 12(3): 301.
- [11] KALYTCHEK S, ZHOVTIUK O, ROGACH AL. Sodium chloride protected CdTe quantum dot based solid-state luminophores with high color quality and fluorescence efficiency[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 103(10): 103105.
- [12] LV S, LI Y, ZHANG K, LIN Z, TANG D. Carbon dots/g-C₃N₄ nanoheterostructures-based signal-generation tags for photoelectrochemical immunoassay of cancer biomarkers coupling with copper nanoclusters[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(44): 38336-38343.
- [13] HU X, LIU TT, ZHUANG YX, WANG W, LI YY, FAN WH, HUANG YM. Recent advances in the analytical applications of copper nanoclusters[J]. *TRAC: Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 77: 66-75.
- [14] WU XM, ZHANG F, LI Y. Facile synthesis of near-infrared emitting dBSA-templated Cu nanoclusters for sensitive detection of heparin[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(34): 5466-5475.
- [15] SHELLAIAH M, SIMON T, THIRUMALAIIVASAN N, SUN KW, KO FH, WU SP. Cysteamine-capped gold-copper nanoclusters for fluorometric determination and imaging of chromium(VI) and dopamine[J]. *Mikrochimica Acta*, 2019, 186(12): 788.
- [16] LUO T, ZHANG S, WANG Y, WANG M, LIAO M, KOU X. Glutathione-stabilized Cu nanocluster-based fluorescent probe for sensitive and selective detection of Hg²⁺ in water[J]. *Luminescence*, 2017, 32(6): 1092-1099.
- [17] FENG J, CHEN YL, HAN YX, LIU JJ, MA SD, ZHANG HG, CHEN XG. pH-regulated synthesis of trypsin-templated copper nanoclusters with blue and yellow fluorescent emission[J]. *ACS Omega*, 2017, 2(12): 9109-9117.
- [18] XUE Y, CHENG Z, LUO M, HU H, XIA C. Synthesis of copper nanocluster and its application in pollutant analysis[J]. *Biosensors: Basel, Switzerland*, 2021, 11(11): 424.
- [19] CHANDRAN N, JANARDHANAN P, BAYAL M, UNNIYAMPURATH U, PILANKATTA R, NAIR SS. Label free, nontoxic Cu-GSH NCs as a nanopatform for cancer cell imaging and subcellular pH monitoring modulated by a specific inhibitor: bafilomycin A1[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, 3(2): 1245-1257.
- [20] HUANG H, LI H, FENG JJ, FENG H, WANG AJ. One-pot green synthesis of highly fluorescent glutathione-stabilized copper nanoclusters for Fe³⁺ sensing[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 241: 292-297.
- [21] LIAO XQ, LI RY, LI ZJ, SUN XL, WANG ZP, LIU JK. Fast synthesis of copper nanoclusters through the use of hydrogen peroxide additive and their application for the fluorescence detection of Hg²⁺ in water samples[J]. *New Journal of Chemistry*, 2015, 39(7): 5240-5248.

- [22] ZECCA L, YOU DIM MB, RIEDERER P, CONNOR JR, CRICHTON RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, 5(11): 863-873.
- [23] HO JA, CHANG HC, SU WT. DOPA-mediated reduction allows the facile synthesis of fluorescent gold nanoclusters for use as sensing probes for ferric ions[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(7): 3246-3253.
- [24] WANG Y, LAO S, DING W, ZHANG Z, LIU S. A novel ratiometric fluorescent probe for detection of iron ions and zinc ions based on dual-emission carbon dots[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 284: 186-192.
- [25] ZHANG Z, XUE W, YANG J, ZHAO Y, GUO J. Discriminating detection of dissolved ferrous and ferric ions using copper nanocluster-based fluorescent probe[J]. *Analytical Biochemistry*, 2021, 623: 114171.
- [26] KARDAR ZS, SHEMIRANI F, ZADMARD R. Determination of iron(II) and iron(III) via static quenching of the fluorescence of tryptophan-protected copper nanoclusters[J]. *Mikrochimica Acta*, 2020, 187(1): 81.
- [27] ZHANG S, ZHANG C, SHAO XD, GUAN RT, HU YY, ZHANG KY, LIU WJ, HONG M, YUE QL. Dual-emission ratio fluorescence for selective and sensitive detection of ferric ions and ascorbic acid based on one-pot synthesis of glutathione protected gold nanoclusters[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(28): 17283-17290.
- [28] LI H, HUANG H, FENG JJ, LUO X, FANG KM, WANG ZG, WANG AJ. A polypeptide-mediated synthesis of green fluorescent gold nanoclusters for Fe³⁺ sensing and bioimaging[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 506: 386-392.
- [29] de SERRANO LO, CAMPER AK, RICHARDS AM. An overview of siderophores for iron acquisition in microorganisms living in the extreme[J]. *Biometals*, 2016, 29(4): 551-571.
- [30] DEVAUX F, THIÉBAUT A. The regulation of iron homeostasis in the fungal human pathogen *Candida glabrata*[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(10): 1041-1060.
- [31] BHAMORE JR, JHA S, BASU H, SINGHAL RK, MURTHY ZVP, KAILASA SK. Tuning of gold nanoclusters sensing applications with bovine serum albumin and bromelain for detection of Hg²⁺ ion and lambda-cyhalothrin via fluorescence turn-off and on mechanisms[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(11): 2781-2791.
- [32] JIA YX, SUN TX, JIANG YN, SUN WY, ZHAO Y, XIN JW, HOU YT, YANG WS. Green, fast, and large-scale synthesis of highly fluorescent Au nanoclusters for Cu²⁺ detection and temperature sensing[J]. *Analyst*, 2018, 143(21): 5145-5150.
- [33] GUAN RT, TAO LX, HU YY, ZHANG C, WANG YP, HONG M, YUE QL. Selective determination of Ag⁺ in the presence of Cd²⁺, Hg²⁺ and Cu²⁺ based on their different interactions with gold nanoclusters[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(55): 33299-33306.