DOI: 10. 3724/ SP. J. 1096. 2011. 00356

Ag/ Au 纳米粒子的没食子酸还原制备及其 共振瑞利散射光谱测定人血清总蛋白

王文星 黄玉萍 徐淑坤* (东北大学理学院,沈阳 11004)

摘 要 以没食子酸为还原剂和稳定剂,用种子生长法制备出粒径均匀、单分散性和稳定性好、近球形的 Ag/Au 核壳纳米粒子。高分辨透射电镜(HRTEM)与 X 射线能量色散光谱仪(EDX)测试表明,在 Ag/Au 摩 尔比为1: 1.6 时,Au 已完全包裹在 Ag 纳米粒子表面时,平均粒径为 25 nm。以此摩尔比制备的 Ag/Au 核壳 纳米粒子为探针用共振瑞利散射光谱测定人血清总蛋白,在 NaAc HAc 缓冲液(pH 4.4)及 0.05 mol/L NaCl 介质中,Ag/Au 核壳纳米粒子与 HSA 形成稳定的复合物;Ag/Au HSA 纳米复合物的相对散射强度 $\Delta I_{390 nm}$ 与 HSA 浓度在 0 0011~0.35 mg/L 范围内呈线性关系,其回归方程为 $\Delta I_{390 nm}$ = -0.54+494.82c(r = 0 9994),检出限为0.36 ng/L。本方法有较好的选择性,可用于人血清蛋白分析,结果与考马斯亮蓝 G 250 法 一致,回收率在98.2%~102.3%之间,相对标准偏差为 2.3%。

关键词 Ag/Au 核壳纳米粒子;没食子酸;共振瑞利散射光谱;人血清总蛋白

1 引 言

共振瑞利散射(RRS)作为共振非线性光散射,是具有高灵敏度和简易性的分析技术,因其灵敏度和 精密度高、干扰较少、操作简便等优点而备受关注。最早是以有机染料分子作探针测定核酸¹¹、蛋白 质^[2]、多糖^[3]、药物^[4]、无机分子^[5]等。近年来陆续出现以纳米粒子为探针测定药物和生物样品的报 道^[6~10],由于 Ag/Au 核壳纳米粒子既保留了 Au 壳层良好的生物相容性和亲和力^[11],同时 Ag 核又能 大幅度地提高表面增强拉曼散射和共振光散射等光检测信号^[12,13],在生物分析检测方面具有明显优越 性。Ag/Au 核壳纳米粒子的制备主要采用以柠檬酸钠或盐酸羟胺作为还原剂的种子生长法^[14,15]。本 研究以没食子酸为还原剂和稳定剂,用种子生长法在 Ag 晶种表面还原沉积 Au,简单快速地制备出一 系列含有不同 Ag/Au 摩尔比的 Ag/Au 核壳纳米粒子。本方法具有操作简便,组分比例可控,壳层包 覆完全,粒径均匀、分散性和稳定性好等优点。将制备的 Ag/Au 摩尔比为1:1.6 的 Ag/Au 核壳纳米 粒子作为探针用 RRS 技术测定人血清总蛋白,不仅探针不需修饰,操作简便,选择性和稳定性好,而且 比传统的染料法^[16,17]有更高的灵敏度,其检出限达到 0.36 mg/L,可满足纳克级蛋白质检测的需要。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LS-55 荧光分光光度计(Perkin Elmer, USA), UV-2100 双光束紫外 可见分光光度计(北京瑞利公司), JEOL 2010 EX 高分辨透射电镜(HRT EM, Japan, 工作电压 200 kV)携带 INCA X-sight X-射线能量色散光谱仪(EDX, England); PB-21 型 pH 酸度计(北京赛多利斯仪器系统有限公司); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。考马斯亮蓝 G-250(Amresco 公司), 人免疫球蛋白(IgG, 北京博奥森生物技术有限公司), 人血清白蛋白(HAS, Sigma 公司)。HAuCl4、AgNO3和没食子酸等试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。人血清试样由东北大学医院提供。实验用水为三次蒸馏水。 2.2 Ag/Au 核壳纳米粒子的制备与表征

2.2.1 Ag 纳米粒子晶种的制备 参照文献[18] 制备银纳米粒子晶种: 先将 200 mL 三次蒸馏水置于 三口瓶中,水浴加热至沸,磁力搅拌下依次加入 1.0 mL 0.02 mol/L AgNO₃ 溶液, 1.0 mL 2.7×10⁻² mol/L 没食子酸溶液和 100 mL 2.4×10⁻⁴ mol/L HAuCl4 溶液,溶液很快由无色变为亮黄色,反应 30

* E-mail: xushukun46@126. com

²⁰¹⁰⁻⁰⁷⁻¹⁵ 收稿; 2010-10-08 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20870511)和中央高校基本科研业务费(No. N100405014)资助

^{© 1994-2011} China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

min 后自然冷却,制得 Ag 纳米粒子。室温避光保存,3 个月内无沉淀,颜色未变化。

2.2.2 Ag/Au核壳纳米粒子的制备 取 2.2.1 节制备的 Ag 晶种 50 mL, 加入 150 mL 水, 水浴加热至 沸腾, 磁力剧烈搅拌, 逐滴加入不同体积的 24 mmol/L HA uCl4 及 27 mmol/L 没食子酸溶液, 制备了 Ag/Au 摩尔比分别为 1:0.05, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.5, 1:0.8, 1:1.0 和 1:1.6 的系列复合纳米粒 子。

2.2.3 纳米粒子的表征 紫外-可见吸收光谱(UV-vis):取3mL纳米粒子溶液于1cm石英比色池, 以水为参比进行扫描。HRTEM图像和EDX能谱:将纳米粒子溶液滴加到覆有碳膜的铜网上,自然干燥后,置于HRTEM中成像,同时用电子束聚焦在单个纳米粒子上,分析单个纳米粒子的元素组成及比例。

2.3 Ag/Au HSA的 RRS 光谱

在比色管中依次加入 2.4 mL Ag/Au 核壳纳米粒子, 0.3 mL 0.01 mol/L N aAc HAc 缓冲液, 0.3 mL 不同浓度的 HSA 溶液, 摇匀, 室温下放置 25 m in。用光程为 1 cm 的石英比色池, 在荧光分光光度 计上以 $\Delta \geq 0$ 方式同步扫描(200~ 800 nm) RRS 光谱, 于 $\lambda_m = \lambda_x = 390$ nm 处测定产物的散射光强度 I_{RRS} , $\Delta I_{\text{RRS}} = I_{\text{RRS}} - I_{\text{RRS}}^{0}$ 。以上产物所得散射光强度 I_{RRS} 均为消减至 1% 的测量值。

3 结果与讨论

3.1 Ag/Au核壳纳米粒子的UV-vis吸收光谱

文献[15]报道,在核壳型纳米粒子的合成中,当 Au 包裹在 Ag 纳米粒子外层时, Au 纳米粒子的光谱性质 会随着包裹程度的增加逐渐显示出来,通常表现出 Ag 和 Au 两个等离子共振吸收峰,但是当核纳米粒子表面 形成一层厚度达到 3~4 nm 的壳层时,体吸收带仅显示 出一个吸收峰,表现为壳层金属的特征吸收峰^[19]。如 图 1 所示,当 Ag/Au 摩尔比为 1:0.05 时,其吸收峰与 Ag 纳米粒子的吸收峰峰形相似,仅峰位略有红移,峰强 稍有降低,表明 Au 已开始包裹 Ag 纳米粒子。当 Ag/ Au 摩尔比在 1:0.1~1:0.5 范围内时,吸收峰明显宽 化, Ag 纳米粒子和 Au 纳米粒子的特征吸收带都有吸 收,并随着 Ag/Au 摩尔比的减小,在 Ag 特征吸收区域



图 1 Ag, Au 纳米粒子及不同 Ag/Au 摩尔比下, Ag/Au 核壳 纳米粒子 紫外 可见 吸收光谱(Ag 0.1 mmol/L)

Fig. 1 UV-vis absorption spectra of Ag, Au narroparticles and Ag/Au core/shell nanoparticles with different Ag/Au molar ratios (Ag, 0.1 mmol/L)

的峰高逐渐降低,而在 Au 特征吸收区域的峰高逐渐增大,表明 Au 在进一步地包裹 Ag 纳米粒子。当 Ag/Au 摩尔比在 1:0.8~1:1.6 范围内时,它们在 Au 的特征吸收区域出现一个吸收峰,而属于 Ag 特征吸收区域的吸收峰消失,且随着 Ag/Au 摩尔比的减小,吸收峰位逐渐红移,吸收峰强度不断增强,在 摩尔比为 1:1.6 时,纳米粒子的吸收峰强度在 523 nm 处达到最强,表明此时 Au 已完全包裹在 Ag 纳米粒子表面,此现象与文献[19]一致。此外,随着 Ag/Au 摩尔比的减小,体系的颜色由 Ag 纳米粒子的 黄色逐渐过渡到 Au 纳米粒子的红色,表明 Ag/Au 核壳纳米粒子的形成。这一规律与 Ag/Au 合金纳米粒子的表面等离子吸收特性存在明显差异: Ag/Au 合金纳米粒子仅有一个吸收峰,介于纯银和纯金纳米粒子的吸收峰之间^[20]。

3.2 Ag/Au 核壳纳米粒子的 HRTEM 图和 EDX 分析

由图 2A 可见, 制备的 Ag/Au 复合纳米粒子具有明显的核壳结构, 形貌接近球形, 单分散性较好, 平均粒径为 25 nm, 比反应初期生成的 18 nm 银晶种^{18]} 长大了 7 nm。由图 2B 可知, 单个纳米粒子上含 有 Ag 和 Au 两种元素, 其原子比为 1:1.4, 与其参加反应的 Ag/Au 摩尔比值较接近。结合 UV-vis 吸 收光谱结果, 证实本方法制备的是 Ag/Au 核壳纳米粒子。

3.3 Ag/Au 核壳纳米粒子的 RRS 光谱

如图 3 所示, Ag/Au 核壳纳米粒子在 390 nm 处有最强共振散射峰, 其峰形与 Au 纳米粒子的相似, 表明Au 已完全包裹在 Ag 纳米粒子表面, 且其最大 RRS 强度介于 Au 纳米粒子与 Ag 纳米粒子之,





图 2 Ag/Au 摩尔比为 1: 1.6时 Ag/Au 核壳纳米粒子的 HRTEM 图(A)和 EDX 谱图(B) Fig. 2 High resolution transmission electron microscopyic(HRTEM) image(A) and energy dispersive X ray spectrometry (EDX) analysis result (B) of Ag/Au core/shell nanoparticles with Ag/Au molar ratio of 1: 1.6

间。Ag 纳米粒子和 Ag/Au 核壳纳米粒子的 RRS 强度 为消减至 1% 后的结果, 而 Au 纳米粒子为强度未消减 的测得结果, 所以 Ag 纳米粒子和 Ag/Au 核壳纳米粒 子的实际强度是 Au 纳米粒子的 100 倍以上。可见, 与 Au 纳米粒子相比, Ag/Au 核壳纳米粒子能大幅度地提 高 RRS 光谱的检测信号, 同时又保留了外层 Au 的生物 相容性和光学特性。

3.4 Ag/Au HSA的 RRS 光谱

如图 4 所示, 当 Ag/ Au 核壳纳米粒子与 HSA 结合 后, 其结合产物的散射强度明显增强, 且散射强度随着 HSA 浓度的增加成比例增强, 呈线性关系。这是由于 Ag/ Au 核壳纳米粒子表面吸附的没食子酸还原产物带 负电荷而具有亲水性, 在水溶液中不能形成界面, 但是 当 HSA 包裹在纳米粒子外层通过静电作用形成超分子 聚合物后, 纳米粒子表面的负电荷被大量中和, 与水之 间形成明显界面, 此固 液界面导致了 RRS 光谱增强^[6]。 **3.5** 优化 Ag/ Au 核壳纳米粒子 HSA 体系 RRS 检测条件

由图 5 可见,在 0.01 mol/L NaAc HAc 缓冲体系下, 随着 pH 值的增加, Ag/Au HSA 复合物的 RRS 强度发生 由弱至最强再减弱的明显变化,且在 pH 4.4 时达到最 强。故选择 pH4.4 的 0.01 mol/L NaAc HAc 缓冲溶液 作为酸度介质。固定体系中 HSA 浓度为 0.2 mg/L,当 介质中 NaCl 浓度大于 0.05 mol/L 时,其 RRS 强度随着 NaCl 浓度增大而迅速降低。这是因为所制备的 Ag/Au 核壳纳米粒子呈胶体状态,过高浓度的 Na⁺和 CF 破坏体 系的稳定性,导致粒子凝聚沉淀。故反应体系应控制在 低离子强度下。

在上述优化条件下,反应时间在 25 min 内, Ag/Au 核壳纳米粒子与 HSA 结合反应完全;在反应完成后的 35 min 内,产物的 RRS 强度基本保持不变,表明反应产 物有较好的稳定性,能满足分析操作的要求。

3.6 人血清总蛋白的测定

3.6.1 标准曲线 在最佳实验条件下,测定 Ag/Au 核 壳纳米粒子与不同标准 HSA 浓度的复合物的 RRS 强



图 3 Ag 纳米粒子(A), Ag/Au 摩尔比为 1: 1.6 时 Ag/Au 核壳纳米粒子(B) 和 Au 纳米粒子(C) 的 RRS 光谱

Fig. 3 Resonance Rayleigh scattering(RRS) spec tra of Ag nanoparticles (A), Ag/Au core/shell nanoparticles with Ag/Au molar ratio of 1: 1. 6 (B) and Au nanoparticles (C)



图 4 HSA(A)、Ag/Au 摩尔比为 1: 1.6 时的 Ag/Au 核壳纳米粒子(B)、Ag/Au HSA(0.1 mg/ L, C)、Ag/Au HSA(0.2 mg/L, D) 和 Ag/Au HSA(0.3 mg/L, E)的 RRS 光谱

Fig. 4 RRS spectra of HSA(A), Ag/Au with Ag/Au molar ratio of 1: 1.6(B), Ag/Au HSA(0. 1mg/L, C), Ag/Au HSA(0.2 mg/L, D) and Ag/Au HSA(0.3 mg/L, E)

nal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度, 以 Δ*I* 为纵坐标, HSA 浓度(c, mg/L) 为横坐标绘制标 准曲线。得到一元线性回归方程为 Δ*I* = -0.54+494. 82*C*, 相关系数(r) 为 0.9994, 线性范围是 0.0011~0.35 mg/L, 检出限(3°) 为0.36 ng/L, 相对标准偏差为 2.3% (0.2 mg/L HSA, n= 11)。表明方法有很高的灵敏度。 **3.6.2** 方法的选择性 HSA 浓度为 0.2 mg/L 时, 考察 了常见共存离子和氨基酸对体系 RRS 强度的影响。结果 表明, 体系中 1 × 10⁻⁵ mol/L 的 Ca²⁺, Co³⁺, Li⁺, Na⁺, Mn²⁺, Al³⁺, Mg²⁺, Ag⁺, Zn²⁺ 等 阳 离 子, 1×10⁻⁵ mol/L 的 Cl⁻, NO₃⁻, Γ 等阴离子均不干扰测 定;除了 *L*-半胱氨酸由于含有的巯基与粒子外层的 Au 结 合产生沉淀而干扰测定外, 5.0 mg/L 的氨基丙酸, 甘氨酸, *D*, *L*-甲硫氨酸, *L*-谷氨酸等氨基酸均不干扰测定, 表明方 法有较好的选择性, 能用于实际样品的测定。



图 5 pH 值对 Ag/Aur H SA(0.2 mg/L) RRS 强度的影响

Fig. 5 Effect of pH on RRS intensity of Ag/ Aur HSA(0.2 mg/L)

当各种蛋白质含量相同时,由于蛋白质的氨基酸组成、分子大小以及二级结构的不同会引起共振散 射信号的差异。在最佳实验条件下,以 0.2 mg/L HSA 为标准,检验了几种不同蛋白质的响应差异。 结果表明,牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白和免疫球蛋白(IgG)的响应值分别为 99.0%, 98.3% 和 96. 5%,而牛血红蛋白的响应差异相对较大为 80.4%,可能是部分氨基酸组成或分子大小不同的缘故。在 人血清中人血清白蛋白和免疫球蛋白是主要蛋白,它们的响应值基本一致,因而,本方法可用于测定人 血清中总蛋白的含量。

3.6.3 人血清样品中总蛋白的测定、回收率与显著性检验 在 0.01 mol/L N aAc H Ac 缓冲体系(pH 4.4)下,介质中 NaCl 浓度为 0.05 mol/L,将人血清样品稀释 1000 倍,进行测定。将本方法与经典的考 马斯亮蓝 G-250 法(CBB 法)^[23]进行对照,测定结果及加标回收率(测试液中加入 0.2 mg/L H SA) 见表 1。本方法的 RSD 为 1.5%~ 2.8%,样品平均回收率为 98.2%~ 102.3% 对两种分析方法测定结果的 *F* 检验和 *t* 检验表明,两种分析方法的测定精密度和含量平均值均无显著性差异。

样品 Samples	RRS 方法 RRS m ethod			考马斯亮蓝 G-250 方法 CBB G-250 method	
	测得值 Found (g/L)	RS D (%, n= 5)	回收率 Recovery (%)	测得值 Found (g/L)	RSD (%, n= 5)
样品 1 Sample 1	69.6	2.1	101.1	68.8	1.9
样品 2 Sample 2	79.5	1.5	98.2	78.6	2.3
样品 3 Sample 3	77.4	1.8	102.3	78.2	1.6
样品 4 Sample 4	75.3	2.5	99.4	76.5	2.8

表 1 人血清样品中总蛋白含量的测定

Table 1 Determination of total proteins in human serum samples

实验结果表明,本方法有很高的灵敏度和精密度,较好的选择性和稳定性,不仅可用于血清中微量 蛋白质的测定,也有望用于其它样品如尿液中微量蛋白质的测定。

References

- 1 Wang Y T, Zhao F L, Li K A, Tong S Y. Anal. Chim. Acta, 1999, 396(1): 75~ 81
- 2 Liu S P, Liu Q. Anal. Sci., 2001, 17(2): 239~ 242
- 3 Luo H Q, Liu S P, Li N B, Liu Z F. Anal. Chem. Acta, 2002, 468(2): 275~286
- 4 Liu S P, Zhang Z Y, Luo H Q, Kong L. Anal. Sci., 2002, 18(9): 971~978
- 5 Liu S P, Zhou G M, Liu Z F. Anal. Lett., 1998, 31(7) : 1247~ 1259
- 6 HE Your Qiu, LIU Shao Pu, LIU Zhong Fang, HU Xiao Li, LU Qurr Min(何佑秋, 刘绍璞, 刘忠芳, 胡小莉, 鲁群 岷). Acta Chimica Sinica (化学学报), 2005, 63(11): 997~1002
- 7 WANG Qi, LIU Zhong Fang, LIU Shao Pu(王齐, 刘忠芳, 刘绍璞). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化
 ② 常学报), 2007, 28(5): 837~.842
 ③ 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- 8 Hu X L, Xu D P, Liu S P, Liu Z F, Liu S. Luminescence, 2009, 24(2): 79~83
- 9 Cai H H, Yang P H, Feng J, Cai J Y. Sensors and Actuators B, 2009, 135(2): 603~ 609
- 10 LIN Shao Ming, LI Jian Fu, LIANG Ar Hui, WEN Gur Qing, KANG Car Yan, JIANG Zhr Liang(凌绍明,李建 福,梁爰惠,温桂清,康彩艳,蒋治良). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2010, 30(2): 486~488
- 11 MA Li Na, LIU Diarr Jun, WANG Zherr Xin (马立娜, 刘殿骏, 王振新). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2010, 38(1): 1~7
- 12 Cui Y, Ren B, Yao J L, Gu R A, Tian Z Q. J. Phys. Chem. B, 2006, 110(9): 4002~4006
- 13 Ji X H, Xu S P, Wang L Y, Liu M, Pan K, Yuan H, Ma L, Xu W Q, Li J H, Bai Y B, Li T J. Colloids Surf. A, 2005, 257~258(1): 171~175
- 14 Kaushik M, Madhuri M, Narayan P, Tarasankar P. Nano Letters, 2001, 1(6): 319~322
- 15 CUI Yan, GU Ren Ao(崔颜,顾仁敖). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报), 2005, 26(11): 2090~ 2092
- 16 Vidal E, Palomeque M E, Lista A G, Fernández Band B S. Anal. Bioanal. Chem., 2003, 376(1): 38~41
- 17 Long X F, Liu S P, Kong L, Liu Z F, Bi S P. Talanta, 2004, 63(2): 279~286
- 18 HUANG Yur Ping, XU Shur Kun, WANG Wen Xing, YUAN Jian Pei(黄玉萍, 徐淑坤, 王文星, 员建培). Chinese J. Inorg. Chem. (无机化学学报), 2007, 23(10): 1683~1688
- 19 Chen H M, Liu R S, Jang L Y, Lee J F, Hu S F. Chemical Physics Letters, 2006, 421(1-3) : 118~123
- 20 WANG Werr Xing, HUANG Yur Ping, CHEN Qir Fan, XU Shur Kun, YANG Dong Zhi(王文星, 黄玉萍, 陈启凡,

徐淑坤,杨冬芝). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(8): 1726~1729

Gallic Acid Based Synthesis of Silver/Gold Nanoparticles and Resonance Rayleigh Scattering Detection of Human Serum Proteins

WANG Werr Xing, HUANG Yur Ping, XU Shu Kun*

(College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110004)

Nearly spherical Ag/Au core/shell nanoparticles with good monodispersity and stability Abstract were synthesized in aqueous solution by seed growth method using gallic acid as reductant and stabilizer. High resolution transmission electron microscopic (HRTEM) image and energy dispersive X ray spectrometry (EDX) showed complete coating of gold on the surface of Ag nanoparticles and the presence of Au and Ag in individual nanoparticle with the average size of about 25 nm. The Ag/Au core/ shell nanoparticles with Au/Ag molar ratio of 1:1.6 were used as probes to determine human serum proteins by resonance Rayleigh scattering (RRS) spectrometry. The results indicated that in pH 4.4 NaAcHAc buffer solutions and in the presence of NaCl of 0.05 mol/L, HSA was combined with Ag/Au core/shell nanoparticles to form stable complex. The enhanced resonance scattering intensity at 390 nm ($\Delta I_{390 \text{ m}}$) was linear to HSA concentration in the range of 0.0011– 0.35 mg/L, with the regress equation of $\Delta I_{390 \text{ nm}} = -0.54 + 494.82C(r = 0.9994)$ and the detection limit of 0.36 mg/L. Co-existing metal ions and amino acids excepting L-cysteine did not interfere with the detection, indicating the assay is of good selectivity. The assay was applied to the detection of total proteins in human serum, with a RSD of 2.3% and the recovery range of 98.2% - 102.3%, and the results were in a good agreement with that of Coomassie brilliant blue G-250 assay.

Keywords Silver/gold core/shell nanoparticles; Gallic acid; Resonance Rayleigh scattering spectrometry; Human serum proteins

(Received 15 July 2010; accepted 8 October 2010)