

# 金纳米微粒作探针共振瑞利散射 光谱法测定亚甲蓝

鲁群岷, 何佑秋, 刘绍璞, 刘忠芳

(西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

**摘要** 在 pH 为 6.5~9.5 的中性或弱碱性介质中, 金纳米微粒可与亚甲蓝 (MB) 阳离子靠静电引力及疏水作用力结合, 形成粒径较大的聚集体 (平均粒径从 12 nm 增至 20 nm), 这种聚集体的形成导致共振瑞利散射 (RRS) 强度显著增强, 最大散射峰位于 371 nm. 在适当条件下, 散射强度 ( $I$ ) 与亚甲蓝浓度成正比. 该法具有高灵敏度, 将金纳米微粒作为测定亚甲蓝的高灵敏 RRS 探针, 对亚甲蓝的检出限为 21.17 ng/mL, 该法简便, 快速, 且有较好的选择性, 可用于血液中亚甲蓝的测定.

**关键词** 金纳米微粒; 共振瑞利散射光谱; 亚甲蓝

**中图分类号** O657

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)05-0849-04

亚甲蓝 (MB) 是一种吩噻嗪类染料, 也是一种杀菌解毒药, 因为其可与 SARS 病毒类的 RNA 包膜病毒具有很高的亲和力, 而且理化性质、生物安全属性、生物学和毒理学研究背景清楚, 可在 MB 光化学法中作为光敏剂杀灭 RNA 包膜病毒, 为传染病病毒病原体的体外灭活开辟了一条新途径<sup>[1,2]</sup>, 因此, 近年来在光敏灭活病毒方面得到越来越广泛的应用<sup>[3,4]</sup>. 但残留的 MB 有致突变的可能<sup>[5]</sup>, 故痕量 MB 的测量显得更加重要. 但目前 MB 的痕量分析较少<sup>[6]</sup>, 因此发展新的简便、快速的高灵敏测定 MB 的方法是一个值得研究的课题. 共振瑞利散射 (RRS) 是近几年来发展起来的新技术, 由于具有高灵敏度和简易性而受到广泛关注, 研究工作日益增多, 目前已在核酸<sup>[7]</sup>、蛋白质<sup>[8]</sup>和多糖<sup>[9]</sup>等生物大分子及无机离子<sup>[10-12]</sup>、有机物<sup>[13]</sup>和药物<sup>[14]</sup>分析中得到广泛的应用.

近年来, 金纳米微粒作为光学探针和化学与生物传感器的分析应用已引起了人们的关注<sup>[15-17]</sup>. 研究表明, 在柠檬酸盐介质中, 柠檬酸根阴离子靠静电引力自组装于金纳米微粒的表面, 使整个金纳米微粒成为带负电荷的超分子化合物. 此时一价阳离子 MB<sup>+</sup> 能靠静电引力和疏水作用力与金纳米微粒结合, 形成体积较大的聚集体, 从而导致 RRS 强度的急剧增强, 故该方法具有很高的灵敏度和较好的选择性, 可用于痕量 MB 的测定. 本文研究了金纳米-亚甲蓝体系 RRS 的光谱特征和适宜的反应条件, 对反应机理进行了初步讨论, 并进行了分析应用.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

质量分数分别为 1.0% 氯金酸 ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 上海试剂一厂) 溶液, 1.0% 的柠檬酸钠溶液, 1.0% 的鞣酸溶液; 30.0  $\mu\text{g/mL}$  亚甲蓝 (Methylene blue, 简称为 MB, 北京化工厂) 标准溶液. Britton-Robinson 广泛缓冲溶液 (简称 BR 缓冲溶液).

Hitachi F-2500 型荧光分光光度计 (日本岛津), 狭缝宽度 5 nm; UV-8500 型紫外-可见分光光度计 (香港天美公司); H-600 型透射电子显微镜 (日本电子株式会社).

### 1.2 实验方法

利用鞣酸-柠檬酸钠还原法<sup>[18]</sup> 制备出 12 nm 左右的金纳米微粒溶液, 此时 Au 的质量浓度为

收稿日期: 2005-07-04

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20475045) 资助.

联系人简介: 刘绍璞 (1940 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事分子光谱分析研究. E-mail: liusp@swnu.edu.cn

47.8  $\mu\text{g/mL}$ . 在 10 mL 比色管中依次加入 2.0 mL 金纳米微粒溶液、1.0 mL pH = 8.0 的 BR 缓冲溶液和一定量的亚甲蓝溶液, 用水稀释至刻度并摇匀, 放置 15 min 后, 于荧光分光光度计上以  $\theta_{\text{in}} = \theta_{\text{ex}}$  方式进行同步扫描, 可得到共振瑞利散射光谱, 于  $\theta_{\text{in}} = \theta_{\text{ex}}$  处测定产物溶液的散射光强度  $I_{\text{RRS}}$  和试剂空白的散射强度  $I_{\text{RRS}}^0$  ( $I_{\text{RRS}} = I_{\text{RRS}} - I_{\text{RRS}}^0$ ).

## 2 结果与讨论

### 2.1 金纳米微粒及其与亚甲蓝结合产物的形貌和粒径

用透射电子显微镜 (TEM) 观测了金纳米微粒及其与亚甲蓝结合产物的形貌和粒径. 结果如图 1 所示. 从图 1(A) 可看出, 按实验方法制备的红色金纳米微粒尺寸均匀、分散并基本上呈球形, 其平均粒径为 (12.0  $\pm$  0.5 nm) 左右. 当与亚甲蓝作用形成紫色产物时 [图 1(B)], 亚甲蓝聚集于金胶表面, 导致反应物的粒径增大至 20 nm 左右, 其形貌仍呈均匀分散的球形, 说明染料在金胶表面聚集后, 只增大了体积, 而未改变金纳米微粒的形貌.

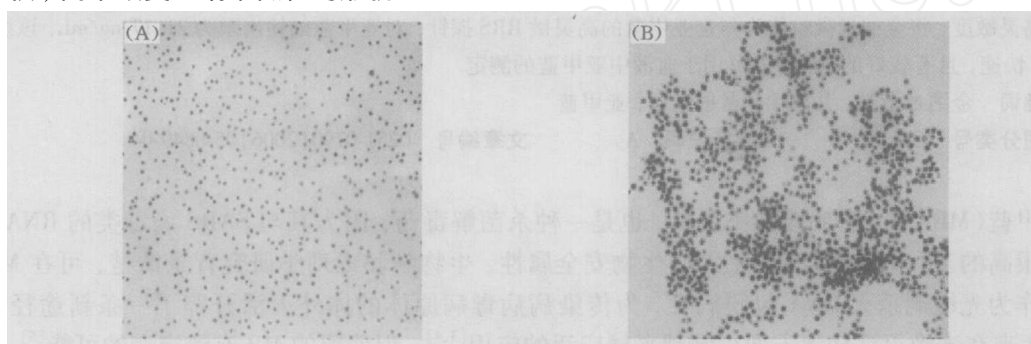


Fig 1 TEM images of gold nanoparticle and the binding product with MB ( $\times 60\ 000$ )

(A) Gold nanoparticle ( $d = 12$  nm); (B) supramolecular compound of Au-MB ( $d = 20$  nm).

### 2.2 共振瑞利散射光谱

金纳米微粒、亚甲蓝溶液和两者结合的产物的 RRS 光谱如图 2 所示. 从图 2 中可以看出, 单独的亚甲蓝溶液的 RRS 十分微弱, 而金纳米微粒本身有一定的 RRS 强度, 其最大散射波长位于 368 nm, 当金纳米微粒与亚甲蓝结合, 形成新的超分子化合物后, 散射强度急剧增强, 最大散射波长位于 371 nm, 另在 280 及 510 nm 处有两个较小的散射峰. 并且在最大散射波长处和适当条件下, 散射强度随亚甲蓝浓度的增大成比例增强.

### 2.3 适宜的反应条件

2.3.1 溶液酸度的影响 实验结果表明, 当用 BR 缓冲溶液作为介质时, 反应的最佳 pH 范围在 6.5 ~ 9.5, 且在 pH = 4.0 ~ 10.0 之间散射强度变化不大, 因而反应有宽松的酸度范围. 且由于 BR 缓冲溶液的适宜用量范围是 0.8 ~ 1.5 mL, 故以下实验均加入 1.0 mL pH = 8.0 的 BR 缓冲溶液.

2.3.2 金纳米溶液用量的影响 适宜的金纳米溶液用量为 1.5 ~ 3.0 mL (金的质量浓度为 7.17 ~ 14.34  $\mu\text{g/mL}$ ). 金的质量浓度不足和过量均会导致 RRS 强度降低. 故实验选用加入试剂的用量为 2.0 mL.

2.3.3 显色速度及稳定时间 室温下体系在 15 min 后反应完全, 并且在 5 h 内  $I$  值基本不变, 故实验选在 15 min 后测定.

2.3.4 有机溶剂的影响 研究了乙醇及丙酮等极性有机溶剂对反应体系 RRS 强度的影响. 当在反应

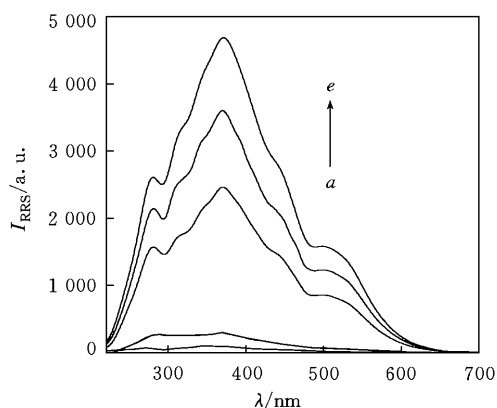


Fig 2 RRS spectra

a MB (3.00  $\mu\text{g/mL}$ ); b Au; c Au-MB (1.50  $\mu\text{g/mL}$ ); d Au-MB (2.25  $\mu\text{g/mL}$ ); e Au-MB (3.00  $\mu\text{g/mL}$ ). Au (9.56  $\mu\text{g/mL}$ ), pH = 8.0.

体系中加入乙醇或丙酮等有机溶剂时,体系的红紫色逐渐消失,当加入量达到 1 mL时,共振瑞利散射强度显著降低.这可能是由于金纳米微粒与亚甲蓝形成新的超分子化合物时,它们的电荷被中和后具有强的疏水性,从而能与水形成界面.这种界面有利于 RRS的增强,但在有机溶液的存在下这种界面消失,导致 RRS值的降低.

#### 2.4 金纳米微粒与 MB的结合作用对 RRS的影响

金纳米微粒与亚甲蓝相互作用能形成三层结构的超分子复合物,即中间为金纳米内核,外层为亚甲蓝,中间的柠檬酸根起着一种“桥”的作用.结合产物具有更大的体积,其粒径从金纳米微粒的 12 nm增至 20 nm左右.它不仅会导致 RRS的显著增强,而且还可观察到新的 RRS光谱.

金纳米微粒与亚甲蓝的结合作用使 RRS增强的主要原因可能在于:(1)金纳米微粒与 MB结合产物的最大 RRS波长在 371 nm处,位于金纳米微粒的吸收带中,因此可能产生一种共振增强的散射效应,从而使 RRS增强.(2)由于结合产物之间相互作用生成了粒径更大的聚集体,散射微粒体积的增大将导致散射强度增大;(3)反应前,带负电荷的金纳米微粒和带正电荷的 MB阳离子均易溶于水,不能与水形成界面,而结合产物形成后,电荷被中和,且复合物的外围是疏水性的吩噻嗪芳环骨架,因此能与水之间形成界面,这种界面增强的散射效应,对于 RRS增强也有一定的贡献.

通过研究 MB和 MB-Au的热力学性质发现,在 298.2 K和  $1.01 \times 10^5$  Pa时,MB和 MB-Au的焓分别为 -3 103 866.10和 -5 097 198.21 kJ/mol,熵分别为 29.09和 56.67 J/(mol·K).用  $G_0 = H_0 - T S_0$ 公式计算可得出  $G_0 = -185 113.26$  kJ/mol,根据  $G_0$ 判断亚甲蓝与金纳米微粒结合的过程是自发进行的.

### 3 分析应用

#### 3.1 标准曲线

按照实验方法在最佳条件下得到一元线性回归方程:  $I = -23 + 1247c$ ,相关系数  $r=0.9991$ ,线性范围为 0.071~3.000  $\mu\text{g/mL}$ ,该方法的灵敏度高,对于 MB的检出限(3 $\sigma$ )为 21.17 ng/mL.分别对 1.50和 0.75  $\mu\text{g/mL}$ 的 MB体系平行测定 5次,求得其相对标准偏差(RSD,%)各为 0.5%和 0.7%.

#### 3.2 共存物质的影响

按实验方法考察了一些常见金属离子、非金属离子和糖类以及氨基酸的影响,结果发现,1 200倍量的  $\text{Mn}^{2+}$ 、尿素、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ ,500倍量的  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 及葡萄糖,300倍量的  $\text{Al}^{3+}$ 及  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,200倍量的  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Br}^-$ 及乳糖,100倍量的麦芽糖、 $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 及  $\text{Pb}^{2+}$ ,10倍量的 L异白氨酸、甘氨酸、烟酸和 D,L半胱氨酸等不干扰测定.可见,除了氨基酸的允许量较低外,其它常见的金属离子、非金属离子和糖类的允许量都比较大.说明该体系具有较好的选择性,可用于实际样品的测定.

#### 3.3 血清中亚甲蓝的测定

按实验方法<sup>[18]</sup>各测定了 3份人血清样品,结果列于表 1.由表 1可见,相对标准偏差均在 0.5%~1.1%范围内,准确度高.平均回收率为 98.8%~102.0%.故该方法可用于临床亚甲蓝血药浓度的监测和药代动力学的研究,为患者个体间和个体自身的变化制定合理用药方案提供了有价值的参考.

Table 1 Results for the determination of serum samples (n=5)

No	(Added) / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	(Found) / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Recovery (%)	RSD (%)
1	0.10	0.101	101.0	0.8
2	0.50	0.494	98.8	1.1
3	1.00	1.020	102.0	0.5

### 参 考 文 献

- [1] Drost C., Gunther S., Preiser W. et al. N. Engl. J. Med [J], 2003, 348(20): 1967—1976  
 [2] HUANG Qing(黄庆), FU WeiLing(府伟灵), CHEN Bin(陈斌) et al. Chin. J. Nosocomiol(中国医院感染学杂志) [J], 2004, 14(1): 54—59

- [ 3 ] Zhang L. Z., Tang G. Q. . J. Photochem. Photobiology, B[J], 2004, **74**(2/3): 119—125
- [ 4 ] Wainwright M., Crossley K. B. . J. Chemother[J], 2002, **14**(5): 431—443
- [ 5 ] Wagner S. J., Cifone M. A., Murli H. *et al.* Transfusion[J], 1995, **35**(5): 407—410
- [ 6 ] MA Yu(马 育), YANG Xiao-Lan(杨晓兰), SHANG Jing-Chuan(尚京川) *et al.* Chin. J. Pharm. Anal (药物分析杂志) [J], 2002, **22**(5): 380—383
- [ 7 ] LU Shao-Pu(刘绍璞), HU Xiao-Li(胡小莉), LUO Hong-Qun(罗红群) *et al.* Sci China, Ser B(中国科学, B辑) [J], 2002, **32**(1): 18—26
- [ 8 ] WANG Ya-Ting(王亚婷), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), LI Ke-An(李克安) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2000, **21**(10): 1491—1497
- [ 9 ] Liu S. P., Luo H. Q., Li L. B. *et al.* Anal. Chem. [J], 2001, **26**(6): 3907—3914
- [ 10 ] LU Shao-Pu(刘绍璞), LU Zhong-Fang(刘忠芳). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 1996, **17**(8): 1213—1215
- [ 11 ] LU Shao-Pu(刘绍璞), ZHOU Guang-Ming(周光明), LU Zhong-Fang(刘忠芳) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 1998, **19**(7): 1040—1044
- [ 12 ] YANG Zhuo(杨 卓), LU Shao-Pu(刘绍璞), LU Zhong-Fang(刘忠芳) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2004, **25**(6): 1040—1042
- [ 13 ] HE You-Qiu(何佑秋), LU Shao-Pu(刘绍璞), LU Zhong-Fang(刘忠芳) *et al.* Acta Chimica Sinica(化学学报) [J], 2005, **63**(11): 997—1002
- [ 14 ] Lin S. Y., Liu S. W., Lin C. M. *et al.* Anal. Chem. [J], 2002, **74**(2): 330—335
- [ 15 ] Mirkin C. A., Letsinger R. L., Mucic R. C. *et al.* J. Nature[J], 1996, **382**(6592): 607—609
- [ 16 ] Nath N., Chilkoti A. . Anal. Chem. [J], 2002, **74**(3): 504—509
- [ 17 ] ZHAO Hong-Qiu(赵红秋), LN Lin(林 琳), TANG Ji-An(唐季安). Chinese Science Bulletin(科学通报) [J], 2001, **46**(4): 292—296
- [ 18 ] HU Xiao-Li(胡小莉), LU Shao-Pu(刘绍璞), LUO Hong-Qun(罗红群). Acta Chimica Sinica(化学学报) [J], 2003, **61**(8): 1287—1293

## Resonance Rayleigh Scattering Spectral Method for Determination of Methylene Blue with Gold Nanoparticle as Probe

LU Qun-Min, HE You-Qiu, LU Shao-Pu<sup>\*</sup>, LU Zhong-Fang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract** In a neutral or weak alkaline medium (pH = 6.5—9.5), the gold nanoparticle can combine with methylene blue by the virtue of electrostatic and hydrophobic interaction, forming aggregate with bigger diameters (average diameter increase from 12 to 20 nm). The aggregate arouse Resonance Rayleigh Scattering (RRS) intensity enhancing greatly. The maximum scattering peaks are at 371 nm. Under optimum conditions, there is a linear relationship between scattering intensity ( $I$ ) and the concentration of methylene blue. This method has a high sensitivity. So gold nanoparticle can be used as the RRS probe of high sensitivity for methylene blue. The detection limit of methylene blue is 21.17 ng/mL. The method which is simple and rapid has good selectivity. It was successfully applied to the detection of methylene blue in clinic serum samples

**Keywords** Gold nanoparticle; Resonance Rayleigh scattering spectrum; Methylene blue

(Ed: A, G)