

# 基于高荧光蛋白保护的金纳米簇检测硝基苯

陶丽霞 王永平 张宝倩 刘晨 张聪 岳巧丽

(聊城大学 化学化工学院, 山东 聊城 252059)

**摘要** 硝基苯是重要的化工原料,对人体健康有着严重影响,因此具有良好光学性能的传感器的发展是极为重要的.由亚纳米级规模构成的金纳米团簇由于其理想的光性能和电性能目前成为了研究领域的热点之一.在本实验中,硝基苯对基于牛血清白蛋白保护金纳米簇有着明显的猝灭作用,具有较高的灵敏度和良好的选择性,可应用于对硝基苯的检测.

**关键词** 金纳米簇;牛血清白蛋白;荧光光谱;紫外光谱;硝基苯

**中图分类号** O611.6

**文献标识码** A

## 0 引言

硝基苯(NB)广泛用于生产染料,药物,苯胺和溶剂的化学过程中<sup>[1]</sup>.由于工业中大量使用硝基芳烃而引起关注,主要原因是这些污染物在废水中的持续存在且会对人类健康产生的毒理学影响<sup>[2]</sup>.因此,许多国家将硝基苯列为优先污染物,并且由于它具有致突变性,顽固性和在环境中积累的倾向<sup>[3]</sup>.政府对环境中的NB浓度提出了严格的限制,例如:美国为 17  $\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[4]</sup>,中国为 20  $\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[5]</sup>.目前,广泛应用于溶液中硝基芳香族化合物的测定检测方法有很多,如电化学方法、气相色谱联用法和金属-有机骨架传感等.<sup>[6-8]</sup>然而这些检测方法大都易受到环境影响,检测线略高或者需用到含毒性的  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>[8]</sup>.

在本实验中,我们利用牛血清白蛋白(BSA)为模板合成了一种荧光金纳米簇(AuNCs)作为传感器用于检测硝基苯.基于牛血清白蛋白保护的纳米金簇具有高灵敏度、高选择性、低毒性以及水溶性好等的优点,广泛应用于分析及生物成像<sup>[9-13]</sup>.本实验是基于金纳米簇的荧光效应,硝基苯可使作为荧光探针的 AuNCs 的荧光猝灭.在最佳实验条件下,相对荧光猝灭强度与硝基苯浓度之间存在良好线性关系,其检测范围为 0.2 到 1  $\mu\text{M}$ ,检测限可低至 0.01  $\mu\text{M}$ .该方法简单,有效,可靠,有着很好的应用前景.

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器和试剂

F-320 荧光分光光度计,UV-2550 紫外分光光度计,J-810 圆二色谱仪,JEOL-2100 透射电子显微镜,ZF-6 型三用紫外线分析仪,TGL-16B 台式离心机,KQ5200 型超声清洗器,牛血清白蛋白溶液(BSA),四氯金酸溶液,氢氧化钠,硝基苯,邻苯二酚,间苯二酚,水杨酸,邻苯二甲酸氢钾,2,6-吡啶二羧酸,苯甲酸,对氨基苯甲酸,对甲苯胺,甲苯,无水乙醇,磷酸盐缓冲液.

### 1.2 金纳米簇的合成

将所有玻璃仪器用新鲜配制的王水( $V_{\text{浓硝酸}}:V_{\text{浓盐酸}}=1:3$ )浸泡 30 min,清洗干净.打开磁力控温搅拌器,预热至 37  $^{\circ}\text{C}$ .分别将 15 mL,10 mM 牛血清白蛋白、15 mL,10 mM 四氯金酸溶液置于干净的试管,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下恒温后,转移至 50 mL 圆底烧瓶中混合均匀,2 min 后加入 1.5 mL 氢氧化钠溶液剧烈搅拌,37  $^{\circ}\text{C}$ ,12 h 后形成金纳米簇.将合成的金纳米簇透析后,存放于干净棕色试剂瓶中 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用.

收稿日期:2018-11-06

基金项目:国家自然科学基金项目(91543206),山东省自然科学基金项目(ZR2014BQ017,ZR2015BM024,2013SJJGZ07),山东省泰山学者研究基金和聊城大学研究基金资助

通讯作者:岳巧丽,女,汉族,博士,副教授,研究方向:新型纳米生物传感方法与器件,E-mail:yueqiaoli@lcc.edu.cn.

## 2 结果与讨论

### 2.1 光谱图

金纳米簇的吸收光谱如图 1(a)所示. 从 BSA 金簇原液的紫外吸收谱中可看出在 450-500 nm 间有一吸收峰图 1(a), 从 BSA 的吸收光谱中观察到在 275 nm 处有色氨酸的吸收峰如图 1(b), 从金纳米簇的激发和发射光谱可得知最佳激发波长为 470 nm, 最佳发射为 640 nm, 如图 1(d). 以及在紫外灯(365 nm)和日光灯下分别照射金纳米簇, 可看出我们合成的纳米簇发强红光.

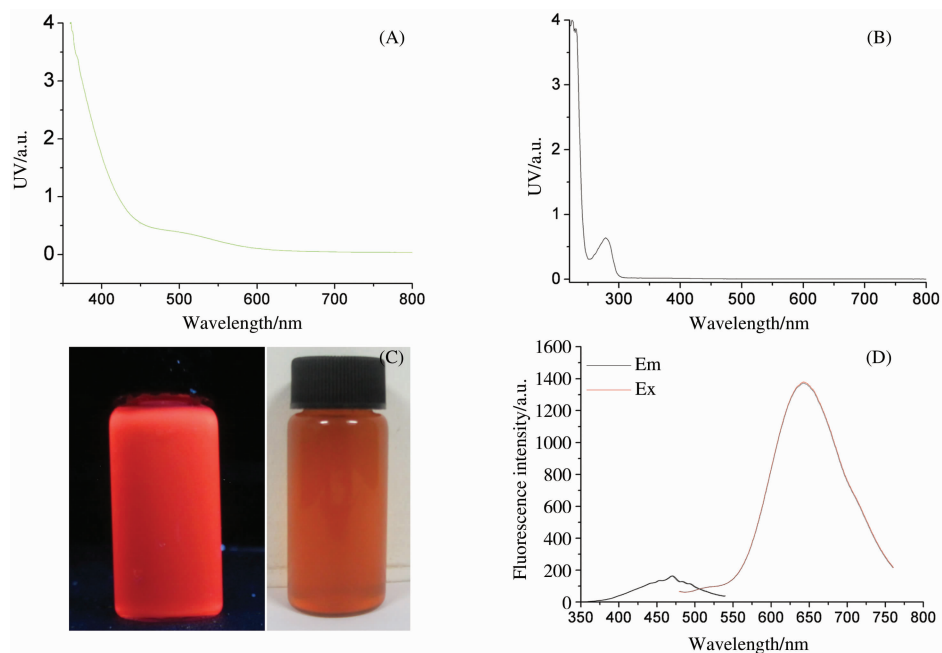


图 1 金纳米簇紫外吸收光谱(a)、BSA 的紫外光谱(b)、金簇在日光灯与紫外灯下对比图(c)、发射光谱 Em(d)

### 2.2 TEM 与 XPS 能谱

将分散均匀的金纳米簇, 滴在铜网上晾干, 图 2(a)所示其 TEM 图像. 纳米金簇的 XPS 结果, 如图 2(b)所示, 可以解卷积为分别以  $\text{Au}^0$  (83.4 eV) 和  $\text{Au}^{1+}$  (85.0 eV) 为中心的两个组分, 这与之前报道的 AuNCs 具有良好的一致性<sup>[14]</sup>.

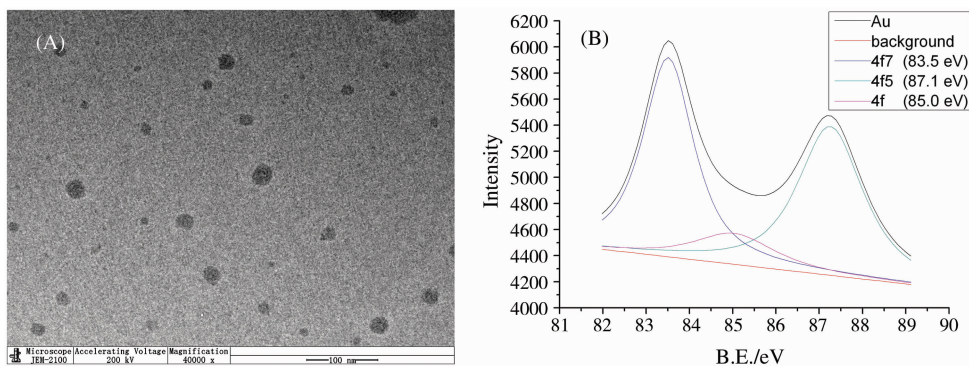


图 2 AuNCs 的 TEM 图像(a), XPS 能谱(b)

### 2.3 荧光寿命与量子产率

为确定硝基苯对金纳米簇的猝灭机制, 研究了 BSA-AuNCs 荧光寿命的变化如图 3(a). 不同于荧光寿命不变的一般静态猝灭机制<sup>[15]</sup>, 在本实验工作中, 金纳米簇的荧光衰减时间从 18.1  $\mu\text{s}$  减少到 16.7  $\mu\text{s}$ , 荧光寿命缩短, 可判断出此为动态猝灭. 为了计算 BSA-AuNCs 的量子产率(QY), 使用罗丹明 B 溶液作为参比的标准对比方法如图 3(b). QY(绝对值)的计算根据等式进行

$$QY = QY_r \frac{m n^2}{m_r n_r^2},$$

其中  $n$  是折射率,  $m$  是积分发光强度与吸光度曲线的斜率,  $r$  后缀表示参考罗丹明 B 溶液. 用相同的溶液分别同时测量紫外吸光度和荧光发光强度. 标准 ( $QY_r$ ) 的量子产率为 0.89, 溶剂 (水) 的折射率为 1.33.

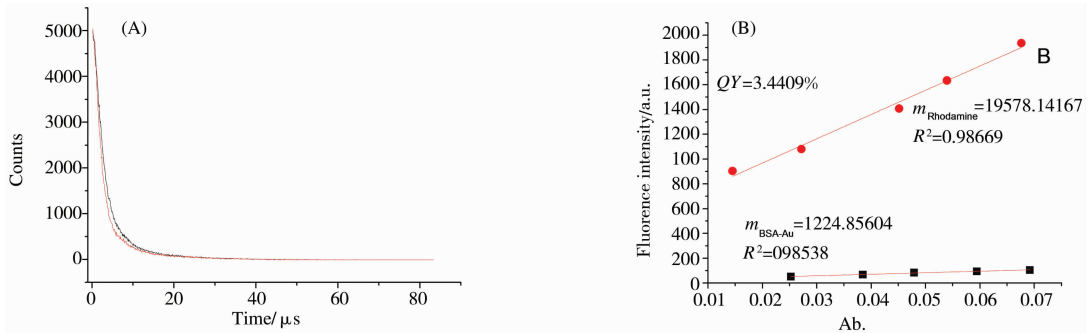


图3 BSA-AuNCs 的荧光寿命(a), BSA-AuNCs 的荧光量子产率(QY)(b)

## 2.4 荧光光谱

2.4.1 不同激发波长下金纳米簇的发射光谱. 通过 410-470 nm 激发波长下的发射光谱如图 4(a) 可以看出, 最大发射波长位置变化不明显, BSA-AuNCs 的荧光强度随着激发波长的增大逐渐增强; 470-540 nm 激发波长下的激发光谱如图 4(b) 中, 金纳米簇的荧光强度随着激发波长的增大逐渐减弱, 最大发射波长位置变化也并不明显. 同时也可看出 470 nm 为最佳激发波长, 640 nm 处为最佳发射波长.

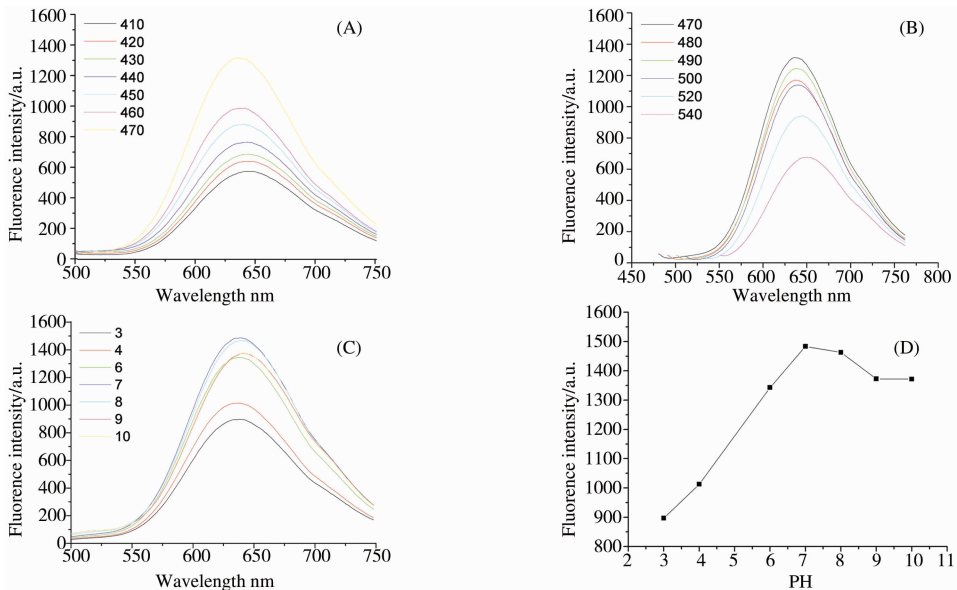
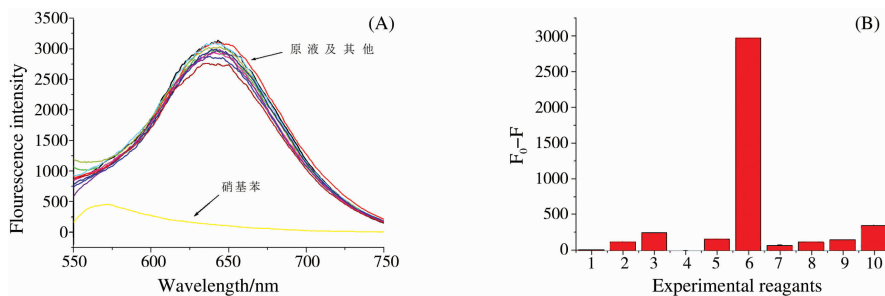


图4 不同激发波长下金纳米簇的发射光谱(a、b)不同 pH 下的发射光谱(c)及变化曲线(d)

2.4.2 金纳米簇在不同 pH 下的发射光谱. 固定最佳激发波长 470 nm, 扫描在不同 pH 下金纳米簇的荧光强度, 随着 pH 的增大而逐渐增强, pH=7 时达到最大值, 而后随 pH 的增大开始逐渐减弱, 因而选用 pH=7 为 pH 的最优条件, 如图 4(c、d) 所示.

## 2.5 选择性

为检测对比合成 BSA-AuNCs 是否对硝基苯具有良好的选择性, 如图 5, 除了 6 号试剂硝基苯外, 分别加入其他试剂: 邻苯二酚, 间苯二酚, 水杨酸, 邻苯二甲酸氢钾, 2,6-吡啶二羧酸, 苯甲酸, 对氨基苯甲酸, 对甲苯胺, 甲苯和不加任何试剂所测得的最大荧光强度差值 ( $F_0 - F$ ), 而加入硝基苯后的最大荧光强度变化值最明显, 这表明金纳米簇的荧光有选择性检测硝基苯.

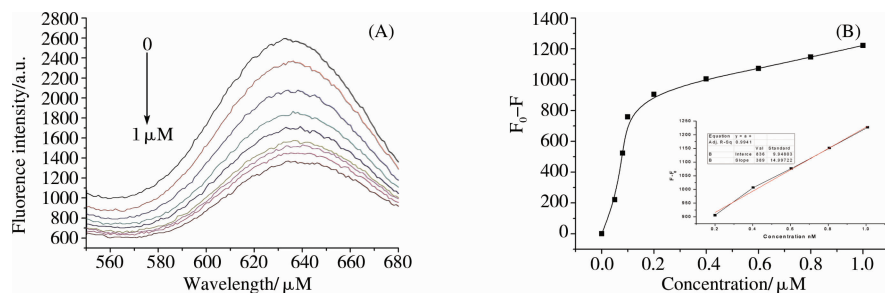


注:1:甲苯,2:对甲苯胺,3:水杨酸,4:邻苯二甲酸氢钾,5:2,6-吡啶二羧酸,6:硝基苯,7:苯甲酸,8:对氨基苯甲酸,9:间苯二酚,10:邻苯二酚。

图 5 金纳米簇的荧光强度的选择性

## 2.6 传感器的工作曲线

调控金纳米簇的浓度和 pH,在最优条件下,分别加入一系列不同浓度的硝基苯溶液.测量不同浓度硝基苯的金纳米簇的荧光光谱,可观察到随着硝基苯浓度的增加荧光信号逐渐降低,绘制标准工作曲线,如图 6 所示。



注:(a)工作曲线(b)线性方程为  $Y = 9.95X + 14.99$ ,  $R_2$  为 0.9941。

图 6 加入硝基苯后荧光强度降低

## 3 结论

本文通过一锅合成法简单制备了金纳米团簇,并对其进行了表征,金纳米簇在 470 nm 附近有最佳激发峰;并在此波长下激发,在 640 nm 处有最大发射波长.在本实验中硝基苯可使作为荧光探针的 AuNCs 发生荧光猝灭.在最佳实验条件下,相对荧光猝灭强度与硝基苯浓度之间存在良好线性关系,在 0.2 到 1  $\mu\text{M}$  的检测范围内,检测限可低至 0.01  $\mu\text{M}$ .该方法简单、有效、可靠、有着很好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Wang A J, Cheng H Y, Liang B, et al. Efficient reduction of nitrobenzene to aniline with a biocatalyzed cathode[J]. Environ Sci Technol, 2011, 45: 10186-10193.
- [2] Zhu L, Ma B, Zhang L, et al. The study of distribution and fate of nitrobenzene in a water/sediment microcosm[J]. Chemosphere, 2007, 69: 1579-1585.
- [3] Spain J C. Biodegradation of nitroaromatic compounds[J]. Annu Rev Microbiol, 1995, 49: 523-555.
- [4] US Environmental Protection Agency Office of water[S]. National Recommended Water Quality Criteria, 2004.
- [5] 地表水环境质量标准[S]. GHZB1-1999, 中国, 1999.
- [6] Kariuki V M, Fasih-Ahmad S A, Osonga F J, et al. An electrochemical sensor for nitrobenzene using  $\pi$ -conjugated polymer-embedded nanosilver[J]. Analyst, 2016, 141: 2259.
- [7] Chapman G M, Bravo R, Stanelle R D, et al. Sensitive and selective gas chromatography-tandem massspectrometry method for the detection of nitrobenzene in tobaccosmoke[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1565: 124-129.
- [8] Sun L, Xing H, Xu J, et al. A novel (3,3,6)-connected luminescent metal-organic framework for sensing of nitroaromatic explosives[J].

Dalton Transactions, 2013, 42: 5508.

- [9] Chang H C, Ho J A, et al. Gold Nanocluster-Assisted fluorescent detection for hydrogen peroxide and cholesterol based on the Inner filter effect of gold nanoparticles[J]. Anal Chem, 2015, 87: 10362-10367.
- [10] Xing H, Zhang X, Zhai Q, et al. Bipolar electrode based reversible fluorescence switch using prussian blue/Au nanoclusters nanocomposite film[J]. Anal Chem, 2017, 89: 3867-3872.
- [11] Zhai Q, Xing H, Zhang X, et al. Enhanced electrochemiluminescence behavior of gold-silver bimetallic nanoclusters and Its sensing application for mercury(II)[J]. Anal Chem 2017, 89: 7788-7794.
- [12] Sheng J, Jiang X, Wang L, et al. Biomimetic mineralization guided one-pot preparation of gold clusters anchored 2D MnO<sub>2</sub> nanosheets for fluorometric/magnetic bimodal sensing[J]. Anal Chem 2018, 90: 2926-2932.
- [13] Biswas A, Banerjee S, Garg, E V, et al. Gold nanocluster containing polymeric microcapsules for intracellular ratiometric fluorescence biosensing[J]. ACS Omega, 2017, 2: 2499-2506.
- [14] Zhuang M, Ding C Q, Zhu A W, et al. Ratiometric fluorescence probe for monitoring hydroxyl radical in live cells based on gold nanoclusters[J]. Anal Chem, 2014, 86: 1829-1836
- [15] Jin L H, Shang L, Guo S J, et al. Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26: 1965-1969

## Detection of Nitrobenzene by Gold Nano-clusters based on High Fluorescent Protein Protection

TAO Li-xia   WANG Yong-ping   ZHANG Bao-qian

LIU Chen   ZHANG Cong   YUE Qiao-li

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract** Nitrobenzene, an essential chemical raw material, has a severe impact on human health. Therefore, the development of sensors with good optical properties to detect nitrobenzene is extremely important. Additionally, gold nanoclusters composed of sub-nanometer scales have become one of the hotspots in the research field due to their ideal optical and electrical properties. In this experiment, the gold nanoclusters which based on bovine serum albumin have evidently quenched by nitrobenzene. In conclusion, it can be utilized to the detection of p-nitrobenzene, with high sensitivity, good selectivity and reproducibility.

**Key words** gold nanoclusters; bovine serum albumin; fluorescence spectrum; ultraviolet spectrum; nitrobenzene.