

基于4-巯基苯甲酸/多肽修饰金纳米粒子的表面增强拉曼光谱传感器快速检测水中 Ag^+ 含量

容培森, 李 皓, 高汉铭, 许庆鹏*

(广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300)

摘要: **目的** 建立4-巯基苯甲酸/多肽修饰金纳米粒子修饰的表面增强拉曼光谱 (surface enhanced Raman spectroscopy, SERS) 传感器快速检测水中的 Ag^+ 。**方法** 通过特异性的 Ag^+ 多肽识别序列(RFPRGGDD)和4-巯基苯甲酸的结合, 构建了 Ag^+ 表面增强拉曼光谱传感器, 使用便携式拉曼光谱仪读取数据。**结果** 在10~850 nmol/L的浓度范围内线性关系较好, 相关系数(r^2)为0.98345, 检出限为36 pmol/L, 加标回收率为95.28%~102.9%, 相对标准偏差在0.79%~3.73%。**结论** 该方法响应速度快、选择性好、检出限低, 适用于现场快速检测水中的 Ag^+ 。**关键词:** 金纳米粒子; 表面增强拉曼光谱法; Ag^+ ; 便携式拉曼仪

Rapid detection of Ag^+ in water by surface-enhanced Raman spectroscopy sensor based on 4-mercaptobenzoic acid/polypeptide modified gold nanoparticles

RONG Pei-Sen, LI Hao, GAO Han-Ming, XU Qing-Peng*

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

ABSTRACT: Objective A 4-mercaptobenzoic acid/polypeptide-modified gold nanoparticle modified surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) sensor was developed for rapid detection of Ag^+ in water. **Methods** A Ag^+ surface enhanced Raman spectroscopy sensor was constructed by combining a specific Ag^+ peptide recognition sequence (RFPRGGDD) with 4-mercaptobenzoic acid, and data was read using a portable Raman spectrometer. **Results** In the concentration range of 10~850 nmol/L, the linear relationship was good, the correlation coefficient (r^2) was 0.98345, the limit of detection was 36 pmol/L, the standard recoveries were 95.28%~102.9%, and the relative standard deviations were 0.79%~3.73%. **Conclusion** The method has high response speed, good selectivity and low detection limit, and is suitable for rapid detection of Ag^+ in water.

KEY WORDS: gold nanoparticles; surface enhanced Raman spectroscopy; Ag^+ ; portable Raman spectrometer

0 引言

Ag^+ 是一种常被人们所忽视的重金属污染物, 含有 Ag^+ 消毒制剂常被用于饮用水或者自然水体的消毒^[1], 因此 Ag^+ 可以

通过水、食物链等进入到人体^[2]。长期摄入 Ag^+ 会对人体造成严重的损害。世界卫生组织在其《世界卫生组织饮用水质量指导标准》中规定: 饮用水中的 Ag^+ 检出量不得超过46 nmol/L^[3]。饮用水安全是食品安全的重要组成部分, 如何快速、准确地检

*通信作者: 许庆鹏, 硕士, 工程师, 主要研究方向: 食品及食品相关产品安全检测。E-mail: 993031357@qq.com

*Corresponding author: XU Qing-Peng, Master, Engineer, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China. E-mail: 993031357@qq.com。

测出饮用水样品中微量 Ag^+ 对于饮用水安全十分重要^[4]。随着技术的不断革新,各种检测 Ag^+ 的方法被开发出来。但大部分检测方法都有着样品前处理烦琐、费用高、仪器设备体积大等缺点,并不适用于现场快速检测^[5]。基于此,亟需开发一种能够现场快速检测 Ag^+ 的方法,与现有技术形成优势互补。表面增强拉曼散射(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)是一种超灵敏的痕量物质检测手段^[6],但由于重金属的拉曼散射截面小,无法直接检测出重金属离子,因此可以利用金纳米粒子聚集产生的“热点”信号来间接检出重金属离子^[7]。与传统的比色传感器相比,引入拉曼信号放大的办法检出限更低,线性范围更宽,并且该方法不依赖于颜色的变化,灵敏度更高^[8]。近年来,纳米金的比色检测方法迅猛发展^[9]。因为多肽不仅更容易被修饰而且序列设计上具有灵活性、容易控制等特性^[10],因此,比其他金属离子配体(如DNA、氨基酸、适配体)更具有优势^[11]。已有科研工作者开发肽链用来稳定金纳米溶胶^[12]。然而,目前基于 Ag^+ 与多肽相互作用来检测 Ag^+ 报道较少。例如LI等人^[13]设计多肽序列(RFPRGGDD)结合胶体金比色传感方法用来检测水中 Ag^+ ,该多肽不仅能使金纳米粒子在相对较低的等电点保持稳定,而且具备良好的选择性,但该方法不仅容易受到主观因素影响,而且线性范围和检出限亟需进一步提高。

鉴于此,本研究通过构建功能性的4-巯基苯甲酸/多肽修饰金纳米粒子(R/M-AuNPs),利用便携式拉曼光谱仪实现了水溶液中 Ag^+ 的快速、稳定、定量检测,为水体中重金属离子现场快速检测提供一种新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

SEED 3000 便携式拉曼光谱仪(上海如海光电科技有限公司);TG16W 型高速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);Zetasizer Nano ZSP 型动态光散射激光粒度仪(英国马尔文仪器公司);JEOL-2100 型透射电子显微镜(日本电子株式会社);UB-7 型 pH 计(美国丹佛仪器);MS-100 型恒温混匀(杭州奥盛仪器有限公司);AL-104 型电子天平(感量 0.1 mg, 上海梅特勒-托利多仪器公司)。

六水合柠檬酸三钠(化学纯,美国 Sigma 公司);氯金酸(化学纯,国药集团化学试剂北京有限公司);4-巯基苯甲酸(4-mercaptobenzoic acid, 4-MBA, 化学纯,上海麦克林生化科技有限公司);无水乙醇、氯化钠、硝酸镁、氯化钾、硝酸钙、氯化铁、硝酸钴、氯化锌、硝酸汞、硝酸铅、氯化镉、硝酸铜、硝酸银以及浓盐酸、浓硝酸、氢氧化钠、二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠(分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司);实验用水为超纯水(自制,电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.2 实验方法

1.2.1 金纳米粒子合成及探针的构建及样品准备

采用柠檬酸三钠还原法制备大约 30 nm 的金纳米粒子^[14],在 4°C 下避光保存。首先,进行金纳米粒子溶胶的多肽功能化修饰^[15],在蛋白低吸附离心管中加入 0.9 mL 金纳米溶胶,先后加入序列为:精氨酸—苯丙氨酸—脯氨酸—精氨酸—甘氨酸—甘氨酸—天冬氨酸—天冬氨酸(RFPRGGDD)的多肽水溶

液 100 μL 和一定浓度的 4-MBA 的无水乙醇溶液 10 μL ,让其恒温混匀仪中孵育(20°C , 600 r/min) 2 h,使得多肽和拉曼信号分子(4-MBA)的最终总浓度在 20 $\mu\text{mol/L}$ 。孵育 12 h,然后,在 4000 r/min, 15 min 的条件下,连续离心 3 次,除去未修饰到金纳米粒子表面的多肽和 4-MBA。在每个离心步骤之后使用 10 mmol/L, pH=7.0 的磷酸盐缓冲液对上清液进行替换,并重悬。调节多肽和 4-MBA 的摩尔比得到不同比例的自组装 Ag^+ 探针,把混合修饰的探针命名为 R/M-AuNPs。

1.2.2 SERS 检测

取 10 μL 样品液于洁净铝箔片,放置于载物台上,调节焦距采集信号,使用共聚焦显微拉曼仪进行检测(条件:氦氖激光,激发波长 (785 ± 5) nm, 波长范围: 800~1800 cm^{-1} , 曝光时间 6 s, 积分次数 5 次)。

1.2.3 实验前期的可行性分析

使用动态光散射激光粒度仪、便携式拉曼光谱仪、透射电子显微镜分别对加入 Ag^+ 前后探针体系进行表征。

1.2.4 实验条件优化

分别对多肽 R 与 M(4-MBA) 的比例、反应时间进行优化。取 490 μL 的探针溶液,加入 10 μL 不同浓度的硝酸银标准溶液,使得混合液最终体积为 500 μL ,反应 10 min,取 10 μL 反应后混合液进行数据采集,根据光谱中最高强度的峰值对其强度进行归一化处理, SERS 相对强度(normalized intensity, NI) 的表示方法如公式(1):

$$NI = I_0 / I_{\max} \quad (1)$$

其中, I_0 为反应过程中对应的 SERS 强度, I_{\max} 为反应过程中出现的最高拉曼强度。

1.2.5 标准曲线的确定和 Ag^+ 检测

对不同浓度(0、10、50、150、250、400、550、700、850 nmol/L)的探针体系进行 SERS 信号的采集。

1.2.6 探针选择性分析

在同等条件下,探针与其他金属离子(Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+})与 Ag^+ 反应对比分析。在最优条件下,探索金属离子(Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+})对 Ag^+ 选择性的干扰。

1.2.7 实际样品分析

采用加标回收法,分别对湖水、自来水进行加标回收实验。加标样品进行电感耦合等离子体发射光谱仪测试,判断该新方法可行性。

1.3 数据处理

使用 Origin 8.5 软件对实验中使用到的便携式拉曼光谱仪、动态光散射激光粒度仪自带电脑生成的原始数据进行适当处理,并进行绘图。使用 Excel 2003 制表。

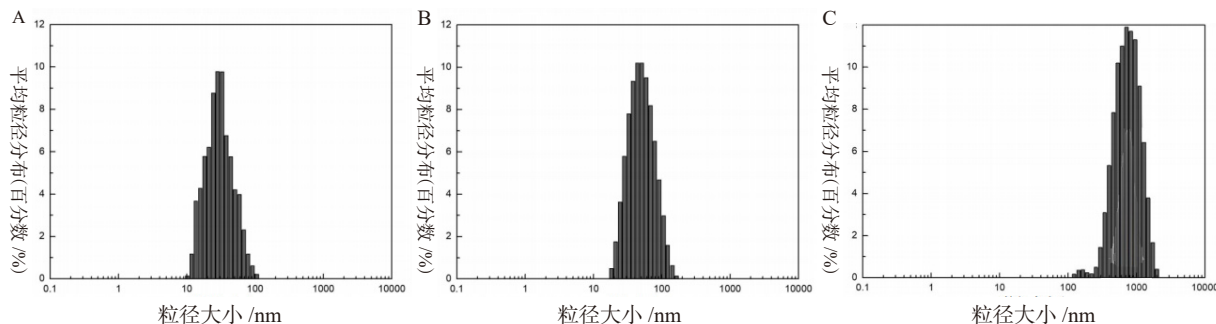
2 结果与分析

2.1 实验前期的可行性分析

图 1 表明探针的水合粒径分布随着 Ag^+ 的增加而逐渐增大, SERS 光谱如图 2 所示,图 2 的 a、b、c 分别对应图 1 中的 A、B、C。胶体金和探针的 SERS 光谱表明 4-MBA 位于 1076 cm^{-1} 和 1580 cm^{-1} 特征峰的强度并不显著(图 2a),这是由于分散状态下的金纳米粒子的 SERS 增强能力较弱,这进一步表明了多肽的修饰不会影响金纳米粒子的稳定性^[16]。在加入 Ag^+ 后,由

于多肽和 Ag⁺ 的配位作用, 金纳米粒子发生聚集, 4-MBA 位于 1076 cm⁻¹ 和 1580 cm⁻¹ 特征峰的强度显著增强, 因此选用 1076 cm⁻¹ 处拉曼峰作为特征峰。Ag⁺ 加入前后 R/M-AuNPs 探

针的透射电镜表征如图 3 所示, 加入 Ag⁺ 之前, R/M-AuNPs 探针体系保持良好的分散性, 加入一定量的 Ag⁺ 会诱导探针聚集, 这进一步证明了上述结论。



注: A 为金纳米粒子; B 为 R/M-AuNPs 探针; C 为探针与银离子反应后。

图 1 粒径分布图

Fig.1 Particle size distribution diagram

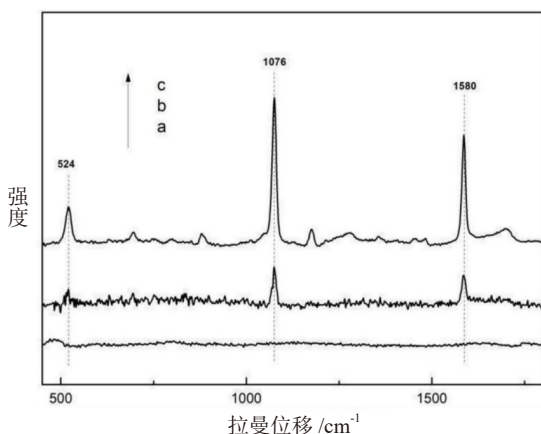
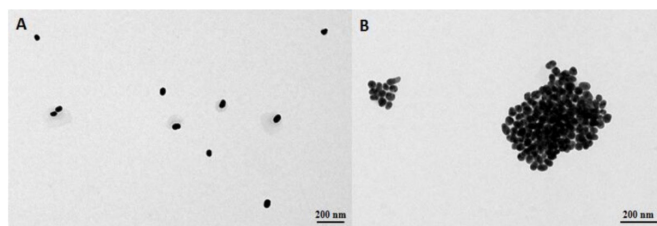


图 2 SERS 光谱图

Fig.2 SERS spectrum



注: A 为银离子加入前; B 为银离子加入后。

图 3 透射电镜图

Fig.3 Transmission electron microscopy image

2.2 实验条件优化

2.2.1 多肽 R 与 4-巯基苯甲酸的比例优化

多肽 R (RFPRGGDD) 具备较小的等电点 (pI=6.44)^[12] 并且在一定条件下可以使得金纳米溶胶稳定, 因此多肽 R 不仅起到识别、捕获 Ag⁺ 的作用而且能稳定胶体金。4-MBA 等电点较高 (pI=6.88)^[17], 过多地修饰 4-MBA 不仅会破坏胶体金的稳定性并且会导致检测过程中背景信号过高, 但是修饰过少, SERS 的响应信号很弱, 达不到理想效果。如图 4 所示, 保持多肽 R 与 4-MBA 的总摩尔浓度为 20 μmol/L 不变, 以多肽 R 与 4-MBA 的摩尔比例 R/M 为横坐标, 相对 SERS 强度差 [(I₁-I₀)/I₀] (I₀

表示未加入 Ag⁺ 的空白 SERS 强度, I₁ 表示加入 Ag⁺ 的 SERS 强度) 为纵坐标建立坐标系。当 R/M 值在 5%~65% 时, 探针的响应能力不断升高, 原因可能是随着 R 肽的修饰比例增加, 相对强度差 (I₁-I₀)/I₀ 不断上升, 并且在 R/M=65% 时, (I₁-I₀)/I₀ 值达到最大, 当 R/M 值在 65%~95% 时, 相对 SERS 强度差 (I₁-I₀)/I₀ 随着 R/M 值的增加而下降, 这说明 4-MBA 比例太少会导致响应信号下降, 因此, 可以认为探针检测的灵敏度与 R/M 的比值紧密联系。当 R/M=65% 时, 探针对 Ag⁺ 的响应值最高, 此时测得体系 pH 为 7.0, 因此选择多肽 R 与 4-MBA 摩尔比为 65%、体系 pH 为 7.0 为最优比例。

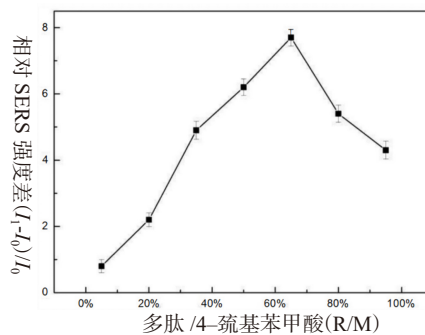


图 4 相对 SERS 强度差与多肽 /4-MBA 摩尔比的关系图

Fig.4 Relationship between the relative SERS intensity difference and the molar ratio of polypeptide/4-MBA

2.2.2 反应时间动力学优化

探针与 Ag⁺ 反应过程需要一定的时间, 两者必须达到反应平衡才能保证结论的准确性和灵敏度。图 5 为不同浓度 Ag⁺ 条件下, 体系响应的动力学过程, 横坐标为反应时间, 纵坐标为 SERS 相对强度, 在 Ag⁺ 浓度较高的情况下, 体系率先达到反应平衡, Ag⁺ 浓度较低时反应达到平衡的时间较长, 但总体来说, 在 12 min 时, 基本上达到反应平衡状态。因此选择反应时间为 12 min 为最佳反应时间。

2.3 标准曲线的确定和 Ag⁺ 检测

如图 6 所示, 1076 cm⁻¹ 处的 SERS 强度随着 Ag⁺ 浓度的增加而上升。图 7A 为不同 Ag⁺ 浓度下 1076 cm⁻¹ 处的标准 SERS

曲线, 在 10~850 nmol/L 的范围内随着 Ag^+ 浓度的升高, SERS 强度呈现出对数递增的特点, 根据该特性对数据进行适当处理: 把浓度为 850 nmol/L 条件下 1076 cm^{-1} 处的 SERS 强度做标准化参考值 I_0 , 不同浓度的 Ag^+ 位于 1076 cm^{-1} 处的 SERS 值做标准化校准 ($R=\Delta I/I_0$)。经过校正的结果如图 7B 所示, Ag^+ 浓度的自然对数与标准化 SERS 强度表现出线性关系。线性回归方程 $y=0.33179x-0.00517$, x 轴表示 Ag^+ 浓度的自然数对数, y 轴表示 1076 cm^{-1} 处的标准化 SERS 强度, 相关系数 (r^2) 为 0.98345。将空白的平均信号进行标准化, 标准化后的值加上 3 倍标准偏差 (0.034), 计算结果代入线性回归方程中, 计算最低检出限为 36 pmol/L, 实验证明该方法灵敏度高、响应时间短, 其线性范围满足世界卫生组织对于饮用水中 Ag^+ 的最低检出浓度 (46 nmol/L) 的要求^[3], 具备较强的应用价值。

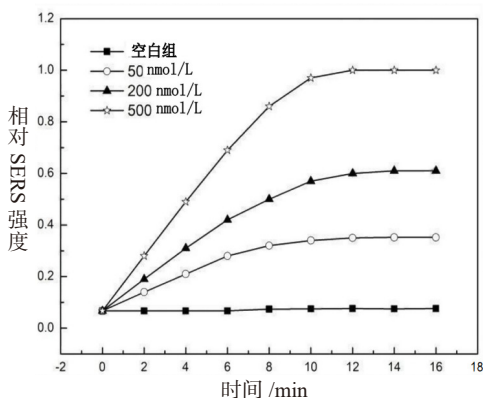
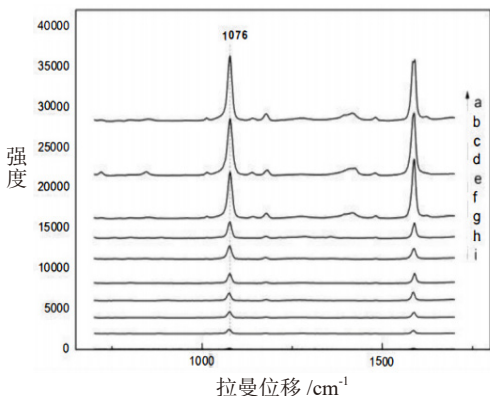


图 5 不同银离子浓度下体系响应的时动力学过程图

Fig.5 Time dynamic process diagram of system response under different silver ion concentration



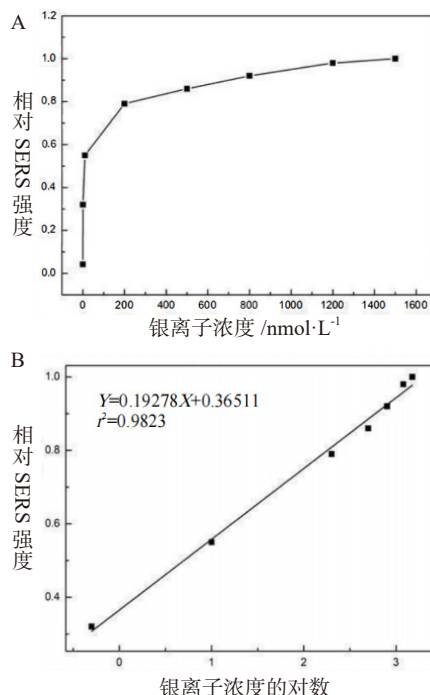
注: i~a 分别对应银离子浓度为 0、10、50、150、250、400、550、700、850 nmol/L。

图 6 不同银离子浓度下的 SERS 光谱图

Fig.6 SERS spectra of different silver ion concentrations

2.4 探针选择性分析

如图 8 所示, 添加 100 nmol/L 的 Ag^+ 后 SERS 的强度在 1076 cm^{-1} 附近有明显的特征峰, 而其他种类的金属离子在 1076 cm^{-1} 没有明显特征峰。图 9 则表示 Ag^+ 与其他金属离子竞争反应, 共同孵育 12 min 后在 1076 cm^{-1} 处的标准化相对 SERS 强度, 可以看到, 其他金属离子对 Ag^+ 的检测结果无明显干扰。综上所述, 说明该方法具有较好选择性。



注: A 为相对探针溶液 SERS 强度(1067 cm^{-1})随银离子浓度增加的变化图; B 为银离子浓度的自然对数 $\log[c(\text{Ag}^+)]$ 与 SERS 强度的标准化曲线图。

图 7 标准化曲线图

Fig.7 Standardized curve chart

2.5 加标回收实验与实际样品分析

按照此方法对 Ag^+ 浓度为 50 nmol/L 和 500 nmol/L 的加标样品进行检测, 结果如表 1 所示, 三者加标回收率在 95.28%~102.9%, 相对标准偏差为 0.79%~3.73%, 说明该方法可以用于自来水和湖水中的 Ag^+ 的检测。为了进一步验证该方法准确性, 采用电感耦合等离子体发射光谱仪分别检测加标量为 50 nmol/L 和 500 nmol/L 浓度 Ag^+ 的湖水, 每组样品进行 3 次平衡测定, 测定结果取平均值。如表 2 和表 3 所示。结果显示感耦合等离子体发射光谱仪测得结果和 SERS 检测方法得出结果基本一致, 说明了该方法具备良好的可行性和准确性。

表 1 自来水中 Ag^+ 检测结果

Table 1 Ag^+ detection results in tap water

自来水 (编号)	Ag^+ 加标量 (nmol/L)	Ag^+ 检出量 (nmol/L)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
1	50	52.9	102.9	2.81
2	500	514.8	114.8	1.45

表 2 湖水中 Ag^+ 检测结果

Table 2 Ag^+ detection results in lake of water

湖水编号	Ag^+ 加标量 (nmol/L)	Ag^+ 检出 (nmol/L)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
1	50	50.8	100.8	0.79
2	500	476.4	95.28	2.42

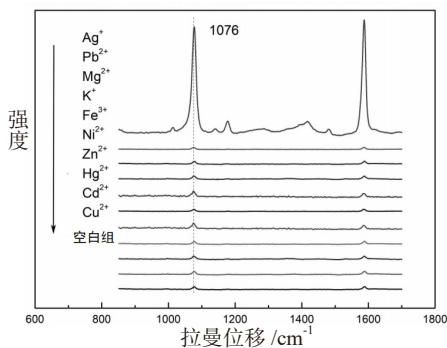


图 8 探针与金属离子反应的 SERS 光谱图

Fig.8 SERS spectra of probe reacting with metal ion

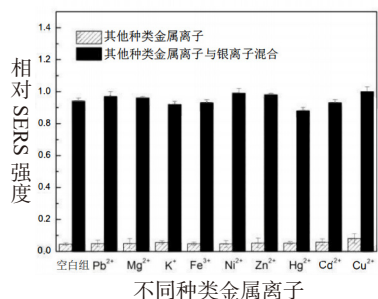


图 9 银离子与其他金属离子竞争反应的相对 SERS 强度图

Fig.9 Relative SERS intensity diagram of competitive reaction between silver ions and other metal ions

表 3 电感耦合等离子体发射光谱仪检测天然湖水中 Ag⁺

Table 3 Detection of Ag⁺ in lake water by inductively coupled plasma emission spectrometer

湖水编号	Ag ⁺ 加标量 (nmol/L)	Ag ⁺ 检出量 (nmol/L)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
1	50	46.4	92.8	3.73
2	500	482.6	96.52	1.77

3 结论

本研究设计了一种检测水中 Ag⁺ 的新型 SERS 探针, 该方法将特异性多肽与 SERS 基底有机地结合起来, 充分利用了 SERS 技术在超灵敏检测方面的优势。对比其他检测方法, SERS 探针构建简单、稳定易保存; 且该方法灵敏度高、特异性强、检测范围宽、检测限低、检测时间短。通过加标回收实验表明, 该方法完全具备进行现场快速检测的潜力。

参考文献

[1] 邓红. 银离子消毒饮用水的机制[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1999, 26(01): 3.

[2] SALMONA M, DELARUE S, DELAUGERRE C, *et al.* Clinical evaluation of BioPlex 2200 HIV Ag-Ab, an automated screening method providing discrete detection of HIV-1 p24 antigen, HIV-1 antibody, and HIV-2 antibody [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(01): 103-107.

[3] ZHAO H, CHEN MJ, MA CB. Fluorescent method for the detection of biothiols using an Ag⁺-mediated conformational switch [J]. Sensors, 2019, 19(04): 56-89.

[4] 任春生. 基于金纳米簇比色法对银离子的检测研究[J]. 吉林化工学院学报, 2019, 36(05): 5.

[5] LI F, WANG J, LAI Y, *et al.* MLtrasensitive and selective detection of copper (II) and merCurY (II) ions by dye-coded silver nanoparticle-based SERS probes [J]. Biosens Bioelectr, 2013, 39(01): 82-87.

[6] YIN J, WU T, SONG J, *et al.* SERS-active nanoparticles for sensitive and selective detection of cadmium ion (Cd²⁺) [J]. Chem Mater, 2011, 23(21): 4756-4764.

[7] SCHLUCKER S. SERS Microscopy: Nanoparticle probes and biomedical applications [J]. Chemphyschem, 2009, 10(9-10): 134-144.

[8] WANG G, LIM C, CHEN L, *et al.* Surface-enhanced Raman scattering in nanoliter droplets: Towards high-sensitivity detection of merCurY (II) ions [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(07): 1827-1832.

[9] 李天华. 金纳米粒子的制备及其在阴离子比色检测中的应用研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2015.

[10] LI W, NIE Z, HE K, *et al.* Simple, rapid and label-free colorimetric assay for Zn²⁺ based on unmodified gold nanoparticles and specific Zn²⁺ binding peptide [J]. Chem Commun, 2011, 47(15): 4412-4414.

[11] 詹深山, 吴远根, 邱树毅, 等. 基于纳米金和核酸适配体的重金属离子传感器研究进展[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(02): 8.

[12] AHN JK, KIM HY, BAEK S, *et al.* A new s-adenosylhomocysteine hydrolase-linked method for adenosine detection based on DNA-templated fluorescent Cu/Ag nanoclusters [J]. Biosens Bioelectr, 2017, 93: 330-334.

[13] LI XY, WU ZT, ZHOU XD, *et al.* Colorimetric response of peptide modified gold nanoparticles: An original assay for trasensitive silver detection [J]. Biosens Bioelectr, 2017, 92: 496-501.

[14] TURKEVITCH J, STEVENSON PC, HILLIER J. Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold [J]. Discuss Faraday Soc, 1951, 11: 55-75.

[15] 代昭, 韩阳. 小粒径金纳米粒子的制备及性能表征[J]. 天津工业大学学报, 2019, 38(06): 5.

[16] 谢辉, 蔡继业. 胶体金修饰纳米免疫传感器的制备与性能测定[J]. 生物物理学报, 2007, 23(03): 215-222.

[17] 张美霞, 付喆, 刘晶. 4-巯基苯甲酸-Ag₂₀ 表面增强拉曼散射的化学增强电荷转移机理研究(英文)[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2014, 41(04): 324-329.

作者简介



容培森, 硕士, 主要研究方向: 食品及食品相关产品安全检测分析。



许庆鹏, 硕士, 工程师, 主要研究方向: 食品及食品相关产品安全检测。