

基于金纳米粒子比色检测重金属铅离子

许宙¹, 梅博^{1,2}, 丁利², 唐瑶¹, 王利兵², 程云辉¹

(1. 长沙理工大学, 长沙 410004; 2. 湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 长沙 410004)

摘要: **目的** 研究一种新的基于半胱氨酸修饰的金纳米粒子的检测重金属铅离子的方法。**方法** 采用柠檬酸钠还原法合成粒径为13 nm的金纳米粒子,并用半胱氨酸进行修饰(Cys-AuNPs)。在Pb²⁺诱导下,Cys能通过螯合配体结合作用捕获Pb²⁺,导致AuNPs聚集,使AuNPs特征峰的位置和强度发生变化,且溶液颜色发生变化。**结果** 该比色法的检测范围为0.02~5 μmol/L,检出限为0.01 μmol/L。通过对比Pb²⁺与其他金属离子的紫外可见光谱,证明该方法特异性好。**结论** 该比色法可用于Pb²⁺的实际检测应用中。

关键词: 重金属铅离子;比色法;金纳米粒子;半胱氨酸

中图分类号: TB487; TS207.5⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2015)01-0029-04

Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles for Detection of Pb Ions

XU Zhou¹, MEI Bo^{1,2}, DING Li², TANG Yao¹, WANG Li-bing², CHENG Yun-hui¹

(1. Changsha University of Science and Technology, Changsha 410004, China;

2. Hunan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: To develop a simple and sensitive colorimetric detection method for Pb²⁺ based on cysteine functionalized gold nanoparticles (Cys-AuNPs). AuNPs with a particle size of 13 nm were synthesized using sodium citrate reduction method and then functionalized with cysteine. Cys-AuNPs could be induced to aggregate immediately in the presence of Pb²⁺ through chelating ligand binding, which led to the colorimetric response of AuNPs, with changes in the position and strength of AuNPs characteristic peaks as well as the solution color. The experimental results indicated that a good linear relationship was found in the Pb²⁺ concentration range between 0.02 μmol/L and 5 μmol/L, and the limit of detection (LOD) was 0.01 μmol/L. The selectivity of this method was confirmed by comparison with the UV/Vis spectra of other divalent metal ions. The colorimetric method could be used in the actual application of Pb²⁺ detection.

KEY WORDS: heavy metal Pb²⁺; colorimetric method; gold nanoparticles; L-cysteine

重金属离子会对环境和人类健康造成严重影响,尤其是铅离子,在少量接触时也会对人体神经有强烈的毒害作用,影响人的行为、大脑发育和神经传导速度^[1-2],由此,铅的检测显得尤为重要。2006年卫生部颁布的新版GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》^[3]规定,日常饮用水中铅的质量浓度不得高于0.01 mg/L(相当于0.05 μmol/L)。铅的传统检测方法包括原子吸收

法(AAS)^[4]、分光光度法^[5]、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)^[6]、X射线荧光光谱法^[7]和电化学法^[8]等,但这些方法通常都需要复杂的实验技术,耗时长,设备昂贵,使其难以推广,一般仅适用于实验室分析^[9-10]。

相比于其他检测方法,比色法具有独特的优势,如其结果肉眼可见、无需复杂仪器、成本低且非常适合现场测定。金纳米粒子(AuNPs)与其他材质相比,

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(31401566);“十二五”科技支撑计划项目(2011BAK10B05,2012BAD29B05);质监总局公益项目(201310128)

作者简介: 许宙(1983—),男,湖南长沙人,博士,主要研究方向为食品安全。

通讯作者: 程云辉(1964—),女,湖南长沙人,博士,长沙理工大学教授,主要研究方向为食品安全。

具有显著的特性,如易制备、易修饰、生物相容性好、独特的光学和电学特征等。AuNPs具有很强的表面等离子共振(SPR)性能,导致其吸收光谱在520 nm附近会产生一个尖锐的表面等离子共振峰,而且该峰的位置会随AuNPs粒径和粒子间距的变化而变化^[11]。当AuNPs之间的距离减小(由分散态向聚集态转变)时,SPR吸收峰的位置会发生变化,并会产生比色响应,溶液颜色也会逐渐由红色变为蓝色。基于AuNPs的比色法受到了研究者的广泛关注,如Lou等^[12]利用含T(与 Hg^{2+} 结合)的DNA链修饰AuNPs比色法测定 Hg^{2+} ,Guo等^[13]利用基于木瓜蛋白酶包被AuNPs的比色系统同时检测 Hg^{2+} , Pb^{2+} 和 Cu^{2+} ,Huang等^[14]利用没食子酸修饰AuNPs用于检测 Pb^{2+} 。文中利用半胱氨酸修饰金纳米粒子,以硫氰化钾为屏蔽剂,用来检测水中的 Pb^{2+} 。该方法简单、灵敏、选择性好,并且检测限低至 $0.01 \mu\text{mol/L}$,低于国标规定的 $0.05 \mu\text{mol/L}$ (0.01mg/L),有望应用到现场原位检测中。

1 实验

1.1 材料与设备

实验材料:氯金酸(HAuCl_4)、二水合柠檬酸三钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、L-半胱氨酸(L-Cys)、硫氰化钾(KSCN)、重金属标准样品(Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , As^{2+}),以上试剂都是分析纯,国药集团化学试剂有限公司,该实验所有溶液都采用超纯水配制,超纯水全部采用怡宝纯净水。

实验仪器:UV-1800紫外可见分光光度计,透射式电子显微镜,TG16-W微量高速台式离心机。

1.2 方法与原理

Cys含有一个自由 $-\text{COOH}$ 基团和一个 $-\text{NH}_2$ 基团,这2个基团可以为进一步与重金属离子反应提供一个亲水界面。当 Pb^{2+} 存在时,Cys能通过螯合配体结合作用捕获 Pb^{2+} ,导致Cys-AuNPs聚集,见图1。当Cys-AuNPs发生聚集时,会引起AuNPs特征峰的位置和强度发生变化,导致AuNPs溶液颜色由红变蓝。

1.3 步骤

1.3.1 13 nm AuNPs制备

13 nm AuNPs是根据文献[15]采用柠檬酸钠还原 HAuCl_4 法合成。洁净的三口烧瓶中加入97.5 mL超纯

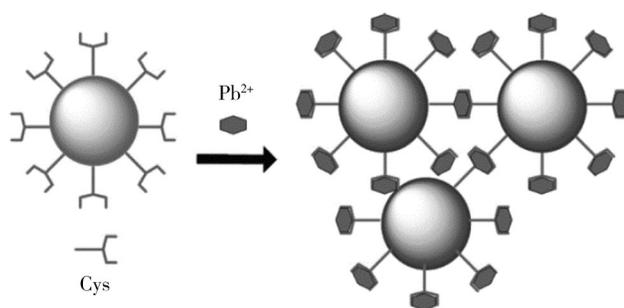


图1 比色法检测铅离子原理

Fig.1 Principle of the colorimetric detection of Pb^{2+}

水和2.5 mL质量分数为0.412%的氯金酸溶液,搅拌并加热至沸腾,7~8 min后加入2 mL质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液,溶液从无色变为红色后,停止加热,并继续搅拌15 min。

1.3.2 Cys修饰AuNPs

1 mL AuNPs溶液在离心速率为12 000 r/min的离心机中离心20 min后,弃上清液,并向其加入900 μL 超纯水,加入一定量的Cys溶液,震荡后静置孵化0.5 h。

1.3.3 Pb^{2+} 测定

向1.3.2节中的Cys-AuNPs溶液分别加入0,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1,2,5,10 $\mu\text{mol/L}$ 的标准 Pb^{2+} 溶液,孵育30 min后,用紫外/可见分光光度计扫描获得光谱,记录400~800 nm波长范围内光谱图。

2 结果与讨论

2.1 Cys修饰AuNPs表征

AuNPs, Cys-AuNPs和 Pb^{2+} -Cys-AuNPs的TEM照片见图2。由图2a可知,表明新制备的AuNPs分散均匀,平均粒径约为13 nm。从图2b中可观察到Cys-AuNPs仍处于分散状态,说明Cys修饰不影响AuNPs的聚集。加入 Pb^{2+} 后,AuNPs会发生明显的聚集,见图2c。

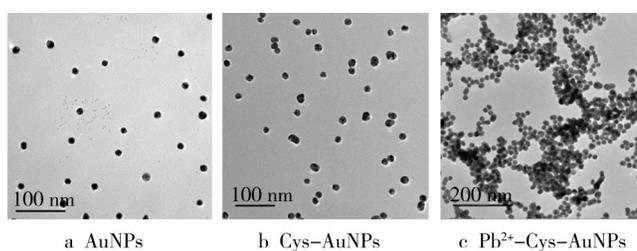


图2 透射电镜表征

Fig.2 TEM images

2.2 条件优化

影响该体系灵敏性的主要因素是 Cys 的浓度,若 Cys 浓度太低,体系灵敏度不够;若 Cys 浓度太高,会引起 AuNPs 聚沉,导致体系不稳定。该实验优化了 Cys 的浓度,当 Cys 的浓度低于 50 nmol/L 时,随 Cys 浓度的增加,特征峰的响应值会逐渐减小;当 Cys 的浓度高于 50 nmol/L 时,响应值会突然变大。由此,Cys 的最佳浓度为 50 nmol/L。

2.3 Pb²⁺测定

通过检测 AuNPs 溶液的紫外可见光谱和颜色变化来判断该方法对不同浓度梯度 Pb²⁺(0.02~10 μmol/L) 的响应。由图 3 可知,当 Pb²⁺浓度增加到 1 μmol/L 时,溶液颜色会有酒红色变为紫色,可以通过肉眼观察到。继续增加 Pb²⁺浓度超过 10 μmol/L 时,静置后溶液会产生沉淀,说明此时 Pb²⁺-Cys-AuNPs 已完全聚沉。

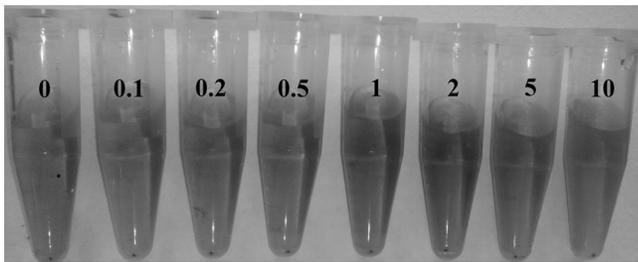


图3 浓度梯度影响颜色变化

Fig.3 Effect of Pb²⁺ concentration gradient on the color change

由图 4 可知,加入 Pb²⁺后,AuNPs 溶液的特征峰位置由 518 nm 逐渐红移到 522 nm。随着 Pb²⁺浓度的增加,特征峰强度逐渐减小,红移会越来越大。当 Pb²⁺浓度增加至 10 μmol/L 时,特征峰位置已不太明显,这与图 3 中的颜色变化相对应。这主要原因是随着 Pb²⁺浓度的增加,AuNPs 的聚集程度随之增加,导致溶液颜色变化和特征峰的位移。Pb²⁺浓度的对数为横坐标,以吸光度值为纵坐标而得到的标准曲线见图 5。由图 5 可知,吸光度值与 Pb²⁺浓度之间存在线性关系 $y = -0.0497 \ln x + 0.6659$, $R^2 = 0.9897$ 。该比色法的检测范围为 0.02~5 μmol/L,检出限(LOD)为 0.01 μmol/L (< 0.05 μmol/L),并且在一定浓度范围内,可以通过肉眼估判出 Pb²⁺的浓度。

2.4 方法的选择性

饮用水中的主要重金属离子包括 Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, As²⁺等。为了判断其他金属离子对

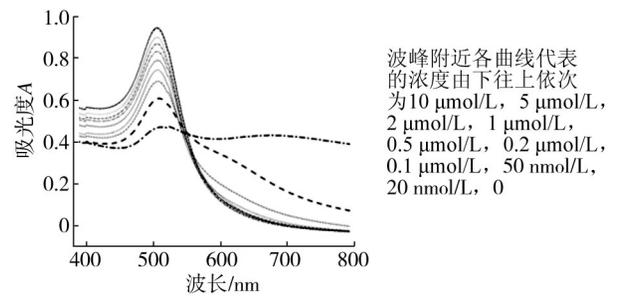


图4 不同浓度的Pb²⁺紫外可见光谱

Fig.4 UV-Vis absorption spectra of Cys-AuNPs after addition of different concentrations of Pb²⁺

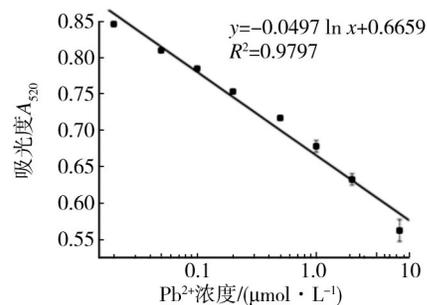


图5 A₅₂₀与Pb²⁺浓度的对数之间的标准曲线

Fig.5 Linear fitting of the peak intensities at 520 nm as a function of the logarithm of Pb²⁺ concentration

Pb²⁺检测的干扰,向 1 mL Cys-AuNPs 溶液中分别加入一定量(10 μL 200 μg/mL)的 Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, As²⁺溶液(含 2 μmol/L 硫氰化钾),孵育 30 min 后,扫描记录波长为 400~800 nm 内光谱图,结果见图 6。图 6a 表示加入相同浓度不同重金属离子得到的紫外可见吸收光谱。由图 6a 可知,加入标准重金属(除 Pb²⁺外)溶液后,AuNPs 特征峰的强度几乎与空白组相同,没有发生显著变化,加入 Pb²⁺的 AuNPs 特征峰则有显著变化。图 6b 是以 520 nm 处空白组与实验组吸光度值的差值(即 $\Delta A_{520} = A_{\text{空白}} - A_{\text{试验}}$)为纵坐标得到的柱状图。结合图 6a 和图 6b 可知,其他重金属离子对 Pb²⁺的干扰较小(硫氰化钾屏蔽效果较好),说明该比色法对 Pb²⁺有较好的选择性。

2.5 实际样品测定

向 0.9 mL Cys-AuNPs 溶液中分别加入 0.1 和 1 μmol/L 标准 Pb²⁺溶液(饮用水配置,含 2 μmol/L 硫氰化钾),孵育 30 min 后,扫描记录波长为 400~800 nm 的光谱图,结果见表 1。由表 1 可知,2 次测量的标准偏差分别为 0.56% 和 0.346%,回收率分别为 95.7% 和 102.4%。结果表明,该体系可用于饮用水中 Pb²⁺的检测。

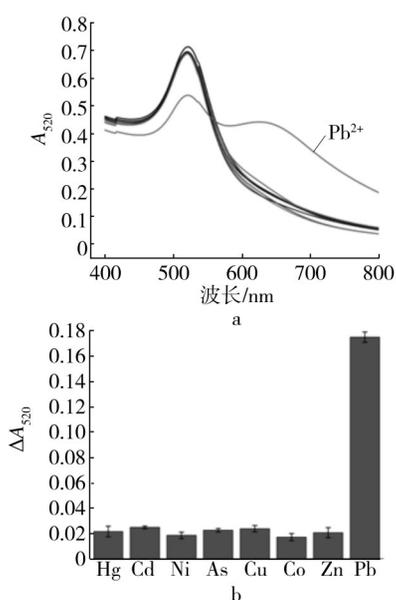


图6 不同干扰物质对体系的影响

Fig.6 The influence of different divalent metal ions

表1 实际样品测定结果

Tab.1 Determination of Pb^{2+} spiked into drinking water

样品	加入量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	实测值/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%	回收率/%
饮用水	0.1	0.0957	0.56	95.7
	1	1.024	0.346	102.4

3 结语

文中利用半胱氨酸(Cys)修饰金纳米粒子,以硫氰化钾为屏蔽剂,建立了一种重金属铅离子比色检测的方法。该比色法的检测范围为 $0.02\sim 5\ \mu\text{mol/L}$,并且检测限低达 $0.01\ \mu\text{mol/L}$,低于国标规定的 $0.05\ \mu\text{mol/L}$ ($0.01\ \text{mg/L}$)。该比色法同其他一些检测方法相比,其操作简单快捷、成本低廉,并且特异性强,弥补了其他方法成本高、需要借助其他大型仪器的缺陷,可以实现快速和实时检测。

参考文献:

[1] NOLAN E M, LIPPARD S J. Tools and Tactics for the Optical Detection of Mercuric Ion[J]. Chemical Reviews, 2008, 108(9):3443—3480.
 [2] WASSERMAN G A, STAGHEZZA J B, SHROUT P, et al. The Effect of Lead Exposure on Behavior Problems in Pre-school Children[J]. American Journal of Public Health, 1998, 88(3):481—486.
 [3] GB 5749—2006, 生活饮用水卫生标准[S]. GB 5749—2006, Standards for Drinking Water Quality[S].

[4] BEDNAR A J, KIRGAN R A, JONES W T. Comparison of Standard and Reaction Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in the Determination of Chromium and Selenium Species by HPLC-ICP-MS[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 632(1):27—34.
 [5] NARIN I, SOYLAK M. Enrichment and Determinations of Nickel(II), Cadmium(II), Copper(II), Cobalt(II) and Lead(II) Ions in Natural Waters, Table Salts, Tea and Urine Samples as Pyrrolydine Dithiocarbamate Chelates by Membrane Filtration-flame Atomic Absorption Spectrometry Combination[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 493(2):205—212.
 [6] POLEC-PAWLAK K, RUZIK R, LIPIEC E. Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) Complexation by Glutathione and its Component Amino Acids by ESI-MS and Size Exclusion Chromatography Coupled to ICP-MS and ESI-MS[J]. Talanta, 2007, 72(4):1564—1572.
 [7] ELZINGA E J, ROUFF A A, REEDER R J. The Long-term Fate of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} Adsorption Complexes at the Calcite Surface: an X-ray Absorption Spectroscopy Study[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2006, 70(11):2715—2725.
 [8] YI Peng, LIN Li-dong. Label-free Picomolar Detection of Pb^{2+} Using Atypical Icosahedra Gold Nanoparticles and Rolling Circle Amplification[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 59:314—320.
 [9] 邬智高. 近年来水中铅离子的检测方法的研究进展[J]. 沿海企业与科技, 2011(4):24—26.
 WU Zhi-gao. Detection Methods and Research Progress of Lead Ions[J]. Coastal Enterprises and Science & Technology, 2011(4):24—26.
 [10] HUANG M R, GU G L, SHI F Y, et al. Development of Potentiometric Lead Ion Sensors Based on Ionophores Bearing Oxygen/Sulfur-containing Functional Groups[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(1):50—58.
 [11] MURPHY C J, GOLE A M, HUNYADI S E, et al. Chemical Sensing and Imaging with Metallic Nanorods[J]. Chemical Communications, 2008(5):544—557.
 [12] LOU T, CHEN L, ZHANG C, et al. A Simple and Sensitive Colorimetric Method for Detection of Mercury Ions Based on Anti-aggregation of Gold Nanoparticles[J]. Anal Methods, 2012, 4(2):488—491.
 [13] GUO Y, WANG Z, QU W, et al. Colorimetric Detection of Mercury, Lead and Copper Ions Simultaneously Using Protein-functionalized Gold Nanoparticles[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(10):4064—4069.
 [14] HUANG K W, YU C J, TSENG W L. Sensitivity Enhancement

(下转第36页)

- 157—395.
- [2] 金岭,董文丽,孙智慧. 聚碳酸酯中双酚A的毒性及迁移规律研究进展[J]. 包装工程, 2013, 34(9): 122—126.
JIN Ling, DONG Wen-li, SUN Zhi-hui. Research Progress of Toxicity and Migration Rule of Bisphenol A in Poly-carbonate [J]. Packaging Engineering, 2013, 34(9): 122—126.
- [3] LUDOVIC L C, LYDIE I D M, PHILIPPE B, et al. Bisphenol a Disrupts the Intestinal Lipid Metabolism[J]. Toxicology Letters, 2012, 211: 210.
- [4] 赖莺,王鸿辉,蔡鹭欣,等. 高效液相色谱法测定环氧树脂粘接剂中的双酚A[J]. 分析实验室, 2012, 31(3): 43—46.
LAI Ying, WANG Hong-hui, CAI Lu-xin, et al. Determination of Bisphenol a in Epoxy Resin Adhesives by High Performance Liquid Chromatography[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 31(3): 43—46.
- [5] 焦艳娜,丁利,李晖,等. 加速溶剂萃取GC-MS/MS法测定食品接触材料中双酚A、双酚F及其衍生物的残留量[J]. 包装工程, 2011, 32(15): 53—57.
JIAO Yan-na, DING Li, LI Hui, et al. Determination of Bisphenol A, Bisphenol F and Their Derivatives Residues in Food Contact Materials by Accelerated Solvent Extraction and GC-MS/MS[J]. Packaging Engineering, 2011, 32(15): 53—57.
- [6] 卫碧文,缪俊文,宇文佳. 气相色谱—质谱法分析食品包装材料中双酚A[J]. 分析实验室, 2009, 28(1): 107—109.
WEI Bi-wen, MIAO Jun-wen, YU Wen-jia. Determination of Bisphenol A in Food Packing by Gas Chromatography-mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(1): 107—109.
- [7] MARCHESINI G R, MEULENBERG E, HAASNOOT W, et al. Biosensor Immunoassays for the Detection of Bisphenol A[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 528(1): 37—45.
- [8] PIAO M H, NOH H B, RAHMAN M A, et al. Label Free Detection of Bisphenol A Using a Potentiometric Immunosensor[J]. Electroanalysis, 2008, 20(1): 30—37.
- [9] 王玉春,刘赵荣,弓巧娟. 电化学分析法对食品包装材料中双酚A的检测[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 303—306.
WANG Yu-chun, LIU Zhao-rong, GONG Qiao-juan. Electrochemical Determination on of Bisphenol A in Food Packaging Materials[J]. Food Science, 2010, 31(20): 303—306.
- [10] 孙希岚,朱争礼,单营营,等. 食品金属罐用涂层中双酚A的快速定性分析方法[J]. 包装工程, 2013, 34(1): 38—43.
SUN Xi-lan, ZHU Zheng-li, SHAN Ying-ying, et al. Quick Qualitative Analyzing Method of Bisphenol A in Metal Food Cans Coating[J]. Packaging Engineering, 2013, 34(1): 38—43.
- [11] 罗敏,张吉坪,李晨曦,等. 食品容器中双酚A的一种现场检测方法[J]. 包装工程, 2014, 35(15): 11—14.
LUO Min, ZHANG Ji-ping, LI Chen-xi, et al. A Portable Method for Rapid Determination of Bisphenol A in Food Containers[J]. Packaging Engineering, 2014, 35(15): 11—14.
- [12] JO M, AHN J Y, LEE J, et al. Development of Single-stranded DNA Aptamers for Specific Bisphenol A Detection[J]. Oligo-nucleotides, 2011, 21(2): 85—91.
- [13] MEI Z, CHU H, CHEN W, et al. Ultrasensitive One-step Rapid Visual Detection of Bisphenol A in Water Samples by Label-free Aptasensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 39(1): 26—30.
- [14] KUANG H, YIN H, LIU L, et al. Asymmetric Plasmonic Aptasensor for Sensitive Detection of Bisphenol A[J]. ACS Applied Materials & Plant Physiology and Biochemistry Interfaces, 2013, 6(1): 364—369.
- [15] 杜鹃. 金纳米粒子微波及水热反应合成研究及其在光谱分析中的应用[D]. 重庆: 重庆大学, 2013.
DU Juan. Gold Nanoparticles Synthesized by Microwave-assisted Heating Method and Hydrothermal Method and Its Applications in Spectral Analysis[D]. Chongqing: Chongqing University, 2013.
- [16] 姚素薇,邹毅,张卫国. 金纳米粒子的特性、制备及应用研究进展[J]. 化工进展, 2007, 26(3): 310—319.
YAO Su-wei, ZOU Yi, ZHANG Wei-guo. Research Progress of the Properties, Preparation and Application of Au Nanoparticles[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2007, 26(3): 310—319.
- [17] 郭筱兵,李忠海,黎继烈,等. 金纳米粒子在食品检测领域中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 368—370.
GUO Xiao-bing, LI Zhong-hai, LI Ji-lie, et al. Research Progress in Food Detection of Gold Nanoparticles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(5): 368—370.
- [18] ZHENG Y, WANG Y. Aptamer-based Colorimetric Biosensing of Dopamine Using Unmodified Gold Nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 156(1): 95—99.
- [19] OFIR Y, SAMANTA B, ROTELLO V M. Polymer and Biopolymer Mediated Self-assembly of Gold Nanoparticles[J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(9): 1814—1825.
- [15] CHAI F, WANG C, WANG T, et al. L-cysteine Functionalized Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Hg²⁺ Induced by Ultraviolet Light[J]. Nanotechnology, 2010, 21(2): 025501.
- [16] AMBROSI A, CASTA EDA M T, KILLARD A J, et al. Double-codified Gold Nanolabels for Enhanced Immunoanalysis[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(14): 5232—5240.

(上接第32页)

in the Colorimetric Detection of Lead (II) Ion Using Gallic Acid-capped Gold Nanoparticles: Improving Size Distribution and Minimizing Interparticle Repulsion[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(5): 984—989.