DOI:10.19789/j.1004-9398.2017.02.010



# 荧光银纳米团簇在生物化学传感分析中的应用

刘晨昱 林雨青* 黄潇楠*
(首都师范大学化学系,北京 100048)

**摘 要**

银纳米团簇(silver nanoclusters,AgNCs)是一种新型的荧光纳米材料,一般由几个到上百个原子组成,近些年来得到了广泛的关注. 银纳米团簇具有尺寸小(<2nm)、比表面积大、光物理性质好、表面易于修饰及荧光性质可调节等优点. 作为新型荧光探针,荧光银纳米团簇已成功用于对金属离子(如 $Hg^{2+}$、$Cu^{2+}$)及重要的生物活性物质如过氧化氢、葡萄糖、半胱氨酸和抗坏血酸等小分子化合物的检测. 本文结合当前的研究现状,综述了银纳米团簇在生物化学传感分析中的应用,并对银纳米团簇的研究方向和发展前景进行了展望.

**关键词:** 银纳米团簇,生物化学,传感分析.
**中图分类号:** Q503

## 0 引 言

近年来,贵金属纳米簇已发展为一种新型的荧光纳米材料,一般由几个到上百个金属原子(如 Au、Ag、Pd 等)组成. 一般来说,贵金属纳米簇的粒径小于 2 nm,其尺寸接近电子的费米波长,由于量子限域效应的存在,连续能级发生分裂[1],因此表现出一些独特的性质,比如荧光. 这些年来,国内外的研究者们对银纳米簇的合成方法做出了很大的改进和发展. 由于纳米簇的团聚倾向以及修饰配体对其发光性能的影响,要获得粒径小、荧光性强的银纳米簇的一个关键点就是要找到合适的配体,稳定纳米簇,防止其团聚并增强纳米簇荧光. 目前报道了以肽、巯基化合物、树枝状分子化合物、蛋白质、聚合物分子和 DNA 为模板合成银纳米簇的方法[2].

迄今为止,国内外的研究者已深入研究了银纳米团簇的制备、功能化及其在生物大分子检测、生物医学荧光成像等方面的应用. 本文结合目前银纳米团簇的研究现状,概述了银纳米团簇在金属离子和有机小分子化合物检测中的应用,同时对银纳米团簇的研究方向和发展前景进行了展望.

收稿日期: 2016-04-07
* 通讯作者

## 1 荧光银纳米团簇在检测小分子化合物中的应用

### 1.1 金属离子的检测

金属离子,尤其是重金属离子,由于对环境的污染和生物体的危害而广受关注. 利用银纳米团簇可以实现重金属离子的检测,且检测限低、灵敏度好、分析成本低,是一种很有应用前景的分析方法.

#### 1.1.1 $Hg^{2+}$ 的检测

$Hg^{2+}$ 是一种普遍存在于自然环境中的有毒离子,毒性高,污染区域广. 微量 $Hg^{2+}$ 即可对生物体的大脑、神经系统和肾脏等造成严重的伤害[3],因此,对 $Hg^{2+}$ 的检测非常重要. 近些年的报道显示,$Hg^{2+}$ 对多种类型的贵金属纳米簇有荧光猝灭效应,研究者利用这种荧光猝灭效应可以实现对 $Hg^{2+}$ 的高灵敏检测. Tang 等人[4] 以 PMAA 盐为模板,采用水热法合成的银纳米团簇,用于检测 $Hg^{2+}$. 该种方法合成的团簇性质稳定,在 pH3.8 ~ 9.7 范围内呈现出较强的荧光强度,汞离子检测限可降低至 10 nM (2 ppb),远低于全球健康协会规定的饮用水中 $Hg^{2+}$ 最高含量标准(6 ppb). 该方法创新之处在于:向含有 $Hg^{2+}$ 和 $Cu^{2+}$ 的体系中加入 EDTA 用以掩蔽 $Cu^{2+}$,银纳米团簇探针呈现出较好的专一性,线性范围为 10 ~ 20 μM. Irudayaraj 等人[5] 用盐酸胍和三(2-羧乙基)膦(TCEP)对牛血清白蛋白进行预处理,



(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以变性后的 BSA 作为模板,采用 $NaBH_4$ 为还原剂合成了银纳米团簇. 该团簇对 $Hg^{2+}$ 有高灵敏度和高选择性的响应,检测限为 10nM. Wang 等人[6] 报道了以寡核苷酸为模板合成的银纳米簇荧光探针对 $Hg^{2+}$ 进行检测. 实验结果显示,在 pH 5 ~ 7 的范围内,银纳米团簇对 $Hg^{2+}$ 有高灵敏度、高选择性的响应,检出限为 5 nM,该值远低于美国环境保护局允许的饮用水中 $Hg^{2+}$ 最高含量标准(10 nM). Ma 等人[7] 以色氨酸 - 戊二醛混合物为还原剂,采用微波法合成了硝化色氨酸包裹的银纳米团簇,实现了 $Hg^{2+}$ 的高选择性、高灵敏度荧光检测. 该方法的线性工作范围为 1 pM ~ 10 mM,检测限为 0.658 pM.

### 1.1.2 $Cu^{2+}$ 的检测

铜元素是水中金属元素的一种,也是人体代谢的必需元素,然而过量的铜对生物体危害很大. 游离态的 $Cu^{2+}$ 可与蛋白质中的巯基结合,干扰巯基酶的活性,使水生生物致命. 因此,水中 $Cu^{2+}$ 含量的检测十分重要.

Chang 等人[8] 以 DNA 为模板合成 AgNCs,利用 $Cu^{2+}$ 对银簇荧光的增敏现象实现了 $Cu^{2+}$ 检测. 在 DNA-AgNCs 体系中加入 $Cu^{2+}$ 后形成一种 DNA-Cu/AgNCs 结构,该结构能使 DNA 更好的保护银纳米簇,从而使荧光增强,该方法检测限为 8 nM.

Luo 等人[9] 报道了一种以聚乙烯亚胺(PEI)为模板的 AgNCs - 半胱氨酸体系用于检测铜离子(图 1). 首先,以 PEI 为模板合成 AgNCs,向其中加入半胱氨酸使得 PMAA - 银纳米簇发生荧光猝灭,这是因为半胱氨酸分子中含有巯基,与银纳米簇形成的 Ag-S 键破坏了 AgNCs 的荧光性质. 再向体系中加入铜离子,半胱氨酸被氧化成二硫化物,失去猝灭效应,荧光恢复. 该方法成本低廉,简单易行,选择性高,灵敏度高,检测限仅为 2.3 nM.

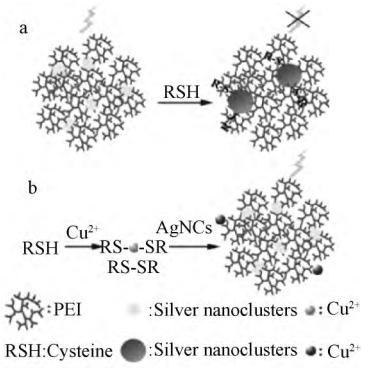



图 1 基于 PEI-Ag NCs 体系在半胱氨酸存在下检测 $Cu^{2+}$ 的示意图[9]

### 1.1.3 其他金属离子检测

Chen 等人[10] 以谷胱甘肽(GSH)为保护剂利用超声法合成 GSH@ AgNCs,利用 $Fe^{3+}$ 对 AgNCs 的荧光猝灭效应实现 $Fe^{3+}$ 的检测. 该方法灵敏度高,选择性好,线性检测范围为 0.5μM ~ 20μM,检测限为 $1.2 \times 10^{-7}$ M. 利用该方法对人类血清中血清铁进行检测,回收率为 84.12% ~ 101.70%. 此外,该课题组还发现 EDTA 的加入可以使猝灭的荧光得以恢复,这是因为 EDTA 和 GSH@ AgNCs 二者与 $Fe^{3+}$ 的结合竞争. 这一特性使该探针的再利用成为可能.

Chaiendoo 等人[11] 以 PMAA 为保护剂和还原剂,利用水热法合成 AgNCs,从而实现了 $Fe^{2+}$ 的比色法检测. 随着 $Fe^{2+}$ 浓度增加,银纳米团簇趋向于形成纳米颗粒,紫外吸收值增加. 该传感器的线性工作范围为 5 ~ 100 μM,检测限为 76 nM. 将传感器应用于补铁剂样品中的 $Fe^{2+}$ 含量检测,回收率为 98.6% ~ 116.8%.

## 1.2 阴离子的检测

卤素离子在工业、医学和生态环境中都起到重要的作用. 若土壤或饮用水中含有过量卤素,将会导致环境污染甚至人体生理失调. Qu 等人[12] 以 PEI 作为保护剂采用水热法合成银纳米团簇,实现了卤素离子($Cl^-$、$Br^-$、$I^-$)的检测. 检测原理为卤素离子与银簇中的银原子反应,诱导银纳米团簇的氧化刻蚀和团聚,最终导致荧光猝灭.

在食品加工中,硝酸盐是常用的发色剂和防腐剂,但是摄入过量的硝酸根离子会对人体产生巨大的危害,如引发癌症. Rao 等人[13] 用阳离子表面活性剂稳定的 AgNCs 修饰于银盘电极表面作为传感器,采用恒电位法使硝酸盐溶液发生电化学反应,从而检测硝酸根浓度. 该方法检测限极低,可以达到 $1.5 \times 10^{-15}$ M(图 2).

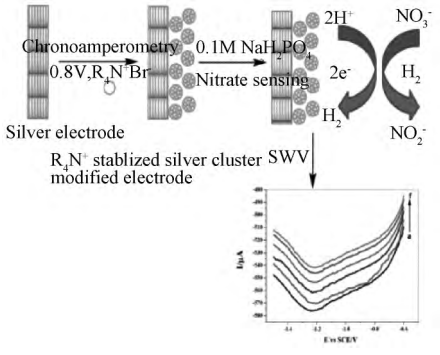



图 2 基于银纳米簇电极体系检测硝酸根离子的传感器示意图[13]



(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 1.3　有机小分子的检测

一些有机小分子如过氧化氢、半胱氨酸、抗坏血酸等在生物体中扮演着重要的角色. 它们大多具有生理活性,参与生物体的各种生理反应. 在医学上有时可以用来研究生理和病理过程、疾病的发病机制或者作为疾病诊断依据.

#### 1.3.1　过氧化氢的检测

在生物体内,过氧化氢几乎是所有氧化酶的反应产物. Luo 等[14] 利用银纳米簇比表面积大的催化性质,首次将 PEI 包裹的 AgNCs 通过滴涂法沉积在空白玻碳电极(GCE)上,基于银纳米簇在电极上能够催化过氧化氢的还原反应,通过测量电化学信号强度来检测过氧化氢的浓度,检测限为 1.8 μM.

#### 1.3.2　葡萄糖的检测

葡萄糖在葡萄糖氧化酶作用下产物之一为过氧化氢,通过检测过氧化氢的含量可间接检测葡萄糖的浓度.

Luo 等[15] 提出了一种基于 PEI-AgNCs 的过氧化氢和葡萄糖探针(图 3). 二者的检测限分别为 400 nM 和 $8.0\times10^{-7}$ M. 过氧化氢对于 PEI 包裹的 AgNCs 具有较强的荧光猝灭作用,因此可用于定量检测. 如前所述,该方法线性范围广,检测限低,制备简单. 此外,合成的纳米簇具有较强的荧光性质,具有良好的生物成像技术前景. 他们提出过氧化氢导致的荧光猝灭可能的机理如下:

$$Ag^0 + 2H_2O_2 \rightarrow Ag^+ + O_2\cdot^- + 2H_2O$$

在银纳米簇和过氧化氢作用过程中生成了一种羟基化的活泼物种,这种物质既可能是氢氧自由基:

$$AgNCs + H_2O_2 \rightarrow Ag^+ + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

$${}^{\cdot}OH + H_2O_2 \rightarrow O_2\cdot^- + H_2O + H^+$$

也可能是键和的羟基自由基:

$$AgNCs + H_2O_2 \rightarrow Ag-O(H)-OH$$

$$Ag-O(H)-OH \rightarrow Ag^+ + O_2\cdot^- + 2H_2O$$

还有可能生成了 Ag(Ⅱ) 反应活性中间体:

$$AgNCs + H_2O_2 \rightarrow AgOH^+ + OH^-$$

$$AgOH^+ + H_2O_2 + OH^- \rightarrow Ag^+ + O_2\cdot^- + 2H_2O$$

#### 1.3.3　半胱氨酸的检测

生物巯基化合物如半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽(GSH)参与了生物体内一些重要生理过程: 可逆氧化还原反应、排毒以及新陈代谢等. 因此,检测生物硫醇在人的体液中的含量水平对很多疾病如癌症、心血管疾病和阿耳茨海默而症等的早期诊断有十分重要的意义.

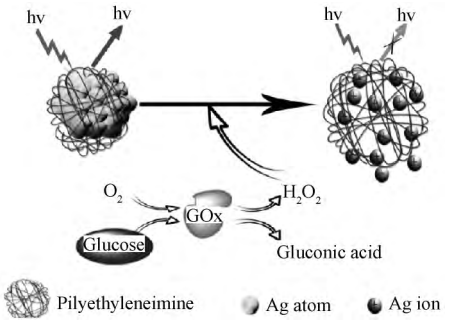



图 3　基于 $H_2O_2$ - PEI-AgNCs 体系的荧光猝灭发检测葡萄糖示意图[15]

Xie 等人[16] 设计了一种基于谷胱甘肽保护的银纳米簇的检测半胱氨酸的探针. 首先以 GSH 作为保护剂合成荧光银纳米簇. 向体系中加入 Cys 时,由于巯基的刻蚀作用使纳米簇分解为更小的物种,失去荧光性质,基于此原理来定量检测 Cys. 该方法的核心之处有两点: 第一,由于 Ag-S 键的作用,不含有巯基的氨基酸不能使银纳米簇发生荧光猝灭,因此该方法具有较强的选择性; 第二,GSH 体积较大,由于空间位阻作用使得一些含有巯基的较大分子也不能使银纳米簇发生荧光猝灭. 该种方法灵敏度高,选择性强,检测限小于 3nM. 类似的,Shang 等[17] 设计了以 PMAA 为模板的银纳米簇基于荧光猝灭原理来检测半胱氨酸,在 $2.5\times10^{-8}\sim6.0\times10^{-6}$ M 范围内呈现良好的线性关系,检测限为 20nM.

#### 1.3.4　其他有机小分子的检测

抗坏血酸是人类和高等灵长类生物体内的一种必需营养素,体内的缺乏会导致坏血病. 在生物体内,抗坏血酸是一种抗氧化剂,保护身体免于自由基的威胁,同时,它也是一种辅酶,参与人体的新陈代谢活动. Cao 等人[18] 报道了用 BSA 包裹的银纳米簇检测抗坏血酸的方法. 将 BSA 与 $AgNO_3$ 溶液混合,以少量 $NaBH_4$ 为还原剂,制备 BSA 包裹的银纳米簇,溶液中存在大量过量的 $Ag^+$. 加入抗坏血酸后,由于抗坏血酸具有还原性,将溶液中过量的 $Ag^+$ 还原成 Ag 原子,这些 Ag 原子在纳米簇上生长成粒径较大的银纳米颗粒. 通过比色法和紫外可见光分光光度法检测反应前后纳米簇和纳米颗粒的吸收性质,可定量检测抗坏血酸. 加入抗坏血酸后,由于纳米簇粒径的增大,溶液颜色由浅变深,紫外吸收峰增强. 在 2.0 ~ 5.0 μM 内呈现线性关系,检测限为 0.16 μM. 实验证明当不加入还原剂或 $Ag^+$ 非过量



(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

时,无法形成 AgNCs,这进一步验证了从 AgNCs 到 AgNPs 生长的过程(图 4).

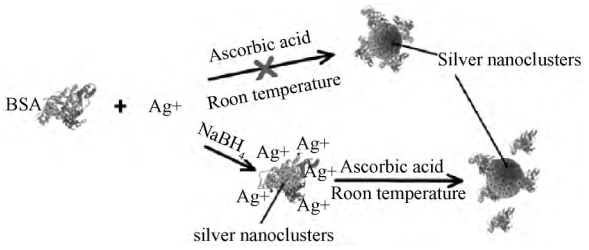



图 4 基于 BSA-Ag NCs 体系检测抗坏血酸示意图[18]

三聚氰胺是一种应用广泛的化工原料. 然而,长期的摄入可能导致肾脏和泌尿系统的疾病,因此检测饮用水及食品中的三聚氰胺含量十分必要. Xu 等人[19]报道了一种基于 DNA-AgNCs 荧光增强方式检测三聚氰胺的方法,在 DNA-AgNCs 体系中加入三聚氰胺后,银纳米簇的荧光得到了增强. 该方法检测限为 20 μM. 他们认为这种荧光增强的机理可能是三聚氰胺与 DNA 有强的相互作用,改变了银纳米簇周围的化学环境从而导致了荧光的增强.

## 2 总结和展望

银纳米团簇作为一种新型发光纳米材料,其小尺寸、低毒性和非间歇性发光等性质使其在生物应用中具有巨大前景. 由于其良好的荧光性质,银纳米团簇已被作为新型荧光探针,并广泛应用于灵敏度高、选择性好地检测金属离子、阴离子和有机小分子化合物,并展现了潜在的应用前景. 然而,作为新型的荧光材料,荧光银纳米团簇的发展也存在着障碍与挑战.

首先,在银簇的合成方法上还有很大的发展空间. 目前已报道的合成金属簇的路线其量子产率相对较低(<10%). 此外,合成的银簇粒径大小不一,需要进一步处理,这一点增加了银纳米簇尺寸表征和产量计算的困难. 因此,目前迫切需要一种方法来合成单一尺寸,荧光性强的银纳米簇.

其次,银纳米团簇除了作为荧光探针外还有许多其他性质,比如良好的生物兼容性、杀菌性、磁性等. 若能将这些性质综合利用,可以设计出生物探针或多功能探针. 另一种发展前景是将银纳米簇与其他金属(如 Au)或量子点复合制备复合纳米材料,这可能会改进银纳米簇的吸收和荧光性质,在医学成像上得到更广泛的应用.

荧光银纳米团簇由于具有尺寸小、生物相容性、荧光性质随尺寸可调等优点而受到广泛关注. 它们的合成及其在小分子化合物检测领域中的应用仍处于起步阶段. 在设计合成高质量、多功能银纳米团簇的同时,我们期待银纳米团簇能够用于更快速、灵敏、特异性检测中.

**致 谢**

感谢首都师范大学青年教学改革项目《<化学文献检索>课程实践教学研究》经费支持.

## 参 考 文 献

[1] Le G, Xavier H, Benjamin J, et al. Formation of fluorescent metal (Au, Ag) nanoclusters capped in bovine serum albumin followed by fluorescence and spectroscopy [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115: 10955 – 10963.

[2] Mathew A, Sajanlal P R, Pradeep T. A fifteen atom silver cluster confined in bovine serum albumin [J]. Journal of Materials Chemistry, 2011, 21: 11205.

[3] Holmes P, James K A F, Levy L S. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? [J]. Sci Total Environ, 2009, 408: 171 – 182.

[4] Liu J, Ren X L, Meng X W, et al. Sensitive and selective detection of $Hg^{2+}$ and $Cu^{2+}$ ions by fluorescent Ag nanoclusters synthesized via a hydrothermal method [J]. Nanoscale, 2013, 5: 10022 – 10028.

[5] Guo C, Irudayaraj J. Fluorescent Ag clusters via a protein-directed approach as a Hg(II) ion sensor [J]. Anal Chem, 2011, 83: 2883 – 2889.

[6] Guo W W, Yuan J P, Wang E K. Oligonucleotide-stabilized Ag nanoclusters as novel fluorescence probes for the highly selective and sensitive detection of the $Hg^{2+}$ ion [J]. Chem Commun, 2009, 23: 3395 – 3397.

[7] Bian P P, Xing L W, Liu Z M, et al. Functionalized-tryptophan stabilized fluorescent Ag nanoclusters: synthesis and its application as $Hg^{2+}$ ions sensor [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 203: 252 – 257.

[8] Lan G Y, Huang C C, Chang H T. Silver nanoclusters as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions [J]. Chem Commun, 2010, 46: 1257 – 1259.



(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[9] Zhang N, Qu F, Luo H Q, et al. Sensitive signal-on fluorescent sensing for copper ions based on the polyethyleneimine-capped silver nanoclusters-cysteine system [J]. Anal Chim Acta, 2013, 791: 46 - 50.

[10] Chen Z, Lu D T, Zhang G M, et al. Glutathione capped silver nanoclusters-based fluorescent probe for highly sensitive detection of $Fe^{3+}$ [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 202: 631 - 637.

[11] Chaiendoo K, Tuntulani T, Ngeontae W. A highly selective colorimetric sensor for ferrous ion based on polymethylacrylic acid-templated silver nanoclusters [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015, 207: 658 - 667.

[12] Qu F, Li N B, Luo H Q. Polyethyleneimine-templated Ag nanoclusters: a new fluorescent and colorimetric platform for sensitive and selective sensing halide ions and high disturbance-tolerant recognitions of iodide and bromide in coexistence with chloride under condition of high ionic strength [J]. Anal Chem, 2012, 84: 10373 - 10379.

[13] Dhanya S, Saumya V, Rao T. Synthesis of silver nanoclusters, characterization and application to trace level sensing of nitrate in aqueous media [J]. Electrochimica Acta, 2013, 102: 299 - 305.

[14] Li B L, Chen J R, Luo H Q, et al. Electrocatalytic activity of polymer-stabilized silver nanoclusters for hydrogen peroxide reduction [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2013, 76: 64 - 68.

[15] Wen T, Qu F, Li N B, et al. Polyethyleneimine-capped silver nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of hydrogen peroxide and glucose [J]. Anal Chim Acta, 2012, 749: 56 - 62.

[16] Yuan X, Tay Y, Dou X, et al. Glutathione-protected silver nanoclusters as cysteine-selective fluorometric and colorimetric probe [J]. Anal Chem, 2013, 85: 1913 - 1919.

[17] Shang L, Dong S J. Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 1569 - 1573.

[18] Yang X H, Ling J, Peng J, et al. Catalytic formation of silver nanoparticles by bovine serum albumin protected-silver nanoclusters and its application for colorimetric detection of ascorbic acid [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2013, 106: 224 - 230.

[19] Han S, Zhu S, Liu Z, et al. Oligonucleotide-stabilized fluorescent silver nanoclusters for turn-on detection of melamine [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 36: 267 - 270.

# Application of Fluorescent Silver Nanoclusters for the Determination of Small Molecules

Liu Chenyu　Lin Yuqing　Huang Xiaonan

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing　100048)

**Abstract**

Silver nanoclusters (AgNCs), composed of a few to hundreds of atoms, have emerged as a novel type of nanomaterials that have received much attention in recent years. AgNCs have small sizes (core size <2nm), large surface area, remarkable photophysical properties, facile surface modification and tunable fluorescence. As a novel class of fluorescent probes, fluorescent AgNCs have been used for the sensing of metal ions(e.g., $Hg^{2+}$、$Cu^{2+}$), and the significant biological molecules including hydrogen peroxide, glucose, cysteine and ascorbic acid. In this review, recent advances in fluorescence determination of biochemical sensing are highlighted. The future directions and perspectives in this research area are also discussed.

**Key words:** silver nanoclusters, biochemical, sensing.



(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net