

银纳米微粒对锌卟啉的荧光增强效用研究

王静静^{1,2} 刘莹^{1,2} 吴莹^{1,2} 孙松^{1,2}

¹江苏师范大学物理与电子工程学院, 江苏 徐州 221116

²江苏省先进激光材料与器件重点实验室, 江苏 徐州 221116

摘要 采用波长为407 nm的激光照射以银纳米颗粒作为荧光增强剂的成人全血溶液,研究其对血液中锌卟啉(ZPP)的荧光增强作用。实验结果表明,胶体状态的银纳米颗粒可以显著增强锌卟啉的荧光强度,增强效果最大可以达到5.2倍,且荧光增强效率随银胶加入量的增加呈现先增后减的趋势。分析认为,当溶液中锌卟啉分子和银纳米颗粒之间的距离满足荧光增强条件时,引起荧光强度的增加。加入大量的银胶颗粒时,分子之间作用距离逐渐减小,增强效果发生变化。研究结果表明使用银纳米颗粒可以实现低浓度血样中锌卟啉荧光的增强效应,为提高锌卟啉检测的灵敏度和精度提供有价值的参考。

关键词 光谱学; 荧光增强; 银纳米微粒; 人全血溶液; 锌卟啉

中图分类号 O433

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201535.0730001

Research on Fluorescence Enhancement Effect of Silver Nanoparticles on Zinc Porphyrin

Wang Jingjing^{1,2} Liu Ying^{1,2} Wu Ying^{1,2} Sun Song^{1,2}

¹School of Physics & Electronic Engineering, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China

²Jiangsu Provincial Key Laboratory of Advanced Materials and Laser Device, Xuzhou, Jiangsu 221116, China

Abstract Adult blood with silver nanoparticles is radiated by laser with wavelength of 407 nm, and the effect of colloidal silver nanoparticles on the fluorescence performance of zinc porphyrin (ZPP) in blood has been investigated. It has been found that colloidal silver nanoparticles can enhance fluorescence intensity of ZPP in low concentration human blood significantly, the highest enhancement ratio is about 5.2. Moreover, with the increase in silver colloid amount, the fluorescence enhancement efficiency increases firstly and then decreases. Theoretical analysis indicates that when the distance between ZPP molecules and silver nanoparticles in the solution meets fluorescence enhancement condition, the intensity of ZPP fluorescence can be improved. However, after adding extra silver particles, the distance between molecules will decrease, which is detrimental to the enhancement effect. The research shows that silver nanoparticles can enhance the fluorescence intensity of ZPP in low concentration human blood, which is important for the improvement of ZPP detection sensitivity and accuracy.

Key words spectroscopy; fluorescence enhancement; silver nanoparticles; whole blood; zinc porphyrin

OCIS codes 300.2530; 300.6280; 300.6490; 300.6550

1 引言

卟啉是人体血液中的主要光敏物质之一,血卟啉代谢是一种人体正常的生理活动,对维持人体正常的生理功能具有重要意义。锌卟啉由游离原卟啉与锌离子络合形成,可作为体内铅吸收的检测指标,健康机体中锌卟啉的正常含量为0.6~1.0 $\mu\text{m/L}$ 。有文献记载^[1],大多数恶性肿瘤(如肝癌、胃癌、肺癌、白血病等)周围及血液中锌卟啉含量明显增高。因此锌卟啉的检测对诊断机体健康状态具有非常重要的意义。常用的监

收稿日期: 2015-01-29; 收到修改稿日期: 2015-03-23

作者简介: 王静静(1988—),女,硕士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: jing1368518@163.com

导师简介: 刘莹(1970—),女,博士,教授,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: liuying70@126.com(通信联系人)

测锌卟啉含量的方法^[2]有很多,如高效液相色谱法、荧光法、分光光度法。其中荧光法具有方法简便、选择性好、重现性好、灵敏度高、取样量少及设备简单等优点,目前常用于锌卟啉相关实验研究中。由于锌卟啉在体内的含量很少,利用传统的荧光光谱技术对正常血液与非正常血液中的锌卟啉荧光进行研究,发现两种荧光的差异性不是很大,单纯依据两者的荧光强度进行诊断稍有困难,满足不了当前的研究和临床使用要求。因此亟需寻找一种提高光谱法检测血液中锌卟啉灵敏度的方法。

大量研究表明^[3-5],金属纳米颗粒具有特殊的表面等离子体共振作用,能增强粒子表面的局域电磁场,影响颗粒表面及周围荧光团的自由空间条件,进而可以增强一些物质的荧光光谱、表面增强拉曼散射光谱等,增强的光谱效应可显著提高光谱检测的灵敏度,在生物医学领域得到了广泛的应用^[6-7]。刘琨等^[6]以银胶体粒子为表面增强拉曼散射基底,获得了高信噪比的小鼠血清表面增强拉曼光谱,该光谱中可以清晰地看到血清中多种蛋白类分子的拉曼特征峰。通过探索性实验发现在荧光光谱技术的基础上引入金属纳米微粒增强荧光的技术,可以增强血液中锌卟啉在 570~700 nm 范围的荧光强度。本文基于银纳米颗粒对全血溶液的荧光增强,研究了银纳米颗粒对低浓度血液中锌卟啉的荧光增强效果,研究结果可以为精确监测锌卟啉的含量提供有价值的参考。

2 实验设备和样品

实验所用主要仪器为 Edinburgh Instruments 公司生产的 FLS920 型多功能光谱仪,激发光源是输出波长为 407 nm 的 PDL800-B 型皮秒脉冲半导体激光器。扫描 450~750 nm 范围内的样品发射光谱。

实验中,以柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)作为还原剂还原硝酸银($AgNO_3$)溶液得到银胶($AgNPs$),柠檬酸钠同时兼做稳定剂,实验中使用的柠檬酸钠和 $AgNO_3$ 溶液均为分析纯。有研究表明这种实验方法得到的银胶中,银纳米粒子会吸附柠檬酸根离子而形成扩散的双电层结构,使表面带有负电荷而阻止银粒子的聚集^[8-9]。透射电子显微镜(TEM)下观察到的图像如图 1 所示。从图 1 中可以看出,银纳米颗粒的分散性和均一性较好,形貌近似圆形,有少量的棒形,尺寸大约为 40~80 nm。

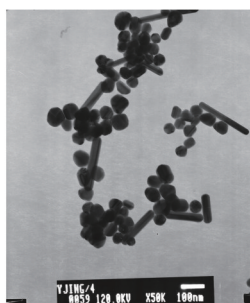


图 1 银胶 TEM 图像

Fig.1 TEM image of silver colloid

实验所用血样来自医院检验科的健康成人体检血样,置于血常规管(K2EDTA)中低温保存。人全血溶液配制过程中,以医用标准生理盐水作为溶剂。为了消除加入银胶溶液对血样浓度的影响,固定每份样品的体积为 2 mL,具体配制方法如表 1 所示。进行荧光光谱测量时,同组实验中采用相同的扫描参数,且血样来自同一人的同次血样采集。

表 1 0.4%全血溶液的荧光增强实验样品配制表

Table 1 Sample preparation table for fluorescence enhancement test of 0.4% whole blood solution

Sample No.	1	2	3	...	15	16	17
AgNPs /mL	0	0.4	0.5	...	1.7	1.8	1.9
Normal saline /mL	1.992	1.592	1.492	...	0.292	0.192	0.092
Whole blood / μ L	8	8	8	...	8	8	8
Total /mL	2	2	2	...	2	2	2

3 实验结果

3.1 正常全血溶液的光谱研究

3.1.1 人全血溶液的荧光光谱

采用波长为 407 nm 的激发光激发不同浓度的正常全血溶液,其浓度分别为 0.4%、0.8%、1.5%、4%、7%和 10%,获得不同浓度的全血溶液荧光光谱,如图 2 所示。由图 2 可知,荧光光谱中会出现 4 个很明显的峰,峰值分别位于 473, 515, 560 和 600 nm 左右,其中锌卟啉在 590 nm 左右有一个发射峰^[10-11],隐藏在 600 nm 左右的宽发射带内而不可见。

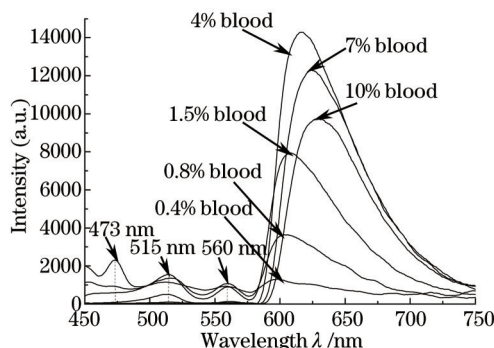


图 2 人全血溶液荧光光谱

Fig.2 Fluorescence spectra of human blood solution with different concentrations

3.1.2 人全血溶液的吸收光谱

为了研究银胶对血液是否有荧光增强作用及如何达到最好的增强效果,实验中测量了银胶的吸收光谱和全血溶液的吸收光谱,如图 3 所示。从图 3 可以看出,银胶在 350~550 nm 范围内有一吸收带,峰位置在 435 nm 处,为银胶的表面等离子体共振波长,分析认为制备银纳米颗粒大小不均匀,银纳米颗粒吸收峰的位置随颗粒尺寸的增加发生了红移形成这一较宽的吸收带。全血溶液有 5 个吸收峰,分别位于 277、344、417、542 和 577 nm 处,其中 417 nm 处最强。

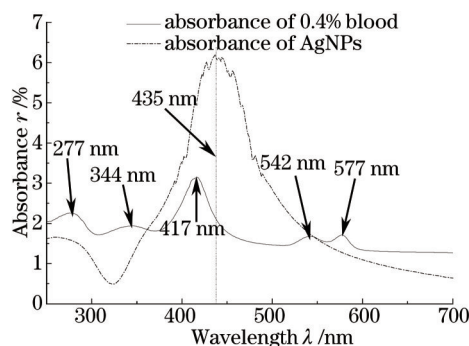


图 3 银胶和全血溶液的吸收光谱

Fig.3 Absorption spectra of colloidal silver solution and blood solution

有研究表明,当金属纳米颗粒的表面等离子体共振波长与荧光分子的吸收带重合时,金属纳米颗粒表面产生的局域电磁场增加荧光团的激发率,会达到最大的荧光增强效果^[12]。实验中银纳米颗粒在 435 nm 附近的等离子体共振波长与血样在 417 nm 处的吸收带有很好的重合,理论上预测银纳米颗粒增强锌卟啉的荧光强度存在可能性。

3.2 人全血溶液的荧光增强光谱研究

3.2.1 银胶对全血溶液荧光增强作用研究

对加入相同量银胶的 0.4% 全血样品和 4% 全血样品进行比对实验,样品配制参照表 1。分别得到两组样品在 570~750 nm 范围内的荧光增强光谱图,如图 4 所示,其中“+N mL AgNPs”表示在该份全血溶液样品中加入了 N mL 银胶溶液,其他与图中意义相同。

根据图 4 分析 0.4% 全血溶液在 597 nm 处的荧光峰,银纳米颗粒的加入对该峰的荧光强度有明显的增强

作用。4%全血溶液的荧光峰位置在 612 nm 左右,银纳米颗粒的加入使这个位置的荧光峰强度发生了严重的荧光淬灭,峰的位置没有明显变化。

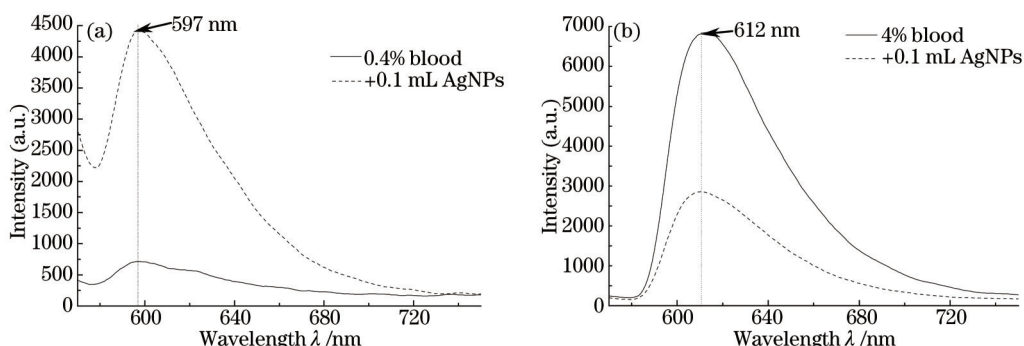


图4 全血溶液荧光增强光谱图

Fig.4 Fluorescence enhanced spectra of whole blood solution

鉴于银纳米颗粒对 0.4%全血样品荧光光谱有明显的增强作用,在后续实验中将使用该浓度的血液样品进行不同量的银纳米颗粒对全血溶液荧光增强效果的研究。

3.2.2 不同银胶量的增强效果研究

为了详细研究加入不同量的银纳米颗粒对全血溶液中锌卟啉成分荧光增强的效果,对加入不同量银胶的 0.4%全血样品进行了比对实验,荧光增强实验中样品具体制备方法如表 1 所示。

获得表 1 中 1~17 号样品的荧光增强光谱,部分结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出,该组样品中获得的 0.4%全血溶液的荧光光谱图中荧光峰的位置在 598 nm 左右,随着银胶加入量的增加,银纳米颗粒对 598 nm 处的荧光增强作用呈现先增后减的趋势。

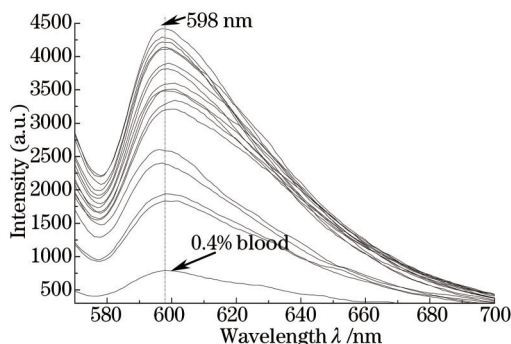


图5 加入不同量银胶的 0.4%全血溶液荧光增强光谱

Fig.5 Fluorescence enhanced spectra of 0.4% whole blood solution with various amount of silver nanoparticles added

4 分析讨论

从图 5 中可以看出,580~700 nm 是一个宽展的发射带,其中隐藏了锌卟啉在 590 nm 附近的荧光发射峰。特对这 17 份荧光光谱的二次导数进行分析,部分结果如图 6 所示。所有光谱的二次导数在 590 nm 左右均有明显的极小值。这说明 17 份样品在 590 nm 左右有被隐藏的荧光峰,统计计算得出这 17 份光谱中在 590 nm 周围的峰平均位置为 591.5 nm,该发射峰是锌卟啉的特征峰。

为了详细研究银胶加入量与荧光增强效果的关系,得到 591 nm 处的荧光增强率随银胶加入量变化的曲线,如图 7 所示。其中荧光增强倍率通过(1)式得到,式中 I_A 为加入一定银胶量的全血样品在 591 nm 处的荧光发射峰强度, I_B 为纯 0.4%全血溶液在 591 nm 处的荧光发射峰强度。

$$N = \frac{I_A - I_B}{I_B} \quad (1)$$

由图 7 可以看出,随着银胶加入量的增加,银纳米颗粒对锌卟啉在 591 nm 处荧光的增强效果呈现先增后减的趋势。当锌卟啉的加入量为 1.0 mL 左右时获得最强的荧光增强效果,约为 5.2 倍。

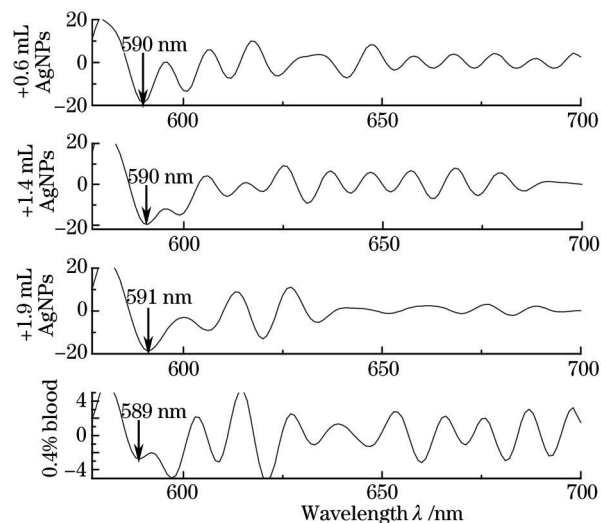


图6 部分荧光增强光谱的二次导数

Fig.6 Second derivatives of partial fluorescence enhanced spectra

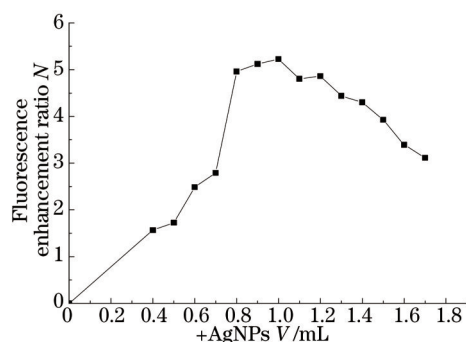


图7 锌卟啉荧光增强倍率随银胶加入量的变化图

Fig.7 Zinc porphyrin fluorescence enhancement ratio with the amount of silver variation

有研究表明,金属纳米微粒增强荧光的途径主要有两种^[10]:1) 金属纳米微粒的表面等离子体共振增强局域电磁场,局域电磁场增加荧光团的激发率;2) 局域电磁场的存在引起荧光量子产率的增加,提高了荧光分子的辐射衰减率。理论上,当金属纳米微粒的表面等离子体共振波长与荧光团的吸收带重合时,易发生第一种荧光增强机制,可以获得较好的荧光增强效果^[13]。实验中银胶的吸收峰在435 nm左右,吸收带为350~550 nm,恰与人全血溶液的最强吸收峰417 nm有重合,因此银纳米颗粒可以起到增强全血溶液荧光发射峰的作用。当锌卟啉受到400 nm左右的激发光激发时,吸收光子并从基态跃迁到激发态,产生 $^1S_{1,0} \rightarrow ^0S_{0,0}$ 的能级跃迁,发射590 nm的荧光^[14]。

金属微粒与荧光团之间的距离 d 影响荧光团的激发效率和辐射衰减率^[15],当 d 在5~25 nm范围内,荧光团的激发效率和辐射衰减率被提高,易产生有效的荧光增强。当 $d < 5$ nm时,荧光团会产生非辐射衰减而导致荧光淬灭。实验中,在固定2 mL的实验样品中,随着银纳米颗粒数量的增加,银纳米粒子与血样中各种荧光团之间的距离 d 会逐步减小,从而引起荧光增强效果发生改变。

5 结 论

1) 全血溶液的吸收带与银纳米颗粒的表面等离子体共振波长有很好的重合,在银纳米颗粒产生的局域电磁场影响下,锌卟啉的激发率显著增加,从而使锌卟啉的荧光得到增强。

2) 适当银胶的加入对低浓度血液中锌卟啉在591 nm处的荧光发射峰起到了荧光增强作用。随着银胶加入量的增加,对锌卟啉荧光的增强效果呈先增后减的趋势。当银胶加入量在1.0 mL左右时达到最佳荧光增强效果,荧光增强倍数可以达到5.2倍。

3) 在固定 2 mL 体积的样品中,不同银胶颗粒数量影响着银胶颗粒和锌卟啉分子的距离,对锌卟啉荧光分子的荧光产生了不同的增强效果。

研究结果对进一步提高锌卟啉荧光检测灵敏度、扩大荧光技术的应用范围提供了更多的可能,为金属荧光增强技术进一步应用于血液荧光检测的研究提供了参考。金属增强荧光技术在理论上还有待进一步完善和实验验证,可以通过建立合理的理论模型等多种手段深入研究金属增强荧光的规律,进一步扩大金属纳米微粒增强荧光的应用范围。

参 考 文 献

- 1 孟继武,西坂刚,深海隆明,等. 肿瘤发展过程中卟啉代谢的特点及其在肿瘤诊断上的意义[J]. 科学通报, 1995, 12(40): 1144-1147.
- 2 Li Yuandong. High performance liquid chromatography method for simultaneous determination of serum zinc porphyrins and protoporphyrin[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2003, 20(6): 904-905.
黎远冬. 高效液相色谱法同时测定血清中锌卟啉和原卟啉的含量[J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(6): 904-905.
- 3 Sun Song, Cai Tingdong, Liu Ying, *et al.*. Research on spectral characteristics and mechanism of ammonium sulfate solution[J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(3): 0330004.
孙 松,蔡廷栋,刘 莹,等. 硫酸铵溶液的拉曼光谱特征及其产生机理研究[J]. 光学学报, 2014, 34(3): 0330004.
- 4 Weng Shizhuang, Zheng Shouguo, Li Pan, *et al.*. Quantitative analysis of fenitrothion based on surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(8): 0815001.
翁士状,郑守国,李 盼,等. 基于表面增强拉曼光谱的杀螟硫磷定量分析[J]. 中国激光, 2013, 40(8): 0815001.
- 5 Liu Yu, Zhang Haitao, Xu Shuping, *et al.*. Study on the refractive index and metal film thickness on surface plasmon resonance field enhanced surface-enhanced Raman scattering[J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(12): 1207001.
刘 钰,张海涛,徐抒平,等. 折射率和金属膜厚度对表面等离子体共振场增强表面增强拉曼散射的影响研究[J]. 中国激光, 2013, 40(12): 1207001.
- 6 Liu Kun, Wu Shifa, Chen Maodu, *et al.*. A novel silver colloid as Raman spectroscopy analysis of surface substrate in mice serum enhancement[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(2): 339-342.
刘 琨,吴世法,陈茂笃,等. 以新型银胶为衬底小鼠血清的表面增强拉曼光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(2): 339-342.
- 7 Xiong Yang, Si Minzhen, Gao Fei, *et al.*. Study on cervical oxyhemoglobin using near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(1): 0115001.
熊 洋,司民真,高 飞,等. 基于 NIR-SERS 光谱技术分析宫颈氧合血红蛋白[J]. 中国激光, 2015, 42(1): 0115001.
- 8 Fendler J H. Nanoparticles and Nanostructured Films[M]. New York: Wiley, 1998: 259.
- 9 Huang Hua, Wu Shifa. The preparation of nanometer silver colloid by photochemical method and its character study[J]. Acta Photonica Sinica, 2005, 34(11): 1643-1646.
黄 华,吴世法. 纳米银胶的光化学制备及其特性研究[J]. 光子学报, 2005, 34(11): 1643-1646.
- 10 Zhang Feng, Liu Ying, Yang Chengfang, *et al.*. Decay and damage mechanism of laser irradiated red blood cells[J]. Acta Photonica Sinica, 2010, 39(4): 675-679.
张 枫,刘 莹,杨成方,等. 激光照射血细胞的衰变规律和损伤机制研究[J]. 光子学报, 2010, 39(4): 675-679.
- 11 Liu Ying, He Wenliang, Liu Cheng. Research on the fluorescence polarization characteristic of alcoholism blood[J]. Acta Optica Sinica, 2010, 30(7): 2065-2068.
刘 莹,何文亮,刘 诚. 乙醇中毒血液荧光偏振特性研究[J]. 光学学报, 2010, 30(7): 2065-2068.
- 12 He Xin, Zhang Mei, Feng Jinyang, *et al.*. The latest research progress of metallic silver enhanced fluorescence[J]. Rare Metal Materials and Engineering, 2011, 40(3): 559-564.
何 鑫,张 梅,冯晋阳,等. 金属银增强荧光的最新研究进展[J]. 稀有金属材料与工程, 2011, 40(3): 559-564.
- 13 Stranik O, McEvoy H M, Donagh C M, *et al.*. Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications[J]. Sensors and Actuators B, 2005, 107(1): 148-153.
- 14 Peng Changde, Gao Shumei, Liu Ying, *et al.*. LED induced blood fluorescence spectroscopy[J]. Applied Laser, 2003, 23(4): 232-234.
彭长德,高淑梅,刘 莹,等. LED 诱导人血液荧光光谱研究[J]. 应用激光, 2003, 23(4): 232-234.
- 15 Lakowicz J R. Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 298(1): 1-24.

栏目编辑: 吴秀娟