

聚苯乙烯纳米探针与丁二酮肟反应耦合共振瑞利 散射-能量转移光谱法测定痕量尿素

姚东梅^{1,2}, 卢珊珊¹, 温桂清¹, 梁爱惠¹, 蒋治良^{1*}

1. 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室(广西师范大学), 广西 桂林 541004
2. 河池学院化学与生物工程学院, 广西 宜州 546300

摘要 尿素是氨基酸代谢的最终产物,其作为氮肥在农业中用途广泛。但当尿素的浓度在人体中积累到一定值时,它将对人体的器官产生一定的损害。因此,建立一种简便、灵敏的尿素检测方法具有重要的意义。共振瑞利散射(RRS)是一种操作简便,灵敏度好及耗能低的分子光谱技术,其在化学及生命科学等领域都得到了广泛的应用。目前,共振瑞利散射技术应用于尿素的定量分析亦有报道,但还是存在操作复杂和灵敏度低等问题。该工作开发了一种简单、快速及灵敏的共振瑞利散射-能量转移(RRS-ET)新方法应用于人体尿液中痕量尿素(UR)的检测。在盐酸及稳定剂氨基硫脲(TSC)存在条件下,丁二酮肟(DMG)与UR反应生成稳定的红色二噁衍生物4,5-二甲基-2-咪唑酮(DIK),DIK作为能量受体能与能量供体聚苯乙烯纳米探针(PS)发生RRS-ET现象,使得体系的RRS信号发生变化。在一定范围内,随着UR浓度的增大,体系在500 nm处的RRS强度呈线性降低。为了达到最佳检测效果,对影响体系信号的因素进行了优化,结果表明,当选择HCl溶液浓度为 $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,TSC溶液浓度为 $0.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,DMG溶液浓度为 $19.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,PS的浓度为 $17.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,水浴温度为 $80 \text{ }^\circ\text{C}$,水浴反应时间为20 min时,体系获得最佳检测效果。在最佳条件下,聚苯乙烯纳米微粒体系的共振瑞利散射信号降低值与UR浓度在 $2.0 \sim 3200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系,检出限为 $2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时,考察了共存物质对 $2000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ UR测定情况的影响。结果表明, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Na^+ , Zn^{2+} , $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Mn^{2+} , Cr^{3+} , $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SO_4^{2-} , NO_3^- , Co^{2+} , Fe^{3+} , $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Cr^{6+} , Ca^{2+} 不干扰UR的测定,说明该方法有较好的选择性。最后,将该RRS-ET方法应用于尿液中UR的测定,样品加标回收率在 $94.19\% \sim 96.94\%$ 之间,相对标准偏差(RSD)在 $4.20\% \sim 6.35\%$ 之间,检测结果令人满意。据此,建立了一个共振瑞利散射-能量转移分析尿素的新方法,方法操作简单、灵敏度高。

关键词 聚苯乙烯纳米微粒; 尿素; 丁二酮肟; 共振瑞利散射; 能量转移

中图分类号: O657.39 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)11-3590-04

引言

随着现代科技的不断进步,微纳米尺度的材料的发展越来越受到学术界的关注,人们也愈益认识到新型功能材料的重要性。聚苯乙烯纳米微粒(PS)是一种易得的高分子材料,可通过乳液聚合、分散聚合、悬浮聚合、种子溶胀等方法来制备^[1-3]。PS具有球形度好、比表面积大、骨架密度低、吸附

性强、力学强度高、与不同极性的有机溶剂兼容性好等诸多优点,在荧光分析^[4-5],电化学检测^[6-7],细胞成像^[8]等领域已有应用。Cui等^[4]通过在PS磁珠上将大量量子点(QD)进行叠层组装,开发了一种基于QD的新扩增荧光标签,用于双DNA目标检测。该方法灵敏度高,但是需要进行标记,操作较复杂。Wang等^[7]基于多层CdS量子点功能化PS作为生物探针和氧化石墨烯-聚苯胺复合材料的信号放大策略,开发了一种新型的超灵敏电化学生物传感器,用于 $10 \sim 1.0$

收稿日期: 2019-11-22, 修订日期: 2020-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(21767004, 21667006)及珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室研究基金项目(ERESP2018201)资助

作者简介: 姚东梅, 1985年生, 广西师范大学化学与药学院博士研究生 e-mail: dmyao47@163.com

* 通讯联系人 e-mail: zljjiang@mailbox.gxnu.edu.cn

$\times 10^7/\text{mL}^{-1}$ K562 细胞的检测。该方法具有很高的特异性和灵敏度。Qu 等^[8]制备了聚乙二醇(PEG)接枝的聚苯乙烯微球,基于 Fe^{3+} 在细胞质中的选择性荧光猝灭作用,可用于细胞内 Fe^{3+} 的成像。该方法中 PS 具有良好的生物相容性和可忽略的细胞毒性,但是实验成本较高。据我们所知,尚未发现 PS 探针用于共振瑞利散射(RRS)光谱分析,因此,研究 PS 在 RRS 分析中的应用具有重要意义。

RRS 由于其灵敏、快速、简便等特点,在生物分析、药物分析及环境分析等领域得到应用。Ren 等^[9]基于 Hg^{2+} 触发的核酸外切酶 III 辅助靶标的回收和 G-四链体纳米线的生长用于信号放大,构建了一种新型的非标记 RRS 适体传感器,用于检测 $50.0 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 500.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ 。共振能量转移是一种光学现象。在光谱分析中,当供体的 RRS 光谱与受体的吸收光谱有一定的重叠时,在它们二者之间就可以发生共振瑞利散射-能量转移(RRS-ET)现象。基于该现象建立的分析方法已在环境分析,食品分析及生物分析等^[10]领域得到应用。近年来,共振瑞利散射能量转移也有报道。Wen 等^[10]将 Sb(III) 还原为 SbH_3 气体,并将其引入 I_3^- -氧化石墨烯(GO)溶液中,基于 I_3^- 的吸收峰和 GO 的 RRS 峰重叠,可以在供体 GO 和受体 I_3^- 之间发生了共振瑞利散射能量转移现象,从而实现 $2.1 \sim 376.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Sb}$ 的检测。目前,尿素测定方法有电化学法、光度法、表面增强拉曼光谱法、全反射衰减-傅里叶变换红外光谱法、光学生物传感器、荧光法等^[11-16]。本文利用尿素与丁二酮肟在强酸和稳定剂氨基硫脲作用下共热生成稳定的红色二嗪衍生物 4,5-二甲基-2-咪唑酮与聚苯乙烯纳米微粒发生 RRS-ET 现象,体系在 500 nm 处的 RRS 信号强度线性降低,建立了检测尿素的简便、灵敏度高的 RRS-ET 分析新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-7000 荧光光谱仪(Hitachi Co. Ltd); TU-1901 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); FEI Quanta 200 场发射环境扫描电子显微镜(Thermo Fisher, USA); HH-S2 电热恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂); SK3300 超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

聚苯乙烯纳米微粒(Polystyrene nanoparticles, PS)采用乳液聚合制备,其粒径为 $(50.0 \sim 100 \text{ nm})$, Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd)。 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚苯乙烯纳米微粒溶液制备:因该微球不能直接溶于水,但可采用以下方法制备其水溶液。准确称取 12.5 mg 聚苯乙烯纳米微粒于 20 mL 甲苯中,溶解完全后加入 50 mL 水,超声至甲苯全部挥发完,溶液呈深乳白色,即得到 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚苯乙烯纳米微粒溶液。 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 尿素(UR)储备液:准确称取 0.1 g UR 溶于二次水中,定容到 100 mL 容量瓶中得到 $16.65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ UR 标准液,使用时逐级稀释; $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液:取 5 mL $12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 于干净的 10 mL 量筒中加入 5 mL 二次蒸馏水; 3% 丁二酮肟(DMG): 0.18 g DMG 溶解于 6 mL $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 中得到 3% DMG 溶液,现配

现用; $2.2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胺基硫脲(TSC); 0.2004 g TSC 溶于 100 mL 二次水中得到 $2.2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSC 溶液备用。所用试剂均为分析纯级,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 方法

准确吸取一定量 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ UR 溶液于试管中,加入 $250 \mu\text{L}$ $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, $20 \mu\text{L}$ $2.2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSC, $150 \mu\text{L}$ 3% DMG, 摇匀,置 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热 20 min , 冷却后,加入 $140 \mu\text{L}$ $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚苯乙烯纳米微粒,用二次蒸馏水定容至 2 mL , 静置 8 min 。用日立 F-7000 荧光光谱仪(电压 350 V , 狭缝 5 nm)获得溶液在 $200 \sim 700 \text{ nm}$ 的共振瑞利散射光谱,记录 500 nm 处的 RRS 强度(I),以不加 UR 作空白记录空白强度(I_0),并计算 $\Delta I = I_0 - I$ 。

2 结果与讨论

在酸性条件下,丁二酮肟在水溶液中首先反应生成中间产物双乙酰,双乙酰进一步与尿素在稳定剂 TSC 的作用下共热生成稳定的红色二嗪衍生物 DIK,作为 RRS 供体的 PS 与受体 DIK 之间发生共振瑞利散射能量转移,随着 UR 浓度的增加,生成的红色产物 DIK 越多,共振瑞利散射能量转移现象越明显,体系在 500 nm 处的 RRS 信号强度线性降低,并且在一定范围内,RRS 信号降低值与 UR 浓度成线性关系,据此可建立检测 UR 的 RRS-ET 分析方法。

2.1 RRS 和吸收光谱

在强酸及 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中,研究了 PS 体系的 RRS 光谱。该体系在 400 及 500 nm 处分别有一个 RRS 峰, 500 nm 处 RRS 信号随着 UR 浓度增大逐渐降低(图 1),主要是由于随着 UR 的浓度增大,生成的 DIK 越来越多,RRS-ET 现象越来越明显的原因。紫外吸收光谱表明,分析体系在 530 nm 处有吸收峰,且随着 UR 浓度的增大,体系的吸光度逐渐增大,是因为生成的 DIK 越来越多。

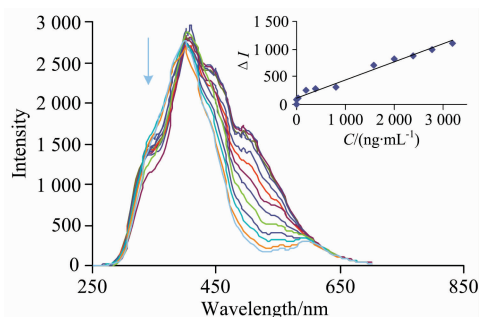


图 1 UR-DMG-PS 体系的 RRS 光谱

($0, 2, 20, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, 3200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) UR + $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl + $0.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSC + $19.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMG + $17.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PS

Fig. 1 RRS spectra of UR-DMG-PS system

($0, 2, 20, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, 3200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) UR + $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl + $0.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSC + $19.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMG + $17.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PS

2.2 聚苯乙烯微球的表征

PS 在 375 及 500 nm 处分别有一个 RRS 峰,随着 RRS

浓度的增大,其在 375 及 500 nm 处的 RRS 信号逐渐上升。375 nm 处的 RRS 峰不发生共振能量转移,500 nm 处谱峰与 DIK 之间发生共振能量转移。PS 的吸收峰出现在 310~330 nm 处左右,随着浓度增大,吸收信号逐渐增大,波长发生微小红移,可能与其浓度有关。

按照实验方法制备样品,取 2 μL 样品溶液滴到硅片表面,自然晾干后用扫描电子显微镜记录样品形貌,从图 2 可知,聚苯乙烯微球呈球形结构,颗粒粒度不够均匀,平均粒径为 63 nm。

2.3 分析优化条件

对影响测定的试剂浓度进行研究。结果表明,当 HCl 溶液浓度为 0.75 mol \cdot L⁻¹, TSC 溶液浓度为 0.22 mmol \cdot L⁻¹, DMG 溶液浓度为 19.35 mmol \cdot L⁻¹, 聚苯乙烯纳米微粒的浓度为 17.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水浴温度为 80 $^{\circ}\text{C}$, 水浴反应时间为 20 min 时,体系 ΔI 最大。因此,选择以上条件作为反应最佳条件。

2.4 工作曲线

按照实验结果绘制了体系的工作曲线。对于 UR-DMG-PS 体系,在一定范围内,随着 UR 浓度的增大,体系的 ΔI 值逐渐增大,尿素浓度在 2.0~3 200 ng \cdot mL⁻¹ 范围内与其

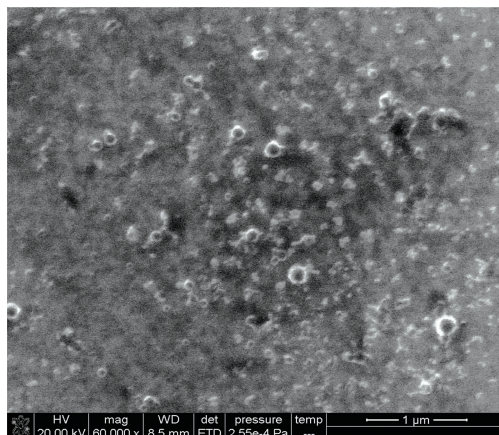


图 2 聚苯乙烯纳米微粒的扫描电镜图像

Fig. 2 Scanning electron microscope image of PS

共振瑞利散射信号降低值 ΔI 呈良好的线性关系(图 1),线性方程为 $\Delta I = 0.327c + 108.8$, 线性相关系数为 0.9764, 检出限 2.0 ng \cdot mL⁻¹。与已报道的方法比较(表 1), 本方法操作简便、灵敏度高,是一种快速检测 UR 的新方法。

表 1 测定尿素的分析方法的比较

Table 1 Comparison of analytical methods for detecting UR

测定方法	线性范围	检出限	注释	参考文献
电化学法	0~40 mmol \cdot L ⁻¹	—	方法操作方便,但灵敏度低	[11]
光度法	4~80 mmol \cdot L ⁻¹	—	方法操作方便,但灵敏度低	[12]
SERS	8.25~825 nmol \cdot L ⁻¹	4.92 nmol \cdot L ⁻¹	简便,灵敏	[13]
红外光谱法	—	0.1 mmol \cdot L ⁻¹	方法快速,但准确度不高	[14]
生物传感器	—	—	方法简便,但是定量分析难	[15]
荧光法	0~10 mmol \cdot L ⁻¹	0.072 mmol \cdot L ⁻¹	方法操作方便,但灵敏度低	[16]
RRS-ET	2.0~3 200 ng \cdot mL ⁻¹	2.0 ng \cdot mL ⁻¹	方法操作简单快速、灵敏度高	本法

2.5 干扰离子的影响

按实验方法考察了共存离子对测定 2 000 ng \cdot mL⁻¹ UR 的情况。结果表明,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Na⁺, Zn²⁺, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Mn²⁺, Cr³⁺, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SO₄²⁻, NO₃⁻, Co²⁺, Fe³⁺, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cr⁶⁺ 和 Ca²⁺ 不干扰测定,说明该方法有较好的选择性。

2.6 样品测定

取某人不同时间段 A, B 和 C 的三种尿液,分别稀释 100 倍后得到样品储备液,然后取 10 μL 样品储备液按照实验方法测定。其含量分别为 179.1, 282.3 和 466.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 尿素,样品加标回收率在 94.19%~96.94%之间, RSD

在 4.20%~6.35% 之间。

3 结 论

利用 PS 在超声条件下溶解于甲苯中得到乳白色悬浮液作为共振瑞利散射能量的供体。在强酸及稳定剂氨基硫脲存在条件下,丁二酮肟与尿素共热生成稳定的红色二嗪衍生物 4,5-二甲基-2-咪唑酮与聚苯乙烯纳米微粒结合发生 RRS-ET 效应,据此建立了 RRS-ET 分析尿素的新方法,方法操作简单、灵敏度高、选择性好等特点。

References

- [1] Chandler W L, Yeung W, Tait J F. J. Thromb. Haemostasis, 2011, 9: 1216.
- [2] Sukerkar P A, Rezvi U G, MacRenaris K W, et al. Magn. Reson. Med., 2011, 65: 522.
- [3] Kim D, Jang D, Lee H, et al. Polymer, 2019, 185: 121938.
- [4] Cui H, Song W, Cao Z, et al. Luminescence, 2016, 31: 281.
- [5] Qu J, Li S, Xu Y, et al. Sensor. Actuat. B-Chem., 2018, 272: 127.

- [6] Guo J, Lin F, Chang C, et al. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2020, 302: 127185.
- [7] Wang J, Wang X, Tang H, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 100: 1.
- [8] Qu J, Xu Y, Liu Y, et al. *Colloid. Surface. B*, 2017, 152: 475.
- [9] Ren W, Zhang Y, Chen H, et al. *Anal. Chem.*, 2016, 88: 1385.
- [10] Wen G, Zhang X, Li Y, et al. *Food Chem.*, 2017, 214: 25.
- [11] Ahmad R, Tripathy N, Park J, et al. *Chem. Commun.*, 2015, 51: 11968.
- [12] Shi H, Chen X, Li L, et al. *Dalton T.*, 2014, 43: 9016.
- [13] Liang A, Wang H, Yao D, et al. *Food Chem.*, 2019, 271: 39.
- [14] Jha S N, Jaiswal P, Borah A, et al. *Food Bioprocess Tech.*, 2015, 8: 926.
- [15] Gharsallah Z, Najjar M, Suthar B, et al. *Opt. Quant. Electron.*, 2018, 50: 249.
- [16] Chen M, Wu W, Chen Y, et al. *RSC Adv.*, 2018, 8: 41432.

Determination of Trace Urea by Resonance Rayleigh Scattering-Energy Transfer Spectroscopy Coupled With Polystyrene Nanoprobe and Dimethylglyoxime Reaction

YAO Dong-mei^{1, 2}, LU Shan-shan¹, WEN Gui-qing¹, LIANG Ai-hui¹, JIANG Zhi-liang^{1*}

1. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University), Guilin 541004, China

2. College of Chemistry and Biology Engineering, Hechi University, Yizhou 546300, China

Abstract Urea is the final product of amino acid metabolism and is widely used in agriculture as a nitrogen fertilizer. However, when the concentration of urea accumulates to a certain value in the human body, it will cause certain damage to the organs of the human body. Therefore, it is of great significance to establish a simple and sensitive method for urea detection. Resonance Rayleigh Scattering (RRS) is a molecular spectroscopy technique with simple operation, good sensitivity and low energy consumption. It has been widely used in the fields of chemistry and life sciences. At present, the application of the resonance Rayleigh scattering technique to the quantitative analysis of urea has also been reported, but there are still problems such as complicated operation and low sensitivity. In this paper, a simple, rapid and sensitive resonant Rayleigh scattering-energy transfer (RRS-ET) method is developed for the detection of trace urea (UR) in human urine. In the presence of HCl and the stabilizer thiosemicarbazone (TSC), dimethylglyoxime (DMG) can react with UR to form a stable red diazine derivative of 4,5-dimethyl-2-imidazolidone (DIK). The RRS-ET phenomenon occurs between DIK as an energy acceptor and an energy donor polystyrene nanoprobe (PS), which causes the RRS signal of the system to change. Within a certain range, as the UR concentration increases, the RRS intensity at 500 nm decreases linearly. In order to achieve the best detection results, the factors affecting the system signal are optimized. The results show that when the concentration of HCl solution is $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the concentration of TSC solution is $0.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the concentration of DMG solution is $19.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the concentration of PS is $17.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the temperature of the water bath is $80 \text{ }^\circ\text{C}$, and the bath time is 20 min, the system obtains the best detection effect. Under the optimal conditions, the resonance Rayleigh scattering signal reduction value of the polystyrene nanoparticle system is linear with the UR concentration in the range of $2.0 \sim 3200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the detection limit is $2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. At the same time, the effect of coexisting substances on the determination of $2000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ UR is investigated. The results show that $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of Na^+ , Zn^{2+} , $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of Mn^{2+} , Cr^{3+} , $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of SO_4^{2-} , NO_3^- , Co^{2+} , Fe^{3+} , $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cr^{6+} and Ca^{2+} did not interfere with UR determination. The results show that the method has good selectivity. Finally, the RRS-ET method is applied to the determination of UR in the urine. The recovery of the spiked samples is $94.19\% \sim 96.94\%$, and the relative standard deviation (RSD) is $4.20\% \sim 6.35\%$. The test results are satisfactory. Based on this, a new method of resonance Rayleigh scattering-energy transfer analysis of urea is established with simple operation and high sensitivity.

Keywords Polystyrene nanoparticles; Urea; Dimethylglyoxime; Resonance Rayleigh scattering; Energy transfer

* Corresponding author

(Received Nov. 22, 2019; accepted Mar. 6, 2020)