

纳米银对表面吸附荧光素的荧光增强和荧光猝灭 效应及 KCl 的荧光猝灭释放效应

王悦辉 周 济* 石士考

(清华大学新型陶瓷与精细工艺国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 制备了两种不同粒径的纳米银溶胶, 研究了在水溶液条件下其对表面吸附荧光素(FL)的荧光性能的影响及 KCl 电解质对该体系荧光性能的影响。FL 溶液中加入纳米银, FL 分子吸收峰位发生红移。随着纳米银浓度的增加, FL 分子荧光先出现增强, 而后又逐渐猝灭。粒径较大的纳米银产生最大荧光增强比率所需浓度较低。在纳米银猝灭 FL 分子荧光的溶液中加入 KCl 电解质, 随着 KCl 浓度的增加, 荧光逐渐增强, 出现了荧光猝灭释放效应。研究结果表明, 纳米银对表面吸附 FL 的荧光作用与 FL 分子附近局域电磁场增强和分子到金属表面无辐射跃迁能量转移过程决定并与纳米银的浓度、尺寸及电解质等密切相关。

关键词: 纳米银; 荧光素; 局域场; 荧光增强; 荧光猝灭

中图分类号: O647.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)09-1579-06

Enhancing and Quenching Effect of Silver Nanoparticles on the Fluorescein Fluorescence and Quenching Release by KCl

WANG Yue-Hui ZHOU Ji* SHI Shi-Kao

(State Key Lab of New Ceramics and Fine Processing, Tsinghua University, Beijing 10084)

Abstract: Two kinds of silver nanoparticles with different size were prepared. Fluorescent properties of fluorescein in the presence of silver nanoparticles and KCl electrolyte concentration were studied. The absorption peak of FL was red shifted when silver nanoparticles were added. Furthermore, with the increasing in silver nanoparticles concentration, the fluorescence increases first and then decreases. The larger silver nanoparticles have maximum enhancement ratio in lower concentration region. The addition of KCl can promote enhancement of fluorescence and show quenching release effect. The results suggest that the effect of metal-enhanced fluorescence is strongly affected by the local field enhancement, the size and concentration of silver nanoparticles and electrolyte.

Key words: silver nanoparticles; fluorescein; local field; enhanced fluorescence; quenched fluorescence

金属纳米粒子的表面等离子体共振可以极大地增强粒子周围的电磁场, 这种局域场可以改变吸附于其表面及周围荧光体的自由空间的条件(free-space conditions), 使荧光体的荧光得到增强或猝灭, 这种现象称为金属增强荧光效应(Metal-enhanced fluorescence, MEF)^[1]。金属增强荧光效应具有增加荧光量子产率、减小荧光寿命、提高光稳定性及增加 Förster 距离等特点^[2-4]。作为新一代生物检测、标记

及生物和化学传感器的开发技术成为人们研究的热点。Zhang 等^[5]在团聚的超微纳米银粒子表面吸附 PEPA 染料发现明显的荧光增强效应。Lakowicz 等^[6]采用银岛膜对 DAPI-PI 标记 DNA 分子进行研究, 发现 Förster 距离增加了 5 倍, 具有明显的荧光增强效应, 从而可以提高 DNA 分子分析的准确率。

咕吨类染料荧光素(Fluorescein, FL)具有较高的发射效应、高荧光量子产率而被广泛应用于生物技

收稿日期: 2006-01-17。收修改稿日期: 2006-05-29。

国家 863 计划(2003AA32G030)、国家 973 计划(2002CB61306 和 201CB6104)、国家基金杰出青年基金(50425204)及国家自然科学基金(50272032)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: zhouji@mails.tsinghua.edu.cn

第一作者: 王悦辉, 女, 31 岁, 博士; 研究方向: 信息功能材料及光电材料。

术中,其分子结构如图 1 所示。然而这类荧光素因具有较小的 Förster 距离而易出现自身荧光猝灭现象,从而使其荧光效率下降。为了解决这个问题,人们向其溶液中引入金属纳米粒子,利用金属增强荧光效应提高其荧光效率^[7-9]。Malicka 等^[10]利用银岛膜进行荧光素 FL 标记 DNA 分子荧光增强研究。实验结果表明,当采用 1 个和 4 个 FL 分子分别标记 DNA 分子时,荧光强度分别增强了 7 倍和 19 倍,使 DNA 分子序列的检测敏感性增强。

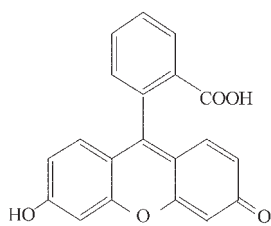


图 1 荧光素的分子结构图

Fig.1 Structure of fluorescein

由于金属纳米结构产生的局域电磁场状态与纳米材料的显微结构(几何状态、界面结构、介电环境与受体的结合状态等)关系甚大并且金属纳米结构的引入同时可能引入某种新的发光猝灭机制,因此迄今为止尚无法从理论上预言纳米结构对各种发光受体的作用效果。本工作研究了 2 种不同粒径纳米

银对表面吸附荧光素荧光性能的影响。实验发现金属荧光增强效应与纳米银的浓度、粒径大小密切相关。另外,实验也在荧光素与纳米银混合体系中引入 KCl 电解质,研究电解质对该体系的荧光性能影响。

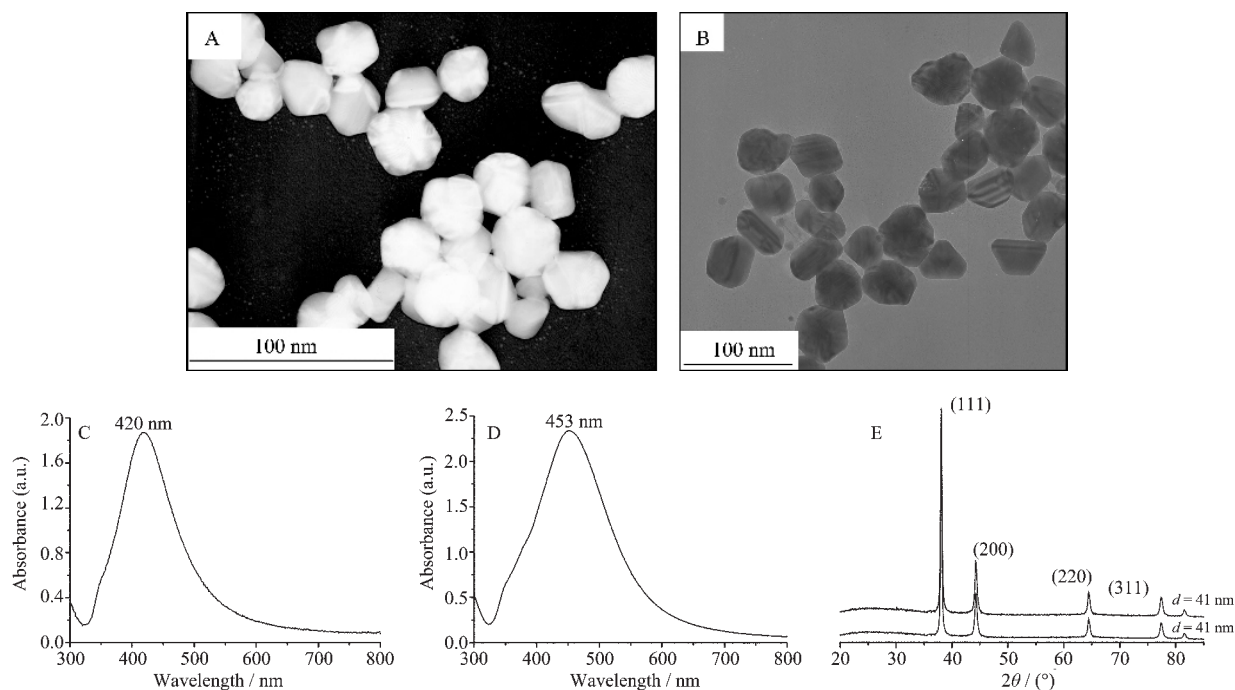
1 实验部分

1.1 实验

实验中所用的硝酸银、柠檬酸三钠、FL、KCl 均为分析纯试剂,溶剂为二次去离子水。纳米银的制备采用柠檬酸三钠还原硝酸银法,具体工艺如下:取 30 mg AgNO_3 溶解到 170 mL 去离子水中,剧烈搅拌下,100 °C 下加热煮沸,然后加入 1% $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 水溶液 20.1 mL,保持同样的温度继续煮沸至一定的时间后,调整溶液至 200 mL,静置 2d,保持备用。通过控制反应时间制备出平均粒径分别为 20 nm 和 40 nm 的纳米银。

1.2 表征

纳米银粒子大小和形貌采用透射电镜(JEOL-JEM-200CX 型,日本电子公司)观察。将纳米银滴加在铜网上,在室温下自然干燥。在加速电压 200 kV 和不同放大倍数下观察。用 Rigaku D/Max-RB 型 X 射线粉末衍射仪(XRD)测定纳米银结构, $\text{Cu K}\alpha$ 辐射, $\lambda=0.15418 \text{ nm}$,工作电压为 40 kV,工作电流



Size of silver nanoparticles is 20 nm in (A) and (C) and 41 nm in (B) and (D)

图 2 银溶胶的 TEM 图(A)和(B)、吸收光谱(C)和(D)及XRD 图(E)

Fig.2 TEM micrographs (A) and (B) and optical absorption spectra (C) and (D) and XRD patterns (E) of different silver colloids

为 120 mA,连续扫描,扫描速度为 $2^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$ 。将银溶胶离心分离,将离心出的沉淀物滴加到薄的玻璃片上,室温下自然干燥进行 XRD 分析。吸收光谱采用 UV-500 PC 型紫外-可见发光光度计测定。吸收范围是 200~900 nm,分辨率是 2 nm,选用该仪器的标准模式,用石英玻璃试管。荧光光谱采用 VARIAN Cary-Eclipse 型荧光分光光度计测定。所有荧光测试均在室温下进行,测试时激发狭缝和发射狭缝均保持为 5 nm。试样制备采用银溶胶与染料均匀混合,加二次去离子水稀释,保持混合溶液中 FL 的浓度恒定为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 2 为 2 种粒径的纳米银的透射电镜照片(图 A、图 B)和吸收光谱图(图 C、图 D)及 XRD 图(图 E)。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

图 3A 为不同浓度的银溶胶(平均粒径为 41 nm)与 FL 混合后溶液吸收光谱。当 FL 中加入银溶胶

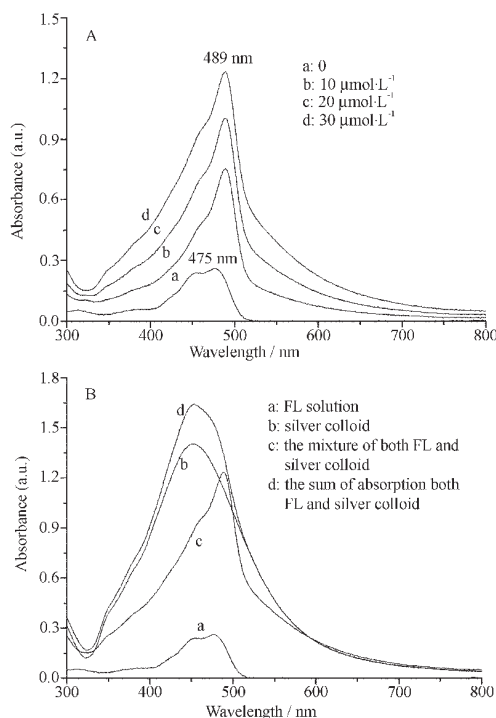


图 3 (A) FL 溶液与不同浓度的纳米银(粒径为 41 nm)的混合溶液的吸收光谱,(B)纯 FL 溶液、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纯纳米银溶液及两者混合溶液的吸收光谱和两种液吸收谱的加和曲线

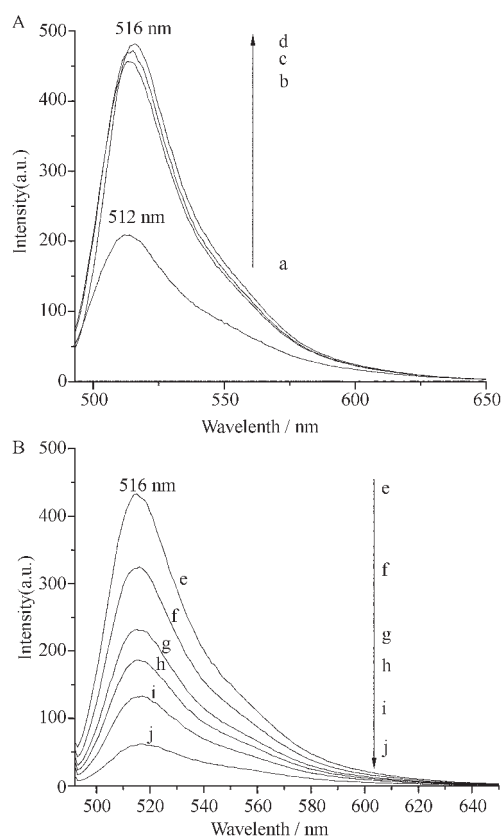
Fig.3 (A) Absorption spectra of the solution of FL containing different concentrations of silver colloid (size=41 nm) (B) Absorption spectra of pure FL solution, $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pure silver colloid and the sum of both

后,其吸收峰红移 14 nm,随着银溶胶浓度的继续增加,峰位不变。图 3B 为纯 FL 溶液、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纯银溶胶和两者混合溶液的吸收谱及纯 FL 溶液和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纯银溶胶的吸收谱的加和曲线。FL 的吸收峰位于银溶胶的吸收带内,但混合溶液的吸收谱与两种纯溶液的吸收谱的加和曲线间有较大的区别,说明体系不仅仅存在单一的 FL 分子和银纳米粒子。FL 分子在水溶液中以阴离子型分子的形式存在,其羧基($-\text{COO}^-$)与纳米银之间存在较强相互作用。相互作用的结果,在纳米银表面形成了 $\text{FL}_n\text{-Ag}$ 复合物^[11,12]。纳米银表面等离子体在外场的激发下在表面附近产生很强的局域场,表面上吸附的分子将会受到这种局域场的作用。表面局域场的物理作用及表面分子的化学作用是吸附分子的共振吸收产生红移的主要原因^[6,11,13]。

2.2 发射光谱

图 4A 和图 4B 为不同浓度的银溶胶(平均粒径为 41 nm)与 FL 混合溶液发射光谱(激发波长为 489 nm)。从图中可见,随着银溶胶浓度的增加,FL 的荧光强度先增加,而后逐渐下降。结果表明,引入适当浓度的纳米银,可使 FL 的荧光明显增强,峰位红移。如银溶胶浓度为 $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,荧光增强 2.31 倍。进一步提高纳米银浓度,粒子对 FL 的增强效应则逐渐降低。表明纳米银在溶液中既可以是荧光增强剂也可以是荧光猝灭剂。FL 吸附在纳米银表面与纯 FL 水溶液的荧光谱相比,没有本质的改变,说明复合物的形成,并没有破坏 FL 内的荧光团。

具有金属性的纳米结构(如金属纳米微粒、纳米线等)可通过表面等离子激元与光子间强烈的共振耦合极大地增强纳米结构周围的电磁场,进而提高纳米结构附近发光体的激发强度,将能量传至系统发光中心,使发光中心的辐射跃迁几率大幅度提高,荧光增强^[1,13,14]。由于金属纳米结构的能量传输性质决定于光辐射与纳米结构产生的局域电磁场状态,而后者受多种因素影响,如纳米结构的几何状态、界面结构、介电环境、纳米结构与发光体间的距离和结合状态等,因此纳米结构引入的同时也可能引入某种发光猝灭机制,如碰撞猝灭、静电猝灭等^[13,14],使发光中心的无辐射跃迁能量转移增加,荧光猝灭。金属纳米结构对发光体荧光作用往往就是荧光增强和荧光猝灭相互竞争的结果,这主要由发光体分子附近局域电磁场增强和分子到金属表面无辐射跃迁能量转移过程决定^[1,14]。在本实验条件下,当纳米银浓度



concentration of silver colloid / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): a: 0, d: 2, c: 4, d: 6, e: 10, f: 20, g: 30, h: 40, i: 50, j: 80; (excitation at 489 nm)

图 4 FL 溶液与不同浓度的纳米银的混合溶液的荧光光谱

Fig.4 Emission spectra of the solution of FL containing different silver concentrations

较低时($\leq 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 纳米银引入使 FL 荧光增强, 这主要是因为在此实验条件下, FL 中的荧光团与纳米银表面的距离接近至有效能量传输距离, 使纳米结构收集的激发光能量通过强局域场传输给 FL 分子远远超过无辐射跃迁能量转移过程, 使荧光增强效应大于猝灭效应, 因此其荧光增强。另外, 吸附的作用也降低了 FL 分子与分子之间由于碰撞过程所导致的荧光猝灭效应, 也对荧光增强起作用。当纳米银的浓度超过 $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 大量的纳米银粒子的存在使纳米粒子表面等离子体共振受到抑止, 局域场强下降^[1]。另外, 大量的 FL 分子吸附在纳米银粒子表面, 一方面使 FL 分子与纳米银粒子间有效传输距离减小; 另一方面使碰撞、静电相互作用等加强使无辐射转移效应大于局域增强效应, 使荧光强度逐渐降低^[14,15]。

图 5 给出 2 种不同粒径的纳米银加入到 FL 溶

液中后, 溶液中 FL 分子的荧光强度与纯 FL 分子荧光强度比与银溶胶浓度的关系。从图中可见, 不同粒径的纳米银使 FL 分子的荧光强度增强至最大比率所需的纳米银的浓度不同。在本实验条件下, 粒径较大的纳米银产生荧光增强至最大比率所需浓度较低。当加入平均粒径为 41 nm 的纳米银时, 纳米银的浓度为 $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 荧光增强比率最大; 当加入平均粒径为 20 nm 的纳米银时, 纳米银的浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 荧光增强比率最大。分析认为较大的粒子产生较强的表面等离子共振, 使局域场有较大增强^[6,15]。上述实验结果表明, 纳米金属粒子荧光增强效应与纳米粒子的浓度、大小、吸附分子与纳米粒子的距离等因素密切相关。

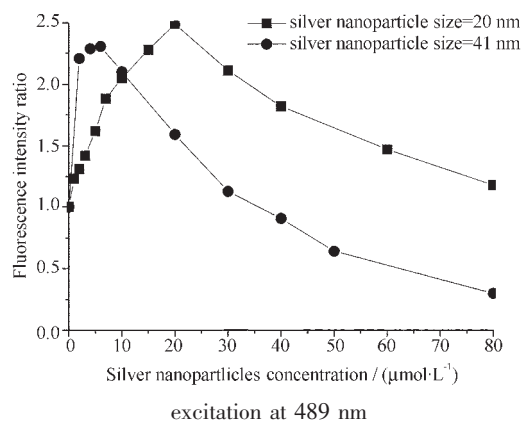


图 5 FL 与不同粒径的纳米银混合溶液中 FL 分子的荧光强度与纯 FL 分子荧光强度比与银溶胶浓度的关系

Fig.5 Fluorescent intensity ratio vs. silver nanoparticles concentration. The intensity ratio is the fluorescent intensity of the mixture to that of the pure FL solution

3 KCl 影响

卤族离子会影响纳米粒子在溶胶体系中的分散状态和粒子表面物理化学性能, 从而引起金属表面增强拉曼因子及金属荧光增强效应的改变^[15-18]。我们也在纳米银与 FL 的混合溶液中加入 KCl 电解质, 研究该电解质的加入对混合溶液中 FL 分子荧光性能的影响。图 6A 为 FL 溶液与 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米银(平均粒径为 41 nm)混合溶液中加入不同浓度的 KCl 后溶液的荧光光谱。图 6B 为相应的相对荧光增强比率。从图中可见, 荧光强度随着 KCl 浓度的增加逐渐增强, 当 KCl 浓度达到一定值后, 荧光强度保持定值。说明 KCl 电解质的加入产生了荧光

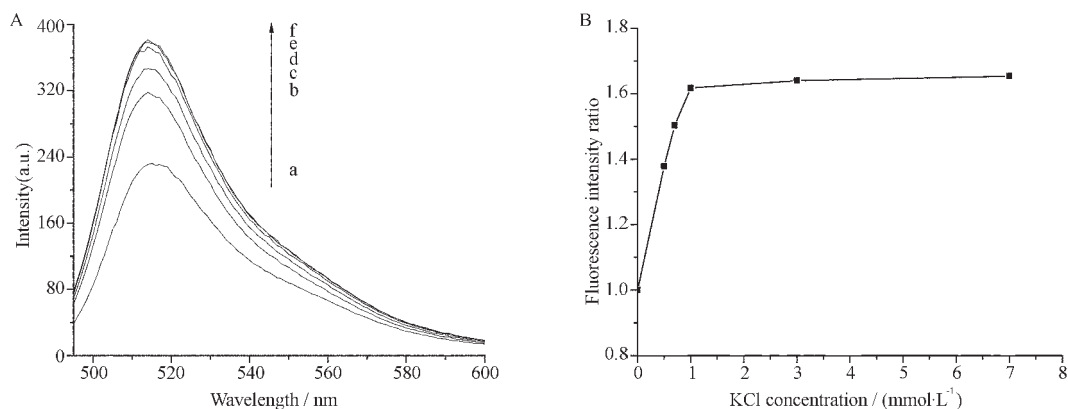


图6 (A)FL溶液与 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米银(平均粒径为 41 nm)混合溶液中加入不同浓度的 KCl 后溶液的荧光光谱 (B)荧光增强比率

Fig.6 (A) Emission spectra of the FL solutions containing $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ silver colloid and different KCl concentrations:

(a) $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) $0.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (d) $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (e) $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (f) $7.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B) Fluorescent intensity ratio vs KCl concentration (excitation at 489 nm)

猝灭释放效应^[12]。

KCl 加入到混合溶液中,由于 Cl^- 与纳米银间存在较强的相互作用,与 FL 之间产生了竞争吸附,竞争的结果使部分 FL 分子从银表面脱附,一方面使得溶液中 FL 分子增加,使得荧光增加;另一方面 FL 分子与纳米银粒子间的距离也接近有效能量传输距离,无辐射通道减少,荧光逐渐增强^[1,15]。当 KCl($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的加入量达到 1.0 mL 后,再继续增加 KCl 的量,荧光强度几乎不变,表明体系达到了平衡。我们也在纳米银与 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 混合溶液体系中引入 KCl 电解质,发现了这种荧光猝灭释放效应和荧光强度随着 KCl 加入量的增加最终体系达到平衡状态。分析认为这与体系中存在分子间相互作用的动态平衡有关。

4 结 论

荧光素 FL 溶液中加入不同粒径的纳米银粒子,纳米银在一定的浓度范围内实现了对 FL 的荧光增强。实验结果表明,纳米银既可以是荧光增强剂也可以是荧光猝灭剂。纳米银通过产生的强局域场将能量传输给 FL 发光中心,实现了 FL 的荧光增强。过多的纳米银粒子的存在不仅使表面等离子激元共振受到抑止,局域场强降低,而且碰撞、静电相互作用等猝灭效应增加,使 FL 的荧光猝灭。粒径较大的纳米银产生最大荧光增强比率所需浓度较低。当加入一定浓度的 KCl 电解质后,由于 Cl^- 与纳米银间存在较强的相互作用,与 FL 之间产生了竞争吸附,使部分 FL 分子从银表面脱附,荧光逐渐增强。研

究结果表明,金属荧光增强效应主要由 FL 分子附近局域电磁场增强和分子到金属表面无辐射跃迁能量转移过程决定并与纳米银的浓度、尺寸密切及电解质等相关。

参考文献:

- [1] Geddes C D, Lakowicz J R. *J. Fluorescence*, **2002**,**12**:121~129
- [2] Parfenov A, Gryczynski I, Malicka J, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2003**,**107**:8829~8833
- [3] Lakowicz J R, Shen Y, D'Auria S, et al. *Anal. Biochem.*, **2002**,**301**:261~277
- [4] Lakowicz J R, Malicka J, D'Auria S, et al. *Anal. Biochem.*, **2003**,**320**:13~20
- [5] Zhang J, Lakowicz J R. *J. Phys. Chem. B*, **2005**,**109**:8701~8706
- [6] Lakowicz J R, Kusba J, Shen Y, et al. *J. Fluorescence*, **2003**,**13**:69~77
- [7] Gryczynski I, Malicka J, Holder E, et al. *Chem. Phys. Lett.*, **2003**,**372**:409~414
- [8] Zhang J, Matveeva E, Gryczynski I, et al. *J. Phys. Chem.*, **2005**,**109**:7969~7975
- [9] Aguilla A, Murray R W. *Langmuir*, **2000**,**16**:5949~5952
- [10] Malicka J, Gryczynski I, Lakowicz J R. *Anal. Chem.*, **2003**, **75**:4408~4414
- [11] Noginov M A, Williams S N, Gavrienko V I, et al. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, **2005**,**7**:S219~S229
- [12] Huang T, Murry R W. *Langmuir*, **2002**,**18**:7077~7081
- [13] Stefan A M, Pieter G K, Harry A A, et al. *Nature Materials*,

2003,2:229~232[14]Nabika H, Deki S. *J. Phys. Chem. B*, **2003,107**:9161~9164[15]Lakowicz J R. *Anal. Biochem.*, **2001,333**(298)1~24[16]Zhang P X, Fang Y, Wang W N, et al. *J. Raman Spectrosc.*,**1990,21**:127~131[17]Mandal S, Gole A, Lala N, et al. *Langmuir*, **2001,17**:6262~6469[18]Lakowicz J R. *Anal. Biochem.*, **2005,337**:171~183