中国科学: 化学 2015 年 第 45 卷 第 1 期: 90 ~ 97
SCIENTIA SINICA Chimica www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

基于 *L*-半胱氨酸合成的金纳米簇用于铜离子和多西环素的检测

冯媛娇, 杨晓明, 朱姗姗, 廖洪波, 刘汉儒*

西南大学药学院, 重庆 400716
*通讯作者, E-mail: liuhr1118@126.com

收稿日期: 2014-03-29; 接受日期: 2014-04-21; 网络版发表日期: 2014-09-26
doi: 10.1360/N032014-00093

摘要 以 *L*-半胱氨酸(*L*-Cysteine)为还原剂和稳定剂, 采用一步法合成了粒径均匀并具有较强荧光的水溶性金纳米簇(AuNCs), 该金簇的粒径约为 3~5 nm, 在紫外灯下呈黄绿色荧光. 随后发现, 铜离子(Cu^{2+})对 AuNCs 的荧光有明显的响应, 基于此建立了荧光探针检测 Cu^{2+}的新方法, 结果表明 AuNCs 的荧光变化与 Cu^{2+}的浓度呈良好的线性关系, 并能用于实际样品(尿液)中 Cu^{2+}的检测. 同时, 研究发现, 多西环素(DC)的加入能够使混合体系(AuNCs-Cu^{2+})猝灭的荧光逐渐恢复, 由此进一步建立了由 Cu^{2+}介导"关-开"(off-on)检测 DC 的荧光分析方法, 并将其用于实际样品(牛奶)中多西环素的检测, 得到了满意的结果.

关键词
金纳米簇(AuNCs)
铜离子(Cu^{2+})
多西环素(DC)
关开(off-on)机制

1 引言

铜是人体中必不可少的, 也是最丰富的过渡金属元素之一, 它在生物系统和环境中发挥着正面或负面的作用[1]. 作为过渡元素, 铜离子(Cu^{2+})对人体健康至关重要, 能够与某些蛋白结合, 产生大量的酶[2]. 但与此同时, 当人体摄入过量 Cu^{2+}时, 它可以与分子氧反应形成反应性氧自由基(ROS), 也可以破坏蛋白质, 核酸和脂类. 若不经调节, Cu^{2+}将导致细胞稳态的紊乱, 其毒性将导致严重的神经变性疾病[3], 如门克斯病[4]、威尔逊病[5]和阿尔茨海默氏病[6,7]等. 除此之外, 由于农业和工业中的广泛使用, Cu^{2+}也造成了日益严重的环境污染. Cu^{2+}对人体的潜在毒性和对环境产生的污染已经成为世界各国关注的问题[2]. 迄今为止, 针对痕量 Cu^{2+}的检测已有大量的报道, 如原子吸收光谱法(AAS)[8,9]、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)[10]、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)[11,12]. 然而, 这些方法通常操作比较复杂, 耗时且费用昂贵. 因此发展高灵敏度、高选择性、廉价、易操作的 Cu^{2+}检测方法仍然具有实用价值, 并且对于环境保护也具有重要的意义.

多西环素(DC)是四环素类抗生素, 广泛应用于各种呼吸道和泌尿道感染的治疗中. 它是广谱抑菌化合物, 对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌具有明显效果[13], 在预防或控制细菌感染和动物疾病方面起到了显著作用. DC 通过与细菌的 30S 核糖体结合后抑制蛋白质的合成, 从而实现对细菌感染的治疗[14]. 然而, 过量摄入 DC 会严重危害人体健康, 如过敏反应、肝功能损害、牙齿发黄和胃肠紊乱等[15]. 此外, 若在动物饲料中不正当使用 DC, 可导致其在动物组织中大量残留, 因此可以通过食物链在人体中富集, 进而危害人类健康[15]. 传统检测 DC 的方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)[13]、紫外吸收光谱法(UV)[16]、酶联免疫吸附分析法(ELISA)[17]等, 上述方法均需要复杂的样品前

处理, 且操作繁琐. 故发展快速、简单、灵敏的检测 DC 的方法具有一定的应用前景.

随着纳米技术的发展, 贵金属纳米材料以其独特的光学性质成为纳米科学和表面等离子体光子学的研究热点[18~21]. 作为贵金属纳米材料的新星，纳米簇直径约为 1~100 nm, 具有独特的光学、电学、催化性质, 可广泛应用于催化剂材料、电池电极材料、低温导热材料和导电材料等[22]. 近年来, 基于纳米团簇构建的荧光探针已被用于检测金属离子[23,24]、药物或蛋白质等大分子物质[25,26], 因此贵金属纳米簇的制备及应用受到了科研工作者的广泛关注. 本文以半胱氨酸为还原剂和稳定剂, 在水溶液中一步合成了具有良好荧光性能的金纳米簇(AuNCs), 合成方法简单, 耗时短, 原料易得. 随后将所制备的 AuNCs 作为荧光探针用于 Cu^{2+}的检测, 同时基于 Cu^{2+}介导的“关-开”策略, 进一步建立了对 DC 的荧光分析方法.

2　实验部分

2.1　试剂与仪器

L-半胱氨酸(*L*-Cys)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)购于上海生工生物技术有限公司; 氯金酸($HAuCl_4$)、硫酸铜($CuSO_4$)、多西环素(doxycycline)、四环素(tetracycline)、金霉素(chlortetracycline)、环丙沙星(ciprofloxacin)、维生素 C(VitaminC)、链霉素(streptomycin)、牛血清白蛋白(BSA)、诺氟沙星(norfloxacin)和 葡萄糖(glucose)购于美国西格玛奥德里奇公司; Ag^+, Ba^{2+}, Br^-, Ca^{2+}, Eu^{3+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, I^-, K^+, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}等离子及氢氧化钠(NaOH)和盐酸(HCl)购于成都科龙化学试剂厂; 纯牛奶购于西南大学竹园教育超市; 所有化学试剂为分析纯, 实验用水均为超纯水.

荧光光谱在 F-7000 荧光分光光度计(日立公司, 日本)上测得, 使用光径为 1 cm 石英池, 电子显微镜图在 TECNAI G2 F20 高分辨率透射电子显微镜(HR-TEM, FEI 公司, 美国)上测得, 紫外图谱在 UV-2450 紫外-可见吸收光谱仪(岛津公司, 日本)上测得, 其余用到的仪器还有 DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城工贸有限公司, 中国), BS-124S 电子天平(上海精天电子仪器有限公司, 中国), PS-10 pH 计(北京赛多利斯系统有限公司, 中国), 圆底烧瓶, DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司, 中国).

2.2　AuNCs 的制备

取 2 mL *L*-半胱氨酸(25 mg/mL)于圆底烧瓶中, 加入 1 mL $HAuCl_4$(0.01 mol L^{-1})混合均匀后, 将圆底烧瓶置于 37℃水浴加热, 搅拌 15 min, 随后逐滴加入 50 μL NaOH (1 mol L^{-1}), 持续搅拌 10 h 后, 溶液变为淡黄色, 即初步制得 AuNCs 溶液. 将得到的 AuNCs 溶液用 0.22 μm 滤膜过滤后存放于 4℃冰箱以便后续的实验应用.

2.3　AuNCs 溶液与 Cu^{2+}的反应

配置 Cu^{2+}储备液(10^{-3} mol L^{-1}), 随后将其稀释成不同浓度的 Cu^{2+}溶液. 室温下, 在 1.5 mL 离心管中依次加入 50 μL 的 AuNCs 溶液, 50 μL pH 9 的磷酸盐缓冲液 (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4), 50 μL 不同浓度的 Cu^{2+} (0 ~100 μmol L^{-1}), 混合均匀, 加纯水稀释至 500 μL, 温和涡旋 30 s, 置于温度 45℃(25~75℃)水浴锅中反应 50 min(10~100 min), 所得溶液在荧光分光光度计上进行检测.

2.4　选择性实验

在 1.5 mL 离心管中依次加入 50 μL AuNCs, 50 μL 500 μmol L^{-1} 不同离子(Cu^{2+}, Ag^+, Ba^{2+}, Br^-, Ca^{2+}, Eu^{3+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, I^-, K^+, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}), 50 μL 磷酸缓冲液(pH 9), 混合均匀后用纯水稀释至 500 μL, 置于最佳条件下进行反应. 同样, 向 AuNCs-Cu^{2+}溶液体系中分别加入多西环素, 四环素, 金霉素, 环丙沙星, 维生素 C, 链霉素, BSA, 诺氟沙星, 葡萄糖(100 μL, 100 μmol L^{-1}), 分别置于 45℃水浴锅中反应 45 min. 随后用荧光分光光度计记录荧光强度的变化.

2.5　多西环素的检测

随后, 将标准浓度的 DC 溶液加纯水稀释成 10^{-3} mol L^{-1} 的溶液, 作为实验用 DC 的储备液, 待使用时将其稀释成不同浓度. 在 1.5 mL 离心管中依次加入 50 μL 磷酸缓冲液(10 mmol L^{-1}, pH 9, Na_2HPO_4/NaH_2PO_4), 50 μL 不同浓度的 DC 溶液(0~100 μmol L^{-1}), 50 μL AuNCs-Cu^{2+}混合液, 用纯水稀释至 500 μL, 涡旋 30 s, 45℃水浴反应 10 min, 测定其荧光强度.

3 结果与讨论

3.1 机理

如图 1 所示, 由于 *L*-Cys 上的巯基能与 Au 原子形成 Au–S 键[27], 所以本文以 $HAuCl_4$ 为原料, *L*-Cys 为还原剂和稳定剂, 成功合成了 AuNCs. 在 Cu^{2+}与该金簇反应过程中, 由于 Cu^{2+}能与 *L*-Cys 中的–NH_2 和 –COOH 结合[28], 故可导致合成的金纳米簇发生聚集, 从而猝灭该体系的荧光. 此外, 据文献报道[29], DC 与 Cu^{2+}有较强的结合力, 容易形成络合物{[Cu(doxycycline)(1,10-phenanthroline)(H_2O)(ClO_4)]}, 且在酸性环境下, DC 带有负电荷, 使其更易与 Cu^{2+}结合, 因此当加入 DC 时, 会使得 AuNCs 荧光恢复.

3.2 AuNCs 的表征

3.2.1 AuNCs 的光谱表征

首先通过荧光分光光度计考察了 AuNCs 的荧光激发和发射光谱, 如图 2(a)所示. 设置激发和发射的狭缝为 5 nm, 测得其激发位置在 375 nm 处, 最大发射波长为 520 nm. 同时如图 2(b)(II)所示, 在紫外灯光照下能看到 AuNCs 溶液发出肉眼可见的黄绿色荧光, 而在白光下则为淡黄色的澄清溶液(I), 表明 AuNCs 溶液具有良好的光致发光特性. 为了进一步探索该金簇的其他光学性质, 对其进行了紫外吸收光谱扫描, 如图 2(b)所示, AuNCs 溶液在 370 nm 左右有一个弱的吸收峰, 说明有新物质(金簇)的生成.

3.2.2 AuNCs 的电子显微镜图

为了表征 AuNCs 的粒径尺寸、粒径分布及其结构. 我们对合成的 AuNCs 采用高分辨率透射电子显微镜进行分析. 如图 3 所示, AuNCs 的粒径相对比较均匀, 平均粒径约为 3~5 nm, 表明合成的 AuNCs 颗粒具有较好的分散性.

3.3 条件优化

为了考察时间、温度及 pH 对 AuNCs 检测 Cu^{2+}体系的影响, 本文对其进行了系统优化. 首先在 1.5 mL 离心管中依次加入 50 μL Cu^{2+}溶液(10^{-5} mol L^{-1}), 50 μL AuNCs, 50 μL 不同 pH 的磷酸缓冲液, 混合均匀后加超纯水稀释至 500 μL 进行反应. 如图 4(a)所示, 当 pH 为 9 时, 荧光猝灭最明显, 即检测 Cu^{2+}的效果为最佳, 因此检测过程选择的最优 pH 为 9. 同上, 固定 pH 为 9, 反应时间范围为 10~100 min. 如图 4(b)所示, 当反应时间为 50 min 时, 荧光猝灭最明显, 故选择最佳反应时间为 50 min. 最后, 为了考察温度对

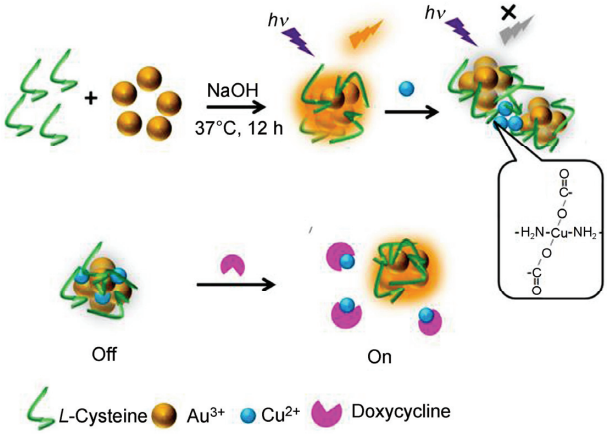


图 1 AuNCs 检测 Cu^{2+}以及 AuNCs-Cu^{2+}复合物体系检测 DC 示意图

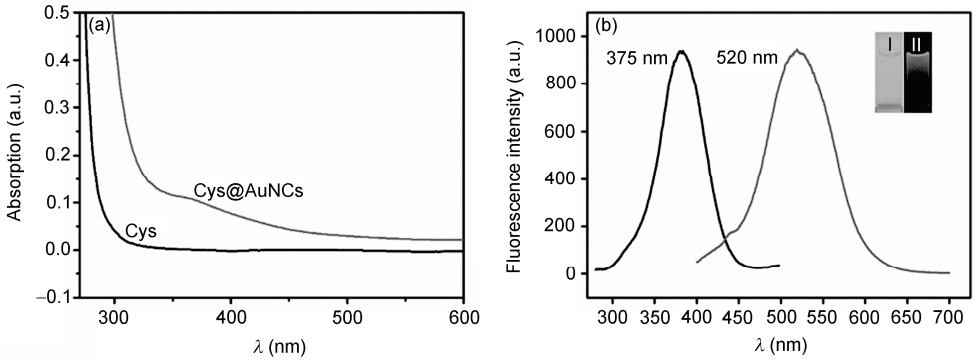


图 2 (a) *L*-Cys 和金簇的紫外可见吸收光谱图; (b) AuNCs 的荧光光谱图, λ_{ex} = 375 nm, λ_{em} = 520 nm, I 和 II 分别为 AuNCs 在白光、紫外灯下的照片

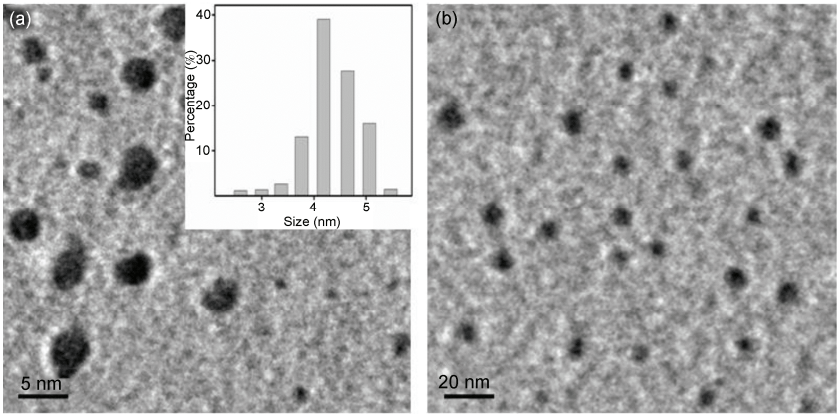


图 3　AuNCs 的高分辨率透射电子显微镜图, 内嵌为 AuNCs 粒径图分布图

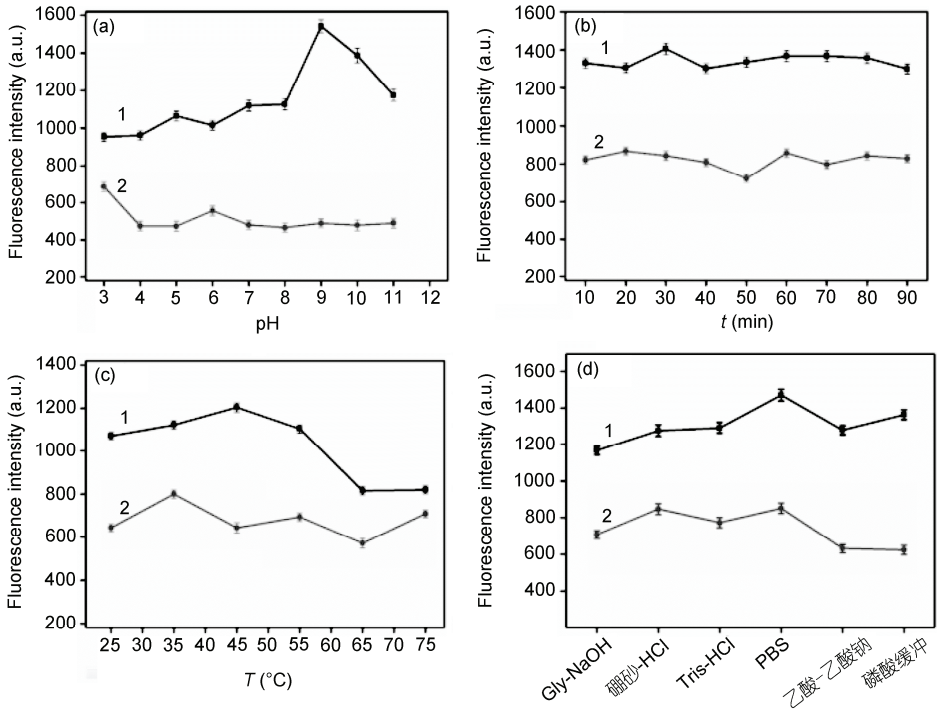


图 4　Cu^{2+}检测条件的优化. (a) pH(3~11); (b) 时间(10~100 min); (c) 温度(25~75℃); (d) 缓冲溶液的优化. 图中曲线 1 和 2 分别表示没有加入和加入 Cu^{2+}(10^{-6} mol L^{-1})后所测得 AuNCs 的荧光强度

检测过程的影响, 固定 pH 为 9, 时间为 50 min, 优化的温度范围从 25℃到 75℃. 如图 4(c), 45℃为最佳检测温度. 因此，随后的实验都在此最佳条件(pH 9, t = 50 min, T = 45℃)下进行. 除此之外, 实验还选择 Gly-NaOH, 硼砂-HCl, Tris-HCl, PBS, 乙酸-乙酸钠, 磷酸缓冲溶液对检测体系进行优化, 如图 4(d), 磷酸缓冲的缓冲效果最好, 因此实验选择磷酸缓冲溶液.

3.4　离子选择性

为了验证该方法对不同离子的选择性, 本文考察了常见离子对该金纳米簇构建的检测方法的响应. F_0–F 表示各种离子对 AuNCs 荧光的影响程度, 值越大表明影响越大. 如图 5 所示, 常见的其他离子对 AuNCs 的荧光强度几乎没有影响, 只有 Cu^{2+}的加入会对该金簇的荧光强度产生明显影响, 表明 AuNCs 荧光探针用于 Cu^{2+}检测具有较好的特异性.

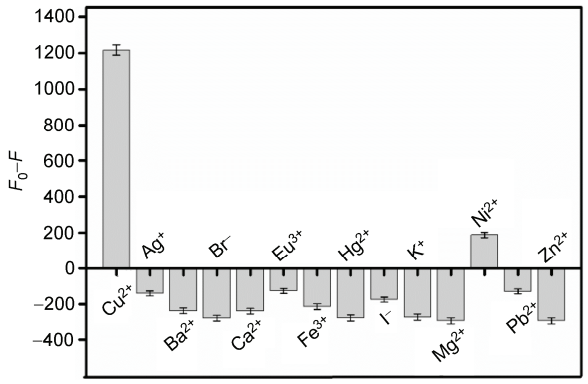


图 5 不同离子对 AuNCs 荧光强度的影响, Cu^{2+}(10^{-6} mol L^{-1}), 其他离子浓度均为 10^{-5} mol L^{-1}. λ_{ex} = 375 nm, λ_{em} = 520 nm

3.5 Cu^{2+}的检测

由于 Cu^{2+}与 AuNCs 中 *L*-Cys 的–NH_2和–COOH 能够相互作用, 因此该金簇可以用于检测 Cu^{2+}. 为了考察 Cu^{2+}的浓度对该金簇荧光强度的影响, 在该溶液中加入不同浓度的 Cu^{2+}, 并得到其相应的荧光光谱. 如图 6 所示, AuNCs 的荧光强度在 520 nm 处随着 Cu^{2+}浓度增加而相应地降低. 同时, 图 6(b)表明 Cu^{2+}浓度在 1 nmol L^{-1}~10 μmol L^{-1} 的范围内与该金簇的荧光强度的变化呈现良好的线性关系, 其回归方程为 $y = 362.73x + 3118.5$, 相关系数为 0.9724. 通过计算, 其检出限为 0.34 nmol L^{-1}.

3.6 Cu^{2+}的实际样品检测

为验证 AuNCs 检测 Cu^{2+}方法的可行性, 本文对人体尿液进行了检测, 将获得的尿液用纯水稀释 10 倍后对其进行加标. 按照上述检测 Cu^{2+}的方法在荧光分光光度计上对样品进行检测. 根据上述线性回归方程计算尿液中的 Cu^{2+}浓度, 得到的回收率如表 1 所示. 结果表明, 本方法能够应用于尿样中 Cu^{2+}的检测, 具有一定的应用前景.

3.7 针对多西环素的特异性

前期研究表明, 该金簇溶液与 Cu^{2+}反应后, 形成 AuNCs-Cu^{2+}复合体系, 同时金簇荧光强度降低. 由于 Cu^{2+}能够与 DC 特异性结合且作用较强, 在进一步的研究中, 考察了 DC 及其余抗生素和生物基质对该体系的影响. 如图 7 所示, F–F_0 表示其他物质对 AuNCs-Cu^{2+}的复合体系荧光的影响程度, 值越大表明影响越大. 从实验结果来看, 其他基质对 AuNCs-Cu^{2+}的复合体系的荧光强度影响较小, 只有 DC 能与 Cu^{2+}特异性地结合, 进而对该体系有明显的荧光恢复作用, 表明该方法可以用于 DC 的检测.

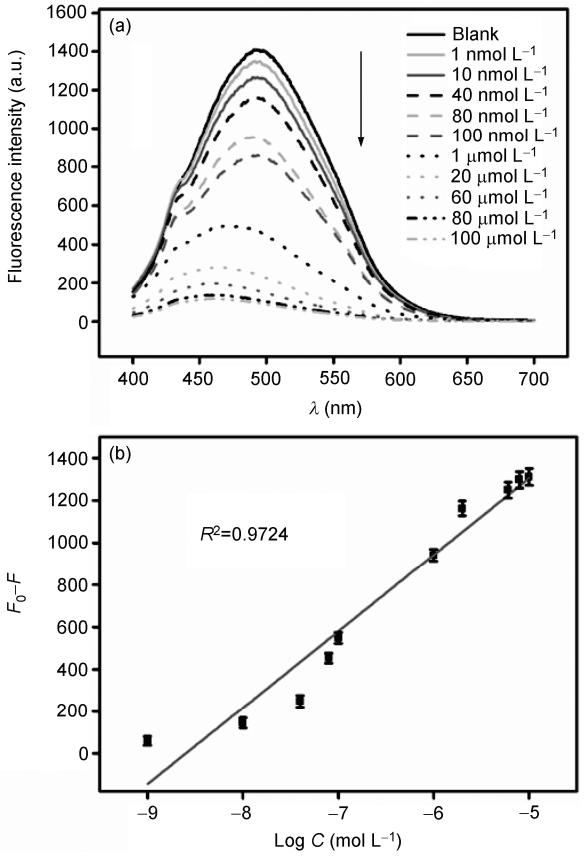


图 6 (a) AuNCs 加入不同浓度 Cu^{2+} (0, 1, 10, 40, 80, 100 nmol L^{-1}, 1, 20, 60, 80, 100 μmol L^{-1})荧光光谱图; (b) AuNCs 荧光强度的变化与不同浓度 Cu^{2+}的线性关系

表 1 尿样中 Cu^{2+}的加标实验 (n = 3)

Sample	Cu^{2+} supplemented (μmol L^{-1})	Cu^{2+} measured (μmol L^{-1})	Recovery (%)
1	0.80	0.78	97.5
2	1.00	0.97	97.0
3	1.20	1.23	102.5

3.8 多西环素的检测

由于 DC 与 Cu^{2+}能够特异性结合, 在酸性条件下, DC 的逐渐加入会导致 AuNCs 的荧光不断恢复. 在此基础上, 提出了一种高效的荧光“关-开”式策略特异性地定量检测 DC. 如图 8(a), AuNCs 的荧光强度在

520 nm 处随着 DC 浓度的增加随之恢复. 图 8(b)表明 DC 浓度在 100 nmol L^{-1}~100 μmol L^{-1} 的范围内与该体系的荧光强度变化呈现良好的线性关系, 其回归方程为 $y = 5.0371x + 34.213$, 相关系数为 0.9317. 通过计算, 其检出限为 16.7 nmol L^{-1}.

3.9　多西环素的实际样品检测

为验证方法的可行性, 本文对实际样品进行了检测. 因为牛奶中大部分是酪蛋白, 而酪蛋白聚沉的最佳pH为4.6, 所以将从西南大学竹园教育超市买来牛奶, 用 0.5 mol L^{-1} 的盐酸溶液调节 pH 到 4.6[30], 静置 10 min 后以 8000 r min^{-1} 的转速离心, 取上层清液用 0.22 μm 的滤膜过滤[31], 得到的滤液稀释 25 倍后对其进行加标处理. 按照上述检测 DC 的方法在荧光分光光度计上对样品进行检测. 根据线性回归方程计算牛奶中的 DC 浓度, 得到的回收率如表 2 所示. 结果表明, 本实验方法能够应用于牛奶中 DC 的检测, 具有一定的应用前景.

4　结论

本文利用 *L*-Cys 一步合成了 AuNCs, 该金簇具有良好的光致发光特性. 重要的是, 基于 Cu^{2+} 与 –COOH 和–NH_2 能以共价键结合, 建立了一种检测重金属离子 Cu^{2+}的方法. 同时, 基于 DC 对 AuNCs-Cu^{2+}

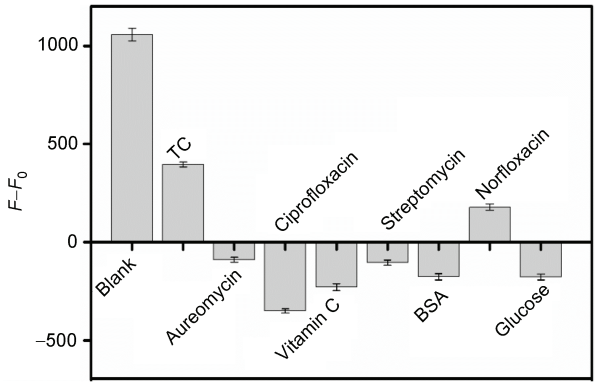


图 7　DC 检测的特异性, blank 表示 DC (10^{-5} mol L^{-1}), 四环素、金霉素、环丙沙星、维生素 C、链霉素、BSA、诺氟沙星、葡萄糖均为 10^{-4} mol L^{-1}, λ_{ex} = 375 nm, λ_{em} = 520 nm

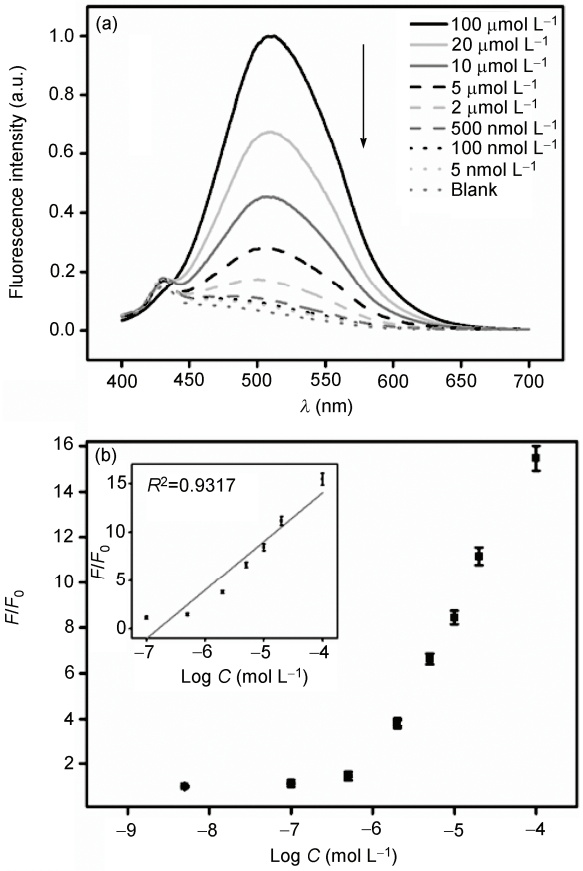


图 8　(a) 加入不同浓度 DC(100, 20, 10, 5, 2 μmol L^{-1}, 500, 100, 5, 0 nmol L^{-1})后的 AuNCs-Cu^{2+}复合体系的荧光光谱图; (b) AuNCs-Cu^{2+}复合体系的荧光强度的变化与 DC 的线性关系

表 2　牛奶样品中 DC 的加标实验 (n = 3)

Sample	DC supplemented (μmol L^{-1})	DC measured (μmol L^{-1})	Recovery (%)
1	8.00	7.84	98.0
2	10.00	9.71	97.1
3	12.00	12.07	100.6

复合物体系有明显荧光恢复作用, 建立了 Cu^{2+}介导的"关-开"荧光探针检测 DC 的方法. 相比较其他方法, 该方法简单, 所用原料经济易得, 灵敏度高, 并成功应用于牛奶中 DC 的快速检测, 获得了可靠的结果. 该检测方法对于 DC 的检测具有潜在的应用价值, 为构建新的分析体系提供了重要的理论依据.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(31100981)和国家级大学生创新创业训练计划项目（201310635014）资助, 特此致谢.

参考文献

1 Liu JM, Lin L, Wang XX, Lin SQ, Cai WL, Zhang LH, Zheng ZY. Highly selective and sensitive detection of Cu^{2+} with lysine enhancing bovine serum albumin modified-carbon dots fluorescent probe. *Analyst*, 2012, 137: 2637–2642

2 Zhou Y, Wang SX, Zhang K, Jiang XY. Visual detection of copper (II) by azide-and alkyne-functionalized gold nanoparticles using click chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 120: 7564–7566

3 Wu SP, Huang RY, Du KJ. Colorimetric sensing of Cu (II) by 2-methyl-3-[(pyridin-2-ylmethyl)-amino]-1, 4-naphthoquinone: Cu (II) induced deprotonation of NH responsible for color changes. *Dalton Trans*, 2009, 4735–4740

4 Tan YF, O'Toole N, Taylor NL, Harvey Millar A. Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function. *Plant physiol*, 2010, 152: 747–761

5 Desai V, Kaler SG. Role of copper in human neurological disorders. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88: 855S–858S

6 Hancock CN, Stockwin LH, Han BN, Divelbiss RD, Jun JH, Malhotra SV, Hollingshead MG, Newton DL. A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50: 110–121

7 Zhang LB, Zhu JB, Ai J, Zhou ZX, Jia XF, Wang EK. Label-free G-quadruplex-specific fluorescent probe for sensitive detection of copper (II) ion. *Biosens Bioelectron*, 2013, 39: 268–273

8 Lin TW, Huang SD. Direct and simultaneous determination of copper, chromium, aluminum, and manganese in urine with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer. *Anal Chem*, 2001, 73: 4319–4325

9 Pourreza N, Hoveizavi R. Simultaneous preconcentration of Cu, Fe and Pb as methylthymol blue complexes on naphthalene adsorbent and flame atomic absorption determination. *Anal Chim Acta*, 2005, 549: 124–128

10 Becker JS, Matusch A, Depboylu C, Dobrowolska J, Zoriy MV. Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (slugs-genus arion) measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007, 79: 6074–6080

11 Liu Y, Liang P, Guo L. Nanometer titanium dioxide immobilized on silica gel as sorbent for preconcentration of metal ions prior to their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 2005, 68: 25–30

12 Otero-Romaní J, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera P. Evaluation of commercial C18 cartridges for trace elements solid phase extraction from seawater followed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry determination. *Anal Chim Acta*, 2005, 536: 213–218

13 Sunarić SM, Denić MS, Bojanić ZŽ, Bojanić VV. HPLC method development for determination of doxycycline in human seminal fluid. *J Chromatogr B*, 2013, 939: 17–22

14 吴琼, 靳野, 郑海学, 刘湘涛. 氯霉素和四环素阻碍细菌蛋白分泌研究进展. 中国生物工程杂志, 2010, 30: 97–100

15 Gajda A, Posyniak A. Tetracyclines and their epimers in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2009, 53: 263–267

16 Gajda A, Posyniak A, Zmudzki J, Tomczyk G. Determination of doxycycline in chicken fat by liquid chromatography with UV detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2013, 928: 113–120

17 Le T, Zhao ZW, Wei W, Bi DR. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg. *Food chem*, 2012, 134: 2442–2446

18 Wen F, Dong YH, Feng L, Wang S, Zhang SC, Zhang XR. Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing. *Anal Chem*, 2011, 83: 1193–1196

19 Huang X, Luo Y, Li Z, Li BY, Zhang H, Li L, Majeed I, Zou P, Tan B. Biolabeling hematopoietic system cells using near-infrared fluorescent gold nanoclusters. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 16753–16763

20 Shang L, Dong SJ, Nienhaus GU. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications. *Nano Today*, 2011, 6: 401–418

21 Liu J, Yu M, Zhou C, Yang S, Ning X, Zheng J. Passive tumor targeting of renal-clearable luminescent gold nanoparticles: long tumor

retention and fast normal tissue clearance. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 4978–4981
22 Díez I, Ras RHA. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 2011, 3: 1963–1970
23 罗峰, 陈冬梅, 施雅梅, 陈曦. 基于罗丹明类衍生物荧光增强的水体中 Hg^{2+}检测. 中国科学: 化学, 2013, 5: 592–598
24 Guo WW, Yuan JP, Wang EK. Oligonucleotide-stabilized Ag nanoclusters as novel fluorescence probes for the highly selective and sensitive detection of the Hg^{2+} ion. *Chem Commun*, 2009, 23: 3395–3397
25 Li LL, Liu HY, Shen YY, Zhang JR, Zhu JJ. Electrogenerated chemiluminescence of Au nanoclusters for the detection of dopamine. *Anal Chem*, 2011, 83: 661–665
26 周殿明, 吴一丹, 刘佩, 白昊天, 唐丽娟, 俞汝勤, 蒋健晖. 基于蛋白结合抑制转录的纳米机器实现小分子蛋白质相互作用的无标记均相荧光检测. 中国科学: 化学, 2011, 41: 1667–1667
27 Su HY, Zheng QL, Li HB. Colorimetric detection and separation of chiral tyrosine based on *N*-acetyl-*L*-cysteine modified gold nanoparticles. *J Mater Chem C*, 2012, 22: 6546–6548
28 Yang XM, Yang L, Dou Y, Zhu SS. Synthesis of highly fluorescent lysine-stabilized Au nanoclusters for sensitive and selective detection of Cu^{2+} ion. *J Mater Chem C*, 2013, 1: 6748–6751
29 Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AMC, Bortolotto T, Fischer FL, Terenzi H, Neves A, Pereira-Maia ECP. Two new ternary complexes of copper (II) with tetracycline or doxycycline and 1, 10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorg Chem*, 2011, 50: 6414–6424
30 苏洋. 牛奶中抗生素及三聚氰胺残留的竞争检测方法与实验. 博士学位论文. 天津: 天津大学, 2010. 49–56
31 Gao F, Ye QQ, Cui P, Zhang L. Efficient fluorescence energy transfer system between CdTe-doped silica nanoparticles and gold nanoparticles for turn-on fluorescence detection of melamine. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 4550–4558

Synthesis of gold nanoclusters based on *L*-Cysteine for selective sensing Cu^{2+} and doxycycline

Yuanjiao Feng, Xiaoming Yang, Shanshan Zhu, Hongbo Liao, Hanru Liu*

College of Pharmaceutical Scicences, Southwest University, Chongqing 400716, China
*Corresponding author (email: liuhr1118@126.com)

Abstract: *L*-Cysteine, serving as both a reducing agent and stabilizer, was employed for synthesis of gold nanoclusters (AuNCs) in aqueous solution. The AuNCs existed in sizes of 3–5 nm, and emitted yellow-green fluorescence under UV light. Subsequently, the AuCNs prepared here were applied for detections of Cu^{2+} on the basis of interactions between Cu^{2+} and the groups of the AuCNs, which lead to the fluorescence quenching of the AuCNs, and can be used for detection of Cu^{2+} in the real samples (urine). In addition, the fluorescence of AuNCs-Cu^{2+} complex will recover while doxycycline(DC) were introduced, mainly due to the more intensive interactions between Cu^{2+} and DC, thus this complex were employed as a fluorescent probe for assaying DC. Moreover, the optimal conditions for sensing both Cu^{2+} and DC have also been explored, and the results showed favorable liner relationships and satisfactory recoveries. Significantly, this new fluorescent probe was used for determining DC in milk samples, demonstrating its practical value. Therefore, the current AuCNs implied potential of broadening avenues for analyzing both Cu^{2+} and DC.

Keywords: gold nanoclusters(AuNCs), copper ions(Cu^{2+}), doxycycline(DC), off-on mechanism