



中华人民共和国国家标准

GB/T 36082—2018/ISO/TS 14101:2012

纳米技术 特定毒性筛查用金纳米颗粒 表面表征 傅里叶变换红外光谱法

Nanotechnologies—Surface characterization of gold nanoparticles for nanomaterial
specific toxicity screening—FT-IR method

(ISO/TS 14101:2012, Surface characterization of gold nanoparticles
for nanomaterial specific toxicity screening: FT-IR method, IDT)

2018-03-15 发布

2018-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

| | |
|---|----|
| 前言 | I |
| 引言 | II |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 符号和缩略语 | 2 |
| 5 样品制备 | 3 |
| 6 FT-IR 测试程序 | 6 |
| 7 应用举例 | 10 |
| 附录 A (资料性附录) 验证配体交换的实例 | 12 |
| 附录 B (资料性附录) 金纳米颗粒表面结合生物化学分子的定性分析实例 | 14 |
| 附录 C (资料性附录) 窗片材料选择指南 | 17 |
| 参考文献 | 18 |

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO/TS 14101:2012《特定毒性筛查用金纳米颗粒表面表征：傅里叶变换红外光谱法》。

与本标准中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

——GB/T 32269:2015 纳米科技 纳米物体的术语和定义 纳米颗粒、纳米纤维和纳米片 (ISO/TS 27687:2008, IDT)。

本标准作了如下编辑性修改：

——为与归口标准化技术委员会现有标准系列一致，将标准名称修改为《纳米技术 特定毒性筛查用金纳米颗粒表面表征 傅里叶变换红外光谱法》；

——符号和缩略语中，由于 g 为重力加速度， $\times g$ 为相对离心力单位符号，因此将 \times 去掉；

——5.1.3 中，为符合离心操作要求，将样品体积 1.5 mL 修正为 1 mL；

——附录 A 中，根据柠檬酸盐分子结构，增加注，建议将 $\text{C}=\text{O}$ 的振动模式改为 COO 的振动模式；根据红外光谱振动频率分类规则，增加注，建议将 $1\,581\text{ cm}^{-1}$ $\text{C}=\text{O}$ 伸缩改为 COO 反对称伸缩，将 $1\,396\text{ cm}^{-1}$ 羧酸 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 弯曲改为 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 弯曲和 COO 对称伸缩，将 $1\,257\text{ cm}^{-1}$ 羧酸 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩改为 $\text{C}-\text{C}$ 伸缩振动，将 $1\,111\text{ cm}^{-1}$ 醇 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩改为醇和醚的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动；

——7.2 和附录 B 中，根据红外光谱振动频率分类规则，增加注，建议将 $3\,311\text{ cm}^{-1}$ $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动改为酰胺 A 带 ($\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动)，将 $1\,653\text{ cm}^{-1}$ $\text{N}-\text{H}$ 弯曲改为酰胺 I 带 ($\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动)，将 $1\,550\text{ cm}^{-1}$ $\text{N}-\text{H}$ 弯曲改为酰胺 II 带 ($\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动)。

本标准由中国科学院提出。

本标准由全国纳米技术标准化技术委员会 (SAC/TC 279) 归口。

本标准负责起草单位：国家纳米科学中心。

本标准参加起草单位：珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司、北京大学。

本标准主要起草人：郭玉婷、葛广路、华瑞、翁诗甫。

引 言

金纳米颗粒由于尺寸、形状和表面配体易于控制,成为研究理化性质和细胞毒性之间关系的理想模型体系^[1-3]。在金纳米颗粒各种性质中,人们发现其表面配体特性,如化学组成、分子结构和结合分子的数量,对决定金纳米颗粒的行为起到重要作用,比如在溶液中聚集或团聚的程度、在细胞培养液中与生物分子的键合,以及对活细胞的毒性^[4-12]。另一方面,合成过程中的表面配体改性并不总是成功的,配体置换的程度宜在金纳米颗粒的特定细胞毒性测试前确定,以获得可靠和一致的结果。

FT-IR(傅里叶变换红外)吸收光谱是纳米颗粒表面配体鉴定和定量分析的重要工具之一。采用FT-IR方法可对结合在纳米颗粒表面的配体分子的结构和相对数量进行分析^[13-20]。然而,金纳米颗粒是在水中合成的,且浓度很低,对测量结果的解释变得复杂。低浓度的金纳米颗粒测试得到的吸光度值很小,易受背景噪声或痕量杂质吸收的影响。由于细胞毒性测试是在水相环境中进行的,所以如果想研究表面特性对金纳米颗粒毒性的影响,需要分析在水溶液中的金纳米颗粒表面存在什么物质。然而,水分子在很宽的波数范围内对红外光有很强的吸收,所以无法用红外光谱对浓度非常低的溶质进行分析。因此有必要制定测试指南,使上述问题的影响最小化。在本标准中,力求制定一个检测干燥膜中的金纳米颗粒的表面结合化学基团的技术规范,以提供水溶液中金纳米颗粒的结合分子的信息。FT-IR测量程序的标准化将作为这一技术规范的基础,大量篇幅也将用于描述正确进行FT-IR分析所需要的样品制备过程。

纳米技术 特定毒性筛查用金纳米颗粒 表面表征 傅里叶变换红外光谱法

1 范围

本标准规定了测试纳米材料细胞毒性实验前后鉴别干燥金纳米颗粒薄膜中表面结合分子的傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)。

注 1: 金纳米颗粒在测试之前表面可能已经结合了配体,在细胞毒性测试过程中也可能额外覆盖(或包覆)有机或生物分子。

注 2: 采用傅里叶变换红外光谱法分别检测磷酸二酯、胺或脂质的有关吸收谱带,可以分别确定结合在金纳米颗粒上的核酸、氨基酸、脂质或细胞膜的成分,但核酸、蛋白质或脂质的类型不能通过红外光谱具体确定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO/TS 27687 纳米科技 纳米物体的术语和定义 纳米颗粒、纳米纤维和纳米片(Nanotechnologies—Terminology and definitions for nano-objects—Nanoparticle, nanofibre and nanoplate)

3 术语和定义

ISO/TS 27687 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用,以下重复列出了 ISO/TS 27687 中的一些术语和定义。

3.1

衰减全反射模式 attenuated total reflection mode

ATR 模式

一种仪器工作模式,在该模式下红外光在晶体内的入射角要大于临界角。

注: 红外光在晶体的上表面被完全反射,其强度由于覆盖在晶体上表面材料的吸收而衰减。吸收的红外光频率用来确定化学基团,吸光度用于确定化学基团的数量。

3.2

透析 dialysis

小分子或离子通过薄膜扩散与溶液中的大分子或悬浮物分离的过程。

[ISO 6107-2:2006,定义 38]

3.3

傅里叶变换红外光谱 Fourier transform infrared spectroscopy; FT-IR

基于样品中化学基团对红外辐射的吸收,以鉴别和定量化学基团的一种分析化学技术。

3.4

检出限 limit of detection

LOD

根据给定的测量程序得到的测量值, β 为由测量值漏报某种成分的概率, α 为误报的概率。

注 1: 引自 ISO/IEC 指南 99:2007, 定义 4.18。

注 2: 根据 IUPAC 推荐, α 和 β 值均取 0.05, 重复 5 次空白实验标准偏差的 2.776 倍即为 LOD。

注 3: 参见 ISO 17191。

3.5

定量下限 limit of quantification; LOQ

被测样品在可接受的准确度和精密度下能检测到的最低值。

注 1: LOQ 可以确定为光度噪声标准偏差的 10 倍值, 对于最小信号水平 A 将给出相对精确度 $\sigma_A/A \leq 10\%$ 。

注 2: 参见参考文献[24]。

3.6

截留分子质量 molecular weight cut-off value; MWCO

经过 16 h 的透析后, 截留量超过 90% 以上溶质的分子质量。

注: 参见参考文献[25]和[26]。

3.7

纳米物体 nano-object

一维、二维或三维外部维度处于纳米尺度的物体。

注: 用于所有相互分离的纳米尺度物体的通用术语。

[ISO/TS 27687:2008, 定义 2.2]

3.8

纳米颗粒 nanoparticle; NP

三个外部维度都在纳米尺度的纳米物体。

注: 如果纳米物体最长轴和最短轴的长度差别显著(大于 3)时, 用纳米棒或纳米片来表示纳米颗粒。

[ISO/TS 27687:2008, 定义 4.1]

3.9

纳米尺度 nanoscale

处于 1 nm~100 nm 之间的尺寸范围。

注 1: 本尺寸范围通常、但非专有地表现出不能由较大尺寸外推得到的特性。对于这些特性来说, 尺度上、下限值是近似的。

注 2: 本定义中引入下限(约 1 nm)的目的是为了避免在不设定下限时, 单个或一小簇原子被默认为是纳米物体或纳米结构单元。

[ISO/TS 27687:2008, 定义 2.1]

3.10

预检(合格的)蒸馏水 pre-tested distilled water; DW

经过 FT-IR 检测, 证实不含红外吸收杂质的有效蒸馏水。

3.11

相对离心力 relative centrifugal force; RCF

相对于地球重力的加速度力。

3.12

表面等离子激元共振带 surface plasmon resonance band; SPR

由固体表面附近区域内的电子集体振荡产生的吸收的光的频率范围。

注: SPR 发生在金属薄膜或金属纳米颗粒中。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

AuNP:金纳米颗粒

IR:红外

MW:分子质量

SCM:含血清的介质

UV/Vis:紫外/可见

g :地球的重力加速度,作为相对离心力的一个参考单位

5 样品制备

5.1 去除未结合的分子

5.1.1 通则

由于 FT-IR 吸收光谱测量的是样品膜中所有分子,所以在制备样品膜前,除溶剂外,所有未结合的红外活性分子都需要从溶液中去除,以便正确检测结合在金纳米颗粒表面的分子。

5.1.2 透析

透析是一种采用合适的截留分子质量的膜将未结合分子与金纳米颗粒有效分开的方法。正确使用时,透析膜可以按照样品和透析液的体积比来降低透析后未结合分子的浓度,一般情况下可截留 90% 以上的纳米颗粒。建议截留分子质量小于被保留物质分子质量的一半,大于穿过透析膜物质分子质量的 3 倍。由于透析膜的效率取决于分子的电荷和形状,透析膜去除未结合分子的效率应在分离金纳米颗粒和未结合分子之前进行验证。在效率测试前,需要对透析膜进行测试,看它是否存在红外吸收杂质。杂质测试流程如下:

- a) 将 0.5 mL~3 mL 的 DW 装入透析袋中。
- b) 将装有 DW 的透析袋用合适的夹子封好,在 DW(体积 ≥ 600 mL)水浴中透析 16 h。
- c) 使用溶剂浸湿的棉签清洁 ATR 晶体或 IR 窗片的表面。
- d) 从透析袋中取出所需体积(2 μ L 或 ≥ 200 μ L)的液体。

注: ATR 方法使用 2 μ L,透射方法使用量 ≥ 200 μ L。

- e) 将所取液体滴在 ATR 晶体或 IR 窗片上,在脱水室中干燥(见 5.2),这一过程称为滴干。
- f) 采用 6.2 或 6.3 的程序测试溶解在所取液体中任何潜在杂质的 FT-IR 光谱。
- g) 如果在关注的频率范围内红外谱带没有高出检出限,则认为透析膜没有红外活性杂质。

这种无红外活性杂质影响的膜可用于透析。检测透析效率的流程如下:

- a) 将 0.5 mL~3 mL 仅含有能通过透析膜的分子的溶液装入透析袋中:
 - 通过透析膜的分子为交换前和交换后的表面配体,或血清中的生物分子,或键合实验中的细胞提取物;
 - 样品溶液的浓度根据表面配体在纳米颗粒悬浮液可以存在的最大数量设定。这个值可能与交换过程中的配体分子添加量相等,或者由表面的金原子数估计,这可由晶格常数^[27]和金纳米颗粒的直径计算得到。配体分子的最大数目是假设在配体之间无空间位阻条件下单层键合时表面上的金原子个数。
- b) 将装有样品的透析袋用合适的夹子封好,在 DW(体积 ≥ 600 mL)水浴中透析 16 h。
- c) 从透析袋中取出所需体积(2 μ L 或 ≥ 200 μ L)的样品。
- d) 在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干样品溶液。
- e) 采用 6.2 或 6.3 的程序测样品膜的 FT-IR 光谱。
- f) 从水浴中取出所需体积(2 μ L 或 ≥ 200 μ L)的样品。

- g) 在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干样品溶液。
- h) 采用 6.2 或 6.3 的程序测试样品膜的 FT-IR 光谱。
- i) 比较步骤 e) 和 h) 得到的光谱。如果两个光谱都没有高于 LOD 的谱带,提高样品溶液浓度重复测试。由于透析袋和水浴中的样品在经过适当透析后具有相同的组分,所以如果它们的谱带都高于 LOD 并且强度在测试不确定度范围内相等,则认为膜是有效的。

5.1.3 离心

离心法可以用于分离金纳米颗粒与未结合的分子,尤其是当未结合的分子的分子质量太大找不到合适的截留分子质量透析膜时。离心速度不足将导致金纳米颗粒悬浮在上清液中,这可以从使用紫外/可见吸收光谱观察到的 SPR 谱带吸收来确定。离心速度过高将导致未结合的分子沉降。在使用离心方法进行 FT-IR 分析时,要确保溶液中重新悬浮的金纳米颗粒有足够的浓度。紫外/可见吸收光谱的 SPR 谱带能提供有效沉降和重新悬浮的信息。如果未结合分子的吸收谱能从 SPR 吸收区中排除,聚集/团聚程度则可通过金纳米颗粒的 SPR 吸收带变宽来估计。

为了保证金纳米颗粒有效地沉降而不受未结合分子的干扰,确定离心力和离心时间组合的程序如下:

- a) 将 1 mL 的金纳米颗粒溶液置于 2 mL 的微量离心管中。
- b) 采用表 1 中推荐的离心力和离心时间离心沉降金纳米颗粒。
- c) 尽可能多地移走管中的上清液,而不扰动沉积物;以 DW 为参比测量 400 nm~750 nm 范围内上清液的紫外/可见吸收光谱:
——在探讨未结合分子的吸收情况时,检查金纳米颗粒的 SPR 谱带是否出现。
- d) 如果 SPR 谱带的吸光度最大值高于 0.05,即紫外/可见光谱定量分析的低限^[28],增加离心力或离心时间 20%,重复步骤 a)~c)^[28]。
- e) 如果 SPR 谱带的吸光度最大值低于 0.05,沉降所需的离心力和离心时间已经足够。

表 1 金纳米颗粒沉降所推荐的相对离心力和离心时间与颗粒直径的函数关系

| 金纳米颗粒直径 nm | 样品体积 mL | 相对离心力 × g | 离心时间 min |
|---------------|------------|--------------|-------------|
| 5 | 1 | 19 000 | 60 |
| 15 | 1 | 10 000 | 20 |
| 30 | 1 | 5 000 | 20 |
| 50 | 1 | 2 000 | 20 |
| 100 | 1 | 1 000 | 20 |

确定离心力和离心时间上限的程序如下:

- f) 将 1 mL 除了金纳米颗粒外含有所有其他组分的溶液,如交换前后的自由配体溶液、SCM 或细胞提取物,置于 2 mL 微量离心管中。
- g) 按照步骤 a)~e) 确定的离心力和离心时间进行离心。
- h) 取 1 mL 不包含任何潜在沉积物的上清液。
- i) 取所需体积(2 μL 或 ≥200 μL)上清溶液;置于 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干溶液,并测量 FT-IR 光谱。
- j) 振荡离心管中剩余溶液,取所需体积(2 μL 或 ≥200 μL)剩余溶液,置于 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干溶液,并测量 FT-IR 光谱。

- k) 重复步骤 f)~j) 三次作为重复性实验;分别对上清液 FT-IR 光谱(光谱 IR-1)和剩余溶液的 FT-IR 光谱(光谱 IR-2)取平均值。
- l) 比较“光谱 IR-1”和“光谱 IR-2”;如果“光谱 IR-2”中高于定量下限(LOQ)的任何吸收谱带强度大于“光谱 IR-1”的 1.3 倍,则应该减小离心力或离心时间以避免未结合分子沉降。如果“光谱 IR-2”中高于定量下限(LOQ)的所有吸收谱带强度是“光谱 IR-1”吸收谱带强度的 0.7 倍~1.3 倍,则离心力和离心时间的上限值确定。
- m) 如果由步骤 a)~e) 确定的离心力和离心时间高于由步骤 f)~l) 确定的上限值,则离心力和离心时间可以减小,直到上清液 SPR 吸光度最大值达到 0.05 时定为下限值。

确定离心力和离心时间后,金纳米颗粒将通过以下步骤与未结合分子进行分离:

- n) 将 1 mL 金纳米颗粒溶液置于 2 mL 微量离心管中。
- o) 根据步骤 a)~m) 确定的离心力和离心时间沉降金纳米颗粒。
- p) 在不扰动沉积物的情况下,尽可能多地移走上清液。
- q) 在沉积物管中加入 1 mL 的 DW,振荡离心管 30 s 得到稳定的悬浮物。
- r) 重复步骤 o)~q) 三次。
- s) 将步骤 r) 得到的溶液制备成样品膜用于 FT-IR 测试。
- t) 如果在步骤 q) 中得到的金纳米颗粒沉积物由于发生团聚而不能重新悬浮,为了使沉积物有效地重新悬浮,可加入少量的酸或碱:
 - 对于胺类功能化的金纳米颗粒,在步骤 q) 后加 150 μ L 浓度为 1 mol/L 的 HCl 溶液到 1 mL 金纳米颗粒的悬浮液中,再次振荡 30 s;
 - 对于羧酸盐功能化的金纳米颗粒,在步骤 q) 后加 150 μ L 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液到 1 mL 金纳米颗粒的悬浮液中,再次振荡 30 s;
 - 这些添加物在步骤 r) 中被洗掉。

5.2 脱水干燥

水对红外光有强的吸收,样品膜应脱水。为了在 ATR 晶体或 IR 窗片上制备干燥的金纳米颗粒膜,应避免污染,应该按照下列程序做空白实验进行验证:

- a) 测量在脱水室中金纳米颗粒溶液完全脱水所需的时间。脱水室可以是(真空)烘箱或(真空)干燥器。在使用真空烘箱或干燥器时,真空泵要选无油型,或者在干燥室和真空泵之间配备冷阱。
- b) 在金纳米颗粒脱水过程中,将空白的 ATR 晶体或 IR 窗片放在脱水室中。
- c) 测量通过空白 ATR 晶体或 IR 窗片的 IR 单光束光谱。
- d) 用高纯度异丙醇湿棉签清洁 ATR 晶体或 IR 窗片表面。测量通过清洁后的 ATR 晶体或 IR 窗片的 IR 单光束光谱。
- e) 计算在脱水干燥室中干燥过的 ATR 晶体或 IR 窗片的 FT-IR 光谱。
- f) 如果在所关心的频率区域内没有出现高于 LOD 的红外谱带,则脱水过程没有引进红外活性杂质。否则需要找出杂质的来源,而且在重复步骤 b)~e) 时,将红外谱带吸光度降到 LOD 以下。

5.3 样品管释放到蒸馏水中的杂质筛选实验

一些锥形管或微量离心管在装有蒸馏水超过几分钟后,会释放出烃类杂质;虽然这些杂质的吸光度值非常低($<10^{-3}$),但会严重影响对金纳米颗粒表面配体的分析,因为金纳米颗粒本身的 FT-IR 吸光度值也可能非常低。最好避免使用释放烃类杂质的样品管。在检测来自样品管的杂质前,要检测蒸馏水是否含有杂质。蒸馏水的杂质检测流程如下:

- a) 取所需体积($2\ \mu\text{L}$ 或 $\geq 200\ \mu\text{L}$)的蒸馏水;
- b) 在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干的蒸馏水;
- c) 测试通过 ATR 晶体或 IR 窗片的 IR 单光束光谱(见 6.2 或 6.3);
- d) 用高纯度异丙醇湿棉签清洁 ATR 晶体或 IR 窗片表面,测量通过清洁后的 ATR 晶体或 IR 窗片的 IR 单光束光谱;
- e) 计算滴干的蒸馏水的 FT-IR 光谱;
- f) 如果在所关心的频率区域内没有出现高于 LOD 的红外谱带,那么所用的蒸馏水不含红外活性杂质,这种蒸馏水称作“预检(合格的)蒸馏水(DW)”。否则需要找出杂质的来源,而且再重复步骤 a)~e)时,将红外谱带吸光度降到 LOD 以下。

在证实蒸馏水不含杂质后,来自样品管的 FT-IR 活性杂质对蒸馏水的污染可通过以下步骤测试:

- a) 样品管(微量离心管或锥形管)中加入 DW 至 80% 体积;
- b) 盖上盖子,振荡样品管 30 s;
- c) 蒸馏水在样品管中保留 30 min 以上;
- d) 从样品管中取所需体积($2\ \mu\text{L}$ 或 $\geq 200\ \mu\text{L}$)的液体;
- e) 在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干样品液体;
- f) 测量存放在样品管中的蒸馏水潜在杂质的 FT-IR 光谱(见 6.2 或 6.3);
- g) 如果在所关心的频率区域内没有出现高于 LOD 的红外谱带,说明样品管不含红外活性杂质,这种样品管称为“预检(合格的)样品管”。否则用 DW 或高纯度的异丙醇清洗样品管,干燥样品管并重复步骤 a)~f)。如果在所关心的频率区域内仍有超过 LOD 的红外谱带,则使用其他公司提供的样品管,并从步骤 a)~f)重复测试。

6 FT-IR 测试程序

6.1 通则

在本章中,描述了 FT-IR 分析的测试过程。可以使用 ATR 和透射法测试,透射法应使用非水溶性红外透光材料。

6.2 ATR 方法

ATR 方法适用于薄膜定量分析,如溶液制备的金纳米颗粒薄膜。将一定量的金纳米颗粒悬浮液或溶液滴在 ATR 晶体元件上。溶剂蒸发后,金纳米颗粒或溶剂化分子形成薄膜,其厚度与浓度成正比。假设该膜与晶体保持紧密接触,而且膜的厚度小于 ATR 晶体表面隐失波的穿透深度,则测得的吸收信号正比于薄膜厚度。因为溶液中金纳米颗粒的浓度通常很低($< 1\ \mu\text{mol/L}$),溶液制备的样品膜是非常薄的(厚度 $< 1\ \mu\text{m}$)。推荐使用 ZnSe 或金刚石作为 ATR 晶体材料,并具有 2 mm 左右直径的圆形有效检测区域。这些材料是用作 IR 窗片的很好材料,因为它们是非水溶性的,并且在红外区域具有高透过性。

使用 ATR 模式的主要优点之一是,由于 ATR 晶体有效区域小,FT-IR 测试所需样品体积很小(约 $2\ \mu\text{L}$)。使用 ATR 方法得到的 FT-IR 光谱吸收图形不能直接与采用透射方法得到图形进行比较,因为光在 ATR 晶体表面的穿透深度与其频率有关。然而,使用 ATR 方法得到的 FT-IR 光谱,如果和用同样的方法获得的光谱进行比较,并且在不超出方法的线性范围时,可以提供定量信息。将背景干扰降到最小,采用 ATR 方法进行 FT-IR 光谱测量的程序如下:

- a) 打开 FT-IR 光谱仪,开启干燥氮气(N_2)气源,吹扫红外光学台光路。然后预热和吹扫仪器 60 min 以上。充分吹扫所需时间应根据 6.4 中吹扫测试程序确定。通常建议将仪器一直保持在开机状态以维持仪器稳定。

- b) 如果需要,使用液氮(N₂)或设备附带的其他冷却系统冷却红外探测器。建议使用在 6.4 程序中验证的持续时间内,能提供 LOD 至少为 3.0×10^{-4} 吸光度单位的探测器。
- c) 确认仪器已经稳定。
- d) 用高纯度异丙醇湿棉签清洁晶体。
- e) 在晶体上滴干样品。
- f) 测试样品单光束光谱,记录分辨率和测试所用时间。
- g) 使用溶剂浸湿棉签在原位清洁晶体。
- h) 测试背景的单光束光谱。
- i) 从背景和样品单光束光谱计算样品的吸收光谱。

最好先测试样品,后测量背景,因为这样时间间隔更短,并且不需移开晶体。

6.3 透射方法

高压压出来的锭片经常用在 FT-IR 光谱测量的透射方法中,然而锭片形态引起的背景变化会严重干扰金纳米颗粒的红外弱吸收。在制备透射方法测试所用的样品时,推荐在非水溶性、透红外光的窗片上制备脱水样品膜。从背景稳定性考虑,这种方法比锭片法得到的结果更可靠。利用透射法进行 FT-IR 光谱测定的过程如下:

- a) 打开 FT-IR 光谱仪,开启干燥氮气(N₂)气源,吹扫红外光学台光路。然后预热和吹扫仪器 60 min 以上。充分吹扫所需时间应根据 6.4 中吹扫测试程序确定。通常建议将仪器一直保持在开机状态以维持仪器稳定。
- b) 如果需要,使用液氮(N₂)或设备附带的其他冷却系统冷却红外探测器。建议使用在 6.4 程序中验证的持续时间内能提供 LOD 至少为 3.0×10^{-4} 吸光度单位的探测器。
- c) 确定仪器已经稳定。
- d) 用高纯度异丙醇湿棉签清洁 IR 窗片。
- e) 在 IR 窗片上滴干样品。
- f) 测量样品单光束光谱,记录分辨率和测试所用时间。
- g) 取下 IR 窗片,利用溶剂浸湿棉签擦掉样品膜。
- h) 测量背景的单光束光谱。
- i) 从背景和样品单光束光谱计算样品的吸收光谱。
- j) 尽可能使用样品穿梭器取代步骤 g) 和 h),样品穿梭器上可以安装两个窗片,分别用于样品和背景测量:

- 仪器配备样品穿梭器后,在测试样品和背景的单光束光谱过程中,红外光束方向的吹扫气氛保持稳定;
- 在这种情况下,背景单光束光谱应采用清洁的、和制备样品膜所用窗片的材料和形状相同的空白窗片来进行测量;
- 分别测试样品空白窗片和背景空白窗片的红外吸收光谱,从样品的吸收光谱中减去这两个光谱的差谱。

6.4 充分吹扫所需时间的确定

6.4.1 通则

即使在气态,FT-IR 方法仍可以非常灵敏地检测分子化合物,所以需要吹扫红外光路,避免空气中水汽、二氧化碳和其他可能杂质的干扰。可以采用流动的干燥氮气(N₂)吹扫红外光经过的整个区间。不充分的吹扫通常会在水汽和二氧化碳区出现红外谱带,这是由于测量样品和背景光谱时这些分子存

在浓度差。因此,在测量红外单光束光谱之前,应该确定充分吹扫所需的时间。充分吹扫所需时间应按照以下程序确定。

6.4.2 ATR 方法

ATR 方法如下:

- a) 在提供干燥氮气进入仪器吹扫入口的同时,将清洁的 ATR 晶体放置在仪器晶体位置处。
- b) 采集 ATR 晶体反射的红外单光束光谱作为背景。
- c) 等待预先设定的吹扫时间,例如 10 min。预先设定的时间最好和日常分析中样品和背景测试之间的时间间隔相同。
- d) 采集 ATR 晶体反射的红外单光束光谱作为样品信息;计算清洁的 ATR 晶体的 FT-IR 吸收光谱。
- e) 继续等待预先设定的时间间隔,例如 10 min,和 c) 相同,进行进一步吹扫。
- f) 采集 ATR 晶体反射的红外单光束光谱作为样品信息;计算清洁的 ATR 晶体的 FT-IR 吸收光谱。
- g) 比较由最后两次测量所获得的光谱:
 - 如果在整个波长范围内,这两个红外光谱吸收谱带均小于 LOD,则充分吹扫所需时间确定为直到前一次测量的吹扫时间;
 - 否则,重复步骤 b)~g),直到在整个光谱范围内最后两次测量所得红外光谱吸收谱带在 LOD 内一致。

6.4.3 透射方法

透射方法如下:

- a) 在提供干燥氮气进入仪器吹扫入口的同时,将清洁的 IR 窗片放置在仪器窗片位置处。
- b) 采集穿过 IR 窗片的单光束光谱作为背景。
- c) 等待预先设定的吹扫时间,例如 10 min。预先设定的时间最好和日常分析中样品和背景测试之间的时间间隔相同。
- d) 采集通过 IR 窗片的红外单光束光谱作为样品信息;计算清洁的 IR 窗片的 FT-IR 吸收光谱。
- e) 继续等待预先设定的时间间隔,例如 10 min,和 c) 相同,进行进一步吹扫。
- f) 采集通过 IR 窗片的红外单光束光谱作为样品信息;计算清洁的 IR 窗片的 FT-IR 吸收光谱。
- g) 比较由最后两次测量所获得的光谱:
 - 如果在整个波长范围内,这两个红外光谱吸收谱带均小于 LOD,则充分吹扫所需时间确定为直到前一次测量的吹扫时间;
 - 否则,重复步骤 b)~g),直到在整个光谱范围内最后两次测量所得红外光谱吸收谱带在 LOD 内一致。

6.5 红外谱带的强度对浓度的线性范围

为了进行定量分析,需要确定特定振动模式的红外谱带吸光度对金纳米颗粒浓度的线性范围;因为分子振动频带的吸光度可能会在分子与金纳米颗粒结合后发生改变,所以这里的定量不是对与金纳米颗粒结合的配体数量进行定量,而只是对谱带强度进行定量。当红外谱带强度对浓度的线性关系建立后,就有可能通过测量相关的谱带强度,确认配体交换程度(见 7.1)。通过分别测量由一系列金纳米颗粒稀溶液制备的样品膜的红外谱带强度,可以得到配体的交换程度。确定红外谱带强度对浓度的线性范围的实验程序如下:

- a) 取所需体积(2 μL 或 $\geq 200 \mu\text{L}$)的样品,在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干溶液;

- b) 按照 6.2 或 6.3 的步骤测试 FT-IR 光谱；
- c) 采取浓度减半的方式配制一系列溶液(例如 1/2、1/4、1/8、1/16)，至少配制四个系列稀释溶液；
- d) 测量每个稀释溶液的 FT-IR 吸收光谱；
- e) 设定稀释因子的倒数为“ x ”(例如 1/2、1/4、1/8、1/16)和最强的红外谱带的吸光度为“ y ”，在线性刻度坐标系中标出这些值；
- f) 确定吸光度与稀释倍数倒数线性相关的浓度范围(至少通过三个点)；
- g) 计算一系列稀释液的每一张光谱各个谱带对最强谱带的相对强度比值；
- h) 红外谱带相对强度比值对稀释因子倒数作图，确定相对强度比值与稀释因子无关的浓度范围(至少通过两个点)；
- i) 有效 FT-IR 光谱分析的浓度范围应同时满足步骤 f) 和 h) 中的条件。

6.6 检测限和定量下限的确定

6.6.1 通则

为了进行定量分析，需要确定每个振动频率的检测限和定量下限。根据 ISO 17191， $\sigma_A/A \leq 10\%$ 是按照光度计噪声标准偏差的 10 倍计算得到的。因此，LOD 和 LOQ 可以分别按照光度计噪声标准偏差的 2.776 倍和 10 倍计算(LOD 取 $2.776\sigma_A$ ，LOQ 取 $10\sigma_A$)。用于对每一频率的 LOD 和 LOQ 估算的光度计噪声分析流程如下(同样重要的是按照 6.2 或 6.3 中所述设置和稳定仪器)。

6.6.2 ATR 方法

ATR 方法如下：

- a) 在仪器中的晶体位置安装一个清洁的 ATR 晶体；
- b) 采集从 ATR 晶体反射的红外单光束光谱；
- c) 利用溶剂浸湿棉签清洁 ATR 晶体表面；
- d) 采集 ATR 晶体反射的红外单光束光谱，作为背景；
- e) 计算清洁的 ATR 晶体的 FT-IR 吸收光谱；
- f) 重复步骤 b) 到 e)，测量至少五个独立的 IR 光谱；
- g) 计算从步骤 a) 到 f) 得到的五个 FT-IR 吸收光谱每个频率吸光度的标准偏差；
- h) 该标准偏差乘以 2.776 得到该频率的 LOD；
- i) 该标准偏差乘以 10 得到该频率的 LOQ。

6.6.3 透射方法

透射方法如下：

- a) 在仪器中的样品位置安装一个清洁的 IR 窗片；
- b) 采集透射过 IR 窗片的红外单光束光谱；
- c) 取下窗片，利用溶剂浸湿棉签进行 IR 窗片的表面清洁；
- d) 重新安装清洁后的窗片，采集透射过 IR 窗片的 IR 单光束光谱作为背景；
- e) 计算清洁窗片的 FT-IR 吸收光谱；
- f) 重复步骤 a) 到 e)，测试至少五个独立的 IR 光谱；
- g) 计算从步骤 a) 到 f) 得到的五个 FT-IR 吸收光谱每个频率吸光度的标准偏差；
- h) 该标准偏差乘以 2.776 得到该频率的 LOD；
- i) 该标准偏差乘以 10 得到该频率的 LOQ。

6.7 重复性测定

为了进行定量分析,应确定 IR 吸收谱带的测量重复性。重复性可用重复吸收测量的 95% 置信区间进行评价^[29]。IR 吸收谱带重复性分析流程如下:

- 按照 6.2 或 6.3,取所需体积的样品溶液,进行干燥样品的 FT-IR 光谱测试:
——样品溶液的浓度应按照 6.5 调整在线性范围内。
- 分析高于 LOQ 强度的红外谱带强度。
- 通过重复制样、测量和光谱计算流程获得相同溶液制备的样品膜的至少三个独立红外光谱。
- 从得到的红外光谱中计算红外谱带的标准偏差。
- 使用式(1),由标准偏差和独立观察的光谱数目计算相对重复性的 95% 置信区间($CI_{95\%,rRpt}$)。

$$CI_{95\%,rRpt} = [k \times s(A_\nu) / \sqrt{N}] / A_{\nu,m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $CI_{95\%,rRpt}$ ——相对重复性的 95% 置信区间;
- k ——对于给定的置信水平和数据个数的包含因子(k 值总结在参考文献[30]中);
- $s(A_\nu)$ ——从 N 个光谱数据得到的吸光度的标准偏差;
- N ——独立的光谱数;
- $A_{\nu,m}$ ——测得的吸光度的平均值。

7 应用举例

7.1 配体交换度

从一种化合物到另一种化合物的配体交换程度可以通过比较相对强度来评估。在评估过程中,所有强度高于 LOQ 的吸收谱带都可以使用。此外,光谱强度应如 6.5 所述与金纳米颗粒溶液浓度线性相关。下面列举了证实配体交换的程序:

- 在配体交换之前,取 1 mL 金纳米颗粒溶液。按照步骤 5.1.2 或 5.1.3 将金纳米颗粒与未结合的配体分开,并提供金纳米颗粒悬浮液。
- 在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干在步骤 a) 中制备的溶液,测量其 FT-IR 光谱。通过这项测量,得到配体交换前金纳米颗粒的 IR 光谱。
- 取所需体积用于金纳米颗粒表面交换的自由配体溶液。在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干溶液,测量其 FT-IR 光谱;通过这项测量,得到自由配体分子的 IR 光谱。
- 在配体交换后,取 1 mL 金纳米颗粒溶液。按照步骤 5.1.2 和 5.1.3 将金纳米颗粒从未结合的配体中分离出来,并提供金纳米颗粒悬浮液。
- 在 ATR 晶体或 IR 窗片上滴干步骤 d) 中制备的溶液,测量其 FT-IR 光谱。通过这项测量,得到配体交换后金纳米颗粒的 IR 光谱。
- 按照从最高频到最低频的顺序,列出在配体交换前金纳米颗粒红外光谱中超过 LOQ 的吸收谱带。从频率最高的谱带对应的“1”开始给吸收谱带编序号。
- 对 $-\text{CH}_2$ 伸缩振动谱带强度归一化后,分别计算步骤 b)、c) 和 e) 中得到的三个光谱中每个红外谱带的相对吸光度值。
- 如果任一光谱的 $-\text{CH}_2$ 伸缩振动谱带强度低于 LOQ,则选用其他谱带归一化,在步骤 b)、c) 和 e) 得到的所有 FT-IR 光谱,选用谱带的强度都应高于 LOQ。
- 红外谱带相对强度对谱带编号作图。
- 比较交换前金纳米颗粒和自由配体的相对强度图。检查在两张光谱中,任何红外谱带相对强

度比是否存在差异：

——如果没有红外谱带存在相对强度差异，则不能使用这种方法；

——如果有红外谱带存在相对强度差异，则标记出红外谱带用于比较。

- k) 比较配体交换后金纳米颗粒光谱中标记的红外谱带强度与另外两个光谱的谱带强度相对比值。从不同的红外谱带的相对比值定性估计交换的程度。
- l) 金纳米颗粒表面配体交换验证案例研究结果参见附录 A。

7.2 生物分子结合的定性测量

主要生化分子在金纳米颗粒表面的结合情况可以通过胺基、磷酸二酯或脂质振动模式来测定。可以在金纳米颗粒细胞毒性实验前后进行测定。测定结果可用来推断金纳米颗粒表面生化分子的结合情况。在细胞毒性实验过程中，采用 FT-IR 检测金纳米颗粒的表面分子的步骤如下：

- a) 测量用于细胞毒性实验的金纳米颗粒的 FT-IR 光谱。
- b) 在盛放活细胞和细胞培养液的样品管中加入固定体积的金纳米颗粒溶液。
- c) 将混合物在培养箱中放置固定的时间。
- d) 在预定的时间间隔，取出管中的上层液，而不汲取细胞。
- e) 将约 2 mL 样品溶液置于微量离心管里，以 $250 \times g$ 离心力将所取的上层液中的细胞或细胞碎片沉降。
- f) 取出可能含有金纳米颗粒、未结合的生物分子和盐的上清液。将盐和未结合的分子通过透析或离心的方法从溶液中除去。
- g) 测量分离出的金纳米颗粒的 FT-IR 光谱。将此光谱和步骤 a) 中得到的光谱进行比较。检查在最后一次测量的 FT-IR 光谱中是否有新的红外谱带出现：

——结合在金纳米颗粒表面的蛋白质类生化特征基团可以通过同时检测 $3\ 510\text{ cm}^{-1} \sim 3\ 310\text{ cm}^{-1}$ （脂肪族/芳香族的伯胺/仲胺伸缩）谱带、 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ （脂肪族/芳香族的伯胺/仲胺弯曲）谱带定性测量^[31-33]；

注：根据红外光谱振动频率分类规则，建议将 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ （脂肪族/芳香族的伯胺/仲胺弯曲）改为 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ [脂肪族/芳香族的酰胺 I 带（ $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动）和酰胺 II 带（ $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动）]。

——结合在金纳米颗粒表面的脂质或生物膜的生化特征基团可以通过检测增强的谱带 $2\ 935\text{ cm}^{-1} \sim 2\ 915\text{ cm}^{-1}$ （亚甲基的 $\text{C}-\text{H}$ 反对称伸缩振动）、 $2\ 865\text{ cm}^{-1} \sim 2\ 845\text{ cm}^{-1}$ （亚甲基的 $\text{C}-\text{H}$ 对称伸缩振动）和 $1\ 485\text{ cm}^{-1} \sim 1\ 445\text{ cm}^{-1}$ （亚甲基的 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动）定性测量^[34-36]；

——结合在金纳米颗粒表面的核酸类生化特征基团可以通过同时检测 $1\ 240\text{ cm}^{-1} \sim 1\ 220\text{ cm}^{-1}$ ， $1\ 130\text{ cm}^{-1} \sim 1\ 080\text{ cm}^{-1}$ （磷酸二酯骨架反对称/对称伸缩振动）谱带和 $1\ 500\text{ cm}^{-1} \sim 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ （糖基振动）谱带定性测量^[37-39]。

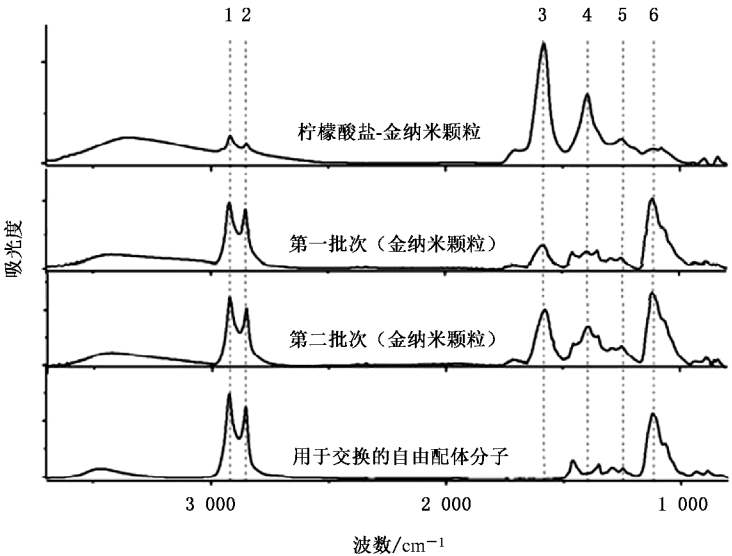
- h) 关于官能团的红外谱带指认信息可在参考文献[40]中查阅。
- i) 在含血清的介质中，金纳米颗粒表面的蛋白质的生化特征基团的定性测量案例参见附录 B。

附录 A
(资料性附录)
验证配体交换的实例

本附录描述采用 FT-IR 方法分析金纳米颗粒表面配体交换的一个验证案例。金纳米颗粒表面的柠檬酸盐交换为 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ (三乙二醇单-11-巯基十一烷基醚 triethylene glycol mono-11-mercaptoundecyl ether; TEMUE), 监测了配体交换前后的 FT-IR 光谱。在此案例中, 配体交换反应在两个独立实验中进行, 获得两批独立的金纳米颗粒溶液(图 A.1 中的第 1 和第 2 批次)。

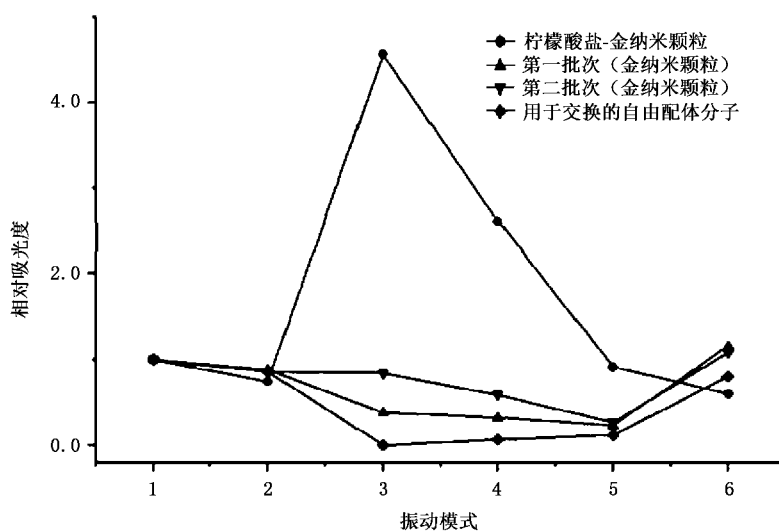
因为在柠檬酸盐中有两个亚甲基基团和三个羧酸根基团, 在 FT-IR 光谱中, $-\text{CH}_2$ 振动模式(模式 1 和模式 2)的吸光度值与 $\text{C}=\text{O}$ 的振动模式的吸光度值(模式 3 和模式 4)要相对低些。另一方面, TEMUE 有 17 个亚甲基基团, 没有羧酸根基团, 在 FT-IR 光谱中, $-\text{CH}_2$ 振动模式(模式 1 和模式 2)的吸光度值变得高于 $\text{C}=\text{O}$ 振动模式的吸光度值(模式 3 和模式 4)。这种差异可通过比较 FT-IR 光谱[图 A.1a)]观察到。由于配体交换程度不同, 各种振动模式相对于模式 1 来说相对吸光度图形发生了变化[图 A.1b)]。比较各种振动模式的相对强度, 可以看出, 第一批次的交换比第二批次的更加有效。这样的定性解释无法由简单的谱带检测推断出来。

注: 根据柠檬酸盐分子结构, 建议将 $\text{C}=\text{O}$ 的振动模式改为 COO 的振动模式。



a) 自由配体分子和金纳米颗粒表面配体由柠檬酸盐交换为 TEMUE 后的 FT-IR 光谱

图 A.1 自由配体分子和金纳米颗粒表面配体交换后的 FT-IR 光谱及其
各种振动模式的相对吸光度



b) 自由配体和与配体结合的金纳米颗粒的相对吸光度

说明:

每条线上的数字表示不同的振动模式。振动频率和官能团的关系如下:

- 1—— $2\,924\text{ cm}^{-1}$ CH_2 反对称伸缩;
- 2—— $2\,854\text{ cm}^{-1}$ CH_2 对称伸缩;
- 3—— $1\,581\text{ cm}^{-1}$ $\text{C}=\text{O}$ 伸缩;
- 4—— $1\,396\text{ cm}^{-1}$ 羧酸 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 弯曲;
- 5—— $1\,257\text{ cm}^{-1}$ 羧酸 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩;
- 6—— $1\,111\text{ cm}^{-1}$ 醇 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩。

相对吸光度是通过振动模式 1 归一化后得到的。

注: 根据红外光谱振动频率分类规则, 建议将 $1\,581\text{ cm}^{-1}$ $\text{C}=\text{O}$ 伸缩改为 COO 反对称伸缩, 将 $1\,396\text{ cm}^{-1}$ 羧酸 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 弯曲改为 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 弯曲和 COO 对称伸缩, 将 $1\,257\text{ cm}^{-1}$ 羧酸 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩改为 $\text{C}-\text{C}$ 伸缩振动, 将 $1\,111\text{ cm}^{-1}$ 醇 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩改为醇和醚的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动。

图 A.1 (续)

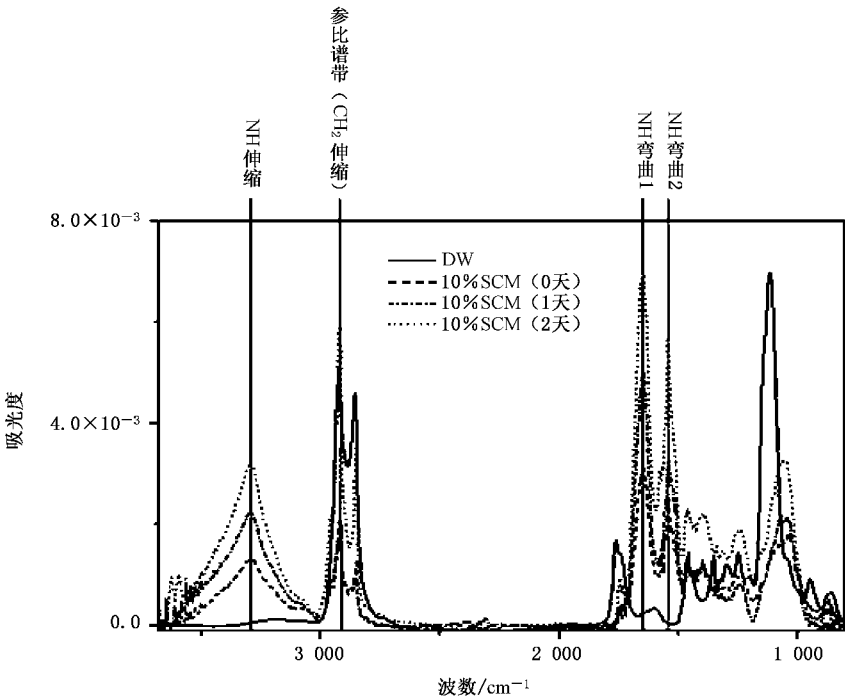
附录 B
(资料性附录)

金纳米颗粒表面结合生物化学分子的定性分析实例

本附录描述了生物化学分子结合到烷基链羧酸保护的纳米颗粒上的 FT-IR 光谱证据。生物分子在金纳米颗粒表面的结合情况可以通过胺、磷酸二酯或脂质振动模式的指认进行观察。

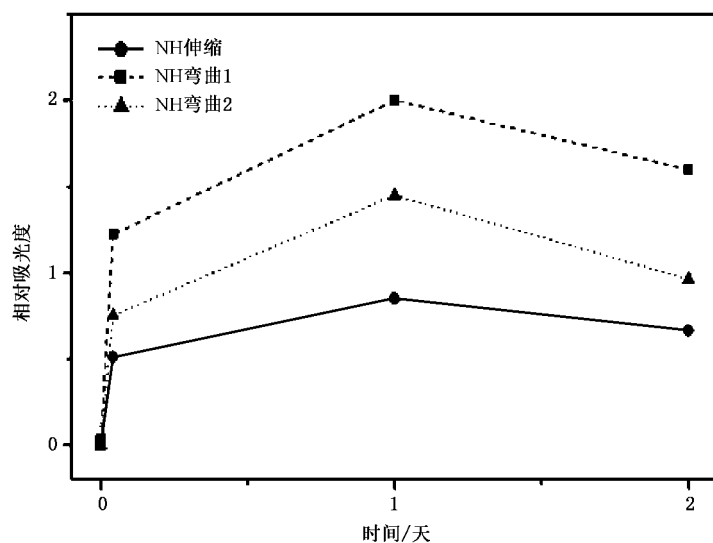
图 B.1 表明,吸附在金纳米颗粒表面上的生物分子可通过观察 FT-IR 光谱的相对强度进行监测。表面用 Carboxy-EG6-undecanethiol[20-(11-Mercaptoundecanyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosanoic acid)] 修饰的 30 nm 金纳米颗粒溶液和 20% FBS(胎牛血清)细胞培养液按体积比 1:1 混合。在预定的时间间隔内采样固定体积的混合溶液。然后将金纳米颗粒与未结合的分子分离,测试 FT-IR 光谱。

如图 B.1 所示,金纳米颗粒在 10% FBS 细胞培养液保持一段时间后,出现与酰胺基团相关的振动模式。N—H 伸缩对应的 $3\,311\text{ cm}^{-1}$ 、N—H 弯曲对应的 $1\,653\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,550\text{ cm}^{-1}$ 的吸收谱带强度按 CH_2 反对称伸缩振动对应的 $2\,924\text{ cm}^{-1}$ 的吸收谱带强度进行归一化后,SCM(10% FBS 细胞培养液)混合物所得吸光度值远高于混合前溶液的吸光度值。



a) 使用 ATR 模式获得金纳米颗粒膜的 FT-IR 光谱

图 B.1 金纳米颗粒膜的 FT-IR 光谱及酰胺对应的红外吸收谱带的相对吸光度



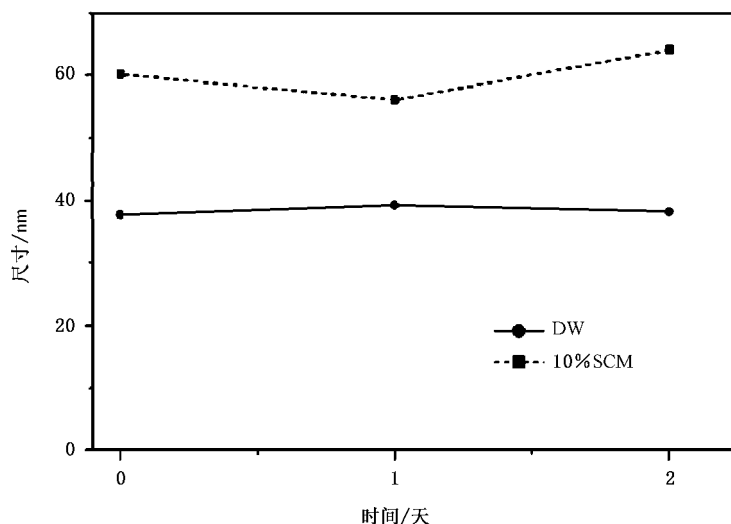
b) 金纳米颗粒表面酰胺对应的红外吸收谱带的相对吸光度

样品膜是由在 DW 或 SCM(10% FBS 细胞培养液)中配体修饰的金纳米颗粒通过离心方法去除未结合分子后制备的。

相对吸光度是通过 $-\text{CH}_2$ 反对称伸缩振动吸收峰归一化后得到的。

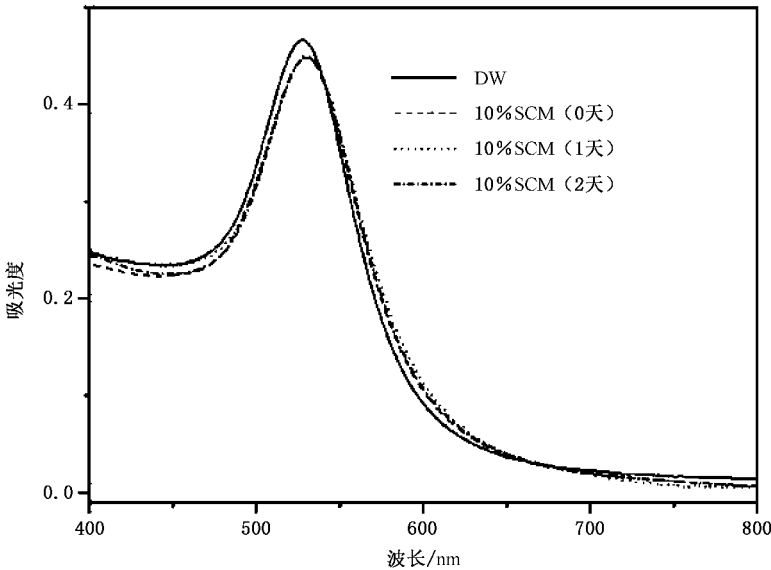
图 B.1 (续)

如图 B.2 所示,金纳米颗粒的 DLS 尺寸增加约 50%,而与 SCM 混合后溶液中金纳米颗粒的紫外/可见光吸收光谱几乎不变。这些结果表明,金纳米颗粒流体力学半径的增加是由于金纳米颗粒与额外的分子结合造成的,考虑到在较长波长区域 SPR 谱带吸收光谱几乎不变,故半径的增加不是由金纳米颗粒团聚引起的。



a) 蒸馏水或 10% SCM 中结合配体的金纳米颗粒不同培养时间的 DLS 尺寸

图 B.2 蒸馏水或 10% SCM 中结合配体的金纳米颗粒不同培养时间的 DLS 尺寸及 UV/Vis 吸收光谱



b) 不同培养时间结束后,金纳米颗粒在 DW 或 10% SCM 中的 UV/Vis 吸收光谱

DW 曲线中 0 天表示刚刚通过离心方法去掉自由基。10% SCM 曲线中 0 天表示金纳米颗粒与 20% SCM 以 1 : 1 体积比例混合后 1 h。

图 B.2 (续)

以上三种不同技术的综合结果表明,蛋白质在 10% SCM 溶液中与金纳米颗粒结合,使金纳米颗粒的流体力学半径增加,使酰胺谱带($3\,311\text{ cm}^{-1}$ 为 N—H 伸缩振动, $1\,653\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,550\text{ cm}^{-1}$ 为 N—H 弯曲)的红外吸收强度增加。按照 7.2 中所述步骤进行细胞毒性实验,就有可能检测和识别与金纳米颗粒结合的生物分子类型。

注: 根据红外光谱振动频率分类规则,建议将 $3\,311\text{ cm}^{-1}$ N—H 伸缩振动改为酰胺 A 带(N—H 伸缩振动),将 $1\,653\text{ cm}^{-1}$ N—H 弯曲改为酰胺 I 带($\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动),将 $1\,550\text{ cm}^{-1}$ N—H 弯曲改为酰胺 II 带(N—H 弯曲振动)。

附 录 C
(资料性附录)
窗片材料选择指南

透射模式所用的 IR 窗片应高度透光,并且在红外频率范围内几乎没有吸收带。IR 窗片也要求在水中是稳定的,因为大部分的金纳米颗粒是以水溶液形式提供的。由于 IR 窗片的透射率曲线是随窗片的厚度变化的,建议参阅供应商网站或产品目录中提供的透射率曲线。

例如硒化锌、硅和金刚石是红外吸收光谱应用中合适的窗片材料。它们是非水溶性的,并且比大多数 IR 窗片材料的截止波长更长。

参 考 文 献

- [1] Lewinski N. et al. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*. 2008,4 p. 26.
- [2] Murphy C.J. et al. Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging. *Acc. Chem. Res.* 2008,41(12) pp. 1721-1730.
- [3] Chen P.C. et al. Gold nanoparticles-from nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2008,1 pp. 45-66.
- [4] Vincent A. et al. Protonated nanoparticle surface governing ligand tethering and cellular targeting. *ACS Nano*. 2009,3(5) pp. 1203-1211.
- [5] Xu Z.P. et al. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem. Eng. Sci.* 2006,61 pp. 1027-1040.
- [6] Krpetic Z. et al. Selective entrance of gold nanoparticles into cancer cells. *Gold Bull.* 2006,39(2) pp. 66-68.
- [7] Liu Z., & Jiang M. Reversible aggregation of gold nanoparticles driven by inclusion complexation. *J. Mater. Chem.* 2007,17 pp. 4249-4254.
- [8] Huang Y.F. et al. Aptamer-modified gold nanoparticles for targeting breast cancer cells through light scattering. *J. Nanopart. Res.* 2009,11 pp. 775-783.
- [9] Uboldi C. et al. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type- II cell lines A549 and CIH441. *Part. Fibre Toxicol.* 2009,6 pp. 18-29.
- [10] Bowman M.C. et al. Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2008,130(22) pp. 6896-6897.
- [11] Goodman C. et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 2004,15 pp. 897-900.
- [12] Renault S. et al. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bull.* 2008,41(2) pp. 116-126.
- [13] Kouassi K.G., & I rudayaraj J. A Nanoparticle-based immobilization assay for prion-kinetics study. *J. Nanobiotechnology*. 2006,4 pp. 8-17.
- [14] Shukla N. et al. FT-IR study of surfactant bonding to FePt nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2003,266 pp. 178-184.
- [15] Dablemont C. et al. Functionalization and grafting of platinum nanoparticles on alumina surfaces; FT-IR and XPS study. *Langmuir*. 2008,24 pp. 5832-5841.
- [16] De Moura M. R. et al. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. *J. Colloid Interface Sci.* 2008,321(2) pp. 477-483.
- [17] Zhang B., & Yan B. Analytical strategies for characterizing the surface chemistry of nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010,396(3) pp. 973-982.
- [18] Fang C. et al. Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media. *Small*. 2009,5(14) pp. 1637-1641.
- [19] Wijaya A., & Hamad-Schifferli K. Ligand customization and DNA functionalization of gold nanorods via roundtrip phase transfer ligand exchange. *Langmuir*. 2008,24 pp. 9966-9969.
- [20] Das M. et al. Biofunctionalization of magnetite nanoparticles using an aminophosphonic acid coupling agent; new, ultradispersed, iron-oxide folate nanoconjugates for cancer-specific targeting. *Nanotechnology*. 2008,19(41) p. 415101.

- [21] ISO 6107-2:2006 Water quality—Vocabulary
 - [22] ISO/IEC Guide 99:2007 International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms(VIM)
 - [23] ISO 17191 Urine-absorbing aids for incontinence—Measurement of airborne respirable polyacrylate superabsorbent materials—Determination of dust in collection cassettes by sodium atomic absorption spectrometry
 - [24] MacDougall D., & Crummett W.B. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 1980, 52 pp. 2242-2249.
 - [25] Van der Bruggen B. et al. Influence of molecular size, polarity and charge on the retention of organic molecules by nanofiltration. *J. Membr. Sci.* 1999, 156 pp. 29-41.
 - [26] Revchuk A.D.(Mel) Suffet, I. H., Ultrafiltration separation of aquatic natural organic matter; Chemical probes for quality assurance. *Water Res.* 2009, 43(15) pp. 3685-3692.
 - [27] Liu X. et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2007, 58 pp. 3-7.
 - [28] ISO 21571 Foodstuffs—Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products—Nucleic acid extraction
 - [29] ISO 21270 Surface chemical analysis—X-ray photoelectron and Auger electron spectrometers—Linearity of intensity scale
 - [30] Taylor B. N., & Kuyatt C.E. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, NIST Technical Note 1994, 1297 pp 10 (<http://physics.nist.gov/Pubs/guidelines/TN1297/tn1297s.pdf>).
 - [31] Kasthuri J., & Rajendrian N. Functionalization of silver and gold nanoparticles using amino acid conjugated bile salts with tunable longitudinal plasmon resonance. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2009, 73 pp. 387-393.
 - [32] Aryal S. et al. Immobilization of collagen on gold nanoparticles: preparation, characterization and hydroxyapatite growth. *J. Mater. Chem.* 2006, 16 pp. 4642-4648.
 - [33] Venyaminov S. Y., & Kalnin N.N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers.* 1990, 20 pp. 1243-1257.
 - [34] Bhattacharya S., & Srivastava A. Synthesis and characterization of novel cationic lipid and cholesterol-coated gold nanoparticles and their interactions with dipalmitoylphosphatidylcholine membranes. *Langmuir.* 2003, 19 pp. 4439-4447.
 - [35] Zhang L. et al. Didodecyldimethylammonium bromide lipid bilayer-protected gold nanoparticles; synthesis, characterization, and self-assembly. *Langmuir.* 2006, 22 pp. 2838-2843.
 - [36] Zhu H. et al. One step synthesis and phase transition of phospholipid-modified Au particles into toluene. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2005, 257-258 pp. 411-414.
 - [37] Sauthier M.L. et al. Nanoparticle layers assembled through DNA hybridization; characterization and optimization. *Langmuir.* 2002, 18 pp. 1825-1830.
 - [38] Boncheva M. et al. Design of oligonucleotide arrays at interfaces. *Langmuir.* 1999, 15 pp. 4317-4320.
 - [39] Brewer H.S. et al. Detection of DNA hybridization on gold surfaces by polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy. *Langmuir.* 2002, 18 pp. 4460-4464.
 - [40] Encyclopedia of Analytical Chemistry Meyers. R.A. ed. 2000, pp 10815-10837.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
纳米技术 特定毒性筛查用金纳米颗粒
表面表征 傅里叶变换红外光谱法
GB/T 36082—2018/ISO/TS 14101:2012

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

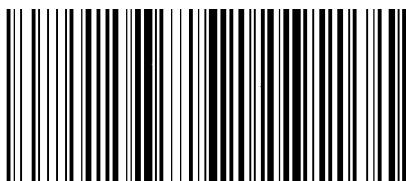
服务热线: 400-168-0010

2018年3月第一版

*

书号: 155066 • 1-59727

版权专有 侵权必究



GB/T 36082-2018