

文章编号: 1007- 2985(2008)02- 0096- 05

胃蛋白酶对 CdS 纳米粒子的表面修饰及分析应用^{*}

陈莉华^{1,2}, 覃事栋¹, 卜晓英³, 陈益超¹

(1. 吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000; 2. 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 湖南 长沙 410082;
3. 吉首大学湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南 张家界 427000)

摘要:以巯基乙酸为稳定剂及表面修饰剂, 在水溶液中合成了平均粒径为 10 nm 左右的 CdS 纳米粒子, 用胃蛋白酶改变 CdS 纳米粒子的表面修饰状态并研究了其系列特性。CdS 纳米粒子在 292 nm 附近有强的紫外吸收, 有 524.8 nm 的荧光发射, 胃蛋白酶对其表面修饰后, 紫外吸收峰位不变, 荧光峰位蓝移至 462.4 nm, 荧光强度降低。温度及 pH 值对表面修饰产生影响。在最佳实验条件下, 胃蛋白酶质量浓度在 2~ 20 mg/L 范围内与荧光降低值之间成线性关系, 检测限 (3σ) 为 0.13 mg/L ($n=10$), 方法可用于人体胃液胃蛋白酶的测定。

关键词: CdS 纳米粒子; 胃蛋白酶; 表面修饰; 荧光测定

中图分类号: Q614.24

文献标识码: A

纳米粒子因其优良的光谱特征和光化学稳定性而在荧光探针、生物细胞学、免疫生物学、医学研究等方面^[1]得到广泛应用。纳米粒子的一个显著特征是表面效应, 表面原子数增多、原子配位不满(悬空键)以及高的表面能, 导致了纳米微粒表面存在许多缺陷, 使其表面具有很高的活性。^[2]对纳米粒子的表面修饰不仅可以获得稳定、单分散和具有良好分散性的纳米粒子, 而且可以通过表面修饰分子与粒子表面的相互作用来控制、改变其光化学特性, 如光谱吸收位置及荧光产率等。对 CdS 纳米粒子来说, 当其外表面被多肽^[3]修饰时, 多肽-Cd²⁺络合物对纳米 CdS 形成包覆从而使 CdS 纳米晶荧光强度上升, 而当 CdS 纳米粒子表面上修饰半胱氨酸^[4]后, 引起了荧光强度、荧光峰位置及带隙能的变化。

笔者用巯基乙酸为稳定剂, 隔绝空气条件下于水溶液中合成了 CdS 纳米粒子。并用胃蛋白酶对其表面进行修饰, 研究了修饰前后纳米粒子的紫外光谱及荧光特性, 探讨了各种因素对表面修饰的影响。发现胃蛋白酶改变了纳米粒子表面态能级, 使纳米粒子荧光发生猝灭; 一定范围内, 胃蛋白酶浓度与纳米粒子荧光猝灭程度成线性关系。由此建立了纳米粒子测定胃蛋白酶的方法并用于人体胃液胃蛋白酶的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5000 荧光分光光度计(日本岛津); L-6 紫外分光光度计(美国 PE 公司); JEM 3010 高倍透射电镜(日本 JEOL 电子公司)。Cd(NO₃)₂(分析纯, 苏州市振兴化工厂); 硫代乙酰胺(CH₃CSNH₂, 分析纯, 湖南师大试剂厂); 巯基乙酸(分析纯, 湖南师大试剂厂); 胃蛋白酶(pepsin, 分析纯, 湖南师大试剂厂)。工作液质量浓度为 150 mg/L, pH 值为 2.21 Britton-Robinson (B-R) 缓冲溶液, 其它试剂均为分析纯, 高纯 N₂ 气, 实验中所用超纯水(台湾艾柯 KL-UP-III-20 型超纯水机制备)的电阻率为 10~16 MΩ·cm@25℃, 电导率小于 0.1 μS/cm@25℃。

1.2 实验方法

1.2.1 CdS 纳米粒子的制备 配制 40 mL 含 1.5×10^{-2} mol/L CdCl₂ 及 4 mL 巯基乙酸的混和溶液, 用 NaOH

* 收稿日期: 2008-02-12

基金项目: 湖南省教育厅自科基金重点项目(05A009); 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室开放课题(2005019); 吉首大学博士基金资助项目

作者简介: 陈莉华(1963-), 女, 博士, 吉首大学化学化工学院教授, 主要从事生物化学分析及纳米粒子在化学上的应用。

调节至透明无浑浊, 此时 pH 约为 11 左右. 通 N_2 除氧约 10 min, 倒入三颈烧瓶内, 放在恒温磁力搅拌器中, 隔绝空气条件下缓慢升高温度, 向其中滴加 40 mL 1.0×10^{-2} mol/L 的硫代乙酰胺溶液 ($[Cd^{2+}]:[S^{2-}] = 1.5:1$). 将溶液加热到 96 $^{\circ}C$, 在 N_2 保护下 (N_2 一直通入溶液中除氧) 搅拌 2.5 h, 回流 3 h, 过滤, 得淡黄色表面富含 Cd^{2+} 的 CdS 纳米粒子溶胶. 将该溶胶状液体与 100 mL 甲醇超声搅拌均匀, 静置 5 h, 离心分离大粒径 CdS, 溶液经超声震荡, 得到颗粒较为均匀的 CdS 纳米粒子.

1.2.2 巯基乙酸表面修饰 CdS 纳米粒子 在 PBS 缓冲液中, 将 CdS 纳米粒子与一定量 1:1 的巯基乙酸在室温下反应 6 h, 取上层可溶功能性纳米粒子备用. 后续所指的 CdS 纳米粒子即指用此巯基乙酸表面修饰的 CdS 纳米粒子.

1.2.3 胃蛋白酶对 CdS 纳米粒子表面替换修饰 在 15 mL 比色管中, 准确加入 pH 值为 2.21 的 B-R 缓冲液 2.0 mL, 1:1 巯基乙酸 0.5 mL, 1.0 mL CdS 纳米粒子溶液, 加入不同量的胃蛋白酶溶液(标准曲线)或一定量的样品溶液(样品分析), 定容后室温放置 5 min. 用固定时间变化法在 350 nm 激发波长下纪录 462.4 nm 处荧光强度 F , 无蛋白酶溶液的为空白溶液, 其荧光强度为 F_0 . 以荧光强度差值 $\Delta F(F_0 - F)$ 计算胃蛋白酶溶液的质量浓度.

2 结果与讨论

2.1 CdS 纳米粒子的荧光谱

通常 CdS 纳米粒子有很强的发射. 主要有 2 类发射带: 一是与吸收带边相一致的带-带跃迁, 二是被表面态捕获后, 大于 500 nm 的表面态发射. 其中表面态发光与纳米粒子的生长环境有关, 受周围介质的影响强烈. 笔者合成的 CdS 纳米粒子的荧光峰见图 1. 从图 1 可见: CdS 在 524.8 nm 处有一窄而对称的荧光发射, 半高峰宽(full width at half maximum, FWHM) 为 44.8 nm. 此发射带为表面被捕获后的表面态发射, 该发射受控于纳米粒子的介质效应, 与纳米粒子的生长环境有关^[5]. 激发光谱(图未给出)表明 CdS 纳米粒子的激发波长范围较宽, 从 220 到 380 nm 范围的光均可作为激发光. 本实验选择 350 nm 作为激发波长.

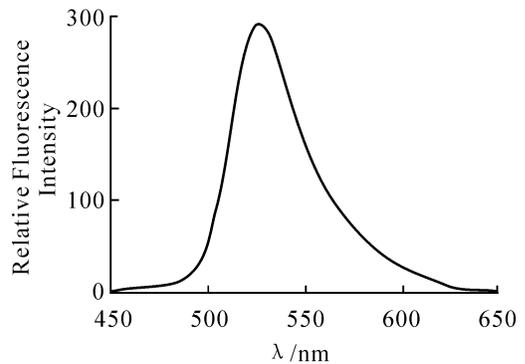
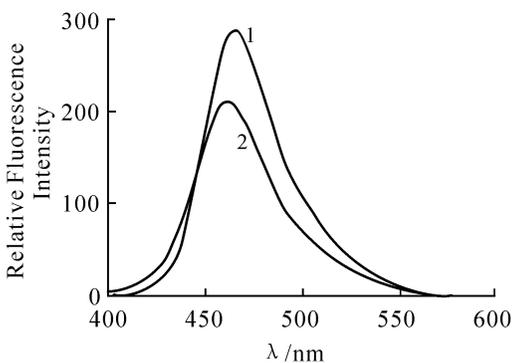


图 1 CdS 纳米粒子的荧光光谱图

Fig. 1 Fluorescence Spectrum of CdS Nano-Particles

2.2 胃蛋白酶修饰 CdS 纳米粒子前后的荧光光谱分析



1—CdS-巯基乙酸; 2—CdS-胃蛋白酶

图 2 CdS-巯基乙酸及 CdS-胃蛋白酶的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence Spectra of CdS-Mercaptoethylic Acid (Line 1) and CdS-Pepsin (Line 2)

合成过程中在半导体纳米粒子的表面连接上适当的亲水性基团不仅使其具有较好的水溶性, 而且可改善纳米粒子的表面状态. 笔者利用 CdS 纳米粒子中 Cd(II) 与巯基之间强的络合作用, 用巯基乙酸与 CdS 纳米粒子结合, 在 CdS 纳米粒子表面修饰一层巯基酸, 使 CdS 纳米粒子的亲水性及表面状态得到改善. 本实验中: 随着巯基乙酸加入量的增加, 其荧光强度有所增强; 当增强至一定程度后荧光强度又降低; 更重要的是荧光峰位发生较大程度的蓝移: CdS 纳米粒子在 $E_{ex} = 350$ nm 时, 其荧光发射峰为 524.8 nm, 半高峰宽 (FWHM) 为 44.8 nm, 当用巯基乙酸进行表面修饰时, 其荧光峰位于 467.2 nm, 蓝移了 57.6 nm, 半高峰宽不变(图 2).

前已述及, 纳米粒子的表面具有很高的活性, 微粒表面化学环境的改变将使其光谱吸收位置、荧光峰位置及荧光产率发生变化. 笔者合成 CdS 纳米粒子时, S^{2-} 由 CH_3CSNH_2 水解缓慢产生, 而 Cd^{2+} 一直处于游离状态, 且 Cd^{2+} 与 S^{2-} 的比例为 1.5:1. 即 Cd^{2+} 在制备过程中处于过量状态, 得到的 CdS 纳米粒子表面富含 Cd^{2+} , 大量加入巯基乙酸后, 巯基乙酸对 CdS 纳米粒子进行表面修饰, 形成对 CdS 纳米粒子表面的包覆, 改变了纳米粒子的表面态能级, 表现在荧光光谱上的峰位蓝移及强度升高; 当加入的巯基乙酸完成对 CdS 纳米粒子表面的包覆后, 多余的巯基乙酸将捕获 CdS 纳米粒子表面游离的 Cd^{2+} 使荧光强度降低. 文献 [6] 曾报道, 在 CdS 纳米溶胶中加入 Cd^{2+} , 其荧光强度增强.

由图 2 还看出: 已用巯基乙酸包覆的 CdS 纳米粒子再用胃蛋白酶修饰后, 荧光发射波长又蓝移了 4.8 nm, 位于 462.4 nm, 其半高峰宽不变, 仍保持其窄谱特征, 但荧光强度降低. 这是表面修饰层发生变化导致.

胃蛋白酶是一个具有 α -螺旋、 β 折叠、转向及无规卷曲 4 种结构的蛋白质. 当 CdS-巯基乙酸纳米粒子再用胃蛋白酶修饰后, 胃蛋白酶替换了 CdS 表面的巯基乙酸, 较之于简单、直链的巯基乙酸. 这些螺旋状、折叠状、转向及无规卷曲状的胃蛋白酶大大改变了 CdS 纳米粒子表面的化学环境和表面态能级, 使其发射峰再次蓝移, 而且各种形状的胃蛋白酶更易捕捉 CdS 表面游离的 Cd^{2+} , 从而降低 CdS 表面的 Cd^{2+} 质量浓度使荧光强度猝灭. 当胃蛋白酶质量浓度仅为 20 mg/L 时, 猝灭程度可达 15%.

纳米粒子的猝灭机制可以通过能量转移、电荷转移及表面吸附分子对表面态能级的改变等各种形式而改变整个体系的发光^[2]. 对 CdS 纳米粒子来说, 400~600 nm 范围的发射光谱与胃蛋白酶分子 400~600 nm 范围的吸收光谱交叠很少, 因而可以忽略能量转移机制, 也无依据判断是否为电荷转移. 但胃蛋白酶进行表面替换修饰后, 其发射峰蓝移, 说明是表面吸附分子使 CdS 纳米粒子的化学环境和表面态能级发生改变, 但未改变纳米粒子的核结构及粒子尺寸, 故其半高峰宽不变且保持了纳米粒子对称分布的窄谱特征.

2.3 吸收光谱分析

图 3 给出了 CdS 纳米粒子及胃蛋白酶的吸收光谱. 由图 3 可见: 胃蛋白酶分子在 350~600 nm 范围无吸收, CdS-巯基乙酸和 CdS-胃蛋白酶的吸收曲线在短波段迅速上升, 且均在 292 nm 处有强吸收. 表明 2 种修饰状态的 CdS 纳米粒子表面均属于亲水性, 吸收光谱长波段处的吸收拖尾是由于粒子尺寸具有一定的分布以及粒子表面存在缺陷^[7], 但均可以观察到在 450 nm 附近存在一个宽的肩峰, 该峰为 CdS 纳米粒子的激子吸收峰. 激子峰的存在表明被修饰的粒子其粒径都比较均匀.^[8] CdS-胃蛋白酶比 CdS-巯基乙酸的激子吸收峰稍宽, 说明用巯基乙酸进行表面修饰和用胃蛋白酶进行表面修饰均

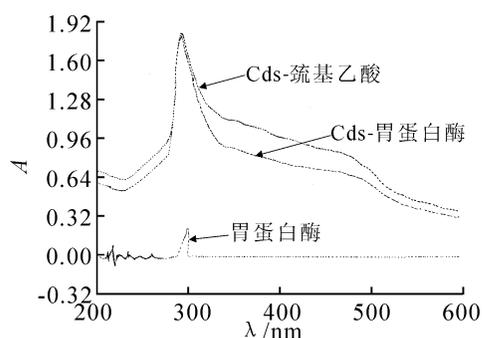


图 3 CdS 纳米粒子-表面修饰剂的吸收光谱图
Fig. 3 Absorption Spectra of CdS- Mercaptoethylic Acid, CdS- Pepsin and Pepsin

使 CdS 纳米粒子获得良好的分散, 但 CdS-胃蛋白酶分散性更好些.

2.4 电镜分析

图 4 左为 CdS-巯基乙酸的透射电镜 (TEM) 图, 右为 CdS-胃蛋白酶的透射电镜图. 由图 4 可见: 当用少量巯基乙酸修饰 CdS 纳米粒子时, 颗粒有团聚现象; 当用胃蛋白酶修饰 CdS 纳米粒子时, 粒径更为均匀, 分散性更好. 这是因为发生了表面替换修饰所致. TEM 图的结果与光谱分析的结果一致. 从 TEM 图上可以估算到 CdS 的平均粒径在 10 nm 之间.

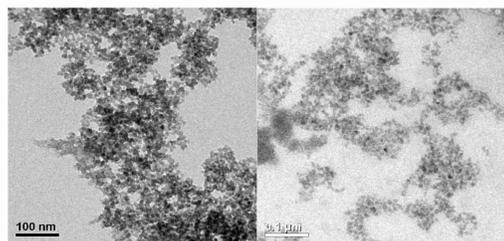


图 4 CdS-巯基乙酸(左)及 CdS-胃蛋白酶(右)的透射电镜 (TEM) 图

Fig. 4 TEM Photographs of CdS- Mercaptoethylic Acid (left) and CdS- Pepsin (Right)

2.5 温度对表面替换修饰的影响

温度将影响 CdS 纳米粒子的表面替换修饰速度. 低于 25 °C 时胃蛋白酶替换 CdS 表面的巯基乙酸需要较长时间, 而在 25 °C 的水浴中或室温下反应仅需 5 min, 且荧光强度在 40 min 内保持稳定; 在 25~ 40 °C 范围内, 温度增加, 胃蛋白酶替换速度加快; 但当温度升到 40 °C 以上, 体系开始出现沉淀, 可能是因为胃蛋白酶在 40 °C 开始失去活性. 本实验选择室温并放置 5 min 后进行测定.

2.6 pH 值对表面替换修饰的影响

不同 pH 值对 CdS 纳米粒子表面修饰的影响结果见图 5. 从图 5 中可知: pH 值增大, CdS- 巯基乙酸荧光强度缓慢降低, 而 CdS- 胃蛋白酶的荧光强度先剧烈升高后在一个相对高位上波动. 这是因为: 当表面上修饰的是巯基乙酸时, 裸露在外的是 -COOH; 当 pH 值增大, 裸露在外的 -COOH 逐渐变为 -COO-, 从而更容易结合 CdS 粒子表面游离的 Cd²⁺ 使荧光强度降低; 但当 CdS 粒子表面的 -COOH 都转变为 -COO- 时, 其所能结合的 Cd²⁺ 也就固定, 故其在 pH 值为 4 以后荧光强度变化趋缓. 而对于胃蛋白酶来说, pH 值增大时, 促使胃蛋白酶分子伸展和溶胀, 使 CdS 粒子表面的修饰层解体, 重新释放结合的 Cd²⁺ 使荧光强度增大. 这与李文友^[9] 报道的 pH 值对 CdS 纳米粒子荧光强度有影响之结果一致.

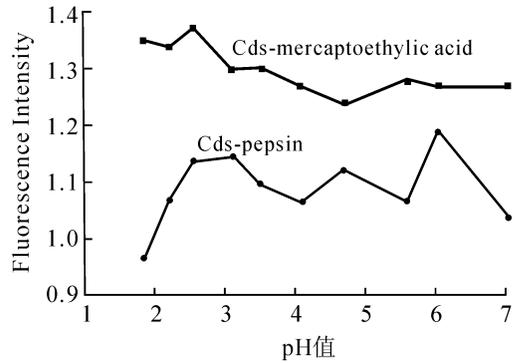


图 5 体系 pH 值对 CdS- 巯基乙酸和 CdS- 胃蛋白酶的影响
Fig. 5 Effect of pH Value on the Fluorescence Intensities of CdS- Mercaptoethylic Acid and CdS- Pepsin

资料表明, 正常胃液主要由 HCl、胃蛋白酶和粘液组成, pH 值约为 2~ 3. 在后续的分析应用中, 为了既模拟人体胃液环境又能得到较大的荧光降低值, 选择 pH 值 2.21 的 B- R 缓冲液控制体系 pH 值.

2.7 表面修饰的分析应用

2.7.1 干扰离子对 CdS 纳米粒子测定酶的影响 利用表面替换修饰使 CdS 纳米粒子荧光强度降低现象, 可测定胃蛋白酶质量浓度, 在最佳实验条件下, 试验了各种干扰离子对测定质量浓度为 6.67 mg/L 的表面修饰剂胃蛋白酶的影响, 结果见表 1.

表 1 干扰离子对 CdS 纳米粒子测定酶的影响(胃蛋白酶质量浓度为 6.67 mg/L)

Tab. 1 Inferences of Coexisting Substances for Concentration Determination of Pepsin by Using CdS Nano- Particles (Concentration of Pepsin is 6.67 mg/L)

共存物质	质量浓度/(g·mL ⁻¹)	相对偏差/%	共存物质	质量浓度/(g·mL ⁻¹)	相对偏差/%
脯氨酸	29.3	4.4	白蛋白	61.1	2.66
组氨酸	36.8	1.4	牛血清白蛋白	17.6	7.26
精氨酸	19.7	0.41	鸡蛋白	17.6	4.1
赖氨酸	39.5	3.0	脱氧核糖核酸	33.6	8.3
天门冬酰胺	36.8	1.87	酵母核糖核酸	25.6	5.24
天冬氨酸	49.2	2.5	Ba ²⁺	109.2	0.82
缬氨酸	19.2	- 4.6	Ni ²⁺	34.0	0.063
谷氨酸	27.2	6.3	Cu ²⁺	36.5	- 2.1
酪氨酸	20.3	- 1.87	Pb ²⁺	13.3	0.79
甘氨酸	85.0	3.54	Mg ²⁺	40.0	4.75
丙氨酸	57.4	0.73	Zn ²⁺	35.7	2.02
半胱氨酸	21.6	0.72	Sn ²⁺	90.0	- 2.88
蔗糖	64.2	6.21	Co ²⁺	33.6	0.0
果糖	62.4	7.82	Se (IV)	13.3	- 5.41
核黄素	12.0	1.31			

由表 1 可知, 大部分干扰离子对体系测定都没有影响.

2.7.2 用 CdS 纳米粒子分析胃蛋白酶的线性关系 在选定的最佳条件下,用不同质量浓度的胃蛋白酶替换 CdS 纳米粒子表面上的巯基乙酸时,随着胃蛋白酶质量浓度的增大其体系荧光强度降低,在一定范围(2 ~ 20 mg/L)内线性关系可表达为 $\Delta F = 0.04479 + 0.02494 C$ (C 为胃蛋白酶的质量浓度, mg/L, $n = 10$), 检测限(3σ) 为 0.13 mg/L ($n = 10$). 由此建立了胃蛋白酶的定量分析方法并用于实际样品测定.

2.7.3 人体胃液胃蛋白酶的测定 采用正常人、胃炎患者及糖尿病患者的胃液作为实际测定的样品,样品来源于湘西自治州康复医院.按照选定的最佳实验条件用标准加入法测定了胃液内胃蛋白酶含量,结果见表 2.

表 2 人体胃液胃蛋白酶测定结果

Tab. 2 Analytical Results of Pepsin in Human Gastric Juice

样品	测出值/(mg·L ⁻¹)	平均值/(mg·L ⁻¹)	相对标准偏差 RSD/ %
正常人	3.32, 3.35, 3.21, 3.36, 3.37	3.37	1.97
胃炎患者	3.56, 3.45, 3.50, 3.62, 3.54	3.53	1.81
糖尿病患者	3.47, 3.52, 3.38, 3.45, 3.53	3.47	1.74

上述测定结果与文献报道值基本符合,说明该方法可用于实样测定.

参考文献:

- [1] BAILEY R E, SMITH A M, NIE S M. Quantum Dots in Biology and Medicine [J]. Physica E, 2004, 25: 1- 12.
- [2] 张 宇, 傅德刚, 蔡建东, 等. CdS 纳米粒子的表面修饰及其对光学性质的影响 [J]. 物理化学学报, 2000, 16(5): 431- 436
- [3] 陈旭东, 王新波, 范 莉, 等. CdS 纳米晶与多肽相互作用研究 [J]. 化学学报, 2005, 63(17): 1 600- 1 606.
- [4] 刘 辉, 李文友, 尹洪宗, 等. CdS 纳米粒子与半胱氨酸相互作用的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(9): 1 618- 1 622.
- [5] 容智敏, 章明秋, 梁海春, 等. 原位表面修饰纳米 CdS 粒子的表面结构和光学性能 [J]. 材料研究学报, 2004, 18(4): 343- 351.
- [6] 丛日敏, 罗运军, 于怀清. 金属离子对 CdS 量子点/聚酰胺-胺树形分子纳米复合材料光致发光性能的影响 [J]. 无机化学学报, 2007, 23(8): 1 347- 1 352.
- [7] 纪 欣, 章伟光, 范 军, 等. 表面修饰的 Q 态纳米 CdS 的荧光性能研究 [J]. 化学学报, 2004, 62(16): 1 514- 1 518.
- [8] 吴文智, 闫玉禧, 郑植仁, 等. 水溶性 CdTe 量子点的稳态和纳秒时间分辨光致发光光谱 [J]. 物理学报, 2007, 56(5): 2 926- 2 930.
- [9] 刘 辉, 李文友, 尹洪宗, 等. CdS 纳米粒子制备的影响因素及 CdS 纳米粒子-酚藏花红体系的光谱特性 [J]. 化学学报, 2005, 63(4): 301- 306.

Surface Modification of CdS Nano-Particles by Using Pepsin and Its Analytical Application

CHEN Li-hua^{1,2}, QIN Shi-dong¹, BU Xiao-ying³, CHEN Yi-chao¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, Hunan China; 2. State Key Laboratory of Chem of Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, China; 3. Hunan Province Key Laboratory of Forest Product Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan China)

Abstract: CdS semiconductor nano-particles were synthesized in aqueous solution by using mercaptoethylic acid as the stabilizer as well as surface-modification reagent. The average size of CdS nano-particles estimated from TEM graph is ca. 10 nm. The CdS nano-particles exhibited strong ultraviolet absorption at 292 nm and fluorescence emission at 524.8 nm. When surface-modification of CdS nano-particles were replaced with pepsin, ultraviolet absorption peak kept same, fluorescence emission intensity decreased as well as fluorescence peak shifted to 462.4nm. Temperature and pH value influenced surface-modification of CdS nano-particles. Under optimal conditions, a concentration of 2~ 20 mg/L of pepsin could be determined on the basis of fluorescence intensity decrease ratio of CdS nano-particles, with a detection limit 3σ of 0.13 mg/L ($n = 10$). The proposed method was applied to the detection of the concentration of pepsin in human gastric juice.

Key words: CdS nano-particles; pepsin; surface-modification; fluorescence determination

(责任编辑 易必武)