DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.150595

基于纳米通道表面增强拉曼散射光谱分离 检测组氨酸对映体的研究

钟桐生¹ 尹志芳¹ 柳 悦² 黄杉生^{*12}

1(湖南城市学院化学与环境工程学院,413000 益阳) 2(上海师范大学生命与环境科学学院 200234 上海)

摘 要 以 Al_2O_3 纳米通道膜为基体制备金纳米通道,以场发射扫描电镜、循环伏安、交流阻抗等方法对金纳 米通道进行表征。采用 EDC-NHS 的交联反应 将壳聚糖自组装至金纳米通道孔壁上 形成表面具有手性位点 选择性的功能化纳米通道膜 利用纳米通道优异的分离能力手性分离 *D-L-*组氨酸。考察了纳米通道孔径和 溶液的 pH 值对分离效果的影响。采用银溶胶作为表面增强拉曼(SERS) 测试的基底 增强对 *D-L-*组氨酸的 SERS 效应 提高检测该物质的选择性和灵敏度。分别在 1000 和 1590 cm⁻¹ 处测定 *L-*组氨酸和 *D-*组氨酸。在 含 200 μ L 组氨酸、100 μ L 银溶胶和 100 μ L 80 mmol/L NaCl 溶液(pH = 7.59) 中 *D-*组氨酸和 *L-*组氨酸可得到 较好分离 分离度达到 4.91。

关键词 金纳米通道;手性分离;表面增强拉曼光谱;组氨酸

1 引 言

手性是生物体系的一个基本特征,很多内源性大分子物质,如酶、载体、受体、血浆蛋白和多糖等都 具有手性特征^[1]。天然或半合成药物几乎都有手性,但产生不同的药理作用和反应。手性对映体的分 离测定,对研究生命科学、药物化学以及人类健康都具有重要的意义^[2~4]。氨基酸是组成蛋白质的基本 单元,在人体生命活动中起着举足轻重的作用,氨基酸多为外消旋体,D型氨基酸在生理活性和实际用 途与L型有很大差别,因此D-L-氨基酸对映体的分离是生命科学研究的基础内容之一,在蛋白质多肽 的研究、有机化学中的不对称合成以及医药、食品、卫生等领域的研究中都具有重要意义。常用的手性 对映体的分离方法有化学分离法、结晶拆分法、酶或微生物拆分法、萃取拆分法、化学传感器和色谱等方 法^[5~9]。此外,膜分离法也被广泛用于对映体的分离^[10~12]。

表面增强拉曼光谱(SERS) 是表征表面分子吸附行为和分子结构的有力工具,已成为高灵敏的研 究界面效应的技术之一,广泛应用于研究吸附分子在表面的取向及吸附行为、吸附界面表面状态,生物 大分子的界面取向及构型、构象和结构分析^[13,14]。SERS 已成为一个强大的分析工具^[15],当物质分子 吸附到粗糙金属上(例如 Au, Ag, Cu 等) 在很低的浓度甚至单分子都能有 SERS 效应^[16-19]。

纳米通道已在生物医药、生命科学领域的分离分析研究中显示出高度的优越性和实用性^[19~23]。但 是采用纳米通道的方法分离 D-L-组氨酸,且同时利用表面增强拉曼光谱测定被分离的物质鲜有报道。 本研究以氧化铝膜为基底制备金纳米通道阵列,壳聚糖在 EDC-NHS 的交联作用下自组装至金纳米通 道孔壁上,形成表面具有手性位点选择性的功能化纳米通道膜,利用纳米通道优异的分离能力手性分离 D-L-组氨酸。采用银溶胶作为表面增强拉曼的基底,增强对 D-L-组氨酸的 SERS 效应,可对 D-组氨酸 和 L-组氨酸同时检测。本研究为构建纳米通道分离池与 SERS 检测系统的偶联装置,实现对被分离物 质的实时检测、深入理解分离机理打下实验基础,体现了其独特的优越性和广阔的应用前景。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI-760B 电化学工作站(上海辰华公司); U 形连通池(自制); 旋光仪(Autopol IV/IV, USA); 拉曼光谱仪(RENISHAW,英国); S4800 场发射扫描电镜(FESEM, HITACHI,日本)。

* E-mail: sshuang@ shnu. edu. cn

²⁰¹⁵⁻⁰⁷⁻²⁷ 收稿; 2015-09-26 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21275100) 资助

孔径为 100 nm 的氧化铝膜购自 Waterman 公司; *D*-组氨酸、*L*-组氨酸(TCI);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基硫二亚胺(EDC,98.5%)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS,99%) 壳聚糖(CS) 及 3-巯基丙酸(99%) 由 Aldrich 公司提供;其余试剂均为分析纯,实验用水为超纯水(18.2 MΩ cm)。

按文献 [24]所述方法,用柠檬酸钠还原法制备银溶胶。取 0.0255 g AgNO₃ 溶于 150 mL 超纯水中,不断搅拌,并将溶液加热至沸腾后,取 3 mL 1% 柠檬酸钠溶液逐滴缓慢加入其中。在沸腾状态下继续加热溶液 10 min,同时不断搅拌,停止加热,自然冷却至室温,得到呈灰色的银溶胶。避光保存。

制备的银溶胶以紫外可见光谱进行表征。所制备的银溶胶的最大吸收峰在 418 nm 处,这是由于金属粒子表面的等离子共振激发或带间跃迁,金属胶体在紫外可见区有吸收带或吸收区。并且在最大吸收峰之后并没有其它的峰,这说明制得的银溶胶的纳米颗粒粒径分布均匀,没有团聚。因此,所制备的银溶胶适合用作 SERS 活性基底。

2.2 实验方法

2.2.1 金纳米通道的制备与修饰 以 Al_2O_3 纳米通道膜为基体,依文献 [25]方法制备 Au 纳米通道 膜。将所制得的 Au 纳米通道膜浸入 1% 巯基丙酸溶液中 6 h 后用去离子水冲洗若干次,然后浸入 (5: 1, *V/V*) EDC-NHS 溶液中, 2 h 后用水冲洗干净,将活化的膜浸没在 0.4% (*w/w*) 的壳聚糖溶液中 (pH = 7.4) 24 h 通过 EDC-NHS 交联的壳聚糖自组装在 Au 纳米通道膜上,用水冲洗干净后备用。实验 均在 4℃条件下进行。为简便计,分别以 Al_2O_3 , Al_2O_3/Au 和 $Al_2O_3/Au/CS$ 表示 Al_2O_3 , 纳米通道膜和修饰了壳聚糖的 Al_2O_3/Au 膜。

2.2.2 纳米通道传感装置 采用文献 [25]所用的 U 形池作为色氨酸对映体分离装置,以氧化铝纳米通道膜作为分离载体,将膜置于两 U 形池进样池、透过池之间,膜的有效透过面积为 0.196 cm²。在 U 形连通池的进样池中加入 10^{-4} mol/L *D*-组氨酸和 10^{-4} mol/L *L*-组氨酸各 4 mL,透过池中加入 4 mL 水 和 4 mL 银胶溶液,间隔一定时间用拉曼光谱仪检测透过池中 *D*-组氨酸和 *L*-组氨酸的量,作出渗透池中 物质的量随时间的关系,所得直线斜率之比(α) 定义为两种待测物的分离度。

3 结果与讨论

3.1 金纳米通道和修饰膜的表征

图 1 为以 100 nm 孔径 Al₂O₃ 膜为基底的纳米通道膜,沉积不同时间得到的金纳米通道膜的 FESEM 图。由图可见 随着镀金时间的增加 ,Al₂O₃ 膜的孔径不断减小,表明 Au 纳米粒子已成功沉积 在了基底膜的表面及孔道内。



图 1 100 nm 氧化铝膜不同沉积时间得到纳米通道的 FESEM 图

Fig. 1 Field emission scanning electron microscopy (FESEM) of 100 nm Al_2O_3 film with different deposition time

Deposition time: (a) ,0 h; (b) ,7 h; (c) ,9 h.

交流阻抗谱和循环伏安法是考察纳米通道制备过程的有效方法^[24]。由 Al_2O_3 纳米通道膜在 0.1 mol/L K₃ [Fe(CN) ₆]溶液中的循环伏安图(图 2) 可见 ,金沉积时间延长 ,电流下降。可能是由于随 着金沉积时间延长 ,纳米通道的孔径变小 ,电子转移阻力增大所致。图 3 为纳米通道膜在0.1 mol/L K₃ [Fe(CN) ₆]溶液中的交流阻抗谱图。由图 3 可见 , Al_2O_3 纳米通道膜经过金的沉积后 ,由于通道孔径 1696

变小 .阻抗变大; 而 Al_2O_3/Au 膜修饰了 CS 后 ,孔径进一步减小 ,其阻抗也进一步增加 ,表明纳米通道被 成功修饰。



图 2 不同金沉积时间下得到的 Al₂O₃/Au 纳米通道 膜的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of Φ 100 nm Al₂O₃ film after deposition of Au for different time a , 3 h; b , 5 h; c , 7 h; d , 9 h; e , 11 h



图 3 Al₂O₃ 纳米通道膜的交流阻抗谱图

Fig. 3 $\,$ AC impedance spectrum of $\rm Al_2O_3\,/\,Au$ nanochannel membrane before and after modified with chitosan

3.2 纳米通道孔径对分离效果影响

纳米通道的孔径可通过金沉积时间控制。考察了不同金沉积时间后得到的金纳米通道膜,经壳聚 糖修饰后对手性组氨酸分离的影响(图4)。实验表明,金沉积时间太短,纳米通道孔径太大,*D*-组氨酸 和 *L*-组氨酸均能通过纳米通道,但金沉积时间太长,则通道孔径太小,甚至使得通道被堵死,以至组氨酸 不能通过通道。在100 nm 的裸氧化铝膜上镀金9 h 后得到的纳米通道膜对 *D*-*L*-组氨酸的分离效果最好。 **3.3** 溶液的 pH 值对 *D L*-组氨酸分离度的影响

分别将适量 pH 为 2.0, 3.5, 5.0, 5.6, 7.6 和 9.0 的 D-, L-组氨酸溶液及等体积空白溶液加入进 样池中,每间隔 1 h 后检测池 D-组氨酸和 L-组氨酸含量。从图 5 可见在低 pH 或者高 pH 下, $Al_2O_3/Au/CS$ 对 D-L-组氨酸的分离度较小;而在 pH = 7.59 时分离度较大。即在组氨酸等电点(pH = 7.59) 时的 分离度最大,达到 α = 4.5。



图 4 不同孔径的纳米通道膜对组氨酸异构体分离的 影响

Fig. 4 Effect of pore size of nanochannels on separation



图 5 pH 值对组氨酸异构体分离的影响

Fig. 5 Effect of pH value on histidine enantiomers separation

3.4 组氨酸的 SERS 光谱

of histidine enantiomers

图 6 为 1.0 × 10⁻¹⁰ mol/L *D*-组氨酸、1.0 × 10⁻¹⁰ mol/L *L*-组氨酸以及相同浓度的 *D*-*L*-组氨酸混合物 的 SERS 光谱。分别取 200 μL 组氨酸、100 μL 银溶胶和 100 μL 80 mmol/L NaCl 混合均匀。从图 6d 可

见,银溶胶起到了 SERS 活性基底的作用,未加入活性基底时,组氨酸无法检出。由于 D-组氨酸和 L-组氨酸的空间位阻不同,与银微粒作用不同,振动频率不同,所以会出现各自的特征峰。L-组氨酸和 D-组氨酸分别在 1000 cm⁻¹(图 6b)和 1590 cm⁻¹(图 6c)处有各自的特征峰;而在 D-L-组氨酸的混合溶 液中,通过 SERS 检测,可以同时看到 D-组氨酸和 L-组氨酸的特征峰存在(图 6a),表明 SERS 可以同 时检测、区分 D-组氨酸和 L-组氨酸。

3.5 基底团聚时间对 SERS 检测的影响

银溶胶和组氨酸混合后的静置时间影响组氨酸的 SERS 信号。考察了银溶胶、NaCl 和待测物团聚 时间的影响(图7)。以制备好的银溶胶作为基底,分别取 200 μL 1 × 10⁻¹⁰ mol/L 组氨酸、100 μL 银溶胶 和 100 μL 80 mmol/L NaCl ,混合均匀。结果表明,团聚时间对分析物检测有很大的影响。团聚时间太 短,分析物与银溶胶未很好地吸附,导致银溶胶没有起到 SERS 增强的效果,所以没有 SERS 信号,无法 检测出待测物质。实验中,银溶胶和组氨酸混合 1 h 后再进行 SERS 信号的检测。



图 6 组氨酸对映体的 SERS 光谱

Fig. 6 Surface enhanced Raman scattering (SERS) spectra of D-L-histidine detection

(a) 1×10⁻¹⁰ mol/L D L-组氨酸 (b) 1×10⁻¹⁰ mol/L L-组氨酸,
 (c) 1×10⁻¹⁰ mol/L D-组氨酸,
 (d) 组氨酸溶液中未加入银溶 胶基底。

(a) $1 \times 10^{-10} \text{ mol/L } D$, L-histidine , (b) $1 \times 10^{-10} \text{ mol/L } L$ -histidine , (c) $1 \times 10^{-10} \text{ mol/L } D$ -histidine , (d) colloidal silver was not added.

3.6 组氨酸检出限的考察

图 8 为采用银溶胶作为表面增强拉曼的基底, 对组氨酸 SERS 检测范围进行考察。对一系列浓度 为 1 × 10⁻¹¹ ~ 1 × 10⁻⁶ mol/L 的 *L*-组氨酸进行检测,发 现当组氨酸的浓度低至 1 × 10⁻¹¹ mol/L,仍有明显的 SERS 信号 基本可以达到低浓度组氨酸的检测要求。 **3.7** 组氨酸对映体在 Al₂O₃/Au/CS 中的迁移

考察了 D-,L-组氨酸在修饰前的纳米通道内的 迁移量随时间的变化。由图 9A 可见, Al_2O_3/Au 纳 米通道膜对组氨酸对映体没有选择性,二者在金纳 米通道内的迁移速率基本上相同,所以不能将两者 分离。图 9B 为 D-组氨酸、L-组氨酸通过 $Al_2O_3/Au/$ CS 纳米通道膜迁移量随时间的变化。选择在 pH 为 7.59 的条件下对 1 × 10⁻⁵ mol/L D-,L-组氨酸对映体



图 7 银溶胶、NaCl 和待测物团聚时间的影响

Fig. 7 Effect of unite time between substrate and analyte 团聚 0.5 h, 1×10^{-10} mol/L *L*-组氨酸, (b) 团聚 10 min, 1×10^{-10} mol/L *L*-组氨酸。

(a) 1×10^{-10} mol/L L-histidine united for 0.5 h;

(b) 1×10^{-10} mol/L *L*-histidine united for 10 min.



图 8 不同浓度组氨酸的 SERS 信号

Fig. 8 SERS spectra of L-histidine

Concentration of *L*-histidine(mol/L): (a) 1×10^{-6} ; (b) 1×10^{-7} ; (c) 1×10^{-8} ; (d) 1×10^{-9} ; (e) 1×10^{-10} .

进行拆分。很显然 *D*-组氨酸的迁移速率明显大于 *L*-组氨酸 壳聚糖功能化的金纳米通道对 *D*-*L*-组氨酸对映体分离度为 4.91。这是由于表面具有手性位点选择性的壳聚糖功能化的金纳米通道膜对手性 组氨酸具有优异的分离能力。



图 9 1×10^{-5} mol/L 组氨酸手性对映体过 Al₂O₃/Au 纳米通道膜(A) 和过 Al₂O₃/Au/CS 纳米通道膜(B) 的分离情况

Fig. 9 Separation efficiency of histidine enantiomers through Au nanochannels membrane (A) and chitosan functionalized Au nanochannels membrane (B)

4 结论

以氧化铝为模板,壳聚糖功能化的金纳米通道在最佳条件下对 D-L-组氨酸对映体分离度最大达 到 4.91。由于 SERS 检测的检出限低 SERS 可以同时检测出 D-组氨酸和 L-组氨酸,可望与纳米通道进 行偶联 在线实时分离检测手性组氨酸对映体,能够大大缩短检测时间。本研究为构建纳米通道分离池 与 SERS 检测系统的偶合装置,对快速便捷地分离检测手性物质提供了方法,具有潜在、独特的优越性 和应用前景。

References

- 1 Rikken G L J A , Raupach E. Nature , 2000 , 405: 932 935
- 2 Wang H D , Chu L Y. J. Membr. Sci. , 2007 , 297: 262 270
- 3 Maier N M , Franco P , Lindner W. J. Chromatogr. A , 2001 , 906: 3 33
- 4 Lorin M , Delepee R , Maurizot J C , Ribet J P , Morin P. Chirality , 2007 , 19: 106-113
- 5 Granados A G , Martinez A , Quiros R. Tetrahedron. , 1999 , 55: 8567 8578
- 6 Puglisi A, Benaglia M, Annunziata R, Bologna A. Tetrahedron. Lett. , 2003, 44: 2947 2951
- 7 Miller L , Orihuela C , Fronek R , Murphy J. J. Chromatogr A. , 1999 , 865: 211 226
- 8 Zheng X Y, Yao T M, Zhu Y, Shi S. Biosens. Bioelectronics, 2015, 66: 103-108
- 9 Schiopu I, Iftemi S, Luchian T. Langmuir, 2015, 31: 387 396
- 10 Pietraszkiewicz M , Kozbial M , Pietraszkiewicz O. J Membr Sci. , 1998 , 138: 109 113
- 11 Yoshikawa M , Ooi T , Izumi J. J. Appl. Polym. Sci. , 1999 , 72: 493 499
- 12 Yang M , Zhao M , Xie S M , Yuan L M. J. Appl. Polym. Sci. , 2009 , 112: 2516 2521
- 13 Campion A , Kambhampati P. Chem. Soc. Rev. , 1998 , 27: 241 250
- 14 Lin W C , Jen H C , Chen C L , Hwang D F , Chang R , Hwang J S , Chiang H P. Plasmonics. , 2009 , 4: 178 192
- 15 XIE Yun-Fei, WANG Xu, RUAN Wei-Dong, SONG Wei, ZHAO Bing. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(9): 2319-2323

谢云飞, 王旭, 阮伟东, 宋薇, 赵冰.光谱学与光谱分析, 2011, 31(9):2319-2323

- 16 Li P W , Zhang J , Zhang L , Mo Y J. J. Vib. Spectrosc. , 2009 , 49: 2-6
- 17 Lorenzo L R , Puebla R A A , Santos I P , Mazzucco S , Stéphan O , Kociak M , Marzán L M , Abajo F J Gl. J. Am. Chem. Soc. ,2009 ,131: 4616 – 4618

- 18 Dadosh T , Sperling J , Bryant G W , Breslow R , Shegai T , Dyshel M , Haran G , Joseph I B. ACS Nano , 2009 , 3: 1988 1994
- 19 Lim D K , Jeon K S , Kim H M , Nam J M , Suh Y D. Nat. Mater. , 2010 , 9: 60 67
- 20 Lee S B, Mitchell D T, Trofin L, Nevanen T K, Söderlund H. Martin C R. Science, 2002, 296: 2198-2200
- 21 Liu Y , Li P , Xie L , Fan D Y , Huang S S. J. Membr. Sci. , 2014 , 453: 12 17
- 22 Yang Y, Krishna K, Joe G. Micropor. Mesopor. Mater. , 2012, 153: 131-136
- 23 Jiao J Q , Tang J G , Wang G M , Wang Y , Huang L J , Huang Z , Liu J X , Zhu Y K , Belfiore L A. RSC Adv. , 2015 , 5: 60920 - 60925
- 24 SUN Lei, LIU Ai-Xin, HUANG Hong-Ying, TAO Xiao-Jun, ZHAO Yan-Bao, ZHANG Zhi-Jun. Acta Phys. Chim. Sin., 2011, 27: 722 728
 孙 磊, 刘爱心,黄红莹, 陶小军, 赵彦保, 张治军. 物理化学学报, 2011, 27: 722 728
- LIU Yue, DAI Guo-Shuai, XIE Li, HUANG Shan-Sheng. Chinese J. Anal. Chem., 2014, 42(5): 623 628
 柳 悦, 代国帅, 谢 利, 黄杉生, 分析化学, 2014, 42(5): 623 628

Chiral Separation and Identification of *D L*-Histidine Based on Nanochannels Membrane Coupling with Surface Enhanced Raman Scattering Spectroscopy

ZHONG Tong-Sheng¹ , YIN Zhi-Fang¹ , LIU Yue² , HUANG Shan-Sheng^{* 1 2}

¹ (Department of Chemical & Environmental Engineering , Hunan City College , Yiyang 413000 , China)

² (Life and Environmental Science College, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract Gold nanochannels were prepared using Al_2O_3 nanotubules membrane as the carrier and modified with chitosan by a classical *N*-(3-dimethylaminopropyl) -*N*-ethyl carbodiimide (EDC) /*N*-hydroxysuccinimide (NHS) coupling reaction. The nanochannels were characterized by field emission scanning electron microscopy (FESEM), cyclic voltammetry and AC impedance method. The Au nanochannels modified with chitosan showed a chiral environment and can be used to separate histidine enantiomer. The effects of pore size and solution pH on the separation efficiency of histidine were investigated. To increase the detection sensitivity of *D*-, *L*-histidine, Ag nanoparticles were used to enhance the surface enhanced Raman scattering (SERS) activity. The results showed that the chitosan-modified gold nanochannels can be used to separate chiral histidine based on this unique selective nanochannel membrane. *L*-Histidine and *D*-histidine were respectively detected by SERS at wavelengths of 1000 and 1590 cm⁻¹. The results showed that *L*-histidine and *D*-histidine were separated well in the mixture containing 200 µL of histidine , 100 µL of colloidal Ag and 100 µL of 80 mmol/L NaCl (pH = 7.59) with a separation efficiency of 4.91.

Keywords Gold nanochannel; Chiral separation; Surface enhanced Raman scattering spectroscopy; Histidine

(Received 27 July 2015; accepted 26 September 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21275100)