

CdSe 量子点荧光增敏法测定甘草酸

高艳丽, 王宗花*, 张菲菲, 夏建飞, 夏延致*, 李延辉

(青岛大学 纤维新材料与现代纺织实验室 国家重点实验室培育基地 化学化工与环境学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 以巯基乙酸为稳定剂水相法一步合成了 CdSe 量子点, 并以此量子点为荧光探针, 基于甘草酸 (GL) 对量子点的荧光增强效应, 建立了一种简便、快速、灵敏测定 GL 的分析方法, 同时对 GL 与 CdSe 量子点的反应机理进行了初步探讨。考察了多种因素对 GL 测定的影响。结果表明, 在 pH 7.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中, 当量子点的浓度为 2.4×10^{-4} mol/L、反应时间为 10 min 时, 体系的相对荧光强度与 GL 的质量浓度呈良好线性, 线性范围为 $5.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ g/L, $r = 0.9980$, 检出限为 4.8×10^{-9} g/L。该方法对实际样品中甘草酸的测定结果与标准药典方法相吻合。该研究结果预示量子点修饰的甘草酸靶向药物运载系统具有较好的示踪效果, 对进一步研究甘草酸靶向运载体系具有一定意义。

关键词: CdSe 量子点; 甘草酸; 荧光增敏法

中图分类号: O561.3; O611.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)11-1241-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.11.007

Determination of Glycyrrhizin by the Fluorescence Enhancement of CdSe Quantum Dots

GAO Yan-li, WANG Zong-hua*, ZHANG Fei-fei, XIA Jian-fei, XIA Yan-zhi*, LI Yan-hui

(Laboratory of Fiber Materials and Modern Textile, The Growing Base for State Key Laboratory, College of Chemical and Environmental Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: Water-soluble CdSe quantum dots (QDs) were synthesized in aqueous solution with thio-glycollic acid as stabilizer. By using CdSe QDs as fluorescent probe, based on the enhancement of the fluorescence intensity of CdSe QDs by glycyrrhizin (GL), a simple, rapid and sensitive method for the determination of GL was proposed and validated. Furthermore, the possible mechanism of interaction between CdSe QDs and GL was discussed. Effects of experimental conditions were investigated. The optimal conditions were as follows: buffer: pH 7.4 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ solution, concentration of quantum dots: 2.4×10^{-4} mol/L, reaction time: 10 min. Under the optimal conditions, a good linearity was obtained between fluorescence intensity and GL concentration in the range of $5.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-7}$ g/L with a correlation coefficient of 0.9980. The obtained linear regression equation was: $I_F/I_F^0 = 1.337 + 0.014\rho (10^{-9} \text{ g/L})$ and the limit of detection was 4.8×10^{-9} g/L. The proposed method was successfully applied in the determination of GL in actual samples, and the results were in good agreement with that of the national standard method in Chinese Pharmacopoeia. The study indicated that the combination of QDs and GL produced a nice labelling effect, and it would be of considerable significance to the further investigation of GL targeted carrier system.

Key words: CdSe quantum dots; glycyrrhizin; fluorescence enhancement

量子点 (Quantum dots, QDs) 又称为半导体纳米微晶粒, 是一种直径为 1 ~ 100 nm 的发光纳米颗粒。由于小尺寸效应、量子尺寸效应、表面界面效应等使其表现出既有别于体相材料又不同于单个分子的性质^[1-3], 其优良的光化学性质使其在生物标记^[4]、生物检测^[5]等领域有着广泛的应用。同时, 基于量子点的荧光猝灭或增强效应对药物进行定量测定屡见报道。贺冬秀等^[6]以 L-半胱氨酸为稳定剂, 在

收稿日期: 2011-08-03; 修回日期: 2011-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(20975056, 50802045, 81102411); 青岛市科技计划基础研究项目(091330jch); NSFC-JSPS 中日合作与交流项目(21111140014); 山东省自然科学基金(ZR2011BZ004, ZR2011BQ005); 山东省泰山学者项目(TS20070711)

* 通讯作者: 王宗花, 博士, 研究方向: 生命分析化学、纳米材料, Tel: 0532-85950873, E-mail: wangzonghua@qdu.edu.cn
夏延致, 博士, 研究方向: 纳米复合材料、纳米多功能纤维材料, Tel: 0532-85953069, E-mail: qdxyzh@163.com

水溶液中合成了 CdTe 量子点; 并以该量子点为荧光探针, 基于荧光猝灭法对尼群地平进行了定量检测。该方法的线性范围为 $0.38 \sim 77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 检出限为 $0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 可成功用于药片中尼群地平的测定。凌霄等^[7]采用荧光光谱和紫外光谱研究了 CdTe 量子点与广谱抗菌药物帕珠沙星的相互作用。结果表明, 在一定条件下, 帕珠沙星溶液的浓度与量子点荧光强度呈线性关系, 检测限为 $3.254 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 该反应可作为一种快速检测帕珠沙星含量的新方法, 将此方法用于冻干粉针剂和氯化钠注射液中帕珠沙星的含量测定, 所得结果与标示量一致。王齐等^[8]发展了一种用 CdS 量子点作探针, 灵敏、简便并快速测定蒽环类抗癌药物的共振瑞利散射新方法, 该方法对于米托蒽醌、表柔比星和柔红霉素的检出限在 $3.6 \sim 9.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。

甘草酸(Glycyrrhizin)是从甘草(欧亚甘草)根部提取的一种主要化合物。药理研究表明, 甘草酸类药物可防治病毒性肝炎、高血脂症及癌症等疾病, 是有效的干扰素诱生剂和细胞免疫调节剂^[9], 对艾滋病的抑制率高达 90%。20 世纪 90 年代初, Negishi 证实大鼠肝细胞膜上含有甘草次酸及甘草酸结合位点^[10], 随后一些研究也发现以甘草次酸/甘草酸修饰的载体材料具有趋肝性, 可被老鼠及人的肝脏细胞吸收^[11-13], 作为肝靶向的新型靶向载体具有很大的应用前景。甘草酸的测定方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[14]、高效毛细管电泳法(HPCE)^[15]等, 应用荧光法对甘草酸进行分析尚未见报道。

传统的荧光法多以有机荧光染料为荧光剂, 存在荧光强度低、光稳定性差等缺点, 使检测范围和灵敏度受到一定限制。本文利用巯基乙酸为稳定剂, 在水相中一步合成水溶性 CdSe 量子点, 并优化了量子点荧光增敏法检测甘草酸的实验因素, 建立了一种以水溶性量子点为探针, 荧光增敏法测定甘草酸的新方法。该方法仪器要求简单、操作简便快速、灵敏度高, 测定结果与标准药典方法一致。预示着量子点作为一种新型的甘草酸分析荧光探针, 具有良好的应用前景, 量子点与甘草酸的结合具有示踪效果的加强作用, 可推进甘草酸在靶向药物运载系统中的应用研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV755B 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司), F-96 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司), pH5-3CT 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司), 磁力加热搅拌器(京华仪器责任有限公司)。

硒粉(纯度 99.99%)、氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, 纯度 99.95%)、巯基乙酸(>91%)、硼氢化钠(分析纯)、甘草酸(HPLC \geq 98%)均购于中国医药(集团)上海化学试剂公司。甘草浸膏和甘草流浸膏均购于宝鸡金森化工制品有限公司, 实验用水为二次蒸馏水, 所有测试均在室温下完成。

1.2 CdSe 量子点的制备

基于文献[16], 对量子点的制备进行了适当改进: 取 1 mL 水于试管中, 加入 0.050 g 的 NaBH_4 , 待白色晶体全部溶解后, 加入 0.050 g 的 Se 粉, 反应 1~2 h, 形成无色透明溶液 A; 按照 Se、 Cd^{2+} 和巯基乙酸的摩尔比为 1:2:4.8 分别称取 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和巯基乙酸, 混合, 用 1.0 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 值至 8.0, 形成无色透明溶液 B; 将溶液 B 充 N_2 30 min 后将溶液 A 加入其中, 并快速搅拌, 反应 30 min 形成 CdSe 单体; 在 100 °C 下回流加热, 量子点的粒径由不同的回流时间控制(本文使用的是 100 °C 下回流加热 5 min 的样品), 并通过紫外吸收光谱和荧光光谱实时监控。

1.3 样品液的制备

称取 1 mg 甘草浸膏粉末(Extractum glycyrrhizae), 溶于 200 mL 40% 乙醇溶液中, 混匀, 得储备液。准确吸取上清液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 以 40% 乙醇溶液稀释至刻度, 得到实验用甘草浸膏粉样品液; 准确量取甘草流浸膏 2 mL(Extractum glycyrrhizae liquidum), 以相同方法制备甘草流浸膏样品液。

1.4 甘草酸的测定

在 10 mL 具塞比色管中加入 1 mL pH 7.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液, 使反应体系中 CdSe 量子点的终浓度为 $2.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (以 Se^{2-} 浓度计算), 再加入一定量的甘草酸溶液, 定容, 室温下放置 10 min。发射波长为 500 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm, 测量体系的荧光强度 I_f 。同法配制不加甘草酸的空白溶液, 测其荧光强度 I_f^0 。

2 结果与讨论

2.1 CdSe 量子点的表征

经过不同的回流加热时间,可得到不同粒径的水溶性巯基乙酸稳定的 CdSe 量子点。图 1 为回流加热 5 min 时所得 CdSe 量子点的紫外可见吸收光谱和荧光光谱,所合成的 CdSe 量子点荧光峰在 502 nm 处,荧光光谱谱线左右对称,呈正态分布,可判断量子点呈球形,有较好的单分散性。根据 Peng 的经验公式^[17]: $D = (1.612 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2.6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1.624 \times 10^{-3})\lambda^2 - 0.4277\lambda + 41.57$ (式中 D (nm) 为样品的直径, λ (nm) 为吸收波长),可知 CdSe 量子点的平均粒径约为 2.0 nm。

2.2 CdSe 量子点与甘草酸的相互作用

图 2 为 CdSe 量子点、甘草酸 (GL) 和 CdSe - GL 的荧光光谱图。结果表明, CdSe - GL 的荧光峰在 490 nm 处, GL 在此波长无吸收,相比于单一的量子点 CdSe, CdSe - GL 的吸收强度更高,且荧光峰发生了蓝移。甘草酸是良好的金属离子配体,络合能力强,可与 Cd^{2+} 生成稳定性高的配合物^[18]。可以推测, Cd^{2+} 和 GL 形成的高稳定性配合物,有效地钝化了量子点的表面,减少了量子点表面缺陷,从而使荧光强度出现明显的增强^[19]。相对于 CdSe 的荧光峰(502 nm), CdSe - GL 的荧光峰向短波方向移动。引起发射峰位变化的原因可能是结合 GL 后量子点的表面电荷数减少,从而降低了周围分子的定向极化率,使其斯托克斯位移减小,导致发射光谱发生蓝移^[20]。

图 3 为 CdSe 量子点、甘草酸 (GL) 和 CdSe - GL 的紫外可见吸收光谱。如图所示, CdSe QDs 的吸收峰为 453 nm(曲线 a),甘草酸的吸收峰为 251 nm(曲线 c),当甘草酸加入到 CdSe QDs 溶液后在 288 nm 处出现新的吸收峰(曲线 b),表明加入甘草酸后有新物质生成,甘草酸影响了 CdSe QDs 的结构。

2.3 反应介质与 pH 值的影响

考察了不同 pH 值的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、Tris - HCl 和 NaAc - HAc 缓冲溶液及缓冲溶液的浓度对体系的影响。结果表明,在加入 pH 7.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液时,体系发光基本保持稳定,且荧光增强作用较大。因此实验选用 pH 7.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液作为最佳缓冲体系。

2.4 反应时间的影响

按照“1.3”所述的实验方法,在室温条件下

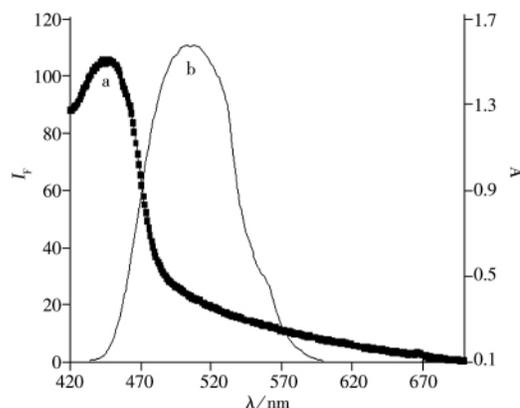


图 1 CdSe 量子点的紫外可见吸收光谱(a)与荧光光谱(b)

Fig. 1 UV - Vis absorption (a) and fluorescence spectra (b) of CdSe QDs

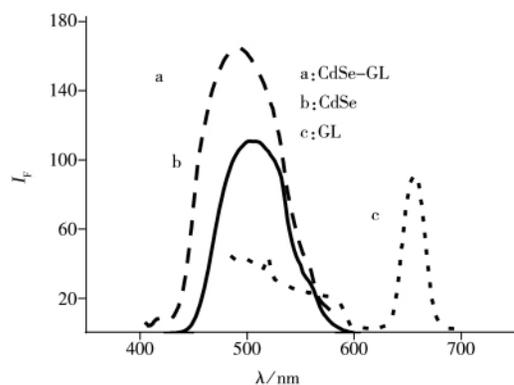


图 2 CdSe - GL(a)、CdSe 量子点(b)和甘草酸(GL)(c)的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of CdSe - GL(a), CdSe QDs(b) and GL(c)

$\rho_{\text{GL}} = 5.0 \times 10^{-9}$ g/L

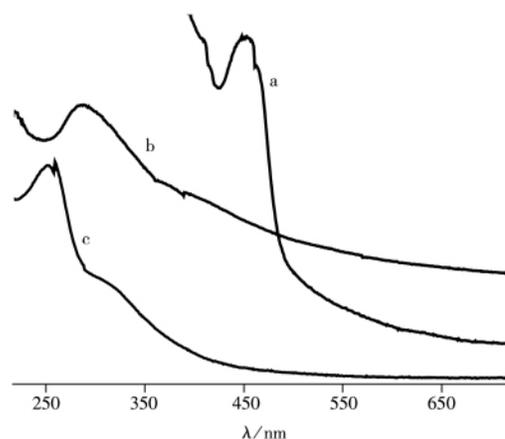


图 3 CdSe QDs(a)、CdSe QDs - GL(b)与GL(c)的紫外可见吸收光谱

Fig. 3 UV - Vis absorption spectra of CdSe QDs(a), CdSe QDs - GL(b) and GL(c)

concentration of CdSe QDs and GL were 2.4×10^{-4} mol/L and 2.0×10^{-8} g/L, respectively

研究了反应时间对荧光强度的影响。结果表明,体系的荧光强度在溶液混合反应 5 min 时明显增强, 10 min 后荧光增强程度达最大值,且可以保持 2 h,因此,选择在体系反应 10 min 时进行测定。

2.5 CdSe 量子点浓度的影响

按实验方法,固定其它实验条件,考察了 CdSe 溶液浓度对体系荧光强度的影响。结果表明,当量子点的浓度(以 Se^{2-} 浓度计算)大于 3.9×10^{-4} mol/L 时,荧光增强作用不明显,分析灵敏度低;当量子点的浓度小于 2.4×10^{-4} mol/L 时,荧光增强程度较大,但体系发光不稳定,线性范围窄;当量子点的浓度在 $2.4 \times 10^{-4} \sim 3.9 \times 10^{-4}$ mol/L 时,体系发光稳定,荧光增强程度较大,且各浓度间荧光强度相差不大。综合考虑,本实验选取 CdSe 量子点的最佳浓度为 2.4×10^{-4} mol/L。

2.6 方法的标准曲线

在 pH 7.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中,随着甘草酸质量浓度的增加,体系的发光强度逐渐升高(见图 4),且发光强度的增幅和甘草酸的质量浓度呈线性关系,据此可实现对甘草酸的荧光法测定。以 I_F/I_F^0 对甘草酸的质量浓度进行线性拟合,甘草酸在 $5.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ g/L 范围内与 I_F/I_F^0 呈良好线性关系(图 4 插图),线性方程为 $I_F/I_F^0 = 1.337 + 0.014\rho$ (ng/L), $r = 0.998 0$,以空白的 3 倍标准偏差除以标准曲线的斜率得出本方法的检出限为 4.8×10^{-9} g/L。

2.7 共存离子的干扰

考察了常见的金属离子对含有 2.0×10^{-8} g/L GL 的体系的影响,以干扰水平为 $\pm 5\%$ 计,结果见表 1。由表 1 可知,大部分金属离子不产生干扰, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 对体系有一定干扰,其中 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 可用三乙醇胺掩蔽, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 可用 KCN 掩蔽。

2.8 实际样品的分析

2.8.1 样品中 GL 的测定 分别取适量样品按实验方法进行测定,以标准曲线法定量,并将测定结果与药典标准法——HPLC^[21]的测定结果进行对照,结果见表 2。结果显示,本方法测定结果与标准方法相吻合。

表 2 样品中甘草酸的测定结果($n = 6$)

Table 2 Determination results of GL samples ($n = 6$)

Sample	This method $w(\text{GL})/\%$	RSD $s_r/\%$	HPLC GL $w(\text{GL})/\%$
Extractum glycyrrhizae	6.62	0.087	6.57
Extractum glycyrrhizae liquidum	2.87	0.12	2.73

2.8.2 样品回收率实验 取甘草浸膏和甘草流浸膏各 6 份,分别加入一定量的甘草酸对照品,进行回收率实验(见表 3)。其中甘草浸膏的平均回收率为 99.6%,RSD 为 1.6%;甘草流浸膏的平均回收率为 100.5%,RSD 为 1.3%,结果满意。

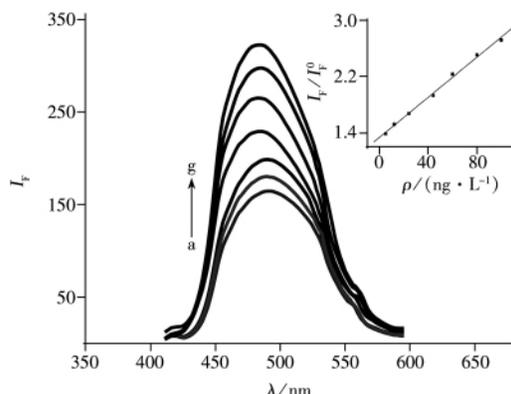


图 4 不同甘草酸(GL)浓度下体系的荧光光谱图
Fig.4 Fluorescence spectra of CdSe QDs in the presence of GL
 ρ_{GL} (a-g): 0.5, 1.2, 2.4, 4.4, 6.0, 8.0, 10.0 ($\times 10^{-8}$ g/L);
concentration of CdSe QDs: 2.4×10^{-4} mol/L, incubation
time: 10 min, pH 7.4; inset: relationship between
fluorescence intensity and GL concentration

表 1 共存物质的干扰

Table 1 Test for the interference of coexistent substances

Coexistent substance	Co-concentration	Degree of interference
	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$E_r/\%$
Mg^{2+} , Cl^-	1.0	+1.2
Na^+ , Cl^-	1.0	-1.0
K^+ , Cl^-	1.0	+3.5
NH_4^+ , Cl^-	0.9	-4.3
Zn^{2+} , Cl^-	0.4	+6.3
Cu^{2+} , Cl^-	0.3	-5.4
Ca^{2+} , Cl^-	0.2	+4.1
Ba^{2+} , Cl^-	0.5	-4.0
Fe^{3+} , NO_3^-	0.2	-7.8
Al^{3+} , Cl^-	0.2	-6.3

表 3 样品的回收率实验 ($n = 6$)
Table 3 Recovery test of samples ($n = 6$)

Sample	Content $w/\%$	Added $w/\%$	Found $w/\%$	Average recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Extractum glycyrrhizae	6.62	10.00	16.56	99.6	1.6
Extractum glycyrrhizae liquidum	2.87	10.00	12.93	100.5	1.3

3 结 论

本文以巯基乙酸为稳定剂,利用水热法一步合成了水溶性 CdSe QDs。基于甘草酸与量子点形成稳定性高的配合物使得 CdSe QDs 的荧光发光强度得到增强,提出了一种简单、快速、灵敏地测定甘草酸的分析方法。该方法应用于实际样品的测定,结果满意。该研究结果预示量子点可加强甘草酸靶向药物运载系统的示踪效果,对进一步的甘草酸靶向运载体系的研究具有一定意义。

参考文献:

- [1] Han M, Gao X, Su J Z. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19(7): 631 – 635.
- [2] Zou M Q, Yang R, Li J F, Ma J X, Wang N. *J. Instrum. Anal.* (邹明强, 杨蕊, 李锦丰, 马吉湘, 王楠. 分析测试学报), **2005**, 24(6): 133 – 137.
- [3] Liu C L, Zhang X Y, Zhong J H, Zhu Y H, Zhang G B. *J. Instrum. Anal.* (刘成林, 张新夷, 钟菊花, 朱以华, 张国斌. 分析测试学报), **2009**, 28(4): 394 – 397.
- [4] Zheng Y G, Gao S J, Jackie Y Y. *Adv. Mater.*, **2007**, 19(3): 376 – 380.
- [5] Wang H Z, Wang H Y, Liang R Q. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **2004**, 36(10): 681 – 686.
- [6] He D X, Liu L, Yu C Y, He X Z. *J. Instrum. Anal.* (贺冬秀, 刘璐, 喻翠云, 何小珍. 分析测试学报), **2010**, 29(12): 1158 – 1161.
- [7] Ling X, Deng D W, Zhong W Y, Yu J S. *Spectrosc. Spectral Anal.* (凌霞, 邓大伟, 钟文英, 于俊生. 光谱学与光谱分析), **2008**, 28(6): 1317 – 1321.
- [8] Wang Q, Liu Z F, Liu S P. *Chem. J. Chin. Univ.* (王齐, 刘忠芳, 刘绍璞. 高等学校化学学报), **2007**, 28(5): 837 – 842.
- [9] Fan Y G, Shi Z Q, He B L. *Nat. Prod. Res. Dev.* (范云鸽, 史作清, 何炳林. 天然产物研究与开发), **1996**, 8(4): 93 – 99.
- [10] Negishi M, Irie A, Nagata N, Ichikawa A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1066: 77 – 82.
- [11] Mao S J, Hou S X, He R, Zhang L K, Wei D P, Bi Y Q, Jin H. *World J. Gastroenterol.*, **2005**, 11: 3075 – 3079.
- [12] Lin A H, Liu Y M, Huang Y, Sun J B, Wu Z F, Zhang X, Ping Q N. *Int. J. Pharm.*, **2008**, 359: 247 – 253.
- [13] Ismail M G, Stanca C, Ha H R, Renner E L, Meier P J, Kullak-Ublick G A. *Hepatol. Res.*, **2003**, 26: 343 – 347.
- [14] Shen J C, Zhuang Z X, Wang X R. *Chin. J. Pharm. Anal.* (沈金灿, 庄峙厦, 王小如. 药物分析杂志), **2006**, 26(4): 421 – 425.
- [15] Xu C Y, Li G F, Chen Z L, Hou L B. *Chin. Tradit. Pat. Med.* (许重远, 李国锋, 陈志良, 侯连兵. 中成药), **2000**, 22(11): 792 – 793.
- [16] Li L, Qian H F, Ren J C. *Chem. Commun.*, **2005**, 4: 528 – 530.
- [17] Yu W W, Qu L H, Guo W Z, Peng X G. *Chem. Mater.*, **2003**, 15(14): 2854 – 2860.
- [18] Zhu S M, Yu S J, Li J P. *Nat. Prod. Res. Dev.* (朱思明, 于淑娟, 李军平. 天然产物研究与开发), **2007**, 19: 854 – 857.
- [19] Hu W P, Jiao M, Dong X Z, Wang X. *Spectrosc. Spectral Anal.* (胡卫平, 焦嫫, 董学芝, 王鑫. 光谱学与光谱分析), **2011**, 31(2): 444 – 447.
- [20] Zhang A M, Wang H S, Yan W, Fan L X. *Phys. Test. Chem. Anal.: Chem. Anal.* (张爱梅, 王怀生, 闫炜, 樊丽霞. 理化检验: 化学分册), **2008**, 44(12): 1137.
- [21] China Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. Beijing: People's Medical Publishing House(国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 人民卫生出版社), **2005**: 273 – 274.