

热处理的锐钛型二氧化钛催化 可见光照射损伤牛血清白蛋白

张朝红^{a*} 韩文明^a 王冬梅^b 胥丹平^a 邓英俏^a 陈中林^a 郜 炜^a

(^a辽宁大学环境学院 沈阳 110036; ^b锦州市环境监测中心站综合技术室 锦州)

摘 要 利用紫外-可见(UV-Vis)光谱和荧光光谱研究了可见光照射热处理的锐钛型二氧化钛(TiO₂)对牛血清白蛋白(BSA)的损伤,同时对处理前后 TiO₂的光催化活性进行了比较,并考察了可见光照射时间、TiO₂加入量和照射功率等因素对 BSA 分子损伤的影响。结果表明,经过高温处理锐钛型 TiO₂可以部分转晶,处理后的 TiO₂和可见光的联合作用能够导致 BSA 分子损伤。UV-Vis 光谱表现为增色效应,荧光光谱表现为荧光猝灭。且处理后的 TiO₂的光催化活性好于处理前。对于体系温度为 25 ℃和浓度为 1.0 × 10⁻⁵ mol/L 的 BSA 溶液,BSA 分子的损伤程度随着可见光照射时间、TiO₂加入量和照射功率的增加而增大。同步荧光光谱证明了 BSA 分子中酪氨酸的损伤程度较大。

关键词 可见光,热处理,二氧化钛(TiO₂),损伤,牛血清白蛋白(BSA)

中图分类号:O644.3

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2010)05-0594-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2010.90516

近年来,以二氧化钛(TiO₂)为催化剂的光催化技术在环境治理领域已得到广泛应用^[1,2]。这是因为 TiO₂具有光催化活性高、化学性质稳定、对人体无毒性 and 价廉易得等特点^[3],并且 TiO₂具有较深的价带能级,当用能量大于 TiO₂能带隙(3.2 eV)的光照射到其表面时,会产生具有很强氧化和还原能力的空穴(h⁺)和电子(e⁻),这些 h⁺和 e⁻与 H₂O 结合会产生氧化性很强的·OH 自由基,可发生许多化学反应^[4]。TiO₂光催化技术可应用于有机废水的处理,能有效地将水中的有机污染物等进行除毒、脱色和矿化,最终降解为 CO₂和 H₂O,因此 TiO₂也成为最具开发前景的绿色环保催化剂之一。

TiO₂可以被正常组织内的血管周围的巨噬细胞所吞噬,不会引起白细胞减少等副作用的发生。血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质,它能够储存和转运众多的内源性和外源性物质。由于血清白蛋白在生理上的重要性以及易于分离、提纯而常被用作模型球蛋白。已有研究证明 TiO₂具有光催化灭菌作用。但通常光催化研究中所用的锐钛型 TiO₂只对紫外光有响应^[5],而太阳光中仅含 3%~4%左右的紫外光,大部分是可见光。为了有效地利用太阳光,需要扩大 TiO₂对可见光的响应范围,提高 TiO₂的光催化活性。本实验通过高温处理得到部分转晶的 TiO₂,在可见光作用下对蛋白质分子损伤进行研究。若实现对蛋白质的损伤,则可能造成自然情况下的细胞凋亡,从而对病毒和病菌的灭活是完全可能的,并且其产物干净且无毒^[6]。同时对于某些病毒、病菌的清除剂和灭活剂等方面的研究也有着重要的意义^[7,8]。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

FL40T8EXD/36 型三基色灯(日本 Toshiba 公司),波长范围 470~700 nm,功率 64~192 W; Cary50 型 UV-Vis 光谱仪(美国 Varian 公司); Cary300 型荧光光谱仪(美国 Varian 公司); D8ADVANCE 型全自

动 X 射线衍射仪(XRD,德国 Brukeraxs 公司)。

牛血清白蛋白(BSA,北京奥博星生物技术责任有限公司),使用时未经进一步纯化,在 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下溶于 NaCl-Tris-HCl(pH = 7.4, NaCl 浓度 0.050 mol/L , Tris-HCl 浓度 0.05 mol/L) 缓冲溶液,配成浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的储备液,准确浓度由 278 nm 处的吸光度确定;TiO₂(微米级粉末,锐钛型,杭州万景新材料有限公司);实验用水为二次蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 TiO₂的热处理过程 锐钛型 TiO₂粉末于马福炉中加热至 $500 \text{ }^\circ\text{C}$,恒温 300 min ,加热过程中适当搅拌,以保证粉末受热均匀。经高温处理使部分锐钛型 TiO₂转变成了金红石型 TiO₂^[9]。

1.2.2 BSA 损伤的测定 量取 6 份浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 BSA 储备液 50 mL 分别放入 6 只体积为 100 mL 无盖锥形瓶(标记为 a、b、c、d、e 和 f)。其中 c 和 d 瓶分别加入 0.05 g (1.0 g/L) 经热处理的 TiO₂(下文简称处理 TiO₂), e 和 f 瓶分别加入 0.05 g (1.0 g/L) 未经热处理的 TiO₂(下文简称 TiO₂)。将 a、c 和 e 瓶避光放置, b、d 和 f 瓶在可见光下照射 3.0 h , 照射功率为 144 W , 之后取样离心, 在室温 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) 下测定 6 个样品的 UV-Vis 光谱和荧光光谱。另外, 改变照射时间, TiO₂ 加入量和照射功率的实验也按同样方法进行。

1.2.3 UV-Vis 光谱和荧光光谱测定条件 UV-Vis 光谱波长范围为 $200 \sim 800 \text{ nm}$, 扫描速度 270 nm/min 。荧光光谱波长范围为 $200 \sim 600 \text{ nm}$, 光源为 150 W 氙灯, 扫描速度为 720 nm/min , 激发波长为 280 nm , 激发及发射狭缝为 2.5 nm 。选择 $\Delta\lambda$ 为 15 和 60 nm 扫描同步荧光光谱, 其中 $\Delta\lambda = \text{发射波长}(\lambda_{em}) - \text{激发波长}(\lambda_{ex})$ 。样品池均为 1.0 cm 石英比色皿, 均为室温下测定。

2 结果与讨论

2.1 处理 TiO₂的 XRD

为了确定原锐钛型 TiO₂的转变及金红石型 TiO₂的生成,测试了原锐钛型 TiO₂和处理 TiO₂的 XRD, 结果如图 1 所示。晶粒尺寸(α)用 Scherrer 方程式计算, 金红石型和锐钛型 TiO₂比例(β)通过 XRD 用质量方程计算^[9]: $I_R = [1 + 0.8(I_A/I_R)]^{-1}$ 和 $I_A = [1 + 1.26(I_R/I_A)]^{-1}$ 。与图 1A 相比, 从图 1B 中可以看出, 金红石型 TiO₂衍射峰的出现, 经计算得出金红石型 TiO₂和锐钛型 TiO₂的含量分别为 24.12% 和 75.88% 。这表明经高温处理使部分锐钛型 TiO₂转变成了金红石型 TiO₂。且结晶化过程将导致粒子尺寸变大, 也为 TiO₂由锐钛型向金红石型转晶提供了机会^[9]。

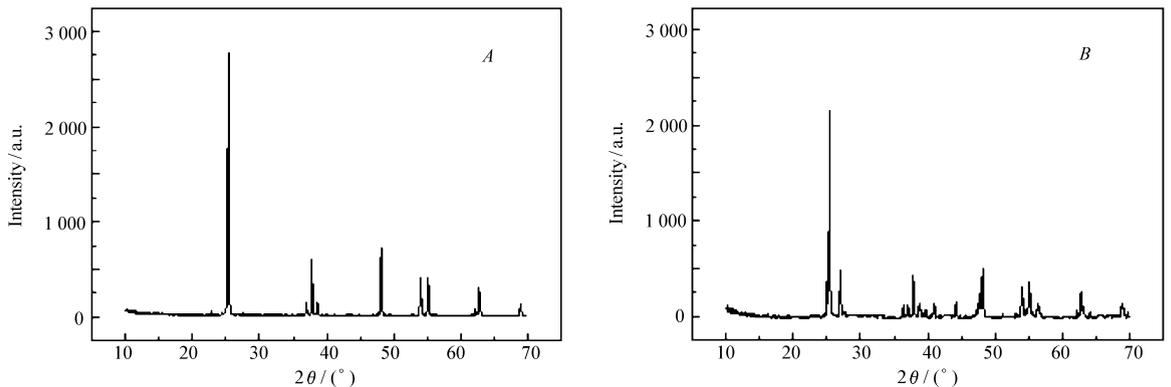


图 1 TiO₂的 XRD 图

Fig. 1 XRD patterns of TiO₂

A. anatase-TiO₂; B. heat-treated TiO₂

2.2 不同条件下 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱和荧光光谱

图 2A 显示, 与 BSA 原液相比, 单纯可见光照射 3.0 h 后, BSA 溶液的吸光度有一定的增加; 而单纯加入 TiO₂ 时 BSA 溶液的吸光度只有微弱增加。但当加入 TiO₂ 并结合可见光照射时, BSA 溶液的吸光度

大幅度增加,且加入处理后的 TiO_2 效果更明显。吸光度从大到小的顺序为: $\text{BSA} + \text{处理 TiO}_2 + \text{可见光} > \text{BSA} + \text{TiO}_2 + \text{可见光} > \text{BSA} + \text{可见光} > \text{BSA} + \text{处理 TiO}_2 > \text{BSA} + \text{TiO}_2 > \text{BSA}$ 。这说明单纯 TiO_2 或可见光只对 BSA 有较小的作用,这些变化是因为改变了 BSA 分子的二级结构,使色氨酸和酪氨酸等氨基酸芳香杂环等疏水基团裸露,吸光度增强,紫外光谱表现为增色效应。而当 TiO_2 和可见光联合作用时,可见光激发 TiO_2 粒子产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基,通过进攻 BSA 分子中的二硫键,氧化硫原子使其断裂,使 BSA 分子损伤,增色效应明显^[10]。且处理 TiO_2 在可见光的作用下对 BSA 的损伤远远大于其它情况。

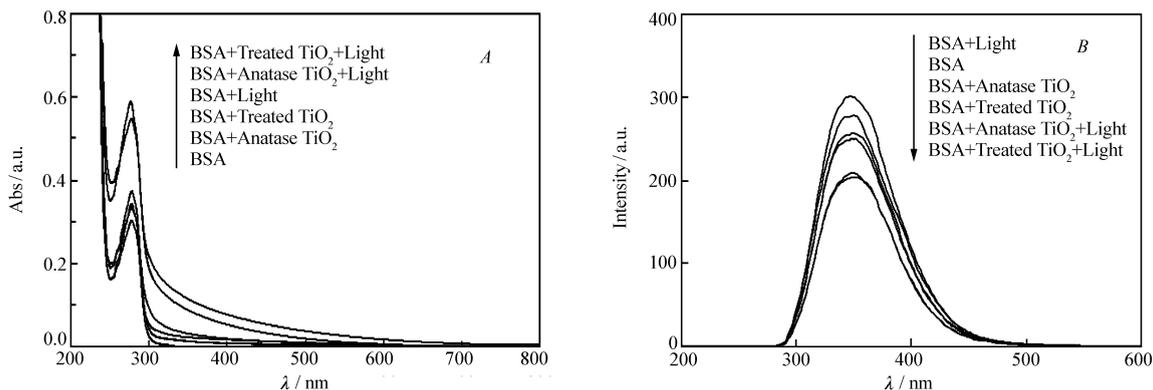


图 2 BSA 溶液的 UV-Vis 光谱(A)和荧光(B)光谱

Fig. 2 (A) UV-Vis and (B) fluorescence spectra of BSA solutions

BSA 溶液的荧光光谱(图 2B)也得到相同结论。BSA 溶液的荧光大小顺序依次为: $\text{BSA} + \text{可见光} > \text{BSA} > \text{BSA} + \text{TiO}_2 > \text{BSA} + \text{处理 TiO}_2 > \text{BSA} + \text{TiO}_2 + \text{可见光} > \text{BSA} + \text{处理 TiO}_2 + \text{可见光}$ 。其可能的原因:当 BSA 在单纯可见光照射下,非荧光基团断裂,肽链伸展,荧光基团外露,荧光强度略微增加。而可见光和处理 TiO_2 的联合作用一方面使 BSA 中的荧光性物质(如色氨酸和酪氨酸等残基)破坏,导致 BSA 溶液的荧光强度下降;另一方面使 BSA 分子结构变化,破坏了 BSA 分子的荧光体系,使其荧光发生猝灭^[11,12],其综合结果是导致 BSA 溶液的荧光强度大幅度下降。

2.3 照射时间对 BSA 分子损伤作用的影响

实验条件同 1.2.2 节,改变照射时间(0.0~5.0 h),结果如图 3 所示。

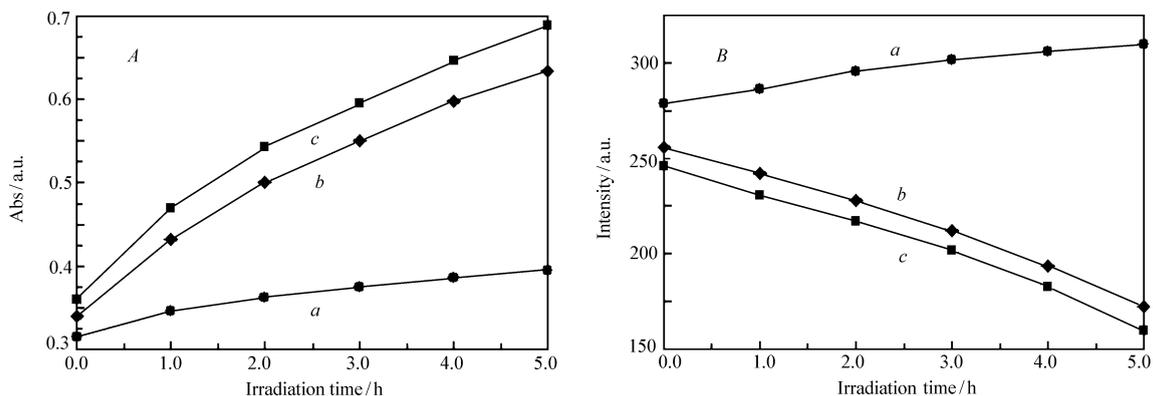


图 3 照射时间对 BSA 溶液吸光度($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) (A) 和荧光强度($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) (B) 的影响

Fig. 3 Influences of irradiation time on (A) absorbance($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) and (B) intensity($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions

a. BSA; b. BSA + TiO_2 ; c. BSA + heat-treated TiO_2

图 3A 显示,在单纯可见光存在时,BSA 溶液的吸光度随着照射时间的延长有缓慢的增加。而当 TiO_2 存在时,随着可见光照射时间的增加,BSA 溶液的吸光度显著增大,即增色效应明显增大。且处理 TiO_2 的 BSA 溶液的吸光度一直高于加入 TiO_2 的吸光度。这说明光照激活处理 TiO_2 可产生更多的 $\cdot\text{OH}$ 自由基,照射时间愈长,产生的自由基越多,对 BSA 分子的损伤就越大。加入 TiO_2 后,图 3B 中荧光强度随着照射时间的延长,处理 TiO_2 存在时的荧光猝灭要比 TiO_2 存在时更强烈。

此外,同步荧光光谱进一步证明了这种现象。同步荧光技术是在同时扫描激发单色器和发射单色器波长的情况下来测绘荧光光谱图。由测得的荧光强度信号对发射或激发波长作图,称为同步荧光光谱。同步荧光光谱已被应用于蛋白质构象的分析,由 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 所得的同步荧光只显示蛋白质中酪氨酸残基的荧光,由 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 所得的同步荧光只显示蛋白质中色氨酸残基的荧光。选择 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 扫描同步荧光光谱,可以明确地将 BSA 中色氨酸和酪氨酸残基荧光峰分辨出来^[13]。图 4 显示,在同样条件下,二者荧光强度均迅速下降。处理 TiO_2 对酪氨酸和色氨酸荧光猝灭率分别为 48.74% 和 33.37%,而 TiO_2 对酪氨酸和色氨酸荧光猝灭率分别为 29.78% 和 22.01%。这再次证明处理 TiO_2 和可见光照射的联合作用对 BSA 的损伤作用更大,且对 BSA 分子中酪氨酸的损伤程度较大。

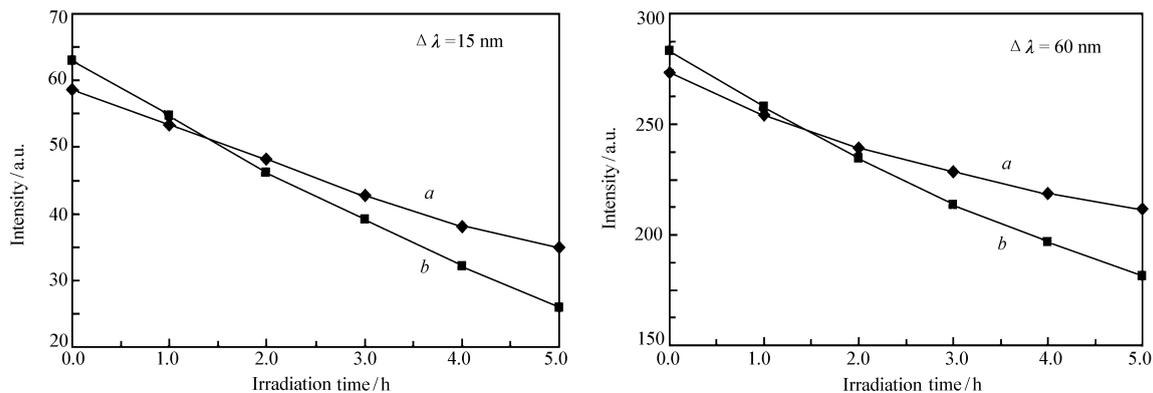


图 4 照射时间对 BSA 溶液同步荧光强度的影响

Fig. 4 Influences of irradiation time on synchronous fluorescence intensity of BSA solutions

a. BSA + TiO_2 ; b. BSA + heat-treated TiO_2

2.4 TiO_2 加入量对 BSA 损伤作用的影响

实验条件同本文 1.2.2 节,改变 TiO_2 的加入量(0.0 ~ 2.5 g/L),结果如图 5 所示。

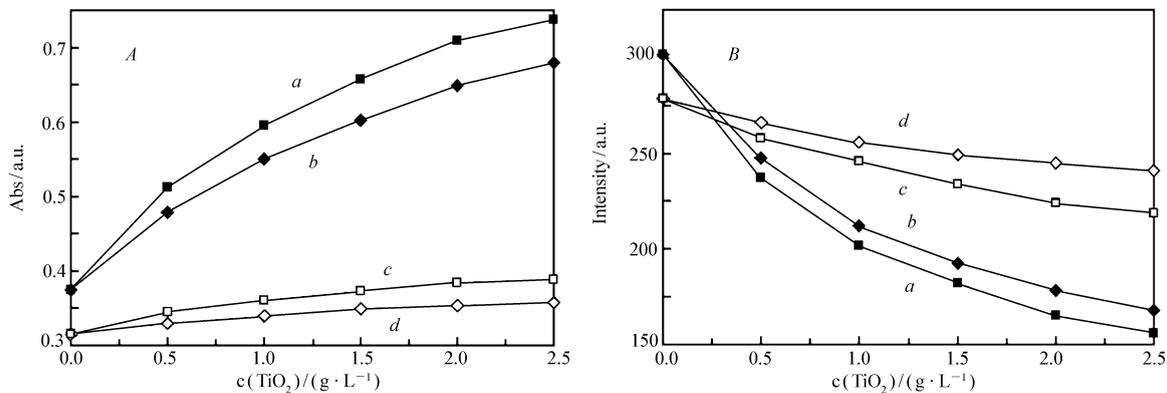


图 5 TiO_2 加入量对 BSA 溶液吸光度($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) (A) 和荧光强度($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) (B) 的影响

Fig. 5 Influences of TiO_2 dose on (A) absorbance($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$) and (B) intensity($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions

a. BSA + heat-treated TiO_2 + Light; b. BSA + TiO_2 + Light; c. BSA + heat-treated TiO_2 ; d. BSA + TiO_2

从图 5A 可见,在可见光照射下,随着 TiO_2 加入量的增加,BSA 溶液的吸光度逐渐增加,这说明 BSA 分子受损伤程度越来越严重,且处理 TiO_2 存在时对 BSA 分子的损伤程度较大。当没有光照时,BSA 溶液的吸光度略微增大,但增幅远远小于相应的光照情况。图 5B 的荧光强度变化也得到同样结果。没有光照时,BSA 溶液的荧光强度随着 TiO_2 加入量的增加而缓慢减小。而在可见光照射时,荧光强度猝灭强烈且处理后的 TiO_2 存在时使 BSA 分子荧光强度猝灭幅度大,因此进一步说明处理后的 TiO_2 和可见光照射联合作用对 BSA 的损伤作用更大。

2.5 功率对 BSA 损伤作用的影响

实验条件同本文 1.2.2 节,改变可见光照射功率为 72、144 和 216 W,结果如图 6 所示。

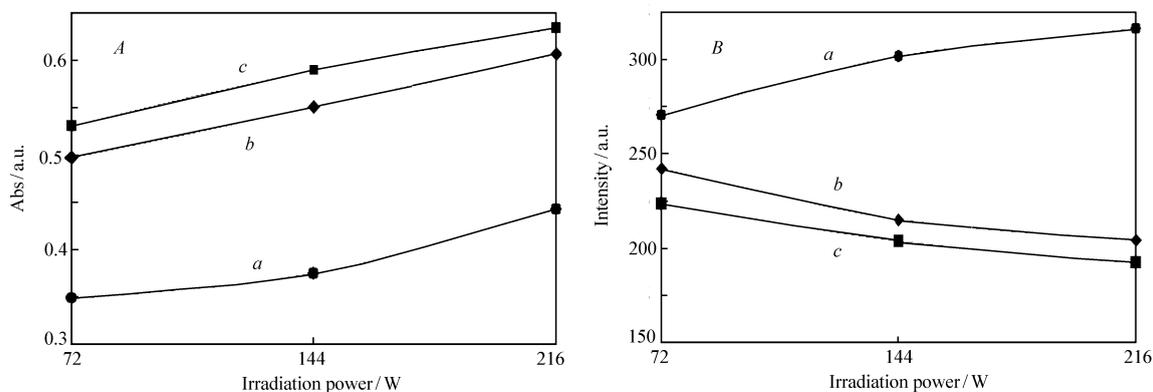


图 6 照射功率对 BSA 溶液吸光度 ($\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$) (A) 和荧光强度 ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) (B) 的影响

Fig. 6 Influences of irradiation power on (A) absorbance ($\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$) and (B) intensity ($\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) of BSA solutions
a. BSA; b. BSA + TiO₂; c. BSA + heat-treated TiO₂

图 6A 显示,单纯可见光照射时,照射功率的增加只能使 BSA 溶液的吸光度稍微增加。而随着可见光照射功率的增加,加入处理 TiO₂使 BSA 溶液吸光度增加更为明显。这说明提高照射功率能有效激活 TiO₂,促进 BSA 分子损伤。这也进一步说明 BSA 分子的损伤主要来自于可见光照射和 TiO₂的协同效应。从图 6B 看出,在相同实验条件下,单纯可见光照射时,照射功率的增加只能使 BSA 溶液产生一定的敏化现象,加入 TiO₂后产生明显猝灭现象。荧光强度猝灭大小顺序依次为:BSA + 处理 TiO₂ + 可见光 > BSA + TiO₂ + 可见光 > BSA + 可见光。

锐钛型 TiO₂经过高温热处理,在可见光作用下能够导致 BSA 分子损伤。且处理后 TiO₂的光催化效果好于处理前。UV-Vis 光谱表现为增色效应,荧光光谱表现为荧光猝灭。对于体系温度为 25 °C 和浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 BSA 溶液,BSA 分子的损伤程度随着可见光照射时间、TiO₂加入量和照射功率的增加而增大。同步荧光光谱证明了 BSA 分子中酪氨酸的损伤程度较大。

参 考 文 献

- 1 Essawy A A, Ali A H, Abdel M M. *J Hazard Mater*[J], 2008, **157**(2-3):54
- 2 Cozzolino M, Tesser R, Serio M D, Ledda M, Minutillo G, Santacesaria E. *Stud Sur Sci Catal*[J], 2006, **192**(162):299
- 3 Kryukova G N, Zenkovets G A, Shutilov A A, Wilde M, Gunther K, Fassler D, Richter K. *Appl Catal B: Environ*[J], 2007, **71**(3-4):169
- 4 Daneshvar N, Salari D, Khataee A R. *J Photochem Photobiol A: Chem*[J], 2004, **162**:317
- 5 LIU Ping(刘平), LIN Hua-Xiang(林华香), FU Xian-Zhi(付贤智), MENG Chun(孟春). *Chinese J Catal*(催化学报)[J], 1999, **20**(3):325
- 6 Daneshvar N, Salari D, Khataee A R. *J Photochem Photobiol A: Chem*[J], 2004, **162**:317
- 7 Suzuki T, Kamada S, Yoshida Y. *Heterocycles*[J], 1994, **38**(6):1209
- 8 Naoto N, Norio M. *Life Sci*[J], 2002, **72**(3):321
- 9 WANG Jun(王君), ZHAO Gang(赵刚), ZHANG Zhao-Hong(张朝红), ZHANG Xiang-Dong(张向东), ZHANG Guan(张冠), MA Teng(马腾), JIANG Yue-Feng(蒋岳峰), ZHANG Peng(张鹏). *Dyestuffs Coloration*(染料与染色)[J], 2006, **43**(5):46
- 10 Hidaka H, Hirikoshi S, Ajisaka K, Zhao J, Serpone N. *Photochem Photobiol A: Chem*[J], 1997, **108**:197
- 11 WANG Jun(王君), ZHAO Hong-Dan(赵红丹), ZHANG Zhao-Hong(张朝红). *Chinese J Inorg Chem*(无机化学学报)[J], 2007, **23**(3):439
- 12 ZHANG Hai(张海), GUO Qi-Yuan(郭琪远), LI Lin(李琳). *Spectrosc Spectr Anal*(光谱学与光谱分析)[J], 2001,

21(6):829

- 13 TANG Shi-Hua(唐世华), LI Jing-Quan(李景权), LEI Fu-Hou(雷福厚). *Acta Chim Sin*(化学学报)[J], 2009, 67(3):185

Damage of Bovine Serum Albumin Catalyzed by Heat-Treated Anatase Titanium Dioxide under Visible Light Irradiation

ZHANG Zhao-Hong^{a*}, HAN Wen-Ming^a, WANG Dong-Mei^b, XU Dan-Ping^a,

DENG Ying-Qiao^a, CHEN Zhong-Lin^a, GAO Wei^a

(^a*School of Environment, Liaoning University, Shenyang 110036;*

^b*Comprehensive Technology Department, Jinzhou Environmental Monitoring Centre, Jinzhou*)

Abstract In order to efficiently make use of visible light and enhance photocatalytic activity, the rutile crystal TiO₂ catalysts which could utilize visible light were obtained by heat-treated method. The damage of BSA under the visible light irradiation in the presence of heat-treated anatase TiO₂ was investigated by means of UV-Vis and fluorescence spectroscopies. The photocatalytic activity of the heat-treated TiO₂ was compared with that of the untreated one. In addition, the influences of irradiation time, TiO₂ addition dose and irradiation power on the damage of BSA molecule were studied. The results show that the damage of BSA under the visible light irradiation was achieved in the presence of heat-treated anatase TiO₂. The photocatalytic activity of heat-treated TiO₂ was also better than that of the untreated one. The obvious hyperchromic effect in UV-Vis spectra and the fluorescence quenching in fluorescence spectra were both observed, which resulted from the exposure of aromatic heterocycle residues of tryptophane and tyrosine. Moreover, the damage degree of tyrosine residues was greater than tryptophan residues, which was proved with synchronous fluorescence spectra. For a BSA solution of 1.0×10^{-5} mol/L at 25 °C, the damage of BSA was aggravated with the increase of the irradiation time, TiO₂ addition dose and the irradiation power. They are of significance to the study on the application of scavenger and inactivator for some virus.

Keywords visible light, heat-treat, titanium dioxide(TiO₂), damage, bovine serum albumin(BSA)