

基于氧化石墨烯的 AIE 荧光探针 对肝素的检测

杨亚伟, 马靖文, 张凤宝*, 李 阳*

(天津大学化工学院, 天津 300350)

摘要:合成了一种新的聚集诱导发光物质, 将其负载于氧化石墨烯上制备成新型荧光探针, 对肝素进行检测。通过改进的维蒂格反应(Wittig reaction)合成 3 种二苯乙烯类化合物, 分别为含有羟基、卤素基团(溴)烷基链和氨基正离子侧链的有机物, 并进行核磁表征, 结果表明, 经过提纯后均得到了纯净的产品。通过荧光发射光谱进行表征, 确定了这 3 种化合物的聚集诱导发光特性。将其中含有氨基正离子侧链的化合物负载于氧化石墨烯, 利用这种荧光探针, 对肝素进行检测。结果表明, 氧化石墨烯具有荧光淬灭作用, 与带有正电荷的聚集诱导发光物质通过静电作用复合, 使其表面修饰正电, 荧光淬灭。当加入肝素钠后, 由于肝素钠电负性更强, 使得两者脱离, 荧光显著增强, 从而可通过此方法对肝素进行检测。

关键词:肝素; 氧化石墨烯; 聚集诱导发光; 荧光检测

中图分类号: O652.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)12-0201-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.12.049

Graphene oxide based AIE fluorescence probe for detection of heparin

YANG Ya-wei, MA Jing-wen, ZHANG Feng-bao*, LI Yang*

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract: A new aggregation induced emission (AIE) material is synthesized and then is supported on graphene oxide to form a new type fluorescence probe that is used for the detection of heparin. Three kinds of 1,2-diphenylethene compounds are synthesized through the modified Wittig reaction, which include organics with hydroxyl group, halogen group (bromine) alkyl chain and amino cation side chain, respectively. They are measured by NMR spectrum. The results show that the pure products are obtained after purification. Through fluorescence emission spectrum characterization, these three compounds are confirmed to have the properties of AIE. The 1,2-diphenylethene compound with amino cation side chain is supported on graphene oxide to form a fluorescent probe that is used to detect heparin. The detection results show that graphene oxide has the ability to quench fluorescence. Graphene oxide can interact with the AIE substances with positive charge through electrostatic interactions, therefore the fluorescence is quenched. When heparin sodium that has stronger negative charges is added, the AIE substances escape from graphene oxide, which results in fluorescence enhancement. This method is efficient for the detection of heparin.

Key words: heparin; graphene oxide; aggregation induced emission; fluorescence detection

肝素是 1916 年 Jay Mclean 等从狗的肝脏组织中分离出的一种具有凝血作用的天然产物。肝素带有很强的负电荷, 具有复杂且广泛的生物学功能, 在手术或治疗中可以作为抗凝剂, 还可以增加脂蛋白酶的活性, 有效防治动脉粥样硬化。因此, 在医药学领域肝素具有不可替代的地位。

由于在临床应用中, 肝素的用量有明确规定^[1], 少量和过量均会造成不可逆转的后果^[2], 因此对药物和血液中的肝素进行准确的测定非常重要。传统的检测肝素的方法如分光光度法和毛细管

电泳法等均存在一定的缺陷, 灵敏度差, 耗时较长, 有一定毒性, 操作复杂^[3]。近几年来, 荧光分析法因为其简单高效的优点而广受欢迎, 但是传统的荧光材料多具有聚集诱导淬灭(ACQ)现象^[4], 给肝素的检测带来一定的局限性。2001 年, Tang 等^[5-6]报导了一种新的荧光现象——聚集诱导发光(AIE)现象, AIE 效应为新型发光材料的发展开辟了一条新的途径^[7-10]。然而在荧光检测中, 有可能出现强的背景信号^[11], 因而引入氧化石墨烯(GO), 利用氧化石墨烯的荧光淬灭作用消除背景干扰^[12]。笔者主

收稿日期: 2017-06-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 21506157); 高等学校学科创新引智计划(批准号: B06006)资助的课题

作者简介: 杨亚伟(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为荧光探针, yawei210@126.com; 张凤宝(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为纳米材料和二维材料, 通讯联系人, fbzhang@tju.edu.cn; 李阳(1985-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为二维材料, 通讯联系人, liyang1895@tju.edu.cn。

要是合成新型二苯乙烯类化合物,将其中带有氨基正离子侧链的化合物与氧化石墨烯进行复合,以此作为 AIE 荧光探针来对肝素进行检测,检测示意图如图 1 所示。

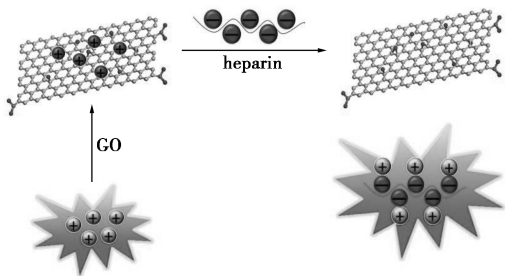


图 1 氧化石墨烯负载 AIE 化合物
荧光探针对肝素的检测示意图

1 实验

1.1 实验药品及实验仪器

4-溴苄基三苯基溴化磷、4-三甲基硅氧基苯甲醛、三甲胺、1,5-二溴戊烷、绝干的四氢呋喃(THF)和正丁基锂的正己烷溶液(2.5 mol/L),北京伊诺凯科技有限公司生产;乙酸乙酯、二氯甲烷和正己烷等有机溶剂,天津市元立化工有限公司生产;实验用水为去离子水。

核磁共振仪(NMR),AVANCE III 400 MHz 型,瑞士 Bruker 公司生产;紫外可见分光光度计(UV-Vis),UV-2802H 型,北京桑翌科技有限公司生产;荧光光度计(PL),F-2500 型,日本 Hitachi 公司生产;马尔文 Nano ZS 纳米粒度及 Zeta 电位仪。

1.2 实验过程

1.2.1 化合物 1 的制备

化合物 1 的制备过程如图 2 所示。将 5.12 g 4-溴苄基三苯基溴化磷、23 mL 四氢呋喃(THF)和 4.2 mL 正丁基锂(2.5 mol/L,32 mmol)在 N_2 保护下进行反应。之后将该溶液置于室温下升温,加入 1.94 g 4-三甲基硅氧基苯甲醛,搅拌过夜,加入 61 mL 冰水,终止反应。依次用乙酸乙酯和水萃取,通过旋转蒸发器去除溶剂,得到粗产品。利用硅胶柱层析,以乙酸乙酯作为洗脱剂,进行分离提纯,得到淡黄色粉末。最后,用乙醇进行重结晶,得到 E 型异构体。产率为 50%。 ^1H-NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm), 7.43 (3H), 7.18 (2H), 7.02 (2H), 6.76 (1H), 6.64 (2H)。 $^{13}C-NMR$ (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm), 158.0 (s, 1C), 137.4 (s, 1C), 131.9 (s, 2C), 130.0 (s, 2C), 128.5 (s, 2C), 124.3

(s, 2C), 120.1 (s, 1C), 116.1 (s, 2C)。

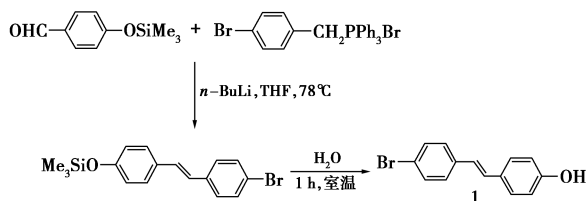


图 2 化合物 1 的合成

1.2.2 化合物 2 的制备

化合物 2 的制备过程如图 3 所示。将 413 mg 产物 1 (1.5 mmol)、20 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、3.44 g 1,5-二溴戊烷(15 mmol)和 1.38 g K_2CO_3 (10 mmol)混合,室温下搅拌 72 h,然后加入 80 mL 去离子水,用二氯甲烷和水依次萃取。通过旋蒸除去溶剂,得到粗产品。利用硅胶柱层析,以乙酸乙酯和正己烷为洗脱剂,对上述粗产品进行分离提纯,得到白色固体,产率为 79%。 ^1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm), 7.47~7.04 (8H), 6.89 (2H), 4.02 (2H), 3.47 (2H), 1.97 (2H), 1.83 (2H), 1.66 (2H)。 $^{13}C-NMR$ (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm), 158.9 (s, 1C), 137.7 (s, 1C), 131.7 (s, 2C), 130.1 (s, 2C), 127.8 (s, 2C), 125.3 (s, 2C), 120.8 (s, 1C), 114.7 (s, 2C)。

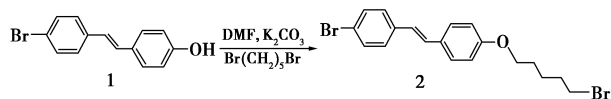


图 3 化合物 2 的合成

1.2.3 化合物 3 的制备

化合物 3 的制备过程如图 4 所示。称取 0.426 g 产物 2 (1.0 mmol)、10 mL 绝干四氢呋喃(THF)和 1.0 mL 三甲胺(33% in ethanol)混合并进行反应,在室温下搅拌过夜,之后通过旋蒸除去溶剂,得到粗产品。最后,将产物通过液相色谱分离提纯,得到纯净的白色产物,产率为 31%。 ^1H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm), 6.48~6.82 (8H), 6.59~6.49 (2H), 4.02~3.17 (9H), 1.91~1.31 (10H)。

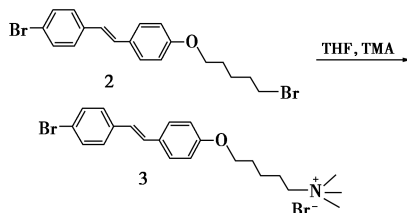


图 4 化合物 3 的合成

1.2.4 反应机理

合成上述3种二苯乙烯类化合物的基础是维蒂希反应^[13],这是1954年由维蒂希(Wittig)发明的由醛、酮合成烯的新方法,其机理如图5所示。利用Wittig反应合成羟基化的二苯乙烯类化合物,需要引入保护基团。很多研究学者用叔丁基二甲氯硅烷作保护基团^[14],形成的中间产物在质子溶剂中很稳定。然而,副产物不易分离,此外,用 $[n-Bu_4N^+, F^-]$ 对酚醛基团去保护,效果也不令人满意^[25]。2012年, Malik Chalal 等^[16]用4-羟基苯甲醛和官能化的苄基溴,引入4-羟基苯甲醛以保护酚醛基团。两者的加入提高了反应的灵敏度,反应在严格的无水和惰性气体环境下进行,这种改进取得了良好的效果。

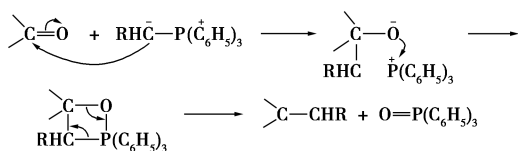


图5 Wittig反应的反应机理示意图

2 结果与讨论

2.1 氧化石墨烯的制备与表征

利用改进的Hummers法制备氧化石墨烯,通过SEM对制备得到的氧化石墨烯的形貌进行表征,结果如图6所示。

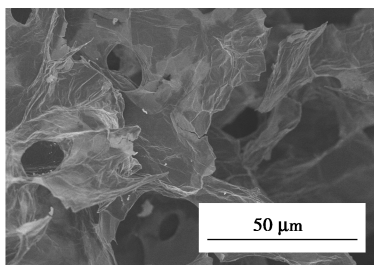
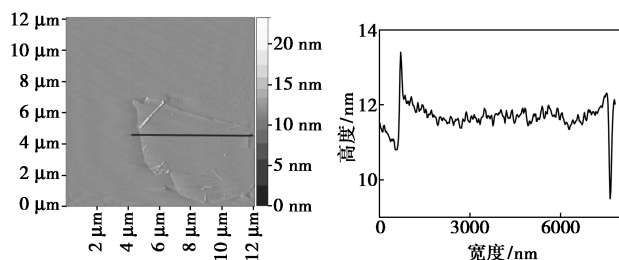


图6 氧化石墨烯的扫描电镜图像

由图6可以看出,氧化石墨烯层片呈褶皱状堆叠。此外,还用AFM对氧化石墨烯进行观察,图像以及对应的剖面线分析结果如图7所示。由图7也可看出,氧化石墨烯呈片层结构,厚度约为8 nm。综上所述,制备得到的氧化石墨烯尺寸大小适宜,形貌均匀。

2.2 3种二苯乙烯类化合物的荧光发射光谱分析

实验过程中发现,3种化合物在聚集态时均能观察到荧光现象,而在良溶剂中,荧光微弱或者几乎没有。为了进一步研究其荧光性能,将3种有机物



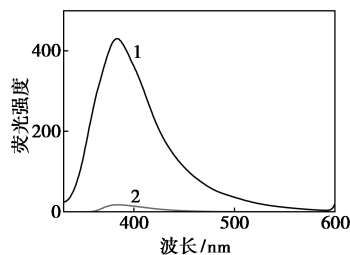
(a) 氧化石墨烯的AFM图像

(b) 剖面线分析图

图7 氧化石墨烯的AFM图像及其对应的剖面线分析图

配制成合适浓度的溶液进行荧光测定。测试条件均为:激发波长为310 nm,扫描范围是330~600 nm。

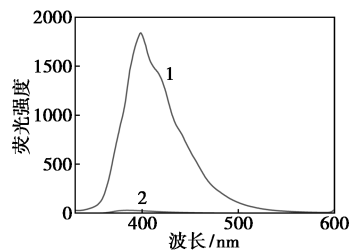
化合物1的荧光发射光谱如图8所示。由图8可以看出,化合物1在乙酸乙酯中溶解性很好,而在水中溶解度较低。图8中曲线1为化合物1在水中分散均匀后的荧光发射光谱数据,荧光发射峰位置在390 nm处;曲线2为等量化合物1溶解在乙酸乙酯中所测得的荧光数据,化合物2在乙酸乙酯溶液中的荧光强度微弱。



1—H₂O;2—乙酸乙酯

图8 化合物1的荧光发射光谱

化合物2的荧光发射光谱如图9所示。化合物2在二氯甲烷中溶解性很好,而在水中溶解度较低。化合物2分散在水中,具有较强的荧光响应,荧光发射峰位置在400 nm处;而当等量的化合物2分散在二氯甲烷中时,荧光强度明显减弱。由此可得出如下结论:化合物2在良性溶剂中荧光微弱,当在不良溶剂中时荧光强度明显提高,具有AIE效应。

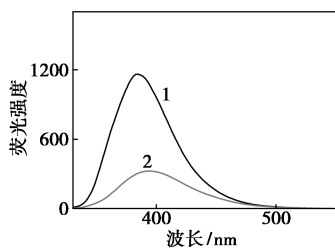


1—H₂O;2—CH₂Cl₂

图9 化合物2的荧光发射光谱

化合物3带有1条含氨基正离子的侧链,官能

团的不同使其具有与前 2 种化合物不同的性质。其分散性较差,在二甲基亚砜和甲醇中溶解性稍好,在水中几乎不溶。配制相同浓度的化合物 3 的甲醇溶液和水溶液,其荧光发射光谱数据如图 10 所示。化合物 3 在水中的荧光发射峰位置在 390 nm 处,而化合物 3 在甲醇中时,荧光发射峰位置从原来的 390 nm 移动到 395 nm,荧光强度较低。原因是化合物 3 在甲醇中依然有极少部分未溶解,处于聚集状态,从而产生较弱的荧光。上述结果同样证明化合物 3 具有 AIE 性能。

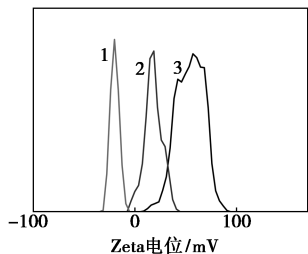


1—H₂O;2—CH₃OH₂

图 10 化合物 3 的荧光发射光谱

2.3 化合物 3 和氧化石墨烯的复合

化合物 3、氧化石墨烯和两者复合的 Zeta 电位如图 11 所示。GO 表面由于羧基、羟基和环氧基等含氧官能团存在而带负电荷,其 Zeta 电位表征如图 11 中曲线 1 所示,为 -20.1 mV。化合物 3 由于侧链带有氨基正离子而显正电,Zeta 电位为 51.2 mV(如图 11 中曲线 3 所示)。将化合物 3 加入到氧化石墨烯溶液中,所测 Zeta 电位明显升高,由负值变为正值 18.3 mV,如图 11 中曲线 2 所示。上述结果说明,化合物 3 和 GO 通过静电作用复合,使 GO 表面修饰大量正电荷,从而使混合溶液的电位由负值变为正值。

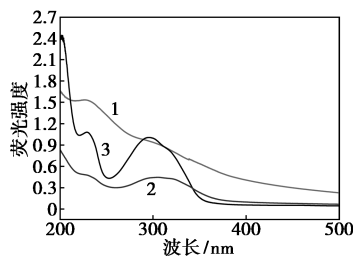


1—GO;2—GO-化合物 3;3—化合物 3

图 11 化合物 3、氧化石墨烯和两者复合的 Zeta 电位

在波长 200~500 nm 范围内,化合物 3 和 GO 负载前后的紫外可见光谱的对比如图 12 所示。化合物 3 在紫外可见光谱图中有 2 个特征吸收峰,GO 在

低波长区域出现 1 个峰,这与 GO 表面的共轭结构有关,同文献[17]中的报道一致。两者复合结果如图 12 中曲线 2 所示,由峰位置的差异可看出,GO 和化合物 3 之间形成了复杂的相互作用,基于氧化石墨烯的 AIE 荧光探针制备成功。



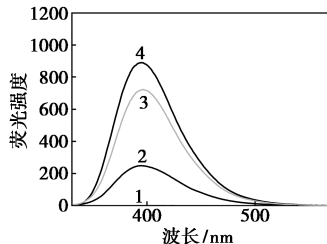
1—GO;2—GO-化合物 3;3—化合物 3

图 12 化合物 3、氧化石墨烯和两者复合的紫外可见吸收光谱

2.4 荧光探针对于肝素钠的检测

首先用荧光发射光谱对 GO 进行荧光表征,测定 GO 水溶液(100 mg/L)的荧光,测试时激发波长为 310 nm,记录 330~600 nm 范围内的荧光强度数据,结果如图 13 中曲线 1 所示,GO 几乎没有荧光产生,相比检测过程中其他物质的荧光强度,GO 的荧光干扰可以忽略不计。因此,后续实验将 GO 作为基底材料时,不会对检测过程中的荧光现象产生干扰。

通过荧光发射光谱记录对肝素钠的检测过程,结果如图 13 所示。图 13 中曲线 4 为化合物 3 在 pH=7.4 的 PBS 中的荧光数据,其荧光发射峰位置在 390 nm 处,而当化合物 3 和 GO 复合后,荧光强度明显降低(图 13 中曲线 2 所示),峰位置未发生偏移。然后,向其中加入适量肝素钠溶液进行检测,发现混合溶液的荧光强度显著增强(图 13 中曲线 3 所示),这是由于肝素钠具有强电负性,加入后会对 AIE 物质有更强的吸引作用,使其与 GO 分离,而脱离后的 AIE 化合物与肝素钠结合,在溶液中发生聚集,使荧光恢复。值得注意的是,加入肝素钠后的荧



1—GO;2—GO-化合物 3;3—GO-化合物 3+hep;4—化合物 3

图 13 对肝素钠检测的荧光发射光谱

光强度未恢复到初始数值,说明仍有一部分 AIE 物质被吸附在 GO 表面,因此相比最初的荧光强度较弱。

3 结论

通过参考改进的维蒂希反应,首次合成了一种带有氨基正离子侧链的新的二苯乙烯类化合物,具有 AIE 效应,聚集状态下发出紫色荧光。通过静电作用将其负载于 GO,制备出基于氧化石墨烯的 AIE 荧光探针检测肝素,GO 的荧光淬灭作用消除了检测过程中的部分背景干扰,从而可以较为准确的对肝素进行测定。

近年来,对石墨烯材料的研究日益深入且应用日益广泛,而氧化石墨烯在荧光方面的特殊性使其被越来越多的应用到医学、生物等领域的分析检测中。AIE 现象的发现弥补了传统荧光材料在检测过程中产生的很多弊端,为荧光检测提供了新思路。二者结合可丰富荧光材料的种类,并将进一步提升荧光检测手段的性能,预期具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Guerrini Marco, Beccati Dainella, Shriver Zachary, *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate is a major contaminant in Heparin associated with adverse clinical events[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(6):669.
- [2] Choay J, Lormeau J C, Petitou M, *et al.* Structural studies on a biologically active hexasaccharide obtained from heparin[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1981, 370(1):644-649.
- [3] Bigler P, Brenneisen R. Improved impurity fingerprinting of heparin by high resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2009, 49(4):1060-1064.
- [4] Zhang X, Zhang X, Tao L, *et al.* Aggregation induced emission-based fluorescent nanoparticles; Fabrication methodologies and biomedical applications[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(28):4398-4414.
- [5] Luo J D, Xie Z L, Lam J W Y, *et al.* Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole[J]. *Chemical Communications*, 2001, 1(8):1740-1741.
- [6] Tang B Z, Zhan X W, Yu G, *et al.* Efficient blue emission from siloles[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2001, 11(12):2974-2978.
- [7] Wang Hong, Zhao Engui, Lam Jacky W Y, *et al.* AIE luminogens: Emission brightened by aggregation[J]. *Materials Today*, 2015, 18(7):365-377.
- [8] Liu Hualong, Song Panshu, Wei Ruirui, *et al.* A facile, sensitive and selective fluorescent probe for heparin based on aggregation-induced emission[J]. *Talanta*, 2014, 118:348-352.
- [9] Zhang X, Kong R, Tan Q, *et al.* A Label-free fluorescence turn-on assay for glutathione detection by using MnO_2 , nanosheets-assisted aggregation-induced emission-silica nanospheres[J]. *Talanta*, 2017, 169(1):1-7.
- [10] Chao D, Zhang Y. A water-soluble cationic Ir(III) complex for turn-on sensing of ClO_4^- , based on aggregation-induced emission[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2017, 245:599-604.
- [11] Kwok Ryan T K, Geng Junlong, Lam Jacky W Y, *et al.* Water-soluble bioprobes with aggregation-induced emission characteristics for light-up sensing of heparin[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(2):4134-4141.
- [12] Liang J, Chen Z, Yin J, *et al.* Aggregation-induced emission (AIE) behavior and thermochromic luminescence properties of a new gold (I) complex[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(34):3567-3569.
- [13] Moreno-Manas M, Pleixats R. Dehydroacetic acid chemistry-a new synthesis of resveratrol, a phytoalexin of vitis-vinifera[J]. *Anales de Quimica Serie C-Quimica Organica Y Bioquimica*, 1985, 81(2):157-161.
- [14] Ponzone C, Beneventi E, Cramarossa M R, *et al.* Laccase-catalyzed dimerization of hydroxystilbenes[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, 349(8-9):1497-1506.
- [15] Kendall P M, Johnson J V, Cook C E. Synthetic route to an aromatic analog of strigol[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1979, 44(9):1421-1424.
- [16] Chalal M, Vervandier-Fasseur D, Meunier P, *et al.* Syntheses of polyfunctionalized resveratrol derivatives using Wittig and Heck protocols[J]. *Tetrahedron*, 2012, 43(41):3899-3907.
- [17] Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, *et al.* The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev* [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 39(1):228-240. ■