论文

荧光碳点与小檗碱类药物的作用及盐酸药根碱的选择性测定

刘慧, 黄承志*

发光与实时分析化学教育部重点实验室; 西南大学药学院, 重庆 400715

*通讯作者, E-mail: chengzhi@swu.edu.cn

收稿日期: 2015-09-30; 接受日期: 2015-12-03; 网络版发表日期: 2016-01-20

国家自然科学基金(编号: 21535006)、西南大学科研基金(编号: SWU209010)和中央高校基本科研业务费专项资金(编号: SWU114020)资助项目

摘要 荧光碳点因具有良好的生物相容性和抗光漂白等性质而广受关注. 本文报道以血晶素为碳源、在氢氧化钠溶液中水热合成新的碳点, 并且对其与小檗碱类生物碱的作用进行了深入探讨. 研究发现, 该方法制备的荧光碳点粒径分布于 2~5 nm 之间, 具有激发光波长依赖的荧光, 且该荧光可被小檗碱类生物碱猝灭. 进一步研究其作用机理得知, 碳点荧光猝灭源于小檗碱类化合物的吸收作用. 其中药根碱猝灭碳点荧光同时可使发射峰红移, 且其红移程度与药根碱浓度对数值在 2.30~4.14 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 检测限为 1.06 $\mu\text{mol/L}$.

关键词 碳点, 药根碱, 荧光峰红移

1 引言

荧光碳点(CDs)作为一种新型碳纳米材料, 具有良好的抗漂白性能、荧光性质和生物相容性, 近年来深受关注^[1,2]. 被广泛应用于生物成像^[3,4]、生物传感^[5,6]、光催化^[7,8]与能量转换^[9]领域, 有望成为最有前景的新生代发光纳米探针.

由于碳点与有机荧光小分子(OFM)和荧光量子点(QDs)的发光机制有显著不同, 并且其激发和发射多集中于紫外区, 因而目前碳点的一个研究热点就是通过不同的合成途径, 如利用水热法^[10-12]、超声法^[3,13]、微波辅助法^[14-16]、电化学合成法^[17,18]、激光消融法^[19,20]、电弧法^[21]等来制备具有不同性质的碳

点, 借以表征其表面结构、组成、形貌等来探讨碳点的发光机制, 然后在此基础上进一步使其化学或生物功能化, 并期待着制备出具有长波长激发和发射的发光碳点. 其次, 通过测定碳点与金属离子或配体发生相互作用时展现出来的光学性质如荧光猝灭、时间分辨荧光^[22]、动态光散射^[23]等特性也是一个研究碳点发光机制的有效手段. 此外, 碳点与不同配体作用或在不同介质中展现出的聚集荧光增强^[24]对碳点表面官能团的行为探讨不仅有利于其发光机制的理解, 而且为其分析应用奠定了基础.

通常情况下, 碳点表面有羧基、羟基等官能团^[22]. 如果碳点得到了氮和硫^[4,25]或锆^[22]等元素掺杂, 碳点可表现出更特殊的发光性质. 例如, 使用天然碳源如

引用格式: 刘慧, 黄承志. 荧光碳点与小檗碱类药物的作用及盐酸药根碱的选择性测定. 中国科学: 化学, 2016, 46: 810-815
Liu H, Huang CZ. Interaction of fluorescence carbon dots with berberines hydrochloride and the selective determination of jatrorrhizine hydrochloride. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 810-815, doi: 10.1360/N032015-00200

蚕丝、柑橘等制备的碳点与金属离子发生作用时, 选择性地被铁、铜等猝灭^[4,25], 但锆元素掺杂的碳点, 荧光则被汞猝灭^[22]. 基于这些猝灭特性, 目前已经建立了如 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Cr^{3+} ^[26]、 Fe^{2+} ^[27]、 Hg^{2+} ^[22]、 Cu^{2+} ^[28] 和自由氯检测^[29]等一系列分析检测方法. 此外, 有人还提出了 On-Off-On 策略, 构建了 PO_4^{3-} ^[23]、 F^- ^[30]、生物素^[31]、谷胱甘肽^[16]和 DNA^[32]等无机阴离子和生物大分子的分析测定方法. 另外, 通过在碳点表面偶联上有不同发射波长荧光物质后, 可利用荧光比率法有效地测定 Cu^{2+} ^[33]、 Hg^{2+} ^[34]、 pH ^[35]等. 通过文献分析, 发现荧光碳点用于分析检测领域应用广泛, 主要集中在金属离子, 同时涉及阴离子和大分子.

本文以血晶素(Hemin, 图 1)为碳源合成了新型荧光碳点, 并将其用于小分子药物的分析研究. 作为动物血液中的天然色素, 血晶素由原卟啉与铁(II)络合形成, 带有 2 个羧基和活泼双键, 通过控制反应温度使羧基得到保留, 从而有利于碳点的表面功能化. 结果发现, 小檗碱类药物可以显著猝灭该新型碳点荧光, 并对其发光性质具有一定的影响. 小檗碱类(Berberines)是重要的异奎宁生物碱类, 种类多, 分布广, 具有广泛的药理活性. 药根碱(Jatrorrhizine, Jat)是一种典型的小檗碱类药物, 有抑菌^[36]、降血糖^[37]、对抗心律失常^[38]及逆转肿瘤细胞多药耐药性^[39]等功效. 针对该类物质, 目前主要通过色谱分析进行测定分析, 如非水毛细管电泳^[40]、液相色谱^[41,42]等. 我们

在研究新合成的碳点与小檗碱类药物作用的基础上, 利用药根碱猝灭碳点荧光并致发射峰红移的现象建立了选择性检测药根碱的方法, 为中药有效成分的分析提供了一个新的思路.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

聚四氟乙烯不锈钢反应釜, DHG-9146 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司, 中国)用于制备碳点. 利用 Hitachi U-3010 紫外-可见分光光度计(日立公司, 日本)和 F-2500 荧光分光光度计(日立公司, 日本)分别测定吸收光谱和各溶液荧光光谱; QL-901 型漩涡混匀器(海门市其林贝尔器材制造有限公司, 中国)用于反应溶液的混匀.

血晶素(Hemin)购于 Sigma 试剂公司(美国); 所用小檗碱类生物碱包括药根碱(Jatrorrhizine, Jat)、小檗碱(Berberine, Ber)、巴马汀(Palmatine, Pal)、表小檗碱(Epipiberine, Epiber)、黄连碱(Coptisine, Cop)盐酸盐均购自中国药品生物制品检定所.

磷酸、盐酸(37%)、冰醋酸、硼酸、氢氧化钠(99%)均购于重庆川东化学试剂厂(中国). 使用 Britton-Robinson 缓冲溶液调节溶液酸度. 所制备的碳点储备液存于 4℃ 冰箱中; 实验所用溶液均由 18.2 MΩ cm 超纯水配制.

2.2 碳点的制备

称取 10 mg 血晶素与 0.1 g 氢氧化钠于 20 mL 小烧杯, 加入 10 mL 二次水溶解后转移到 20 mL 聚四氟乙烯反应釜内衬中. 装好钢套, 于鼓风干燥箱中逐渐加热到 250℃, 恒温反应 4 h 后自然冷却至室温. 然后吸出溶液并用少量水洗涤反应釜, 总体积约为 10 mL, 离心除去大颗粒的残渣, 上层清液用 MWCO 3500 透析袋(Viskase, 美国)于二次水中透析 6 h 除去氢氧化钠, 期间频繁换水; 最后用 0.22 μm 的滤膜过滤得到碳点溶液, 浓度为 0.1 mg/mL (以冻干后称重计), 备用.

2.3 溶液的配制

在 1.5 mL EP 管中, 依次加入 Britton-Robinson 缓冲溶液、CDs 溶液各 50 μL、一定量药根碱或其他小檗碱类生物碱溶液, 再补水至 500 μL, 充分振摇,

图 1 血晶素及盐酸小檗碱类药物的分子结构

在室温下放置 5 min 后在 F-2500 荧光分光光度计上测量荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 CDs 的性质及其与小檗碱类药物的作用

上述水热法所得碳点为类球形纳米颗粒, 粒径大小为 2~5 nm (图 2(a)), 在水中有很好的分散性, 并且溶液十分稳定。其紫外可见吸收光谱表明, 该碳点在紫外到可见区有一个宽的吸收区域, 但没有特征吸收峰, 在紫外到可见光激发下展现出激发波长依赖的荧光特性(excitation dependent emission, EDE), 即随着激发波长的变化产生不同发射波长和量子产率的荧光, 且激发波长红移可造成荧光发射波长不断红移。290 nm 激发光激发时, 390 nm 可得强发射光 (图 2(b))。X 射线光电子能谱表征, 碳点中不含血晶素分子中的 N 和 Fe 元素, 这是由于在碳点形成过程中, N 被氧化, Fe 发生水解, 于是均未能掺杂在碳点中。结合红外和拉曼光谱得知, 所得碳点表面含有丰富

的羟基和羧基, 这些基团赋予碳点良好的水溶性和荧光性能。

3.2 CDs 与小檗碱类药物的作用

研究发现, 所得碳点溶液中加入盐酸小檗碱类药物会产生不同的光学现象。如图 3(a)所示, 药根碱(Jat)、盐酸小檗碱(Ber)、盐酸巴马汀(Pal)、盐酸表小檗碱(Epiber)和盐酸黄连碱(Cop) 5 种小檗碱类生物碱与荧光碳点的作用都导致 CDs 的荧光猝灭。其中, 小檗碱和巴马汀使 CDs 的荧光猝灭但不会造成碳点荧光峰明显红移; 黄连碱和表小檗碱会造成 CDs 荧光微弱红移; 而药根碱可使 CDs 的发射产生明显的红移(图 3(b))。

进一步研究表明, 5 种生物碱都在紫外区有强吸收, 与碳点在紫外-可见区的荧光发射严重重叠(图 4)。更重要的是, 由于药根碱(Jat)、盐酸表小檗碱(Epiber)和盐酸黄连碱(Cop)的吸收峰相对处于更长波长处, 可吸收碳点产生的荧光发射(350~500 nm), 进而导致发射光谱畸变, 碳点荧光红移, 其中药根碱表现尤为突出。所以在碳点与小檗碱类药物的作用过程中, 由

图 2 碳点的形貌及光学性质。(a) 碳点的透射电子显微镜(TEM)成像(插图为粒径分布); (b) 碳点水溶液的紫外可见吸收(ABS)、荧光激发(Em, 390 nm)与发射光谱(Ex, 290 nm)

图 3 各小檗碱类药物与碳点作用的荧光性质。(a) 荧光发射光谱; (b) 各生物碱致碳点发射红移值。pH 10; Ex, 290 nm; 各小檗碱类浓度: Jat 345 $\mu\text{mol/L}$, Ber 363 $\mu\text{mol/L}$, Pal 354 $\mu\text{mol/L}$, Cop 330 $\mu\text{mol/L}$, Epiber 297 $\mu\text{mol/L}$ (网络版彩图)

图4 (a) 小檗碱吸收; (b) CDs 荧光发射(Ex, 290nm). pH 10 BR 缓冲液; 各 Bers 的浓度: Ber 242 $\mu\text{mol/L}$, Pal 236 $\mu\text{mol/L}$, Jat 230 $\mu\text{mol/L}$, Cop 220 $\mu\text{mol/L}$, Epiber 198 $\mu\text{mol/L}$ (网络版彩图)

于小檗碱类分子吸收作用, 导致碳点的发射波长发生猝灭和红移, 并且猝灭和红移与小檗碱分子的特征吸收和吸收强度有关。

3.3 药根碱与 CDs 作用的特异性

为了进一步证明碳点的荧光猝灭与药根碱的分子吸收有关, 我们对药根碱浓度和溶液酸度的影响进行了探讨. 如图 5 所示, 碳点荧光猝灭随着药根碱浓度的增大而增强, 碳点的最大发射波长也随之红移(图 5(a)), 并且红移程度与溶液的酸度有关(图 5(b)).

在弱酸性到碱性条件下, 药根碱导致碳点波长的红移程度($\Delta\lambda_{\text{em}} = \lambda - \lambda_0$, 其中 λ_0 为碳点的特征发射波长, λ 为加入药根碱后的发射峰波长)随着酸度降低、pH 增加而增加; 当 pH 到达 10 以后, 药根碱造成的红移程度达到最大值且几乎不再随溶液酸度变化而变化. 酸度变化引起的波长红移应该与药根碱分子结构中存在羟基有关. 由于药根碱的分子结构中有一个酚羟基(图 1), 在碱性条件下发生解离, 形成氧负离子结构, 吸收往长波方向移动(图 6), 与碳点荧光发射的重叠部分发生变化, 吸收碳点荧光发射区

图5 (a) 不同浓度药根碱与荧光碳点作用的荧光发射光谱; (b) pH 对药根碱致碳点红移的影响($c_{\text{Jat}} = 345 \mu\text{mol/L}$). pH 10 BR 缓冲溶液; Ex, 290 nm

图6 药根碱($c_{\text{Jat}} = 230 \mu\text{mol/L}$)在不同 pH 介质中的吸收与碳点荧光发射(Ex, 290nm)叠加. BR 缓冲溶液(网络版彩图)

域变化而造成发射峰红移程度增加. 随着溶液介质碱性增大, 羟基解离程度增加, 当溶液介质的 pH 达到 10 时, 解离基本完全, 此时红移程度达到最大. 而其余 4 种生物碱对碳点荧光峰位的影响则基本与溶液的 pH 无关(图 7), 说明药根碱中羟基的解离起着至关重要的作用。

3.4 药根碱的分析测定

由于在 pH 10 或碱性更强的环境中, 药根碱可以

图7 在 pH 7、10、12 缓冲条件下小檗碱类药物与碳点作用的发射波长. 实验条件: BR 缓冲液; 各小檗碱类浓度: Jat 345 $\mu\text{mol/L}$, Ber 363 $\mu\text{mol/L}$, Pal 354 $\mu\text{mol/L}$, Cop 330 $\mu\text{mol/L}$, Epiber 297 $\mu\text{mol/L}$

导致碳点的荧光产生明显红移, 且红移程度与药根碱浓度直接相关, 而其他 4 种生物碱红移程度低或根本不发生红移, 据此可以建立药根碱的高选择性分析方法. 如图 8 所示, 向 CDs 溶液中加入不同浓度的 Jat 并测量它们的发射峰峰位, 从而构建荧光峰位移值对 Jat 浓度的标准曲线. 结果表明, 药根碱浓度在 2.30~414 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 发射峰位移值($\Delta\lambda_{\text{em}}$)与药根碱的浓度对数值呈良好的线性关系, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 17.3\log c - 6.64$ ($\mu\text{mol/L}$), $r=0.995$ ($n=10$), 检出限为 1.06 $\mu\text{mol/L}$.

图8 碳点荧光峰红移程度($\Delta\lambda_{\text{em}}$)与药根碱浓度对数的线性关系. 插图为归一化的光谱图, 从左至右浓度为: 0、2.30、4.6、11.5、23.0、46.0、115、184、230、345 和 414 $\mu\text{mol/L}$. pH 10 BR 缓冲溶液; Ex, 290 nm (网络版彩图)

4 结论

以血晶素为碳源经过水热合成制备得到荧光碳点, 因其发射光谱与小檗碱类药物的吸收光谱重叠, 以至于吸收碳点荧光致荧光猝灭. 由于药根碱分子上带有一个酚羟基易于在碱性条件下发生离解, 其吸收光谱随着介质碱性增强而发生红移, 红移后的吸收光谱不仅猝灭碳点荧光, 还导致发射光谱畸变发射峰红移, 据此建立起高选择性检测药根碱的分析方法.

参考文献

- 1 Yao J, Yang M, Duan YX. *Chem Rev*, 2014, 114: 6130–6178
- 2 Hola K, Zhang Y, Wang Y, Giannelis EP, Zboril R, Rogach AL. *Nano Today*, 2014, 9: 590–603
- 3 刘慧, 杨晓溪, 郑佳佳, 李原芳, 黄承志. 中国科学: 化学, 2013, 43: 895–900
- 4 Wu ZL, Zhang P, Gao MX, Liu CF, Wang W, Leng F, Huang CZ. *J Mater Chem B*, 2013, 1: 2868–2873
- 5 Zhang LL, Han YJ, Zhu JB, Zhai YL, Dong SJ. *Anal Chem*, 2015, 87: 2033–2036
- 6 Wei WL, Xu C, Ren JS, Xu BL, Qu XG. *Chem Commun*, 2012, 48: 1284–1286
- 7 Shi WB, Wang QL, Long YJ, Cheng ZL, Chen SH, Zheng HZ, Huang YM. *Chem Commun*, 2011, 47: 6695–6697
- 8 Wang DM, Gao MX, Gao PF, Yang H, Huang CZ. *J Phys Chem C*, 2013, 37: 19219–19225
- 9 吴竹莲, 黄承志. 中国科学: 化学, 2015, 45: 211–216
- 10 Hsu PC, Chang HT. *Chem Commun*, 2012, 48: 3984–3986
- 11 Zhu X, Zuo X, Hu R, Xiao X, Liang Y, Nan J. *Mater Chem Phys*, 2014, 147: 963–967
- 12 Hu LM, Sun Y, Li SL, Wang XL, Hu KL, Wang LR, Liang XJ, Wu Y. *Carbon*, 2014, 67: 508–513
- 13 Li HT, He XD, Liu Y, Huang H, Lian SY, Lee ST, Kang ZH. *Carbon*, 2011, 49: 605–609
- 14 Peng H, Travas-Sejdic J. *Chem Mater*, 2009, 21: 5563–5565
- 15 Zhu H, Wang XL, Li YL, Wang ZJ, Yang F, Yang XR. *Chem Commun*, 2009, 45: 5118–5120
- 16 Wang Q, Liu X, Zhang LC, Lv Y. *Analyst*, 2012, 137: 5392–5397
- 17 Zhao QL, Zhang ZL, Huang BH, Peng J, Zhang M, Pang DW. *Chem Commun*, 2008, 44: 5116–5118

- 18 Lu J, Yang JX, Wang JZ, Lim AL, Wang S, Loh KP. *ACS Nano*, 2009, 3: 2367–2375
- 19 Sun YP, Zhou B, Lin Y, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen BL, Veca LM, Xie SY. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7756–7757
- 20 Hu SL, Niu KY, Sun J, Yang J, Zhao NQ, Du XW. *J Mater Chem*, 2009, 19: 484–488
- 21 Xu XY, Ray R, Gu YL, Ploehn HJ, Gearheart L, Raker K, Scrivens WA. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 12736–12737
- 22 Yuan YH, Li R, Wang Q, Wu ZL, Wang J, Liu H, Huang CZ. *Nanoscale*, 2015, 7: 16841–16847
- 23 Zhao HX, Liu LQ, Liu ZD, Wang Y, Zhao XJ, Huang CZ. *Chem Commun*, 2011, 47: 2604–2606
- 24 Gao MX, Liu CF, Wu ZL, Zeng QL, Yang XX, Wu WB, Li YF, Huang CZ. *Chem Commun*, 2013, 49: 8015–8017
- 25 Wu ZL, Gao MX, Wang TT, Wan XY, Zheng LL, Huang CZ. *Nanoscale*, 2014, 6: 3868–3874
- 26 Liu LQ, Li YF, Zhan L, Liu Y, Huang CZ. *Sci China Chem*, 2011, 54: 1342–1347
- 27 Sun W, Du YX, Wang YQ. *J Lumin*, 2010, 130: 1463–1469
- 28 Liu JM, Lin LP, Wang XX, Lin SQ, Cai WL, Zhang LH, Zheng ZY. *Analyst*, 2012, 137: 2637–2642
- 29 Dong YQ, Li GL, Zhou NN, Wang RX, Chi YW, Chen GN. *Anal Chem*, 2012, 84: 8378–8382
- 30 郑佳佳, 李春梅, 刘忠德, 李原芳, 黄承志. 科学通报, 2011, 56: 2952–2958
- 31 Zhou L, Lin YH, Huang ZZ, Ren JS, Qu XG. *Chem Commun*, 2012, 48: 1147–1149
- 32 Bai WJ, Zheng HZ, Long YJ, Mao XJ, Gao M, Zhang LY. *Anal Sci*, 2011, 27: 243–246
- 33 Zhu AW, Qu Q, Shao XL, Kong B, Tian Y. *Angew Chem*, 2012, 124: 7291–7301
- 34 Cao BM, Yuan C, Liu BH, Jiang CL, Guan GJ, Han MY. *Anal Chim Acta*, 2013, 786: 146–152
- 35 Shi W, Li XH, Ma HM. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 6432–6435
- 36 杨勇, 叶小利, 李学刚. 时珍国医国药, 2007, 18: 3013–3015
- 37 付燕, 胡本容, 汤强, 付琴, 张庆业, 向继洲. 中草药杂志, 2005, 36: 548–551
- 38 陈超, 韩虹, 方达超. 中国药理学通报, 1989, 5: 373–376
- 39 张慧珠, 杨林, 刘淑海, 任雷鸣. 中药材, 2001, 24: 655–657
- 40 Liu Q, Liu YJ, Li YQ, Yao SZ. *J Sep Sci*, 2006, 29: 1268–1274
- 41 Deng YT, Liao QF, Li SH, Bi KS, Pan BY, Xie ZY. *J Chromatogr B*, 2008, 863: 195–205
- 42 Liu LH, Chen ZL. *Acta Chim Sinica*, 2012, 737: 99–104

Interaction of fluorescence carbon dots with berberines hydrochloride and the selective determination of jatrorrhizine hydrochloride

Hui Liu, Chengzhi Huang*

Key Laboratory of Luminescent and Real-Time Analytical Chemistry, Ministry of Education; College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

*Corresponding author (email: chengzhi@swu.edu.cn)

Abstract: Fluorescent carbon dots (CDs), possessing good biocompatibility and anti-photobleaching properties, have been put in the spotlight. Herein, a new type of fluorescent CDs was prepared through hydrothermal reaction, in which hemin was involved as the carbon sources. It was found that the as-prepared CDs were uniformly distributed with the diameter of 2–5 nm, exhibiting excitation dependent emissions (EDE), which could be effectively quenched by berberines. Mechanism investigations showed that the fluorescence quenching results from the absorption of CDs emission by berberines. It is specifically noted that jatrorrhizine not only leads to the quenching of CDs fluorescence, but also induces the characteristic emission red shift of CDs in alkaline solutions. The red shift of CDs emission follows a linear relationship with the logarithm of Jat concentration in the range of 2.30–414 $\mu\text{mol/L}$ with the equation of $\Delta\lambda_{\text{em}}=17.3\log c-6.64$ and correlation coefficients of 0.995 ($n=10$), giving a limit of determination (3σ) of 1.06 $\mu\text{mol/L}$.

Keywords: carbon dots, jatrorrhizine hydrochloride, emission peak red-shift

doi: 10.1360/N032015-00200