

功能材料

壳聚糖基聚集诱导发光复合物用于肝素检测

刘伟¹, 管连雄¹, 王腾飞¹, 谭志伟¹, 胡盛¹, 田大昕^{1,2*}

(1. 湖北民族大学 化学与环境工程学院, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北民族大学 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000, 湖北, 中国)

摘要: 通过静电复合作用, 将壳聚糖季铵盐和具有聚集诱导发光 (AIE) 效应发光体 [4-(1,2,2-三苯基乙基) 苯甲酸 (TPE-COOH)] 相结合, 构建了一种快速检测肝素的复合物 (TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物)。通过 FTIR、¹HNMR、TEM、荧光光谱、UV-Vis、Zeta 电位对 TPE-COOH 及 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物进行了测试。结果表明, 该复合物与肝素相遇后, 壳聚糖季铵盐优先与高负电荷密度的肝素结合, 然后释放出 AIE 荧光体, 导致复合物的荧光强度下降, 从而实现对肝素的定量检测。该复合物对肝素的检测限为 0.0393 mg/L, 线性范围为 0~14 mg/L。

关键词: 肝素; 聚集诱导发光; 壳聚糖; 复合物; 功能材料

中图分类号: O69 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 09-1805-08

Heparin detection via chitosan-based complexes with aggregation-induced emission

LIU Wei¹, GUAN Lianxiong¹, WANG Tengfei¹, TAN Zhiwei¹, HU Sheng¹, TIAN Dating^{1,2*}

(1. School of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China; 2. Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China)

Abstract: A self-assembled composite (TPE-COOH/chitosan quaternary ammonium salt composite) for rapid heparin detection was fabricated through electrostatic complexation of chitosan quaternary ammonium salt and 4-(1,2,2-triphenylethenyl) benzoic acid (TPE-COOH) with aggregation-induced emission (AIE). TPE-COOH and TPE-COOH/chitosan quaternary ammonium salt composite were then characterized and analyzed by FTIR, ¹HNMR, TEM, fluorescence spectrum, UV-Vis and Zeta potential. The results showed that, when encountered with heparin, the chitosan quaternary ammonium salt preferentially conjugated with the highly negatively charged heparin, which led to the release of AIE phosphor resulting in a decrease in the fluorescence intensity of the complex and achieving the quantitative detection of heparin. The detection limit of the composite was 0.0393 mg/L and the linear range was 0~14 mg/L

Key words: heparin; aggregation-induced emission; chitosan; complex; functional materials

糖胺聚糖是一种阴离子聚多糖, 大多数是由硫酸根和羧酸根的二糖重复单元组成, 在已知的天然生物大分子中具有最高的负电荷密度^[1-2]。糖胺聚糖主要成分为肝素、硫酸角质素及透明质酸等^[3], 它们在身体机能中分别承担不同的作用。其中, 肝素具有丰富的生物学功能, 可以在临床医学中作为抗凝剂进行使用^[4], 也可以抑制破骨细胞分化^[5]。此外,

肝素还可以降低先兆子痫复发率^[6]。但是在肝素的应用方面, 存在过量使用导致血小板减少及伤口出血等副作用^[7-8]。因此, 定量检测肝素对确保其在临床上的安全使用具有重要意义。

目前, 已开发的检测肝素的传统方法有毛细管电泳法、发色底物法及电化学分析法等^[9-11]。虽然这些方法都有各自明显的优势, 但是它们也存在一

收稿日期: 2022-04-04; 定用日期: 2022-07-04; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220316

基金项目: 国家自然科学基金 (51263009)

作者简介: 刘伟 (1996—), 男, 硕士生, E-mail: 652227308@qq.com。联系人: 田大昕 (1968—), 男, 教授, E-mail: tiandating@163.com。

些相对明显的劣势,比如需要复杂的检测流程,耗时费力;依赖高价值的医疗设备,难以普及;检测限较高,不能直接检测肝素等。随着近几年荧光材料的发展,利用荧光探针方便及快捷的优势,开发出了不同类型的荧光检测肝素的方法^[12-13]。比如, BAYRAKTUTAN 等^[14]通过荧光素染料检测肝素, CAO 等^[15]利用量子点检测肝素以及 LIU 等^[16]利用荧光抗生素来检测肝素等。但是,这些荧光探针都存在聚集产生猝灭(ACQ)现象,因而限制了其进一步的应用。

唐本忠院士在 2001 年首次提出聚集诱导发光概念(AIE)^[17],为使用高浓度荧光材料而又避免 ACQ 现象开辟了新的途径。与 ACQ 相反, AIE 分子在稀溶液中显示弱荧光或者不发荧光,但在聚集状态下由于分子内旋转受限而发射出明显增强的荧光。由于 AIE 分子制备简单、具有良好的光稳定性并且易于功能化等优点,所以具有 AIE 性质的荧光材料日益受到关注。在此背景下,科研人员开发了一系列关于检测肝素的荧光探针。比如, LIU 等^[18]设计基于金属有机骨架的荧光分子用于检测肝素, APARNA 等^[19]利用铜纳米簇检测肝素, QIAO 等^[13]将聚电解质诱导苈准分子用于检测肝素。但是,将 AIE 物质和壳聚糖相结合用来检测肝素的研究还鲜见报道。

壳聚糖是一种天然多糖,在自然界中广泛存在,由于其具有良好的生物相容性及可降解性而受到了人们的密切关注。壳聚糖的每一个重复单元中都含有大量的羟基和氨基,易于化学修饰,并且化学改性不会破坏其原有的主链结构且可保持原有的多糖特性,所以壳聚糖的改性具有十分重要的研究价值^[20-21]。例如, LIN 等^[22]制备水溶性壳聚糖-量子点混合纳米球用作生物成像和生物标记, MOUSSA 等^[23]使用荧光标记的真菌壳聚糖作为生物防治的抗菌剂, LAI 等^[24]利用壳聚糖修饰的硫化镉量子点作为荧光探针用于测定铜(II)离子。虽然如此,用 AIE 分子修饰壳聚糖的研究鲜见报道。

在本工作中,首先通过一步合成制备了具有 AIE 性质的 4-(1,2,2-三苯基乙烯基)苯甲酸(TPE-COOH),然后,在弱碱性条件下利用带有大量正电荷的壳聚糖季铵盐与之相结合来增强其 AIE 效应,再利用具有高负电荷的肝素与壳聚糖季铵盐静电结合,从而释放出低负电荷的 AIE 发光体,进而导致体系荧光强度减弱,并将其用于肝素的检测。采用傅里叶变换红外光谱仪、核磁共振波谱仪、荧光分光光度计、电位分析仪等对相关产物进行了表征和分析。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

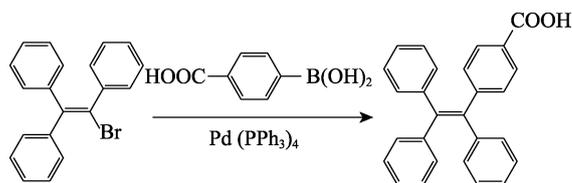
三苯基溴基乙烯(AR)、4-羧基苯硼酸(AR)、四(三苯基膦)钯[Pd(PPh₃)₄](AR)、碳酸钾(AR)、四丁基溴化铵(TBAB, AR)、磷酸钠(AR)、焦磷酸钠(AR)、硫酸钠(AR)、肝素钠(185 USP units/mg)、羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖(取代度 98%)、透明质酸(HA, 质量分数 97%),上海麦克林生化科技有限公司。四氢呋喃,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。魔芋葡甘聚糖(KGM),湖北一致魔芋生物科技有限公司。葡聚糖(相对分子质量 1500)、淀粉,牛血清蛋白(BSA),化学纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。澳洲胎牛血清(FBS500-S),北京智杰方远科技有限公司。

Nicolet Avatar 370 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国 Thermo 公司;AS400 型核磁共振波谱仪,瑞士 Bruker 公司;Zeta sizer Nano S90 电位分析仪,英国 Malvern 公司;Hitachi F-4600 荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司;UV-2600 紫外分光光度计(UV),日本 Shimadzu 公司;FEI F20 透射电子显微镜(TEM),美国 FEI 公司。

1.2 复合物的构建

1.2.1 荧光体 TPE-COOH 的合成

按照文献方法合成 TPE-COOH^[25],具体合成路线如下所示。



在 N₂ 保护下,将三苯基溴基乙烯(1.1 g, 3.2 mmol)和 4-羧基苯硼酸(0.82 g, 4.9 mmol)溶于 55 mL 四氢呋喃(THF)中,然后加入四丁基溴化铵(0.02 g, 0.06 mmol)和 10 mL 碳酸钾水溶液(2 mol/L)。反应体系在 55 °C 下混合搅拌 0.5 h 后,再将四(三苯基膦)钯(0.01 g, 0.0087 mmol)加入混合物中,加热至 90 °C,回流 24 h。用水淬灭反应,然后用乙酸乙酯萃取出粗产物,再用无水硫酸钠干燥有机相并先通过柱层析法纯化,最后用硅胶板二次纯化(洗脱液为二氯甲烷和正己烷,二者体积比为 1:1)。产品为淡黄色粉末,收率 78.02%。

1.2.2 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物的制备

将羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖(0.07 mg)溶于磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4, 1.6 mL)中,再加入溶于 DMF(0.4 mL)的 TPE-COOH(0.019 mg, 0.05 μmol)溶液。将样品放置于振荡器中振荡 2 min 即得到

TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物。

1.3 测试方法

1.3.1 傅里叶变换红外光谱测定

采用溴化钾压片法测试样品的红外光谱。测试范围在 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 。

1.3.2 微观形貌

将样品超声 10 min, 然后用滴管取样滴于铜网上, 自然晾干后, 用 TEM 观察。

1.3.3 Zeta 电位

将不同浓度梯度的样品在 $2\text{ mL } V(\text{DMF}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 4$ 溶液中分散均匀, 超声 10 min 后, 装入测试皿中, 室温下测试其电位值。测三次取平均值。

1.3.4 荧光光谱测定

将不同浓度梯度样品在 $2\text{ mL } V(\text{DMF}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 4$ 溶液中分散均匀, 振荡 2 min, 装入比色皿中, 室温下测试其发射光谱。激发波长: 340 nm, 激发狭缝宽度和发射狭缝宽度分别为 5 nm, 扫描范围在 $350\sim 650\text{ nm}$ 。

1.3.5 紫外光谱测定

将不同浓度梯度样品在 $2\text{ mL } V(\text{DMF}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 4$ 溶液中分散均匀, 振荡 2 min, 装入比色皿中, 室温下测试其吸收光谱。扫描范围在 $255\sim 445\text{ nm}$ 。

1.4 肝素的检测

将肝素或干扰物(磷酸钠、焦磷酸钠、硫酸钠、牛血清蛋白、透明质酸、淀粉、魔芋葡甘聚糖及葡聚糖)分别用 10 mmol/L PBS (pH=7.4) 缓冲溶液配制为 500 mg/L 的待测溶液。然后, 取 $70\text{ }\mu\text{L}$ 待测溶液加入 1.93 mL 复合物体系中, 通过荧光分光光度计来对肝素进行检测(荧光强度的变化与肝素含量有关)。另外, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 牛血清加入 1.98 mL 复合物体系待测液中, 用于实际样品中肝素的检测。

1.5 探针检测限的计算

TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物对肝素的检测限(LOD, mg/L)根据公式(1)计算:

$$\text{LOD} = 3\sigma/k \quad (1)$$

式中: σ 表示不加目标物肝素时空白探针(TPE-COOH 浓度为 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$, 壳聚糖季铵盐质量浓度为 35 mg/L) 的荧光强度标准偏差; k 表示探针在线性范围($0\sim 14\text{ mg/L}$) 内的斜率。

2 结果与讨论

2.1 TPE-COOH 的结构表征

图 1a 为 TPE-COOH 的红外光谱图。从图 1a 可以看出, 在 1692 cm^{-1} 处出现了一个很强的吸收峰, 这归属 TPE-COOH 中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动所致; 在 3435 cm^{-1} 处出现一个宽峰, 这是由 $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动引起; 另外, 在 1599 和 700 cm^{-1} 处出现两个吸收

峰, 这是 TPE-COOH 中芳香环的特征伸缩振动, 与文献报道一致^[26]。图 1b 为 TPE-COOH 的 ^1H NMR 谱图。相关结果如下: ^1H NMR (400 MHz , $\text{DMSO}-d_6$), δ : 12.88 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2H), $7.22\sim 7.07$ (m, 11H), 7.01 (dt, $J = 7.3, 1.9\text{ Hz}$, 6H)。在 $\delta 12.88$ 处吸收峰归属于 1 位上氢原子的共振; 在 $\delta 7.72$ 处吸收峰对应于 2, 3 位氢原子的共振; 在 $\delta 7.22\sim 7.01$ 处吸收峰是由于 4~20 位上氢原子的共振所引起, 该结果与文献报道一致^[26-27]。FTIR 和 ^1H NMR 都证实了目标产品的成功合成。

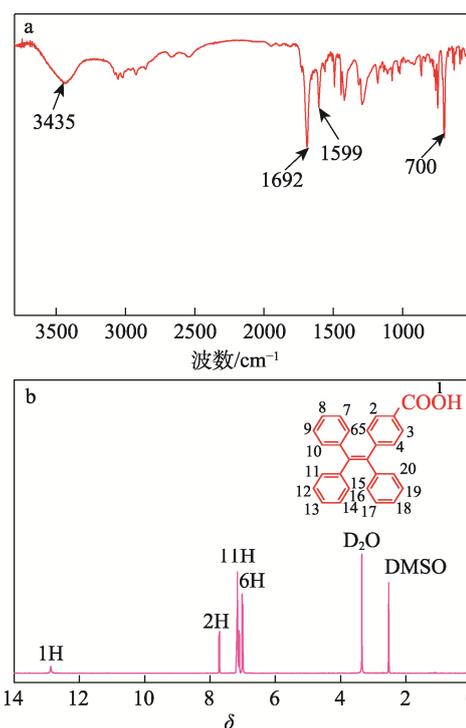
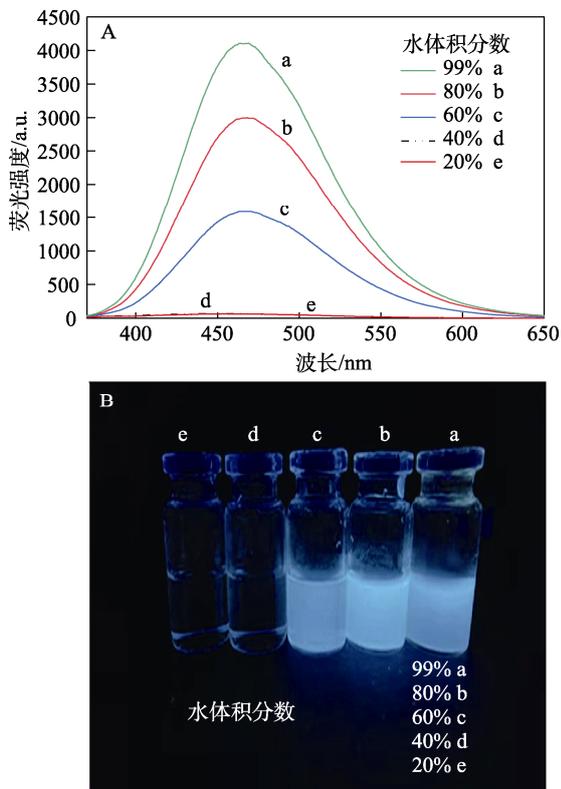


图 1 TPE-COOH 的 FTIR (a) 及 ^1H NMR 谱图 (b)
Fig. 1 FTIR (a) and ^1H NMR (b) spectra of TPE-COOH

2.2 TPE-COOH 的 AIE 效应

本工作的 AIE 分子在良性溶剂(疏水溶剂)中发弱光或不发光, 但是随着不良溶剂(亲水溶剂)的增加其荧光逐渐增强。图 2A 为 TPE-COOH 在水不同体积分数的 DMF/ H_2O 溶液中的荧光发射光谱。由图 2A 可见, 当 H_2O 体积分数 $\leq 40\%$ 时, 其荧光强度都很低, 曲线几乎重合。但是随着不良溶剂 H_2O 的继续加入, 其在 467 nm 处的荧光发射强度逐渐增强, 这正是 AIE 分子的特有荧光性质^[28]。图 2B 为 TPE-COOH 在水不同体积分数的 DMF/ H_2O 溶液中的紫外光照射照片。从图 2B 可以看出, 当 H_2O 体积分数 $\leq 40\%$ 时, 紫外光照射照片很暗, 说明其荧光强度很弱; 但当 H_2O 体积分数高于 40% 时, 其照片很亮, 说明其荧光强度很强, 这一现象与文献报道一致^[29]。TPE-COOH 在 DMF 中溶解性较好, 但在 H_2O 中溶解性较差, 因此随着混合液中 H_2O 含量逐渐升

高, TPE-COOH 分子出现聚集, 其分子内运动受阻, 从而导致其荧光强度显著增强。



注: TPE-COOH 质量浓度 10 mg/L; 激发波长 340 nm; 激发狭缝/发射狭缝 5 nm/5 nm

图 2 TPE-COOH 在不同水体积分数的 DMF/H₂O 溶液中的荧光发射光谱 (A) 及紫外光照片 (B)

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of TPE-COOH in mixtures (DMF/H₂O) with different volumetric ratios of H₂O (A) and photographs of the complex taken under UV light (B)

2.3 复合物的组装行为

图 3 为壳聚糖季铵盐和 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物的 TEM 照片。

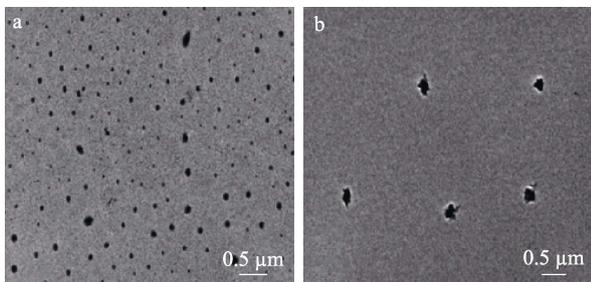


图 3 壳聚糖季铵盐 (a) 和 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物 (b) 的 TEM 照片

Fig. 3 TEM images of chitosan quaternary ammonium salt (a) and TPE-COOH/chitosan quaternary ammonium salt complex (b)

从图 3a 可以看出, 壳聚糖季铵盐为具有较好分散性和较规则形状的颗粒, 直径在 100 nm 以下。但

是, 壳聚糖季铵盐中添加 TPE-COOH 后的 TEM 照片发生了改变 (如图 3b 所示), 荧光复合物具有更大的轮廓和不规则的形状, 直径明显大于壳聚糖季铵盐。这可解释为, 壳聚糖季铵盐和 TPE-COOH 通过静电结合, 导致壳聚糖季铵盐表面电荷下降, 大分子链段更易相互靠近, 从而形成了直径更大的聚集体^[30]。

图 4 为 TPE-COOH 和 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物的紫外吸收光谱。如图 4a 所示, 在 250~280 nm 和 280~340 nm 出现的吸收峰为 TPE-COOH 的特征峰, 与文献报道一致^[31]。当添加壳聚糖季铵盐后, 样品的紫外吸收光谱出现红移 (图 4b), 说明壳聚糖季铵盐与 TPE-COOH 产生了静电作用。

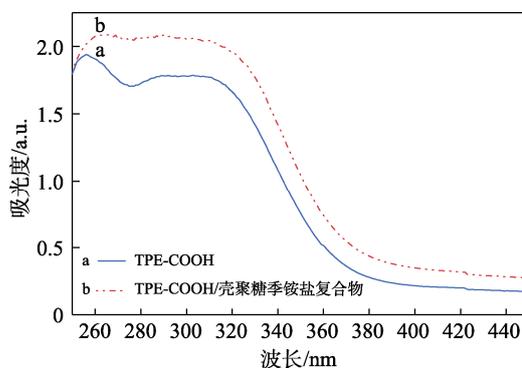
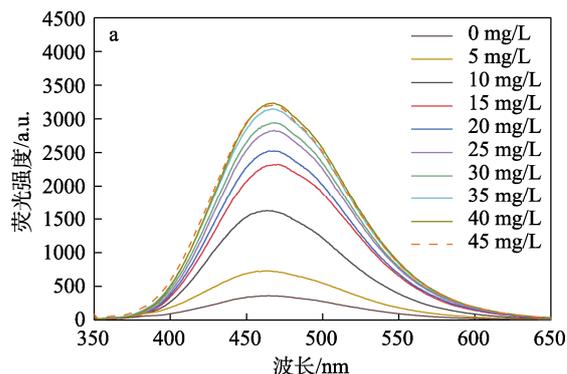
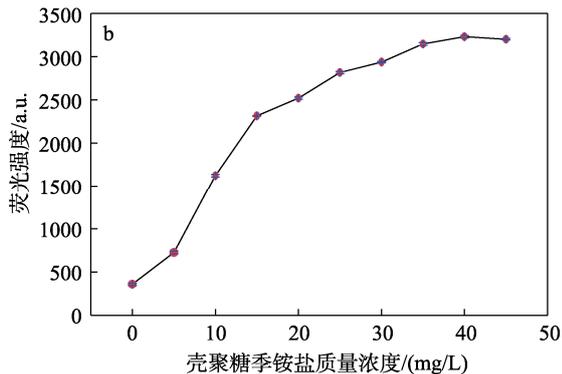


图 4 TPE-COOH (a) 和 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物 (b) 的 UV 吸收光谱

Fig. 4 UV adsorption spectra of TPE-COOH (a) and TPE-COOH/chitosan quaternary ammonium salt complex (b)

图 5 为壳聚糖季铵盐浓度对复合物荧光发射光谱及最大发射强度的影响。如图 5a 所示, 向 TPE-COOH 溶液中加入梯度壳聚糖季铵盐溶液 (0~30 mg/L) 时, 随着壳聚糖季铵盐浓度增加, 复合物的荧光强度逐渐增强, 壳聚糖季铵盐溶液的质量浓度从 30 mg/L 增加到 40 mg/L 时, 其荧光强度变化不大。另外, 从图 5b 也可以看出, 壳聚糖季铵盐溶液质量浓度 (0~30 mg/L) 不断增加时, 复合物的荧光强度是逐渐升高的过程, 壳聚糖季铵盐质量浓度超过 30 mg/L 时, 荧光强度增幅不大。这说明此时壳聚糖季铵盐的浓度已达到饱和, 复合物中大部分 TPE-COOH 已经转化为聚集形式。



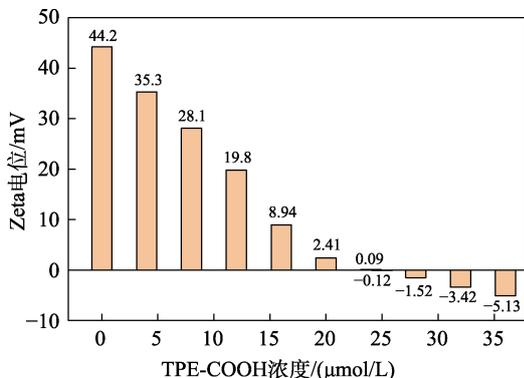


注: TPE-COOH 浓度 25 $\mu\text{mol/L}$; pH=7.4; 激发波长 340 nm; 激发狭缝/发射狭缝 5 nm/5 nm

图 5 壳聚糖季铵盐浓度对复合物荧光发射光谱 (a) 及最大发射强度的影响 (b)

Fig. 5 Effects of concentrations of chitosan quaternary ammonium salt on emission spectra of complex fluorescence (a) and maximum emission intensity (b)

通过 Zeta 电位可以进一步证实壳聚糖季铵盐和 TPE-COOH 通过静电力相结合的设计。图 6 为在固定壳聚糖季铵盐浓度下, 改变 TPE-COOH 浓度对复合物 Zeta 电位的影响。从图 6 可以看出, 不加 TPE-COOH 时, 壳聚糖季铵盐溶液电位为 44.2 mV。但是, 随着复合物中 TPE-COOH 浓度的不断增加(从 0 增至 36 $\mu\text{mol/L}$), 复合物的 Zeta 电位逐渐减小, 从 44.2 mV 降到 -5.13 mV。特别地, 当 TPE-COOH 浓度为 24~25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 复合物的 Zeta 电位接近于零, 意味着此时体系接近于电中和状态, 继续添加 TPE-COOH 体系 Zeta 电位变为负值。另外, 从图 5 的荧光检测也可看出, 在 TPE-COOH 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 、壳聚糖季铵盐质量浓度为 35 mg/L 时, 复合物的荧光强度接近于极大值。所以, 选定壳聚糖季铵盐质量浓度为 35 mg/L, TPE-COOH 的浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续检测肝素的用量。



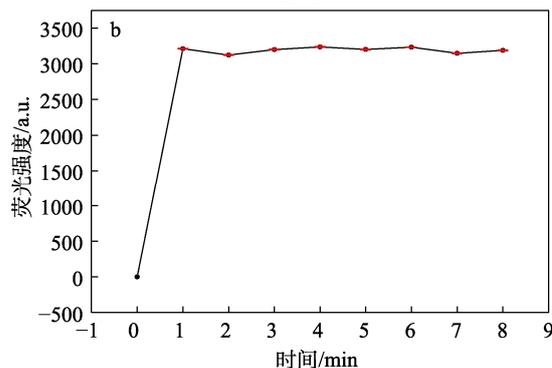
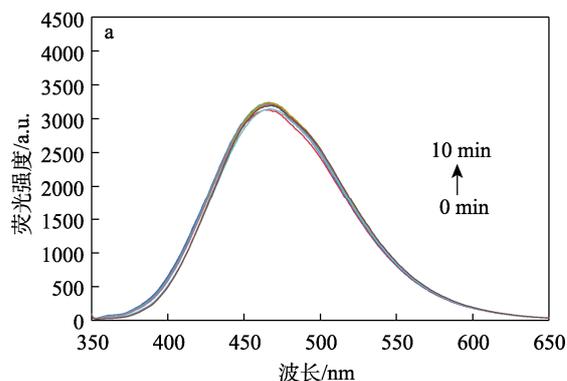
注: 壳聚糖季铵盐质量浓度 35 mg/L; pH=7.4

图 6 TPE-COOH 浓度对复合物 Zeta 电位的影响

Fig. 6 Effect of TPE-COOH concentration on Zeta potential of complex

在复合物中, 底物的稳定性至关重要。检测了荧光存储时间对复合物荧光性能的影响, 结果见图 7。

从图 7 可看出, 复合物的荧光强度在 10 min 内基本保持不变, 说明体系具有较好的荧光稳定性。由于壳聚糖季铵盐与 TPE-COOH 是通过静电力相互作用, 因此二者结合较快, 复合物可以在 1 min 之内完成, 并且在较长的时间里都能够保持较为稳定的荧光强度。这种复合物的荧光稳定性和快速开启荧光功能为肝素检测奠定了较好的基础。



注: 壳聚糖季铵盐质量浓度 35 mg/L; TPE-COOH 浓度 25 $\mu\text{mol/L}$; pH=7.4; 激发波长 340 nm; 激发狭缝/发射狭缝 5 nm/5 nm

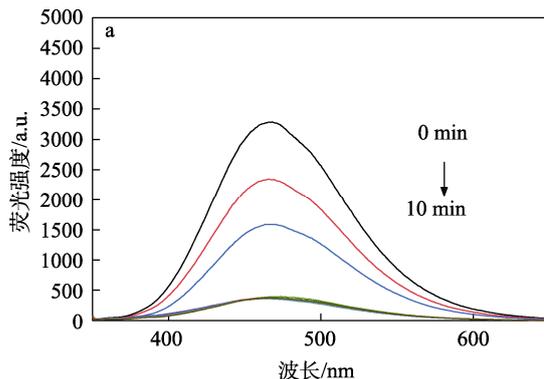
图 7 存储时间对复合物荧光光谱 (a) 及最大发射强度的影响 (b)

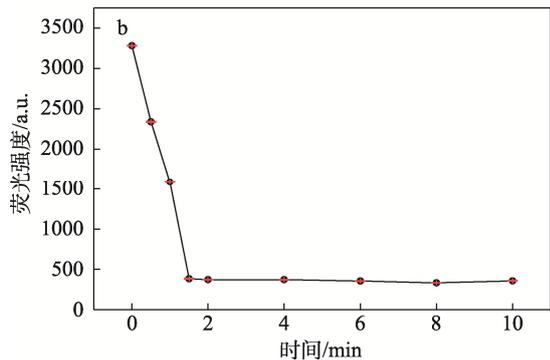
Fig. 7 Effect of storage time on fluorescence spectra (a) and the maximum emission intensity of complex (b)

2.4 复合物对肝素的检测

2.4.1 肝素的定量检测

图 8 为复合物在肝素加入后的发射光谱及最大发射强度与时间的关系图。





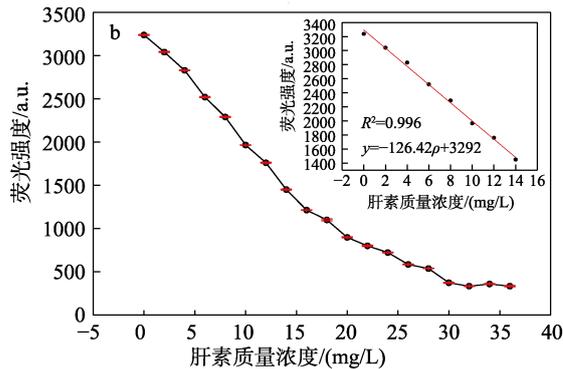
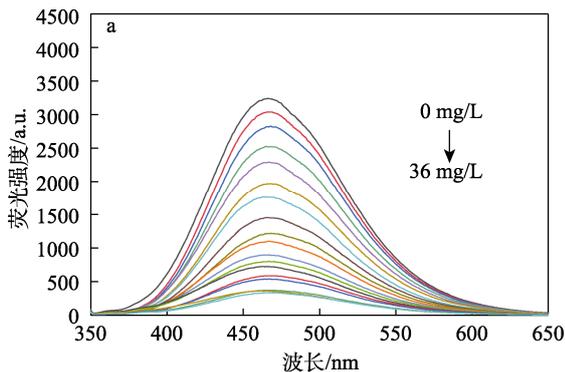
注:壳聚糖季铵盐质量浓度 35 mg/L; TPE-COOH 浓度 25 $\mu\text{mol/L}$; 肝素质量浓度 30 mg/L; pH=7.4; 激发波长 340 nm; 激发狭缝/发射狭缝 5 nm/5 nm

图 8 复合物在肝素加入后的发射光谱 (a) 及最大发射强度与时间的关系图 (b)

Fig. 8 Relationship between time and emission spectrum (a) and the maximum emission intensity (b) of complex after addition of heparin

从图 8 可以看出,加入肝素后体系荧光强度迅速降低,在 2 min 左右降至最低水平并且长时间保持恒定的荧光强度。这说明对于复合物传感器来说,加入肝素(高负电荷密度)可以很好地与壳聚糖季铵盐相结合,同时释放出 TPE-COOH(低电荷密度)。另外也说明,该复合物对肝素具有良好的快速检测的能力。所以,选定 2 min 为检测时间。

图 9 为肝素浓度对复合物的荧光发射光谱及最大发射强度的影响。从图 9a 可以看出,复合物的荧光强度随着肝素浓度的增加而逐渐减弱。其中,当肝素质量浓度在 0~14 mg/L 时,复合物的荧光强度下降较快。当肝素质量浓度高于 14 mg/L 时,复合物荧光强度下降较慢。从图 9b 插图可以看出,当肝素质量浓度 ≤ 14 mg/L 时,体系荧光强度与肝素浓度存在良好的线性关系 ($R^2=0.996$)。另外,根据 CAO 等^[32]及 JIANG 等^[33]所报道的计算方法可算出复合物对肝素的检测限为 0.0393 mg/L,该 LOD 值低于临床检测中要求的最低值^[34],这为以后检测肝素的实际应用奠定了基础。



注:插图为在肝素质量浓度 0~14 mg/L 下的荧光强度与肝素浓度的线性关系;壳聚糖季铵盐质量浓度 35 mg/L; TPE-COOH 浓度 25 $\mu\text{mol/L}$; pH=7.4; 激发波长 340 nm; 激发狭缝/发射狭缝 5 nm/5 nm

图 9 肝素浓度对复合物的荧光发射光谱 (a) 及最大发射强度的影响 (b)

Fig. 9 Effect of heparin concentration on fluorescence emission spectra (a) and the maximum emission intensity of complex (b)

2.4.2 复合物检测肝素的机理

复合物检测肝素的机理示意图见图 10。芳香族羧基的 pK_a 在 4.2 左右^[30],因此 TPE-COOH 在弱碱性条件下呈负电荷,当加入带有正电荷的壳聚糖季铵盐后,二者通过静电作用形成复合物,从而导致 TPE-COOH 产生聚集使其荧光增强。另外,肝素所带负电荷密度要远高于 TPE-COOH 分子,所以当肝素加入到复合物后,壳聚糖季铵盐会优先和肝素通过静电作用形成稳定的络合物,使 TPE-COOH 从复合物中释放出来,最终导致体系荧光变弱,因此可以实现对肝素的检测。

2.4.3 复合物的选择性及其在实际样品中的应用

为了探究复合物对肝素的特异性,选择一些常见的干扰物进行了选择性实验,结果见图 11。这些干扰物包括一些带负电荷的物质($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 Na_3PO_4 、 Na_2SO_4)和生物大分子(BSA、HA、淀粉、葡聚糖、魔芋葡甘聚糖)。从图 11 可以看出,这些干扰物对复合物的荧光强度影响很小。另外,虽然 HA 和肝素的结构接近,但是肝素的猝灭效果仍然是 HA 的 8 倍,这是由于肝素极高的负电荷密度所致。所以,本文合成的复合物对肝素的检测具有较好的选择性。

为了验证壳聚糖基 AIE 复合物检测肝素的可行性,使用复合物探针对血清样品中的肝素进行了测定,结果见表 1。从表 1 可以看出,样品的回收率在 94.8%~97.5%之间,相对标准偏差在 0.7%~2.1%之间。说明 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物检测肝素具有应用到实际的可能性。

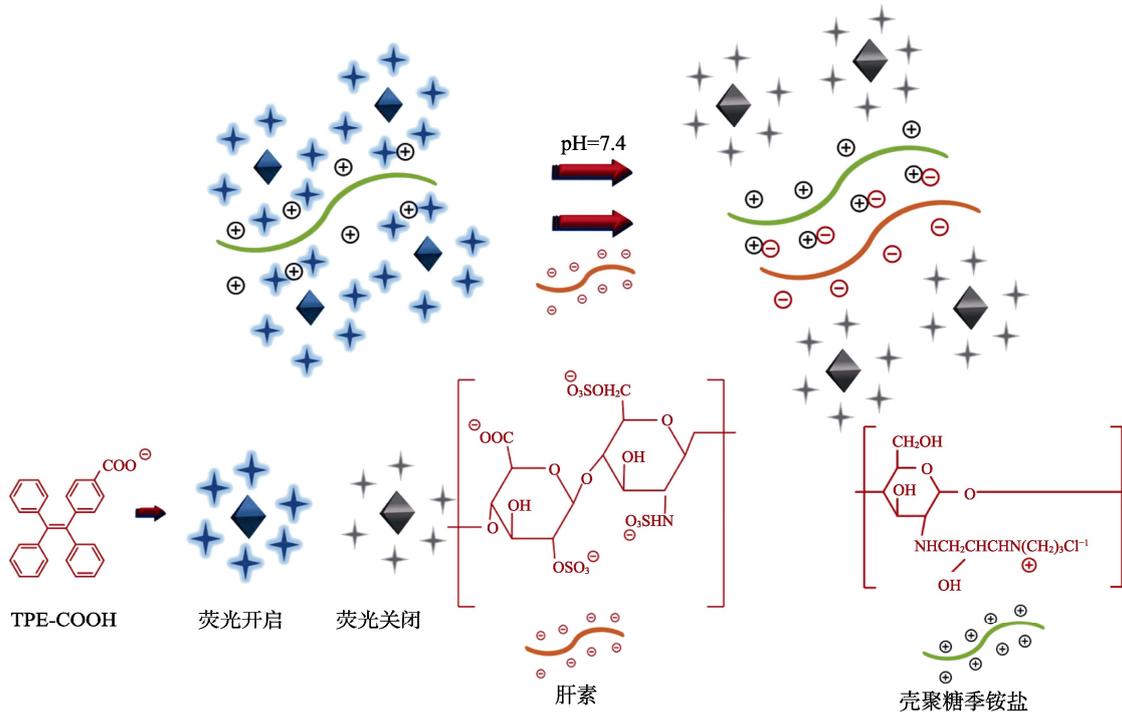
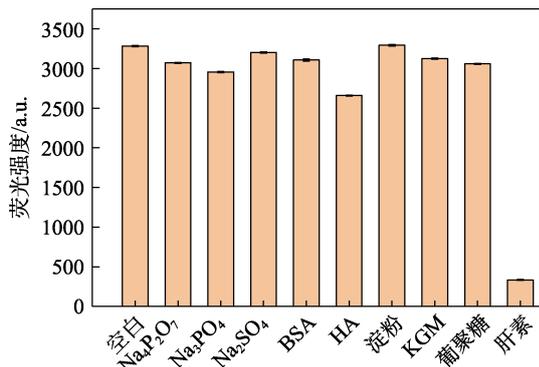


图 10 复合物检测肝素的机理示意图

Fig. 10 Schematic mechanism of the complex for detecting heparin



注:壳聚糖季铵盐质量浓度 35 mg/L;TPE-COOH 浓度 25 μmol/L;肝素质量浓度 30 mg/L;BSA 质量浓度 30 mg/L;HA 质量浓度 30 mg/L;pH=7.4;Na₄P₂O₇ 质量浓度 30 mg/L;Na₃PO₄ 质量浓度 30 mg/L;Na₂SO₄ 质量浓度 30 mg/L;激发波长 340 nm;激发狭缝/发射狭缝 5 nm/5 nm

图 11 复合物的选择性

Fig. 11 Selectivity of complex

表 1 牛血清样品中肝素的检测结果

Table 1 Detection results of heparin in serum samples (n=3)

编号	肝素添加量/ (mg/L)	肝素测定值/ (mg/L)	回收率/%	相对误差/%
1	2	1.95	97.5	0.7
2	6	5.78	96.3	2.1
3	9	8.77	97.4	1.5
4	14	13.28	94.8	1.4

2.4.4 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物检测肝素的方法与其他方法的比较

将 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物检测肝素的方法与其他文献报道的方法进行了比较,结果见

表 2。虽然 LI 等^[34]报道了利用带有负电荷的异硫氰酸荧光素标记的 DNA 序列作为荧光传感器检测肝素,但是它们的传感器存在 ACQ 的缺陷。ZHANG 等^[35]利用金纳米簇作为荧光传感器检测肝素,由于其传感器为金纳米粒子,因此价格昂贵。其他的方法^[36-38]也分别存在探针制备复杂及检测范围窄等不足。在本工作中,荧光单元通过 Suzuki-Miyaura 反应一步法合成,然后与多糖通过简单自组装形成复合物探针。该探针不仅具有较低检测限、较宽的检测范围及较好的选择性,而且具有良好的生物相容性及生物降解性。

表 2 TPE-COOH/壳聚糖季铵盐复合物检测肝素的方法与已报道方法的比较

Table 2 Comparison between the detection of heparin by TPE-COOH/chitosan quaternary ammonium salt composite and reported methods

来源	打开方式	检测范围/ (mg/L)	检测限/ (mg/L)	缺点	优点
[35]	关闭	0.004~0.220	0.0034	制备成本高	检测限低
[36]	关闭	0.000156~0.001875	0.000078	ACQ 效应	检测限低
[37]	打开	0.20~14	0.05760	发射波长短	检测范围广
[38]	打开	≤2	0.03589	制备复杂	检测限低
[39]	关闭	0.6~2.0	0.04522	检测范围窄	方法简单
本工作	关闭	≤14	0.0393	发射波长短	制备简单

3 结论

本工作首先通过一步合成法制备了 TPE-COOH,

然后与壳聚糖季铵盐通过静电作用制备了一种具有 AIE 效应的自组装复合探针。复合物加入肝素后,壳聚糖季铵盐会优先和肝素相结合,从而释放出 AIE 荧光体使体系荧光强度降低。同时,采用 FTIR、¹HNMR、电位分析仪、荧光分光光度计等对复合物进行了表征。结果表明,在复合物中加入肝素能使其荧光强度下降,从而可以实现对肝素的定量检测。复合物检测肝素的方法不但具有较好的选择性,而且具有较低检测限和较宽检测范围。与其他检测肝素的探针相比,利用天然多糖构建复合物探针可赋予荧光探针较好的可降解性及生物相容性,同时也为天然多糖的应用开拓了新思路。另外,本工作为壳聚糖基 AIE 复合物用于临床中肝素的检测提供了研究基础。

参考文献:

- GAMA C I, HSIEH-WILSON L C. Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(6): 609-619.
- QI Y Y, HE J H, XIU F R, *et al.* A facile chemiluminescence sensing for ultrasensitive detection of heparin using charge effect of positively-charged AuNPs[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 216(5): 310-318.
- MENDE M, BEDNAREK C, WAWRYSZYN M, *et al.* Chemical synthesis of glycosaminoglycans[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(14): 8193-8255.
- BJÖRK I, LINDAHL U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1982, 48(3): 161-182.
- ARIYOSHI W, TAKAHASHI T, KANNO T, *et al.* Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 103(6): 1707-1717.
- MELLO G, PARRETTI E, FATINI C, *et al.* Low-molecular-weight heparin lowers the recurrence rate of preeclampsia and restores the physiological vascular changes in angiotensin-converting enzyme DD women[J]. *Hypertension*, 2005, 45(1): 86-91.
- BRAATZ E, SESARTIC V, LISKA J. Will high-dose heparin affect blood loss and inflammatory response in patients undergoing cardiopulmonary bypass?[J]. *Perfusion*, 2021, 36(1): 63-69.
- CUKER A, CINES D B. How I treat heparin-induced thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2012, 119(10): 2209-2218.
- SUN X J, LIN L, LIU X Y, *et al.* Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of heparin oligosaccharides and low molecular weight heparin[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(3): 1937-1943.
- LIAO H, LIU Y, CHEN M, *et al.* A colorimetric heparin assay based on the inhibition of the oxidase mimicking activity of cerium oxide nanoparticles[J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(5): 274-280.
- TIAN L, ZHAO H S, ZHAO Z Z, *et al.* A facile voltammetric method for detection of heparin in plasma based on the polyethylenimine modified electrode[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11(10): 1324-1330.
- YANG M D, CHEN J, ZHOU H P, *et al.* Polycation-induced benzoperylene probe excimer formation and the ratiometric detection of heparin and heparinase[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 75(1): 404-410.
- QIAO Y D, YAO Z Y, GE W Q, *et al.* Rapid and visual detection of heparin based on the disassembly of polyelectrolyte-induced pyrene excimers[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(12): 2569-2574.
- BAYRAKTUTAN T, BAYRAKTUTAN O F. A novel turn on fluorescence sensor for determination enoxaparin, a low molecular weight heparin[J]. *Journal of Fluorescence*, 2020, 30(6): 1591-1599.
- CAO Y L, SHI S, WANG L L, *et al.* Ultrasensitive fluorescence detection of heparin based on quantum dots and a functional ruthenium polypyridyl complex[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55(5): 174-179.
- LIU J H, LI Y, LIU L, *et al.* Current progress on antibiotic sensing based on ratiometric fluorescent sensors[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 107(2): 176-184.
- LUO J, XIE Z, LAM J W, *et al.* Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole[J]. *Chemical Communications*, 2001, 18(8): 1740-1741.
- LIU L H, DAI J N, JI Y, *et al.* Detection of protamine and heparin using a promising metal organic frameworks based fluorescent molecular device BZA-BOD@ZIF-90[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 341(8): 130006.
- APARNA R S, ANJALI DEVI J S, ANJANA R R, *et al.* Reversible fluorescence modulation of BSA stabilised copper nanoclusters for the selective detection of protamine and heparin[J]. *Analyst*, 2019, 144(5): 1799-1808.
- WANG W J, XUE C H, MAO X Z. Chitosan: Structural modification, biological activity and application[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164(12): 4532-4546.
- NEGM N A, HEFNI H H H, ABD-ELAAL A A A, *et al.* Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152(6): 681-702.
- LIN Y, ZHANG L Z, YAO W, *et al.* Water-soluble chitosan-quantum dot hybrid nanospheres toward bioimaging and biolabeling[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2011, 3(4): 995-1002.
- MOUSSA S H, TAYEL A A, AL-TURKI A I. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54(3): 204-208.
- LAI S J, CHANG X J, FU C. Cadmium sulfide quantum dots modified by chitosan as fluorescence probe for copper (II) ion determination[J]. *Microchimica Acta*, 2008, 165(1): 39-44.
- LI H Y, CHANG J F, HOU T, *et al.* Aggregation induced emission amphiphile with an ultra low critical micelle concentration: Fabrication, self assembling, and cell imaging[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(2): 198-201.
- YE X, WANG H, YU L, *et al.* Aggregation-induced emission (AIE)-labeled cellulose nanocrystals for the detection of nitrophenolic explosives in aqueous solutions[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(5): 707-721.
- LIU G J, TIAN S N, LI C Y, *et al.* Aggregation-induced-emission materials with different electric charges as an artificial tongue: Design, construction, and assembly with various pathogenic bacteria for effective bacterial imaging and discrimination[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(34): 28331-28338.
- LUO H, REN X K, ZHANG B H, *et al.* Synthesis and properties of tetraphenylethylene derivatives with different chiral substituents: From helical supermolecular structure to circularly polarized luminescence[J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 188(4): 109148-109153.
- SHI J, ZHANG S, ZHENG M M, *et al.* A novel fluorometric turn-on assay for lipase activity based on an aggregation-induced emission (aie) luminogen[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 238(1): 765-771.
- YANG Z, FAN X, CHENG W, *et al.* AIE nanoassemblies for discrimination of glycosaminoglycans and heparin quality control[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 10295-10301.
- LI Q Y, WU Y H, LU H, *et al.* Construction of supramolecular nanoassembly for responsive bacterial elimination and effective bacterial detection [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(11): 10180-10189.
- CAO Y L, SHI S, WANG L L, *et al.* Ultrasensitive fluorescence detection of heparin based on quantum dots and a functional ruthenium polypyridyl complex[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55(12): 174-179.
- JIANG R, ZHAO S, CHEN L K, *et al.* Fluorescence detection of protamine, heparin and heparinase II based on a novel aie molecule with four carboxyl[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156(8): 1153-1159.
- LI S W, GAO M, WANG S X, *et al.* Light up detection of heparin based on aggregation-induced emission and synergistic counter ion displacement[J]. *Chem Commun*, 2017, 53(35): 4795-4798.
- ZHANG Z P, LI S, HUANG P C, *et al.* Colorimetric and fluorometric aggregation-based heparin assay by using gold nanoclusters and gold nanoparticles[J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(12): 790-798.
- PANG S, LIU S Y, SU X G. A fluorescence assay for the trace detection of protamine and heparin[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(49): 25857-25862.
- LIU H L, SONG P S, WEI R R, *et al.* A facile, sensitive and selective fluorescent probe for heparin based on aggregation-induced emission[J]. *Talanta*, 2014, 118(15): 348-352.
- GAO Y X, WEI K L, LI J Z, *et al.* A facile four-armed aie fluorescent sensor for heparin and protamine[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 277(20): 408-414.
- WEI W, WANG H J, JIANG C Q. Spectrofluorimetric determination of trace heparin using lomefloxacin-terbium probe[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2006, 63(2): 241-246.