

石墨烯量子点荧光猝灭-恢复法测定 Cu^{2+} 与谷胱甘肽的含量

宋凤娟¹, 艾永玲¹, 钟文英^{1,2*}, 王菁^{1,2**}

(中国药科大学¹医药生物功能材料重点实验室;²药物质量与安全预警教育部重点实验室,南京 210009)

摘要 通过在温和条件下氧化石墨粉的方法合成高分散性、高荧光强度的石墨烯量子点(GQDs),并运用此GQDs对 Cu^{2+} 和GSH具有荧光猝灭-恢复的效应,建立对这两种物质简便、快捷的检测方法。 Cu^{2+} 与GSH的浓度分别在1.0~10.0 mmol/L、0.1~1.0 mmol/L范围内与GQDs的荧光强度呈良好线性关系,检测限分别为0.01和0.1 mmol/L。此外,在实际样品的检测中,加标法测得的回收率分别为93%~101%、96%~107%。该方法操作简便,测定准确,精密度高,且常见的金属离子及潜在共存物质对 Cu^{2+} 与GSH的检测均没有干扰。

关键词 石墨烯量子点; Cu^{2+} ;谷胱甘肽;荧光猝灭-恢复;含量测定

中图分类号 R971 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)01-0087-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180112

引用本文 宋凤娟,艾永玲,钟文英,等. 石墨烯量子点荧光猝灭-恢复法测定 Cu^{2+} 与谷胱甘肽的含量[J]. 中国药科大学学报,2018,49(1):87-92.

Cite this article as: SONG Fengjuan, AI Yongling, ZHONG Wenying, et al. Detection of copper ions and glutathione based on off-on fluorescent graphene quantum dots[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(1):87-92.

Detection of copper ions and glutathione based on off-on fluorescent graphene quantum dots

SONG Fengjuan¹, AI Yongling¹, ZHONG Wenying^{1,2*}, WANG Jing^{1,2**}

¹Key Laboratory of Biomedical Functional Materials; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract We developed a rapid method to detect Cu^{2+} and glutathione (GSH) based on the fluorescence quenching-recovery properties of graphene quantum dots (GQDs), which were synthesized by the gentle oxidation of graphite powder. The results revealed that the fluorescence intensity of GQDs versus concentration of Cu^{2+} and GSH had good linearity, with the detection limits of 0.01 and 0.1 mmol/L, respectively. The fluorescence quenching was linearly proportional to the concentrations of Cu^{2+} ranging from 1.0 to 10.0 mmol/L; the fluorescence intensity was linearly enhanced with the concentrations of GSH ranging from 0.1 to 1.0 mmol/L. In addition, the method was successfully applied to the determination of real samples with recoveries falling between 93%~101% and 96%~107%, respectively. This method is simple, accurate and precise. There was no interference with other familiar co-existing metal ions and potential materials.

Key words graphene quantum dots; Cu^{2+} ; glutathione; fluorescence quenching-recovery; content determination

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21405178); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161455); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2016ZZD004) and the Open Project Fund of Key Laboratory of Biomedical Functional Materials of China Pharmaceutical University

收稿日期 2017-05-18 通信作者 * Tel: 025-86185180 E-mail: wyzhong@cpu.edu.cn

** Tel: 18652949200 E-mail: wangjing@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21405178);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20161455);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. 2016ZZD004);中国药科大学医药生物功能材料重点实验室开放基金资助项目

Cu^{2+} 是人体内及许多生物体内重要的金属元素之一,它对于人体的新陈代谢、免疫系统起着至关重要的作用^[1]。此外, Cu^{2+} 还可以与多种药物分子形成配合物以改变药物的疗效。传统检测 Cu^{2+} 的方法有分光光度法^[2]、原子吸收光谱法^[3]、电感耦合等离子体发射光谱法^[4]等,而这些方法都存在前处理比较复杂、仪器价格昂贵等缺点。因此,建立快速、准确、简便、成本低廉的检测微量 Cu^{2+} 方法是非常有必要的。

谷胱甘肽(GSH)是由谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸3种氨基酸组成^[5],GSH对于细胞的多种功能有重要作用^[6-7],同时GSH的巯基能与多种化学物质及代谢产物相结合,使其作为药物被广泛应用^[8-9,14-15]。因此,建立准确快速测定GSH的方法能为临床提供很多有用信息。通常用于检测GSH的方法有高效液相色谱法^[10]、高效毛细管电泳法^[11]、电化学法^[12]等。这些方法各有优点,但存在操作繁琐、耗费时间长等不足。近些年来发展起来的荧光分析方法,具有操作简便、快速和灵敏度高等优点,弥补了传统分析方法的不足,尤其是基于量子点(QDs)荧光分析方法,已发展成为一种新型并有效的方法。

相比于传统的荧光有机染料,QDs具有宽激发、窄发射、高荧光量子产率等优点,是一种理想的分析探针^[13]。其中石墨烯量子点(GQDs)是最近发现的粒径小于100 nm具有零维结构的石墨烯纳米片^[14]。与传统的QDs相比,GQDs具有较好的光稳定性、高的荧光活性、良好的抗光漂白能力和生物相容性,在各个领域引起较大关注并成为当前的研究热点之一。与此同时,越来越多的研究开始着重于发展一种能够顺序检测不同阳离子和氨基酸的传感技术^[15-16]。

基于以上出发点,本研究在温和的条件下氧化石墨粉,得到高分散、高荧光强度的GQDs溶液,并实现了顺序检测 Cu^{2+} 和GSH。由于GQDs表面的羧基能与 Cu^{2+} 通过静电相互作用,使荧光强度降低;而当体系中存在有GSH时,GSH的巯基又可与 Cu^{2+} 相结合,形成Cu-SR键,使GQDs的荧光恢复。因此,本研究利用GQDs荧光猝灭-恢复的现象建立了一种简便准确检测 Cu^{2+} 与GSH的方法,并应用于含 Cu^{2+} 与GSH实际样品的测定。

1 材料

1.1 试剂

谷胱甘肽(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);石墨粉(南京先丰纳米材料科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯;实验用水均为超纯水(电阻系数 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, Milli-Q, Millipore)。

1.2 仪器

UV-3600紫外可见吸收光谱仪,IRAffinity-1S红外光谱仪(日本岛津公司);Fluoromax-4荧光光谱仪(日本Horiba公司);2000型透射电子显微镜(TEM,日本Jeol公司);BS110S电子天平(德国赛多利斯公司);pHS-25型pH计(上海雷磁仪器厂)。

2 方法

2.1 GQDs的制备

GQDs按文献[17]方法合成有所改进,具体步骤为:称取石墨粉1.0 g,置于聚四氟乙烯反应釜中,加入浓 H_2SO_4 180 mL与浓 HNO_3 60 mL,混合均匀,超声2 h,80 °C水浴加热24 h。冷却至室温后,用超纯水800 mL稀释,对所获得的GQDs溶液用 Na_2CO_3 溶液中和至中性,透析、冷冻干燥,配制成1 mg/mL的GQDs储备液,储存于4 °C冰箱待用。

2.2 荧光法检测 Cu^{2+}

称取 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 适量,用超纯水溶解,配制成不同浓度系列的 Cu^{2+} 溶液。在1.5 mL离心管中,依次加入1 mg/mL的GQDs溶液50 μL 和不同浓度的 Cu^{2+} 储备液50 μL ,再用超纯水定容至500 μL ,涡旋混匀,于室温下放置20 min。以370 nm为激发波长,选狭缝宽度为10 nm/10 nm,测定其荧光强度。

2.3 荧光法检测GSH

称取GSH适量,用超纯水溶解,配制成不同浓度系列的GSH溶液。取经过100 mmol/L Cu^{2+} 猝灭的GQDs溶液450 μL ,加入不同浓度的GSH储备液50 μL ,涡旋混匀。以370 nm为激发波长,选狭缝宽度为10 nm/10 nm,测定其荧光强度。

3 结果与讨论

3.1 GQDs的表征

本实验中,通过对石墨粉进行混酸氧化的方式制备了GQDs,利用透射电子显微镜、荧光光谱仪、

紫外可见吸收光谱仪对合成的 GQDs 进行表征,如图 1 所示。图 1-A 为 GQDs 的 TEM 图谱与粒径分布图谱,可见合成的 GQDs 的粒径约为 5 nm,且分散均匀,这与粒径分布图集中显示的 4~6 nm 一致,结果表明用此方法合成的 GQDs 在溶液中大小均一、高度分散。如图 1-B,1-C 所示,激发波长在 300~370 nm 之间,GQDs 的荧光强度随着激发波长的红移而增加,在激发波长为 370 nm 时达到峰值,随后荧光强度逐渐降低,且发射峰位置在激发波长 300~400 nm 之间并没有明显的变化。因此本研究选取 370 nm 作为激发波长,GQDs 的荧光

最大发射峰的位置为 458 nm。紫外可见光谱图 1-D 中 230 nm 与 270 nm 的吸收峰为 GQDs 的特征峰,230 nm 的吸收峰是 $\text{C}=\text{C}$ 的 $\pi-\pi^*$ 跃迁形成,而 270 nm 的吸收峰是 $\text{C}=\text{O}$ 的 $n-\pi^*$ 跃迁形成。从 GQDs 的红外光谱图 1-E 可见,在 3447 cm^{-1} 处存在 $\text{C}-\text{OH}$ 的伸缩振动峰, $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰为 1640 cm^{-1} , $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的振动峰为 1093 cm^{-1} ,红外光谱图表明用此方法合成的 GQDs 表面含有丰富的含氧官能团。此外合成的 GQDs 荧光强度对 pH 有较强的依赖性,如图 1-F 所示,在 pH 为 7 时 GQDs 的荧光强度最高,因此选择此为体系反应 pH。

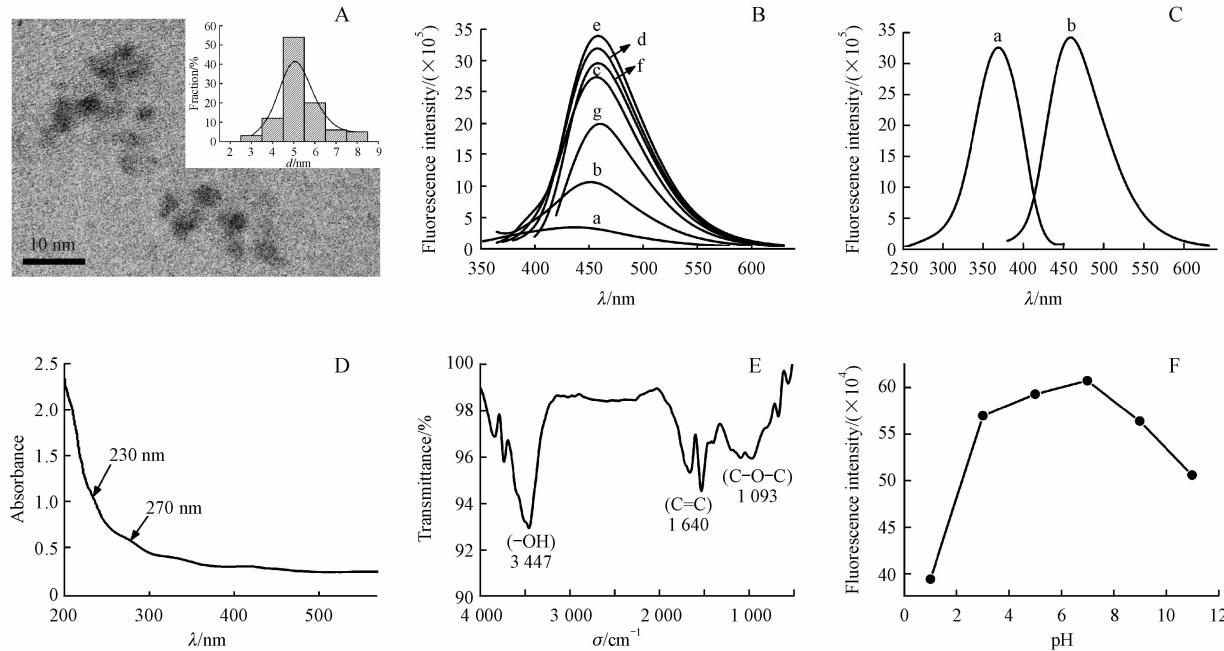


Figure 1 Characterization of graphene quantum dots (GQDs)

A:TEM images of GQDs, Inset: Corresponding size distribution of GQDs; B: Fluorescence spectra of GQDs at different excitation wavelengths: (a) 300 nm; (b) 325 nm; (c) 350 nm; (d) 360 nm; (e) 370 nm; (f) 380 nm; (g) 400 nm; C: Excitation spectra (a) and emission spectra (b) of GQDs; D: UV-Vis spectra of GQDs; E: FT-IR spectra of GQDs; F: Relationship between pH value and fluorescence intensity

3.2 Cu^{2+} 与 GSH 对 GQDs 荧光光谱的影响

实验研究表明, Cu^{2+} 和 GSH 先后加入 GQDs 溶液,会显著改变 GQDs 的荧光强度,结果如图 2 所示。由图 2 曲线 a、b 比较可见, GQDs 在加入 100 mmol/L Cu^{2+} 溶液 50 μL 之后,荧光强度大幅度降低,这是由于 GQDs 表面的羧基基团与 Cu^{2+} 通过静电作用结合, GQDs 处于激发态的电子转移至 Cu^{2+} 未占有电子能级的最低轨道上, GQDs 的电子以非辐射的形式回到基态,导致荧光强度降低^[18]。而随着 GSH 的加入到这个猝灭体系中, GQDs 的荧光强度又逐渐恢复(曲线 c)。但

若体系中没有 Cu^{2+} 存在,而只是加入相同量的 GSH,体系的荧光强度与 GQDs 本身荧光发射并没有明显变化(曲线 d)。这是由于 GSH 的巯基基团只与 Cu^{2+} 结合,从而形成 $\text{Cu}-\text{SR}$ 键, $\text{Cu}-\text{SR}$ 键的强度大于静电作用力的强度,因此 Cu^{2+} 会逐渐从 GQDs 表面脱离下来,使得 GQDs 的荧光强度得以恢复。

3.3 荧光猝灭法对 Cu^{2+} 的浓度测定

GQDs 荧光猝灭的程度与 Cu^{2+} 的浓度直接相关。图 3-A 呈现了随着不同浓度 Cu^{2+} 的加入, GQDs 的荧光强度逐渐降低,当 Cu^{2+} 的浓度达到

100 mmol/L 后, GQDs 的荧光强度随着 Cu^{2+} 加入变化很小, 基本上已经达到一个稳定值, 因此后续检测 GSH 时, 取 Cu^{2+} 的浓度为 100 mmol/L。 Cu^{2+} 的浓度测定结果如图 3-B 所示, 在 1.0 ~ 10.0 mmol/L 范围内与 GQDs 的荧光强度呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $F = -34863.81c + 762248.98$, 线性相关系数 (r) 达 0.9958, 检测限是 0.01 mmol/L。在相同条件下对 10 mmol/L 的 Cu^{2+} 标准溶液进行 6 次平均测定, 得到相对标准偏差 (RSD) 为 1.8%。以上可证明此荧光猝灭法能准确检测 Cu^{2+} 。

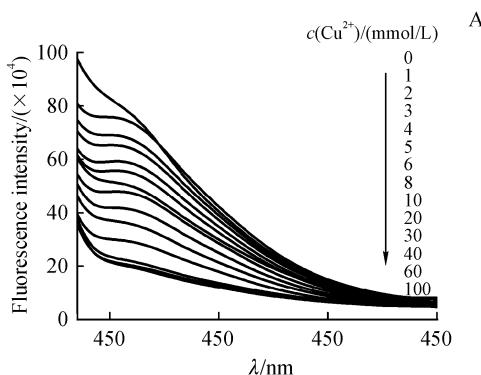


Figure 3 Determination of Cu^{2+} concentration by fluorescence quenching

A: Fluorescence spectra of 1 mg/mL GQDs with different concentration of Cu^{2+} ; B: Relationship between the fluorescence intensity and the concentration of Cu^{2+} , inset: Linear relationship with the concentration of Cu^{2+} in the range of 1.0-10.0 mmol/L ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 荧光恢复法对 GSH 的含量测定

为了考察猝灭后的 GQDs 荧光恢复程度能检测 GSH 的具体范围, 本研究向经过 100 mmol/L Cu^{2+} 猛灭的 GQDs 溶液中加入不同浓度的 GSH 溶液, 结果如图 4 所示。由于 GSH 的巯基基团与 Cu^{2+} 的相互作用, 随着不同浓度的 GSH 的加入, GQDs 的荧光强度逐渐恢复。但当 GSH 的浓度超过 1.0 mmol/L 时, GQDs 的荧光光谱变形, 这可能由于 GSH 与 Cu^{2+} 反应改变了 GQDs 所处的外界环境, 进而影响到峰形。GSH 的浓度在 0.1 ~ 1.0 mmol/L 范围内与 GQDs 的荧光强度呈线性关系, 线性方程为 $F = 370422.25c + 243862.20$, 线性相关系数达 0.9912, 检测限为 0.1 mmol/L。同样, 在相同条件下对 0.6 mmol/L 的 GSH 标准溶液进行了 6 次平均测定, 得到相对标准偏差 (RSD) 为 1.5%。因此表明这种利用 GQDs 荧光猝灭-恢复法对 GSH 的检测具有良好的准确度和精密度。

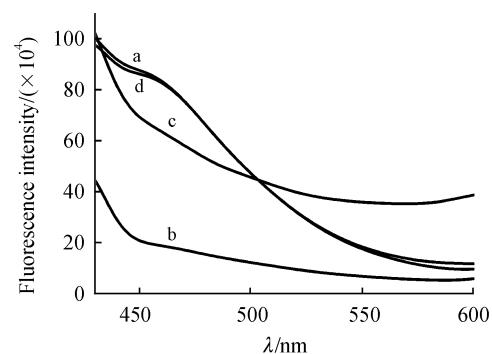
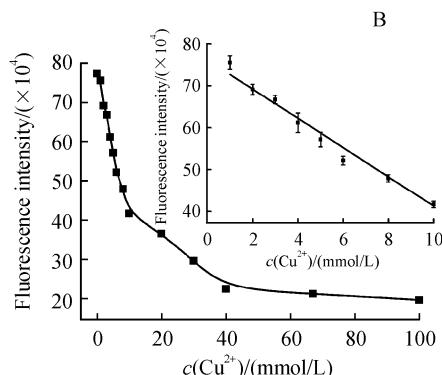


Figure 2 Fluorescence spectra of (a) GQDs, (b) GQDs + Cu^{2+} (100 mmol/L), (c) GQDs + Cu^{2+} (100 mmol/L) + GSH (1.0 mmol/L) and (d) GQDs + GSH (1.0 mmol/L)



3.5 荧光体系的选择性考察

特异性是衡量分析方法的一个重要指标。本研究在同样的实验条件下, 考察多种金属离子: Ag^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 单独存在以及与 Cu^{2+} 共存情况下对 GQDs 荧光强度的影响。其中其他金属离子浓度为 Cu^{2+} 浓度的 10 倍, 测定荧光强度变化 ΔI ($\Delta I = F_0 - F$, F_0 为 GQDs 的荧光强度, F 为加入金属离子后的荧光强度)。结果如图 5-A 所示, 除了 Cu^{2+} 能显著猝灭 GQDs 的荧光发射, 其余的离子对 GQDs 的荧光强度影响不大, 可以说明该方法对 Cu^{2+} 的检测有很好的选择性。

同样, 本研究也考察了 GSH 检测中共存物质的潜在干扰, 在经过 Cu^{2+} 猛灭的 GQDs 溶液中分别加入 4 种不同的蛋白: 半胱氨酸、葡萄糖、赖氨酸、多巴胺, 其浓度均设为 GSH 浓度的 10 倍, 测定荧光强度的变化 $\Delta I'$ ($\Delta I' = F' - F_0'$, F' 为加入蛋白后的荧光强度, F_0' 为被 100 mmol/L Cu^{2+} 猛灭后的 GQDs 荧光强度)。

强度),如图 5-B 所示,加入 GSH 之后 GQDs 的荧光强度有明显增强,然而其他蛋白并不能明显改变

GQDs 的荧光强度,结果显示此检测方法能很好地检测 GSH,并不受其余干扰物质的影响。

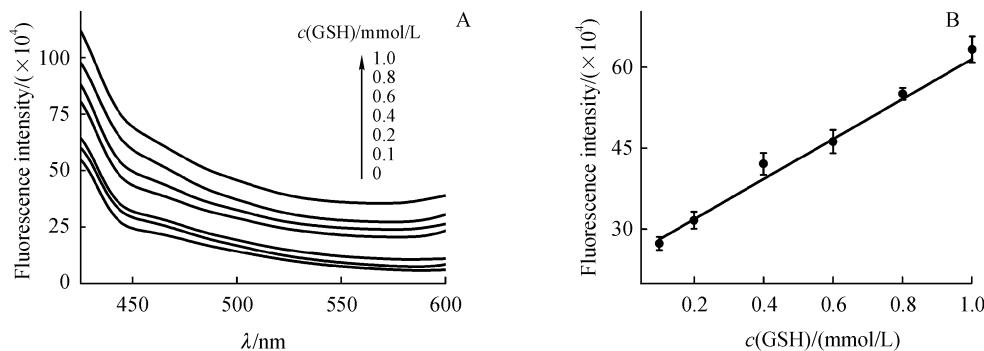


Figure 4 Determination of GSH concentration by fluorescence recovery

A:Fluorescence spectra of GQDs with different concentration of GSH. The concentration of GQDs and Cu^{2+} were 0.1 mg/mL and 100 mmol/L; B:Linear relationship with the concentration of GSH in the range of 0.1-1.0 mmol/L ($\bar{x} \pm s, n=3$)

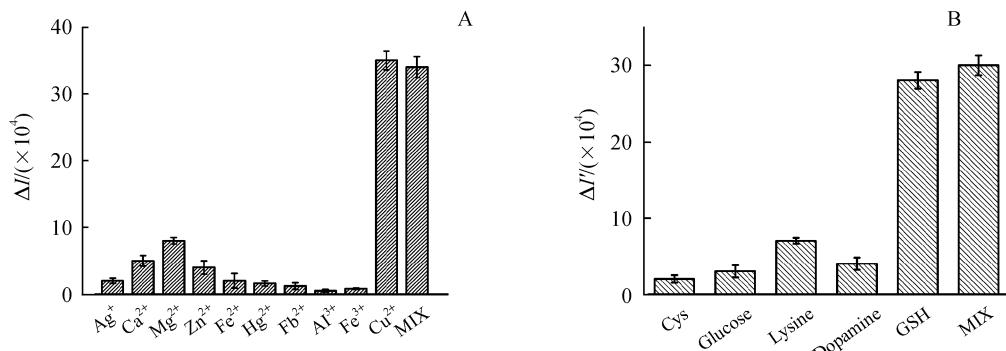


Figure 5 Selectivity of the fluorescence system

A:Quenched fluorescence intensity of GQDs containing different metal ions. The concentration of Cu^{2+} was 10 mmol/L and other metal ions were 100 mmol/L. $\Delta I = F_0 - F$, Where F_0 and F are the fluorescence intensity of the reaction mixture absence and in the presence of metal ions, respectively; B:Changed fluorescence intensity of quenched GQDs containing different proteins. The concentration of GSH was 0.6 mmol/L and other proteins were 6 mmol/L. $\Delta I' = F' - F'_0$, Where F' and F'_0 are the fluorescence intensity of the reaction mixture in the presence and absence of potential interfering materials, respectively ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 实际样品分析

为了进一步探索本检测方法对实际样品的应用,本研究利用药品阿司匹林能与加入的硫酸铜络合形成阿司匹林铜,在测定之前用盐酸与阿司匹林铜反应使得络合的 Cu^{2+} 再次游离到溶液中,用该方法检测所加入的 Cu^{2+} 浓度。加入的浓度分别为 3.0、5.0、7.0 mmol/L,结果如表 1 所示

回收率在 93.33% ~ 101.4%, RSD 不大于 4%,同样,采用加标回收法测定人血清样品中 GSH 的含量,加入浓度分别为 0.30、0.50、0.70 mmol/L,结果表明回收率在 95.76% ~ 106.7%, RSD 均小于 5%,因此,此检测方法对实际样品的检测结果也令人满意。

Table 1 Determination of Cu^{2+} and GSH in practical samples

Sample	Added/(mmol/L)	Found/(mmol/L)	Recovery/%	RSD/(%, n=5)
Copper-aspirin complex	3.0	2.8	93.33	4.0
	5.0	5.3	106.0	3.2
	7.0	7.1	101.4	3.5
Serum sample	0.30	0.32	106.7	4.8
	0.50	0.49	98.02	2.5
	0.70	0.67	95.76	3.8

4 结 论

本研究通过在温和条件下氧化石墨粉成功合成单分散的GQDs溶液,荧光强度高,粒径均一,并且利用GQDs荧光猝灭-恢复的效应,实现了对Cu²⁺与GSH灵敏检测,检测限分别为0.01和0.1 mmol/L。本文所建立的分析方法专属性强、重现性好、精密度高、操作简便,未来有希望为药物开发、药物检测提供支持。

参 考 文 献

- [1] Ji HF, Zhang HY. A new strategy to combat Alzheimer's disease combining radical-scavenging potential with metal-protein-attenuating ability in one molecule[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15**(1):21-24.
- [2] Tang LJ, Li FF, Liu MH, et al. A new rhodamine B derivative as a colorimetric chemosensor for recognition of copper (II) ion[J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2010, **31**(11):3212-3216.
- [3] Sahin CA, Tokgoz I. A novel solidified floating organic drop microextraction method for preconcentration and determination of copper ions by flow injection flame atomic absorption spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **667**(1/2):83-87.
- [4] Otero-Romani J, Moreda-Pineiro A, Bermejo-Barrera A, et al. Evaluation of commercial C18 cartridges for trace elements solid phase extraction from seawater followed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry determination [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, **536**(1/2):213-218.
- [5] Grek CL, Zhang J, Manevich Y, et al. Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation[J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(37):26497-26504.
- [6] Yu F, Li P, Wang BS, et al. Reversible near-infrared fluorescent probe introducing tellurium to mimetic glutathione peroxidase for monitoring the redox cycles between peroxynitrite and glutathione *in vivo*[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(20):7674-7680.
- [7] Samarasinghe KTG, Godage DNPM, VanHecke GC, et al. Metabolic synthesis of clickable glutathione for chemoselective detection of glutathionylation[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(33):11566-11569.
- [8] Chang RCC, So KF. Use of anti-aging herbal medicine, lycium barbarum, against aging-associated diseases. What do we know so far[J]? *Cell Mol Neurobiol*, 2008, **28**(5):643-652.
- [9] Hughes TB, Miller GP, Swamidass SJ. Site of reactivity models predict molecular reactivity of diverse chemicals with glutathione [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, **28**(4):797-809.
- [10] Assensi M, Sastre J, Pallardó FV, et al. A high performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples [J]. *Anal Biochem*, 1994, **217**(2):323-328.
- [11] Zhao M, Zhou MF, Feng H, et al. Determination of tryptophan, glutathione, and uric acid in human whole blood extract by capillary electrophoresis with a one-step electrochemically reduced graphene oxide modified microelectrode [J]. *Chromatographia*, 2016, **79**(13/14):911-918.
- [12] Wang Y, Lu J, Tang LH, et al. Graphene oxide amplified electro-generated chemiluminescence of quantum dots and its selective sensing for glutathione from thiol-containing compounds[J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(23):9710-9715.
- [13] Li XM, Rui MC, Song JZ, et al. Carbon and graphene quantum dots for optoelectronic and energy devices: a review [J]. *Adv Funct Mater*, 2015, **25**(31):4929-4947.
- [14] Zhao LM, Chen LN, Zhao SL. Detection of ascorbic acid by fluorescence probe based on graphene quantum dots [J]. *Chin J Lumin*(发光学报), 2017, **38**(1):124-131.
- [15] Hu Y, Heo CH, Kim G, et al. One-photon and two-photon sensing of biothiols using a bis-pyrene-Cu(II) ensemble and its application to image GSH in the cells and tissues[J]. *Anal Chem*, 2015, **87**(6):3308-3313.
- [16] You GR, Jang HJ, Jo TG, et al. A novel displacement-type colorimetric chemosensor for the detection of Cu²⁺ and GSH in aqueous solution[J]. *RSC Adv*, 2016, **6**(78):74400-74408.
- [17] Qian ZS, Shan XY, Chai LJ, et al. A fluorescent nanosensor based on graphene quantum dots-aptamer probe and graphene oxide platform for detection of lead (II) ion[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, **68**:225-231.
- [18] Li Z, Wang Y, Ni YN, et al. A rapid and label-free dual detection of Hg (II) and cysteine with the use of fluorescence switching of graphene quantum dots[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, **207**:490-497.