

新型壳聚糖荧光纳米粒的制备及 pH 敏感性能研究

余慧¹ 梁淑彩*² 钟海迪² 付婷¹ 鄢国平*¹

¹(武汉工程大学材料科学与工程学院, 武汉 430074) ²(武汉大学药学院, 武汉 430072)

摘要 以合成的具有羧基官能团的萘酰亚胺类化合物为荧光团, 通过酰氯化法活化其中的羧基, 并选用生物相容性较好的水溶性高分子聚合物——羧甲基壳聚糖(CMCS)为基质材料, 以化学键合的方式将荧光团引入到 CMCS 基体中, 得到新型荧光材料萘酰亚胺修饰羧甲基壳聚糖 CMCS3N。通过红外光谱、紫外光谱及透射电子显微镜对 CMCS3N 的结构和形态进行表征, 证明其具有纳米结构, 粒径约 40 nm。荧光显微镜成像结果表明: 在紫外光激发下, CMCS3N 发出黄绿色荧光。荧光光谱测试该荧光纳米粒的激发波长和发射波长分别为 409 和 534 nm, 在 pH 5~8 范围内, 其荧光对 pH 值敏感, 且 1.0×10^{-5} mol/L 常见金属离子对其荧光无明显影响。此荧光纳米粒可望作为 pH 敏感荧光探针, 用于生物体内 H⁺ 成像研究。

关键词 萘酰亚胺; 羧甲基壳聚糖; 荧光纳米粒; pH 敏感

1 引言

H⁺ 浓度变化是衡量生物体生理变化的最重要指标^[1]。荧光分析法采用各种荧光参数的变化测定 pH 值, 简便且灵敏度较好, 开发能够检测生物体内 H⁺ 变化的 pH 荧光探针在生物医学研究方面具有广阔的应用前景^[2,3]。相对于普通小分子荧光探针, 纳米粒子因易于修饰、改善生物相容性及提高灵敏度等优点具有明显优势, 因此被广泛用于食品检测, 药物载体以及光动力学疗法等方面^[4]。但采用包埋方式获得的纳米荧光材料容易造成荧光染料分子的泄露, 光稳定性差^[5~7]。因此, 开发生物相容性好且荧光稳定的 pH 纳米荧光探针具有重要意义。

羧甲基壳聚糖(CMCS)不仅具有良好的生物相容性和生物降解性能, 而且含丰富的羧基、氨基等活性官能团, 易于标记荧光分子和偶联生物活性物质, 是制备荧光纳米探针的良好材料^[8]。1,8-萘酰亚胺衍生物是一类非常重要的荧光材料, 具有斯托克斯位移大、荧光量子产率高、光稳定性好等优点^[9,10]。4-位哌嗪萘酰亚胺具有对 pH 的敏感性, 且具有大的荧光发射波长, 作为 pH 荧光探针在生化体系中可有效避开生物自发荧光和生物内源性物质的干扰^[11,12]。本实验合成了萘酰亚胺衍生物 *N*-(1-丁二酸单酰胺)-4-(*N*-甲基哌嗪)-1,8-萘酰亚胺(化合物 3), 采用化学键合法将其联接在 CMCS 上, 合成了具有萘酰亚胺荧光团的荧光材料, 并对其纳米结构和形态进行了表征。由于荧光团是采用化学键合的方式联接于 CMCS, 有效防止了荧光小分子的泄露。荧光测试结果表明, 此纳米粒荧光稳定性好, 在 pH 5~8 范围内, 对 pH 值有较好响应, 可望作为生物体内 pH 荧光探针, 用于生物体内 H⁺ 变化研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

INOVA400 型核磁共振仪(美国 Varian 公司); 20DXB 型红外光谱仪(美国 Nicolet 公司); S7-UV-1601 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 320-S 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); LS55 型荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司); JEM-100CXII 型透射电镜(日本电子株式会社); IX70 型荧光倒置显微镜(奥林巴斯公司)。

4-溴-1,8-萘酐(≥98.0%, 鞍山市惠丰化工有限责任公司); 羧甲基壳聚糖(粘度 20, 脱乙酰度 90.8%, 青岛海普生物公司); 其它试剂均为分析纯; 实验用水为二次蒸馏水。

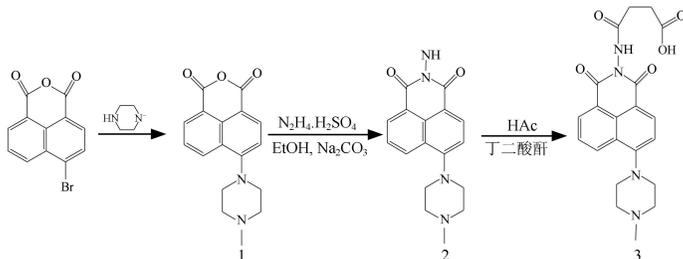
2.2 *N*-(1-丁二酸单酰胺)-4-(*N*-甲基哌嗪)-1,8-萘酰亚胺(化合物 3)的合成

2010-07-13 收稿; 2010-09-20 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20905059)及中央高校基本科研业务费专项资金(No. 3082014)资助项目

* E-mail: chirolab@gmail.com; guopyan2006@163.com

2.2.1 4-(*N*-甲基哌嗪)-1,8-萘酐(化合物 1)的合成 称取 8.00 g 4-溴-1,8-萘酐于 250 mL 两口瓶中,加入 70 mL 乙二醇甲醚作为溶剂,搅拌情况下加入 13 mL *N*-甲基哌嗪,回流,同时在 TLC 点板监测确定反应完成。趁热过滤,减压蒸去溶剂,加入适量冰醋酸,充分冷冻,抽滤得黄色固体 7.93 g,产率:92%, m. p. 105~106 °C,与文献[13]报道一致。



2.2.2 *N*-氨基-4-(*N*-甲基哌嗪)-1,8-萘酐酰胺(化合物 2)的合成 称取 5.00 g 化合物 1、6.75 g 硫酸胍, 10.82 g Na_2CO_3 于 250 mL 三口瓶中,加入 100 mL 无水乙醇作为溶剂,回流, TLC 监测反应。待反应结束后,将三口瓶放置稍冷,过滤,滤液静置过夜,过滤得黄色晶体;再用乙醇重结晶,得 3.84 g 黄色固体产品,产率 73%, m. p. 204~208 °C。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 2.46(s, 3H), 2.78(br, 4H), 3.34(br, 4H), 5.52(s, 2H), 7.21~7.26(t, 1H), 7.68~7.72(t, 1H), 8.42~8.44(d, 1H), 8.53~8.55(d, 1H), 8.60~8.62(d, 1H)。

IR (KBr, cm^{-1}): 3307, 3253, 2793~2930, 1691, 1636。

2.2.3 化合物 3 的合成 在 100 mL 单口瓶中加入 0.20 g (0.002 mol) 丁二酸酐和 0.62 g (0.002 mol) 化合物 2, 20 mL 乙酸, 室温搅拌, TLC 监测至反应完全后,减压蒸去大部分溶剂,加适量无水乙醇后静置,过滤析出的固体,干燥,得黄色固体产品 0.49 g,产率 60.5%, m. p. 149~151 °C。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): 1.91(s, 3H), 2.64(br, 2H), 2.73(br, 2H), 3.26(br, 4H), 3.43(br, 4H), 7.43~7.45(s, 1H), 7.85~7.87(d, 1H), 8.44~8.46(d, 1H), 8.51~8.53(d, 1H), 10.70(s, 1H)。

IR (KBr, cm^{-1}): 2850~3388 (宽峰), 1723, 1678。

2.3 含萘酐酰胺荧光团的羧甲基壳聚糖纳米粒(CMCS3N)的合成

称取 1.03 g (2.5 mmol) 化合物 3 于两口瓶中,加入 15.0 mL DMF, 搅拌溶解后缓慢滴加 1 mL 氯化亚砷,快速搅拌反应 2.5 h,加入 0.2 g/L 羧甲基壳聚糖的水溶液 5 mL,控制反应温度 40~50 °C,搅拌 4.5 h 后停止反应。将反应液放入透析袋(截留分子量 3500 Da),于 pH 3.5 的 HCl 溶液中透析。至透析液变无色透明时用荧光分光光度计测试透析液荧光强度(激发和发射波长分别为 409 和 534 nm),直到透析液荧光强度接近零,停止透析,取出透析袋内液体,减压蒸发除去溶剂干燥得 CMCS3N。

2.4 CMCS3N 中萘酐酰胺荧光团取代度的测定

分别配制一系列不同浓度的化合物 3 的水溶液,在 405 nm 测定其吸光度,绘制标准曲线。用 1% (V/V) 醋酸溶液配制 1.0 g/L CMCS3N 储备液,用蒸馏水稀释成 0.1 g/L 的工作溶液,并在 405 nm 测定其吸光度,代入标准曲线方程,得 CMCS3N 中化合物 3 的浓度 C_1 ,按式(1)计算取代度 n 。

$$n(\%) = \frac{C_1 / M_1}{(C_2 - C_1) / M_2}$$

式中, C_1 为化合物 3 的浓度(g/L); C_2 为 CMCS3N 浓度(g/L); M_1 为化合物 3 的摩尔质量; M_2 为羧甲基壳聚糖单元的摩尔质量。

2.5 CMCS3N 的形态观察和荧光显微镜观察

用透射电镜观察 CMCS3N 的胶束形态,将聚合物悬浊液滴在有 Formar 膜的铜网上,并进行负染,数分钟后用滤纸吸去多余的溶剂,自然干燥后进行透射电镜观察。

将 0.1 g/L CMCS3N 工作溶液置于荧光显微镜下观察,拍照。

2.6 荧光性质的研究

2.6.1 工作溶液的配制 用 1% (V/V) 醋酸溶液配制 1.0 g/L 的 CMCS3N 和化合物 3 的储备液, 临用时以水稀释至所需浓度的工作溶液。

磷酸盐缓冲溶液的配制: 将 0.05 mol/L Na_2HPO_4 , 0.2 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 以一定比例混合, 用 pH 计调节至所需 pH 值。

金属离子溶液的配制: 分别配制 1.0 mmol/L 的常见金属阳离子的溶液。

2.6.2 pH 值对 CMCS3N 和化合物 3 荧光性质的影响 分别移取 0.1 mL CMCS3N 和化合物 3 的工作溶液于 10 mL 比色管中, 用水定容, 荧光分光光度计测定其激发和发射光谱。

移取 CMCS3N 和化合物 3 的工作溶液 0.1 mL 于 10 mL 比色管中, 用不同 pH 值的缓冲溶液定容, 荧光分光光度计测定荧光激发与发射光谱。

2.6.3 金属离子对 CMCS3N 荧光性质的影响 分别移取 0.1 mL CMCS3N 及不同金属离子的工作溶液至 10 mL 比色管中, 用水定容, 荧光分光光度计测定荧光强度, 并与空白作对照。

3 结果与讨论

3.1 CMCS3N 的结构与形态表征

化合物 3 中的羧基经酰氯化后与羧甲基壳聚糖里的氨基反应, 从而实现荧光小分子的高分子化, 并且保留了羧甲基壳聚糖里的亲水基团羧基, 容易通过自组装得到荧光纳米材料。本研究采用红外光谱、紫外光谱及透射电镜等方法, 对合成的 CMCS3N 结构及形态进行了表征。结果证明, 已得到预期的荧光纳米材料。

3.1.1 CMCS3N 的结构表征和萘酰亚胺荧光团的取代度 红外光谱表明, CMCS 无芳环的骨架伸缩振动峰, 而 CMCS3N 在 1647 cm^{-1} 处有芳环特征吸收峰; CMCS 在紫外光谱仪的可检测区无明显的吸收峰, 而 CMCS3N 在 405 nm 处有明显吸收峰。这些结果证明, 化合物 3 已接枝到 CMCS 上。

紫外光谱分析得到化合物 3 的标准曲线方程: $y = 26.53x - 0.008$, $R^2 = 0.9977$ ($n = 6$)。根据标准曲线计算出 CMCS3N 中化合物 3 的摩尔取代度为 2.68%。

3.1.2 CMCS3N 的形态观察 CMCS3N 中含有亲水性羧基, 而萘酰亚胺部分具有疏水性。在透析的过程中, 由于分子内及分子间相互作用而自组装为纳米胶束。采用透射电镜观察其形态(如图 1)。结果显示, 此纳米胶束为规则球状颗粒, 平均粒径约为 40 nm。

3.2 荧光显微镜观察

荧光显微镜是利用一定波长的光激发被检样品产生荧光进行镜检的显微光学观测技术, 本实验利用它显微观察 CMCS3N 的荧光。由于壳聚糖本身不发射荧光, 而从图 2 可见, 在紫外光激发下, CMCS3N 发出黄绿色荧光, 说明化合物 3 在分子化后仍具有发射荧光的特性。

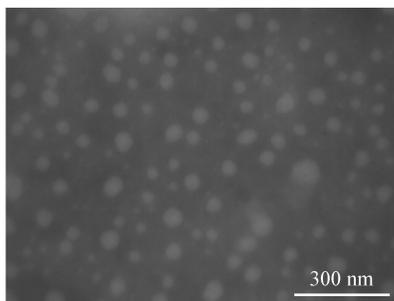


图 1 CMCS3N 纳米颗粒的透射电镜图

Fig. 1 TEM image of naphthalimide modified carboxy methyl chitosan (CMCS3N)

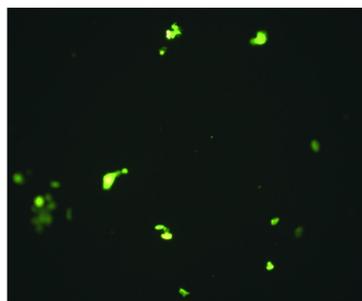


图 2 CMCS3N 的荧光显微镜图

Fig. 2 Fluorescence microscope image of CMCS3N

3.3 pH 值对化合物 3 和 CMCS3N 荧光性质的影响

化合物 3 与 CMCS3N 的荧光激发和发射光谱如图 3。由图 3 可见, 化合物 3 和 CMCS3N 的激发和发射波长均分别为 409 和 534 nm, 说明化合物 3 连接到 CMCS 后, 荧光波长并未发生改变。

已有研究^[14]表明, 4 位含有哌嗪基团的萘酰亚胺类分子具有 pH 值敏感性。本实验合成的化合物

3 具有 4-哌嗪萘酰亚胺结构, CMCS3N 也以化合物 3 为荧光响应基团, 因此它也可能具有 pH 值敏感性。本实验考察了 pH 值对 CMCS3N 及化合物 3 的荧光性质影响。在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中, CMCS3N 与化合物 3 的最大激发波长和最大发射波长均未发生位移, 但其荧光强度发生了变化, 结果见图 4。从图 4 可见, 化合物 3 和 CMCS3N 的荧光强度随 pH 值发生变化的趋势基本一致。在酸性条件下, 荧光较强。在碱性条件下, 荧光较弱, 且荧光强度在 pH 5~8 范围内急剧减小。这是由于在碱性条件下, 化合物 3 中 4 位的哌嗪基团作为强电子给体, 向萘酰亚胺进行光致电子转移 (PET), 从而猝灭萘酰亚胺的荧光。酸性条件下, 哌嗪基上的碱性氮原子质子化后, PET 过程中断, 荧光恢复。虽然壳聚糖分子链具有较多的羧基和氨基, 但并未对萘酰亚胺 4 位上哌嗪基对氢离子的识别能力造成明显影响。在 pH 5~8 范围内, CMCS3N 可以作为 pH 敏感荧光探针。

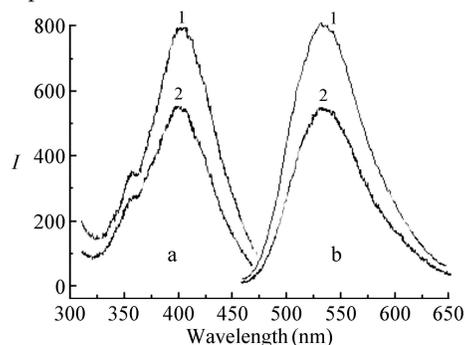


图 3 CMCS3N 与化合物 3 的荧光激发 (a) 和发射光谱 (b)

Fig. 3 Excitation spectra (a) and emission spectra (b) of compound 3 and CMCS3N

1. CMCS3N; 2. Compound 3

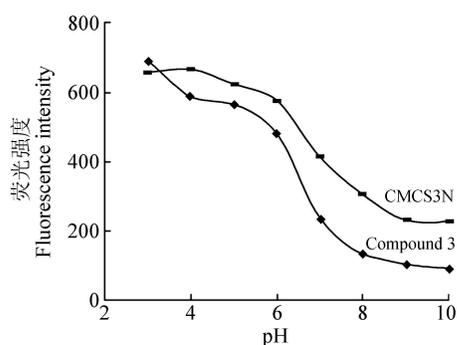


图 4 CMCS3N 与化合物 3 在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中的荧光强度

Fig. 4 Effect of pH on fluorescence intensity of compound 3 and CMCS3N

3.4 金属离子对 CMCS3N 荧光性质的影响

考虑到 CMCS3N 具有较多的杂原子, 可能会与金属离子发生反应。本实验考察了常见金属离子 Zn^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Li^+ , Cu^{2+} 对 CMCS3N 荧光强度的影响。实验表明, 10 mmol/L 金属离子存在时, 对 CMCS3N 荧光强度的影响均小于 3.7%。

结果表明, 此纳米粒具有较长的荧光发射波长, 在 pH 5~8 范围内, 其荧光对 pH 值敏感, 10 mmol/L 常见金属离子对其荧光无影响。此荧光纳米粒可望用于检测活细胞内的 pH 值动态变化。

References

- Safavi A, Abdollahi H. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 367(2): 167~173
- Baruah M, Qin W W, Basaric N, De Borggraeve W M, Boens N. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70(10): 4152~4157
- Yamasaki R, Ito M, Lee B, Jung H, Lee H, Kawai T. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 603(1): 76~81
- JIN Yi Guang, WU Lai Long (金义光, 吴来龙). *J. Int. Pharmaceut. Res.* (国际药学研究杂志), **2009**, 36(3): 234~237
- Salmon L, Molnar G, Zitouni D, Quintero C, Bergaud C, Micheau J C, Bousseksou A. *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20(26): 5499~5503
- LIN Zhang Bi, SU Xing-Guang, ZHANG Jia Ye, JIN Qir Han (林章碧, 苏星光, 张家骅, 金钦汉). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2002**, 30(2): 237~241
- Molnar R M, Bodnar M, Hartmann J F. *Colloid. Polym. Sci.*, **2009**, 287(6): 739~744
- YU Yang, YIN Jing Bo, LUO Kun, XIE Yong Tao, YAN Shi Feng, MA Jia, CHEN Xue Si (郁杨, 尹静波, 罗城, 谢勇涛, 颜世峰, 马嘉, 陈学思). *Chem. J. Chinese University* (高等学校化学学报), **2008**, 29(2): 409~414
- Staneva D, McKenna M, Bosch P, Grabchev I. *SAA*, **2010**, 76(2): 150~154
- Xu Z C, Han S J, Chongmok L. *Chem. Commun.*, **2010**, 46(10): 1679~1681
- Xu Z, Tang J, Tian H. *Chin. Chem. Lett.*, **2008**, 19(2): 1353~1357
- Ogawa M, Kosaka N, Regino CAS. *Mol. Biosyst.*, **2010**, 6(5): 880~893
- ZHANG Yue Hua, ZHANG Qi Ping, LEI Wu (张跃华, 张其平, 雷武). *Speciality Petrochemicals* (精细石油化工), **2008**, 29(2): 409~414

工), 2008, 25(5): 60~64

14 Georgiev N I, Bojinov V B, Nikolov P S. *Dyes and Pigments*, 2009, 81(1): 18~26

Synthesis and Properties of New pH Sensitive Chitosan Fluorescent Nanoparticles

YU Hui¹, LIANG Shu Cai^{*2}, ZHONG Hai Di², FU Ting¹, YAN Guo Ping^{*1}

¹(School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074)

²(College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract A new naphthalimide kind of carboxyl containing fluorophore was synthesized, and then the fluorescent polymer naphthalimide-modified carboxymethyl chitosan (CMCS3N) was developed by the way of chemical bonding of the synthesized naphthalimide fluorophore into carboxymethyl chitosan (CMCS), a water-soluble polymer with good biocompatibility. The structures and morphology of CMCS3N have been characterized by the methods of infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy and transmission electron microscopy. The results showed that the fluorescent polymer has nanostructure with diameters of about 40 nm. The fluorescence microscopy images illustrated CMCS3N could give yellow-green fluorescence under UV-light. The excitation and emission wavelengths of the nanoparticles have been obtained by fluorescent spectroscopy with 409 nm and 534 nm, respectively. The fluorescence of CMCS3N was sensitive to pH in the range from pH 5 to 8 and 1.0×10^{-5} mol/L of common metal cations had no obvious effect on the fluorescence intensity. The results indicated CMCS3N could be used as pH sensitive fluorescent probes in vivo imaging.

Keywords Naphthalimide; Carboxymethyl chitosan; Fluorescent nanoparticles; pH sensitive

(Received 13 July 2010; accepted 20 September 2010)

《英汉·汉英分析检测词汇》

该词典为适应分析检测发展和市场的需要,在《英汉·汉英分析化学词汇》所收词汇的基础上,收入了物性检测、生物医药、司法刑侦和商品检验等方面的词汇近 20000 余条,增补了近年来新出现的词汇约 2500 条,共收录英汉词汇 50000 余条,汉英词汇 50000 余条,词汇涵盖分析检测技术涉及的物质名词、性能、方法、原理、技术、设备、过程等多方面。收词专业、全面、新颖,具有很强的实用性,并且编排更具人性化,便于读者查找使用。

该词典可供分析检测领域从业者,相关领域的科研人员、贸易人员、企业管理人员及相关专业的大专院校师生参考使用。

该词典由周同惠主编,化学工业出版社于 2010 年 1 月出版,定价 148.00 元。