



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113681022 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 23

(21) 申请号 202110998639.3

C09K 11/58 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.27

G01N 21/64 (2006.01)

(71) 申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路  
381号

(72) 发明人 刘锦斌 曾银

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍 江裕强

(51) Int. Cl.

B22F 9/24 (2006.01)

B22F 1/00 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

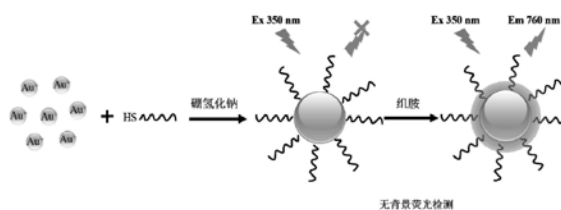
权利要求书1页 说明书5页 附图7页

### (54) 发明名称

一种无荧光背景的金纳米材料及其制备方法  
与用于体外检测组胺和活体内组胺成像的方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种无荧光背景的金纳米材料及其制备方法与用于体外检测组胺和活体内组胺成像的方法。该制备方法包括如下步骤：将氯金酸与硫醇小分子化合物和溶剂混合，搅拌，加入还原剂反应，超滤提纯得到无荧光背景的金纳米材料。本发明还将不发光的金纳米材料应用于组胺的高灵敏光学检测，与常用的组胺检测金纳米材料比较，该材料没有荧光背景，是一种点亮型的无背景组胺检测材料，且稳定性高，干扰小。该不发光的金纳米材料制备方法简单，成本低，易于工业化生产，且由于材料无背景，在溶液遇到组胺，可观察到无荧光的纳米金逐渐产生近红外发光。另外，此不发光的金纳米材料用于活体内成像研究也有很好的效果。



1. 一种无荧光背景的金纳米材料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将氯金酸与硫醇小分子化合物和溶剂混合,搅拌,加入还原剂反应,超滤提纯得到无荧光背景的金纳米材料。

2. 根据权利要求1所述的无荧光背景的金纳米材料的制备方法,其特征在于:所述硫醇小分子化合物为巯基聚乙二醇、谷胱甘肽、巯基乙醇、巯基丙磺酸钠,或者结构为R-SH的化合物;

式中,R为含有羟基、两性官能团的烷基链化合物。

3. 根据权利要求1所述的无荧光背景的金纳米材料的制备方法,其特征在于:所述还原剂为一氧化碳、四羟甲基氯化磷、水合肼、四丁基硼氢化物、硼烷叔丁基胺或硼氢化钠中的一种以上,其中一氧化碳的压力为1-50个大气压;所述溶剂为正己烷、环己烷、对二甲苯、乙腈或水中的一种以上。

4. 根据权利要求1所述的无荧光背景的金纳米材料的制备方法,其特征在于:所述氯金酸与硫醇小分子化合物的摩尔比为1:0.5至1:1.5;所述氯金酸与还原剂的摩尔比为1:0.5至1:10;

所述搅拌的温度为0-40℃,搅拌的时间为5-60min;

所述加入还原剂反应的温度为0-15℃,反应的时间为5-720min。

5. 根据权利要求1所述的无荧光背景的金纳米材料的制备方法,其特征在于:所述超滤提纯为离心去除反应中形成的大颗粒,透析去除多余的未反应物,超滤离心浓缩;

所述离心的温度为0-15℃,离心力为10000-21000g;所述超滤离心次数为3-12次,超滤离心采用pH=7-14的超纯水为洗液,所述超滤离心浓缩使用超滤管的膜孔径为3-50kDa。

6. 权利要求1-5任一项所述的制备方法制备的无荧光背景的金纳米材料,其特征在于:所述金纳米材料为单分散纳米材料,单颗金纳米粒子粒径为1-3nm。

7. 权利要求6所述的无荧光背景的金纳米材料用于体外检测组胺的方法,其特征在于,包括以下步骤:

将无荧光背景的金纳米材料加入水中形成溶液,再加入待测溶液混匀得混合液,孵化后,通过荧光光谱仪检测溶液荧光变化。

8. 根据权利要求7所述的无荧光背景的金纳米材料用于体外检测组胺的方法,其特征在于:所述混合液中无荧光背景的金纳米材料的终浓度为20nM-800nM,组胺的终浓度为0-1mM;孵化时间为5min-12h,孵化温度为0-40℃。

9. 权利要求6所述的无荧光背景的金纳米材料用于活体内组胺成像的方法,其特征在于,包括以下步骤:

将所述无荧光背景金纳米材料及组胺用DPBS稀释,采用皮下注射方式注射,荧光点亮效果使用活体成像系统观察。

10. 根据权利要求9所述的无荧光背景的金纳米材料用于活体内检测组胺的方法,其特征在于:所述无荧光背景的金纳米材料的浓度为1μM-10μM,组胺浓度为0-5mM,成像观察时间为0-10h;

所述荧光点亮的激发波长范围为300-550nm,所述无荧光背景的金纳米材料发射波长范围为600-850nm,所述成像过程观察使用活体成像系统观察荧光变化。

## 一种无荧光背景的金纳米材料及其制备方法与用于体外检测 组胺和活体内组胺成像的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于功能光学纳米材料领域,具体涉及一种无荧光背景的金纳米材料及其制备方法与用于体外检测组胺和活体内组胺成像的方法。

### 背景技术

[0002] 荧光探针的光学成像由于其无创、快速响应和高灵敏度的特点,在生物学传感和成像中得到了广泛的应用。它可以直接可视化各种生物分子相互作用和病理过程,定量检测与疾病诊断相关的基本分析物。然而,常规荧光成像在可见光谱范围内存在严重的组织散射、光吸收和自身荧光,导致低信号-背景比和组织穿透深度不足。与可见光区相比,近红外一区(NIR-I)(650-1000nm)的荧光成像技术由于具有提高组织穿透性、降低自身荧光、降低组织损伤等优点而在近十年来得到了广泛的应用。

[0003] 近红外荧光探针库在过去的十年里急剧扩大,包含了各种各样的探针,可以分为两大类:始终开启探针和点亮型探针。始终开启探针的荧光成像是生物成像和生物传感的核心。用于始终开启探针设计的荧光报道主要在可见或较好地近红外窗口发射,包括小型有机染料,基因表达荧光蛋白,无机纳米材料,如量子点,这些始终开启的荧光探针通常通过积累和保留作为信号增强造影剂,而不是在接近或与感兴趣的目标相互作用时改变其荧光信号。但是,此类型探针需要比较长的时间去清除多余的或未绑定的探针,以产生足够的信噪比用于成像或传感。作为有机染料和量子点的替代品,少原子荧光贵金属纳米团簇由于其超小尺寸,光稳定性好,生物相容性好,水溶性好。

[0004] 近年来引进了许多优良的探针,但目前大部分点亮型是基于荧光共振能量转移(FRET)这一原理,需要附加一个额外的分子作为能量转移剂。现有的大部分点亮型的荧光探针发射波长未达到近红外波段,导致组织荧光穿透深度有限,且自身荧光干扰较大。点亮型荧光探针对于疾病相关的微环境指标或小分子(如低氧、pH、酶、活性氧、活性硫、金属离子、肿瘤相关受体、抗原、组胺等)作用,其荧光由关闭状态切换到荧光打开状态。与传统的始终打开的探针相比,点亮型荧光探针不仅可以放大目标信号,还可以将背景信号降低到最小,从而提高信噪比,降低检测限,从而提高生物传感器的灵敏度和生物成像的分辨率。

[0005] 组胺是生物胺家族的成员,由组氨酸通过组氨酸脱羧酶的催化作用产生,存储在肥大细胞和嗜碱性粒细胞颗粒中。血浆中组胺在几纳摩尔浓度内,但一些病理条件会增加组胺的水平。例如,血凝素浓度的突然升高是炎症的明确标志,突触囊泡中丰富的组胺也被报道参与神经传递。然而,缺乏合适的工具来实时监测组胺。目前有多种检测组胺的方法,这些方法大多数是基于仪器分析,如气相色谱技术、高效液相色谱法、生物电催化法和酶放射性标记等。然而这些技术不能以非侵入的方式和实时监控生物组胺水平。

[0006] 利用分子探针进行荧光检测是组胺生物成像的理想方法,因为它具有高时空分辨率。到目前为止,一些组胺的荧光探针已经开发出来,值得注意的是,这些组胺探针在与组胺相互作用时,材料本身就有荧光,导致其信噪比不高。而且由于仪器漂移或探针在感兴趣

位置的不均匀分布,这种荧光生物成像的信号保真度低较低。此外,很多材料的荧光增强在可见光区,导致其信号易受生物自发荧光干扰(Wang J,Li D,Ye Y,et al.A Fluorescent Metal-Organic Framework for Food Real-Time Visual Monitoring[J].Advanced Materials,2021,33(15):2008020;Song L,Xiao J,Cui R,et al.Eu<sup>3+</sup>doped bismuth metal-organic frameworks with ultrahigh fluorescence quantum yield and act as ratiometric turn-on sensor for histidine detection[J].Sensors and Actuators B:Chemical,2021,336:129753.)。因此,开发一种新型的组胺点亮型探针是很有必要的,它可以提高灵敏度和生物成像的分辨率。

## 发明内容

[0007] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明提供了无荧光背景的金纳米材料对组胺的近红外点亮型检测及在活体成像方面的应用方法。本发明提供的无荧光背景的金纳米材料具有近红外光区点亮的发光性质,可通过多种分析手段同步监测,包括使用荧光光谱仪检测纳米粒子的组胺点亮效果、通过活体成像系统实时观测其无背景组胺体内成像,具有实际检测的价值。

[0008] 本发明的目的通过如下技术方案来实现。

[0009] 一种无荧光背景的金纳米材料的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 将氯金酸与硫醇小分子化合物和溶剂混合,搅拌,加入还原剂反应,超滤提纯得到无荧光背景的金纳米材料。

[0011] 优选的,所述硫醇小分子化合物为巯基聚乙二醇、谷胱甘肽、巯基乙醇、巯基丙磺酸钠,或者结构为R-SH的化合物;

[0012] 式中,R为含有羟基、两性官能团的烷基链化合物。

[0013] 优选的,所述还原剂为一氧化碳、四羟甲基氯化磷、水合肼、四丁基硼氢化物、硼烷叔丁基胺或硼氢化钠中的一种以上,其中一氧化碳的压力为1-50个大气压;所述溶剂为正己烷、环己烷、对二甲苯、乙腈或水中的一种以上。

[0014] 优选的,所述氯金酸与硫醇小分子化合物的摩尔比为1:0.5至1:1.5;所述氯金酸与还原剂的摩尔比为1:0.5至1:10;

[0015] 优选的,所述搅拌的温度为0-40℃,搅拌的时间为5-60min;

[0016] 优选的,所述加入还原剂反应的温度为0-15℃,反应的时间为5-720min;进一步优选的,反应的时间为5-180min。

[0017] 优选的,所述超滤提纯为离心去除反应中形成的大颗粒,透析去除多余的未反应物,超滤离心浓缩;

[0018] 进一步优选的,所述离心的温度为0-15℃,离心力为10000-21000g;所述超滤离心次数为3-12次,超滤离心采用pH=7-14的超纯水为洗液,所述超滤离心浓缩使用超滤管的膜孔径为3-50kDa。

[0019] 上述的制备方法制备的无荧光背景的金纳米材料,所述金纳米材料为单分散纳米材料,单颗金纳米粒子粒径为1-3nm。

[0020] 上述的无荧光背景的金纳米材料用于体外检测组胺的方法,包括以下步骤:

[0021] 将无荧光背景的金纳米材料加入水中形成溶液,再加入待测溶液混匀得混合液,

孵化后,通过荧光光谱仪检测溶液荧光变化。

[0022] 优选的,所述混合液中无荧光背景的金纳米材料的终浓度为20nM-800nM,组胺的终浓度为0-1mM;孵化时间为5min-12h;

[0023] 优选的,所述孵化温度为0-40℃;进一步优选的,所述孵化温度为37℃。

[0024] 上述的无荧光背景的金纳米材料用于活体内组胺成像的方法,包括以下步骤:

[0025] 将所述无荧光背景金纳米材料及组胺用DPBS稀释,采用皮下注射方式注射,荧光点亮效果使用活体成像系统观察。

[0026] 优选的,所述无荧光背景的金纳米材料的浓度为1 $\mu$ M-10 $\mu$ M,组胺浓度为0-5mM,成像观察时间为0-10h;

[0027] 优选的,所述荧光点亮的激发波长范围为300-550nm,所述无荧光背景的金纳米材料发射波长范围为600-850nm,所述成像过程观察使用活体成像系统观察荧光变化。

[0028] 与常用的组胺检测金纳米材料比较,该材料没有荧光背景,是一种点亮型的无背景组胺检测材料,且稳定性高,干扰小。该不发光的金纳米材料制备方法简单,成本低,易于工业化生产,且由于材料无背景,在溶液遇到组胺,可观察到无荧光的纳米金逐渐产生近红外发光。另外,此不发光的金纳米材料用于活体内成像研究也有很好的效果。

[0029] 本发明合成的近红外点亮型的无背景组胺检测金纳米材料生物相容性好,毒性低,在活体内成像方面,具有良好的效果;而此近红外点亮型的无背景组胺检测金纳米材料在DPBS、pH 2-12、NaCl等条件下荧光稳定性好,量子效率高,用活体成像系统可实时观测到体内组胺点亮的情况,故此近红外点亮型的无背景组胺检测金纳米材料在体外检测组胺、活体组胺示踪等领域具有较大的应用前景。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和技术效果:

[0031] (1) 本发明合成的近红外点亮型的无背景组胺检测金纳米材料,合成工艺简单,成本低,易于工业化生产。

[0032] (2) 本发明合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料生物相容性好,操作简单、稳定性好、激发波长范围广,探针与被分析物作用实现无背景点亮型近红外发射,消除背景干扰,提高信噪比;同时对组胺点亮选择性好,抗干扰能力强。

[0033] (3) 本发明合成的近红外点亮型的无背景组胺检测金纳米材料用于研究体内成像操作简单,可以通过活体成像系统来实时观察。

## 附图说明

[0034] 图1为实施例1中无背景的金纳米材料被组胺点亮后的荧光激发光谱、荧光发射光谱以及紫外吸收光谱图。

[0035] 图2为实施例1中近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料的X射线光电子能谱图。

[0036] 图3为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料的透射电子显微镜图。

[0037] 图4为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在DPBS条件下荧光发射光谱图稳定性图。

[0038] 图5为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在DPBS条件下紫外吸收光谱稳定性图。

[0039] 图6为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同NaCl浓度下的荧光发射光谱图稳定性图。

[0040] 图7为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同NaCl浓度下的紫外吸收光谱稳定性图。

[0041] 图8为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同pH条件下的荧光发射光谱图稳定性图。

[0042] 图9为实施例1中合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同pH条件下的紫外吸收光谱稳定性图。

[0043] 图10为实施例2中近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料用于检测不同浓度组胺的荧光发射光谱变化光谱图。

[0044] 图11为实施例2中近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料用于检测一系列浓度不同胺的在760nm波长的荧光发射光谱变化对比图。

[0045] 图12为实施例2中近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料抗巯基干扰的荧光对比图。

[0046] 图13为实施例3中近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在小鼠体内的成像图。

[0047] 图14为本发明近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料的制备流程图和发光原理图。

## 具体实施方式

[0048] 以下结合具体实施例及附图对本发明技术方案作进一步详细的描述,但本发明的保护范围及实施方式不限于此。

[0049] 具体实施例中,观察近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料发光性质及其在活体成像分析等方面的仪器主要包含美国PerkinElmer荧光/磷光/发光光度计(LS-55)和美国Analytikjena成像系统(UVP ChemStudio 815)等。

[0050] 图14为本发明近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料的制备流程图和发光原理图。

[0051] 实施例1

[0052] 本发明制备近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料的实施方案如下:在室温条件下,将250 $\mu$ L氯金酸水溶液(100mM)、350 $\mu$ L巯基丙磺酸钠水溶液(100mM)和49mL水加入100mL三颈烧瓶中,室温搅拌10min后,将反应移入冰浴搅拌,加入500 $\mu$ L硼氢化钠水溶液(400mM),冰浴下反应3小时,溶液由浅黄色到无色透明最后到棕黄色,停止反应,用超滤离心管在pH为中性的超纯水中超滤离心3-12次(离心温度为10 $^{\circ}$ C,离心力为21000g)去除反应中形成的大颗粒,透析去除多余的小分子,最后用10kDa的超滤管超滤浓缩透析液,得到目标产物,放入4 $^{\circ}$ C冰箱储存备用。

[0053] 图1中被组胺点亮后的无背景金纳米材料的荧光激发光谱、荧光发射光谱以及紫外吸收光谱图,在760nm处有最大发射峰(组胺终浓度20 $\mu$ M,金纳米终浓度0.2 $\mu$ M)。

[0054] 图2为合成的产物的X射线光电子能谱图,Au(I)含量较少(Au(I)含量为32.45%)。

[0055] 图3为合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料的透射电子显微镜图,其粒径为1.0~3.0nm。

[0056] 图4表示合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在DPBS条件下荧光稳定性好。

[0057] 图5表示合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在DPBS条件下紫外稳定性好。

[0058] 图6表示合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同NaCl浓度下的荧光稳定性好。

[0059] 图7表示合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同NaCl浓度下的紫外稳定性好。

[0060] 图8表示合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同pH条件下的荧光稳定性好。

[0061] 图9表示近合成的近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同pH条件下的紫外稳定性好。

[0062] 实施例2

[0063] 实施例1制备近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料用于体外检测组胺的实施方案如下:先将实施例1制备的浓缩好的无背景金纳米材料稀释到0.1-1 $\mu$ M,取160 $\mu$ L以上制备的纳米材料、20 $\mu$ L pH=7.4PB和20 $\mu$ L不同浓度的组胺(或其他胺类物质)混合,于37 $^{\circ}$ C孵化,用荧光光谱仪测荧光的变化。

[0064] 图10为近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料用于检测不同浓度组胺的荧光变化光谱图,如图所示随着浓度增大呈线性关系。

[0065] 图11为近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料用于检测一系列浓度不同胺的荧光变化对比图,如图所示近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料展现了很好组胺选择性检测。

[0066] 图12为近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料抗巯基干扰的荧光对比图,如图所示近红外组胺点亮的无背景金纳米材料展现了很好的抗巯基的干扰能力。

[0067] 实施例3

[0068] 实施例1制备近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料用于活体成像的具体实施方案如下:将小鼠固定在活体成像仪内,于背部皮下1跟2号部位分别依次注射DPBS+金纳米材料和1mM组胺+金纳米材料,用活体观察材料在不同的时间内(15min、30min、60min)体内成像情况。

[0069] 图13为近红外组胺点亮的无背景的金纳米材料在不同时间下活体成像情况,如图所示15min内荧光达到最强,且与对照组有显著性差异。

[0070] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

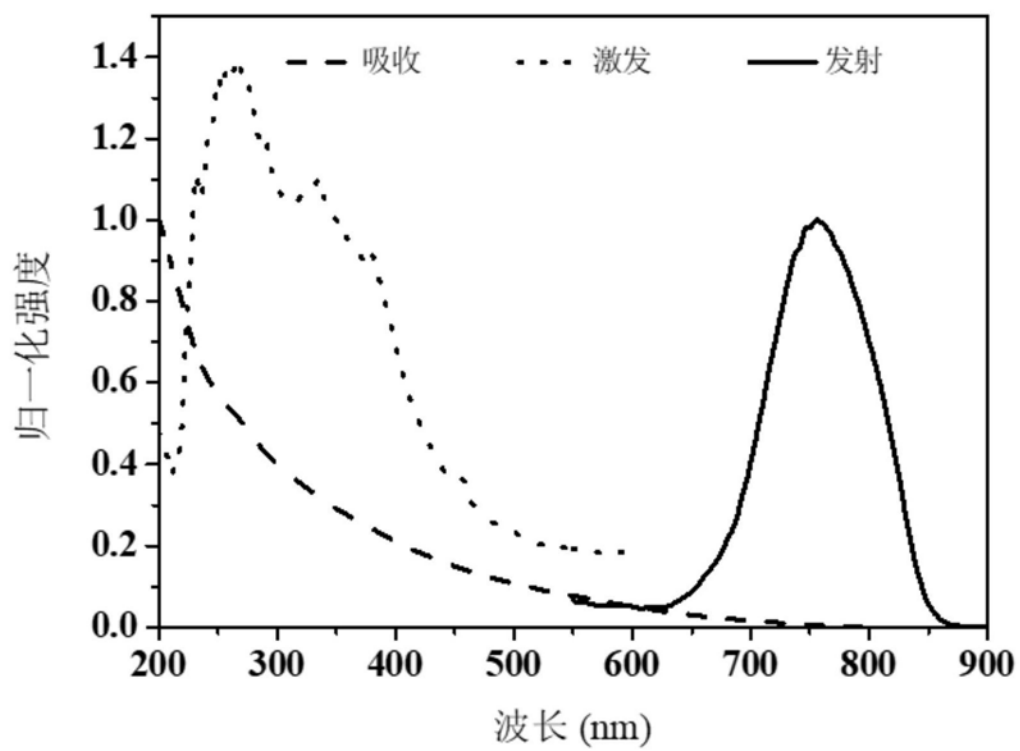


图1

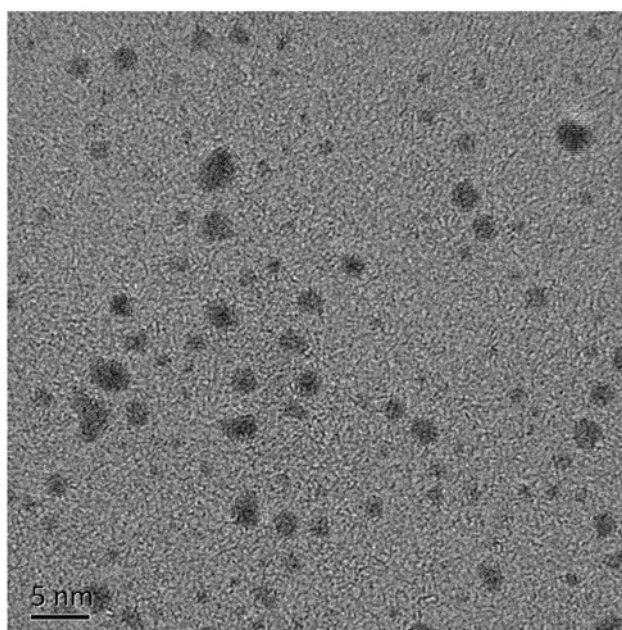


图2



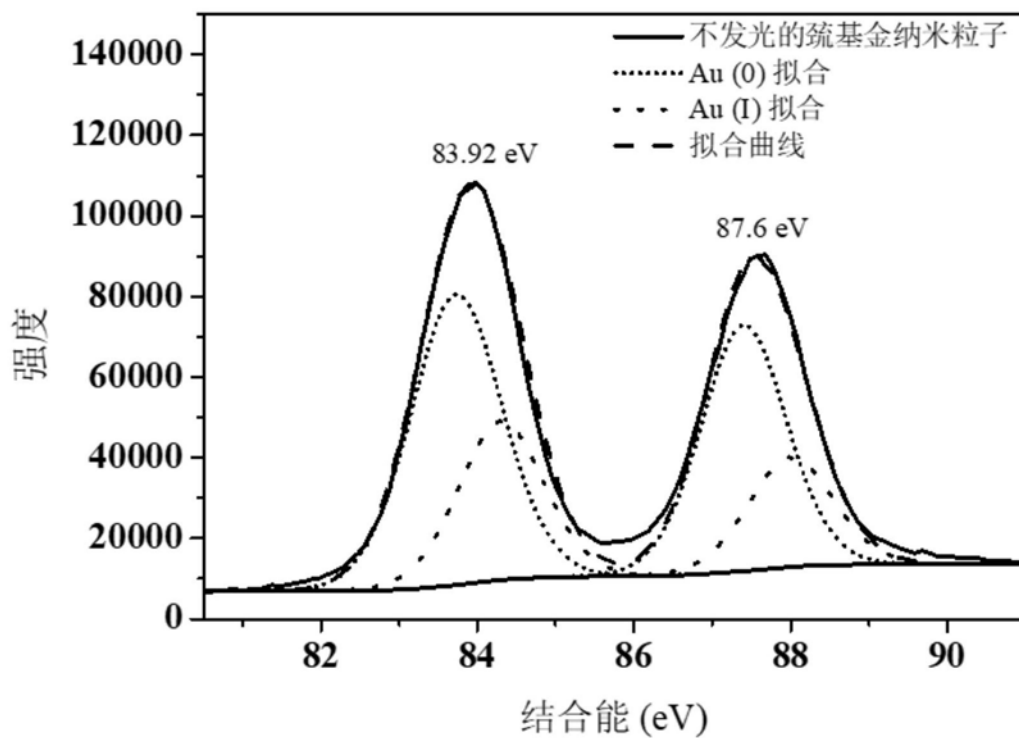


图3

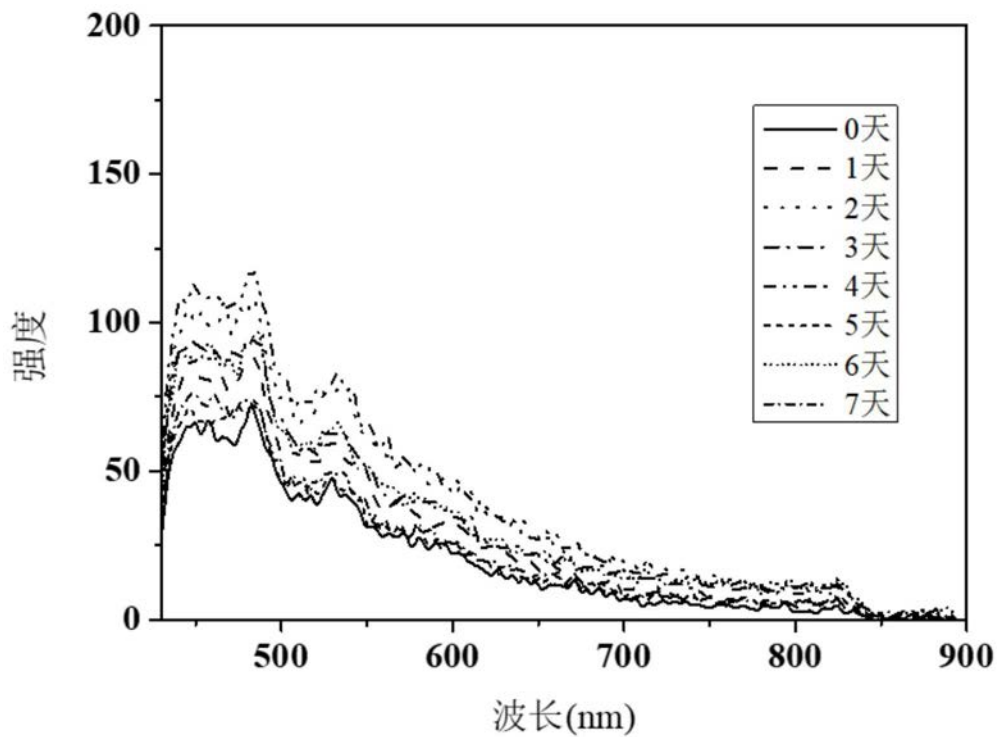


图4

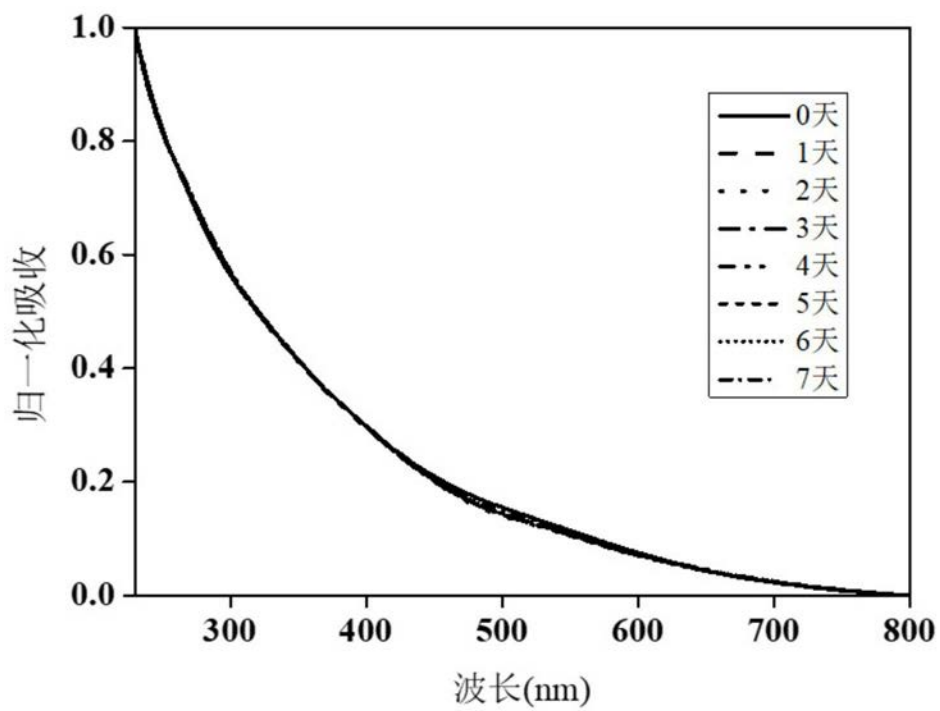


图5

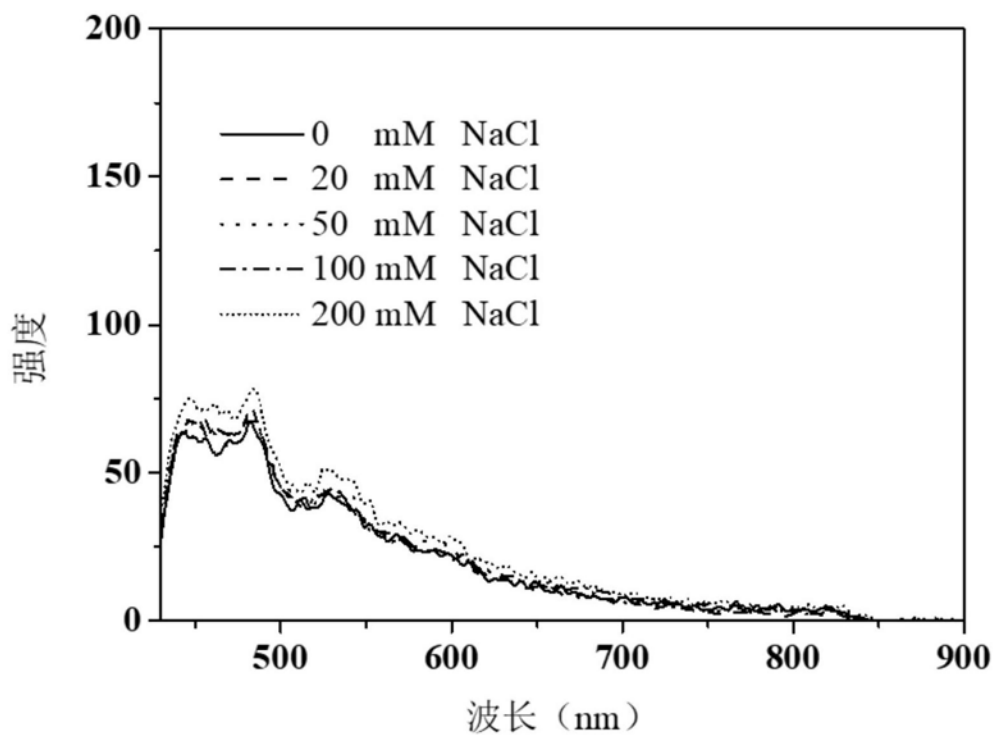


图6

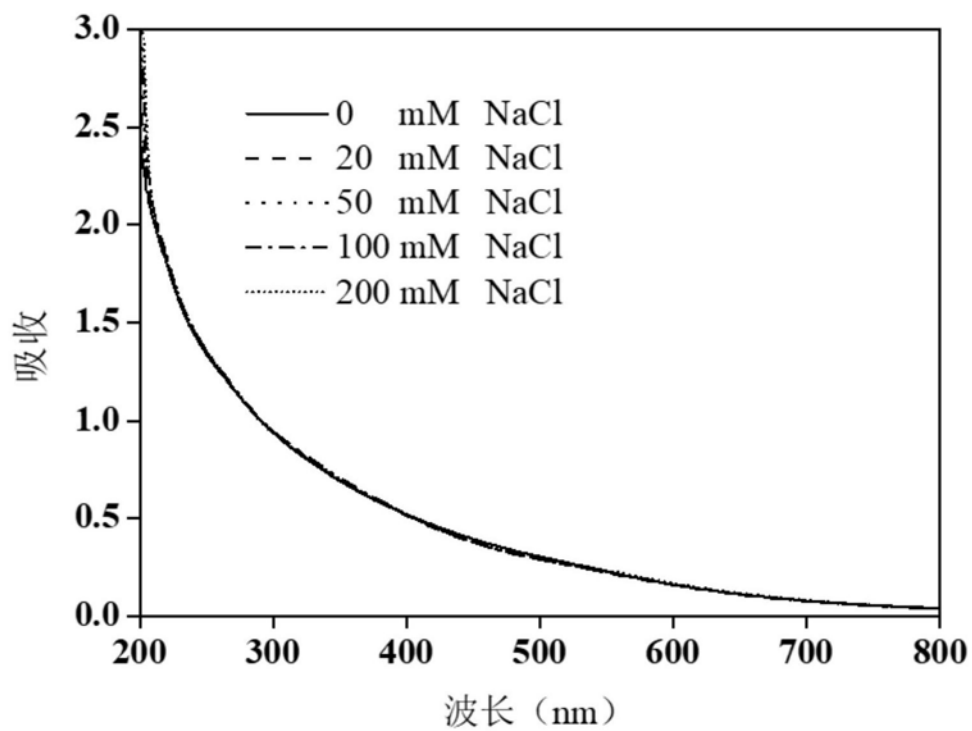


图7

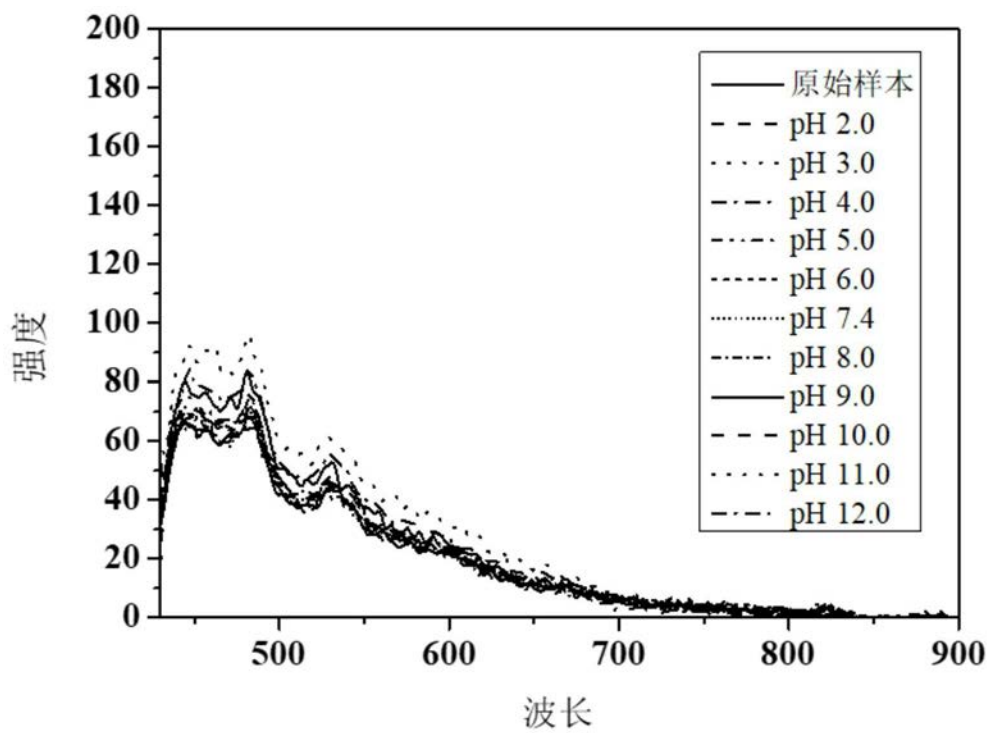


图8

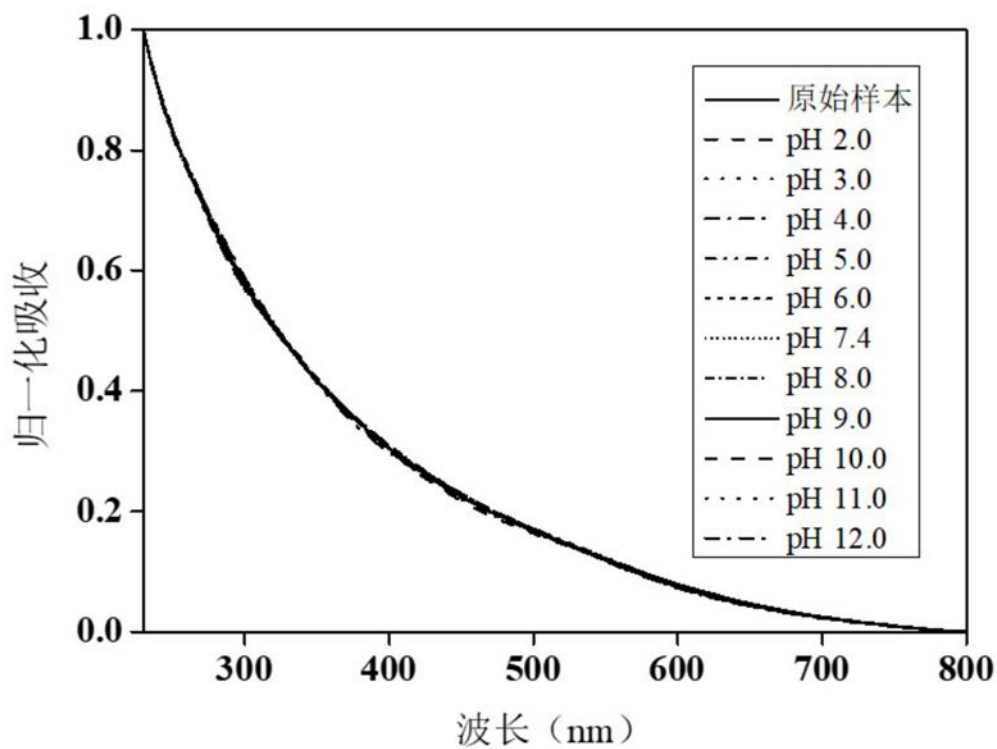


图9

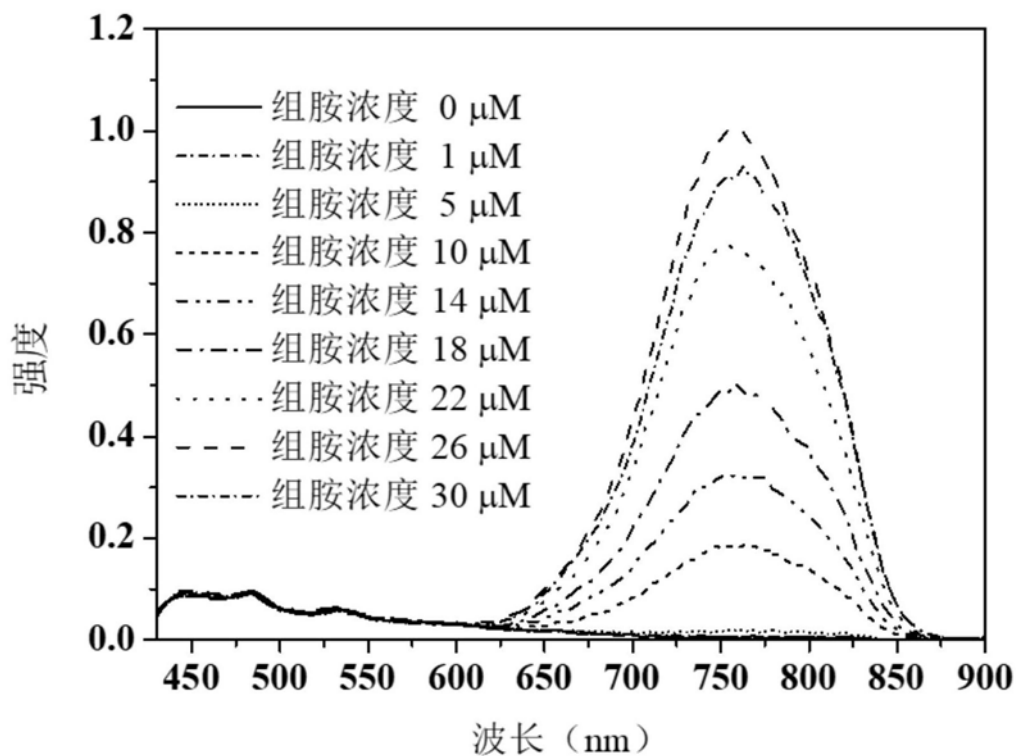


图10

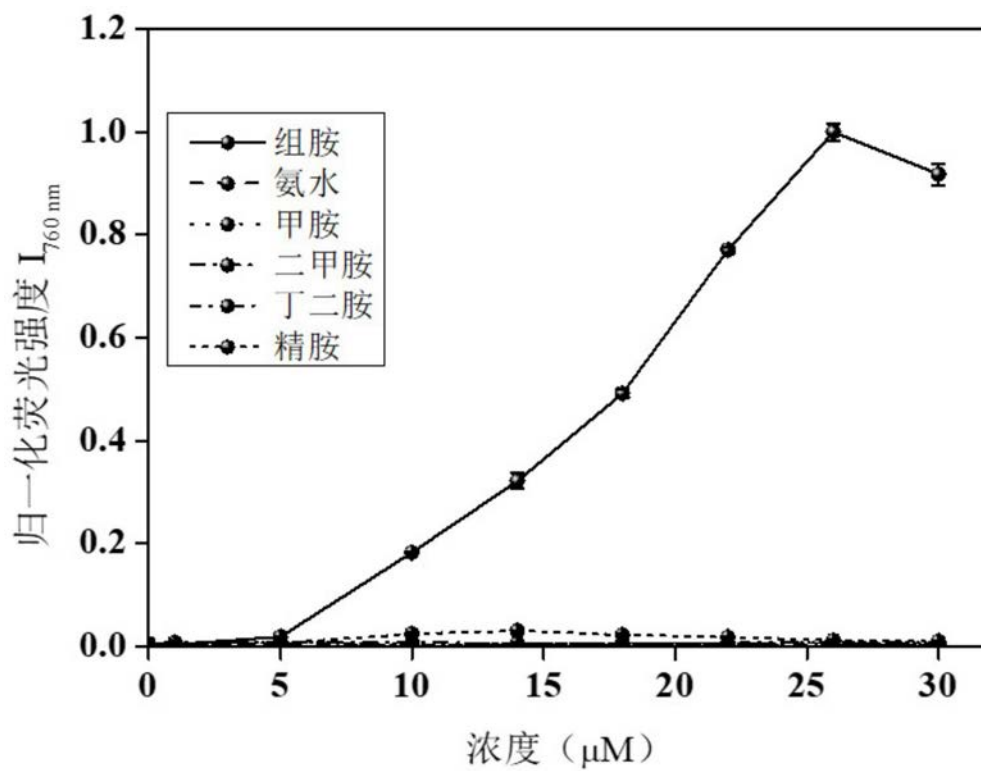


图11

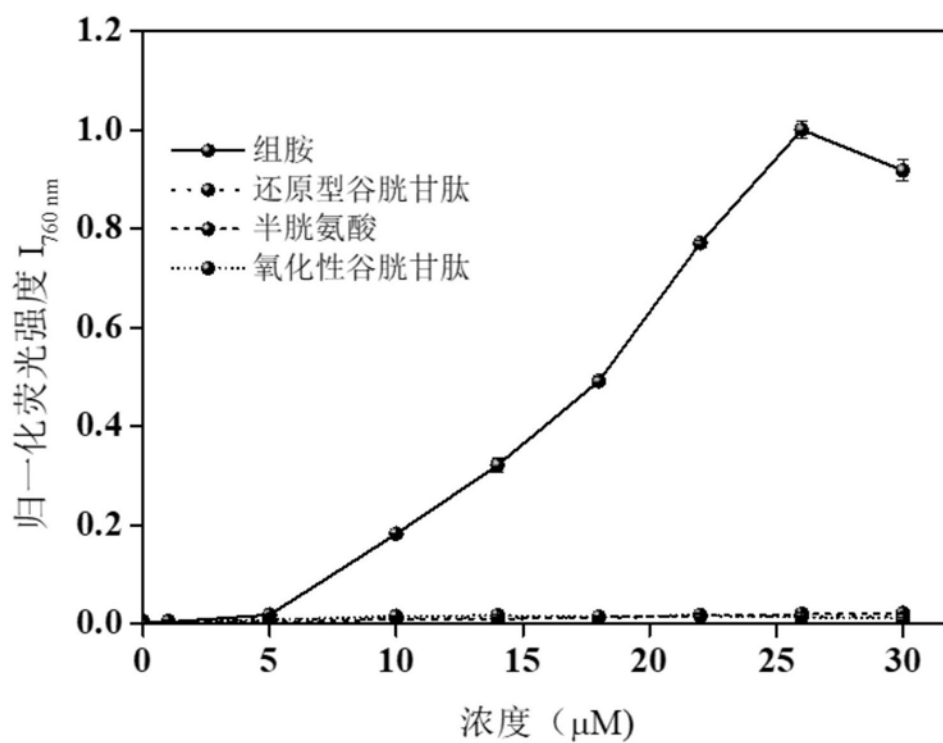


图12

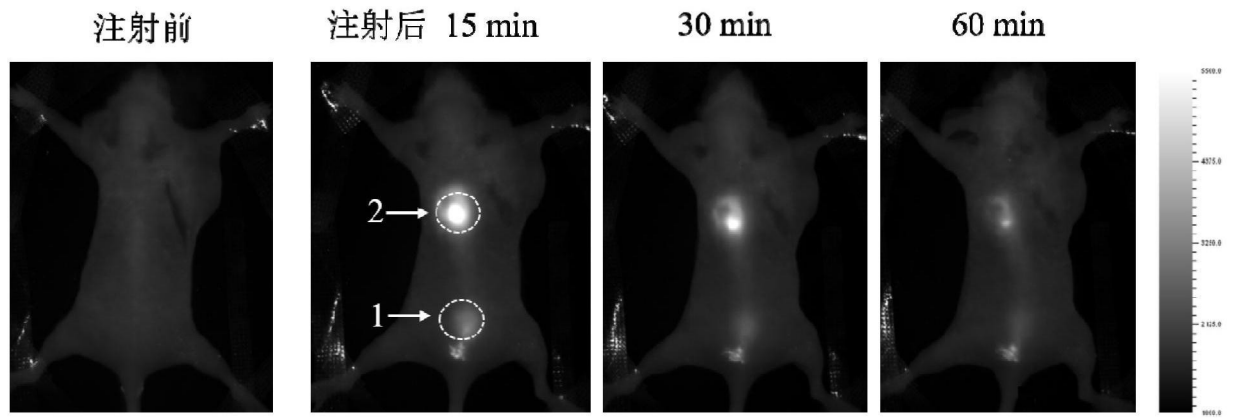


图13

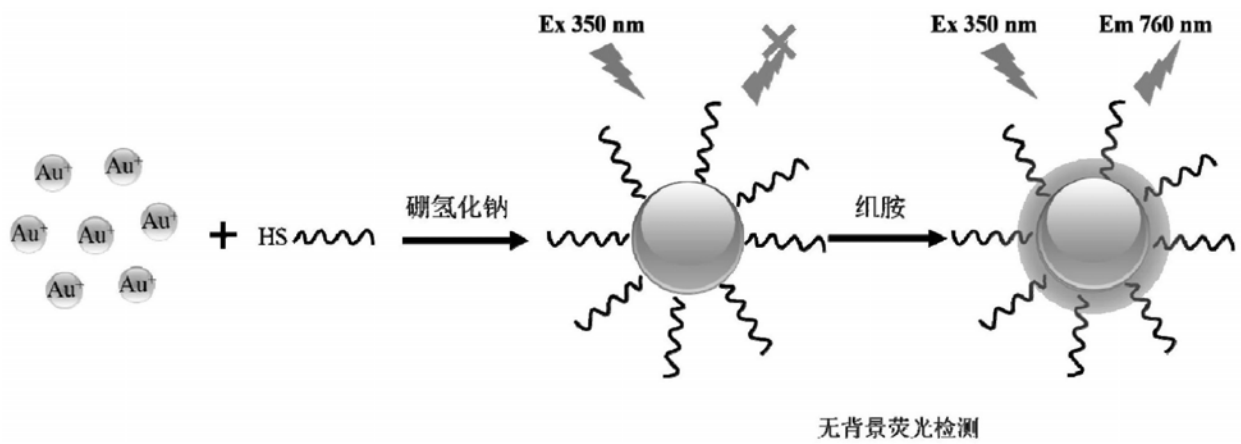


图14