



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102604628 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201210037259. 4

W0 2010045263 A2, 2010. 04. 22, 全文.

(22) 申请日 2012. 02. 19

Ya-Juan Li and Bing Yan.

(73) 专利权人 南京邮电大学

Lanthanide(Eu³⁺, Tb³⁺)/β-Diketone Modified Mesoporous SBA-15/Organic Polymer Hybrids: Chemically Bonded Construction, Physical Characterization, and Photophysical Properties. 《Inorg. Chem.》. 2009, 第 48 卷 8276 - 8285.

地址 210003 江苏省南京市新模范马路 66 号

(72) 发明人 黄维 赵强 成珊 刘淑娟 刘湘梅 马云

Lei Guo 等. Photofunctional Eu³⁺/Tb³⁺ hybrids through sulfoxide linkages: coordination bonds construction, characterization and luminescence. 《Dalton Trans.》. 2011, 第 40 卷 4933 - 4940.

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 叶连生

Ruben D. Costa 等. Light-emitting electrochemical cells based on a supramolecularly-caged phenanthroline-based iridium complex. 《Chem. Commun.》. 2011, 第 47 卷 3207 - 3209.

(51) Int. Cl.

C09K 11/06 (2006. 01)

C09K 11/02 (2006. 01)

A61K 49/00 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

Yung-Kang Peng 等. A New and Facile Method To Prepare Uniform Hollow MnO/Functionalized mSiO₂ Core/Shell Nanocomposites. 《ACS NANO》. 2011, 第 5 卷 (第 5 期), 4177-4187.

(56) 对比文件

CN 101792664 A, 2010. 03. 11, 权利要求 1-5.

CN 101935529 A, 2011. 01. 05, 权利要求 1, 2.

CN 101993693 A, 2011. 03. 30, 权利要求 1-10, 说明书第 1 页第 6 段.

JP 2008063482 A, 2008. 03. 21, 全文.

审查员 周劼聪

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 4 页

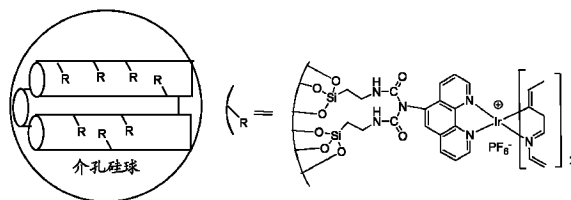
(54) 发明名称

一种有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子制备及其应用

检测和细胞靶向等领域有广阔的应用前景。

(57) 摘要

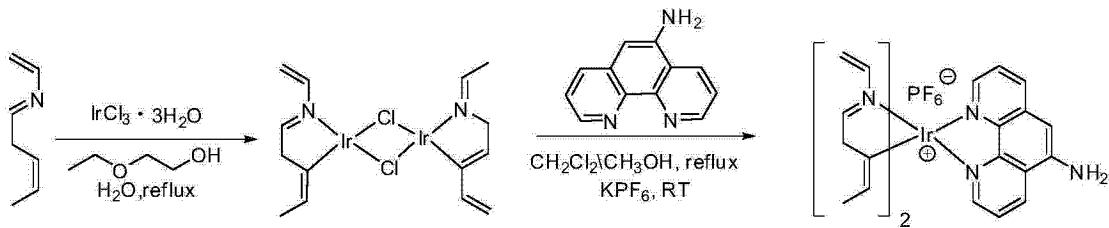
本发明属于发光纳米材料技术领域。具体涉及一类基于颜色可调铈配合物的有机 / 无机杂化二氧化硅纳米粒子的制备方法及其在生物成像领域中的应用。其中颜色可调铈配合物由环金属配体、金属中心和含氨基的邻菲咯啉衍生物配体组成。利用上述铈配合物中的氨基连接异氰酸丙基三乙氧基硅氧烷, 再通过硅氧烷的水解将铈配合物连接到介孔二氧化硅纳米粒子上。本发明的磷光二氧化硅纳米粒子尺寸可控, 粒径均匀, 生物相容性好, 表面也易于进一步功能化, 在生物标记、



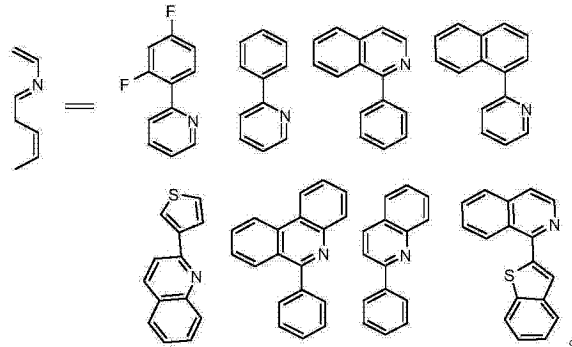
1. 一种有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子的制备方法,其特征在于有机磷光染料通过有机硅氧烷的共价连接分布在介孔二氧化硅纳米粒子的介孔结构与粒子表面上,形成的有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子孔径在 2-5nm,粒径在 50-200nm,为一种有机磷光染料包覆介孔二氧化硅内外表面的有机无机杂化结构;

该方法包括:1)颜色可调磷光前驱体的制备;2)颜色可调磷光前驱体和纳米二氧化硅粒子的杂化,具体如下:

1)颜色可调磷光前驱体的制备:

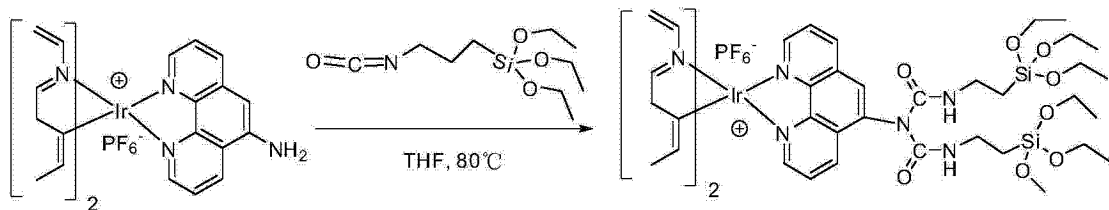


其中 C^N 为具有以下结构的杂环化合物:



具体是将 C^N 配体与 $IrCl_3 \cdot 3H_2O$ 在 3:1, v/v 的 2-乙氧基乙醇和水的混和溶剂中回流反应,反应完全后得到的二氯桥中间体与邻菲咯啉衍生物在 2:1v/v 的二氯甲烷与甲醇的混合溶剂中回流,然后加入六氟磷酸钾室温搅拌,旋出溶剂,将得的固体用柱层析方法分离,即得到上述颜色可调铱配合物;

2)颜色可调磷光前驱体和纳米二氧化硅粒子的杂化:



通过

介孔二氧化硅纳米粒子

磷光二氧化硅纳米粒子
(结构见附图1)

硅氧烷连接有机磷光染料和介孔二氧化硅纳米粒子,即将铱配合物与异氰酸丙基三乙氧基硅氧烷在四氢呋喃中 80-100°C 反应 24-72 小时,将得到的铱配合物硅烷与介孔二氧化硅纳米粒子在四氢呋喃中混合,室温搅拌 10-24 小时,用乙醇反复离心洗去未连接上的铱配合

物硅烷和异氰酸丙基三乙氧基硅烷,即得到颜色可调介孔纳米二氧化硅粒子。

2. 按照权利要求 1 所述的有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子的制备方法,其特征在于,连接有机磷光染料与介孔二氧化硅纳米粒子的硅氧烷是异氰酸丙基三乙氧基硅氧烷。

一种有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于发光纳米材料技术领域。具体涉及一类基于颜色可调铈配合物的有机 / 无机杂化二氧化硅纳米粒子的制备及其在生物成像中的应用。

背景技术

[0002] 生物学成像可以在分子、细胞水平进行疾病的分析和诊断,减少对健康细胞核组织的影响。纳米探针一般使用生物相容性的粒子能够将细胞内环境与有毒的成像剂隔离,成像剂被包覆在基质中可以防止成像剂受到来自细胞内环境的任何可能的干扰,纳米级的尺寸能够降低细胞的物理干扰,并且小尺寸能够提供快速的响应时间,不同的成像剂可以同时包覆于相同的粒子中,使得利用比度法进行测量成为可能。所以利用生物相容性的纳米粒子运载合适的成像剂用于细胞成像,同时连接上靶向配体赋予其癌细胞靶向的功能具有重大的意义。

[0003] 在现有的纳米生物成像技术中,荧光染料因其简便与通用性而得到广泛应用。相比有机荧光,具有 d^6 、 d^8 和 d^{10} 电子结构的磷光重金属配合物具有优异的光物理性质,如大的斯托克斯位移可以很容易区分激发和发射峰,能使用可见光进行激发,长的发射寿命有利于使用时间分辨技术有效地与背景荧光信号区分开以提高检测的信噪比和灵敏度等。

[0004] 然而,大多数的金属配合物磷光成像剂由于疏水性和毒性很难进入细胞,实现成像功能。因此,有必要选择合适的纳米载体,运载金属配合物磷光成像剂,普遍性的实现金属配合物的生物成像功能。介孔纳米二氧化硅以其规则的介孔结构、尺寸可调、容易功能化、显著的生物相容性,以及光学上的透明性越来越多的受到人们的关注,成为一种有效的纳米载体。将金属配合物磷光成像剂通过介孔纳米二氧化硅的运载,有效的弥补了金属配合物磷光成像剂的不足,并将其独特的光学性质用在在细胞和生物体的成像中,因此有机 / 无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子的研究具有深远的科学意义和应用价值。

[0005] 鉴于此,本发明将具有颜色可调性能的磷光重金属铈配合物与二氧化硅纳米粒子杂化,从而制备出低毒、发光颜色可调的、形貌规则、大小可控的磷光二氧化硅纳米粒子,并探索其在生物成像上的应用,从而为其未来的应用提供必要的理论数据。

发明内容

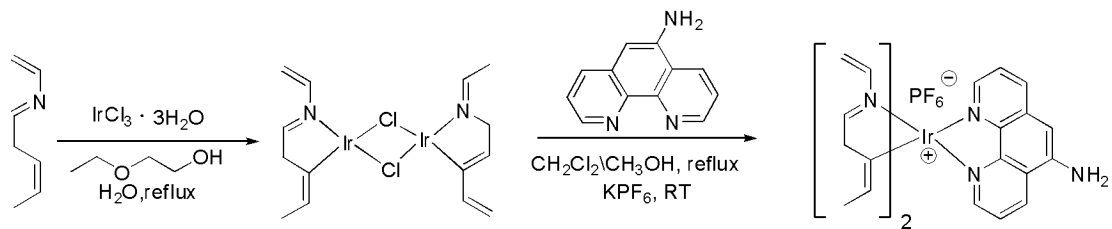
[0006] 技术问题:本发明的目的在于提供一类基于颜色可调铈配合物的有机 / 无机杂化介孔二氧化硅纳米粒子,给出它们的制备方法,并提出这类配合物在细胞标记、成像中的应用。利用扫描电子显微镜和透射电子显微镜观测纳米粒子的形貌,热重分析测试杂化粒子中有机分子含量,紫外 - 可见吸收光谱、荧光发射光谱检测杂化纳米粒子的光物理性质。

[0007] 技术方案:本发明是一种有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子,有机磷光染料通过有机硅氧烷的共价连接分布在介孔二氧化硅纳米粒子的介孔结构与粒子表面上,形成的有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子孔径在 2-5nm,粒径在 50-200nm,为一种有机磷光染料包覆介孔二氧化硅内外表面的有机无机杂化结构。

[0008] 该方法包括：1) 颜色可调磷光前驱体的制备；2) 颜色可调磷光前驱体和纳米二氧化硅粒子的杂化，具体如下：

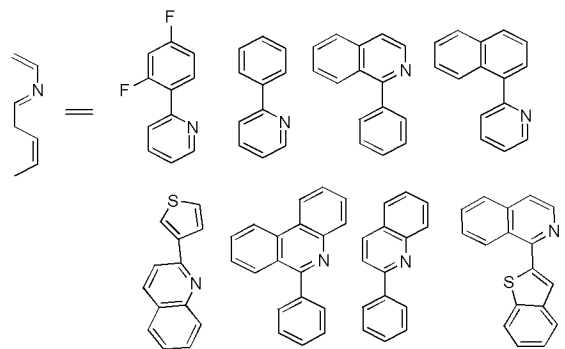
[0009] 1) 颜色可调磷光前驱体的制备：

[0010]



[0011] 其中 C^{N} 为具有以下结构的杂环化合物：

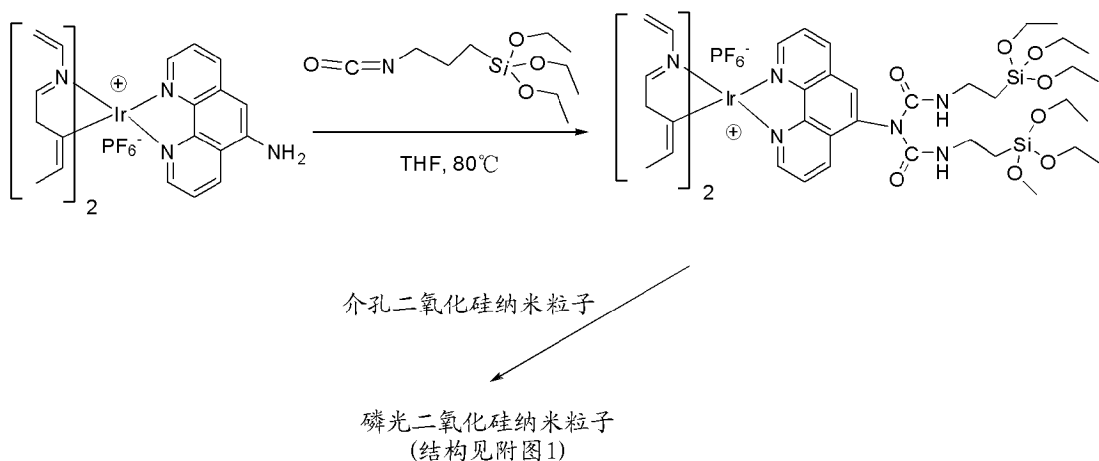
[0012]



[0013] 具体是将 C^{N} 配体与 $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 在 3 : 1, v/v 的 2-乙氧基乙醇和水的混和溶剂中回流反应，反应完全后得到的二氯桥中间体与邻菲咯啉衍生物在 2 : 1v/v 的二氯甲烷与甲醇的混合溶剂中回流，然后加入六氟磷酸钾室温搅拌，旋出溶剂，将得的固体用柱层析方法分离，即得到上述颜色可调铱配合物；

[0014] 2) 颜色可调磷光前驱体和纳米二氧化硅粒子的杂化：

[0015]



[0016] 通过硅氧烷连接有机磷光染料和介孔二氧化硅纳米粒子，即将铱配合物与异氰酸丙基三乙氧基硅氧烷在四氢呋喃中 80-100°C 反应 24-72 小时，将得到的铱配合物硅烷与介孔二氧化硅纳米粒子在四氢呋喃中混合，室温搅拌 10-24 小时，用乙醇反复离心洗去未连接上的铱配合物硅烷和异氰酸丙基三乙氧基硅烷，即得到颜色可调介孔纳米二氧化硅粒

子。

[0017] 连接有机磷光染料与介孔二氧化硅纳米粒子的硅氧烷是异氰酸丙基三乙氧基硅氧烷。

[0018] 该有机无机杂化磷光二氧化硅纳米粒子的应用于生物成像中。

[0019] 有益效果：通过核磁共振 (NMR)、色质联机 (GCMS)、基质辅助激光解析时间飞行质谱 (MALDI-TOF-MS) 等表征铱配合物材料及中间体的结构, 利用扫描电子显微镜和透射电子显微镜观测纳米粒子的形貌, 热重分析测试杂化粒子中有机分子含量, 利用紫外吸收光谱、荧光发射光谱检测纳米粒子的光物理性质。

[0020] 本发明由 C^N 配体的共轭程度调节配合物的发光颜色, 通过介孔纳米二氧化硅粒子的运载, 实现铱配合物的水溶性, 从而实现在细胞成像中的应用。

附图说明

[0021] 图 1、本发明中磷光二氧化硅纳米粒子的结构图。

[0022] 图 2a 为颜色可调配合物, 图 2b 为颜色可调纳米二氧化硅粒子。

[0023] 图 3a 为颜色可调配合物, 图 3b 为颜色可调纳米二氧化硅粒子。

[0024] 图 4a 为扫描电镜照片, 图 4b 为透射电镜照片。

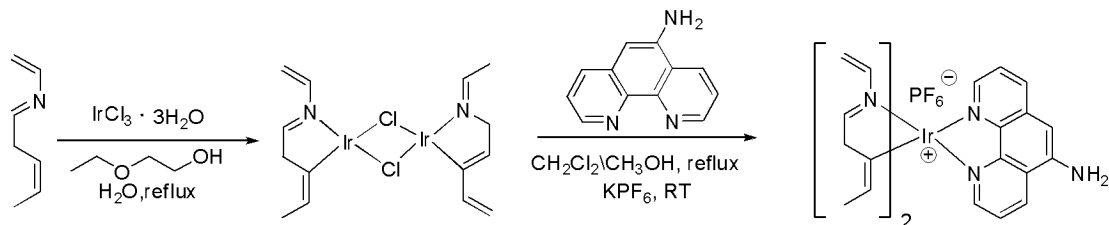
[0025] 图 5、本发明中合成的颜色可调二氧化硅纳米粒子的细胞毒性测试图。

具体实施方式

[0026] 本发明提出可用于细胞成像的颜色可调铱配合物有机 / 无机杂化二氧化硅纳米粒子。其中：

[0027] a. 本发明提出的颜色可调磷光铱配合物合成路线如下：

[0028]



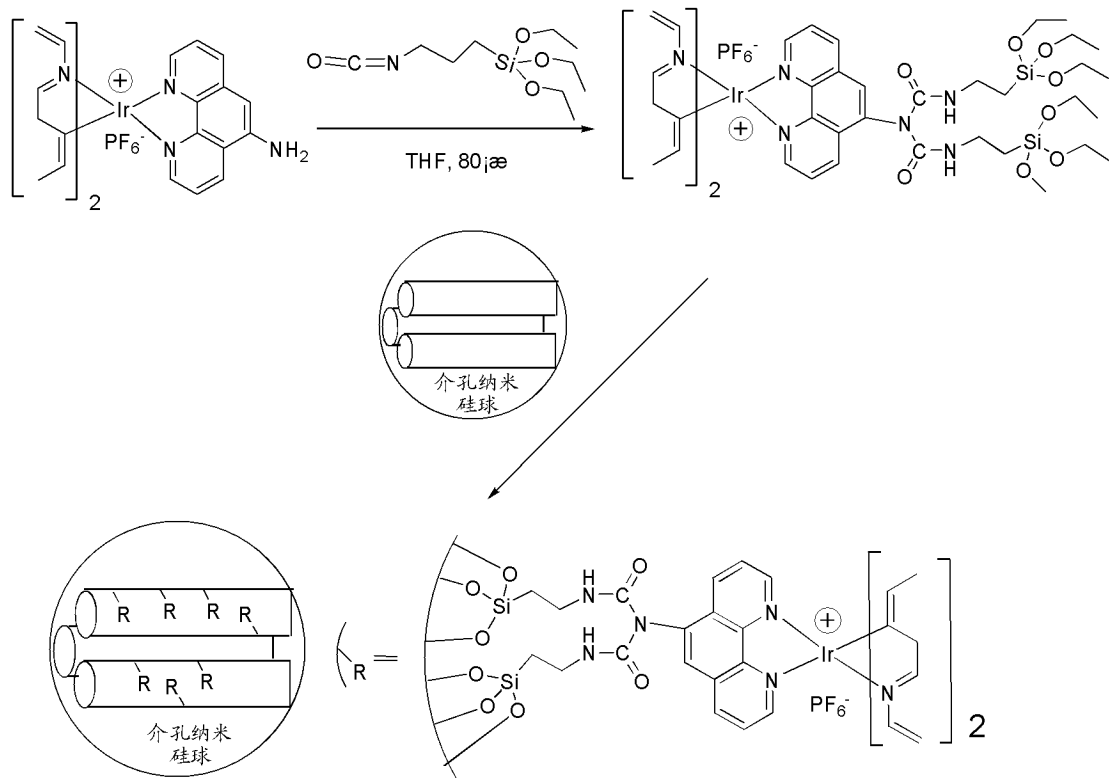
[0029] 具体是将 C^N 配体与 IrCl₃ · 3H₂O 在 2-乙氧基乙醇和水的混和溶剂 (3 : 1, v/v) 中回流反应 18-24 小时, 得到的二氯桥中间体与邻菲咯啉衍生物在二氯甲烷与甲醇的混合溶剂 (2 : 1, v/v) 中回流 3-6 小时, 然后加入六氟磷酸钾室温搅拌 1-3 小时后, 旋出溶剂, 将得的固体用柱层析方法分离, 即得到上述颜色可调铱配合物。

[0030] b. 本发明提出的二氧化硅纳米粒子制备方法如下：

[0031] 具体是将十六烷基溴化铵溶解在氢氧化钠的稀溶液中, 60-90℃ 加热搅拌至溶液澄清, 加入正硅酸乙酯, 在相同温度下加热搅拌 2-3 小时。将得到的混合溶液进行抽滤, 并用纯水冲洗, 将得到的沉淀加到浓盐酸和乙醇的混合溶液中, 50-80℃ 加热搅拌 10-24 小时, 将得到的混合溶液进行抽滤并反复洗涤, 即得到介孔二氧化硅纳米粒子。

[0032] c. 本发明提出的可用于生物成像的颜色可调铱配合物杂化二氧化硅纳米粒子制备路线如下：

[0033]



[0034] 具体是将覆盖可见光范围的颜色可调铱配合物与异氰酸丙基三乙氧基硅烷在四氢呋喃中 $80\text{--}100^\circ\text{C}$ 反应 24-72 小时,将得到的铱配合物硅烷与二氧化硅纳米粒子在四氢呋喃中混合,室温搅拌 10-24 小时,用乙醇反复离心洗去未连接上的铱配合物硅烷和异氰酸丙基三乙氧基硅烷,即得到上述可用于生物成像的颜色可调介孔纳米二氧化硅粒子。

[0035] 为了更好地理解本发明的内容,下面通过具体的实例来进一步说明本发明的技术方案。具体包括合成、性质测定,细胞成像实验。但这些实施例并不限制本发明。

[0036] 实施例 1:颜色可调铱配合物的制备:

[0037] a) 5-硝基-1,10-邻菲咯啉的制备

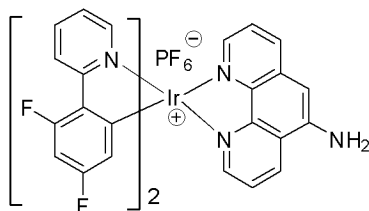
[0038] 在圆底烧瓶中加入 5g 1,10-邻菲咯啉水合物,加入 30ml 浓硫酸溶解,然后逐滴加入 15ml 发烟硝酸,加热溶液使其温度保持在 $160\text{--}170^\circ\text{C}$,反应回流 2 小时。反应完毕,使其冷却至室温,之后将溶液倾倒入冰水中。加入浓度为 10% 的氢氧化钠溶液把 pH 调为 3。析出的黄色沉淀为产物,抽滤,用清水洗并在真空中干燥。得 5g (88%) 淡黄色固体。GC-MS (EI-m/z): 测试值: 225, 理论值: 225.2。

[0039] b) 5-氨基-1,10-邻菲咯啉 (apt) 的制备

[0040] 将 1.0g 5-硝基-1,10-邻菲咯啉溶解在 30ml 无水乙醇中,加入 0.2g 5% Pd/C 催化剂,在氮气保护下加热到 70°C ,然后逐滴加入 10ml 无水乙醇与 10ml 水合肼混合液,回流反应 5h。反应完成后,让其冷却至室温,过滤掉 Pd/C 催化剂,用乙醇洗涤数次。将滤液蒸去大部分乙醇,冷却,析出黄色固体,抽滤,干燥,得黄色固体 (0.67g, 76%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 9.21 (d, 1H), 8.95 (d, 1H), 8.28 (d, 1H), 7.99 (d, 1H), 7.66 (dd, 1H), 7.52 (dd, 1H), 6.9 (s, 1H), 4.3 (s, 2H)。

[0041] c) 配合物 1 ($[\text{Ir}(\text{dfppy})_2\text{apt}]^+ \text{PF}_6^-$) 的制备

[0042]



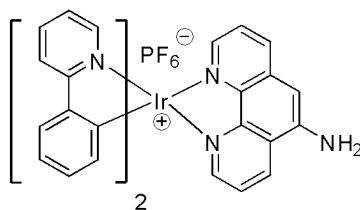
[0043] 1 $[\text{Ir}(\text{dfppy})_2\text{apt}]^+\text{PF}_6^-$

[0044] 称取 2-(2',4'-二氟苯基)吡啶 3.3mmol, $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.4mmol 于反应瓶中, 加入 2-乙氧基乙醇和水的混合物 (3 : 1, v/v), 100-120°C 氮气氛围搅拌, 反应 24 小时左右。将反应体系冷却至室温, 然后将沉淀过滤, 并用水、乙醇反复冲洗, 得到固体产物为铱二氯桥化合物。

[0045] 称取铱二氯桥化合物 0.15mmol 和 5-氨基-1,10-邻菲咯啉 (apt) 0.375mmol 加入到反应瓶中, 再加入 15ml CH_2Cl_2 和甲醇的混合溶剂 (2 : 1, v/v), 磁搅拌下回流。3-5 小时后, 降至室温, 加入 5 倍当量的六氟磷酸钾 (KPF_6), 继续搅拌约 1 小时后, 减压旋蒸除去溶剂, 将所得固体混合物再溶于约 10ml 的 CH_2Cl_2 中, 将不溶物过滤除去, 滤液减压旋蒸除去溶剂后所得固体用柱层析 (二氯甲烷 / 丙酮) 分离得到纯品。产率 67%。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : $\delta = 6.98(\text{s}, 4\text{H}), 7.05-7.12(\text{m}, 3\text{H}), 7.48-7.51(\text{t}, 1\text{H}), 7.70-7.73(\text{m}, 1\text{H}), 7.79(\text{d}, 1\text{H}), 7.93-7.99(\text{m}, 4\text{H}), 8.21(\text{d}, 1\text{H}), 8.26(\text{d}, 2\text{H}), 8.42(\text{d}, 1\text{H})$; MS (Maldi-tof) [m/z] : 测试值 : 768.435 (M- PF_6), 理论值 : 767.775 (M- PF_6)。

[0046] d) 配合物 2 ($[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{apt}]^+\text{PF}_6^-$) 的制备方法与配合物 1 相同。

[0047]

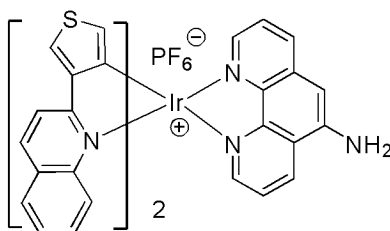


[0048] 2 $[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{apt}]^+\text{PF}_6^-$

[0049] 产率 71%。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : $\delta = 6.91-6.94(\text{m}, 4\text{H}), 6.97-7.05(\text{m}, 4\text{H}), 7.09(\text{s}, 1\text{H}), 7.42-7.45(\text{t}, 2\text{H}), 7.68-7.73(\text{m}, 2\text{H}), 7.84-7.88(\text{t}, 2\text{H}), 7.90-7.93(\text{t}, 2\text{H}), 8.12(\text{d}, 1\text{H}), 8.22(\text{d}, 2\text{H}), 8.37(\text{d}, 1\text{H}), 8.39(\text{d}, 1\text{H})$; MS (Maldi-tof) [m/z] : 测试值 : 696.516 (M- PF_6), 理论值 : 695.813 (M- PF_6)。

[0050] e) 配合物 3 ($[\text{Ir}(\text{thq})_2\text{apt}]^+\text{PF}_6^-$) 的制备方法与配合物 1 相同。

[0051]



[0052] 3 $[\text{Ir}(\text{thq})_2\text{apt}]^+\text{PF}_6^-$

[0053] 产率 63%。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : $\delta = 6.35(\text{s}, 2\text{H}), 6.85(\text{s}, 1\text{H}), 6.92(\text{d}, 2\text{H}), 7.17-7.21(\text{m}, 4\text{H}), 7.37-7.41(\text{t}, 2\text{H}), 7.54-7.59(\text{m}, 4\text{H}), 7.77-7.87(\text{m}, 4\text{H}), 7.98-8.07(\text{m},$

4H), 8.31(d, 1H), 8.71(d, 1H); MS (Maldi-tof) [m/z]: 808.375 (M-PF₆), 理论值: 807.986 (M-PF₆)。

[0054] 实施例 2: 具有生物成像功能的发光颜色可调磷光介孔二氧化硅纳米粒子的制备

[0055] 具体是将十六烷基溴化铵溶解在氢氧化钠的稀溶液中, 80℃加热搅拌至溶液澄清, 加入正硅酸乙酯, 在相同温度下加热搅拌 2-3 小时。将得到的混合溶液进行抽滤, 并用纯水冲洗, 将得到的沉淀加到浓盐酸和乙醇 (1 : 12, v/v) 的混合溶液中, 60℃加热搅拌过夜, 将得到的混合溶液进行抽滤并反复洗涤, 得到的白色粉末即为介孔二氧化硅纳米粒子, 呈规则球形, 粒径在 70-100nm, 孔径约为 3nm 左右。

[0056] 将铽配合物与异氰酸丙基三乙氧基硅烷在四氢呋喃中 80℃反应 3 天, 将得到的铽配合物硅烷与上述二氧化硅纳米粒子在四氢呋喃中混合, 室温搅拌 24 小时, 用乙醇反复离心洗去未连接上的铽配合物硅烷和异氰酸丙基三乙氧基硅烷, 即得到上述颜色可调介孔纳米二氧化硅粒子, 粒径在 70-100nm, 孔径约为 2-3nm 左右。

[0057] 实施例 3: 铽配合物的紫外-可见光谱测试: 配置 20 μM 的配合物的二氯甲烷溶液, 移取 2ml 配合物溶液于荧光比色皿中, 分别测得配合物的紫外-可见发光谱图, 如图 1a。

[0058] 实施例 4: 铽配合物的荧光发射光谱测试: 配置 20 μM 的配合物的二氯甲烷溶液, 移取 2ml 配合物溶液于荧光比色皿中, 分别测得荧光发射光谱图, 如图 2a。

[0059] 实施例 5: 配合物杂化二氧化硅纳米粒子的紫外-可见光光谱测试: 配置 0.5mg/ml 的配合物杂化二氧化硅纳米粒子水溶液, 移取 2ml 配合物溶液于荧光比色皿中, 分别测得配合物的紫外-可见发光谱图, 如图 1b。

[0060] 实施例 6: 配合物杂化二氧化硅纳米粒子的荧光发射光谱测试: 配置 0.5mg/ml 的配合物杂化二氧化硅纳米粒子水溶液, 移取 2ml 配合物溶液于荧光比色皿中, 分别测得配合物的荧光发射光谱图, 如图 2b。

[0061] 实施例 7: 配合物杂化二氧化硅纳米粒子的活细胞成像实验:

[0062] 采用 1ml 的细胞培养液配制 2mg 的配合物杂化二氧化硅纳米粒子, 浓度为 2mg/ml。取 100 μL 稀释至成像所需浓度: 100 μg/ml。分别取 2ml 溶液孵育细胞 8 小时后用 PBS 缓冲液清洗细胞 3-5 次, 用 405nm 波长激发细胞共聚焦成像, Z 扫描。测试数据表明: 配合物杂化二氧化硅纳米粒子具有良好的细胞穿透性, 分布在细胞质区域。

[0063] 实施例 8: 配合物杂化二氧化硅纳米粒子的毒性实验:

[0064] 取对数期的人胶质瘤细胞 U87MG 接种在 96 孔细胞培养板上 (1×10⁴ 个细胞/孔), 在 5% CO₂, 37℃下孵育 24 小时。配合物杂化二氧化硅纳米粒子 (100 μl/孔, 含 1% HEPES) 分别以 50, 100, 150, 200 μg/ml 的浓度加入到实验组的细胞中。将含 1% HEPES 的 MEM 培养基 (100 μl/孔) 加入到对照组的细胞中。细胞在 5% CO₂ 37℃下继续孵育 24 小时后, 每孔加入 10 μl MTT (5mg/ml), 在 5% CO₂ 37℃下再孵育 4 小时。然后每孔加入 10% SDS (100 μl/孔), 在室温静置 12 小时。用多功能酶标仪 Tecan Infinite M200 测定 690nm 波长下扣除背景后的每孔的 OD570 (吸光度)。

[0065] 按以下公式计算细胞生长存活率:

[0066] 细胞存活率 (%) = (实验组的吸光度平均值 / 对照组的吸光度平均值) × 100。

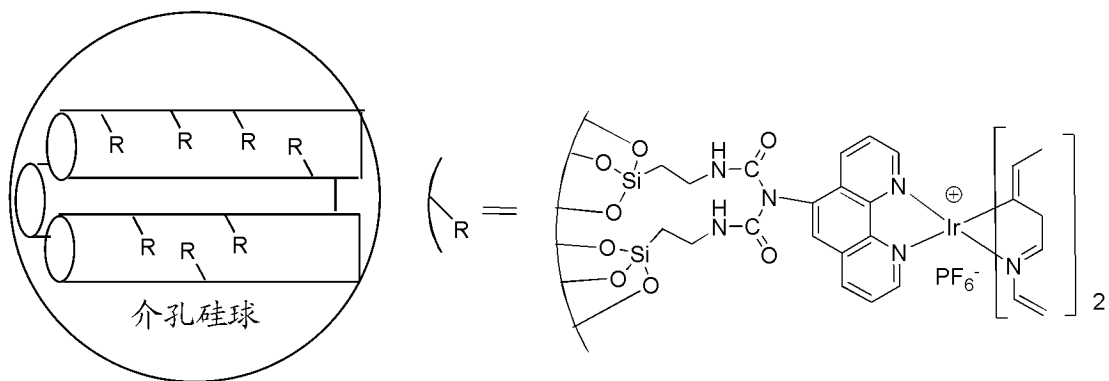


图 1

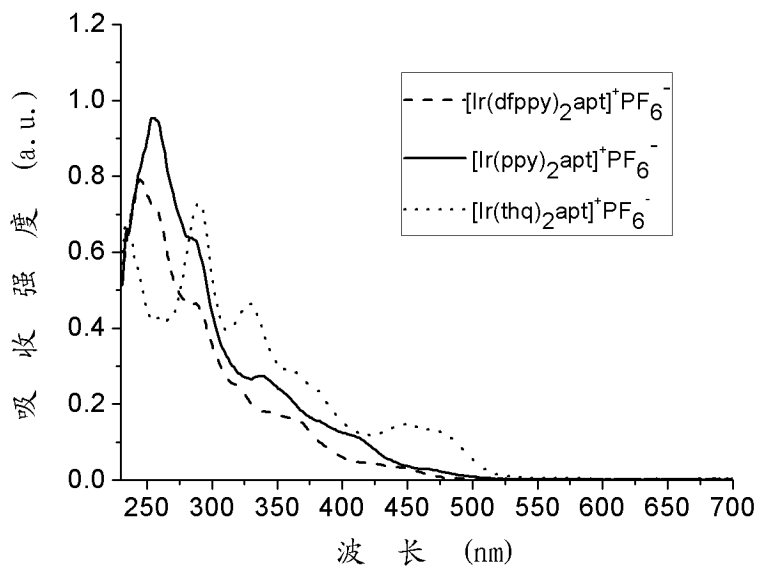


图 2a

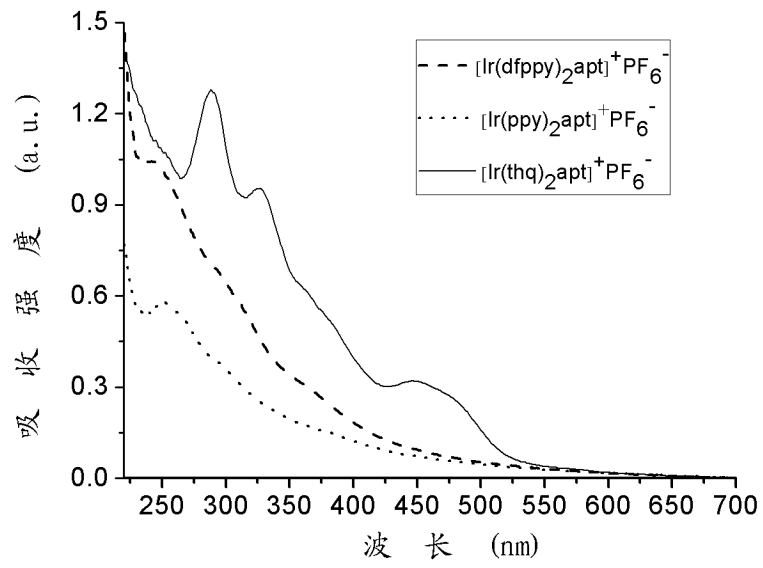


图 2b

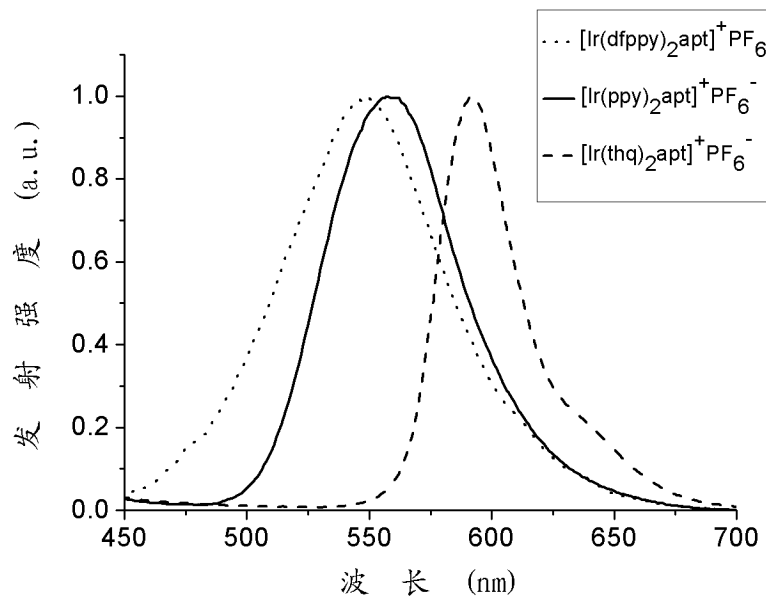


图 3a

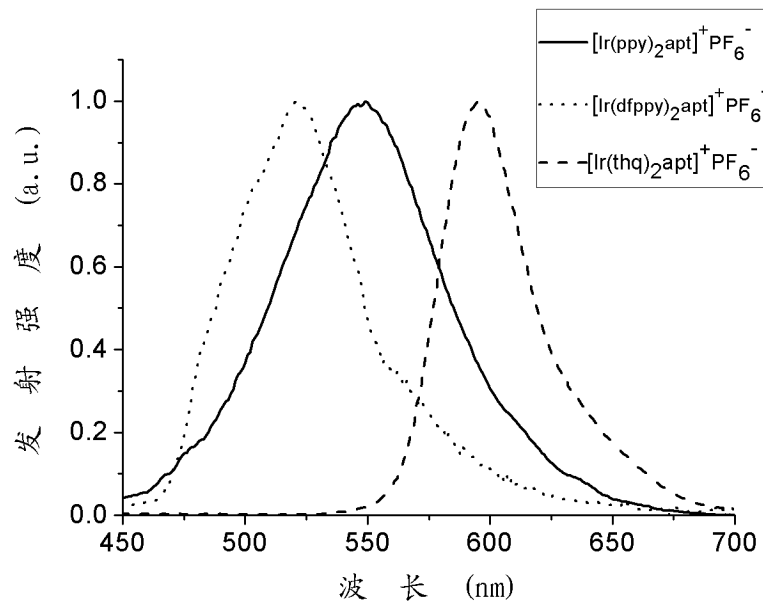


图 3b

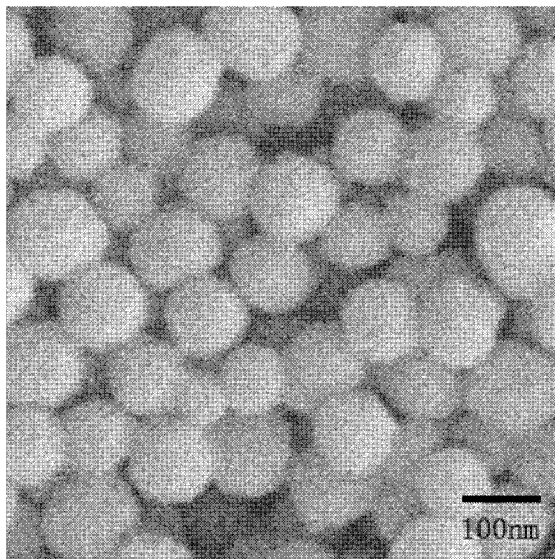


图 4a

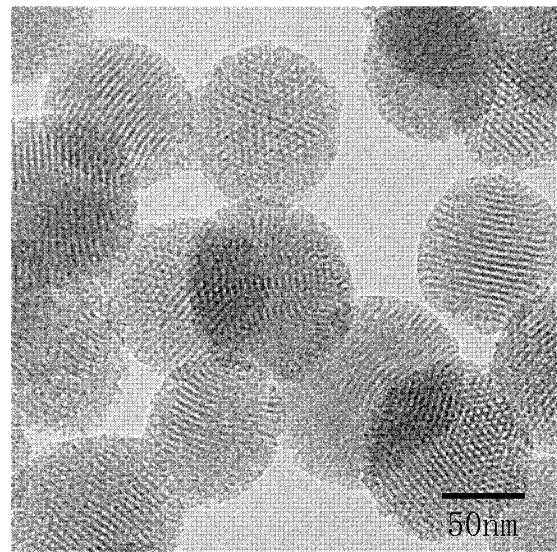


图 4b

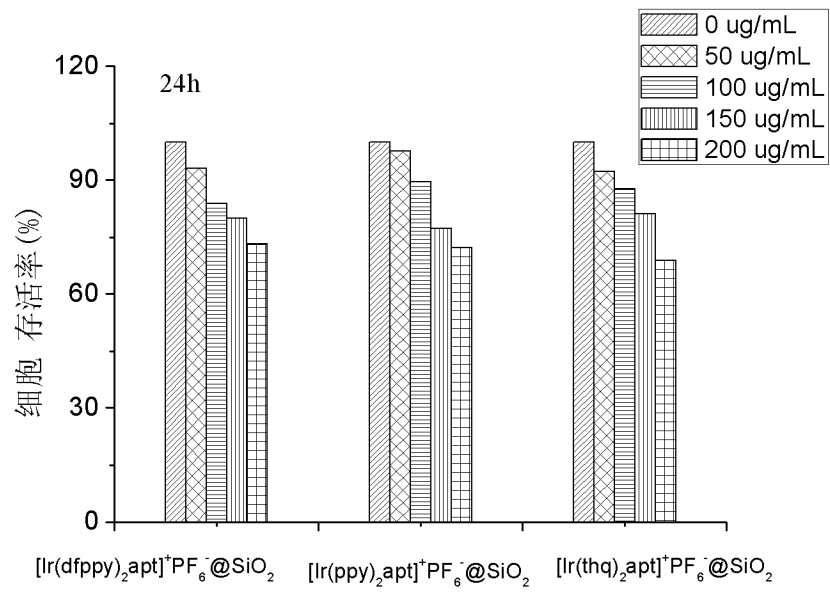


图 5