

量子点标记壳聚糖衍生物自聚集纳米胶束的制备与表征

杨 永, 董晓庆, 张 磊, 常 津*

(天津大学材料科学与工程学院纳米生物技术研究所, 天津 300072)

摘要:以 EDC 为偶联剂, 将胆酸接枝到赖氨酸改性的壳聚糖主链的氨基上, 得到一系列胆酸取代度相同(4.2%)而赖氨酸取代度不同(2.3%, 4.4%, 9.6%)的双亲性壳聚糖衍生物(CA-LysCS), 利用 FT-IR, ^1H NMR 对其结构进行表征。CA-LysCS 在水相中自组装形成自聚集体。以芘为荧光探针对其自聚集行为进行了研究, 结果显示制得的自聚集体具有较小分子表面活性剂较低的 CAC ($1.1 \times 10^{-2} \sim 5.3 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$), 表明自聚集体可在水相中形成稳定的胶束。且随着赖氨酸取代度的增加, CAC 值随之增大。以激光粒度仪对自聚集体水相中的粒径分布进行了研究, 发现其平均粒径随着赖氨酸取代度的增大有所增加(164.6~414.3 nm)。以三辛基氧化膦(TOPO)为包裹剂, 制备了油溶性硫化镉(CdSe)绿色量子点。用制备的自聚集体对量子点进行了包裹, TEM 照片显示量子点位于自聚集体的疏水化核内。以荧光分光光度计对量子点的荧光特性进行了研究, 发现包裹后量子点的荧光强度有所减弱。

关键词:壳聚糖; 胆酸; 赖氨酸; 纳米粒子; 自聚集; 量子点(QDs); 胶束

引言

水溶性高分子的疏水化改性是指将疏水基团(烷基链、脱氧胆酸等)接枝到水溶性高分子上^[1~3]。这类双亲性高聚物要降低界面自由能, 因此可在水相自发形成胶束或自聚集体^[4~9]。由于高分子胶束具有较好的热力学稳定性、可减小药物的细胞毒性及副作用, 并且可以改善药物疗效等优点, 近年来, 被认为是一类很有应用前景的药物及基因载体^[10~12]。

量子点可大大改善荧光标记物在生物检测领域的应用^[13, 14]。作为荧光标记物, 量子点与传统的有机染料相比具有很多优点: 可根据粒子尺寸调节荧光激发及发射波长、较宽的激发波段、狭窄且对称的荧光发射峰、较强且稳定的荧光效能和较高的量子产额等。但是要将其广泛用作生物标记物, 量子点必须在水相中具备三个性质: 有效的荧光强度, 胶束稳定性和较低的非特异性吸附^[15]。由于所合成的量子点表面附有油溶性的有机配合物, 因此可以进入到高分子胶束的疏水化核内, 而胶束的外层则为亲水的, 这样就保证了其在水相中的稳定性, 并且可进行其它功能化。已经有很多两性分子被成功地用于量子点的包裹, 比如用磷脂胶束^[16, 17], 或其它一些高分子胶束等^[18~20]。

由于壳聚糖聚集体不溶于中性或生理 pH 溶液中, 并且数天之内就聚集沉淀, 因此限制了其在药物载体方面的广泛应用^[21]。近来, 水溶性的壳聚糖衍生物被越来越多地用来增加自聚集体的稳定性及减少细胞毒性^[22~24]。由于本实验室已经制备了赖氨酸改性的壳聚糖衍生物, 并对其性质做了一系列研究, 发现由于氨基含量的增加, 使其成为了一种优良的水溶性壳聚糖衍生物。在此基础上, 本文用胆酸对赖氨酸接枝壳聚糖进行了改性, 合成了一系列胆酸取代度相同而赖氨酸取代度不同的壳聚糖衍生物。胆酸的引入提供了疏水基团, 从而使得其能够自聚集形成高分子胶束, 并对胶束一系列性能进行了研究。制备了三辛基氧化膦(TOPO)为包裹剂的绿色量子点, 并用制备的双亲性高聚物对其进行了包裹, 形成的复合物有望应用于生物检测领域。

基金项目:国家自然科学基金(50373033); 天津市应用基础研究重点基金(No. 05YFJJC01001);

作者简介:杨永, 男, 汉族, 硕士研究生, 主要从事纳米生物材料的研究;

联系人: E-mail: jinchang@tj. edu. cn, Tel: 022-27401821, Fax: 022-27890367。

1 实验部分

1.1 实验原料

医用级壳聚糖 ($M_w = 5.0 \times 10^4$, 脱乙酰度 96.8%, 青岛海普生物技术有限公司), 赖氨酸 (99%, sigma), 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC $\cdot$ HCl) (分析纯, 吉尔生化(上海)有限公司), 茈 (分析纯, Acros), 硒粉 (100 目, 99.99%), 氧化镉 (99.5%), 磷酸三丁酯 (90%), 三辛基氧化膦 (90%), 十八胺 (90%), 十八烯 (90%), 油酸 (90%) 均购自 sigma 公司。其它试剂皆为分析纯且购自本地供应商。

1.2 CA-LysCS 的合成

6g 壳聚糖溶于 200mL 0.1M 的醋酸溶液中, 用 75mL 0.3M 氢氧化钠沉淀, 收集白色沉淀, 用水洗至中性, 并重新将其分散在 200mL DMF 中。分别加入 3g 胆酸和 2.1g EDC, 常温下反应 24h。将反应液用甲醇/氨水 (7:3, v/v) 沉淀, 并用乙醚, 水等反复清洗, 将最终得到的沉淀物冻干, 得到胆酸改性壳聚糖 (CA-CS)。
1g CA-CS 溶于 100mL 1% 的醋酸与 DMF (1:1, v/v) 混合溶液中, 将赖氨酸与 EDC 分别溶于 DMF 和水中, 逐滴加入到反应体系中, 常温下反应 24h, 收集产物并用乙醚等反复清洗, 真空干燥, 即得胆酸改性的赖氨酸接枝壳聚糖 (CA-LysCS), 根据赖氨酸加入量的不同, 得到不同取代度的产物。

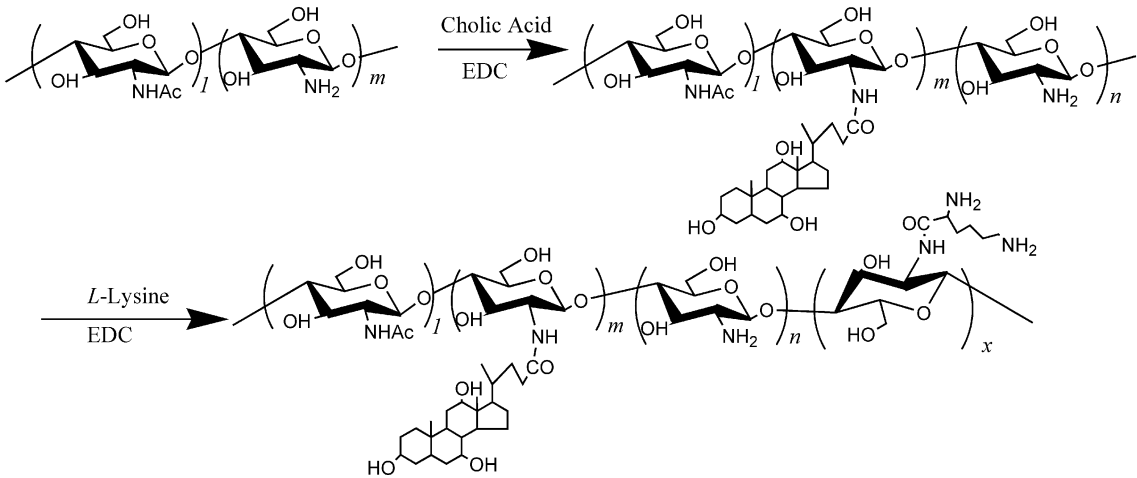


图 1 壳聚糖反应示意图
Figure 1 Synthesis of CA-LysCS

产物结构以傅立叶变换红外光谱 (FT-IR, BIO-Rad FTS 6000 型) 和核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$, UNITY Plus-400 型) 测定。

1.3 三辛基氧化膦 (TOPO) 包裹的绿色量子点的合成

TOPO 包裹的绿色量子点的合成采用原来报道的方法^[25], 分别将一定量的氧化镉、油酸、十八烯放入 50mL 三口瓶中, 氩气保护下升温至 300℃, 并迅速降至室温, 加入一定量的十八胺和三辛基氧化膦, 重新升温至 280℃, 将硒粉的磷酸三丁酯溶液加入到反应体系中, 一定时间后即得绿色量子点。

1.4 量子点标记的自聚集纳米粒子的制备

将一定量的 CA-LysCS 放入水中, 在摇床中 37℃ 下缓慢振荡 3h 使其溶解, 配成不同浓度的溶液。TOPO 包裹的绿色量子点溶于氯仿中并逐滴加入到 CA-LysCS 的溶液中, 滴加同时用探头式超声机于 50W 超声 3min, 室温下自然挥发掉其中的氯仿。

自聚集体及包裹了量子点的自聚集体形貌以透射电子显微镜 (TEM, JEM-2000 FX II 型, 日本) 测定, 自聚集体粒径大小及分布以 Brookhaven⁹⁰Plus 型激光粒度仪测定。

1.5 CA-LysCS 自聚集体的荧光光谱测定

一定量茈溶于丙酮中, 静置挥发掉大部分丙酮, 加入到不同浓度的 CA-LysCS 的光学透明悬浮液中, 室温下电磁搅拌 24h 以挥发掉其中的丙酮并使茈与自聚集体平衡, 茈的最终浓度为 6.0×10^{-7} mol/L。以

F-4500(HITACHI)荧光分光光度计测定不同浓度条件下芘的激发光谱与发射光谱。激发波长 336nm, 激发和发射缝宽分别为 5 和 10nm。

2 结 论

2.1 CA-LysCS 的结构表征

图 2a, b, c 分别给出了原料壳聚糖、胆酸改性壳聚糖和胆酸改性赖氨酸接枝壳聚糖的红外谱图。壳聚糖红外谱图(见图 2a)中 1580cm^{-1} 附近出现了明显的氨基($-\text{NH}_2$)的弯曲振动峰, 而 $3200\sim 3500\text{cm}^{-1}$ 的宽峰为 N-H 及 O-H 的伸缩振动峰。当胆酸接枝到壳聚糖的氨基上之后(见图 2b), 1580cm^{-1} 附近的氨基峰几乎消失, 而 1652cm^{-1} 和 1540cm^{-1} 处出现了两个显著的峰, 这就是酰胺 I 带和酰胺 II 带羰基的伸缩振动峰。这表明在壳聚糖氨基上发生了酰化反应。当赖氨酸接枝到胆酸改性的壳聚糖的氨基上之后(见图 2c), 1660cm^{-1} 附近和 1557cm^{-1} 附近的酰胺 I 带和酰胺 II 带羰基的伸缩振动峰随赖氨酸取代度增加而有所增强^[27]。此外, $3300\sim 3400$ 之间的氨基($-\text{NH}_2$)的伸缩振动峰峰型变宽, $2800\sim 2930\text{cm}^{-1}$ 附近的峰($-\text{CH}_2$ 的伸缩振动峰)亦有所增强, 这说明赖氨酸已成功接枝到 CA-CS 上。

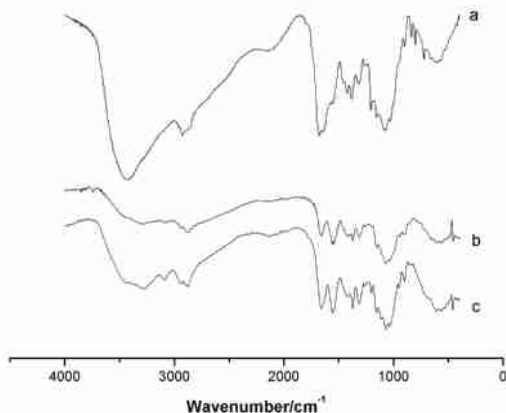


图 2 壳聚糖(a)、胆酸改性壳聚糖(b)和胆酸改性赖氨酸接枝壳聚糖(c)的的红外谱图

Figure 2 IR spectra: (a) chitosan; (b) CACS and (c) CA-LysCS.

图 3a, b 和 c 分别给出了壳聚糖、胆酸改性壳聚糖(CA-CS)和胆酸改性赖氨酸接枝壳聚糖(CA-LysCS)的 ^1H 核磁谱图(^1H NMR), CA-CS 谱图中(见图 3b) $3.88\sim 4.27\text{ppm}$ 处出现的三个峰从低场到高场依次为胆酸分子上 3 位、7 位、12 位的羟基质子峰, 而且化学位移 $0.90\sim 0.94\text{ppm}$ 处的双重偶合分裂峰为 21 位处角甲基的质子峰, 0.81ppm 、 0.67ppm 处的单峰分别为 19 位和 18 位处角甲基的质子峰, 从核磁中可以得到胆酸的取代度为 4.2%。CA-LysCS 谱图中(见图 3c), $3.88\sim 4.27\text{ppm}$ 处出现的三个峰从低场到高场依次为胆酸分子上 3 位、7 位、12 位的羟基质子峰, 2.67ppm 处出现了赖氨酸上最末端氨基所连亚甲基上质子吸收振动峰, 而 1.2 和 1.39 处也出现了赖氨酸上亚甲基的重叠振动峰。由图中可得到赖氨酸的取代度为 4.4%^[27~29]。

2.2 CA-LysCS 的自聚集行为及形貌表征

以透射电子显微镜、激光粒度测试仪和荧光光谱研究 CA-LysCS 的自聚集结构和行为。图 4 是芘在 CA-LysCS4.4(4.4 为赖氨酸取代度)溶液中的发射光谱, 由图中可以看出, 随着 CA-LysCS4.4 浓度的提高, 芘的荧光发射强度增大。这是由于芘对外环境极性较为敏感所致。而其第一个峰强度与第三个峰强度的比值(I_1/I_3)会随着芘所处微环境极性的降低而减小, 因此可用于指示微环境的极性变化^[30~32]。当水相中有疏水化微区形成时, 芘会靠近或进入到这些微区中, 从而使其所处的微环境发生变化, 而反映在谱图中即 I_1/I_3 发生变化。图 5 给出了 I_1/I_3 随对数浓度的变化关系, 由图中可以看出当自聚集体浓度较低时, I_1/I_3 值基本保持不变, 随着浓度的增大, I_1/I_3 逐渐减小, 拐点处的值即为其 CAC 值^[33]。表 1 给出了各自聚集体的 CAC 值, 可以看出其值要远小于一些小分子表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)值, 这表明

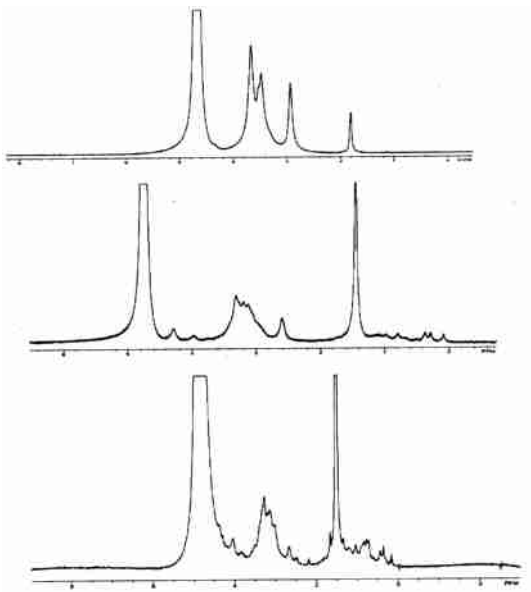


图 3 壳聚糖(a)、胆酸改性壳聚糖(b)和胆酸改性赖氨酸接枝壳聚糖(c)的核磁¹H 谱图(D₂O/CD₃COOD 溶剂)

Figure 3 ¹H NMR spectra: (a) chitosan; (b) CA-CS; and (c) CA-LysCS

自聚集体在水相中较为稳定。从 CAC 值还可以看出随着赖氨酸取代度的增加,CAC 值有所增加,这是由于赖氨酸的引入增加了双亲性高聚物的亲水性。

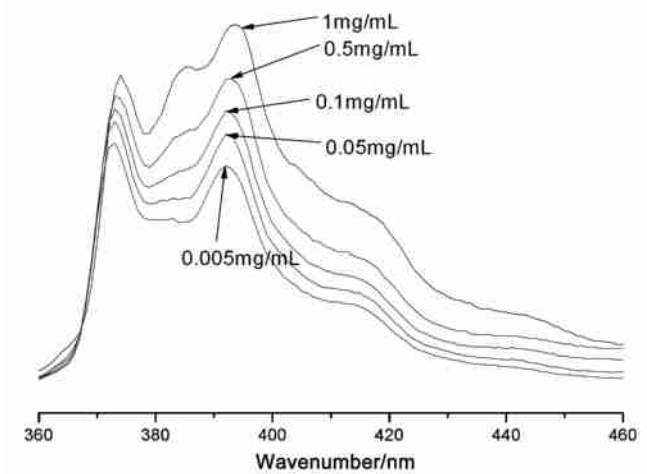


图 4 芘在不同浓度的 CA-LysCS_{4.4} 溶液中的发射光谱

Figure 4 Excitation spectra of pyrene in distilled water in solutions of CA-LysCS_{4.4} with Different concentrations

表 1 CA-CS (1mg/mL)和 CA-LysCS_{4.4}(1mg/mL)的自聚集性质
Table 1 Characterization of CA-CS and CA-LysCS

样品	平均粒径/nm	多分散系数	CAC×10 ⁻² mg/mL
CA-CS	164.6	0.146	1.1
CA-LysCS _{2.3}	194.6	0.119	2.7
CA-LysCS _{4.4}	300	0.245	3.3
CA-LysCS _{9.6}	414.3	0.183	2.1

图 6 给出了 CA-CS 和 CA-LysCS4.4 在浓度为 1mg/mL 条件下的粒径分布图。从表 1 数据中可以看出随着赖氨酸取代度的增加, 粒径有所增加, 这一方面归因于水溶性的增加, 另一方面, 由于赖氨酸的引入带来了带正电荷的氨基, 静电排斥作用的增大使得高分子链趋于向外扩张。

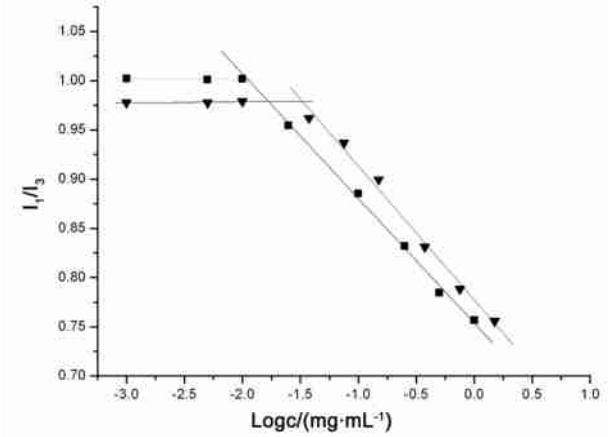


图 5 CA-CS(■)和 CA-LysCS4.4(▼)荧光发射光谱 I_1/I_3 与对数浓度关系图

Figure 5 Change of intensity ratio(I_{372}/I_{392}) of CA-CS(■) and CA-LysCS4.4(▼)from excitation spectra with various concentrations

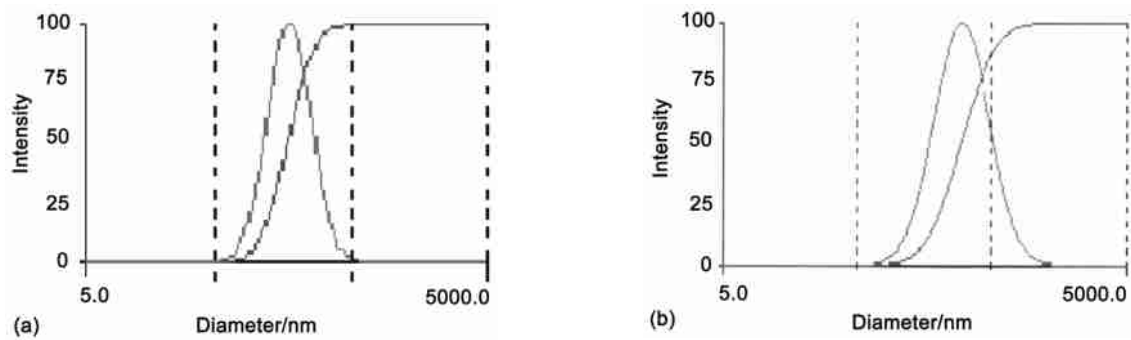


图 6 (a)CA-CS(1mg/mL)和(b)CA-LysCS4.4 (1mg/mL)粒径分布图

Figure 6 Sizes of Main Diameter of (a)CA-CS2.1 and (b) CA-LysCS4.4 in Distilled Water

图 7a、b、c 和 d 分别为 CA-CS (1mg/mL)、CA-LysCS4.4 (1mg/mL)、TOPO 包裹的绿色量子点和包裹量子点的 CA-LysCS4.4 (1mg/mL)的 TEM 照片。由图 7a、b 可以看出, 制备的自聚集体形貌较为规则, 都为近似球形结构, 而粒径都在 50~80nm 之间, 这一数值比激光粒度仪测得的数值小, 这主要由于高分子在水相中具有溶胀性而透射电子显微镜得到的为高真空条件下的干态粒径。图 7c 显示制得的量子点具有均一的粒径分布, 大约为 4nm。由图 7d 得知, 量子点进入到了自聚集体的疏水核内部, 并导致自聚集体粒径变大。

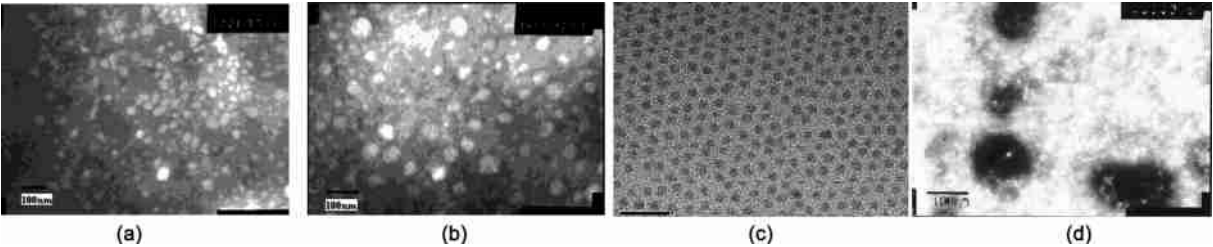


图 7 a. CA-CS(1mg/mL), b. CA-LysCS4.7 (1mg/mL), c. TOPO 包裹的绿色量子点和包裹量子点的 CA-LysCS4.4(1mg/mL)的透射电子显微镜照片

Figure 7 Transmission Electron Micrograph of (a) CA-CS(1mg/mL), (b)CA-LysCS2.3(1mg/mL), (c) TOPO-capped CdSe QDs and (d) Quantum dots tagged Self-Assembly Nanoparticles (CA-LysCS4.4, 1mg/mL)

2.3 包裹对量子点荧光发射的影响

自聚集体的包裹对量子点荧光发射强度产生的影响用 F-4500(HITACHI) 荧光分光光度计进行了测定,激发波长为 470nm,激发和发射缝宽都为 5nm。如图 8 所示,包裹后量子点荧光强度有所减弱^[35],这主要由于外层高分子的遮蔽作用以及水溶液中自聚集纳米粒子对荧光的散射造成的。

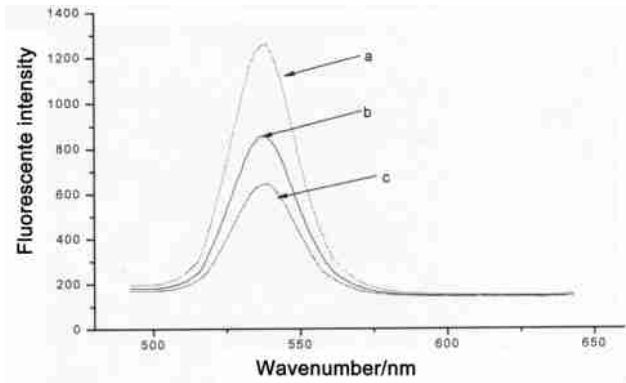


图 8 包裹对量子点荧光强度的影响

a. 绿色量子点的荧光发射光谱 b. CA-CS 自聚集体 (1mg/mL)

包裹的量子点的荧光发射光谱 c. CA-LysCS^{4.4} 自聚集体 (1mg/mL)包裹的量子点的荧光发射光谱

Figure 8 Comparison of emission spectra of free quantum dots in chloroform solution and encapsulated quantum dots in micelles with the same concentration of QDs. (a) Emission spectra of green emission quantum dots; (b) Emission spectra of CA-CS self-aggregates (1mg/mL) encapsulated QDs; (c) Emission spectra of CA-LysCS^{4.4} self-aggregates (1mg/mL) encapsulated QDs

3 结束语：

本文合成了一系列具有相同胆酸取代度而不同赖氨酸取代度的壳聚糖衍生物,对其自聚集性质进行了考察,证明形成的自聚集体均可在水相中稳定存在。由于 TOPO 包裹的量子点不能溶于水中、外层无可反应的官能团存在和较高的细胞毒性等,阻碍其在生物领域的应用。而用制得的自聚集体对合成的 TOPO 包裹的绿色量子点进行包裹之后,这些问题得到了很好的解决。并且由于外层高分子带有大量的氨基(—NH₂),即使在生理条件下,纳米粒子亦荷正电,从而可较易与基因、药物、蛋白质、抗体及一些生物素等进行偶联或静电吸附。因此,制得的量子点标记的自聚集体有望应用于生物检测及生物治疗等方面。

参考文献：

[1] Liu W G, Zhang X, Sun S J, Sun G J, Yao K D. Bioconjugate Chem, 2003, 14(2) : 782.
[2] Kim Y H, Gihm S H, Park C R. Bioconjugate Chem, 2001, 12(6) : 932.
[3] Liu C G, GOUD, DESAI H, Chen X G, H J Park. J Agric Food Chem, 2005, 53(2) : 437.
[4] Akiyoshi K, Sunamoto J. Surf. Sci. Ser., 1992, 44(6) : 289.
[5] Gref R, Minamitake Y, Peracchia M T, Trubetskoy V. Science, 1994, 263, 1600.
[6] Nagasaki Y, Yasugi K, Yamamoto Y, Harada A, Kataoka K. Biomacromolecules, 2001, 1(3) : 1067.
[7] Kakizawa Y, Harada A, Nagasaki Y. Adv Drug Delivery Rev, 2001, 47(1) : 113.
[8] Kakizawa Y, Harada A, Kataoka K. Biomacromolecules, 2001, 2(1) : 491.
[9] Kim K, Kwon S, Park J H, Chung H, Jeong S Y, Kwon I C. Biomacromolecules, 2005, 6(2) : 1154.
[10] Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, Suzuki M, Matsumura Y, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. J Controlled Release, 2001, 74(1-3) : 295.
[11] Tobio M, Gref R, Sanchez A, Langer R, Alonso M. J Pharm Res, 1998, 15(3) : 270.
[12] Rinaudo M, Auzely R, Vallin C, Mullagaliev I. Biomacromolecules, 2005, 6(5) : 2396.
[13] Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos A P. Science, 1998, 281, 2013.
[14] Chan W C W, Nie S. Science, 1998, 281, 2016.
[15] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, Noireaux V, Brivanlou A H, Libchaber A. Science, 2002, 298, 1759.

- [16] Geissbuehler I, Hovius R, Martinez K L, Adrian M, Thampi K, Ravindranathan T, Vogel H. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 40, 1388.
- [17] Wu X, Liu H, Liu J, Haley K N, Treadway J A, Larson J P, Ge N, Peale F, Bruchez M P. *Biotechnol*, 2003, 21(5) : 41.
- [18] Pellegrino T, Manna L, Kudera K, Liedl T, Koktysh D, Rogach A L, Keller S, Radler J, Natile G, Parak W P. *Nano Lett*, 2004, 4(4) : 704.
- [19] Gao X, Cui Y, Levenson R M, Chung L W, Nie S. *Biotechnol*, 2004, 22(10) : 959.
- [20] Kim S W, Kim S, Tracy J B, Jasanoff A, Bawendi M G. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(9) : 4556.
- [21] Qin C, Du Y, Xiao L, Li Z, Gao X. *Int J Biol Macromol*, 2002, 69: 97.
- [22] Yalpani M, Hall L D. *Macromolecules*, 1984, 17(2) : 272.
- [23] Sugimoto M, Morimoto M, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y. *Carbohydr Polym*, 1998, 36: 49.
- [24] Kim T H, Park I K, Nah J W, Choi Y J, Cho C S. *Biomaterials*, 2004, 25(19) : 3783.
- [25] Peng Z A, Peng X G. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(1) : 183.
- [26] Liu L, Li C, Li X, Yuan Z, An Y, He B. *J Appl Polym Sci*, 2001, 80(8) : 1976.
- [27] Park K, Kim K, Kwon I C, Kim S K, Lee S, Lee D Y, Byun Y. *Langmuir*, 2004, 20(26) : 11726.
- [28] Kim C, Lee S C, Kang S W, Kwon I K, Kim Y H, Jeong S Y. *Langmuir*, 2000, 16(11) : 4792.
- [29] Jiang G B, Quan D Q, Liao K, Wang H. *Molecular Phar*, 2006, 3 (2) : 152.
- [30] Hu F Q, Ren G F, Yuan H, Du Y Z, Zeng S. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2005, 50 (2) : 97.
- [31] Lee K Y, Jo W J. *Macromolecular*, 1998, 31(3) : 378.
- [32] Park K, Kim K, Kwon I C, Kim S K, Lee S, Lee D Y, Byun Y. *Langmuir*, 2004, 20(26) : 11726.
- [33] Lee C T, Huang C P, Lee Y D. *Biomacromolecules*, 2006, 7(6) : 1179.
- [34] Petit-Agnely F, Iliopoulos I, Zana R. *Langmuir*, 2000, 16(25) : 9921.
- [35] Chen Y F, Rosenzweig Z. *Nano Lett*, 2006, 2 (11) : 1299.

Preparation and Characterization of Quantum Dots-tagged Self-assembly Nanoparticles

YANG Yong, DONG Xiao-qing, ZHANG Lei, CHANG Jin^{*}

(*Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China*)

Abstract: Various cholic acid modified lysine grafted chitosan (CA-LysCS) with the same degrees of substitute (DS) of cholic acid (4.2%) and different degrees of substitute (DS) of Lysine (2.3%, 4.7%, 9.3%) were synthesized with the EOC as the coupling reagent. Structural characteristics of these products were investigated using FT-IR and ¹HNMR. The critical aggregation concentration (CAC) of the self-aggregate of CA-LysCS were determined by measuring the fluorescence intensity of the pyrene as a fluorescent probe, which increased with increase of DS of Lysine in the range of $1.1 \sim 5.3 \times 10^{-2}$ mg/mL. The average particle size of self-aggregates in distilled water also increased with the increase of the DS of Lysine in the range of 164.6~414.3 nm. These self-assembly nanoparticles were tagged using TOPO-capped green quantum dots (QDs). A transmission electron microscopy study showed that the quantum dots located in the hydrophobic core of the micelles. The fluorescence intensity of green Quantum dots decreased after encapsulated mainly due to the covering of the micelles.

Key words: Chitosan; Cholic acid; L-Lysine; Nanoparticles; Self-assembly; Quantum dots