

文章编号: 1000-7032(2010)03-0395-05

比率荧光纳米水凝胶的制备以及在 pH 探测中的应用

彭洪尚, 黄世华

(北京交通大学光电子技术研究所 教育部发光与光学信息重点实验室, 北京 100044)

摘要: 基于再沉淀方法制备了一种具有比率荧光发射的纳米水凝胶, 适用于检测生理范围的 pH 值。通过在聚氨酯水凝胶中引入 pH 值指示剂以及具有共振能量传递关系的荧光染料分子, 赋予原本非 pH 响应和非荧光型的水凝胶以 pH 探测能力。随着 pH 值由酸性渐变为碱性, 纳米水凝胶的绿色荧光强度逐渐增强, 而红色荧光逐渐减弱。所制备的纳米水凝胶由于具有灵敏度高、亲水性好、稳定性好、响应快以及 pH 值检测范围恰好涵盖了生理 pH 值范围(pH 值 6~8)等优点, 因此在细胞内 pH 值探测领域具有广阔应用前景。

关键词: 纳米水凝胶; pH 探针; 比率荧光; 共振能量传递

中图分类号: O482.31; O657.32

PACS: 78.55.Kz

PACC: 7855

文献标识码: A

1 引言

pH 值检测在生物、医学等许多领域都占有十分重要的地位。在用于 pH 值检测的多种材料中, 水凝胶由于具有很高的稳定性、生物亲和性以及受激反应性(体积随外部刺激发生变化)而备受关注。水凝胶是一种在水相中迅速膨胀的凝胶体, 主要由亲水性的有机聚合物通过共价或者非共价作用交叉连接而成^[1, 2]。目前多种纳米水凝胶已经被研制, 并用于探测各种分析物。但是, 由于目前的纳米水凝胶的探测机制多是基于体积变化, 因此必须集成或依附于微型装置上以适应光学^[3, 4]或者电学方法测量^[5], 结果只能于宏观领域中进行探测。最近, 有研究报道了通过改变纳米凝胶体积与荧光强度的关系而制备了荧光纳米凝胶^[6, 7], 并利用此种纳米凝胶实现了细胞水平上的探测^[8]。我们知道, 单一荧光强度的探测灵敏性会因为探针的分布、浓度以及光电子系统的随机漂移而受到削弱。基于荧光寿命的测量方法虽然可以避开上述缺点, 但对于较短的衰减寿命(如纳秒量级), 则对探测仪器的复杂性大大增加, 这为实际应用带来了不便。荧光比率测量技术通过单一波长激发同时产生两个信号, 然后根据两个信号的比率来探测待分析物。这种内在在校

正特点使得荧光比率测量技术的实际应用更稳定、更方便。在本文中, 我们制备了新型荧光纳米水凝胶, 以应用于生理范围的 pH 探测。这种纳米水凝胶由非响应性的聚合物组成制备, 其 pH 敏感性只是来源于凝胶中所装载的有机分子。这种纳米水凝胶具有恒定体积, 在生物活体探测时不会因扰乱细胞活动而产生人造信号。

2 实验

聚亚安脂水凝胶(PU)购自美国 Cardiotech 公司, 溴百里酚兰(BTB)、香豆素 6(C6)和尼罗红(NR)购自 Sigma Aldrich 公司。

称取一定质量的 PU, 在磁力搅拌条件下将其溶解到 $V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}):V(\text{H}_2\text{O})=9:1$ 的混合溶液中, 配制成浓度为 500×10^{-6} 的溶液。然后将 pH 探针分子 BTB, 0.5 mg, C6, 0.5 mg 和 NR, 0.05 mg 共溶于 20 g 上面所制备的 PU 溶液中, 使 PU、BTB、C6 和 NR 在混合溶液达到 1:0.05:0.05:0.005 的比例(质量比)。上述混合液在搅拌 1 h 之后, 在二次蒸馏水中进行透析 24 h, 期间每隔 4 h 换水一次。最后得到的水凝胶的悬浊液通过一个孔径为 0.2 μm 过滤膜进行过滤, 以除掉较大的团聚物。

吸收光谱和荧光光谱分别在 $\lambda = 14 \text{ p}$

收稿日期: 2010-01-10; 修订日期: 2010-02-24

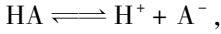
基金项目: 国家自然科学基金(10774012, 10874014); 北京交通大学校基金(2006XM038, 2007XM64)资助项目

作者简介: 彭洪尚(1975-), 男, 山东临沂人, 主要从事生物荧光纳米传感器及纳米发光材料的研究。

E-mail: hshpeng@bjtu.edu.cn

UV-vis 分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司)和 Aminco AB 2 型荧光分光光度计(美国 Thermo 公司)上测量。透射电镜和动态光散射分别在 LEO912AB 型电镜(德国 Zeiss 公司)和 Zetasizer 3000(德国 Malvern 公司)仪器上进行。纳米水凝胶 pH 荧光响应性的理论推导:

BTB 的离解平衡式可以表示为



由上面的平衡式可相应得到如下表达式:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}, \quad (1)$$

这里 K_a 为 BTB 的解离常数, $[\text{HA}]$ 和 $[\text{A}^-]$ 分别为达到平衡时酸性和碱性 BTB 的浓度, $[\text{H}^+]$ 是溶液中的 H^+ 浓度。假定纳米水凝胶中荧光分子的荧光强度服从 Beer-Lambert 定律

$$I = I_0 10^{-\varepsilon lc}$$

这里 I_0 为凝胶中 BTB 分子不存在时的荧光强度, l 为纳米凝胶的半径, ε 和 c 分别是酸性(或碱性)BTB 分子的摩尔吸收率和浓度。这样纳米水凝胶的荧光强度比率 NR(620 nm)/C6(500 nm) 可以写为

$$\frac{I_{\text{NR}}}{I_{\text{C6}}} = \frac{I_{\text{0NR}} 10^{-\varepsilon_{\text{A}^-} l c_{\text{A}^-}}}{I_{\text{0C6}} 10^{-\varepsilon_{\text{HA}} l c_{\text{HA}}}} = \frac{I_{\text{0NR}}}{I_{\text{0C6}}} 10^{l(c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-}) \left(\frac{\varepsilon_{\text{HA}}}{1 + c_{\text{A}^-}/c_{\text{HA}}} - \frac{\varepsilon_{\text{A}^-}}{1 + c_{\text{HA}}/c_{\text{A}^-}} \right)}$$

通过设定

$$k_1 = I_{\text{0NR}}/I_{\text{0C6}}, \quad k_2 = l\varepsilon_{\text{HA}}(c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-}),$$

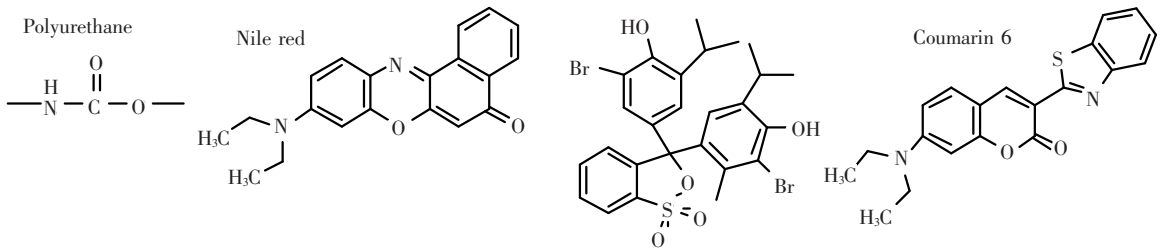


图 1 构成纳米水凝胶各成分的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of the respective ingredients in nanogel

首先利用透射电镜对失水状态下的纳米水凝胶进行了表征,如图 2 所示。从图中可以清晰看出,它们多为较规则的球形结构,直径在 20 ~ 30 nm 之间。由于水凝胶具有高度亲水性,纳米水凝胶在水溶液流体动力学尺寸远远大于其干燥状态下的粒径。根据动态光散射分析,水溶液中的纳米水凝胶直径在 130 ~ 140 nm 之间[图 3(a)]。这些纳米水凝胶在水相中相当稳定,样品在保存

$$k_3 = l\varepsilon_{\text{A}^-}(c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-}),$$

$$c_{\text{A}^-}/c_{\text{HA}} = K_a/10^{-\text{pH}}, \quad c_{\text{HA}}/c_{\text{A}^-} = 10^{-\text{pH}}/K_a,$$

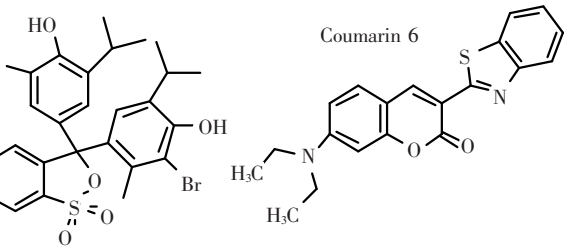
上述表达式可以简化如下式

$$\frac{I_{\text{NR}}}{I_{\text{C6}}} = k_1 10^{\left(\frac{k_2}{1 + K_a/10^{-\text{pH}}} - \frac{k_3}{1 + 10^{-\text{pH}}/K_a} \right)}, \quad (2)$$

3 结果与讨论

荧光纳米水凝胶是通过一种改进的再沉淀方法制备得到^[9]。在 $V(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 9 : 1$ 的混合溶液中,PU、BTB、C6 以及 NR 是以自由分子的状态存在。在透析过程中,随着乙醇分子逐渐渗出透析膜,有机分子周围局域环境的极性逐渐增强。在疏水作用下,PU 聚合物的长链会发生交叉连接和坍塌而形成一种三维稳定的纳米结构^[10, 11]。同时,BTB、C6 和 NR 这些疏水性分子也被固定于纳米颗粒内部。水凝胶中有机分子的掺杂比例是考虑以下两方面因素,根据经验优化而得到:(1)掺杂量不宜过多而损害了聚合物长链的交叉连接和坍塌,以至于影响纳米水凝胶的形成;(2)BTB、C6 和 NR 三者间的比例以产生适宜的发射强度比为最佳。图 1 是荧光纳米水凝胶中相应成分的化学结构式。在荧光纳米水凝胶中,具有非刺激响应性的 PU 被用作基质,pH 探针分子 BTB、荧光分子 C6 和 NR 随机分散于纳米水凝胶中。

Bromothymol blue



一个月之后其尺寸基本不发生改变[图 3(b)]。

荧光纳米水凝胶的 pH 探测能力源于以下两个特点。第一,pH 探针分子 BTB 的吸收光谱与荧光分子 C6 和 NR 的发射光谱均有交叠,如图 4 所示。从图中可以看出,BTB 的吸收光谱随 pH 的变化而变化。在酸性条件下($\text{pH} < 7$),BTB 的吸收峰与 C6 的发射峰有交叠;而在碱性环境下($\text{pH} > 7$),其吸收峰值又与 NR 的发射峰交叠。第

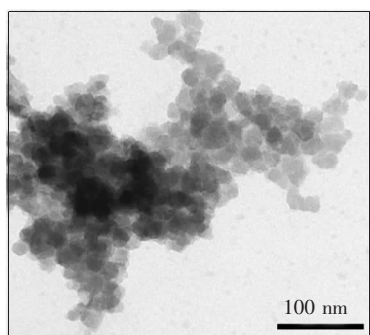


图2 荧光纳米水凝胶在失水状态下的透射电镜照片

Fig. 2 TEM photograph of the dried fluorescent nanogel

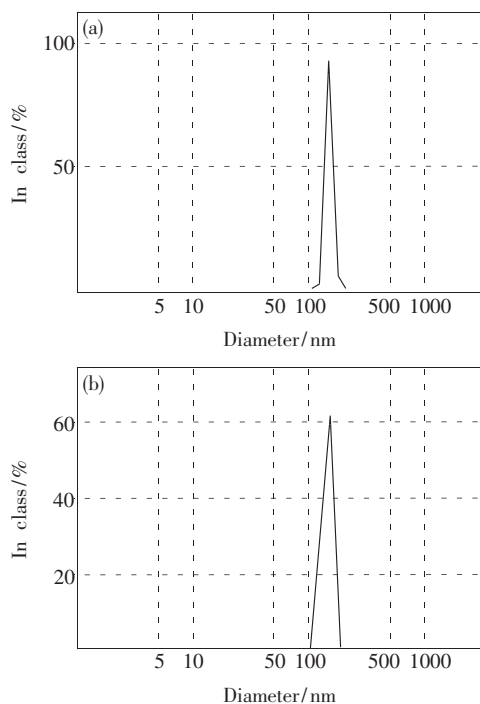


图3 新制备样品(a)和搁置一个月(b)的纳米水凝胶在水溶液中的粒径分布(室温下测量)

Fig. 3 The hydrodynamic size distribution of fresh prepared (a) and stale (b) nanogel

二,在荧光分子 C6 与 NR 之间可以发生有效的共振能量传递(FRET)。由图 4 可以看到,C6 的发射峰与 NR 的吸收峰存在很好的交叠。在溶液时,二者由于处于自由状态,达不到临界距离($<10\text{ nm}$)而不会发生 FRET。但在纳米水凝胶中,大量 C6 和 NR 分子被固定于颗粒中。因为纳米水凝胶的直径在 140 nm 左右,这足以保证大部分 C6 和 NR 可满足临界距离的条件而发生 FRET。下面依据图 4 来具体阐述荧光水凝胶的 pH 探测机理。纳米水凝胶的 pH 敏感性由其中的 BTB 分子赋予。在 450 nm 光激发下,纳米水

凝胶中的荧光分子 C6 发出绿色荧光(峰值在 520 nm),其中的一部分能量通过 FRET 传递给 NR 分子发出 620 nm 红光。在酸性条件下($\text{pH} < 6$),纳米水凝胶中 C6 未进行能量传递的绿色荧光大部分被 BTB 吸收,而 NR 的红色荧光得以保留,从而主要发出红色荧光。在碱性条件下($\text{pH} > 8$),水凝胶中 NR 的大部分红色荧光被 BTB 吸收,而 C6 的绿色荧光得以保留,这时纳米水凝胶主要发出绿色荧光。

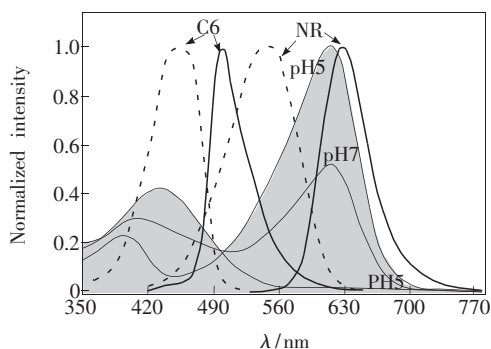


图4 BTB 在不同 pH 值(pH5、7 和 9)水溶液中的吸收光谱(灰色阴影所示),以及 C6 和 NR 在乙醇溶液中各自的吸收(虚线)和发射(实线)光谱。

Fig. 4 (a) pH-dependent absorption of Bromothymol Blue (BTB) in aqueous solution of pH 5.0, 7.0, and 9.0 (grey), respectively, and absorption and emission spectra of coumarin 6 (C6) and Nile Red (NR) in ethanol.

图 5(a)是纳米水凝胶在不同 pH 值下的荧光发射光谱,其中 500 nm 和 620 nm 的发射峰可分别归属到 C6 和 NR 荧光分子。从图中可清晰看出,纳米水凝胶的双重发射强度随 pH 值的变化呈现出不同的趋势。随着 pH 值的增加,C6 的荧光强度逐渐增强,而 NR 的荧光却逐渐减弱。荧光纳米水凝胶所展现出的这种 pH 依赖特性与设计思想完全一致。这样通过测量不同 pH 值纳米水凝胶的双重发射强度,即可建立荧光强度比率与 pH 值的关系。图 5(b)是纳米水凝胶 NR 和 C6 的发射强度比率($I_{F(620)}/I_{F(500)}$)与 pH 值的关系。在 pH 值 $5\sim 9$ 范围内,纳米水凝胶的荧光比率变化接近 9 倍(由 3.5 减小到 0.4)。考虑到荧光分子的发射与 BTB 吸收光谱的重叠,可以假设 $I_{F(620)}$ 和 $I_{F(500)}$ 分别依赖于酸性 BTB 和碱性 BTB 的浓度,从而得到纳米水凝胶荧光比率与 pH 值的理论表达式(实验部分方程 2)。通过与实验数

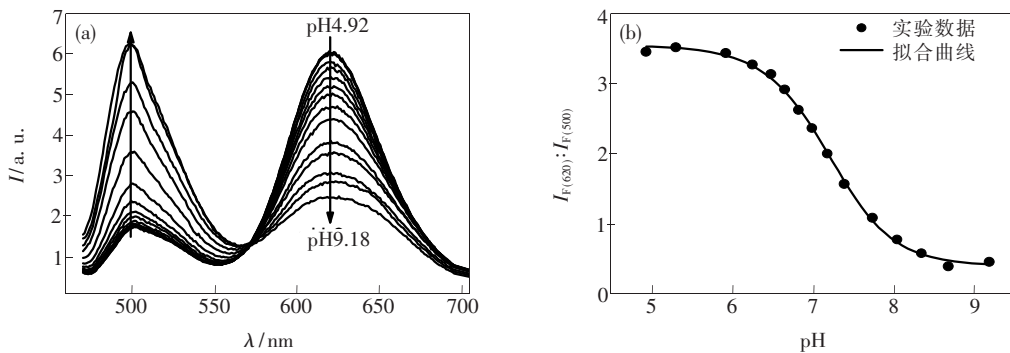


图 5 (a)450 nm 激发下, 荧光纳米水凝胶在不同 pH 值(4.92, 5.29, 5.91, 6.24, 6.47, 6.64, 6.81, 6.98, 7.38, 7.73, 8.04, 8.34, 8.67, 9.18)下的荧光发射光谱; (b) 比率荧光纳米水凝胶的 pH 校正曲线。实验数据由 620 nm 和 500 nm 处的荧光强度比计算得到, 拟合曲线通过方程 2 得到。

Fig. 5 (a) Fluorescence spectra of the ratiometric pH-responsive nanogels at 450 nm excitation at pH values of 4.92, 5.29, 5.91, 6.24, 6.47, 6.64, 6.81, 6.98, 7.38, 7.73, 8.04, 8.34, 8.67, and 9.18, respectively; (b) pH calibration plot of the ratiometric nanogels. The experimental data were calculated from the ratio of the fluorescence intensities at 620 nm and 500 nm. The line is a fit of the function given in Eq. 2.

据的拟合, 得到纳米水凝胶中 BTB 的 pK_a 为 7.64。显然, 所制备的荧光纳米水凝胶非常适宜探测人体的生理范围的 pH 值。另外, 由于具有小尺寸和高度的亲水性, 纳米水凝胶的 pH 响应时间为数秒钟。

4 结 论

提出了一种用于 pH 值传感的比率荧光纳米水凝胶, 该纳米水凝胶是用一种改进的再沉淀法

制备得到的。随着 pH 值指示剂以及 FRET 关联的荧光染料分子的引入, 原本非 pH 响应和非荧光型的聚氨酯水凝胶被赋予了依赖于 pH 值的比例型荧光。该方法也可以应用于构造其他的比率荧光纳米水凝胶以取代以往的染料。由于具有灵敏度高、亲水性好、稳定性好、响应速度快, 且 pH 值检测范围涵盖了生理 pH 值范围(pH 值 6~8)等优点, 该荧光纳米水凝胶有望在细胞内 pH 检测方面得到应用。

参 考 文 献:

- [1] Gehrke S H. Synthesis, equilibrium swelling, kinetics, permeability and applications of environmentally responsive gels [J]. *Adv. Polym. Sci.*, 1993, **110**:81-144.
- [2] Hoffman A S. Hydrogels for biomedical applications [J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, **54**(1):3-12.
- [3] Holtz J H, Asher S A. Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials [J]. *Nature*, 1997, **389**(6653):829-832.
- [4] Kim J, Nayak S, Lyon L A. Bioresponsive hydrogel microlenses [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(26):9588-9592.
- [5] Sirkar K, Revzin A, Pishko M V. Glucose and lactate biosensors based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin films [J]. *Anal. Chem.*, 2000, **72**(13):2930-2936.
- [6] Iwai K, Matsumura Y, Uchiyama S, et al. Development of fluorescent microgel thermometers based on thermo-responsive polymers and their modulation of sensitive range [J]. *J. Mat. Chem.*, 2005, **15**(27-28):2796-2800.
- [7] Gota C, Uchiyama S, Yoshihara T, et al. Temperature-dependent fluorescence lifetime of a fluorescent polymeric thermometer, poly(N-isopropylacrylamide), labeled by polarity and hydrogen bonding sensitive 4-sulfamoyl-7-aminobenzofurazan [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**(10):2829-2836.
- [8] Gota C, Okabe K, Funatsu T, et al. Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**(8):2766-2767.
- [9] Yoo M K, Jang M K, Nah J W, et al. Effect of temperature on the mobility of core-shell-type nanoparticles composed of poly(g-benzyl-L-glutamate) and poly(N-isopropylacrylamide) [J]. *Macromol. Chem. Phys.*, 2006, **207**(5):528-535.

- [10] Missirlis D, Tirelli N, Hubbell J A. Amphiphilic hydrogel nanoparticles. Preparation, characterization and preliminary assessment as new colloidal drug carriers [J]. *Langmuir*, 2005, **21**(6):2605-2613.
- [11] Oh J K, Siegwart D J, Lee H I, *et al.* Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**(18):5939-5945.

A Ratiometric Fluorescence Nanogel for pH Sensor

PENG Hong-shang, HUANG Shi-hua

(Key Laboratory of Luminescence and Optical Information, Ministry of Education, Institute of Optoelectronic Technology, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

Abstract: In this paper a ratiometric fluorescence nanogel was prepared and used in pH sensing. By introducing a pH probe and two fluorescent dyes (related by fluorescent resonant energy transfer), the non-responsive and non-fluorescent hydrogel (polyurathane) was imparted the ability of pH sensing. With the increase of pH value from acidic to basic, the dominant fluorescence of nanogels varied from red to green accordingly. The as-prepared nanogels exhibits high sensitivity, high hydrophilicity, quick responsiveness, and physiological pH detecting in the range of 6 ~ 8. Hence, the nanogels would be very potential as intracellular pH nanosensors.

Key words: nanogel; pH sensor; ratiometric fluorescence; FRET

CLC number: O482.31; O657.32

PACS: 78.55. Kz

PACC: 7855

Document code: A