

Meso-四(对甲基苯基)卟啉及其钴配合物的光学性能与生物应用

张万宇¹ 张晓娟^{*1} 佟佳霖¹ 陈天赐¹ 田俊强¹ 胡 蓉² 王志明^{*2}

(¹ 沈阳工业大学石油化工学院, 辽阳 111003)

(² 香港科技大学深圳研究院, 深圳 518000)

摘要: 对 *meso*-四(对甲基苯基)卟啉(TMPP)和 *meso*-四(对甲基苯基)卟啉钴(TMPP-Co)的溶剂化效应及其水相体系下的发光机理进行了细致地研究。发现 TMPP 在与钴离子配位后发光强度明显下降; TMPP-Co 的溶剂化效应不仅与溶剂极性有关, 还与 Co 离子的轴向配位有关; TMPP 与 TMPP-Co 在水相条件下及在甘油中的发光强度呈现先上升后下降的趋势。此外, TMPP-Co 产生单线态氧的能力较强; 通过制备 TMPP-TAT-NPs 纳米粒子成功实现对细胞的染色, 并局域在细胞溶酶体上。

关键词: TMPP; 溶剂化效应; 单线态氧; 细胞染色

中图分类号: O614.81²; O614.4; O645.13 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2018)12-2161-11

DOI: 10.11862/CJIC.2018.279

Optical Properties and Biological Applications of *Meso*-tetrakis (*p*-methylphenyl) Porphyrin and Its Cobalt Complex

ZHANG Wan-Yu¹ ZHANG Xiao-Juan^{*1} TONG Jia-Lin¹ CHEN Tian-Ci¹

TIAN Jun-Qiang¹ HU Rong² WANG Zhi-Ming^{*2}

(¹ School of Petrochemical Engineering, Shenyang University of Technology, Liaoyang, Liaoning 111003, China)

(² Shenzhen Research Institute, The Hong Kong University of Science and Technology, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: The solvation effects of *meso*-tetrakis(*p*-methylphenyl) porphyrin (TMPP) and *meso*-tetrakis(*p*-methylphenyl) porphyrin cobalt (TMPP-Co), and the luminescence mechanism in aqueous systems have been studied in detail. It was found that the luminescence intensity of TMPP after the complexation of cobalt ions decreased significantly; the solvation effect of TMPP-Co was not only related to the polarity of the solvent but also related to the axial coordination of Co ions. The luminous intensities of TMPP and TMPP-Co showed a trend of increase and then decrease both in aqueous phase and in glycerol. In addition, TMPP-Co has a strong ability to generate singlet oxygen; the preparation of TMPP-TAT-NPs nanoparticles successfully stained cells and localized to the cell lysosomes.

Keywords: TMPP; photoelectric properties; singlet oxygen; cell staining

0 引 言

卟啉类化合物是维持动植物生理活性的中心, 在氧的传输、储存及活化, 酶催化, 光合作用及电子传递过程中发挥着重要的作用^[1-4]。近年来, 科研工作

者们通过不断地改变卟啉母体化合物卟吩环上取代基的种类及位置, 设计出一系列具有特定功能的卟啉类衍生物。如今, 卟啉类化合物已被广泛用于光电化学、生物医学、分析化学、催化等诸多领域^[5-12]。

人们不断地设计结构复杂的卟啉类化合物, 反

收稿日期: 2018-05-22。收修稿日期: 2018-10-02。

国家自然科学基金(No.51673118)和深圳市基础研究计划项目(No.JCYJ20160428150429072)资助。

*通信联系人。E-mail: zxj51565@163.com, wangzhm1983@163.com

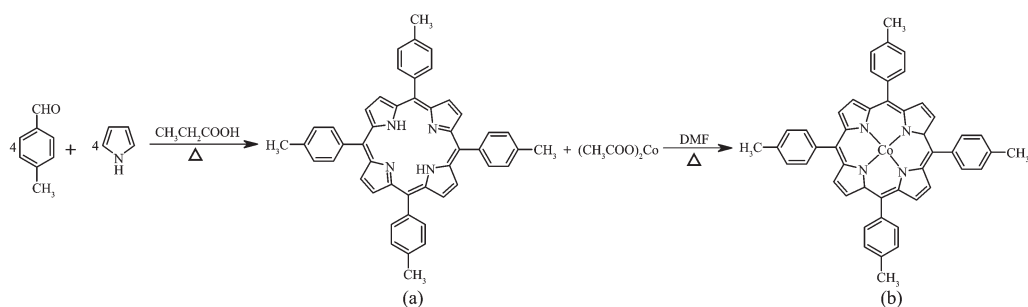


图 1 TMPP (a) 及 TMPP-Co (b) 的合成路线

Fig.1 Synthesis route of TMPP (a) and TMPP-Co (b)

而忽视了对结构较为简单的卟啉类化合物的研究。因此本文制备并纯化了 *meso*-四(对甲基苯基)卟啉(TMPP)及其钴配合物 TMPP-Co, 并对它们的溶剂化效应、不同水含量下的发光情况及单线态氧(ROS)产生能力进行了细致的讨论, 根据吸收及发射光谱的变化过程提出了相应的发光机理。由于卟啉类化合物作为光动力疗法的光敏剂, 在光的激发下能够产生杀灭肿瘤细胞的单线态氧, 目前已成为生物医学领域的研究热点^[13-16]。因此本文也尝试用 MAL(马来酸酐)修饰的 PEG(聚乙烯醇)包覆 TMPP 并用 TAT(一种具有细胞膜穿透作用的多肽)修饰, 以制备 TMPP-MAL-TAT 纳米粒子, 并探究其在细胞染色领域的应用。

1 实验部分

1.1 TMPP及 TMPP-Co 的制备

采用优化后的 Alder 法^[17]合成 TMPP。取 250 mL 四口烧瓶, 加入 120 mL 丙酸作溶剂兼催化剂, 加热搅拌至回流后停止加热, 待温度降至 110 °C 时滴加新蒸吡咯与对甲基苯甲醛(物质的量之比为 1:1.1, 以 0.05 mol 吡咯为基准), 滴加结束后迅速加入 2 mL 硝基苯, 继续加热搅拌至回流并开始计时, 反应 40 min 后蒸出 90 mL 丙酸, 停止反应, 将反应液冷却至室温, 再放入 -25 °C 环境中静置过夜产生结晶沉淀, 经抽滤、洗涤获得滤饼, 用硅胶柱层析法提纯, 流动相为二氯甲烷/石油醚(1:3, V/V), 收集第一色带(紫色), 旋干溶剂后得 2.09 g 紫色晶体, 收率为 25%。UV-Vis(DCM, λ /nm): S: 412, Q: 516, 551, 591, 648。¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz): δ -2.77(s, 2H, N-H), 2.70(s, 12H, -CH₃), 7.54(d, J =4.6 Hz, 8H, Ph), 8.08(d, J =4.7 Hz, 8H, Ph), 8.85(s, 8H, Py)。IR (KBr, cm⁻¹): 3 335, 2 914, 1 504, 1 470, 1 348, 982, 838。HRMS: C₄₈H₃₈N₄ 计算值 670.309 6, 实验值 670.226 4。

采用一锅法合成 TMPP-Co。取 250 mL 四口烧瓶, 加入精制后的 TMPP 2 g, 按 TMPP 与金属盐物质的量之比 1:7 加入一定质量的乙酸钴, 以 120 mL DMF 做溶剂兼催化剂, 搅拌加热至回流开始计时, 反应 4.5 h 后蒸出 90 mL 溶剂, 停止反应, 后处理过程与 TMPP 的后处理过程相同, 其中柱层析法提纯的流动相为二氯甲烷/石油醚(1:2, V/V), 收集第二色带(橘红色), 旋干溶剂后得 1.9 g 紫色晶体, 收率 92%。UV-Vis(DCM, λ /nm): S: 413, Q: 483。¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz): δ 2.69(s, 12H, -CH₃), 7.80(d, J =4.6 Hz, 8H, Ph), 8.47(d, J =4.7 Hz, 8H, Ph), 8.52(s, 8H, Py); IR (KBr, cm⁻¹): 2 915, 1 505, 1 454, 1 349, 998, 845; HRMS: C₄₈H₃₆CoN₄ 计算值 727.227 2, 实验值 727.141 7。

1.2 光学性能测试

分别称取 10 mg 的 TMPP 及 TMPP-Co, 稀释到 10 mL 四氢呋喃(THF)中, 配成一定浓度的母液, 采用日本岛津公司 UV-2600 型紫外分光光度计及 PerkinElmer 公司 LS-55 型荧光分光光度计进行吸收和发射光谱的测定。测试溶剂化及含水体系下的发射光谱时, 激发波长为其在该体系下 S 带的吸收波长, 狭缝宽度均为 15 nm。

1.3 电化学测试

采用上海辰华 CHI760E 电化学工作站进行循环伏安测试。以精制的二氯甲烷为正方向扫描溶剂, 无水 DMF 为负方向扫描溶剂, 配制成浓度为 0.1 mol·L⁻¹ 的四丁基六氟磷酸铵电解质溶液。工作电极为玻碳电极, 参比电极为 Ag/AgNO₃ 电极, 辅助电极为铂电极, 以二茂铁做内标(4.8 eV)。测试时将少量化合物加入到电解槽中, 加入 3 mL 电解液, 连接电极, 设置参数(扫速为 0.1 V·s⁻¹)进行正负方向扫描测试。在测试负向时要通入少量的氮气。

HOMO 能级的计算方法:

$$E_{\text{HOMO}} = -e(E_{\text{ox}}^{\text{onset}} + 4.8 \text{ V} - E_{\text{Fc}^+/ \text{Fc}})$$

$E_{\text{ox}}^{\text{onset}}$: 氧化初始电位; $E_{\text{Fc}^+/ \text{Fc}^{\cdot+}}$: 正方向二茂铁氧化还原峰值平均值。

LUMO 能级的计算方法:

$$E_{\text{LUMO}} = -e(E_{\text{red}}^{\text{onset}} + 4.8 \text{ V} - E'_{\text{Fc}^+/ \text{Fc}^{\cdot+}})$$

$E_{\text{red}}^{\text{onset}}$: 还原初始电位; $E'_{\text{Fc}^+/ \text{Fc}^{\cdot+}}$: 负方向二茂铁氧化还原峰值平均值。

能级差的计算方法:

$$\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$$

1.4 活性氧测试

以 THF 为溶剂将 TMPP 及 TMPP-Co 配成浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液。在避光条件下用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠水溶液水解掉 ROS(二氯荧光素二乙酯)中的乙酯使其成为二氯荧光素,即将 ROS 探针激活。取 2.900 mL 去离子水于比色皿中,加入 $30 \mu\text{L}$ 母液,再向比色皿中加入 $70 \mu\text{L}$ 激活后的 ROS 荧光探针,并让他们充分混合均匀。加入荧光探针时要保证周围环境昏暗或在避光条件下进行,并且在接下来的测试中也要使周围环境达到同样条件。调节光源强度使其达到 $4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,并使光照均匀。测试时间范围为 $1 \sim 10 \text{ min}$,每光照 1 min 进行一次荧光测试,设置荧光光谱的 $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ (激发波长)和 $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ (观测波长),狭缝宽度为 2 nm ;测试荧光光谱范围为 $495 \sim 700 \text{ nm}$ 。

1.5 细胞染色实验

采用商业购买的 HeLa 细胞进行培养及传代,先进行 TMPP 与 TMPP-Co 对细胞的直接染色:在培养皿中加入 1 mL 培养基,加入 $150 \mu\text{L}$ (或 $80 \mu\text{L}$)充分混合的细胞培养基,混匀后置于培养箱中,待细胞贴壁后即可用于染色。用 DMSO 将染料配成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,取 $5 \mu\text{L}$ 母液于培养皿中混匀,置于培养箱中培养 30 min 后移去培养基,用 PBS 溶液洗 3 次以确保染料不再残余在溶液中,再加入 1 mL 培养基,将其置于荧光显微镜下拍照,选用与染料的最大吸收波长相近的激光波长,若荧光微弱则可将染料浓度提高或染色时间延长,若荧光较强则可适当降低染料浓度或缩短染色时间,以此来确定最适浓度和染色时间。确定后则可用最适浓度和时间进行后续实验。

再用 MAL(马来酸酐)修饰的 PEG(聚乙烯醇)进行包覆 TMPP 衍生物纳米粒子的制备及其 TAT 修饰。制备 TMPP-TAT-NPs 纳米粒子的步骤如下:称取 1.0 mg TMPP,溶于 1 mL 氯仿溶液中,得到 $1 \text{ mg} \cdot$

mL^{-1} TMPP 溶液。称取 1 mg MAL(马来酸酐修饰的 PEG),溶于 0.5 mL TMPP 溶液,再加入 4.5 mL 纯水,得到 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MAL-TMPP 混合溶液。将 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MAL-TMPP 混合溶液超声(时间 5 min ,强度 20%)使得 TMPP 和 MAL 充分接触。往溶液中通入氮气约 6 h ,使氯仿溶液挥发干后,将 TMPP 水溶液过滤膜,得到 TMPP-MAL 水溶液约 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 0.5 mL TMPP-MAL 水溶液,加入 $2 \mu\text{L}$ TAT,搅拌过夜后透析 2 d ,得到约 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMPP-MAL-TAT 水溶液。取 $100 \mu\text{L}$ 于 1 mL 培养基中,混匀后与 HeLa 细胞共培养 9 h 。

用 PBS 冲洗细胞 2 次后用共聚焦荧光显微镜进行拍照,观察其染色情况。

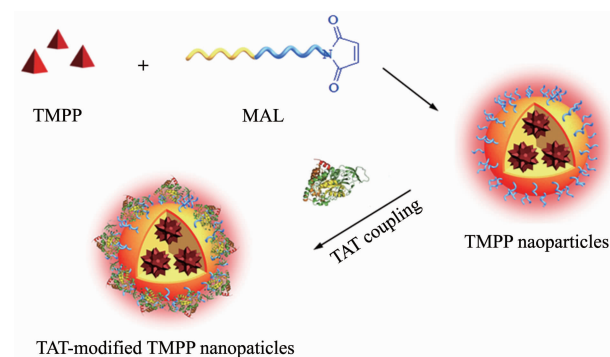


图 2 MAL 修饰的 PEG 包覆的 TMPP 衍生物纳米粒子及 TAT 修饰过程

Fig.2 MAL-modified PEG coated TMPP derivatives nanoparticles and TAT modification process

2 结果与讨论

2.1 溶剂化效应

每次取 2.5 mL 不同极性的溶剂于比色皿中,再加入 $50 \mu\text{L}$ 母液搅匀进行溶剂化效应测试,结果如图 3 所示。从整体上看 TMPP 与 TMPP-Co 的发射峰强度及峰位变化存在一定的差异,但也存在一定的共性,如在甲苯中都发生了红移;在乙腈、乙醇及异丙醇中均发生蓝移。同时也发现与金属离子配位后,发光强度显著下降。

通过图 3a 发现, TMPP 在不同极性溶剂中的变化较为规律:在质子型极性溶剂中的发光较强;在非质子非极性溶剂中的发光较弱。按照溶剂极性顺序,理论上 TMPP 在乙腈中的发光应较强,但由于其极性较大,使 TMPP 的空间结构发生扭曲,造成电荷分布不均,电子跃迁能隙变宽,激发态电子多以无辐射跃迁的形式回落至基态,因此表现为发射

峰变宽、发射峰位蓝移及发射强度下降。而乙醇及异丙醇存在分子间氢键的作用,它们能形成较大体系的链状结构,从而实现对发光中心的包裹缠绕,降低了 TMPP 因振转运动而损耗的能量,使发光增强;同时,这种链状结构具有较大极性,同样会使跃迁能隙变宽,表现出发射峰变宽及发射峰位蓝移。这也预示着可以通过在 *meso* 位苯环对位上链接较长结构的烷基链实现对发光核的包裹,抑制分子间相互作用,进而实现卟啉在水相条件下及薄膜条件下的应用。

通过图 3b 可知, TMPP-Co 在不同极性溶剂中的发射峰强度变化是不规律的。特别是将 TMPP-Co 母液滴入乙腈后,溶液颜色由浅棕色立即变为黄绿色。图 4 为 50 μL 母液在乙腈-THF 混合溶剂中(总体积 10 mL,乙腈含量用体积分数表示)的吸收及发射光谱。如图 4a 所示,随着乙腈含量的逐渐增加,S

带吸收峰由单峰逐渐变为双峰,Q 带吸收峰渐渐消失,这是由于 TMPP-Co 的中心金属离子与乙腈分子中氮上的孤对电子发生轴向配位形成图 6 中的 TMPP-Co(CN)^[18]。而乙腈分子属于 *p*- π 共轭结构,在发生轴向配位后,能使发光中心的电子云密度增加,因此从图 4b 中可以发现发射峰强度随乙腈含量的增加逐渐增强。

由于 TMPP-Co 可以发生轴向配位,选用具有大 π 共轭结构的吡啶与 THF 配成混合溶剂(总体积 10 mL,吡啶含量用体积分数表示)加入 50 μL 母液测得吸收及发射光谱如图 7 所示。由图 7a 可见, TMPP-Co 的 S 带吸收峰由单峰变为双峰,这表明 TMPP-Co 与吡啶发生了轴向配位,形成了图 6 中的 TMPP-Co(Py)。其中 1 号吸收峰呈现先下降后上升再下降的趋势,吸收峰位先蓝移后红移;2 号吸收峰则随着吡啶含量的增加逐渐变为肩峰且强度变化

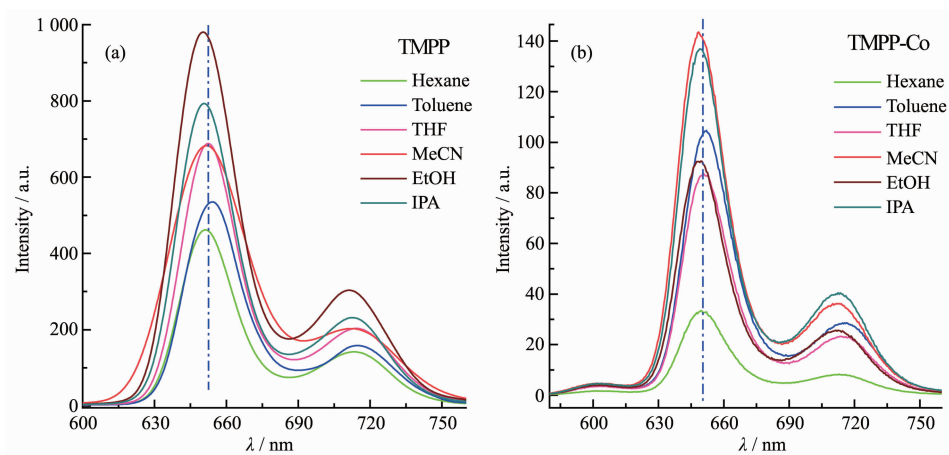
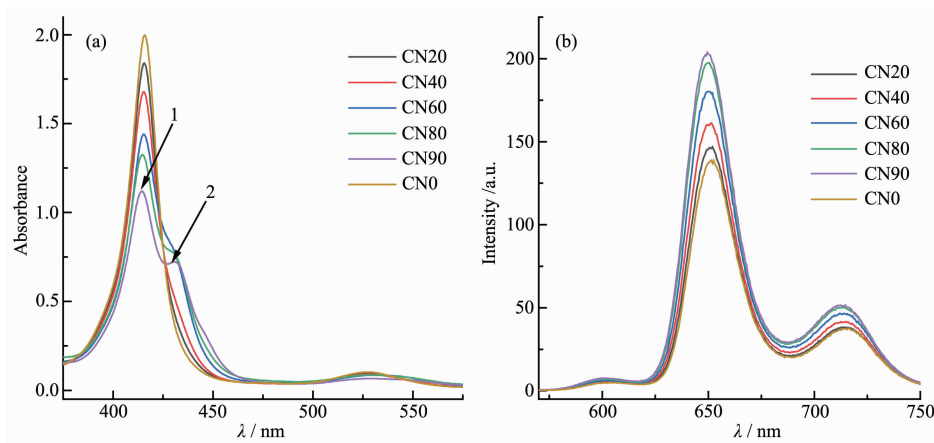


图 3 TMPP 及 TMPP-Co 在不同溶剂中的发射光谱

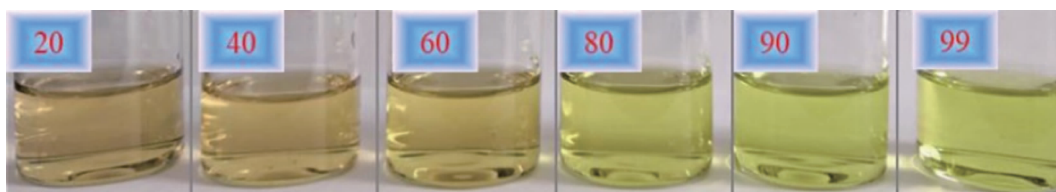
Fig.3 Emission spectroscopy of TMPP and TMPP-Co in different solvents



CN0~CN90: content of MeCN=0, 20%, 40%, 60%, 80%, 90% (V/V), respectively

图 4 TMPP-Co 在不同体积比的乙腈-THF 溶剂中的吸收 (a) 和发射 (b) 光谱

Fig.4 Absorption (a) and emission (b) spectra of TMPP-Co in acetonitrile-THF solvents with different volume ratios



From left to right: content of MeCN=20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 99% (V/V), respectively

图 5 TMPP-Co 溶液在不同体积比的乙腈-THF 溶剂中的颜色变化

Fig.5 Color change of TMPP-Co solution in acetonitrile-THF solvents with different volume ratios

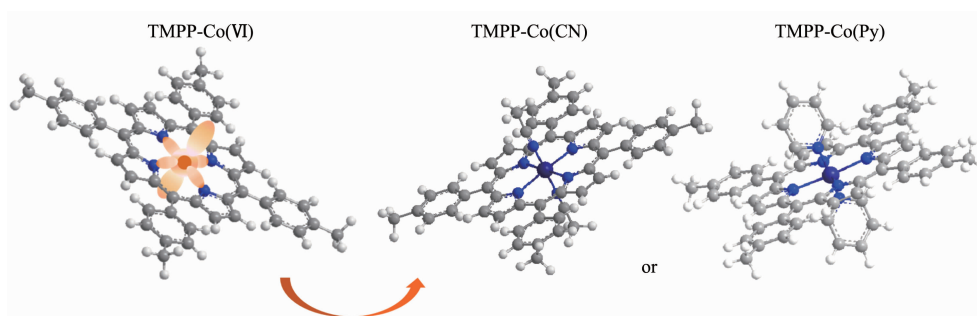
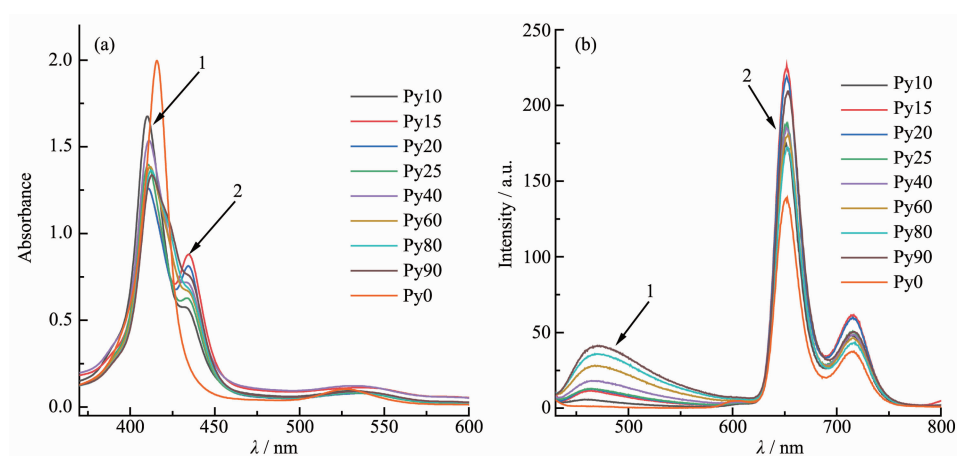


图 6 TMPP-Co 在乙腈或吡啶中发生轴向配位的机理

Fig.6 Mechanism of axial coordination of TMPP-Co in acetonitrile or pyridine



Py0~Py90: content of pyridine=0, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 60%, 80%, 90% (V/V), respectively

图 7 TMPP-Co 在不同体积比的吡啶-THF 溶剂中的吸收 (a)和发射 (b)光谱

Fig.7 Absorption (a) and emission (b) spectra of TMPP-Co in pyridine-THF solvents with different volume ratios

不规则,这说明 TMPP-Co(Py)中出现了分子内电荷转移的过程,但 TMPP-Co 母体与轴向配体之间的电荷转移存在一个相互竞争的关系:即吡啶含量在 0~15%内是先逐渐形成 TMPP-Co (Py),并增大母体 TMPP-Co 的大 π 环发光中心电子云密度,这一过程也导致吡啶配体表现出缺电子特性,使 TMPP-Co (Py)分子内形成 TMPP-Co 电子供体(D)及 Py 电子受体(A);随着吡啶含量的增加,溶剂极性也随之增强,电荷由发光中心逐渐转移至轴向的 Py 配体上,这一过程从图 7b 中 1 号发射峰和 2 号发射峰强度的变化也可以得到印证 (吡啶含量 20%~80%时,1 号

发射峰强度迅速增强;2 号发射峰强度迅速下降);当吡啶的含量达到 90%以上, TMPP-Co(Py)分子内电荷分布趋于稳定,此时体系中充满含有 π 键的吡啶分子,出现了分子间较强的 π - π 相互作用。由于斥力的存在避免了 TMPP-Co(Py)的相互堆叠,并使 TMPP-Co(Py)整体结构更加平整,因此发光强度增强,吸收峰和发射峰也相应地发生红移。

基于 TMPP-Co 在含 π 体系中发光规律,其在甲苯中发光强度的变化也可以得到合理的解释:在甲苯中因 π - π 互斥作用,避免了由于 TMPP-Co 相互堆叠而引发的荧光淬灭,同时使电子尽可能多的

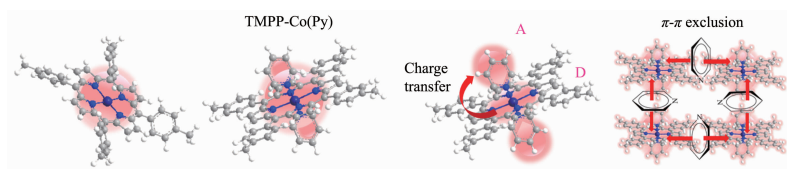


图 8 TMPP-Co 在不同体积比的吡啶-THF 溶剂中的发光机理

Fig.8 Luminescent mechanism of TMPP-Co in pyridine-THF solvent with different volume ratios

局域在发光核附近。而其在乙醇及异丙醇中的发光强度与 TMPP 中的不同,这是由于异丙醇与乙醇相比多了一个具有供电性的甲基,导致氢键作用减弱且极性降低,但异丙醇通过轴向配位增强 TMPP-Co 中心的电子云密度。

2.2 含水体系下的发光性能

图 9 为 TMPP 与 TMPP-Co 的 50 μL 母液在水-THF 混合溶剂中(总体积 10 mL,水的含量用体积分数表示)1 号发射峰的强度变化。从图 10 中可知, TMPP 与 TMPP-Co 的发射光谱强度随着水含量的

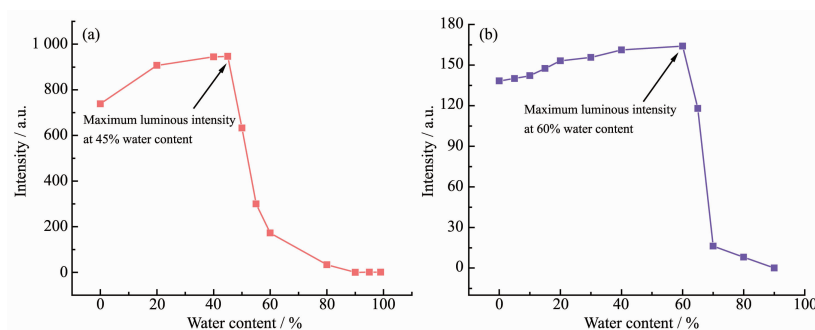
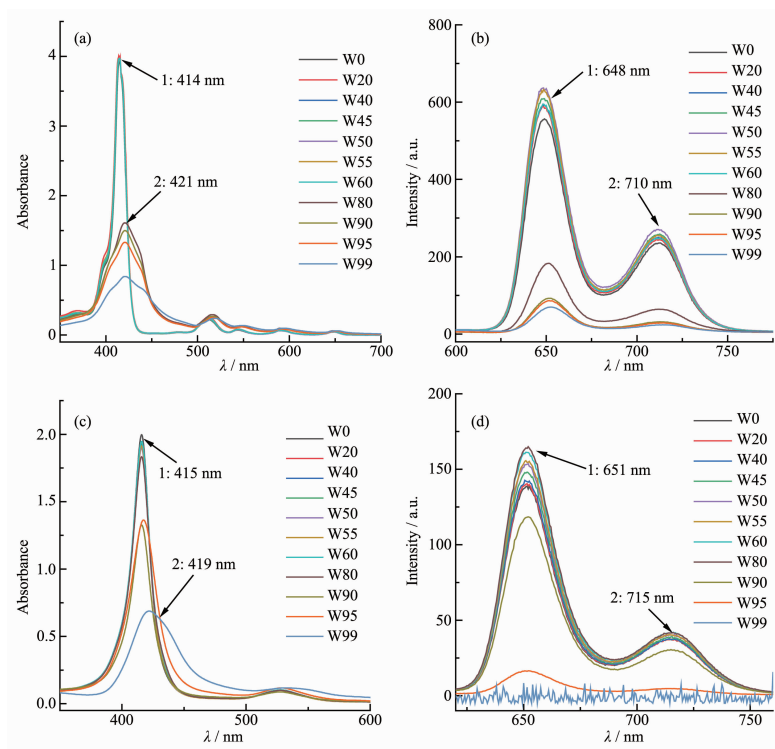


图 9 TMPP (a) 及 TMPP-Co (b) 在水-THF 溶剂中随水含量增加 1 号发射峰强度的变化

Fig.9 Change of intensity of emission peak 1 of TMPP (a) and TMPP-Co (b) with increasing water content in water-THF solvents



W0~W99: content of pyridine=0, 20%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 80%, 90%, 95%, 99% (V/V), respectively

图 10 TMPP 及 TMPP-Co 在不同体积比的水-THF 溶剂中的吸收 (a, c) 和发射 (b, d) 光谱

Fig.10 Absorption (a, c) and emission (b, d) spectra of TMPP and TMPP-Co in water-THF solvents with different volume ratios

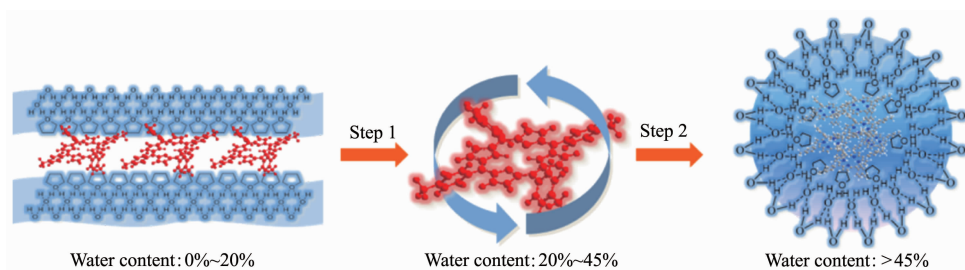


图 11 TMPP 在不同体积比的水-THF 溶剂中的发光机理

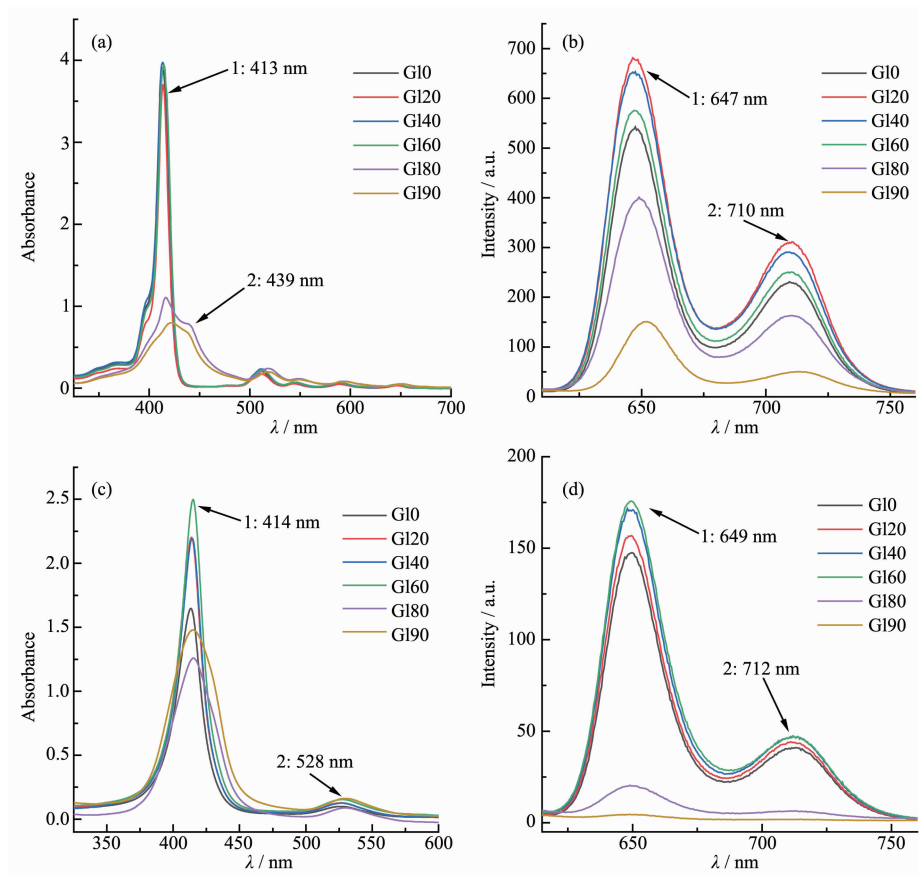
Fig.11 Luminescence mechanism of TMPP in water-THF solvent with different volume ratios

增加均呈现先上升后显著下降的趋势,这说明二者均为 ACQ 型分子。对二者在不同水含量下的发光机理进行了推测:当水含量较少时,会受到水极性的影响,表现为极性增大,发光强度增强;随着水含量的增加,在水中氢键的作用下,溶剂自身形成链状结构,实现对发光核的包裹缠绕,减少卟啉因自身振转而损耗的能量,这与在乙醇及异丙醇中的发光机理相同,因此发光强度会有所增强^[9];由于 TMPP 及 TMPP-Co 本身不溶于水,在水含量达到一定程度后,会发生聚集,体系逐渐变为水包油型的

乳液,使 TMPP 及 TMPP-Co 分子发生扭曲。从图 10a 及图 10c 中的 2 号吸收峰也可以看到,S 带吸收峰均发生了明显的红移,并且吸收强度显著下降,吸收峰变宽,出现较弱的肩峰。这些变化均表明它们是因结构的改变导致分子轨道重组,能隙变窄,发光中心的电荷发生转移,因此出现荧光淬灭的现象。

2.3 粘度对发光性能的影响

图 12 为 TMPP 及 TMPP-Co 的 50 μL 母液在甘油-乙醇混合溶剂中的吸收和发射光谱(总体积 10



G10~G190: content of glycerol = 0, 20%, 40%, 60%, 80%, 90% (V/V), respectively

图 12 TMPP 及 TMPP-Co 在不同体积比的甘油-乙醇溶剂中的吸收 (a, c) 及发射 (b, d) 光谱

Fig.12 Absorption (a, c) and emission (b, d) spectra of TMPP and TMPP-Co in glycerol-EtOH solvents with different volume ratios

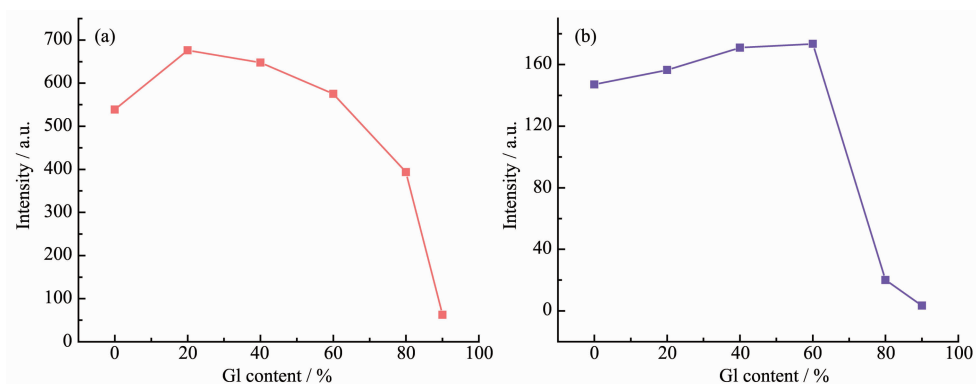
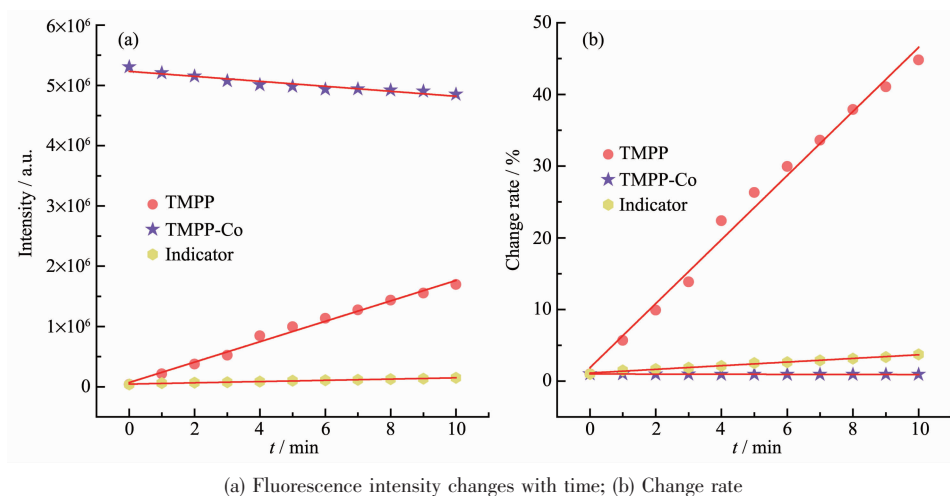


图 13 TMPP (a)及 TMPP-Co (b)在甘油-乙醇溶剂中随甘油含量增加 1 号发射峰强度的变化
Fig.13 Change of the intensity of emission peak 1 of TMPP (a) and TMPP-Co (b) with increasing glycerol content in glycerol-EtOH solvents

mL, 甘油含量用体积分数表示)。采用该方法进一步探究这 2 种化合物在不同粘度下的发光机理。图 13 为 2 种化合物 1 号发射峰随甘油含量增加的变化规律,这与它们在随水含量增加时发光强度的变化规律(图 9)基本一致。甘油含量较少时,2 种化合物均因粘度增大而使自身振转受限,发光强度增强。但观察图 12a 发现,当甘油含量达 80% 时, S 带吸收峰出现了明显的肩峰,并且吸收峰强度明显下降,发生了一定程度的红移,这说明粘度较大时 TMPP 的结构确实发生了扭曲,并出现了电荷转移的过程;然而观察图 12b 发现其发射峰位置未发生变化,也未出现新的发射峰,说明它仍然是以大 π 环为发光中心。TMPP-Co 在高粘度下的发光机理与 TMPP 基本相同。该实验也证明了水相条件下发光机理的正确性。

2.4 活性氧测试结果

考虑到 ROS 探针在细胞生物体系内的应用日益成为光动力学研究的热点,因此采用 TMPP 及 TMPP-Co 在水系条件下形成的纳米粒子作为研究对象。图 14 直观地给出随着时间的变化,ROS 探针荧光强度的变化规律。其中,在 TMPP 体系中 ROS 的荧光强度随着光照时间的增加逐渐增大,单线态氧的生成速度与光照呈现良好的线性关系。而在 TMPP-Co 的体系中,ROS 的荧光强度起始时就相对较大,随时间略有下降,说明其生成单线态氧的速度极快,能够在 1 min 内完成转化,通过测试 TMPP 与 TMPP-Co 的电化学循环伏安曲线(图 15),发现其具有较低的氧化还原电位,并且能隙较低,很容易发生电子跃迁;此外,钴离子的顺磁性也能使 TMPP-Co 很容易发生电子从最低激发单重态至中



(a) Fluorescence intensity changes with time; (b) Change rate
图 14 TMPP 及 TMPP-Co 的活性氧测试光谱图
Fig.14 Spectra of TMPP and TMPP-Co for active oxygen test

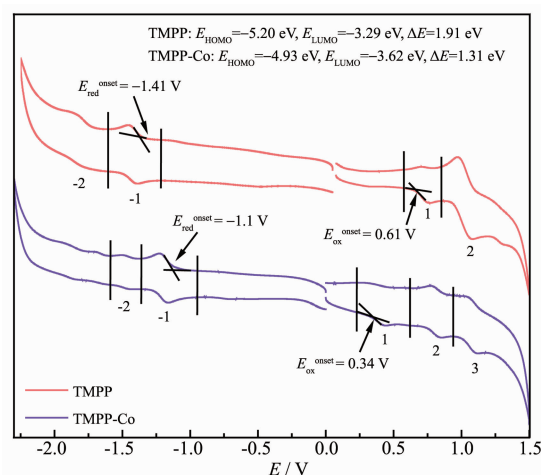


图 15 TMPP 及 TMPP-Co 循环伏安曲线对比

Fig.15 Comparison of cyclic voltammograms of TMPP and TMPP-Co

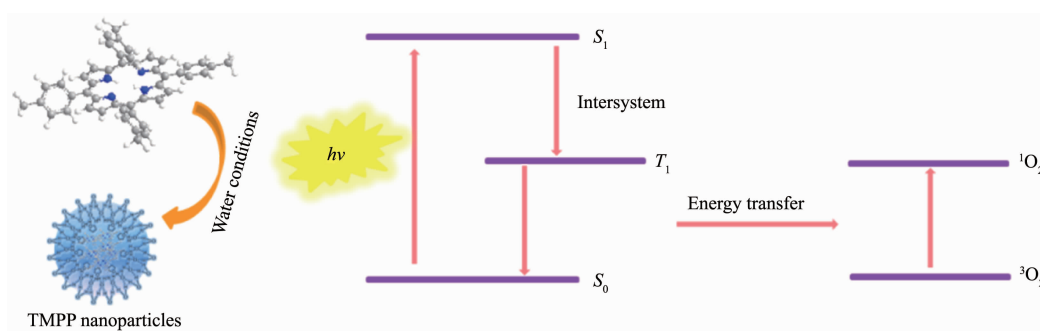


图 16 TMPP 单线态氧产生的机理

Fig.16 Singlet oxygen generation mechanism of TMPP

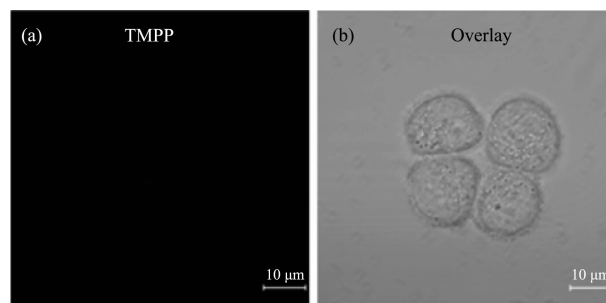
心离子三重态的系间窜越^[20];但从另外一个角度看,它的氧化过程可能不是以光控做为决速步骤。据此推测的单线态氧产生机理如图 16 所示。钴离子的引入确实在效果上增加了 ROS 的产生能力,从而起到活化氧化的作用,这对目前关注的工业仿生催化和细胞内的诊疗都具有积极意义。

2.5 细胞染色实验

结合上面的数据分析,拟开展 TMPP 及 TMPP-Co 在细胞层次的荧光成像应用研究。从前文看 TMPP 及 TMPP-Co 具有良好的发光效率、电化学反应和产生活性氧的能力。本文用 TMPP 和 TMPP-Co 作为研究对象直接制备荧光探针。可能由于分子间较强的相互作用,导致这 2 种化合物很难采用传统的 DMSO 溶解分散法制备荧光探针。尽管 TMPP 的溶解性较 TMPP-Co 有一定提高,但是发现其与 HeLa 细胞作用 10 h 后均没有观测到细胞内荧光信号(图 17),与明场图像对比,证明 TMPP 并未进入到细胞内部。这个原因可能是由于 TMPP 本身形成的粒子尺寸过大,很难通过细胞的吞噬效应进入细

胞;而其在细胞机制培养液中也很难解离成单分子形式进入细胞,从而导致其并未观测到荧光信号。

因此,只能采用具有细胞膜穿透能力的 TAT (TAT 是一种具有细胞膜穿透作用的多肽) 作为修饰,将纳米粒子表面变为正电荷,利用穿透机制进入细胞。选择 TMPP 进行进一步研究,将 TMPP 和



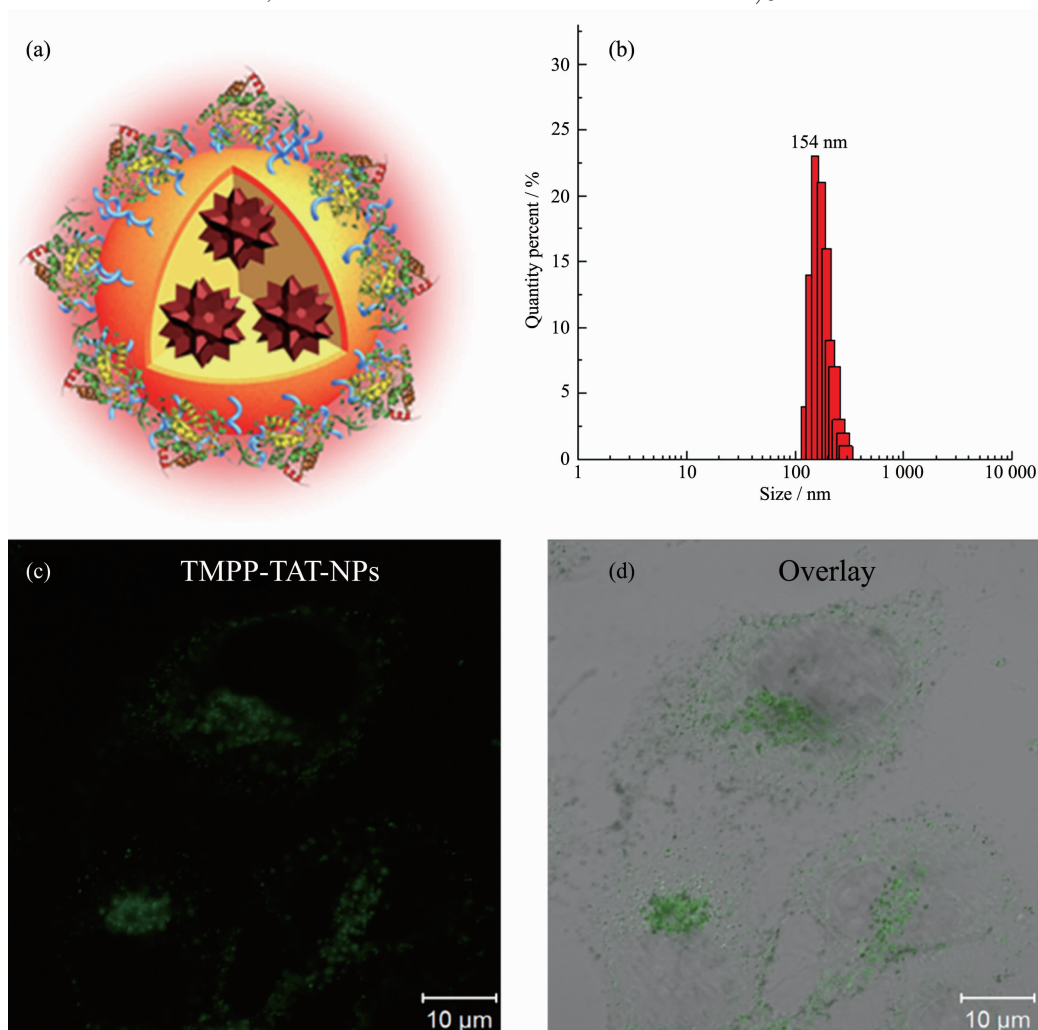
(a) Dark field fluorescence image excited by $\lambda_{ex}=405$ nm;
(b) Overlapping image of dark field fluorescence image and bright field image

图 17 TMPP 采用 DMSO 传统法进行细胞染色实验
Fig.17 Cell staining experiment of TMPP using DMSO traditional method

马来酸酐修饰的聚乙烯醇(MAL-PEG)包裹共混,使用氯仿作为主溶剂,然后利用氮气吹干法制备稳定的纳米粒子 TMPP-MAL-NPs;进一步采用原位点击的反应,将富含氨基的 TAT 与纳米粒子表面的马来酰胺的双键反应,得到 TMPP-TAT-NPs,其纳米粒径为 154 nm, ζ 电位是 9.9 mV。这个正的表面电位证明 TAT 已经引入到纳米粒子表面,而且正电荷有利

于穿透细胞膜(细胞膜表面为负电位)。

采用制备的 TMPP-TAT-NPs 对 HeLa 细胞进行染色发现(图 18c),当作用时间为 2 h 时,纳米粒子已经进入细胞并且局域在细胞内溶酶体上,从暗场激发和重叠图像中均可以观测到显著的荧光信号(这里仍使用绿色荧光作为伪色来提高对比度,实际荧光颜色为深红色)。



(a) TMPP-TAT-NPs-coated nanoparticles; (b) Hydrated ionic radius of TMPP-TAT-NPs; (c) Cells fluorescence imaging in dark field; (d) Image of cell overlapping in bright field and dark field

图 18 TMPP-TAT-NPs 包覆的纳米粒子及其对 HeLa 细胞的荧光成像

Fig.18 TMPP-TAT-NPs-coated nanoparticles and their fluorescence imaging on HeLa cells

3 结 论

TMPP 与钴离子配位后,荧光强度下降。TMPP 在不同极性溶剂中的发光会随着溶剂极性的增强而增强,但乙腈极性较大,会改变 TMPP 结构,使其发光强度减弱;而 TMPP-Co 在不同溶剂中的发光强度不仅与溶剂极性有关,还与中心金属离子的轴向

配位有关。此外, TMPP-Co 及 TMPP 在水含量增加的过程中,荧光强度呈先上升后下降的趋势,二者在含水量较大的体系中均形成水包油状纳米颗粒。当水含量或粘度较大时,这 2 种化合物的结构会发生扭曲并且出现电荷转移的过程,导致荧光淬灭。循环伏安测试显示 TMPP-Co 具有较低的能级差,其在水相条件下产生活性氧的能力较强。采用 TMPP

制备的 TMPP-TAT-NPs 纳米颗粒成功对细胞进行染色,并具有一定的靶向性。

致谢: 感谢国家自然科学基金面上项目(No. 51673118) 和 深圳市 基础 研究 计划 项目 (No. JCYJ20160428150429072)的资助;感谢胡蓉博士和王志明博士在生物成像实验及分析方面给予的帮助。

参考文献:

- [1] Jaramillo M C, Briehl M M, Batini-Haberle I, et al. *Free Radical Biol. Med.*, **2015**,**83**:89-100
- [2] Tovmasyan A, Sampaio R S, Boss M K, et al. *Free Radical Biol. Med.*, **2015**,**89**:1231-1247
- [3] Zhang N, Chen J, Cheng K, et al. *Res. Chem. Intermed.*, **2017**,**43**:2921-2929
- [4] ZHANG Xian-Xia(张现侠), CHEN Can-Yu(陈灿玉). *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2012**,**70**:2475-2483
- [5] Bagheri S, Omidikia N, Sarvar N, et al. *J. Iran. Chem. Soc.*, **2018**,**15**:587-593
- [6] SHA Qiu-Yue(沙秋月), YUAN Xue-Mei(袁雪梅), WANG Xiao-Yu(王小雨), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2016**,**32**(7):1293-1302
- [7] Svirskiy G I, Sergeeva N N, Krasnikov S A, et al. *Phys. Solid State*, **2017**,**59**:368-377
- [8] Loredó-Calderón E L, López-Cortina S T, Carranza-Rosales P, et al. *Med. Chem. Res.*, **2016**,**25**:1657-16650
- [9] LI Yi-Chun(李懿春), QI Yong(齐勇), PAN Ji-Gang(潘继刚). *Chemical Research and Application*(化学研究与应用), **2016**, **28**(1):25-29
- [10] Wei M, Wan J, Hu Z, et al. *J. Mater. Sci.-Mater. Electron.*, **2016**,**27**:4026-4034
- [11] Sohrabi S, Dehghanpour S, Ghalkhani M. *J. Mater. Sci.*, **2018**, **53**:3624-3639
- [12] Fazaeli Y, Jalilian A R, Amini M M, et al. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2013**,**295**:255-263
- [13] Mukai H, Wada Y, Watanabe Y. *Ann. Nucl. Med.*, **2013**,**27**: 625-639
- [14] Jimenez C M, Rubio Y G, Saunier V, et al. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2016**,**79**:447-456
- [15] REN Li-Lei(任丽磊), PENG Xiao-Xia(彭晓霞), ZHAO Xiu-Li(赵秀丽), et al. *Chinese Journal of Applied Chemistry*(应用化学), **2016**,**33**(12):1415-1419
- [16] Song H, Wang G, Wang J, et al. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2018**,**316**:363-368
- [17] Adler A D, Longo F R, Finarelli J D, et al. *J. Org. Chem.*, **1967**,**32**:476-479
- [18] ZHONG Wen-Xing(钟文星), CHEN Guo-Qiang(陈国强). *Journal of Suzhou University: Engineering Science Edition* (苏州大学学报:工科版), **2008**,**28**(4):55-57
- [19] Rychtáriková R, Šabata S, Hetflejš J, et al. *Chem. Pap.*, **2012**,**66**:269-277
- [20] LÜ Yan-Yang(吕艳阳), LIU Xiao-Yu(刘小玉), CAO Jun(曹俊). *Journal of Xinyang Normal University*(信阳师范大学学报), **2010**,**23**(2):275-277