



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115290612 A

(43) 申请公布日 2022.11.04

(21) 申请号 202210019403.5

(22) 申请日 2022.01.06

(71) 申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区粤海街道南海大道3688号

(72) 发明人 何前军 龚晚君

(74) 专利代理机构 深圳市世纪恒程知识产权代理事务所 44287

专利代理人 刘锡滨

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/01 (2006.01)

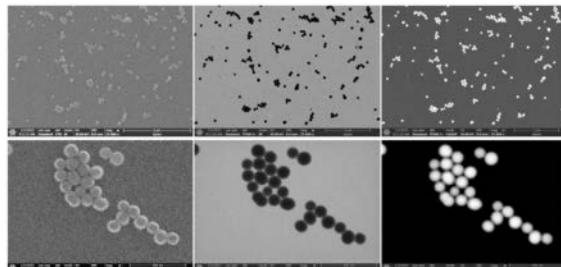
权利要求书1页 说明书9页 附图18页

(54) 发明名称

氢气纳米探针及氢气检测方法

(57) 摘要

本发明公开一种氢气纳米探针及氢气检测方法,所述氢气纳米探针包括介孔载体、贵金属纳米颗粒以及与氢气反应的探针分子,所述贵金属纳米颗粒负载在所述介孔载体上,所述探针分子负载在所述介孔载体上,所述探针分子中含有能与氢气反应的官能团。本发明提供的氢气纳米探针,采用介孔载体作为负载贵金属纳米颗粒和荧光分子的载体,有利于氢气纳米探针的生物安全性,提高其在生物内的适用性;而探针分子中的官能团能够被氢气还原,从而出现吸电子能力的变化,实现对氢气的检测;而贵金属纳米颗粒的存在会促进氢气的催化还原,提高氢气检测效率;该氢气纳米探针有助于对氢气治疗提供一个有效检测手段。



1. 一种氢气纳米探针,其特征在于,包括介孔载体、贵金属纳米颗粒以及与氢气反应的探针分子,所述贵金属纳米颗粒负载在所述介孔载体上,所述探针分子负载在所述介孔载体上,所述探针分子中含有能与氢气反应的官能团。

2. 如权利要求1所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述介孔载体的材料包括纳米多孔二氧化硅、纳米多孔氧化铝、多孔碳和功能性纳米多孔二氧化硅中的至少一种。

3. 如权利要求1所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述贵金属纳米颗粒包括钯纳米颗粒、铂纳米颗粒、铟纳米颗粒、金纳米颗粒和钌纳米颗粒中的至少一种。

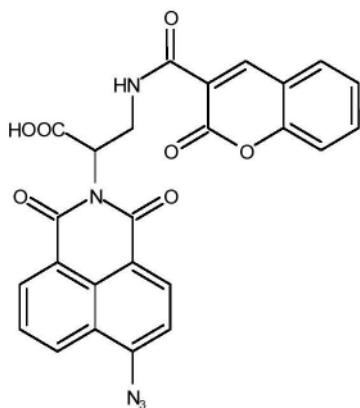
4. 如权利要求1所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述能与氢气反应的官能团包括叠氮基团、硝基、碳碳双键、醛基和碳碳三键中的至少一种。

5. 如权利要求1所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述探针分子中含有反应荧光分子,所述反应荧光分子中含有所述能与氢气反应的官能团。

6. 如权利要求5所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述反应荧光分子包括偶氮染料分子、蒽醌染料分子、芳甲烷染料分子、靛族染料分子、硫化染料分子、酞菁染料分子、硝基染料分子、亚硝基染料分子、甲川染料分子、多甲川类染料分子、二苯乙烯类染料分子和杂环类染料分子中的至少一种。

7. 如权利要求5所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述探针分子中还含有参比荧光分子,所述参比荧光分子包括偶氮染料分子、蒽醌染料分子、芳甲烷染料分子、靛族染料分子、硫化染料分子、酞菁染料分子、硝基染料分子、亚硝基染料分子、甲川染料分子、多甲川类染料分子、二苯乙烯类染料分子和杂环类染料分子中的至少一种。

8. 如权利要求7所述的氢气纳米探针,其特征在于,所述探针分子的化学结构式如结构式(I)所示:



(I)。

9. 一种氢气检测方法,其特征在于,采用如权利要求1至8任意一项所述的氢气纳米探针检测氢气。

10. 如权利要求9所述的氢气检测方法,其特征在于,采用所述氢气纳米探针探测溶液中或细胞中或生物体内的氢气。

氢气纳米探针及氢气检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及氢气检测技术领域,特别涉及一种氢气纳米探针及氢气检测方法。

背景技术

[0002] 作为新型的疾病治疗手段,气体治疗的出现为患者的康复提供了另外的选择及可能。相比于传统药物,气体分子独特的性质使得它们在疾病的治疗过程中发挥了更大的作用。而氢气尤其如此,在安全的浓度窗口中,氢气表现出了抗氧化、抗炎、抗凋亡、促进能量代谢及抗过敏等一系列的特性,对关节炎、缺血再灌注、软组织损伤、癌症治疗等疾病表现出了治疗效果。氢气治疗的前提是明确氢气浓度,以进行针对性治疗,但现阶段,氢气治疗的研究尚处在初步发展阶段,更为重要的是缺乏有效的氢气检测手段。因此,研究出一种有效进行氢气检测的探针尤为重要。

发明内容

[0003] 本发明的主要目的是提出一种氢气纳米探针及氢气检测方法,旨在提供一种有效进行氢气检测的氢气纳米探针。

[0004] 为实现上述目的,本发明提出一种氢气纳米探针,包括介孔载体、贵金属纳米颗粒以及与氢气反应的探针分子,所述贵金属纳米颗粒负载在所述介孔载体上,所述探针分子负载在所述介孔载体上,所述探针分子中含有能与氢气反应的官能团。

[0005] 可选地,所述介孔载体的材料包括纳米多孔二氧化硅、纳米多孔氧化铝、多孔碳和功能性纳米多孔二氧化硅中的至少一种。

[0006] 可选地,所述贵金属纳米颗粒包括钯纳米颗粒、铂纳米颗粒、铟纳米颗粒、金纳米颗粒和钌纳米颗粒中的至少一种。

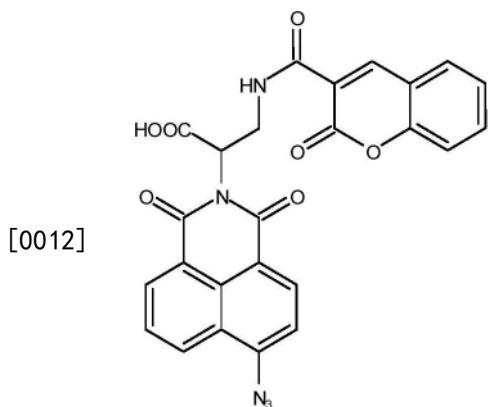
[0007] 可选地,所述能与氢气反应的官能团包括叠氮基团、硝基、碳碳双键、醛基和碳碳三键中的至少一种。

[0008] 可选地,所述探针分子中含有反应荧光分子,所述反应荧光分子中含有所述能与氢气反应的官能团。

[0009] 可选地,所述反应荧光分子包括偶氮染料分子、蒽醌染料分子、芳甲烷染料分子、靛族染料分子、硫化染料分子、酞菁染料分子、硝基染料分子、亚硝基染料分子、甲川染料分子、多甲川类染料分子、二苯乙烯类染料分子和杂环类染料分子中的至少一种。

[0010] 可选地,所述探针分子中还含有参比荧光分子,所述参比荧光分子包括偶氮染料分子、蒽醌染料分子、芳甲烷染料分子、靛族染料分子、硫化染料分子、酞菁染料分子、硝基染料分子、亚硝基染料分子、甲川染料分子、多甲川类染料分子、二苯乙烯类染料分子和杂环类染料分子中的至少一种。

[0011] 可选地,所述探针分子的化学结构式如结构式(I)所示:



(I) .

[0013] 本发明还提出一种氢气检测方法,采用如上所述的氢气纳米探针检测氢气。

[0014] 可选地,采用所述氢气纳米探针探测溶液中或细胞中或生物体内的氢气。

[0015] 本发明提供的氢气纳米探针,采用介孔载体作为负载贵金属纳米颗粒和 荧光分子的载体,有利于氢气纳米探针的生物安全性,提高其在生物内的适 用性;而探针分子中的官能团能够被氢气还原,从而出现吸电子能力的变化, 实现对氢气的检测;而贵金属纳 米颗粒的存在会促进氢气的催化还原,提高 氢气检测效率;该氢气纳米探针有助于对氢气治疗提供一个有效检测手段。

附图说明

[0016] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅为本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0017] 图1为本发明MSN的SEM图：

[0018] 图2为本发明MSN-NH₂的SEM图；

[0019] 图3为本发明Pd@MSN的SEM图：

[0020] 图4为本发明NDI-N₃/Pd@MSN的SEM图：

[0021] 图5为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的SEM图；

[0022] 图6为本发明NDI-N₂的激发及发射图谱；

[0023] 图7为本发明NDI-N₂的氮气响应图：

[0024] 图8为本发明NDI-N₂/Pd@MSN-PEG的氮气响应图

[0025] 图9为本发明NDI-N_x/Pd@MSN-PEG的氢气响应统计图；

[0026] 图10为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的反应动力学：

[0027] 图11为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的氢气浓度响应图。

[0028] 图12为本发明高浓度NDI-N₂/Pd@MSN-PEG的氮气泡

[0029] 图13为本发明NDI-N_x/Pd@MSN-PEG对不同离子的选择性：

[0030] 图14为本发明NDI-N₂/Pd@MSN-PEG对还原性物质的选择性。

[0031] 图15为本发明NDI-N₂/Pd@MSN-PEG在细胞中的稳定性：

[0032] 图16为本发明NDT-N₂/Pd@MSN-PEG的细胞毒性：

- [0033] 图17为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在细胞中探测氢气的能力；
- [0034] 图18为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在细胞中探测氢气的能力统计图；
- [0035] 图19为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在小鼠模型中的氢气探测能力；
- [0036] 图20为本发明NNDI-N₃/Pd@MSN-PEG的活体成像图；
- [0037] 图21为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的小鼠成像及数据统计图；
- [0038] 图22为本发明植物模型的成像图；
- [0039] 图23为本发明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的植物成像及数据统计图。
- [0040] 本发明目的的实现、功能特点及优点将结合实施例，参照附图做进一步 说明。

具体实施方式

[0041] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明 实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例仅仅是 本发明的一部分实施例，而不是全部的实施例。

[0042] 需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买 获得的常规产品。另外，全文中出现的“和/或”的含义，包括三个并列的方案，以“A和/或B”为例，包括A方案、或B方案、或A和B同时满足的方案。此 外，各个实施例之间的技术方案可以相互结合，但是必须是以本领域普通技 术人员能够实现为基础，当技术方案的结合出现相互矛盾或无法实现时应当 认为这种技术方案的结合不存在，也不在本发明要求的保护范围之内。基于 本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获 得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0043] 为实现氢气的探测，现在有采用荧光探针的方式，但该荧光探针具有必 须在有机溶液中进行、需要其他物质参与等局限性。

[0044] 鉴于此，本发明提出一种氢气纳米探针，包括介孔载体、贵金属纳米颗 粒以及与 氢气反应的探针分子，所述贵金属纳米颗粒负载在所述介孔载体上，所述探针分子负载在 所述介孔载体上，所述探针分子中含有能与氢气反应的 官能团。

[0045] 本发明提供的氢气纳米探针，采用介孔载体作为负载贵金属纳米颗粒和 荧光分子的载体，有利于氢气纳米探针的生物安全性，提高其在生物内的适 用性；而探针分子中的官能团能够被氢气还原，从而出现吸电子能力的变化，实现对氢气的检测；而贵金属纳 米颗粒的存在会促进氢气的催化还原，提高 氢气检测效率；该氢气纳米探针有助于对氢气治疗提供一个有效检测手段。

[0046] 进一步地，所述介孔载体的材料包括纳米多孔二氧化硅、纳米多孔氧化 铝、多孔 碳和功能性纳米多孔二氧化硅中的至少一种。当然，所述介孔载体 还可以采用其他材料，本发明对此不做限定。上述材料均具有多孔道，使得 贵金属纳米颗粒和探针分子既可以负 载在介孔载体的外表面，也可以负载在 介孔载体的孔道，提升贵金属纳米颗粒和探针分子的负载量。

[0047] 进一步地，所述贵金属纳米颗粒包括钯纳米颗粒、铂纳米颗粒、铟纳米 颗粒、金纳 米颗粒和钌纳米颗粒中的至少一种。采用纳米形式的贵金属颗粒，有助于催化氢气的还 原。

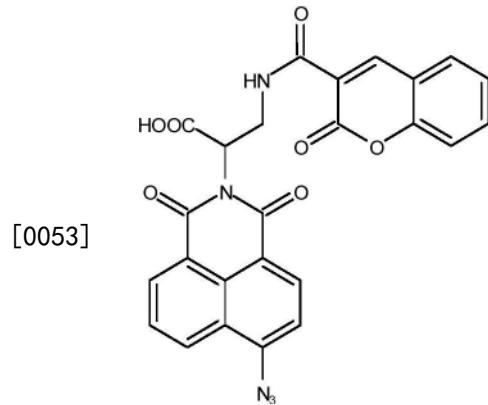
[0048] 进一步地,所述官能团包括叠氮基团、硝基、碳碳双键、醛基和碳碳三键中的至少一种。氢气在温和条件下的还原能力较弱,需要长时间的反应才能达到预期的目的,但是在贵金属如Pd,Pt等的催化下,氢气的还原效率将大幅度提升。在进行氢气检测时,叠氮被氢气还原成氨基,叠氮基团与氨基拥有决然相反的吸电子能力,荧光分子中的荧光团受到其影响而产生明显的荧光变化,实现对氢气的检测。

[0049] 所述探针分子中含有反应荧光分子,所述反应荧光分子中含有所述能与氢气反应的官能团。

[0050] 此外,所述反应荧光分子包括偶氮染料分子、蒽醌染料分子、芳甲烷染料分子、靛族染料分子、硫化染料分子、酞菁染料分子、硝基染料分子、亚硝基染料分子、甲川染料分子、多甲川类染料分子、二苯乙烯类染料分子和杂环类染料分子中的至少一种。本发明对反应荧光分子的具体种类不作限制。

[0051] 进一步,所述探针分子中还含有参比荧光分子,所述参比荧光分子包括偶氮染料分子、蒽醌染料分子、芳甲烷染料分子、靛族染料分子、硫化染料分子、酞菁染料分子、硝基染料分子、亚硝基染料分子、甲川染料分子、多甲川类染料分子、二苯乙烯类染料分子和杂环类染料分子中的至少一种。所述参比荧光分子能够产生荧光,但不与氢气反应,从而实现氢气探测时的荧光参比作用。

[0052] 在一实施例中,所述探针分子的化学结构式如结构式(I)所示:



(I)。

[0054] 其中,萘酰亚胺基团和香豆素基团会产生不同荧光,萘酰亚胺基团连接有叠氮基团,叠氮会与氢气反应而被还原成氨基进而影响萘酰亚胺基团的荧光,而香豆素基团的荧光不受氢气的影响,进而使得香豆素基团的荧光能够作为参比荧光实现更高精度的氢气探测。该探针分子的氢气探测性能优秀,且对生物体内常见的阴阳离子以及还原性物质均具有较好的抗干扰性,在细胞内的稳定性好,未出现细胞毒性,且良好的氢气响应性。

[0055] 本发明还提出一种氢气检测方法,采用如上所述的氢气纳米探针进行检测氢气。由于该氢气检测方法采用了如上所述的氢气纳米探针进行检测氢气,因此具备由上述氢气纳米探针带来的全部技术效果,在此不一一赘述。

[0056] 进一步,采用所述氢气纳米探针探测溶液中或细胞中或生物体内的氢气。经实验结果表明,所述氢气纳米探针在进行溶液中或细胞中或生物体内的氢气探测时,探测性能较佳,满足稳定性、细胞活性和氢气响应性等方面的要求,说明所述氢气纳米探针适用于对溶液或细胞或生物体的氢气检测,为溶液或细胞或生物体的氢气研究提供基础,实现氢

气治疗的可能性。并且,针对采用所述氢气纳米探针探测溶液中氢气的情况,相比于现有的荧光探针,本发明提供的氢气纳米探针无需在有机溶液中进行,且无需其他物质参与。

[0057] 以下结合具体实施例和附图对本发明的技术方案作进一步详细说明,应当理解,以下实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0058] 实施例1 NDI-N₃的合成

[0059] (1) 合成Cou-boc:准确称取3-羧基香豆素(1.9g,10mmol)溶于二氯甲烷(20mL)中,将溶液冷却至0℃后向溶液中缓慢加入SOC₁₂(2mL)接着溶液在室温下搅拌4小时,待反应完全,旋蒸除去多余的DCM及残留的SOC₁₂。接着向溶液中加入boc-d-2,3-diaminopropionic acid(二氨基丙酸)(2.35g,11.5mmol)和DMAP(1.17g,9.59mmol)的二氯甲烷溶液。溶液继续搅拌24小时后停止反应,反应也依次经过混合物依次用盐酸(2N)、饱和食盐水和水洗涤,最后经过无水硫酸钠干燥。干燥好的溶液通过旋转蒸发出去溶剂后经过柱层析色谱纯化,得到最终产物Cou-boc。

[0060] (2) 合成Cou-NH₂:将Cou-boc(500mg,1.3mmol)溶于二氯甲烷中(10mL),接着向溶液中加入等体积的三氟乙酸溶液。接着反应液在室温下持续搅拌24小时后停止反应。之后,反应液通过旋蒸出去溶剂及未反应的物质后得到产物Cou-NH₂。

[0061] (3) 合成NDO-N₃:取一定量的2溴-1,8萘酐(5.4g,19.5mmol),叠氮三甲基硅烷(6.74g,58.5mmol)及四丁基氟化铵(15.3g,58.5mmol)分散于乙醇中,接着溶液被加热到85℃并保持回流24小时。待反应液冷却,过滤掉反应液后得到黄色滤饼并用乙醇、水洗涤三遍。最后换色固体通过柱层析色谱纯化后得到NDO-N₃。

[0062] (4) 合成NDI-N₃:将Cou-NH₂(276mg,1.0mmol)与NDO-N₃(240mg,1.0mmol)于乙醇(50mL)中,接着向溶液中加入催化量的醋酸锌。之后,整个反应也被加热到回流并在此温度下搅拌反应24小时。待反应完全,溶液冷却至室温后过滤出去溶剂,固体经过柱层析色谱纯化后得到最终产物NDI-N₃。

[0063] 实施例2多孔二氧化硅的制备

[0064] (1) 合成多孔二氧化硅纳米颗粒(MSN):将48mL CTAC(25wt%)与0.36g的TEA加入到72mL的去离子水中并在60℃下搅拌1小时,接着,向溶液中缓慢滴加40mL TEOS(20v/v%)的环己烷溶液,滴加完毕后,继续保持60℃的温度搅拌12小时(搅拌速度尽量慢),约60-80rpm,以免水相和有机相混合)。反应完毕后,小心吸出上层有机相,下层水相温度升高到90℃,并保持3小时。待溶液冷却至室温,离心(10000rpm,15min)除去溶剂及大部分未反应原料,固体用乙醇(20mL×3)洗涤以除去剩余未反应原料。将所得到的白色固体重新分散到氯化铵的乙醇饱和溶液中,并在60℃下搅拌反应,重复三次后得到含有孔道的多孔二氧化硅纳米颗粒MSN。

[0065] (2) 合成氨基负载的多孔二氧化硅颗粒(MSN-NH₂):称取400mg MSN倒入15mL无水甲苯中,超声使其均匀分散,接着向溶液中缓慢滴加1.0mL APTES,滴加完毕后,回流反应24小时(110℃)。待溶液冷却至室温,离心(10000rpm,15min)除去溶剂及未反应原料,固体用乙醇(20mL×3)洗涤后得到表面修饰有氨基的二氧化硅纳米颗粒MSN-NH₂。

[0066] (3) 合成Pd修饰的多孔二氧化硅(Pd@MSN):称取56mg MSN-NH₂分散到10mL去离子水中并在30℃下搅拌30min,接着,向溶液中缓慢滴加10mL新配置的Na₂PdCl₆水溶液(1mg/mL),滴加完毕后,溶液继续保持在在30℃并搅拌4小时。向溶液中缓慢加入2mL新配置的

NaBH₄溶液(0.1M),溶液颜色迅速变成灰黑色。待滴加完毕后,溶液保持在30℃并搅拌24小时。待反应完毕,离心(10000rpm,15min)除去溶剂及未反应的产物,固体用乙醇(10mL×3)及去离子水(10mL×3)洗涤后冷冻干燥后得到载有钯的二氧化硅颗粒 Pd@MSN。

[0067] 对MSN、MSN-NH₂和Pd@MSN分别进行电镜扫描,分别对应得到SEM 图如图1至3所示。

[0068] 实施例3氢气纳米探针NDI-N₃/Pd@MSN的制备

[0069] (1)准确称取Pd@MSN(100mg)与NDI-N₃(10mg)于20mL DMF溶液中,接着向溶液中加入5uLTEA,最后溶液在室温下搅拌过夜。待反应完全,离心出去未反应完的NDI-N₃,所得到的固体用DMF,EtOH及H₂O分别洗涤三遍后冷冻干燥,得到NDI-N₃/Pd@MSN。

[0070] 对NDI-N₃/Pd@MSN进行电镜扫描,得到SEM图如图4所示。

[0071] 实施例4氢气纳米探针NDI-N3/Pd@MSN-PEG的制备

[0072] (1)准确称取NDI-N₃/Pd@MSN(100mg)与PEG-NHS(10mg)于20mLDMF 溶液中,接着向溶液中加入5uLTEA,最后溶液在室温下搅拌过夜。待反应完全,离心出去未反应完的NDI-N3,所得到的固体用DMF、EtOH及H₂O分别洗涤三遍后冷冻干燥,得到NDI-N₃/Pd@MSN-PEG。

[0073] 对NDI-N3/Pd@MSN-PEG进行电镜扫描,得到SEM图如图5所示。

[0074] 需要说明的是,下述试验例的附图6-23中,Wavelength为波长,Fluorescence intensity和F.1为荧光强度,H₂ bubbling代表向对应溶液中鼓入氢气。

[0075] 试验例1 NDI-N₃的氢气探测性能测试

[0076] 对水溶液中的NDI-N₃进行激发发射图谱测试,得到结果如图6所示,图 6中,Em为发射波长,Ex为激发波长,图6的纵坐标Normalized fluorescence intensity为归一化荧光强度。由图6可知,NDI-N₃在不同的激发光下会产生不同的荧光信号,其中,香豆素结构的最大激发波长及发射波长分别处于360nm及425nm,而萘酰亚胺的最大激发波长及发射波长则分别处于480nm 及550nm附近。值得注意的是,香豆素和萘酰亚胺结构的激发波长在400nm 处有一定的重叠,因此可以利用单波长同时激发两者。

[0077] 进一步地,向含有NDI-N₃的水溶液中通入氢气,得到激发发射图谱如 图7所示,G/B increased over 23time:绿色波长与蓝色波长的比值增加超过 23倍。由图7可知,在激发波长为420nm时,NDI-N₃确实在蓝光及绿光范围内出现了两处发射峰,而随着与氢气的反应,其绿色波长与蓝色波长的比值 (G/B ratio) 增加超过23倍,这表明NDI-N₃有着很强的氢气探测性能。

[0078] 试验例2 NDI-N₃/Pd@MSN-PEG氢气探测性能

[0079] 向含有NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的PBS溶液中充入不同时间氢气,得到荧光图谱如图8所示,图8中H₂ bubbling time指鼓入氢气时间。由图8可知,在没有与氢气反应前,NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在460nm及540nm处有荧光信号,而在与氢气反应后,460nm处的荧光信号逐渐降低,540nm附近的荧光信号则逐渐上升。继续统计分析460nm和540nm处的荧光值,得到结果如图 9所示,Time of hydrogen bubbling指鼓入氢气时间。由图9可知,NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在460nm的荧光信号从约8000降低到了不到4000,而542nm处的荧光信号则从4000上升超过12000,两者的比例则是上升到了原来8倍,这表明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG能够以比较明显的信号反应出与氢气的结合情况。

[0080] 针对NDI-N₃/Pd@MSN-PEG与氢气的反应速率进行测试,具体过程如下:在饱和氢水中加入了一定量的NDI-N₃/Pd@MSN-PEG后,溶液的荧光强度 随着时间发生了明显的变

化,统计542nm处与460nm处荧光强度的比值并对 反应时间作图得到结果如图10所示,图10b中G/B指绿色波长与蓝色波长的 比值,Time指时间。由图10可知,G/B值在短时间内与时间呈线性关系,而 在6分钟的时候探针与氢气的反应达到饱和。这种比拟气相色谱的反应速率 为NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的体内检测提供了基础。

[0081] 针对NDI-N₃/Pd@MSN-PEG与不同浓度的氢气的反应速率进行测试,得 到结果如图11所示,图11a中H₂ concentration指氢浓度,图11b中Concentration of hydrogen molecule指氢分子浓度,图11c的横坐标Concentration of hydrogen 指氢浓度,纵坐标 $\Delta 1/1_0$ 为荧光增强的幅度。由图11可知,在542nm处的荧 光信号出现了明显地增强,但是 460nm处的荧光降低并不明显,这可能是因 为反应程度不高的原因。定量的分析结果表明 其G/B值增加了约100%。而将 氢气浓度0-250uM的荧光数据进行数据拟合,发现其542nm处的荧光变化与 氢气浓度呈现较好的线性关系。

[0082] 在极低的氢气浓度下对NDI-N₃/Pd@MSN-PEG与氢气反应速率进行测 试,得到结果如图12所示,图12中横坐标H₂ concentration指氢浓度,纵坐 标 $\Delta 1/1_0$ 为荧光增强的幅度。由图12可知,在此浓度的情况下, NDI-N₃/Pd@MSN-PEG对氢分子有着类似的响应,统计绿光与蓝光的比值对 氢气浓度的响应,可见在0-10uM的浓度下,NDI-N₃/Pd@MSN-PEG荧光比 值的变化与氢气的浓度呈正比,通过这些数据计算了氢气探针的最低检测限, 结果表明探针 在氢气浓度低至27nM时仍能够有效的进行氢气探测。

[0083] 试验例3 NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的选择性测试

[0084] 测试NDI-N₃/Pd@MSN-PEG对生物体中常见的阴阳离子的抗干扰情况, 得到结果如图13所示,图13a中横坐标Common anions and cations指常见阴 阳离子,纵坐标 Normalized fluorescence intensity指归一化荧光强度,图13b 纵坐标Normalized G/B ratio指归一化的绿色波长与蓝色波长的比值。由图13 可知,不论是在生物浓度下还是在 统一的高浓度下,探针都对这些离子有着 较高的抗性。

[0085] 测试NDI-N₃/Pd@MSN-PEG对生物体中常见的还原性物质如谷胱甘肽、抗坏血酸等 的抗干扰情况,得到结果如图14所示,图14纵坐标Normalized G/B ratio指归一化的绿色 波长与蓝色波长的比值,Cys为半胱氨酸,GSH为谷胱 甘肽,AA为抗坏血酸,各物质的柱状图 自左至右依次代表加入该物质的时间 为0min、1min、2min、3min、4min、5min、6min和7min。由图14可知,这 些还原性物质对探针的荧光有一定 的影响,但是其响应速度与程度都不及 氢 气。

[0086] 试验例4 NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在细胞内的探测性测试

[0087] 对NDI-N₃/Pd@MSN-PEG进行细胞内的稳定性测试,具体试验过程如下: 将NDI-N₃/ Pd@MSN-PEG与细胞进行了长时间的孵育,并每隔两个小时对其 荧光进行检测,得到结果如图15所示,图15中横坐标Time指时间,纵坐标 G/B ratio指绿色波长与蓝色波长的比值。由图15可知,NDI-N₃/Pd@MSN-PEG 在细胞内绿色通道与蓝色通道的荧光比值在0.6左右,而随着孵育时间的延 长,这个比值有所波动,但是始终在0.6左右。而当孵育时间延长至24小时 时,这个比值仍然维持在0.6左右,这表明NDI-N₃/Pd@MSN-PEG在细胞环 境中并没有受到细 胞环境的影响,能够长时间的存在细胞环境中。

[0088] 对NDI-N₃/Pd@MSN-PEG进行细胞毒性测试,得到结果如图16所示,图 16中横坐标 Concentration of Pd@SiO₂-NDI-PEG指Pd@SiO₂-NDI-PEG的浓 度,纵坐标Cell vialibity

指细胞活力,各对应浓度的柱状图自左至右依次代表 3h、6h、12h和24h。由图16可知,NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG并没有对细胞表 现出毒性。

[0089] 对NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG进行氢气响应性测试,具体试验过程如下:将 细胞与探针共同孵育三个小时,接着未进入细胞的探针用PBS洗涤掉,之后 将细胞至于共聚焦显微镜下,然后将PBS置换成富含氢气的PBS,接着对细 胞进行不间断的成像,得到结果如图17所 示,图17中bright filed指亮场观 察,blank control指空白对照,Green指绿色,Blue指蓝色。由图17可知, NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG在不同的的激发光下展现出了不同的荧光,并且随着时间的延长,其亮度也发生了明显的变化,我们对绿色荧光通道与蓝色荧光 通道的荧光强度比值进行了作图,结果可以看出,随着时间的延长,代表低 比值的蓝色信号逐渐变少,而代表高比值的信号则组件增多,这说明随着时间的推移,氢气能够跨过细胞膜进入到细胞内与探针进行反应,并且这个过 程消耗的时间很短。

[0090] 对单个细胞在绿色荧光通道与蓝色荧光通道的荧光强度进行比值运算, 最后得到各个时间点细胞内绿色荧光与蓝色荧光的比值,得到结果如图18所 示,图18中横坐标 Time指时间,纵坐标G/B ratio指绿色波长与蓝色波长的 比值。由图18可知,细胞在PBS溶液中时,其G/B值大约在0.56左右,而 在加入了含有氢气的PBS后,探针的荧光比值很快发生了变化,并且在1.5分 钟的时候反应完全,这表明,氢气能够在1.5分钟内完成进入细胞-接触探针- 与探针反应三个过程。

[0091] 试验例5 NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG在动物体内的探测性测试

[0092] (1) 将小鼠麻痹,然后依次除去小鼠脑部的皮肤及左半边脑骨,之后再 想脑部滴加含有NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG的PBS溶液,接着让老鼠在氢气的氛 围内持续吸氢,最后将老鼠转移至动物成像系统进行连续成像。

[0093] 得到成像结果如图19所示,图19b中横坐标Time指时间,纵坐标 $\Delta Ratio/Ratio_0$ 指绿色荧光通道与蓝色荧光通道的比值。由图19可知,小鼠在 吸入氢气后,其脑部的蓝色荧光没有明显变化,而绿色荧光部分逐渐增强, 这表明氢气经过小鼠的呼吸作用进入到小鼠体内后,会通过血液循环系统或 者其他方式扩散到脑部,并且与脑部的探针反应,而通过计算比较绿色和蓝 色通道的比值我们可以看出,探针在很短时间内便发生了反应。

[0094] (2) 在另一只小鼠上重复步骤(1)。

[0095] 得到结果如图20所示,由图20可知,蓝色通道的荧光强度同样没有明 显的变化,而绿色通道的荧光在每次吸氢后都会出现一定的增强。

[0096] 对小鼠对应部位的荧光信号作比值处理,得到比值图如图21所示,图 21中 without H_2 inhalation指无氢气吸入, H_2 inhalation指有氢气吸入。由图 21可知,在吸氢 5分钟后,小鼠脑部的探针绿色荧光通道与蓝色荧光通道的 比值便上升了5%,而随着成像的增加这个比值上升了到10%,接着第二次 吸氢出现了类似的现象,比值在吸氢后相对于开始又上升了约10%。

[0097] 试验例6 NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG在植物体内的探测性测试

[0098] (1) 对植物叶子滴加含有NDI- N_3 /Pd@MSN-PEG的PBS溶液,接着让 植物叶子在氢气的氛围内持续吸氢,最后将植物叶子转移至植物成像系统进 行连续成像,得到结果如图22 所示。

[0099] 由图22可知,在转移到饱和氢水后,植物叶子表面探针的蓝色荧光几乎 没有变

化,而绿色荧光也没有出现差异性明显的变化。

[0100] 提取其荧光信息,分析得到NDI-N₃/Pd@MSN-PEG的植物成像及数据统计图如图23所示,图23中,water指水,H₂ rich water指饱和氢水,refresed HRW指更换饱和氢水。由图23可知,从初始、1分钟,5分钟及7分钟的比例图中可以看出,在未接触氢气的时候,植物叶子表面几乎观测不到强比例信号,而在饱和氢水中浸泡了1分钟后便可以在叶子茎部观测到明显的高比值信号,而随着时间的增强,高比值区域越来越多。从定量的分析结果可以看出,在1分钟的时候,叶子表面的荧光比值上升了约2%,而在2分钟的时候则上升到了20%,这中大幅度的上升可能是氢气从根部到叶子需要一定的时间,而在更换了氢水后,叶子表面的荧光又再一次的增强,增强的幅度达到38%。

[0101] 以上仅为本发明的优选实施例,并非因此限制本发明的专利范围,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包括在本发明的专利保护范围内。

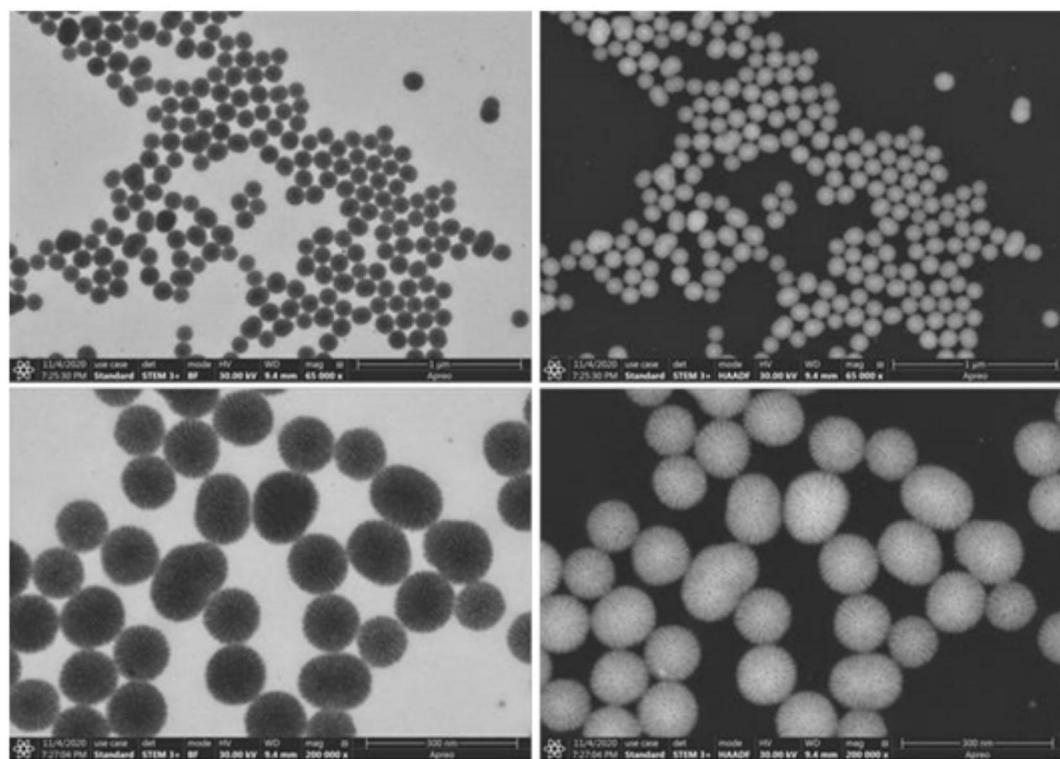


图1

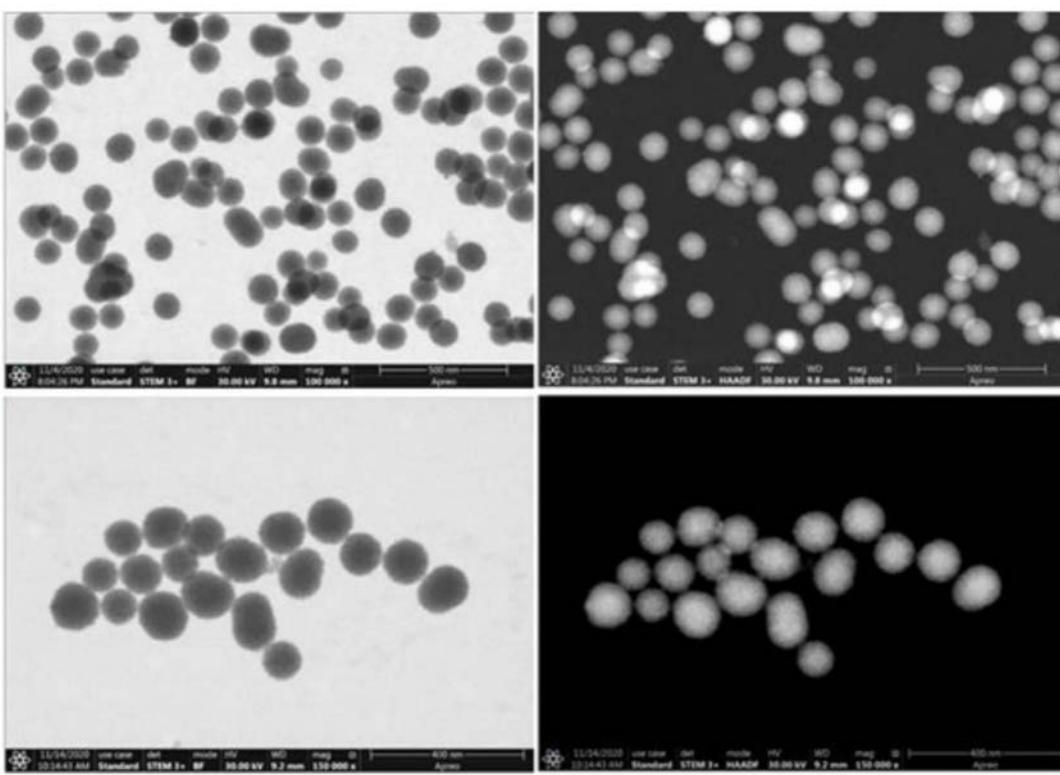


图2

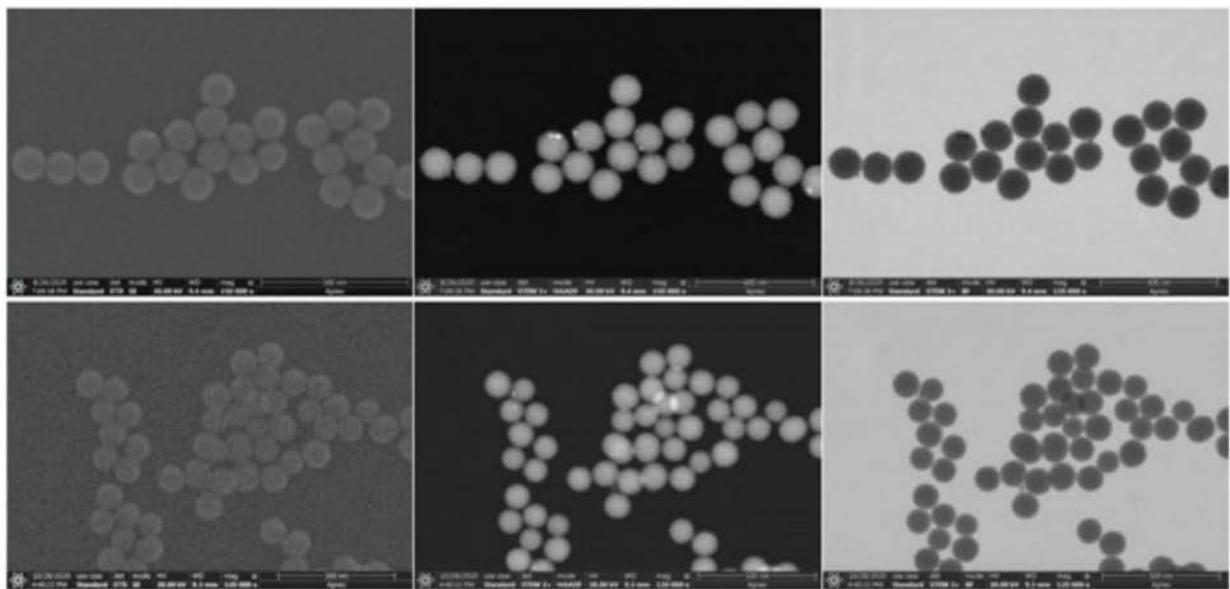


图3

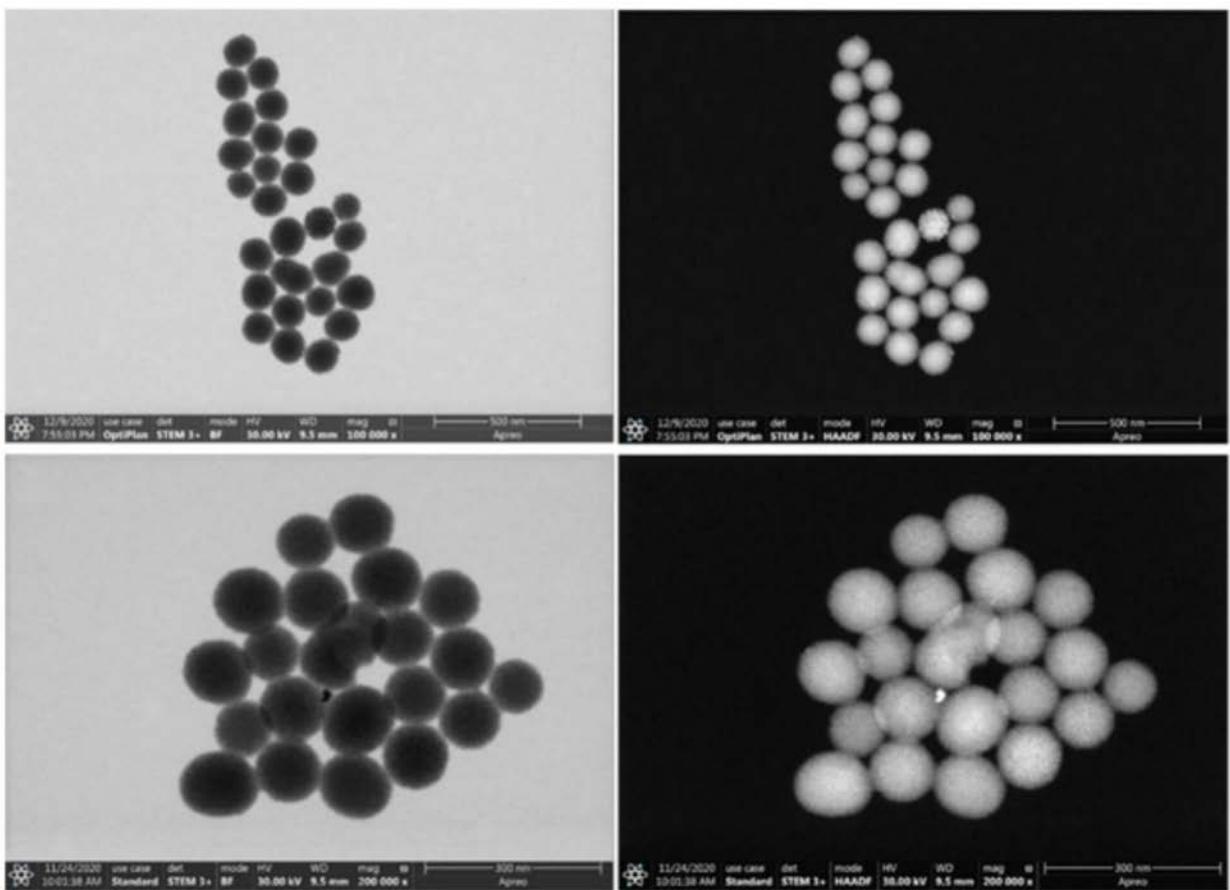


图4

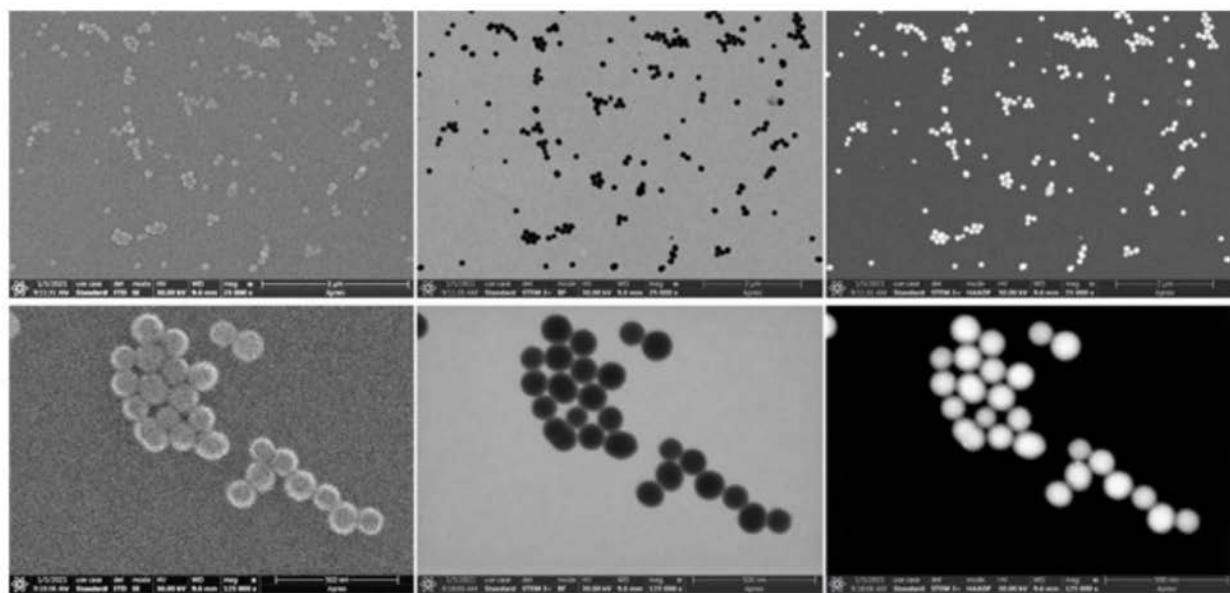


图5

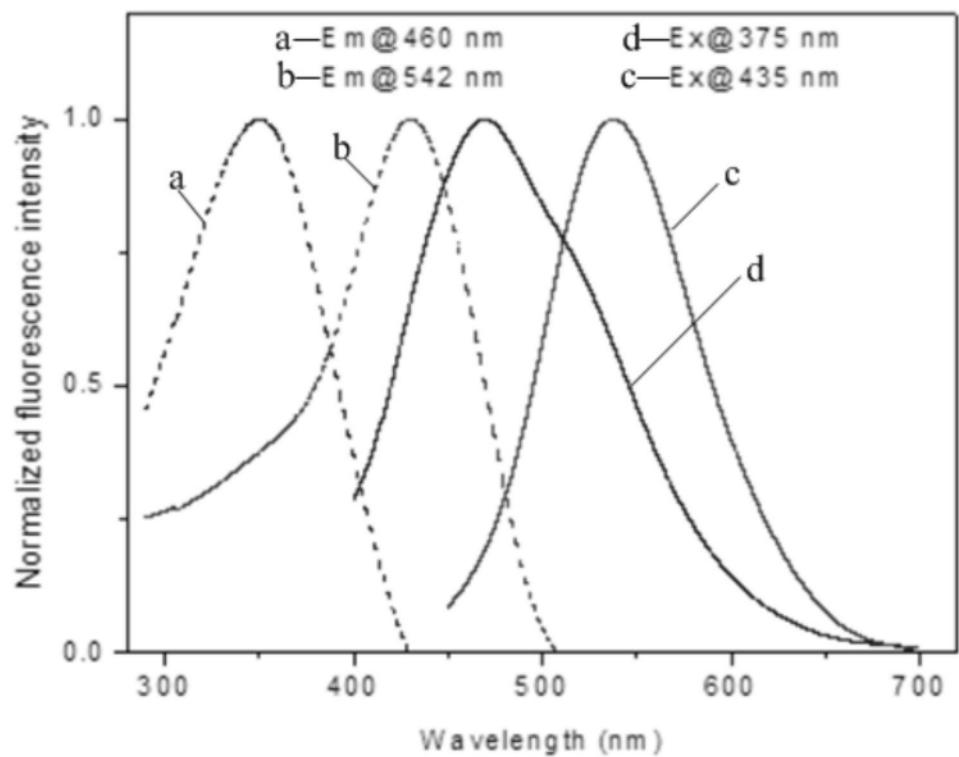


图6

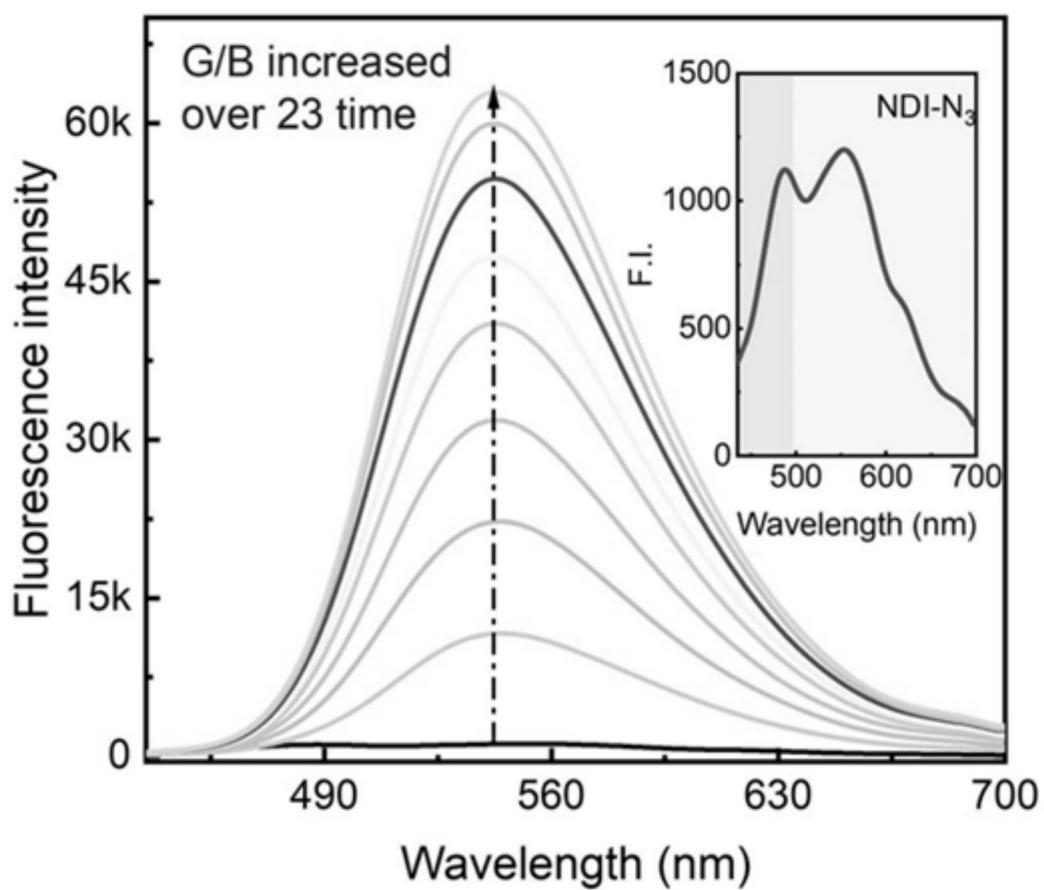


图7

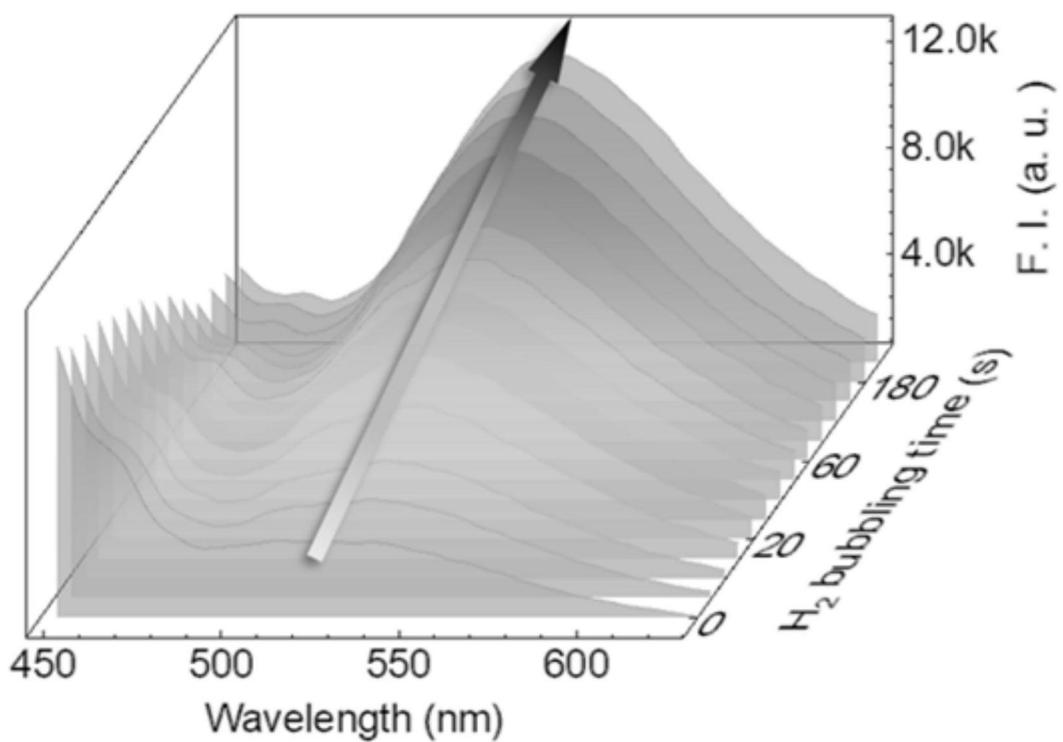


图8

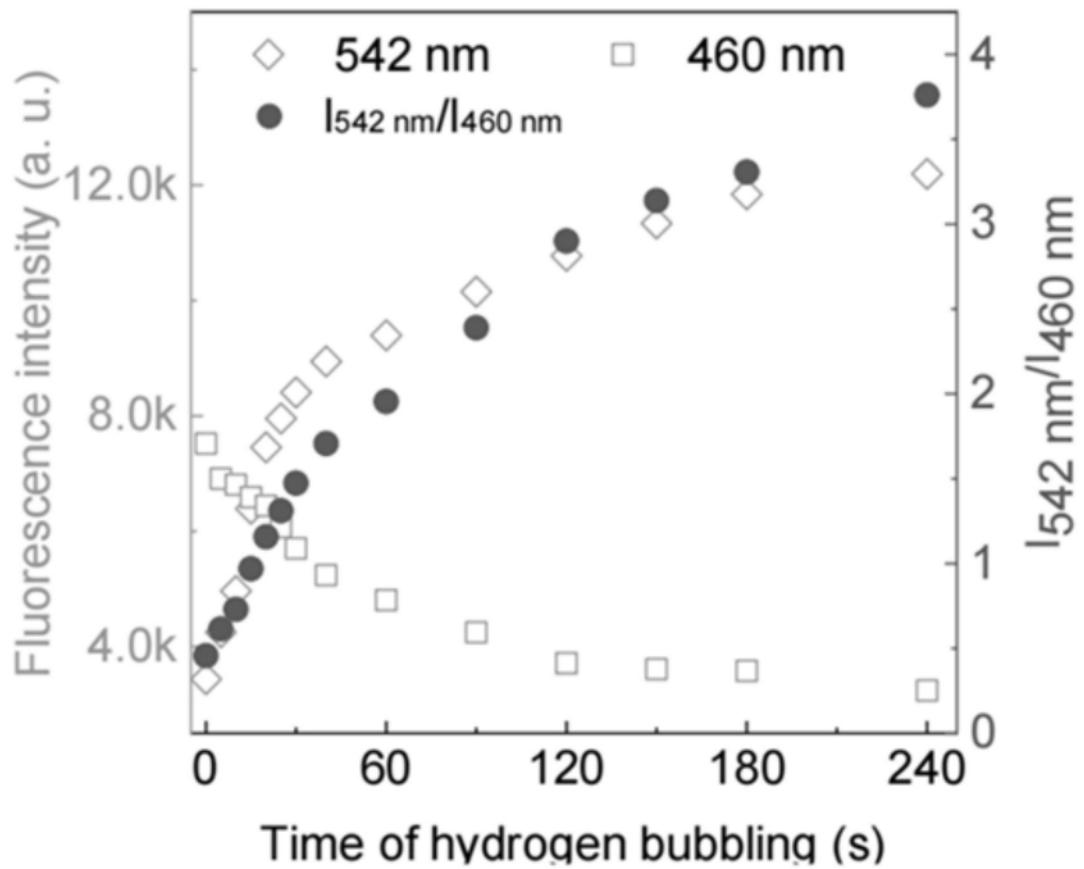


图9

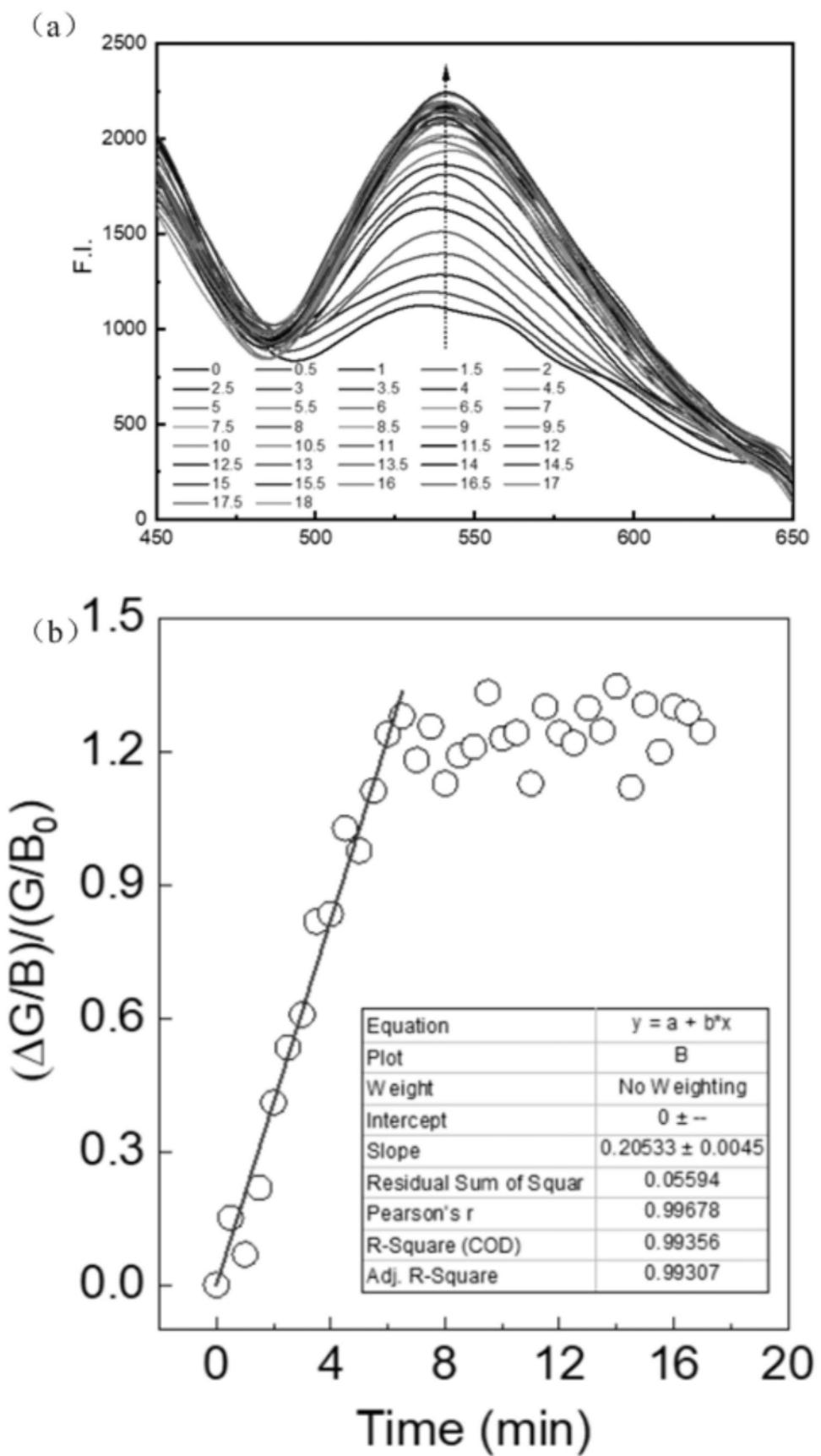
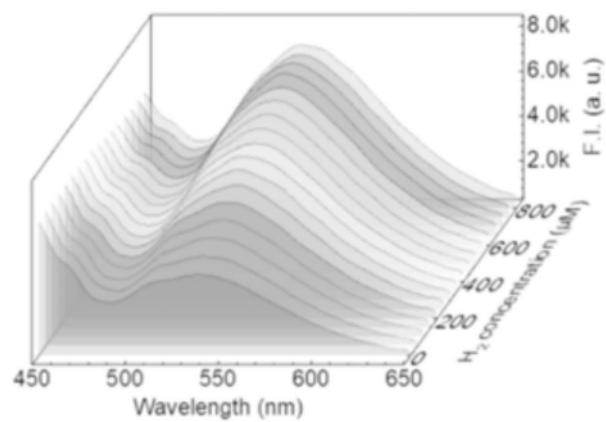
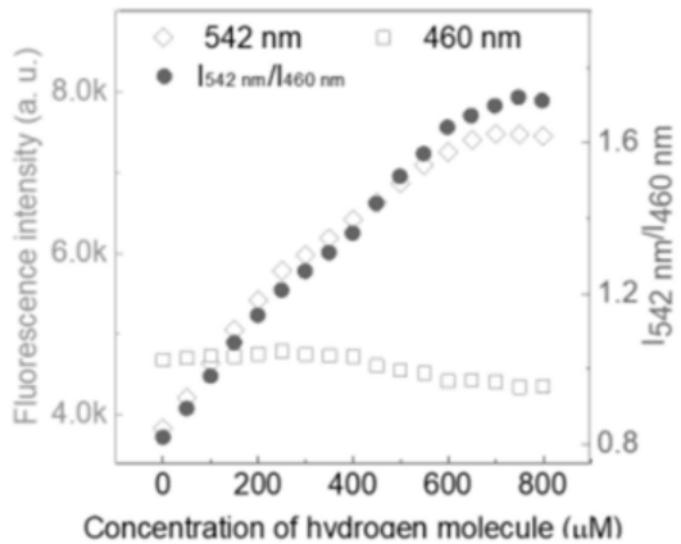


图10

(a)



(b)



(c)

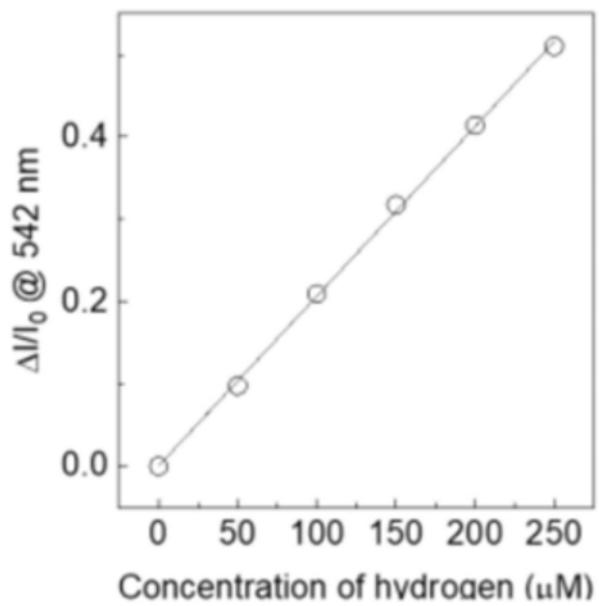


图11

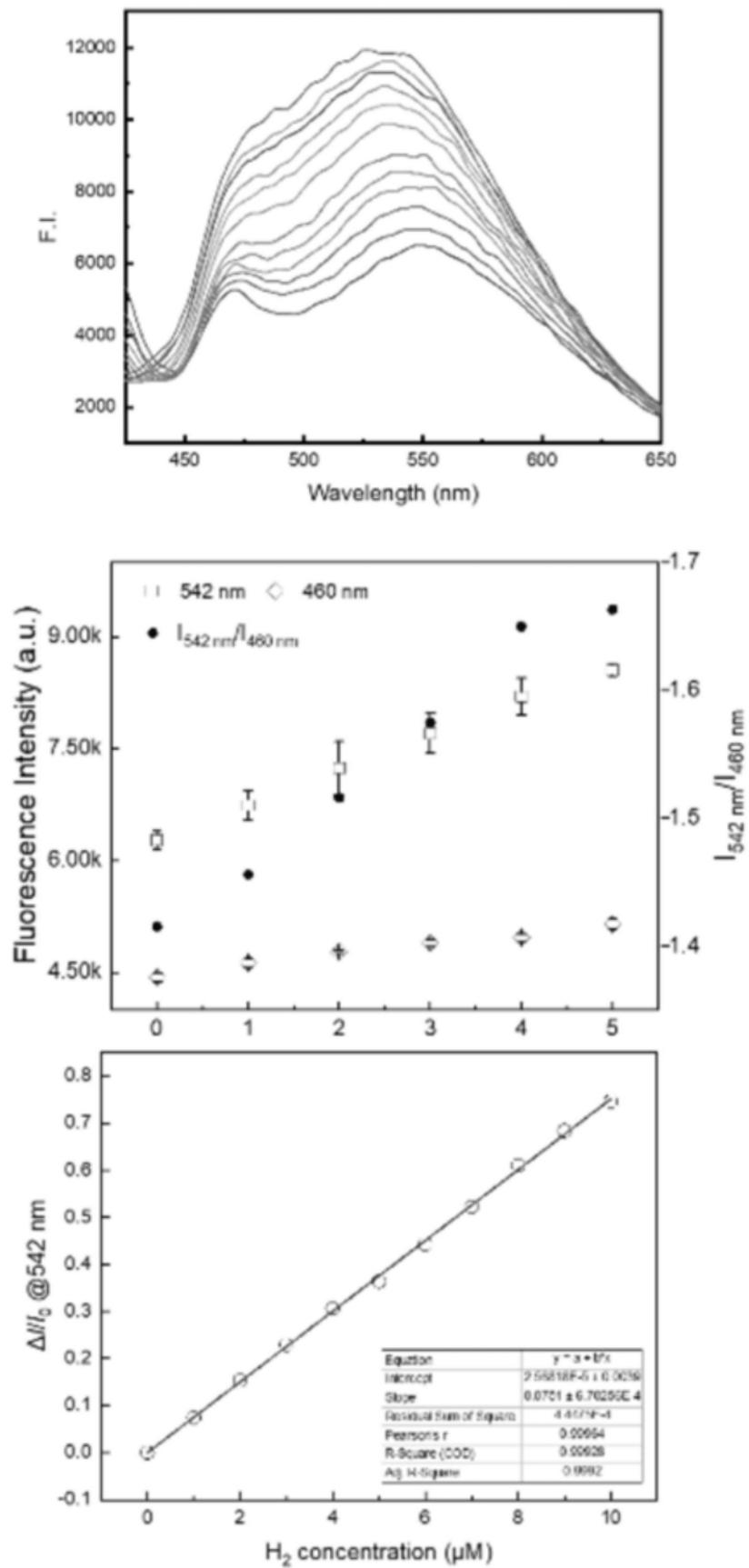


图12

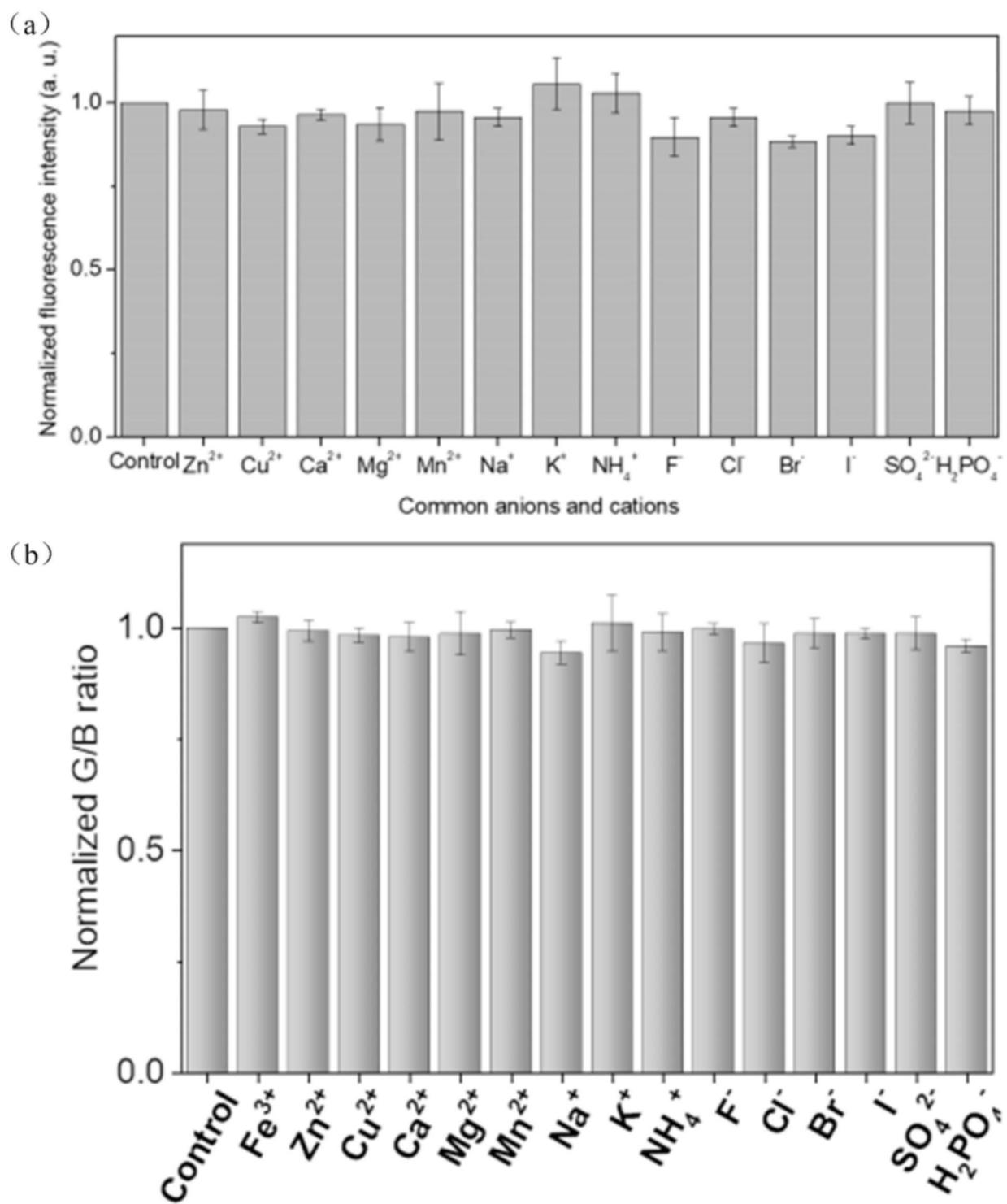


图13

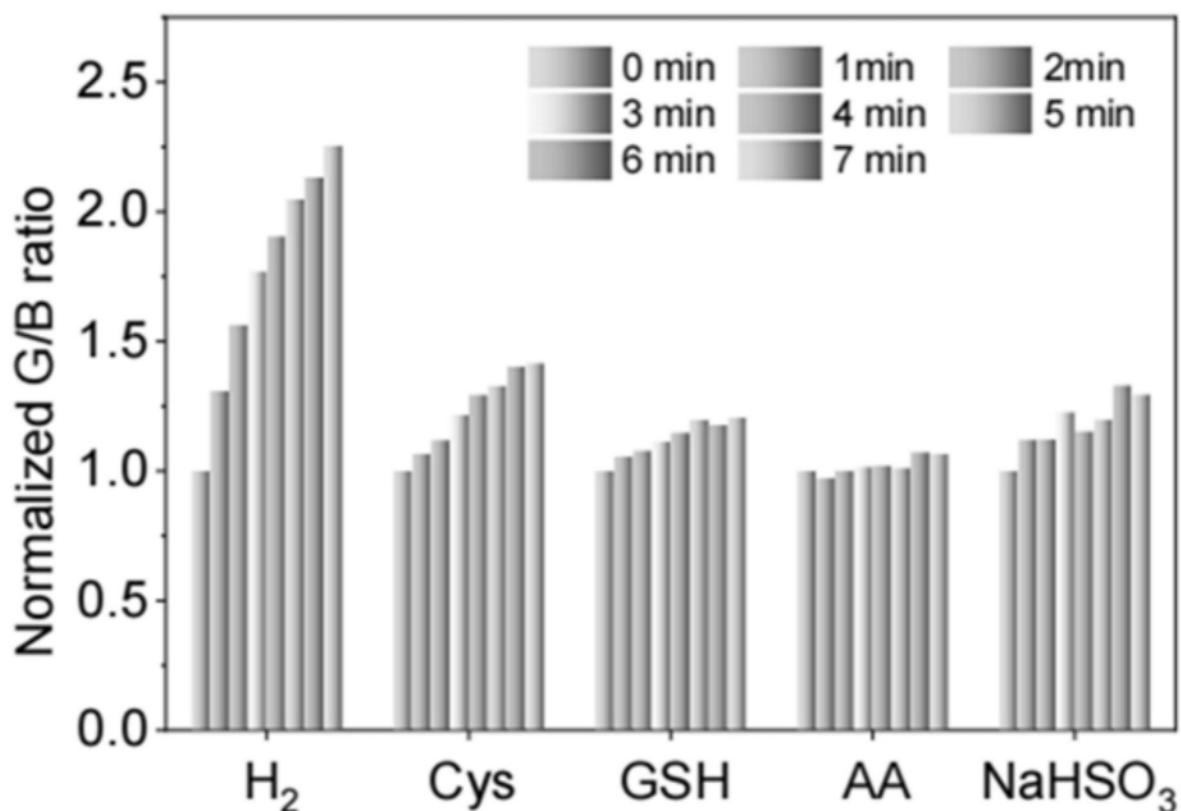


图14

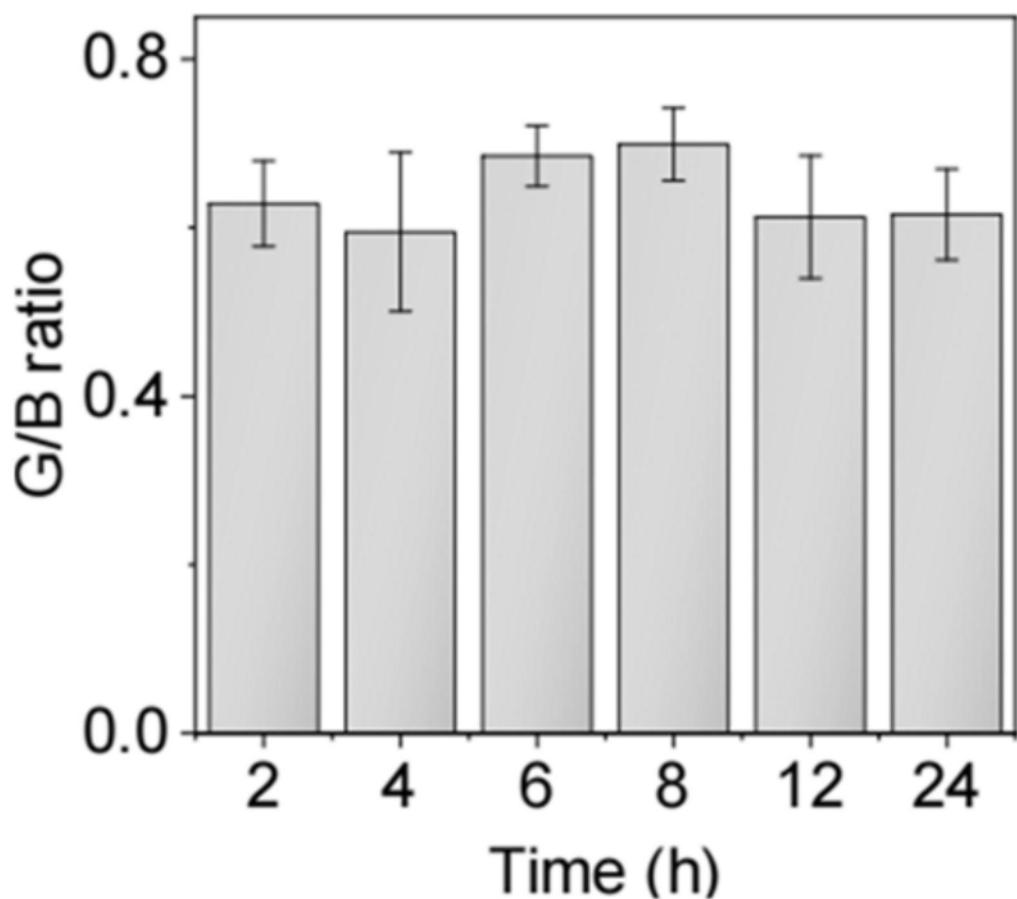


图15

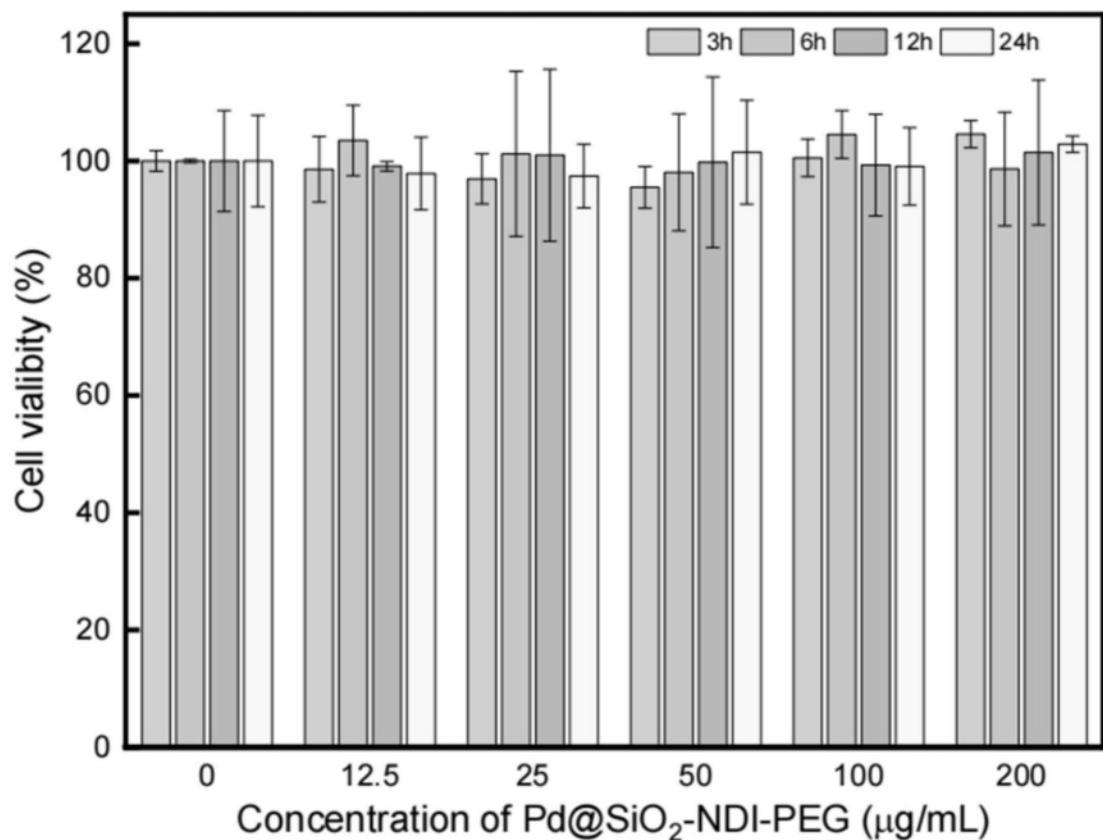


图16

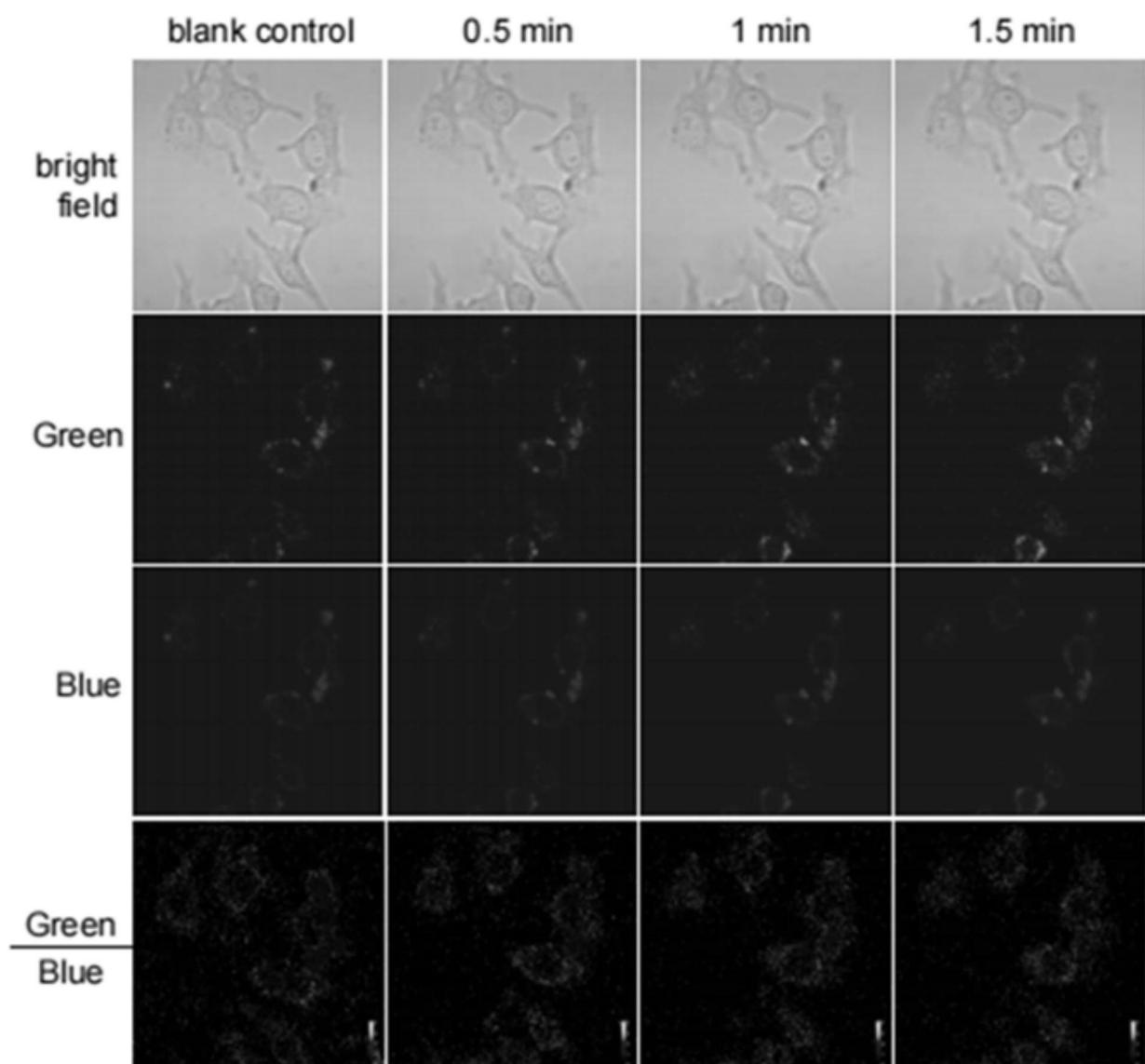


图17

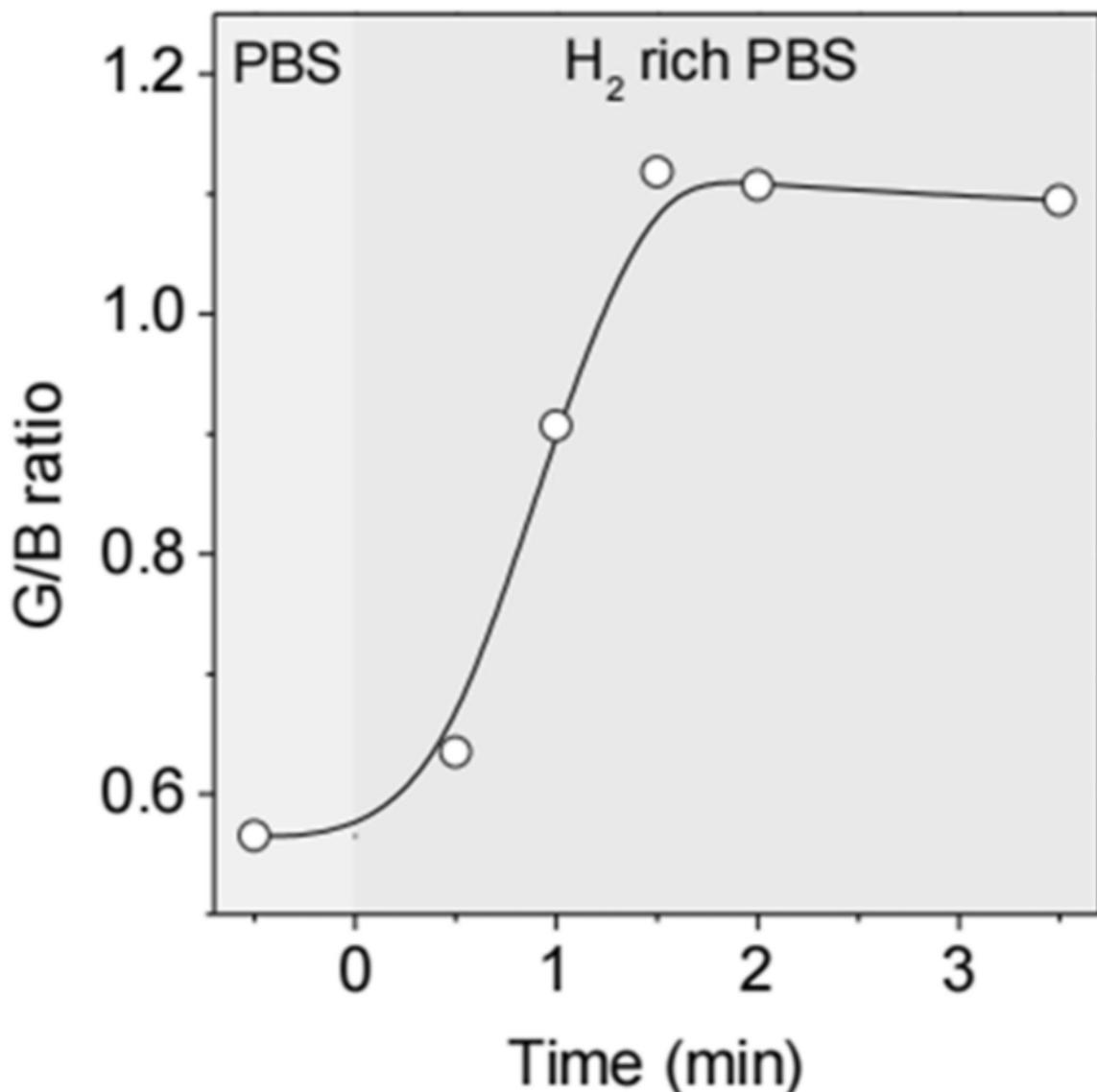


图18

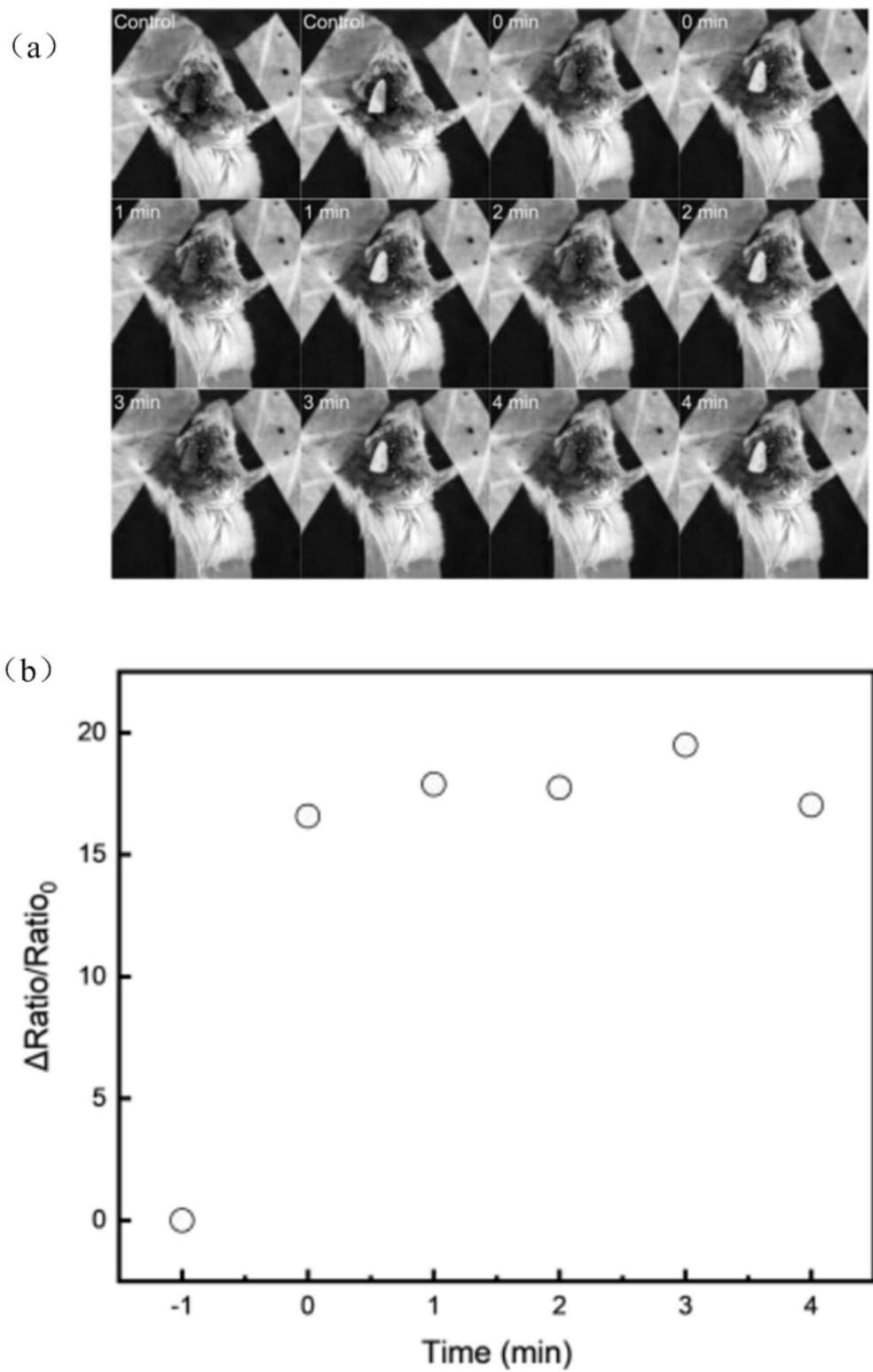


图19

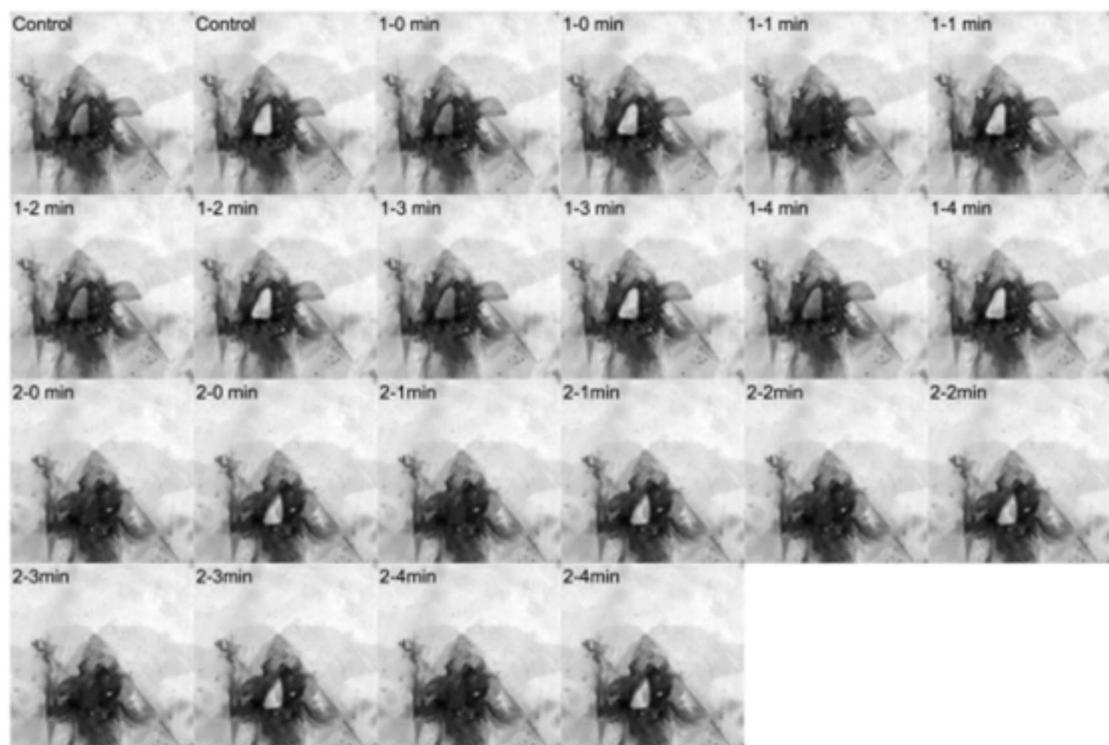


图20

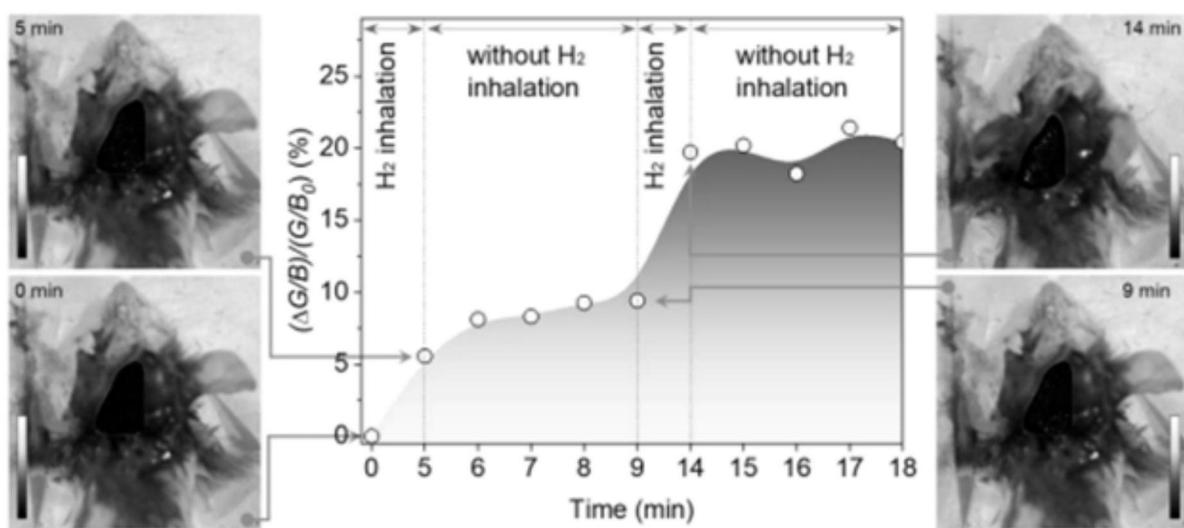


图21

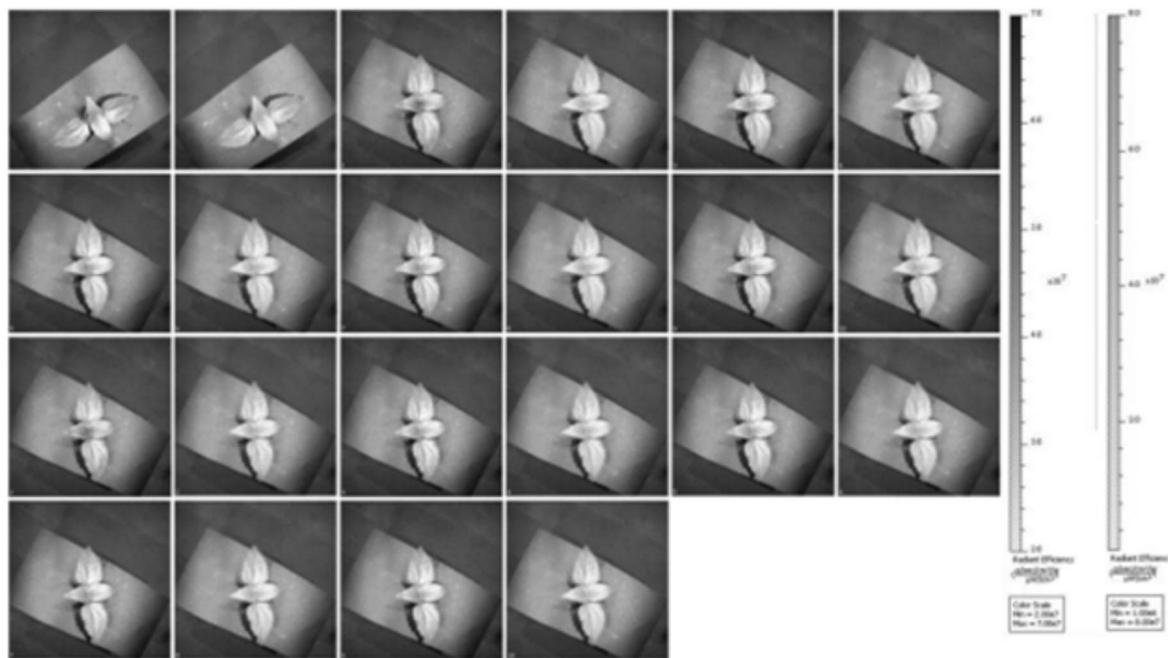


图22

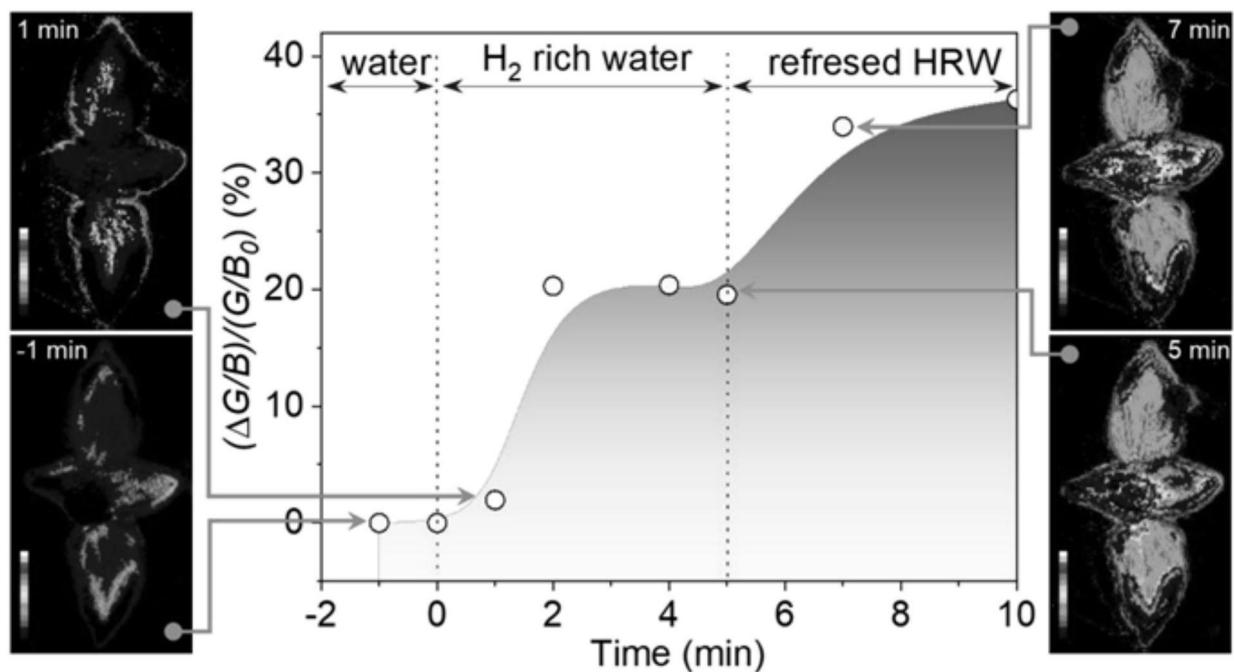


图23