

文章编号: 2095—0411 (2013) 04 - 0057 - 04

# 含荧光基团透明质酸衍生物的合成及其荧光性能<sup>\*</sup>

周维杰, 席海涛, 孙小强

(常州大学 石油化工学院, 江苏 常州 213164)

**摘要:** 以透明质酸钠和 7-羟基-4-甲基香豆素为原料, 合成了具有荧光性能的透明质酸衍生物。通过模拟人体的生理环境, 研究了浓度、pH 和温度变化对透明质酸衍生物荧光性能的影响。结果表明, 透明质酸衍生物荧光强度随浓度的增大而增强, 随 pH 变化其荧光强度变化趋势不明显, 较为稳定, 随温度的变化其荧光强度基本保持稳定。为以后探索具有药物载体透明质酸在机体内的作用机理及其靶向作用提供良好的实验基础。

**关键词:** 透明质酸; 7-羟基-4-甲基香豆素; 荧光性能

中图分类号: TQ 201

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.2095—0411.2013.04.012

## Synthesis and Fluorescence Properties of Hyaluronic Acid Derivatives Containing Fluorescent Groups

ZHOU Wei-jie, XI Hai-tao, SUN Xiao-qiang

(School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** The hyaluronic acid derivatives with fluorescence performance were synthesized from sodium hyaluronate and 7-hydroxy-4-methyl coumarin. Then the influences of the concentration, pH and temperature on fluorescence intensity of hyaluronic acid derivatives were studied under the human body physiological environment. The results showed that fluorescence strength of the hyaluronic acid derivatives enhanced with intensity increased, kept stable and had an unobvious change as pH changed. Also the fluorescence strength performed a basical stability while temperature varied. These provided good experimental bases for the mechanism of action of hyaluronic acid as a drug carrier in human body as well as its targeting effect in the future.

**Key words:** hyaluronic acid; 7-hydroxy-4-methyl coumarin; fluorescence performance

1934 年, Meyer 和 Palmer<sup>[1]</sup> 从牛眼玻璃体中第 1 次成功分离提取得到透明质酸 (HA)。透明质酸及其衍生物作为药物载体, 主要利用其良好的生物相容性、可降解性、高粘弹性以及与细胞表面特异受体专一性结合的能力, 以达到药物增稠、药物缓释、促进药物透皮能力及靶向性的目的<sup>[2]</sup>。目

前, 透明质酸及其衍生物已被用作类固醇类药物、多肽和蛋白类药物<sup>[3-5]</sup> 及各种抗癌药物的运送载体<sup>[6-11]</sup>。为了研究透明质酸运载药物的机理, 在 HA 中引入荧光基团, 利用荧光光谱等分析手段研究其在人体中的药物运载作用机制, 从而为靶向药物的合成和作用机制提供便利条件。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2013 - 03 - 19

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (20872051)

作者简介: 周维杰 (1987—), 男, 甘肃陇南人, 硕士生; 通讯联系人: 席海涛。

香豆素类化合物具备优良的生理活性、光稳定性好、荧光量子产率高、Stocks 位移大等特性, 是很好的荧光增白剂、荧光探针<sup>[12-13]</sup>和药物等精细化工产品的原料和中间体, 近年来在荧光探针方面的研究备受关注。

本文合成了 7-羟基-4-甲基香豆素, 将其与环

氧氯丙烷反应合成 7-甲氧基-4-甲基香豆素-1,2-环氧丙烷, 最后与透明质酸钠通过醚化反应<sup>[14-15]</sup>, 合成了具有荧光性能的透明质酸衍生物。利用荧光光谱研究了透明质酸衍生物的荧光性能以及不同浓度、pH、温度对其荧光强度的影响。合成路线见图 1。

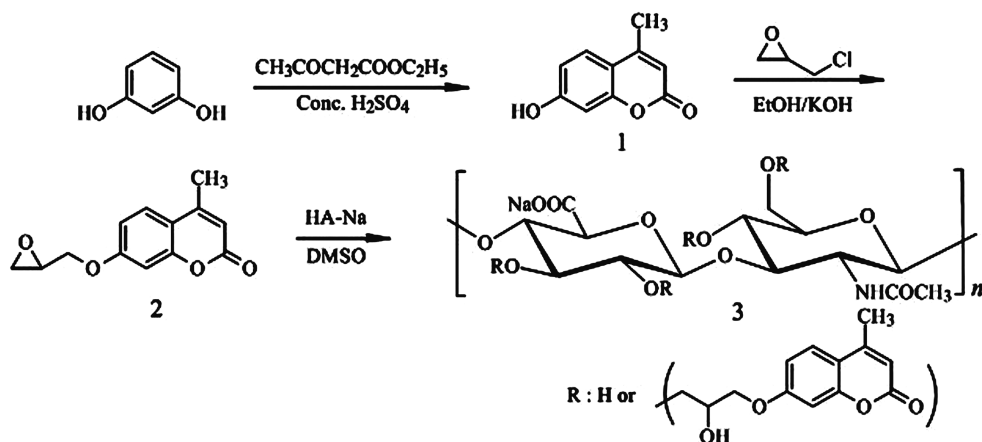


图 1 合成路线

Fig. 1 Synthetic route of compounds

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

数显集热式磁力搅拌器 (金坛杰瑞尔有限责任公司, DF - II); 酸度计 (PHS - II 型); 显微熔点测定仪 (上海申光仪器仪表有限公司, XT4 - 100X); 核磁共振仪 (NMR, 德国 BRUKER 公司, ARX - 500MHz); 紫外 - 可见吸收光谱仪 (日本岛津, UV - 1700); 荧光光谱仪 (美国瓦里安, Cary6000i Optics)。

透明质酸钠 (山东正大福瑞达制药有限公司,  $2.8 \times 10^6$ ), 其余均为市售分析纯。

### 1.2 透明质酸香豆素衍生物的合成

#### 1.2.1 化合物 1 的合成

在 100mL 三口烧瓶中, 依次加入 20mL 浓硫酸、5.51g (50mmol) 间苯二酚和 9.56mL (75mmol) 乙酰乙酸乙酯, 保持反应体系的温度低于 10℃, TLC 跟踪反应。反应液经冰析、过滤后得淡黄色固体, 将滤饼转入 10% NaOH 溶液中, 并将溶液调至中性, 即不再有沉淀析出, 再次过滤后得粗产品。无水乙醇重结晶得白色晶体 6.90g, 产率 78.4%, m. p. 189.2~189.6℃与文献<sup>[16]</sup>值相符。

#### 1.2.2 化合物 2 的合成<sup>[17]</sup>

在 100mL 三口烧瓶中, 依次加入 50mL 无水乙醇、1.75g (20mmol) 化合物 1 和 0.70g (12.5mmol) KOH, 常温搅拌 30min 后, 缓慢滴加 10mL (125mmol) 环氧氯丙烷, 将体系升温到 55~60℃, TLC 跟踪反应。反应结束后, 向反应混合液中滴加蒸馏水, 直至不再析出白色沉淀。过滤收集滤饼, 无水乙醇重结晶得白色固体 1.38g, 产率 59.5%, m. p. 124.0~1250℃。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 7.71 (d,  $J=8.8$ Hz, 1H, Ar - H), 7.02 (s, 1H, Ar - H), 7.01 (d,  $J=8.8$ Hz, 1H, Ar - H), 6.22 (s, 1H, CH), 4.48 (dd,  $J=10.0, 2.5$ Hz, 1H, ArOCH<sub>2</sub>), 3.96 (dd,  $J=10.0, 5.0$ Hz, 1H, ArOCH<sub>2</sub>), 3.37 (s, 1H, OCH), 2.86~2.88 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>), 2.73~2.74 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)。

#### 1.2.3 40℃时透明质酸香豆素衍生物 3 的合成

在 50mL 圆底烧瓶中加入 0.2g (1.0mmol) 透明质酸钠, 加入 8mL 水, 强磁力搅拌使透明质酸钠完全溶胀, 滴加 1mol/L NaOH 溶液, 使混合体系的 pH 为 12 左右, 缓慢滴加含 0.69g (3mmol) 7-甲氧基-4-甲基香豆素-1,2-环氧丙烷溶于 10mL DMSO 溶液, 40℃反应 36h。将反应液在无水乙醇中沉析多次, 离心沉降, 装入透析袋内用

水和无水乙醇透析各 24h, 重复交替透析操作 3 次。最后将其真空冷冻干燥得白色固粉末 0.11g。

### 1.3 荧光性能测定

以水为溶剂, 对化合物 3 进行荧光性能研究, 荧光测试条件均为: 测试温度为 293K, 激发波长为 321nm, 电压为 600V, 激发狭缝为 5nm, 发射狭缝为 5nm。

配制浓度为  $3 \times 10^{-5}$  mol/L 的化合物 2 和化合物 3 的水溶液; 配制 0.04~0.32mg/mL 透明质酸香豆素衍生物 3 的水溶液, 分别测其荧光强度。

配制浓度均为  $3.0 \times 10^{-5}$  mol/L 化合物 3 的水溶液, 调节 pH 在 0.8~13.2 范围内, 研究 pH 变化对化合物 3 荧光强度的影响。

配制浓度为  $3.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的化合物 3 的水溶液, 调节其 pH 为 7.3, 然后将其分别放置在 20~40℃ 的恒温槽中放置 48h, 研究温度变化对化合物 3 荧光强度的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物 3 的结构确定

采用  $^1\text{H}$  NMR 表征并计算化合物 3 的取代度<sup>[14-15]</sup>, 通过比较  $1.90 \times 10^{-6}$  (3H, HA 分子中 N-乙酰氨基上的  $-\text{CH}_3$ ) 和  $2.45 \times 10^{-6}$  (3H, 所引入的香豆素基团的  $-\text{CH}_3$ ) 的信号可计算出透明质酸衍生物的取代度达到 14.7%。

### 2.2 化合物 3 的荧光性能研究

#### 2.2.1 浓度的影响

同一浓度化合物 2 和化合物 3 的荧光强度见图 2; 不同质量浓度化合物 3 的荧光强度见图 3。

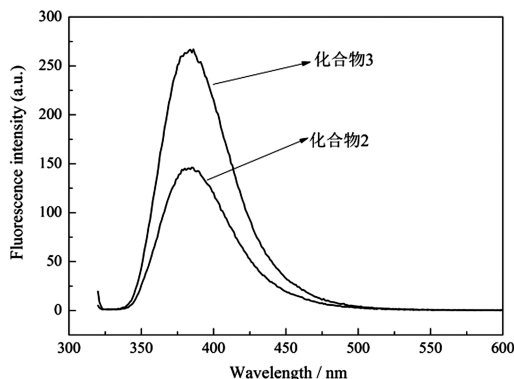


图 2 化合物 2 和 3 的荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of compounds 2 and 3

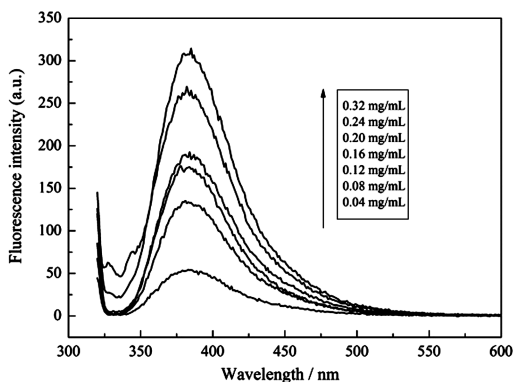


图 3 化合物 3 质量浓度对荧光强度的影响

Fig. 3 Influence towards fluorescence intensity caused by concentration variation of compound 3

化合物 2 和 3 在水溶液中的激发波长为 321nm, 发射波长为 378nm。由于受透明质酸分子结构影响, 化合物 3 的分子刚性增大, 受光激发时化合物 3 分子的骨架振动减弱, 导致吸收的光子能量以非辐射形式损耗较少, 从而使香豆素取代的透明质酸衍生物分子荧光量子产率比化合物 2 自身的要高, 所以图 2 表明化合物 3 比化合物 2 的荧光强度高。图 3 表明, 在一定范围内, 荧光强度随化合物 3 的浓度的增大而增强。

#### 2.2.2 pH 和温度的影响

不同 pH 对化合物 3 的荧光强度影响见图 4; 不同温度对化合物 3 的荧光强度影响见图 5。

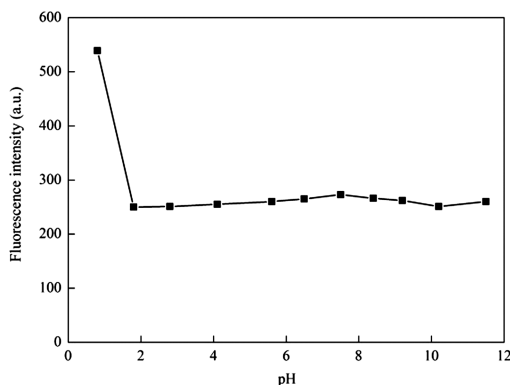


图 4 pH 变化对化合物 3 的荧光强度的影响

Fig. 4 Influence towards fluorescence intensity of compound 3 caused by pH variation

由图 4 表明, 在 pH=0.8 时, 这种条件下对荧光基团电荷状态影响较大, 从而使荧光强度变化较大, 随着 pH 的增大, 化合物 3 的荧光强度变化趋势不明显, 荧光强度较为稳定。图 5 是在模拟人体的弱碱性环境 (pH=7.3), 相同浓度下, 在温度 20~40℃ 的范围内, 化合物 3 荧光强度基本保持稳定。

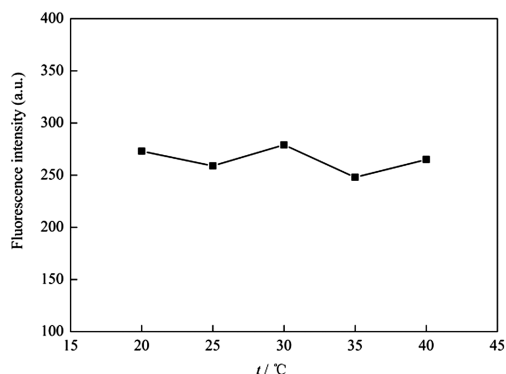


图5 温度变化对化合物3荧光强度的影响

Fig. 5 Influence towards fluorescence intensity of compound 3 caused by temperature variation

### 3 结 论

本文合成了具有荧光功能透明质酸衍生物, 利用荧光光谱研究其荧光性能, 探究不同浓度、pH和温度对透明质酸衍生物荧光性能的影响。从而为以后研究透明质酸在人体内的作用机理以及具有运载药物功能透明质酸的作用机制提供了可行性。

### 参考文献:

[1] Meyer K, Palmer J W. The polysaccharide of the vitreous humor [J]. J Biol Chem, 1934, 107 (3): 629 - 634.  
[2] 张伟, 同翠娥. 透明质酸及其衍生物药物载体 [J]. 化学进展, 2006, 18 (12): 1684 - 1690.  
[3] Benedetti L M, Topp E M, Stella V J, et al. Microspheres of hyaluronic acid esters - fabrication methods and in vitro hydrocortisone release [J]. J Controlled Release, 1990, 13 (1): 33 - 41.  
[4] Kyronen K, Hume L, Benedetti L, et al. Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery: in vitro and in vivo release studies [J]. Int J Pharm, 1992, 80 (1): 161 - 169.  
[5] Surendrakumar K, Martyn G P, Rodgers E C M, et al. Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based dry powder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs

[J]. J Controlled Release, 2003, 91 (3): 385 - 394.  
[6] Luo Y, Prestwich G D. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid - antitumor bioconjugate [J]. Bioconjug Chem, 1999, 10 (5): 755 - 763.  
[7] Luo Y, Ziebell M R, Prestwich G D. A hyaluronic acid - taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells [J]. Biomacromolecules, 2000, 1 (2): 208 - 218.  
[8] Choi K Y, Chung H, Min K H, et al. Self - assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting [J]. Biomaterials, 2010, 31 (1): 106 - 114.  
[9] He M, Zhao Z, Yin L, et al. Hyaluronic acid coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers [J]. Int J Pharm, 2009, 373 (1/2): 165 - 173.  
[10] Liu C C, Chang K Y, Wang Y J. A novel biodegradable amphiphilic diblock copolymers based on poly (lactic acid) and hyaluronic acid as biomaterials for drug delivery [J]. J Polym Res, 2010, 17 (4): 459 - 469.  
[11] 俞晨洁, 张莉, 李红玫, 等. 透明质酸及其衍生物用作药物载体的研究进展 [J]. 药学进展, 2011, 35 (12): 543 - 549.  
[12] Padmanabhan S, Peri R, Rutledge A, et al. Synthesis and binding properties of 2H-1-benzopyran-2 one fluorophore-linked calcium channel antagonist nifedipine(1,4-dihydropyridine) analogs [J]. J Heterocycl Chem, 1997, 34 (1): 301 - 304.  
[13] Trkovanik M, Ivezić Z. Syntheses of some new coumarin - quinolone carboxylic acids [J]. J Heterocycl Chem, 2000, 37 (1): 137 - 142.  
[14] Mlčochová P, Hájková V, Steiner B, et al. Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan [J]. Carbohydr Polym, 2007, 69 (2): 344 - 352.  
[15] Schantéa C E, Zuberá G, Herlinb C, et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications [J]. Carbohydr Polym, 2011, 85 (3): 469 - 489.  
[16] Singh G, Jain S, Gokulan P D, et al. Synthesis, characterization & biological evaluation of novel mannich bases of quinoline derivatives [J]. J Pharm Res, 2011, 4 (7): 2133 - 2135.  
[17] Chen Y L, Lu C M, Lee S J, et al. Synthesis, antiproliferative, and vasorelaxing evaluation of coumarin alpha-methylene-gamma-butyrolactones [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 20 (13): 5710 - 5716.