

文章编号: 1000-7032(2013)07-0845-05

SiO₂ 包覆共轭聚合物 CN-PPV 纳米探针的制备与荧光性质

郑博元, 常开文, 孙 凯, 李 琼, 张 蕊, 代明军, 陈雪霏, 吴长锋*

(集成光电子学国家重点联合实验室 吉林大学电子科学与工程学院, 吉林 长春 130012)

摘要: 采用纳米沉淀法制备了半导体聚合物 CN-PPV 纳米粒子,并用改进的 Stöber 方法对纳米粒子进行包覆,获得了发光稳定的 SiO₂/CN-PPV 纳米粒子。用动态光散射(DLS)及透射电镜(TEM)方法对粒子尺寸进行了表征,结果表明包覆前的 CN-PPV 纳米粒子平均粒径约为 30 nm,包覆获得 SiO₂/CN-PPV 纳米粒子的平均粒径约为 60 nm。通过紫外-可见吸收光谱及荧光光谱对包覆前后纳米粒子的发光性质进行了比较,发现共轭聚合物 CN-PPV 包覆后的发射光谱与包覆前相比发生了小的蓝移,表明共轭聚合物的分子构型可能发生了微小变化。SiO₂ 包覆可以提高聚合物发光分子的光稳定性,并且提供用于生物分子耦联的表面,这类材料有望在生物医学成像中获得应用。

关键词: 共轭聚合物; 纳米粒子; CN-PPV; 二氧化硅; 荧光性质

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20133407.0845

Preparation and Fluorescence Properties of Silica Encapsulated CN-PPV Nanoparticles

ZHENG Bo-yuan, CHANG Kai-wen, SUN Kai, LI Qiong,

ZHANG Rui, DAI Ming-jun, CHEN Xue-fei, WU Chang-feng*

(State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering,
Jilin University, Changchun 130012, China)

* Corresponding Author, E-mail: cwu@jlu.edu.cn

Abstract: Semiconducting polymer CN-PPV nanoparticles (NPs) were prepared by the reprecipitation method and further encapsulated by a facile method. The particle size and the distribution were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The average diameter is ~30 nm for bare CN-PPV nanoparticles and ~60 nm for encapsulated ones. UV-Vis and fluorescence spectroscopy showed consistent results between CN-PPV and SiO₂/CN-PPV nanoparticles. More importantly, silica capsulation improved the photostability of CN-PPV nanoparticles, and provided reliable surface for covalent conjugation with biomolecules. These photostable nanoprobes are promising for biomedical imaging applications.

Key words: conjugated polymer; nanoparticles; encapsulation; silica; fluorescence

收稿日期: 2013-04-10; 修订日期: 2013-06-04

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金(61222508); 国家青年“千人计划”; 吉林大学大学生创新实验(2012B51119)资助项目

作者简介: 郑博元(1991-), 男, 黑龙江大庆人, 主要从事荧光探针及光学成像技术的研究。

E-mail: yuan2049@yeah.net, Tel: (0431)85168241-8325

1 引 言

高荧光强度的纳米粒子已经被广泛地应用于超灵敏分析、活体细胞成像和细胞内生物分子的动力学研究^[1-5]。当前商业化使用的荧光纳米粒子主要包括无机半导体量子点^[1-9]、染料负载的乳胶球^[10-11]和染料掺杂的 SiO₂ 胶质^[12-16]。这些纳米粒子相比于传统的荧光染料具有较高的荧光亮度和光稳定性。然而,对于含有重金属 Cd 离子的无机半导体量子点,其内在毒性限制了它们在活体细胞实验中的应用^[17-18]。负载染料的纳米粒子由于染料自身的猝灭也限制了其负载的浓度。探索新的纳米荧光技术对于生物医学成像研究具有重要意义。共轭聚合物纳米粒子具有非常大的光学吸收截面、很高的荧光量子效率及超快的辐射跃迁速率等特性,这些优异的光学性质特别适合于开发纳米荧光技术。2005 年,美国 Clemson 大学的 McNeill 等^[19]首次报道了半导体聚合物纳米粒子作为纳米荧光探针的研究结果,这类新型纳米荧光粒子因其优越的荧光性能而受到了广泛的关注^[20]。这些纳米粒子主要成分是具有共轭结构的发光聚合物,也被称作聚合物纳米点(Polymer Dot),它们具有小尺寸、高亮度、无毒、稳定等优异特性,为荧光成像技术的发展提供了有效的标记方法,在生物化学、细胞生物学及临床医学等领域显示了广阔的应用前景^[20]。

使用二氧化硅将纳米粒子包覆的方法可以获得光稳定性更好的纳米粒子,并且二氧化硅具有很好的生物相容性,其表面可以较容易进行化学修饰,便于与生物分子进行共价耦联^[21]。基于上述思想,我们选择一种代表性的共轭聚合物 CN-PPV,使用纳米沉淀法制备了 CN-PPV 纳米粒子,进一步用 Stöber 方法 CN-PPV 纳米粒子包埋在二氧化硅基质中,表征了包覆前后纳米粒子的尺寸及分布,讨论了二氧化硅基质对 CN-PPV 发光性质的影响。

2 实 验

2.1 实验试剂

实验中所用的主要化学试剂包括共轭聚合物 Poly [2-methoxy-5-(2-ethylhexyloxy)-1, 4-(1-cyanovinylene phenylene)] (CN-PPV, 平均分子量 $M_w = 235\ 000$, ADS, Inc., Quebec Canada); 无水

四氢呋喃(THF, 99.9%, Aldrich); 实验用水为 Milli-Q water; 正硅酯乙酯(TEOS, 98%, J&K); 无水乙醇(AR, 北京化工厂); 氨水(25% ~ 28%, Aldrich)。所有化学试剂均直接用于化学反应,未经进一步提纯处理。

2.2 CN-PPV 纳米粒子的制备

用纳米沉淀法制备共轭聚合物纳米粒子。将聚合物 CN-PPV 溶于有机溶剂 THF 中,配成质量分数为 0.1% 的原始溶液。将溶液稀释为 0.005%, 在超声震荡的条件下,取 2 mL 的原始溶液注入到 10 mL 超纯水中,继续在超声池中震荡 2 ~ 3 min。然后,将所得混合溶液放在表面温度约为 100 °C 加热台上,向溶液中通入 N₂ 来除去溶液中的 THF,若需浓缩样品可延长加热及通 N₂ 的时间。最后,用 0.2 μm 水相滤头将上述溶液过滤,获得 CN-PPV 纳米粒子的清澈水相溶液。

2.3 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的制备

采用改进 Stöber 方法制备二氧化硅包覆的 CN-PPV 纳米粒子。取 X mL 乙醇、Y mL 氨水和 Z mL CN-PPV 纳米粒子的水溶液在室温下混合均匀,用磁力搅拌器混合搅拌,向混合溶液中缓慢滴加 X mL 的正硅酸乙酯,令上述反应持续 12 h,对产物进行离心分离,并用乙醇和水清洗,最终得到淡黄色的产物沉淀。

2.4 仪器表征

将合适浓度的 CN-PPV 或 SiO₂ 包覆分散液置于干净的 1 cm 塑料比色皿里,用动态光散射测量纳米粒子的尺寸和分布(DLS, Malvern Nano-ZS)。二氧化硅包覆的 CN-PPV 纳米粒子进一步通过透射电子显微镜来测试其粒径(TEM, JEM-2010)。用紫外-可见分光光度计来记录 CN-PPV 纳米粒子的紫外可见吸收光谱(Shimadzu UV-2550PC)。用日本 Hitachi 公司 F-4500 荧光光谱仪测量样品的激发光谱、发射光谱及样品的发光稳定性。

3 结果与讨论

3.1 CN-PPV 纳米粒子的制备及 SiO₂ 包覆

半导体聚合物一类性能优异的有机发光材料,已被广泛应用于有机电致发光及其它光电子器件中。我们在前期工作中制备了一系列小尺寸、高亮度的聚合物纳米颗粒,并将生物功能分子与聚合物纳米粒子耦联,实现了在肿瘤细胞标记

和活体动物成像中的应用^[20]。在一系列半导体聚合物中, CN-PPV 是一种橙黄色发光高分子, 其化学结构如图 1(a) 所示。用这一聚合物制备的纳米粒子具有优异的发光性能, 其光吸收截面高达 $2.3 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$ (约 10 nm 直径的纳米粒子), 其荧光量子效率高达 60%^[22]。在本研究中我们选择 CN-PPV 纳米粒子, 尝试将其包覆在 SiO₂ 纳米球中。

首先, 用纳米沉淀法制备 CN-PPV 纳米粒子, 该方法利用溶剂的突然变化, 诱导高分子聚合物折叠成为稳定的纳米粒子。将 CN-PPV 溶于一种与水完全互溶的有机溶剂 THF 中, 在超声震荡的条件下, 把 CN-PPV 的 THF 溶液快速地注入到水中, 除掉有机溶剂后可获得稳定的聚合物纳米粒子。用动态光散射表征聚合物纳米粒子的尺寸及分布, 如图 1(b) 所示, CN-PPV 纳米粒子的平均粒

径约为 30 nm。然后, 用改进的 Stöber 方法对 CN-PPV 纳米粒子进行包覆。Stöber 方法将 TEOS 在乙醇、氨水和水的混合体系内水解, 可获得尺寸均匀可控、形貌规则的 SiO₂ 微纳米球。我们在硅球制备体系中引入 CN-PPV 的水溶液, 不改变其它反应条件, 因为 CN-PPV 分子富含氧元素, SiO₂ 有望直接在 CN-PPV 纳米粒子的表面成核生长。将上述方法获得样品离心洗涤之后, 可以得到淡黄色的沉淀, 在紫外灯照射下, 展示出明亮橙红色荧光, 表明 CN-PPV 被成功地包埋在硅球中。图 1(c) 给出了 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的透射电镜照片, 表明这些纳米颗粒具有均匀的尺寸分布及较规则的球状形貌, 其平均粒径约为 60 nm。我们进一步用动态光散射测量包覆后纳米粒子的尺寸分布, 如图 1(d) 所示, 测量结果与透射电镜表征结果基本一致。

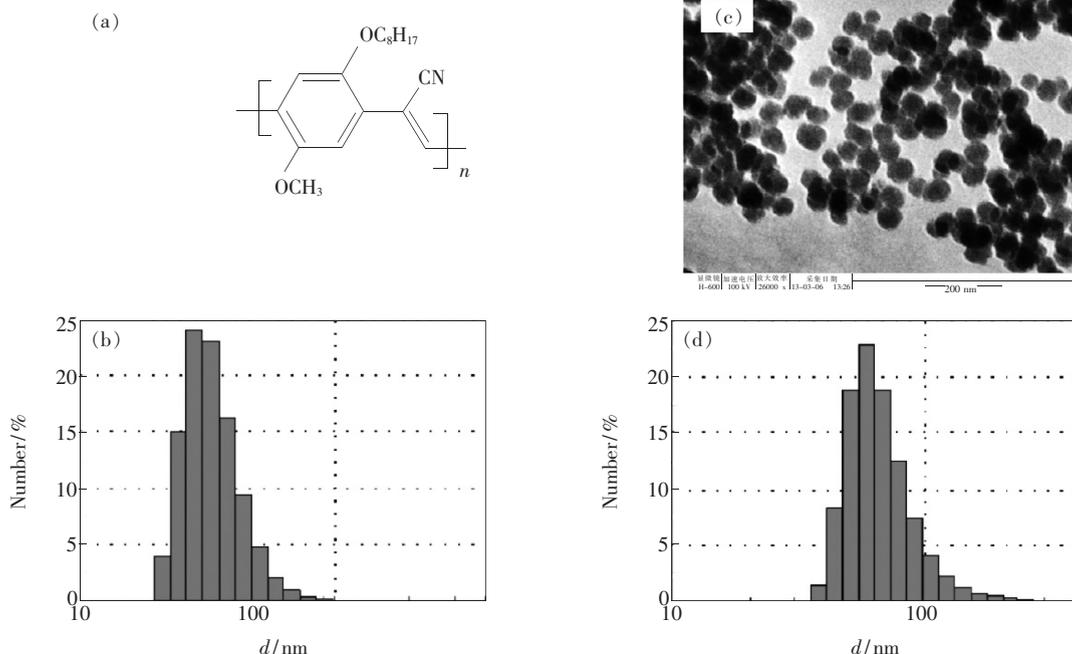


图 1 (a) 共轭聚合物 CN-PPV 的化学结构; (b) 动态光散射测量 CN-PPV 纳米粒子的尺寸及分布; (c) SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的透射电镜照片; (d) 动态光散射测量 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的尺寸及分布。

Fig. 1 (a) Chemical structure of conjugated polymer CN-PPV. (b) Particle size distribution of CN-PPV NPs measured by dynamic light scattering. (c) Typical TEM image of silica encapsulated CN-PPV nanoparticles. (d) Particle size distribution of SiO₂ encapsulated CN-PPV nanoparticles measured by dynamic light scattering.

3.2 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的荧光光谱

半导体聚合物 CN-PPV 表现为宽带吸收, 主要吸收带从 370 nm 延伸到 550 nm, 作为荧光探针适用于激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测系统。如图 2(a) 虚线所示, CN-PPV 纳米粒子的

吸收峰位于 450 nm。用 SiO₂ 对纳米粒子进行包覆后, 因为光散射较强不适合吸收光谱的测量。因此我们监测样品的发光, 获得了样品的激发光谱。激发谱的位置与包覆前 CN-PPV 的吸收光谱基本一致, 其差异是由于光谱仪的光源造成的。

包覆前后样品的发射光谱示于图 2(b), 包覆前后发射光谱的宽度和线形基本不变, 但发射峰的位置约有 8 nm 的蓝移, 说明 CN-PPV 分子的构型在 SiO₂ 包覆后可能发生了变化。图 2(b) 的插图展示了包覆前后纳米粒子悬浮液在紫外灯照射下的发光照片, 可用肉眼观察到发光颜色由橙红色变为了黄色, 与样品的发射光谱的变化一致。光谱变化再次证明 CN-PPV 纳米粒子被成功包埋在 SiO₂ 纳米球中。

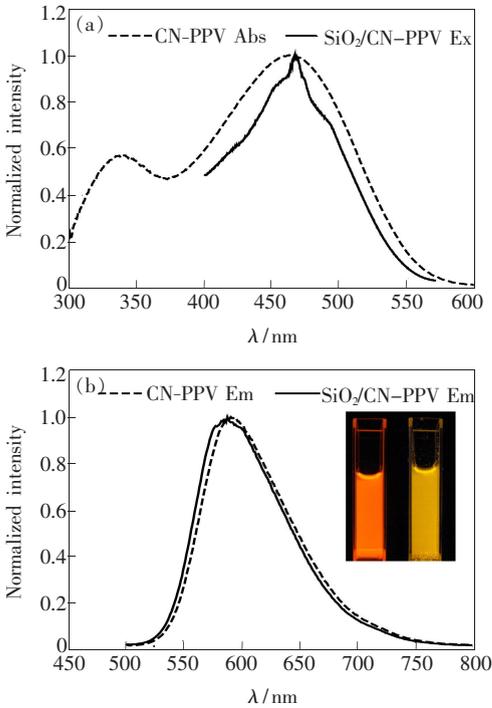


图 2 (a) CN-PPV 纳米粒子的吸收光谱(虚线)和 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的荧光激发光谱(实线); (b) CN-PPV 纳米粒子(虚线)和 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的荧光发射光谱(实线)。插图为 CN-PPV 纳米粒子包覆前后的荧光照片, 左侧为包覆前 CN-PPV 纳米粒子, 右侧为 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子。

Fig. 2 (a) Absorption spectrum of CN-PPV nanoparticles (dashed curve) and excitation spectrum of silica encapsulated CN-PPV nanoparticles (solid curve). (b) Emission spectra of CN-PPV (dashed curve) and silica encapsulated CN-PPV nanoparticles (solid curve). The inset shows pictures of the aqueous solutions of CN-PPV (left) and silica encapsulated nanoparticles (right) under UV lamp illumination.

3.3 SiO₂ 包覆 CN-PPV 纳米粒子的发光稳定性

半导体聚合物纳米探针具有很高的光吸收截面和荧光量子效率, 但光化学稳定性的提高对于长

时间荧光成像和单粒子跟踪等应用具有重要意义。共轭聚合物的光漂白主要与光氧化反应有关, 我们将 CN-PPV 纳米粒子包覆在 SiO₂ 基质中, 可以有效地隔绝氧气, 降低光氧化反应发生的概率, 有望获得光稳定性更好的纳米粒子。另外, 二氧化硅具有很好的生物相容性, 其表面可进行进一步化学修饰, 便于与生物分子进行共价耦联^[21]。在 450 nm 激发光的持续激发下, 用相同的激发和探测条件采集样品发光峰值随时间的变化, 获得了 CN-PPV 纳米粒子包覆前后的发光稳定性数据。如图 3 所示, SiO₂ 包覆样品的光稳定性相比于包覆前的 CN-PPV 纳米粒子有明显的提高。我们在光稳定研究中发现一个重复性很好的实验现象, 即未包覆聚合物粒子的发光强度随光照时间一直呈现降低的趋势, 而包覆样品的发光强度先是缓慢增强, 而后随光照时间的变长而缓慢降低。发光随光照而增强的类似现象曾在另外一种未包覆的聚合物纳米粒子中出现^[23], 其原因有待进一步研究。

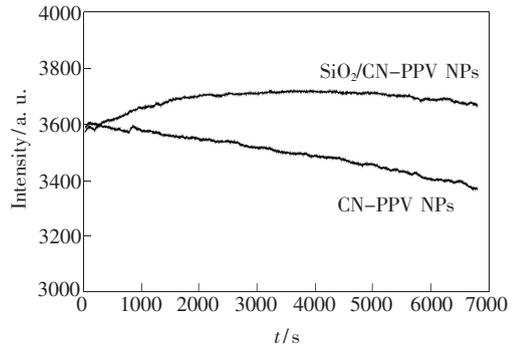


图 3 CN-PPV 纳米粒子包覆前后发光稳定性的比较
Fig. 3 Photostability comparison of CN-PPV and silica encapsulated CN-PPV nanoparticles

4 结 论

采用改进的 Stöber 方法对聚合物 CN-PPV 纳米粒子进行包覆, 获得了发光稳定的纳米粒子。动态光散射 (DLS) 及透射电镜 (TEM) 测量表明, 包覆前 CN-PPV 纳米粒子的平均粒径约为 30 nm, 包覆后样品的平均粒径约为 60 nm。利用吸收光谱及荧光光谱等方法对包覆前后纳米颗粒的发光性质进行了比较, 发现 SiO₂/CN-PPV 纳米粒子的发射光谱与包覆前的光谱相比发生了小的蓝移。SiO₂ 包覆可以大幅提高聚合物纳米粒子的发光稳定性, 有助于推动该类纳米探针在荧光成像及动态荧光跟踪中的应用研究。

参 考 文 献:

- [1] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, *et al.* Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(1):47-51.
- [2] Alivisatos A P. The use of nanocrystals in biological detection [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22(1):47-52.
- [3] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, *et al.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing [J]. *Nat. Mater.*, 2005, 4(6):435-446.
- [4] Alivisatos A P, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes [J]. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 2005, 7:55-76.
- [5] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics [J]. *Science*, 2005, 307(5709):538-544.
- [6] Bruchez M, Moronne M, Gin P, *et al.* Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [J]. *Science*, 1998, 281(5385):2013-2016.
- [7] Chan W C W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. *Science*, 1998, 281(5385):2016-2018.
- [8] Gao X, Cui Y, Levenson R M, *et al.* In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22(8):969-976.
- [9] Wu X, Liu H, Liu J, *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2002, 21(1):41-46.
- [10] Yang C S, Chang C H, Tsai P J, *et al.* Nanoparticle-based in vivo investigation on blood-brain barrier permeability following ischemia and reperfusion [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76(15):4465-4471.
- [11] Kolodny L A, Willard D M, Carillo L L, *et al.* Spatially correlated fluorescence/AFM of individual nanosized particles and biomolecules [J]. *Anal. Chem.*, 2001, 73(9):1959-1966.
- [12] Santra S, Zhang P, Wang K, *et al.* Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photo-stable biomarkers [J]. *Anal. Chem.*, 2001, 73(20):4988-4993.
- [13] Zhao X, Hilliard L R, Mechery S J, *et al.* A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(42):15027-15032.
- [14] Ow H, Larson D R, Srivastava M, *et al.* Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles [J]. *Nano Lett.*, 2005, 5(1):113-117.
- [15] Wang L, Yang C, Tan W. Dual-luminophore-doped silica nanoparticles for multiplexed signaling [J]. *Nano Lett.*, 2005, 5(1):37-43.
- [16] Graf C, Scharl W, Fischer K, *et al.* Dye-labeled polyorganosiloxane- μ -gels with core-shell architecture [J]. *Langmuir*, 1999, 15(19):6170-6180.
- [17] Derfus A M, Chan W C W, Bhatia S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots [J]. *Nano Lett.*, 2004, 4(1):11-18.
- [18] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, *et al.* Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles [J]. *Nano Lett.*, 2005, 5(2):331-338.
- [19] Wu C, Szymanski C, McNeill J. Preparation and encapsulation of highly fluorescent conjugated polymer nanoparticles [J]. *Langmuir*, 2006, 22(7):2956-2960.
- [20] Wu C, Chiu D T. Highly Fluorescent semiconducting polymer dots for biology and medicine [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52(11):3086-3109.
- [21] Wang L, Zhao W, Tan W. Bioconjugated silica nanoparticles: development and applications [J]. *Nano Res.*, 2008, 1(2):99-115.
- [22] Ye F, Wu C, Jin Y, *et al.* A compact and highly fluorescent orange-emitting polymer dot for specific subcellular imaging [J]. *Chem. Commun.*, 2012, 48(12):1778-1780.
- [23] Wu C, Bull B, Szymanski C, *et al.* Multicolor conjugated polymer dots for biological fluorescence imaging [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(11):2415-2423.