

文章编号: 1000-7032(2009)03-0351-05

近红外染料 Yb(P4)(CoP) 掺杂 PS/SiO₂ 复合纳米荧光标记物的制备及其性能

李月娟¹, 孟建新^{2*}, 曹丽伟², 蒋风雷³, 黄伟国³

(1. 暨南大学 化学系; 2. 暨南大学 纳米化学研究所, 广东 广州 510632;

3. 香港浸会大学 化学系, 香港 九龙塘)

摘要: 利用苯乙烯与3-甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷(KH570)化学反应合成共聚前驱物,再采用凝胶-溶胶法,与四乙氧基硅烷在一定的条件下共同水解与缩合,合成了近红外染料[(环戊二烯)钴(Ⅰ)三(二乙基亚磷酸基)][5,10,15,20-四(p-甲氧基苯基)-卟啉]合镱(Ⅲ)掺杂的聚苯乙烯/二氧化硅复合纳米粒子。这种制备染料掺杂复合纳米粒子的方法既克服了传统物理包埋方法染料容易泄漏的问题,又不受到化学键合方法对近红外染料分子性质的限制。用扫描电子显微镜表征该复合纳米粒子呈球形,大小均匀,直径约100 nm。所制得的纳米粒子荧光性质稳定,受外界环境的影响小,具潜在生物亲和性,是一种新型的近红外荧光标记物。

关键词: KH570; 凝胶-溶胶法; 复合纳米粒子; 近红外

中图分类号: O482.31

PACS: 78.55. Kz

PACC: 3250F; 7855

文献标识码: A

1 引 言

荧光检测技术在 DNA 杂交检测、免疫检测、基因重组检测和肿瘤细胞早期诊断等方面的广泛应用,极大地促进了近红外发光标记物的发展。近红外发光标记物的发射光谱处于近红外区(650~1 200 nm),因此避开了很多物质都有吸收的可见光区,近红外发光在生物组织中的穿透深度较大,发光受生物组织本底的影响较少,所以能够在深层组织产生信号,可避免背景干扰而获得较高的分析灵敏度^[1]。近年来发展迅速的各种类型的近红外发光材料有有机染料荧光团^[2]、稀土配合物^[3]、量子点^[4~6]、金和银纳米粒子^[7]、荧光团连接的聚合物^[8,9]和生物发光蛋白质^[10]等。

纳米技术和生物技术的结合发展起来的核壳型纳米粒子,尤其是掺杂近红外染料的发光纳米粒子的制备,为生物医学领域的研究提供了新的材料、技术和方法。与上述各种类型的近红外发光材料相比,核壳型纳米粒子受外界环境影响小,

光稳定性好,制备过程简单,条件温和,试剂便宜^[11]。而且它们的均一粒径、良好的分散性和生物相容性使修饰变得容易。这些优点使得核-壳型荧光纳米粒子应用于多种科学研究和临床诊断^[12]。Joseph 等^[13]利用正硅酸乙酯水解制备了掺杂花菁染料的二氧化硅纳米粒子。这种直接将荧光染料物理包埋于 SiO₂ 的方法存在着明显的荧光染料泄漏问题。He 等^[14]通过油包水的反向微乳液法制备了五甲川菁染料-羊抗人免疫球蛋白(Cy5-IgG)掺杂的核壳荧光纳米粒子。这种化学键合制备核壳荧光纳米粒子的方法能有效地防止荧光染料泄漏,但是对染料分子的性质有要求,特别是近红外荧光染料本身合成难度就很大,很难得到具有用于化学键合的活性基团,因此该方法在实际应用中受到限制。本文发展了一种使荧光染料具有更高包埋效率的物理包埋新方法。在本方法中,首先用硅烷偶联剂修饰聚苯乙烯纳米粒子,使其羟基化。再用凝胶-溶胶法制备了掺杂[(环戊二烯)钴(Ⅰ)三(二乙基亚磷酸基)][5,10,15,20-四(p-甲氧基苯基)-卟啉]合镱(Ⅲ)

收稿日期: 2008-08-04; 修订日期: 2008-10-13

基金项目: 国家自然科学基金(30670523); 广东省自然科学基金团队项目(05200555)资助项目

作者简介: 李月娟(1982-),女,湖南长沙人,主要从事发光免疫分析的研究。

E-mail: liyuejuan2006@126.com, Tel: (020)85228112

*: 通讯联系人; E-mail: tmjx@jnu.edu.cn, Tel: (020)85220223

[Yb(P4)(CoP)] 的聚苯乙烯(PS)/二氧化硅复合纳米粒子。结果表明,这种方法将使染料掺杂后的泄漏很小。该方法操作简便,既克服了传统物理包埋方法染料容易泄漏的问题,又不受到化学键合方法对染料分子性质的限制,而且 PS 所提供的局部疏水环境又显著提高了近红外发光染料的发光效率。可望在近红外荧光纳米粒子的标记研究中得到广泛应用。

2 实 验

2.1 主要试剂及仪器

四乙氧基硅烷(TEOS)、3-甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷(KH-570)、氨基丙基三乙氧基硅烷(APTEOS)购自 Sigma 公司;Yb(P4)(CoP)按文献[15]方法合成;其他试剂均为分析纯试剂;所用水均为二次蒸馏水。近红外发光性能测试用荷兰 AVANTES 公司的 AvaSpec-2048TEC-FT 光纤光谱仪进行;激发光源为波长 473 nm,功率 50 mW 的蓝色半导体激光器;SEM 测量使用 LEO 1530 型扫描电子显微镜。

2.2 掺杂 Yb(P4)(CoP) 的聚苯乙烯/二氧化硅(PS/SiO₂) 复合纳米标记物的制备

参照文献[16]的方法制备了羟基化聚苯乙烯,掺杂 Yb(P4)(CoP)的 PS/SiO₂ 的制备采用凝胶-溶胶法:称取 0.2 g 羟基化聚苯乙烯,将其溶解于 2 mL 的甲苯中,加入 0.2 mL TEOS,370 μ L 曲拉通 X-100,一定量的 Yb(P4)(CoP),反应 0.5 h。于另一 100 mL 的锥形瓶中,加入 50 mL 无水乙醇,5 mL 25% 氨水,搅拌数分钟后,两锥形瓶溶液混合,搅拌反应 12 h 后,加入 100 mL APTEOS,继续反应至 24 h。离心分离,多次水洗和醇洗,烘干待用。

3 结果与讨论

3.1 掺杂 Yb(P4)(CoP) 的 PS/SiO₂ 复合纳米粒子的形貌观测

利用凝胶-溶胶法制备纳米粒子的装置简单,操作容易,无需高温、高压及其他苛刻的实验条件,在室温下可制备出包覆 SiO₂ 外壳的荧光纳米粒子。图 1 是所制备的掺杂 Yb(P4)(CoP) 的 PS/SiO₂ 复合纳米粒子的 SEM 和 TEM 照片,纳米粒子呈球形且大小均一,粒径(100 \pm 5) nm,分散性很好。TEM 照片显示 PS/SiO₂ 复合纳米粒子没

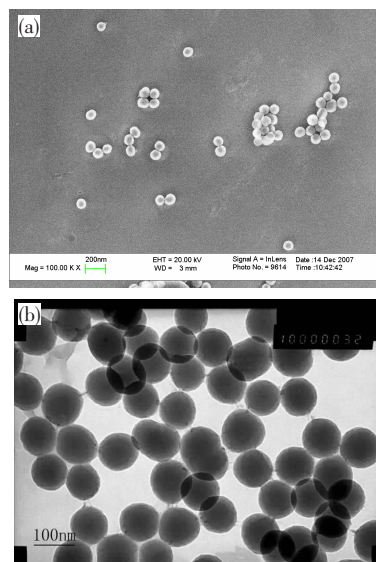


图 1 掺杂 Yb(P4)(CoP) PS/SiO₂ 纳米粒子 SEM(a) 和 TEM(b) 图像

Fig. 1 SEM(a) and TEM(b) images of PS/SiO₂ nanoparticles doped with Yb(P4)(CoP)

有明显的不均匀现象,表明复合纳米粒子中 PS 基团并没有聚集在一起,而是随机分布在二氧化硅纳米粒子的各个部位。

3.2 PS/SiO₂ 核壳结构对 Yb(P4)(CoP) 染料的包埋

取适量所制备的荧光复合纳米粒子,将其分散于 4 mL 蒸馏水中,超声振荡 10 min 后,得一悬浮液,检测该悬物液的荧光强度,然后再将悬物液离心分离,沉降下来的纳米粒子又重新分散在 4 mL 水中,重复上述操作数次,通过荧光强度的变化情况确定染料从纳米粒子中泄漏的程度。结果如图 2 所示,洗涤 8 次后,纳米粒子的荧光强度仍有原来的 90% 以上,并不再随着洗涤次数的增加

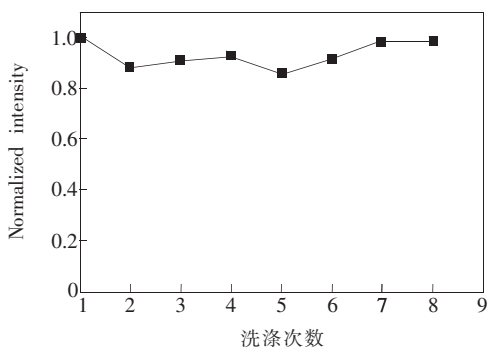


图 2 掺杂 Yb(P4)(CoP) 的 PS/SiO₂ 纳米粒子的水洗泄漏情况

Fig. 2 Dye leakage of Yb(P4)(CoP) doped PS/SiO₂ nanoparticles

而下降。可能的原因是复合纳米粒子是由 SiO₂ 和 PS 两种材料复合而成,疏水性的 Yb(P4)(CoP) 染料靠疏水作用力结合在纳米粒子中的 PS 部位。PS 由于通过化学键与 SiO₂ 结合,不容易从复合纳米粒子中泄露,而 PS 的疏水性,保护了处于疏水环境中的染料分子避免与溶剂水分子接近,因而也避免了水分子对染料发光的猝灭;同时利用 SiO₂ 的亲水性,使得纳米粒子在水中很容易分散。因此这种方法很好地解决了疏水性染料无法在 SiO₂ 中的掺杂的问题。可望在疏水性染料-SiO₂ 纳米粒子的制备中得到推广应用。

3.3 Yb(P4)(CoP) 掺杂量对发光强度的影响

为考察 Yb(P4)(CoP) 掺杂量对所形成的复合纳米粒子发光性能的影响,通过改变加入 Yb(P4)(CoP) 的量来改变荧光染料在纳米粒子中的浓度。按 Yb(P4)(CoP) 加入量为 30, 50, 70, 90 mg 制备了系列掺杂量的荧光复合纳米粒子。分别称取 2 mg, 水洗 2 次后,将其分散于 4 mL 蒸馏水中,超声振荡 10 min 后,得到纳米粒子的悬浮液,悬物液的荧光强度对比如图 3 所示。随着染料加入量的增加,荧光强度增强。图 3 同时对 Yb(P4)(CoP) 乙醇溶液的光谱,从图中可以看出,两光谱形状基本一致,这说明 Yb(P4)(CoP) 掺入到纳米粒子中后,并未改变其荧光性质, Yb(P4)(CoP) 是一稀土配合物,在水溶液中稳定性并不高,但我们的结果表明这一制备方法即使对这种并非十分稳定的配合物也可以很好地应用,同时纳米粒子中配合物染料的荧光强度明显增强,可能是由于纳米粒子中疏水性的染料处于

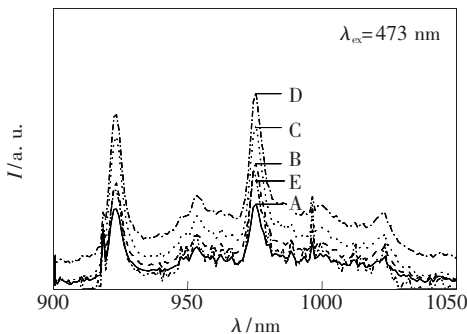


图3 PS/SiO₂ 纳米粒子的荧光强度随 Yb(P4)(CoP) 掺杂量的变化

Fig. 3 Variation of fluorescence intensities of PS/SiO₂ nanoparticles with different Yb(P4)(CoP) dosage; A: 30 mg, B: 50 mg, C: 70 mg, D: 90 mg, E: ethanol solution of Yb(P4)(CoP).

PS 所造成的疏水微环境,减少了近红外发光的猝灭所致。

3.4 pH 值对样品荧光性质的影响

为了考察 PS/SiO₂ 的包合对掺杂染料发光性质的影响,比较了纳米粒子和 Yb(P4)(CoP) 乙醇溶液的荧光性质随 pH 的变化情况。分别称取适量的纳米粒子和 Yb(P4)(CoP) 溶于适量的乙醇中,超声振荡数分钟,各取 3 mL 于 8 只试管中,分别用稀盐酸或氢氧化钠调节至一定 pH,再测量样品在各个 pH 值下的荧光性质。Yb(P4)(CoP) 乙醇溶液的荧光强度受 pH 影响变化较大,荧光强度在 pH 为 10 时最大,将近最小值的 2 倍。Yb(P4)(CoP) 掺杂纳米粒子的荧光强度在 pH 值 3~11 之间的变化很小,最大值:最小值 < 1.1。pH 小于 3 和大于 11 时荧光强度有所下降,可能与此 pH 时 PS/SiO₂ 纳米粒子不稳定有关。这说明染料掺杂纳米粒子后其荧光性质受溶液条件的影响会明显减小,核壳结构减少了荧光物质受外界环境的影响。

3.5 掺杂 Yb(P4)(CoP) 纳米粒子的荧光稳定性

取适量的纳米粒子和 Yb(P4)(CoP) 分散在 4 mL 乙醇中,超声振荡 10 min 后,放在氙灯下照射,每照射 10 min,测一次荧光强度,通过荧光强度的变化来确定纳米粒子的荧光稳定性。60 min 后(如图 4),纳米粒子的荧光强度为初始荧光强度的 92%,而 Yb(P4)(CoP) 乙醇溶液的荧光强度只为初始荧光强度的 48%,这说明,二氧化硅外壳的包合能屏蔽外界对壳内荧光物质的影响,使 Yb(P4)(CoP) 纳米粒子的稳定性得到提高。

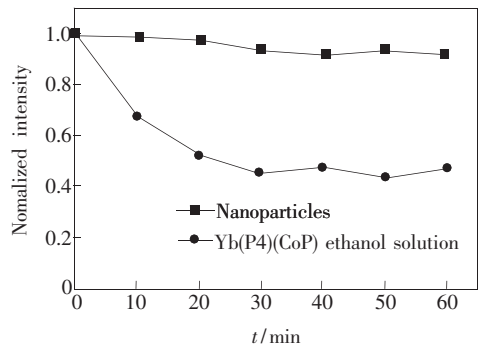


图4 纳米粒子和 Yb(P4)(CoP) 乙醇溶液荧光稳定性比较

Fig. 4 Comparison of fluorescence stability on PS/SiO₂ nanoparticles and Yb(P4)(CoP) ethanol solution

4 结 论

采用凝胶-溶胶法成功地制备出了掺杂 Yb(P4)(CoP) 染料的近红外发光 PS/SiO₂ 复合纳米粒子。该方法操作简单,条件温和,所制备的复合纳米粒子大小均一,分散性好,稳定性好。是一种使近红外荧光染料有效掺杂的物理包埋新方

法。此物理包埋方法很好地解决了染料泄漏的问题,又对本身合成难度很大,很难得到具有用于化学键合的活性基团的近红外荧光染料性质没有严格要求,而且 PS 所提供的局部疏水环境又显著提高了近红外发光染料的发光效率。可望在近红外荧光纳米粒子的标记研究中得到广泛应用。

参 考 文 献:

- [1] Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets [J]. *Nat. Med.*, 2003, **9**(1):123-128.
- [2] Intes X, Ripoll J, Chen Y, *et al.* In vivo continuous-wave optical breast imaging enhanced with indocyanine green [J]. *Med. Phys.*, 2003, **30**(6):1039-1047.
- [3] Imbert D, Cabtuel M, Bunzli J C, *et al.* Extending lifetimes of lanthanide-based near-infrared emitters (Nd, Yb) in the millisecond range through Cr(III) sensitization in discrete bimetallic edifices [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**(51):15698-15699.
- [4] Wolcott A, Gerion D, Visconte M, *et al.* Silica-coated CdTe quantum dots functionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**(11):5779-5789.
- [5] Feng Liyun, Kong Xianggui. Preparation and characterization of fluorescence CdSe-liposome compound [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2007, **28**(3):417-420 (in Chinese).
- [6] Feng Bin, Teng Feng, Tang Aiwei, *et al.* Application of aminophenol-stabilized CdSe nanocrystals as a fluorescent-label for lysozyme [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2007, **28**(3):421-424 (in Chinese).
- [7] Huang X, El-Sayed I H, Qian W, *et al.* Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**(6):2115-2120.
- [8] Ghoroghchian P P, Frail P R, Susumu K, *et al.* Broad spectral domain fluorescence wavelength modulation of visible and near-infrared emissive polymersomes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(44):15388-15390.
- [9] Wu Hongwei, Zhou Peng, Zhao Liang, *et al.* Selective detection of Zn²⁺ ion based on quinoline fluorophore [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2008, **29**(6):1091-1095 (in Chinese).
- [10] Jiang T, Olson E S, Nguyen Q T, *et al.* Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, **101**(51):17867-17872.
- [11] Yang W, Zhang C G, Qu H Y, *et al.* Novel fluorescent silica nanoparticle probe for ultrasensitive immunoassays [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2004, **503**(2):163-169.
- [12] Tan M Q, Wang G L, Ye Z Q, *et al.* Synthesis and characterization of titania-based monodisperse fluorescent europium nanoparticles for biolabeling [J]. *J. Lumin.*, 2006, **117**(1):20-28.
- [13] Bringley J F, Penner T L, Wang R Z, *et al.* Silica nanoparticles encapsulating near-infrared emissive cyanine dyes [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **320**(1):132-139.
- [14] He X X, Chen J Y, Wang K M, *et al.* Preparation of luminescent Cy5 doped core-shell SFNPs and its application as a near-infrared fluorescent marker [J]. *Talanta*, 2007, **72**(4):1519-1526.
- [15] Wong W K, Zhang L, Xue F, *et al.* Synthesis, characterization and crystal structures of neutral mono- and di-nuclear lanthanide(III) porphyrinate complexes [J]. *J. Chem. Soc.*, 1999, (17):3053-3062.
- [16] Hanan S, David A. Submicron silica/polystyrene composite particles prepared by a one-step sol-gel process [J]. *Chem. Mater.*, 2003, **15**(8):1690-1694.

Preparation and Properties of Near-infrared Yb(P4)(CoP) Dyes Doped Polystyrene/Silica Nanoparticles

LI Yue-juan¹, MENG Jian-xin², CAO Li-wei², JIANG Feng-lei³, WONG Rick³

(1. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Institute of Nano-Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

3. Department of Chemistry, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong, China)

Abstract: In an effort to prepare efficient and uniform biolabels, we have developed a novel fluorophore doped polystyrene/silica nanoparticles via sol-gel method. The copolymer precursors are obtained via copolymerizations of styrene and 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (KH570). The controlled hydrolysis and condensation of tetraethyl orthosilicate (TEOS) in sol-gel route leads to the formation of near-infrared ytterbium(III)-[5,10,15,20-tetrakis(p-methoxyphenyl)-porphyrin](cyclopentadienyl)tris(diethylphosphito)cobaltate(I) anion dyes doped polystyrene/silica nanoparticles. The method significantly reduces fluorescent dye leaching from the nanoparticles, and can be conveniently applied to various dyes molecules with no active group. Scanning electron microscope(SEM) images showed that the nanoparticles are very uniform spherical shape and monodispersed with a diameter of about 100 nm. The present near-infrared fluorescent nanoparticles possess with the values of facilitating bio-modification, biocompatibility, higher detection sensitivity and photo-stability, and will be well applied in cell recognition, bacterial detection, DNA analysis and so on.

Key words: KH570; sol-gel route; composition nanoparticles; near-infrared

CLC number: O482.31

PACS: 78.55.Kz

PACC: 3250F; 7855

Document code: A