

СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОАНАЛИЗЕ

Петракова А.В., Урусов А. Е., Костенко С.Н., Придворова С.М., Васильев М.А., Жердев А. В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН (119071, Москва, Россия), e-mail: urusov.alexandr@gmail.com

В статье представлены результаты исследования по определению оптимальных условий синтеза магнитных наночастиц оксида железа. Показано влияние на свойства частиц различных условий синтеза, таких как концентрация солей, температура, соотношение реагентов и способ их введения в реакционную среду. Критериями выбора оптимального протокола синтеза являлись скорость осаждения магнитных частиц в магнитном поле и стабильность в растворе при хранении. Предложена методика синтеза наночастиц магнетита диаметром 10 нм, характеризующихся узким распределением по размерам, высокой стабильностью в растворе, достаточной магнитной восприимчивостью и малой степенью агрегированности. Методика позволяет проводить синтез при комнатной температуре и атмосфере воздуха.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, магнетит, магнитная сепарация

SYNTHESIS OF MAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES FOR IMMUNOASSAY

Petrakova A.V., Urusov A.E., Kostenko S.N., Pridvorova S.M., Vasilyev M.A., Zherdev A.V.

A.N. Bach Institute of biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia (119071 Moscow, Leninsky Prospect 33), e-mail: urusov.alexandr@gmail.com

The paper presents the results of a study to determine the optimal conditions for the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. The influence of particle properties on the different synthesis conditions such as salt concentration, temperature, ratio of reactants and method of their introduction into the reaction medium. Criteria for selecting the optimal synthesis protocol were the deposition rate of the magnetic particles in a magnetic field and stability in solution during storage. The methods of synthesis of nanoparticles of diameter 10 nm, characterized by a narrow size distribution, high stability in solution, sufficient magnetic susceptibility and a low degree of aggregation. The method allows the synthesis at room temperature and atmospheric air.

Keywords: magnetic nanoparticles, magnetite, magnetic separation

Введение

Магнитные наночастицы (МНЧ) представляют собой частицы природных или синтетических материалов с размерами от 5 до 100 нм, которые обладают магнитными свойствами. Показан значительный потенциал применения МНЧ в биомедицине, магнитно-резонансной томографии, системах хранения данных, технологиях восстановления окружающей среды, магнитоуправляемых жидкостях, различных детекторах и системах иммуноанализа [1]. В последнем случае МНЧ используются и как средства пробоподготовки (очистка, концентрирование аналита [6; 8]), и как маркеры (иммунохроматография с магнитной детекцией [9])

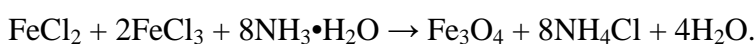
При получении МНЧ, как правило, используются железо, никель и кобальт и их оксиды. Недостатком чистых металлов является то, что их намагничивание падает по мере окисления поверхности, находящейся в контакте с атмосферным кислородом. Однако есть подкласс веществ, лишенных этих недостатков, - ферриты. Они имеют общую формулу $MO \cdot Fe_2O_3$, где М - двухвалентный ион металла. Наиболее часто встречающимся представителем

данной группы является магнетит ($\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$). Главные преимущества магнетита - низкая восприимчивость к окислению, высокие магнитные свойства и низкая стоимость.

С уменьшением размера магнитного материала до однодоменного уровня (менее нескольких десятков нм) он приобретает свойство суперпарамагнетизма. Суперпарамагнитные частицы при удалении магнитного поля полностью теряют намагниченность, то есть возвращаются в исходное состояние и могут быть легко ресуспензированы в растворе.

Ключевыми требованиями к методике синтеза МНЧ являются простота, небольшая стоимость и воспроизводимость. Для получения магнетита чаще всего используется метод соосаждения [2], получая МНЧ из водно-солевых растворов путем добавления основания в инертной атмосфере при комнатной или повышенной температуре.

Схематически процесс образования магнетита можно записать так:



Полное выпадение осадка происходит при значениях рН в интервале от 8 до 14. Форма и состав частиц зависит от типа соли (хлориды, сульфаты, нитраты), соотношения $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ [3], температуры проведения реакции [7], рН [5], а также от типа основания и скорости перемешивания.

Основные преимущества соосаждения – высокая производительность, простота исполнения и аппаратного оформления, доступность и дешевизна используемых реагентов. Однако, несмотря на популярность этого метода, вопросы оптимизации условий синтеза для получения наночастиц с узким распределением по размерам исследованы крайне слабо, причем большая часть таких работ являются ноу-хау коммерческих компаний.

С учетом вышеизложенного, целью нашего исследования было изучение влияния условий протекания реакции соосаждения на физические характеристики МНЧ магнетита и определение оптимальных параметров для получения наночастиц.

Материалы и методы

2.1. Реагенты

В работе использованы железа (III) хлорид гексагидрат, железа (II) хлорид тетрагидрат, Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США), 25% водный раствор аммиака (Химмед, Россия).

Для магнитной сепарации использовали постоянный цилиндрический неодимовый магнит D30x30 мм (Россия).

2.2. Просвечивающая электронная микроскопия.

Препараты МНЧ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и

увеличении 3.300.000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

2.3. Протокол получения МНЧ

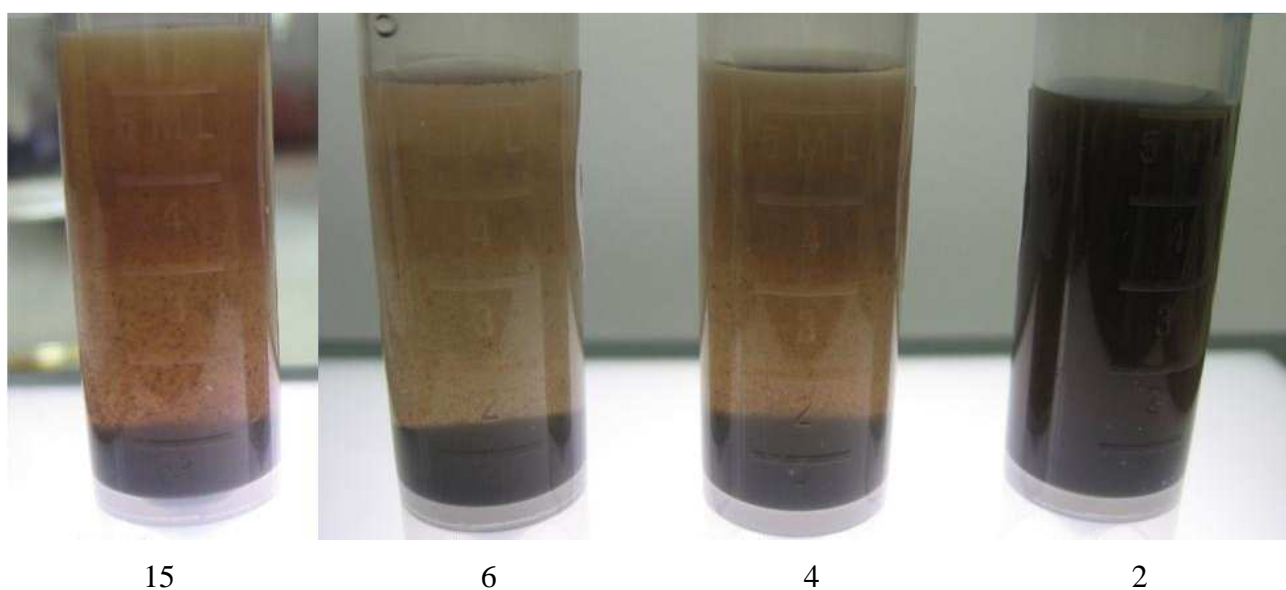
К водному раствору, содержащему 0,3-1,2%_{масс} смеси хлорида железа(II) и (III) в мольном соотношении 1:2, по каплям добавляли водный раствор аммиака (2,4-60%_{объемн}) при комнатной температуре и перемешивали 15 минут. Осадок многократно промывали дистиллированной водой и хранили при +4°C.

Результаты и обсуждение

В нашей работе для соосаждения были использованы соли хлорида железа(II) и (III) и водный раствор аммиака. В большинстве источников рекомендуется проводить взаимодействие при мольном соотношении солей железа (III)/(II), равном 2:1 [3]. В то же время концентрации солей и добавляемого основания существенно разнятся [2; 3; 4]. В связи с этим наша работа была направлена на подбор рабочих концентраций солей (при фиксированном соотношении 2:1), количества основания и условий проведения синтеза.

Для оптимизации количества добавляемого гидрата аммиака было приготовлено 4 препарата магнитных частиц, в процессе синтеза которых использовался раствор 0,3%_{масс} солей железа (конечная концентрация) к которому добавлялся двадцатипятипроцентный раствор аммиака до конечной концентрации от 0,625 до 15%_{объемн}.

Как следует из рис. 1, избыток раствора аммиака приводит к получению нестабильной взвеси. Наиболее стабильны, а значит, наименее агрегированы частицы, полученные при добавлении 2%_{объемн} гидрата аммиака.



Конечная концентрация гидрата аммиака, %_{объемн}

Рис. 1. Стабильность МНЧ, полученных при использовании различных концентраций гидроксида аммония (внешний вид растворов после 5-минутной инкубации без перемешивания),

В подтверждение установленной закономерности были сделаны микрофотографии препаратов с помощью просвечивающей электронной микроскопии. На рис. 2 в качестве примера представлены изображения двух вариантов суспензии магнитных частиц, полученных при концентрации аммиака 2 и 4%.

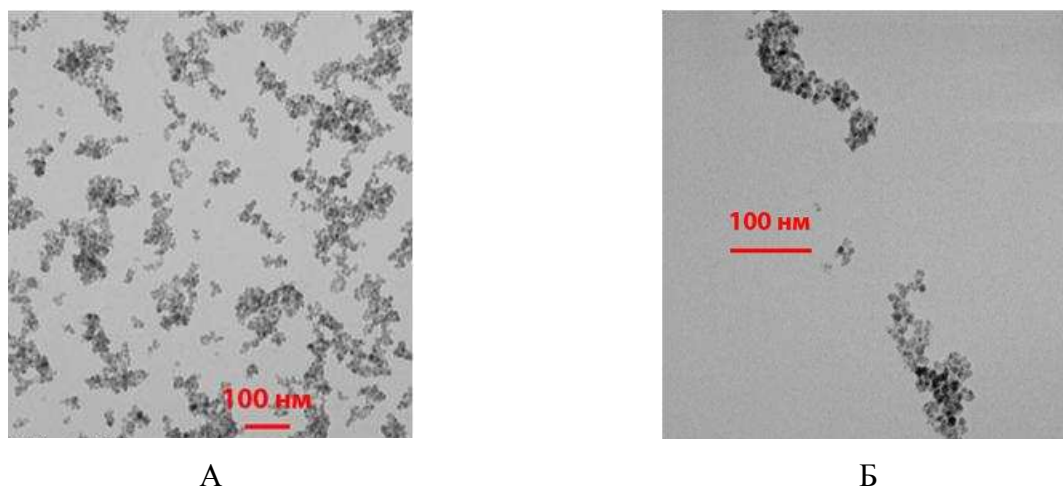


Рис. 2. Электронные микрофотографии препаратов МНЧ, полученных при использовании 2% (А) и 4%(Б) гидрата аммония, 0,5%_{масс} и смеси хлорида железа(II) и (III) в мольном соотношении 1:2 .

В таблице 1 представлены все рассмотренные варианты получаемых продуктов и их характеристики.

Таблица 1

Концентрации исходных реагентов и характеристика полученных МНЧ

№	% NH ₄ OH	% солей железа	Стабильность суспензии	Магнитная восприимчивость	Наличие непрореагировавших солей железа
1	15	1.2	-	+	+
2	15	0.8	-	+	+
3	15	0.5	-	+	-
4	15	0.3	-	-	-
5	12	0.3	-	-	-
6	6	0.3	-	-	-
7	4	0.3	-	-	-
8	2	0.3	+	-	-
9	2	0.5	+	+	-

В результате проведенных исследований выработан ряд рекомендаций по режимам синтеза наночастиц магнетита:

Установлено влияние характера внесения реагентов. При добавлении NH_4OH одновременно всего необходимого объема (не постепенно, по каплям) полученная коллоидная смесь почти лишена магнитных свойств (см. рис 3), а сами частицы сильно агрегированы.

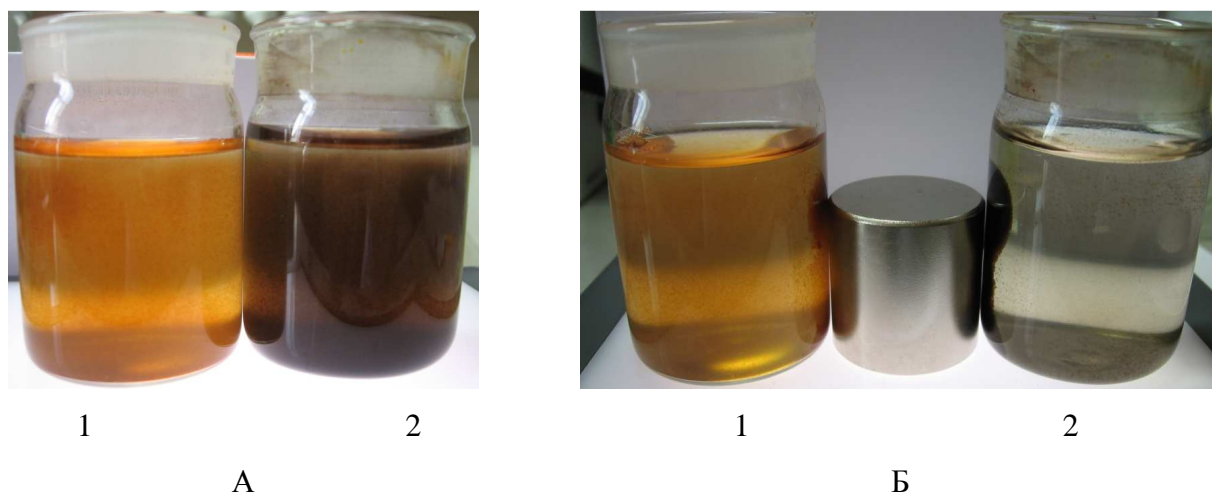


Рис. 3. Магнитные частицы, полученные при различных способах добавления гидрата аммиака – весь объем гидрата аммиака вносился одновременно (А1, Б1) или постепенно, по каплям (А2, Б2), до (А) и после (Б) внесения в магнитное поле

Использование концентраций солей железа выше 1% приводит к неполному прохождению реакции и наличию избытка непрореагировавших солей железа.

На основании изученных свойств МНЧ (скорости осаждения, стабильности в растворе, магнитной восприимчивости) был выбран оптимальный препарат (№9 в таблице), для получения которого концентрация солей железа при синтезе составила 0.5%, а концентрация водного раствора аммиака 2%. Процентный выход реакции составил 72%. По результатам просвечивающей электронной микроскопии синтезированные частицы гомогенны, средний размер составляет около 10 нм, а размер агрегатов не превышает 100 нм.

Выводы

Предложена методика синтеза наночастиц магнетита, обладающих узким распределением по размерам и высокой стабильностью в растворе. Исследовано влияние различных параметров (концентрация солей железа, водного раствора аммиака, температуры и характера внесения реагентов) на качество МНЧ. Получены магнитные частицы диаметром 10 нм, обладающие достаточной магнитной восприимчивостью и малой степенью

агрегированности. Выбранная методика отличается простотой — позволяет проводить синтез при комнатной температуре и атмосфере воздуха.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, соглашение № 8464 от 16 августа 2012 г.

Список литературы

1. Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M.F., Gutierrez L., Morales M.P., Bohm I.B., Heverhagen J.T., Prospero D., Parak W.J. Biological applications of magnetic nanoparticles // Chem. Soc. Rev. — 2012. V. 41. № 11. — P. 4306-4334.
2. Gao R., Li J., Han S., Wen B., Zhang T., Miao H., Zhang Q. Magnetisation behaviour of mixtures of ferrofluids and paramagnetic fluids with same particle volume fractions // J. Exp. Nanosci. — 2011. V. 7. № 3. — P. 282-297.
3. Hyeon T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles // Chem. Commun. — 2003. № 8. — P. 927-934.
4. Laurent S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L.V., Muller, R.N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications // Chem. Rev. — 2008. V. 108. № 6. — P. 2064-2110.
5. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media // IEEE Trans. Magn. — 1981. V. 17. № 2. — P. 1247-1248.
6. Qi H., Zhong Z., Zhou H.X., Deng C.Y., Zhu H., Li J.F., Wang X.L., Li F.R. A rapid and highly sensitive protocol for the detection of Escherichia coli O157:H7 based on immunochromatography assay combined with the enrichment technique of immunomagnetic nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. — 2011. V. 6. — P. 3033-3039.
7. Shen L., Laibinis P.E., Hatton T.A. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces // Langmuir. — 1998. V. 15. № 2. — P. 447-453.
8. Shim W.B., Choi J.G., Kim J.Y., Yang Z.Y., Lee K.H., Kim M.G., Ha S.D., Kim K.S., Kim K.Y., Kim C.H., Eremin S.A., Chung D.H. Enhanced rapidity for qualitative detection of Listeria monocytogenes using an enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatography strip test combined with immunomagnetic bead separation // J. Food Prot. — 2008. V. 71. № 4. — P. 781-789.
9. Xu Q., Xu H., Gu H., Li J., Wang Y., Wei M. Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I // Mater. Sci. Eng. C. — 2009. V. 29. № 3. — P. 702-707.

Рецензенты:

Ерёмин С.А., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией иммунохимических методов анализа кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, г.Москва.

Венгеров Ю.Ю., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А.Н.Баха РАН, г.Москва.