磁性纳米复合颗粒 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2的制备与修饰

郭雅飞[a,b] 王志飞[b] 李智洋[b] 何农跃[b*] 史智扬[c] 汪 华[c]
(东南大学[a]公共卫生学院; [b]分子电子学国家重点实验室 南京 210096; [c]江苏省疾病控制中心 南京)

摘 要 用三步合成法(共沉淀法、微乳液聚合、Stöber过程)制备了(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2磁性纳米颗粒,并在颗粒表面进行了醛基化修饰。用 TEM对不同工艺获得的颗粒形貌和结构进行了表征。结果表明,中间产物 Fe_3O_4/PVA复颗粒的平均尺寸为 100 nm,终产物(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2的尺寸在 100~500 nm范围内是可调的。醛基化的(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2对 BSA蛋白具有捕获能力,并且颗粒结合蛋白后具有一定的持久性和耐温性。

关键词 磁性复合颗粒,醋酸乙烯酯,微乳液聚合,Stöber反应,蛋白
中图分类号: O646 文献标识码: A 文章编号: 1000-0518(2008)09-1022-05

自从 Ugelstad等[1]首次用“活化溶胀法”制备了用于免疫分离的超顺磁性苯乙烯微球以来,有关制备超顺磁性有机或无机复合微球并将其应用到生物领域的研究中,如:生物细胞标记和分离[2]、靶向药物[3]、药物运输[1]、核酸浓缩[4]、固定蛋白和酶[5]、生化检验[6]等。随着特殊测试的需要,近来的研究主要集中在合成单分散的纳米球及通过 Lay-by-Lay技术制备各种各样的磁性纳米复合颗粒,包括磁性内核和高分子壳。磁性内核通常是由磁性纳米粒子(如 Fe_2O_3、Fe_3O_4、Co、Ni)组成,平均粒径一般不超过 30 nm[7~19]。磁性内核的存在使得复合颗粒便于从混合溶液中分离。高分子壳的材料有 PS(polystyrene)[7]、PEI(polyethylenimine)[8]、PEG(polyethylene glycol)[9,10]、poly(acrylamide)[11]、poly(N-isopropylacrylamide)[12]、extran[13]、chitosan[14]、PMMA(polymethylmethacrylate)[15]、PVA(polyvinyl alcohol)[16]等。高分子材料作为壳,可以减少磁性颗粒的毒副作用,改善颗粒表面的生物相容性,提高颗粒在有机组分中的稳定性。高分子包埋磁性纳米颗粒的最常见的方法是单体在颗粒表面原位聚合,形成核壳结构。包括分散聚合法[12]、乳液聚合法[17,18](包括微乳液聚合法和反相乳液聚合)、原子转移自由基聚合[19]。在制备磁性复合颗粒过程中存在很多影响因素,其中最主要的是与合成和组装有关的因素。例如,将颗粒尺寸减小到纳米尺寸通常会导致颗粒尺寸分布过宽;在颗粒表面修饰上亲水的 SiO_2层会降低颗粒的磁含量。近年来,一种高磁含量的纳米球用三步微乳液聚合制备,但使用这种方法合成的单个纳米球的磁含量不同。因此,探索新的方法制备超顺磁性球是非常必要的。本文探索了一种合成单分散纳米级的超顺磁性 Fe_3O_4/PVA微球新方法,结合改进的微乳液聚合和溶胶凝胶技术,即在微乳液聚合之后,将聚合产物经水解再采用溶胶凝胶技术在其表面包埋上 SiO_2。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

$FeCl_3\cdot 6H_2O$、$FeCl_2\cdot 4H_2O$、氨水、HCl、油酸、醋酸乙烯酯(VAc,经过减压蒸馏提纯)、十六烷基三甲氧基溴化铵(CTAB)、正丁醇、过氧化苯甲酰(BPO)、甲醇、无水乙醇、正硅酸乙酯(TEOS)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、25%戊二醛、Bradford蛋白测定试剂盒、$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$、$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$,以上试剂均为分析纯。JEM-200CX型透射电子显微镜(日本);UV-3150型紫外-可见分光光度计(日本岛津)。

1.2 Fe_3O_4/PVA磁性微球的制备

1.2.1 油酸-Fe_3O_4的制备 依照文献[20]方法,通 N_2气,将 23.5 g $FeCl_2\cdot 4H_2O$、8.6 g $FeCl_3\cdot 6H_2O$

2007-09-05收稿,2007-11-13修回
国家自然科学基金(60571032,90606027)和高等学校博士学科点专项科研基金(20050286014)资助项目
通讯联系人:何农跃,男,教授,博士生导师;E-mail: nongyue580210@yahoo.com.cn;研究方向:生物传感与纳米生物材料

溶解于 800 mL蒸馏水中, 加热回流, 当溶液温度至 90 ℃时, 在搅拌下快速将 30 mL氨水加入以上溶液中, 再加入 20 mL油酸, 90 ℃持续搅拌 1 h后停止, 待溶液冷却后用蒸馏水清洗数次, 将产物记为油酸-Fe_3O_4。

1.2.2 *微乳液法合成*　首先向安装有搅拌器、冷凝管、温度计及导气管的四口烧瓶中加入 100 mL水, 水浴加热回流后, 通 N_2气 20 min, 加入 0.3 g CTAB和 3 mL正丁醇, 搅拌使充分混匀, 再加入 10 mL含有 0.4 g油酸-Fe_3O_4纳米颗粒的 VAc混合溶液, 超声 20 min使充分混匀。当反应体系温度升高至 80 ℃时, 加入 0.5 g BPO, 反应 8 h。随着反应的进行, 液体的颜色由黑色变为红棕色。反应结束后, 利用外加磁场将产物 (记为 Fe_3O_4/PVAc)从溶液中分离出来, 用乙醇清洗 3次, 并且分散在 200 mL无水乙醇中。

以乙醇/水混合溶液为溶剂, 采用 Stöber方法对 Fe_3O_4/PVAc进行包埋, 为了使颗粒在溶剂中更好的分散, 需要对油溶性的颗粒 Fe_3O_4/PVAc做亲水性处理, 且 PVAc非常容易水解成亲水性的 PVA。颗粒的水解过程如下: 在以上分散体系中滴加 5 mL氨水, 加热回流 7 h, 结束反应。在外加磁场下分离产物, 用乙醇清洗 3次, 并分散在乙醇中, 将水解后的磁性颗粒标记为 Fe_3O_4/PVA。

1.3　(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2磁性微球的制备

(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2复合纳米颗粒的合成方法与 Stöber方法类似。首先将以上所得颗粒分散在 200 mL V(乙醇):V(水)=4∶1混合液中。将以上混合液超声 10 min, 使其均匀分散。再向溶液中加入不同量的 TEOS(加入的量决定了产物中 SiO_2壳的厚度), 搅拌 30 min。然后加入 0.5 mL氨水溶液, 室温下搅拌 3 h。最后将产物利用外加磁场进行分离, 再用乙醇清洗 3次后将其分散在无水乙醇中。

1.4　磁性颗粒的表面修饰

将 0.4 mL APTES滴加到上述 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2磁性微球的乙醇悬浮液里, 并在室温下搅拌 7 h。最后, 将 APTES修饰的磁性颗粒 (记为 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-APTES复合颗粒)利用外加磁场从反应介质中分离出, 并用乙醇溶液对其清洗 5次。

在修饰完 APTES后, 将 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-APTES复合颗粒加入到 50 mL质量分数为 3%戊二醛的 PB(0.1 mol/L的磷酸缓冲溶液)溶液中, 在 37 ℃下搅拌 3 h。在反应过程中通过氨基与醛基之间形成的 Schiff碱在磁性颗粒表面修饰上醛基官能团。反应结束后, 将颗粒 (((Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde)利用外加磁场从反应介质中分离出, 并用 PB溶液反复清洗产物。

1.5　磁性颗粒与 BSA蛋白偶联

为了验证所合成的纳米颗粒对蛋白质的吸附特异性, 本文考察了 3种磁性复合纳米颗粒 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2、(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-APTES和 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde对 BSA的捕获情况。用以上 3种颗粒分别捕获 2种质量浓度的 BSA(1.0和 0.1 g/L), 借助 Brandford蛋白测定试剂盒可以测出剩余的 BSA质量浓度, 最终计算出颗粒对 BSA的捕获能力和吸附效率。

对以上 3种捕获能力最强的 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde进行了长久性和耐温性试验。将捕获有 BSA的 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde分散在一定的 PBS溶液中, 然后在一定的时间和一定温度下用 Brandford蛋白测定试剂盒测定溶液中蛋白含量。如果溶液中没有含蛋白, 可以认为, 捕获蛋白的颗粒具有一定的长久性和耐温性。

2　结果与讨论

2.1　合成 Fe_3O_4/PVAc纳米颗粒

图 1(a)为用经典的共沉淀法制备的 Fe_3O_4的 TEM。从图中可以看出, 颗粒尺寸在 10 nm左右, 且比较均匀。图 1(b)为合成的磁性纳米高分子微球 Fe_3O_4/PVAc的 TEM图。由图上可以看出, 在每一个球体中, Fe_3O_4微球被均匀地包埋在 VAc聚合物壳之中。乳液聚合可有效地将憎水的材料包埋入聚合物里从而获得复合材料。增强微乳液稳定的方法是加入一种不溶于水的助表面活性剂和一种与单体互溶的化合物 (如十二烷醇、十六烷醇等)。但在乳液聚合中, 助表面活性剂能够充分减小油相从小液滴到大液滴的扩散速度。在实验中用这种方法将亲水的 Fe_3O_4包埋进聚合物中。为了使包埋成功, 本研究中首先将 Fe_3O_4修饰上油酸使其能够分散在油溶性 VAc里面。正丁醇作为一种助表面活性剂降低了液滴的吉布

斯自由能,从而降低了扩散的阻力[18]。另外,超声处理使得单体微液滴里含有 Fe_3O_4,从而使微乳液非常稳定。实验中选用憎水的 BPO作引发剂,它在微液滴中起重要作用。聚合过程与本体聚合发生在每一个单体液滴中相似,聚合之后,磁性聚合物颗粒的平均尺寸为 100 nm。

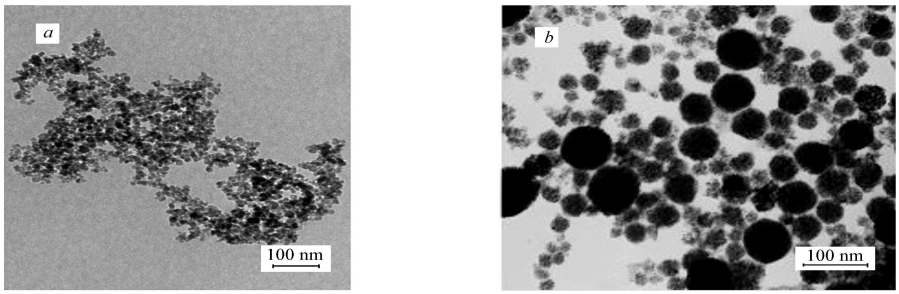

图 1 纳米颗粒的 TEM照片

Fig. 1 TEM images of nanoparticles

a: oleic acid-Fe_3O_4; b: Fe_3O_4/PVAc

本文采用文献[20]方法控制粒子尺寸和尺寸分布。(1)聚合反应的发生中烧瓶是用 4个垂直的不锈钢架固定的,因此机械搅拌的强度可以显著增强,使单体液滴能够分散更加均匀;(2)加热方式采用程序升温。在 45~60 ℃的温度范围内有一个较长时间的停留,对液滴的单分散非常有利,否则反应体系会出现分层现象。

2.2 TEOS量对 SiO_2壳层厚度的影响

(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2复合纳米颗粒是利用 Stöber法合成的,具有明显的核壳结构,如图 2所示。颗粒的尺寸是通过改变正硅酸乙酯的浓度来控制,随着正硅酸乙酯浓度的增大而增大。另外,反应中氨水是一种催化剂,其浓度的大小对反应过程有着重要的影响,浓度太小反应需要的时间较长(反应 1 h后才会有产物生成)。

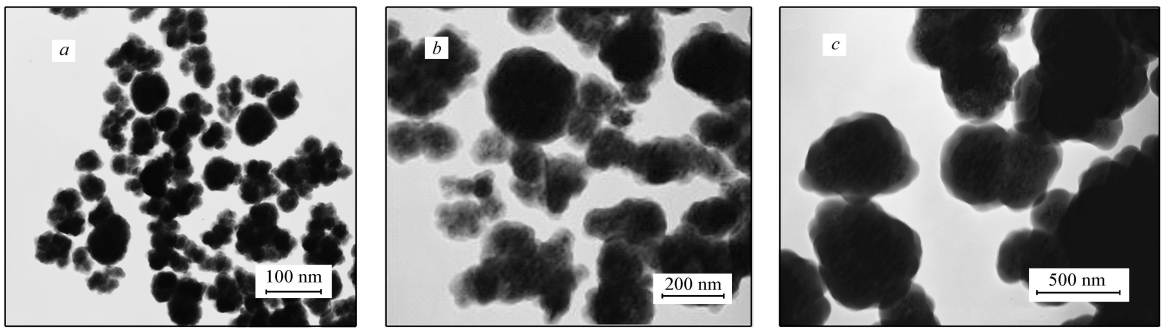

图 2 不同 TEOS用量制得的(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2颗粒 TEM照片

Fig. 2 TEM images of (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2 prepared with different amounts of TEOS

V(TEOS)/mL: a: 0.4; b: 1.2; c: 2. The same condition for all preparations: 0.5 mL ammonia

2.3 磁性颗粒与蛋白偶联

从表 1可以看出,在同一蛋白质量浓度下,(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2、(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-APTES和(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde3种磁性复合颗粒对 BSA蛋白的吸附能力依次增加。说明醛基化的磁性颗粒对 BSA蛋白的捕获能力最强,表明醛基修饰的磁性纳米复合颗粒在实际的免疫分析应用中,可能对蛋白质目标物具有更好的捕获与分离效率。

为了进一步考查醛基修饰的磁性纳米复合颗粒在实际应用中的长效性和稳定性,本文进一步考察了不同时间和不同温度下醛基化磁性纳米复合颗粒捕获 BSA后随着保存时间与保存温度的变化。

表 1　不同磁性颗粒对 BSA的吸附量和效率

Table 1　Adsorption capacity and efficiency of different kinds of magnetic nanoparticles for BSA

Particles	ρ(BSA)/(g·L^{-1})		Adsorption capacity/(mg·g^{-1})	Adsorption efficiency/%
	Initial	Final		
(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2	1	0.699	2	30.1
	0.1	0.071	0.197	29
(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-APTES	1	0.581	2.79	41.9
	0.1	0.064	0.24	36
(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde	1	0.445	3.70	55.5
	0.1	0.028	0.48	72

按照本文 1.5节完成上述 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde对 BSA的捕获实验后, 弃上清液, 将复合颗粒分散在适量的 PBS溶液中, 保存在 -20 ℃冰箱中。然后分别于 1 d和 7 d取出一部分, 用 Bradford试剂盒测定溶液的 BSA含量。结果如表 2所示。表中可见, 在不同时间下, 磁性颗粒的 PBS溶液中的蛋白含量是相对稳定的, 表明所制备的醛基修饰磁性纳米复合颗粒及其修饰或捕获蛋白质后可较长时间储存备用。

表 2　保存时间对捕获的 BSA牢固性的影响

Table 2　Effect of storage time on the firmness of captured BSA on (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde

ρ(Group)/(g·L^{-1})	ρ(BSA)/(g·L^{-1})	
	at first day	at 7th day
1	0.005	0.006
0.1	0.004	0.004

在 -20 ~ 37 ℃范围内, 测定 (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde的 PBS溶液中 BSA蛋白的浓度, 如表 3所示。表中可见, 在不同温度下 (-20 ~ 37 ℃), 磁性颗粒的 PBS溶液中的蛋白含量相对稳定, 表明所制备的醛基修饰的磁性纳米复合颗粒及捕获蛋白后的储存温度可能对捕获蛋白的结合稳定性没有明显影响。

表 3　耐温性试验结果

Table 3　Results of thermal resistance of captured BSA on (Fe_3O_4/PVA)/SiO_2-glutaraldehyde

10^3 ρ(Group)/(g·mL^{-1})	ρ(BSA)/(mg·L^{-1})				
	-20 ℃	4 ℃	15 ℃	25 ℃	37 ℃
1	2.6	1.3	3.9	2.0	3.3
0.1	2.6	3.3	2.6	5.2	2.6

参 考 文 献

1 Ugelstad J, Berge A, Ellingsen T, Schmid R, Nilsen T N, Mork P C, Stenstad P, Hornes E, Olsvik Ø. Prog Polym Sci [J], 1992, **17**: 87

2 Yeh T C, Zhang W, Ldstad S T, Magn Reson Med [J], 1993, **30**: 617

3 Gupta P K, Hung C T, Life Sci [J], 1989, **44**: 175

4 Elaissari A, Rodrigue M, Meunier F, Herve C, J Magn Magn Mater [J], 2001, **225**(1-2): 127

5 Halling P J, Dunnill P, Enzyme Microbiol Tech [J], 1980, **2**: 2

6 Kronick P, Gilpin R W, J Biochem Biophys Methods [J], 1986, **12**: 73

7 Chatterjee J, Haik Y, Chen C J, J Magn Magn Mater [J], 2001, **225**: 21

8 Shouheng Sun, Simone Anders, Hendrik F Hamann, Jan-U Thiele, Baglin J E E, Thomas Thomson, Eric E Fullerton, Murray C B, Bruce D Terris, J Am Chem Soc [J], 2002, **124**(12): 2884

9 Takeshi Mihama, Takayuki Yoshimoto, Kinko Ohwada, Katsunobu Takahashi, Shinichi Akimoto, Yuji Saito, Yuji Inada, J Biotechnol [J], 1998, **7**: 141

10 Butterworth M D, Illum L, Davis S S, Colloids Surf A [J], 2001, **179**: 93

11 Manju G N, Anoop Krishnan K, Vinod V P, Anirudhan T S. J Hazard Mater[J], 2002, **91**: 221
12 Ding X B, Sun Z H, Wan G X, Jiang Y Y. React Funct Polym[J], 1998, **38**(1): 11
13 Molday R S, Mackenzie D J. Immunol Methods[J], 1982, **52**: 353
14 An X, Su Z J. Appl Polym Sci[J], 2001, **81**: 1 175
15 Gass J, Poddar P, Almand J, Srinath S, Srikanth H. Adv Funct Mater[J], 2006, **16**: 71
16 Müller-Schulte D, Brunner H J. J Chromatogr[J], 1995, **711**: 53
17 Liu X Q, Guan Y P, Ma Z Y, Liu H Z. Langmuir[J], 2004, **20**(23): 10 278
18 Deng Y, Wang L, Yang W, Fu S, Elaissari A. J Magn Magn Mater[J], 2003, **257**(1): 69
19 Li G F, Fan J D, Jiang R, Gao Y. Chem Mater[J], 2004, **16**(10): 1 835
20 Ma Z Y, Guan Y P, Liu X Q, Liu H Z. Langmuir[J], 2005, **21**(15): 6 987

Synthesis and Modification of Superparamagnetic Nanocompositions $(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2$

GUO Ya-Fei[a,b], WANG Zhi-Fei[b], LI Zhi-Yang[b], HE Nong-Yue[b*], SHI Zhi-Yang[c], WANG Hua[c]
([a] School of Public Health, [b] State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096;
[c] Jiangsu Disease Prevention and Control Center, Nanjing)

Abstract Nanocompositions $(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2$ have been prepared by three-step method (co-precipitation, miniemulsion polymerization, Stöber process) and structurally characterized by TEM. According to the image of $Fe_3O_4/PVA/SiO_2$ by TEM, the morphology is obviously core-shell structure; the average diameter of $Fe_3O_4/PVAc$ is 100 nm; the diameter of $(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2$ is controllable within a certain range (100 ~ 500 nm). And $(Fe_3O_4/PVA)/SiO_2$-glutaraldehyde can capture BSA within a certain time at a certain temperature.

Keywords magnetic nanocomposition; VAc; miniemulsion polymerization; Stöber method; protein