

СИНТЕЗ ТА ФІЗИКО–ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОКОМПОЗИТІВ НА ОСНОВІ МАГНЕТИТУ, МОДИФІКОВАНОГО МЕЗО-2, 3-ДИМЕРКАПТОСУКЦИНОВОЮ КИСЛОТОЮ

Д.Г. Усов, А.Л. Петрановська, М.П. Турелик,
О.М. Кордубан, П.П. Горбик

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164*

Розроблено методику хімічного модифікування поверхні одnodоменного магнетиту тiольними групами та досліджено характеристики наноколоїдних магнітних суспензій на їх основі. Фізико-хімічними методами (РФС і ІЧ спектроскопія) показано наявність дисульфідних містків та SH-груп на модифікованій поверхні. Методом титрування визначено кількісний вміст -SH груп (19 мкмоль/м^2). Методом динамічного світлорозсіювання визначено дзета-потенціал ($-40,3 \text{ мВ}$) та середній розмір ($40,5 \text{ нм}$) частинок магнітних суспензій.

Вступ

В останні роки актуальними напрямками досліджень є розроблення магніточутливих засобів для спрямованого транспорту лікарських та діагностичних препаратів і магнітної сепарації клітин. Для створення моделей таких засобів використовують магнітні нанорозмірні частки. Крім питань вибору оптимального магнітного матеріалу, розміру та форми наночастинок необхідно вирішити також задачі з колоїдної стабілізації у водному середовищі, надання біосумісних властивостей поверхні носіїв, введення функціональних груп для приєднання лікарських або діагностичних препаратів, а також сенсорних молекул, стабілізації поверхні з метою запобігання можливому окисненню.

Розв'язок вказаних задач полягає у створенні оболонок навколо магнітних наночастинок. Матеріалами для оболонок можуть бути, наприклад, низько- або високомолекулярні речовини органічної (природні та синтетичні полімери), неорганічної (оксиди кремнію та титану) або органо-неорганічної природи (полісилоксани). Використання *in vivo* неорганічних та органо-неорганічних матеріалів, що утворюють міцні ковалентні сітки, може бути небажаним завдяки їх низькій здатності до біодеградування та можливій токсичності. Створення оболонок з полімерних матеріалів є непростю задачею, оскільки високомолекулярні сполуки викликають агрегацію наночастинок у розчині. Таким чином можна зробити висновок про необхідність досліджень оболонок, що складаються з низькомолекулярних органічних речовин.

Прикладом таких сполук є жирні кислоти, наприклад, олеїнова [1], яка надає магнітним суспензіям стабільності за стеричним механізмом, багатоосновні кислоти, такі як лимонна [2, 3] та фосфорна [4] кислоти, які електростатично стабілізують магнітні частинки у водних розчинах. Крім того, існують багато органічних ди-, три- та полідентантних лігандів, таких як етилендіамінтатраоцтова кислота, здатних утворювати стійкі комплексні сполуки з йонами важких металів [5, 6]. Деякі з цих лігандів застосовуються для введення в організм йонів важких металів, їх виведення у випадках отруєння, а також як контрастуючі агенти для діагностичних цілей [7].

Для створення оболонок навколо магнітних наночастинок перспективними є сполуки, що містять у своєму складі тиольні групи, оскільки останні здатні до оборотного утворення дисульфідних містків, що може значно підвищувати міцність покриттів. Прикладом сполуки, що може виступати в ролі ліганду та містить тиольні групи, є 2, 3-димеркаптосукцинова кислота (DMSA).

Відомо використання DMSA антидоту для зв'язування та виведення з організму іонів важких металів завдяки здатності приєднуватись до них шляхом утворення іонних зв'язків двома карбоксильними групами. Наявність тиольних груп, в свою чергу, полегшує виведення з організму DMSA та сполук на її основі завдяки здатності утворювати дисульфідний місток з залишками цистеїну, що містяться в молекулах білків крові [7]. Молекула DMSA містить дві тиольні групи в одній молекулі, що є перевагою при формуванні покриттів для магнітних наночастинок, оскільки дозволяє додатково зміцнити первинний адсорбційний шар, перетворюючи його в полімер шляхом формування дисульфідних містків між адсорбованими молекулами [7, 8, 9]. Оскільки ця реакція є оборотною, так само як і попередня стадія адсорбції, утворене покриття є здатним до біодеструкції. Крім того, наявність тиольних груп сприяє виведенню DMSA з організму завдяки здатності утворювати дисульфідний місток з цистеїном, а отже приєднуватись до молекул білків, у складі яких є відповідний амінокислотний залишок [7]. Покриття, утворене за допомогою DMSA, містить як тиольні, так і карбоксильні групи, і обидва типи груп можуть бути використані для ковалентного приєднання сенсорних молекул та лікарських препаратів [8, 10]. Отже, покриті DMSA частинки є бажаним носієм у медико-біологічних дослідженнях. Деякі дослідження [11] *in vivo* кінетики покриття клітинної мембрани магнітними наночастинами з оболонками, утвореними на основі DMSA, підтверджують підвищення (до 32,5%) ступеню їх фагоцитозу клітинами імунної системи (макрофагами та нейтрофілами).

Методи досліджень

Методика синтезу:

Наважки 0,249 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ та 0,751 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ було розчинено в 11,4 мл дистильованої води в реакторі, в якому було створено азотну атмосферу. Температуру розчину було доведено до 80°C і при перемішуванні до нього було повільно прилито 1,4 мл 25 % водного розчину амоніаку. Спостерігалось випадіння чорного осаду Fe_3O_4 . Після цього до реакційної суміші було додано суспензію 0,29 г мезо-2,3-димеркаптосукцинової кислоти (DMSA) в 2 мл води, і температуру суміші було піднято до 94°C на 30 хв (слід зауважити, що в окремому досліді було показано, що DMSA не розчиняється в концентрованому розчині амоніаку). Спостерігався швидкий перехід чорного осаду в добре стабілізовану водну суспензію з утворенням червонуватого забарвлення. Після цього, реакційну суміш було поміщено в діалізний мішок і проведено її діаліз проти 3 порцій по 2 л дистильованої води. При діалізі проти першої порції води, червонувате забарвлення перейшло з середини діалізного мішку в розчин навколо нього і поступово перетворилося на жовте. Наступні порції води під час діалізу залишалися безбарвними.

Характеристики наноколоїдних магнітних суспензій досліджувались фізико-хімічними методами:

- ІЧ-Фур'є-спектроскопії на спектрофотометрі "Perkin Elmer" (модель 1720X) в діапазоні $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$;
- рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (РФС) на електронному спектрометрі ЕС-2402 з енергоаналізатором PHOIBOS-100_SPECS ($E_{\text{MgK}\alpha} = 1253,6\text{ eV}$, $P = 200\text{ Вт}$, $P = 2 \cdot 10^{-7}\text{ Па}$). Спектрометр оснащений іонною гарматою IQE-11/35 і гарматою повільних електронів FG-15/40 для компенсації зарядки поверхні діелектриків. Спектри S2p- рівнів було розкладено на незалежні компоненти, їх ширина на поло-

вині висоти складала $\Delta E = 0.9$ еВ. Розкладання проводилось методом Гауса-Ньютона. Площа компонент визначалась після вирахування фону за методом Ширлі [12];

Кількісний аналіз функціональних SH-груп.

Наважку одержаного нанокompозиту (0,03 г) вносили у конічну колбу та розчиняли у 20 мл диметилсульфоксиду. Далі додавали 50 мл 0,1н розчину йоду. Паралельно готували контрольний розчин. Суміш ретельно перемішували, давали постояти деякий час для забезпечення повноти реакції. Надлишок йоду титрували 0,1 н розчином тіосульфату натрію у присутності крохмалю.

Вміст тіольних груп (у %) розраховували за формулою:

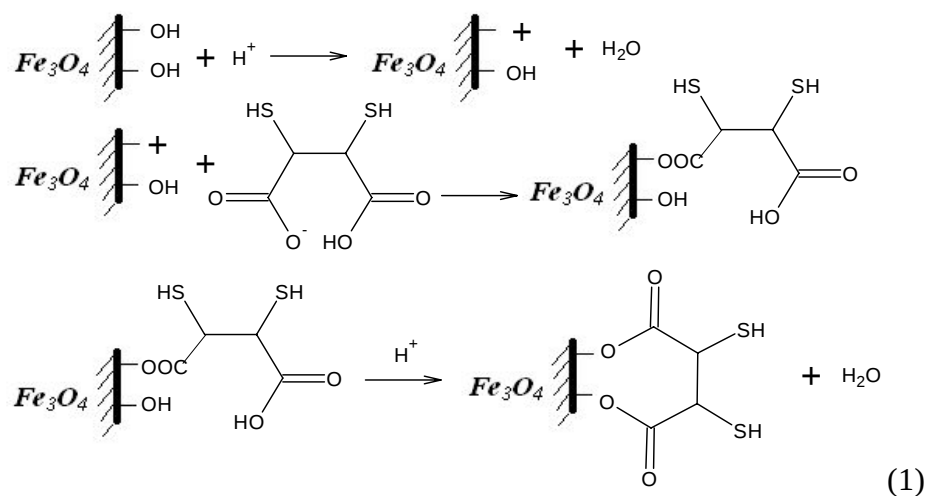
$$(V_{\text{хол.}} - V_0) NM \cdot 100 / g \cdot 1000,$$

де $V_{\text{хол.}}$ та V_0 – об'єми розчинів тіосульфату натрію, яких було витрачено на титрування контрольного розчину та проби відповідно, мл; N – нормальність розчину тіосульфату натрію; M – мольна маса тіолу; g – наважка нанокompозиту, г.

Визначення дзета-потенціалу та середнього розміру частинок утвореної магнітної рідини здійснювали за допомогою динамічного світлорозсіювання на приладі Zetasizer компанії Malvern, Великобританія. Було проведено виміри розподілу частинок магнітної рідини Fe_3O_4 - DMSA / вода за дзета-потенціалом.

Результати та обговорення

Для надання наночастинкам магнетиту гідрофільних властивостей та біосумісності, проведено модифікування його поверхні *мезо*-2,3-димеркаптосукциновою кислотою. DMSA приєднується до оксиду заліза шляхом утворення зв'язку карбоксильної групи з катіонами металу за реакцією:



DMSA спочатку формує стабільне покриття шляхом карбоксо-хелатного зв'язування, подальша стабілізація лігандної оболонки досягається при утворенні міжмолекулярних дисульфідних зв'язків між ланцюгами лігандів при умовах омивання. Міжмолекулярні дисульфідні зв'язки поверхнево зв'язаної DMSA підвищують стабільність покриття. Одержаний водний золь наночастинок, покритих DMSA є стабільним у широких межах рН (3-11), у фосфатних буферних системах без агрегації. Вільні карбоксильні групи надають наночастинці гідрофільних властивостей. Незв'язані карбоксильні та тіольні групи можуть використовуватись для ковалентної посадки біологічних лігандів. Приєднання на поверхню, покриту DMSA, молекули, що містить дисульфідні зв'язки, проходить шляхом окисно-відновних реакцій.

ІЧ спектроскопічне дослідження.

Для підтвердження наявності зв'язку DMSA з поверхнею магнетиту, було проведено ІЧ-Фур'є спектроскопічні дослідження покриття наночастинок за допомогою Фур'є-спектрометра.

На рис. 1 представлено спектри магнетиту, нанокompозиту з DMSA поверхнею та DMSA.

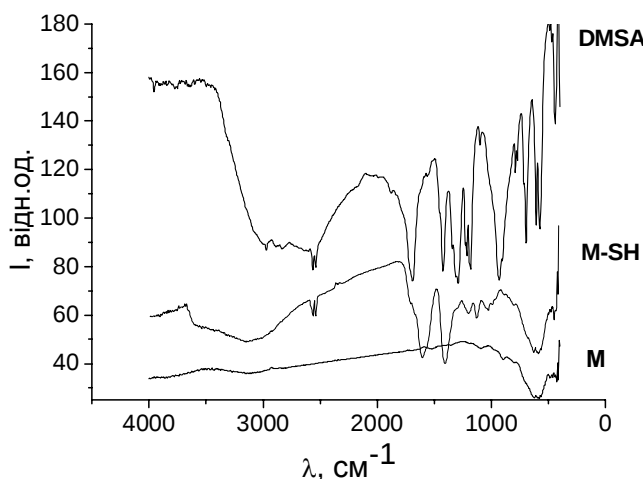


Рис. 1. ІЧ-спектри магнетиту (М), нанокompозиту з поверхнею DMSA (М-SH) та 2,3-димеркаптосукцинової кислоти (DMSA).

На спектрі нанокompозиту з DMSA, наявні три основні групи смуг при ~ 550 cm^{-1} , (~ 1400 cm^{-1} та ~ 1630 cm^{-1}) та (2505 cm^{-1} і 2510 cm^{-1}), що відповідають відповідно S – S, C = O та S – H зв'язкам у DMSA покритті на поверхні магнетиту та підтверджують наявність оболонки. Не зважаючи на те, що характеристична смуга S – S перекривається зі смугою Fe – O при 593 та 606 cm^{-1} , незначний зсув у бік більш слабкої енергії та підвищення інтенсивності піку при 550 cm^{-1} на ІЧ-спектрі є свідченням утворення S – S зв'язку між молекулами DMSA [8].

Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія:

РФ-спектри S2p-рівнів наночастинок магнетиту з оболонкою DMSA та зразку порівняння DMSA як результати розкладання спектрів на компоненти представлено на рис. 2, а, б та в табл. 1. Як видно з рис. 2, в спектрах вихідного DMSA присутні сигнали від трьох нееквівалентних станів іонів сірки. Домінуюча компонента в області $E_{3\phi}=163,7$ eV відповідає фрагменту зв'язку H-S-C у DMSA [12]. Компоненти з $E_{3\phi}=163,0$ eV та $E_{3\phi}=164,3$ eV можна співвіднести зі сполуками проміжних етапів синтезу DMSA як основної речовини.

За результатами розкладання на компоненти спектра поверхні модифікованого магнетиту видно (рис. 2, а), що кількість і співвідношення компонент в порівнянні з вихідним зразком DMSA практично не змінюються. Це однозначно вказує на формування на поверхні магнетиту шару саме з DMSA. Відмінністю є присутність в області $E_{3\phi}=168,4$ eV слабого сигналу ($\sim 4\%$), який можна пов'язати з присутністю незначних слідів розчинника DMSO. Враховуючи, що $E_{3\phi}$ S2p-рівня атомів сірки в фрагменті -S-S- [12] знаходиться в тій же області енергій, що і для фрагменту -SH в DMSA, зафіксувати зміну вкладів двох нееквівалентних станів атому сірки не можливо.

Кількісний аналіз SH-груп:

Хімічні методи визначення функціональних груп в органічних сполуках широко застосовуються, незважаючи на розвиток інструментальних методів аналізу. Загальним принципом традиційних хімічних методів є використання характерних реакцій для певних функціональних груп. Реакція повинна бути не тільки найбільш специфічною, а і достатньо швидкою. Реагенти, які приймають участь у реакції і продукти реакції повинні легко визначатися. Найбільш застосовуються реакції, які утворюють наступні реагенти

чи продукти: кислоти, луги, окисники, відновники, гази, воду, іони металів, малорозчинні чи кольорові сполуки, комплекси.

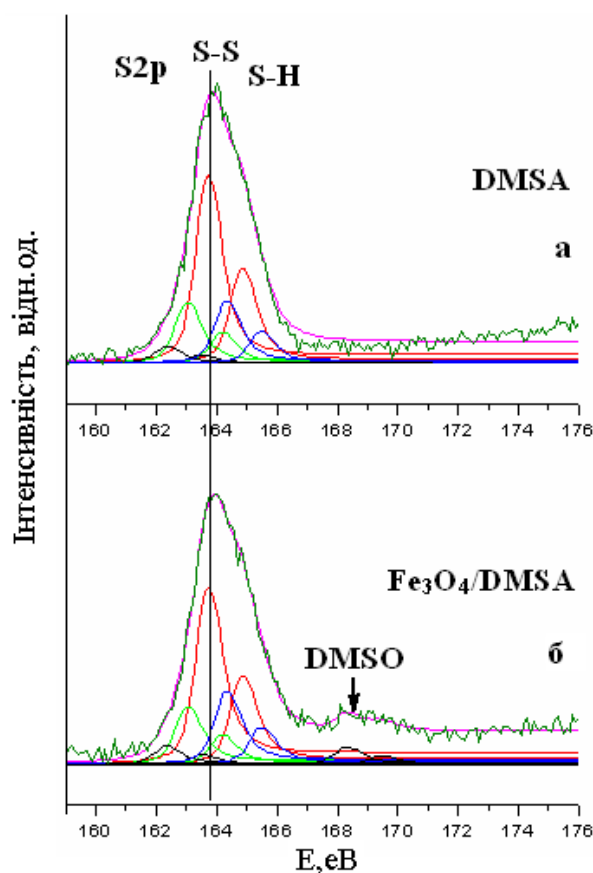
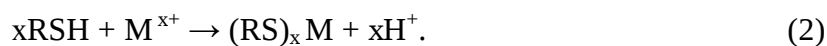


Рис. 2. Розкладені на компоненти S2p-спектри зразків нанокompозиту з оболонкою DMSA (a) та DMSA (б).

Таблиця 1. Енергії зв'язку ($E_{зв}$, eV) максимумів компонент S2p-спектрів та інтегральні інтенсивності компонент I (%).

$E_{зв}$ S2p-, eV	$I_{Fe_3O_4/DMSA}$, %	I_{DMSA} , %
162,3	5,27	4,97
163,0	16,68	18,47
163,7	51,81	57,5
164,3	21,39	19,06
168,3	4,85	-

Тіоли можна розглядати як похідні сірководню, в якому заміщено один атом водню, тому їх реакції повинні бути аналогічні реакціям сірководню. Наприклад, метали заміщують водень у тіольній групі:



Існує декілька методів для кількісного визначення -SH груп, а саме, аргенометричний метод, який включає потенціометричне, амперометричне та алкаліметричне титрування та методи засновані на окисненні, це окиснення йодом та іоном міді. В даній роботі був вибраний метод титрування, заснований на окисненні, метод Кимболла, Крамера і Ріда, який ґрунтується на реакції:



Аналіз показав, що кількість SH-груп у нанокompозиті дорівнює 2,4 ммоль/г. При $S_{num.}=130 \text{ м}^2/\text{г}$, кількість SH-груп становить 19 мкмоль/м².

Також, для порівняння, проводили кількісне вимірювання SH-груп у DMSA. Концентрація SH-груп у DMSA складає 17 ммоль/г.

Вимірювання дзета-потенціалу та середнього розміру частинок утвореної магнітної рідини:

Найважливішими характеристиками магнітної рідини та будь-якої дисперсної системи є розмір частинок та дзета-потенціал. Дзета-потенціал є важливою характеристикою високодисперсних систем, що визначає можливість та швидкість переміщення дисперсної фази відносно дисперсійної фази, інтенсивність електрокінетичних явищ та стійкість золів до деструкції дисперсних систем електролітами.

Досліджувались дзета-потенціал та середній розмір частинок утвореної магнітної рідини за допомогою динамічного світлорозсіювання. Було проведено 2 виміри розподілу частинок магнітної рідини Fe₃O₄ - DMSA/ вода за дзета-потенціалом, результати яких приведено у табл. 2 та рис. 3.

Таблиця 2. Дзета - потенціал та z - усереднений розмір частинок магнітної рідини Fe₃O₄-DMSA/вода згідно даних світлорозсіювання

Дзета-потенціал, мВ	-40,3
Ширина розподілу за дзета-потенціалом, мВ	9,84
Провідність зразка, мС/см	0,129
z - усереднений діаметр часток, нм	40,5

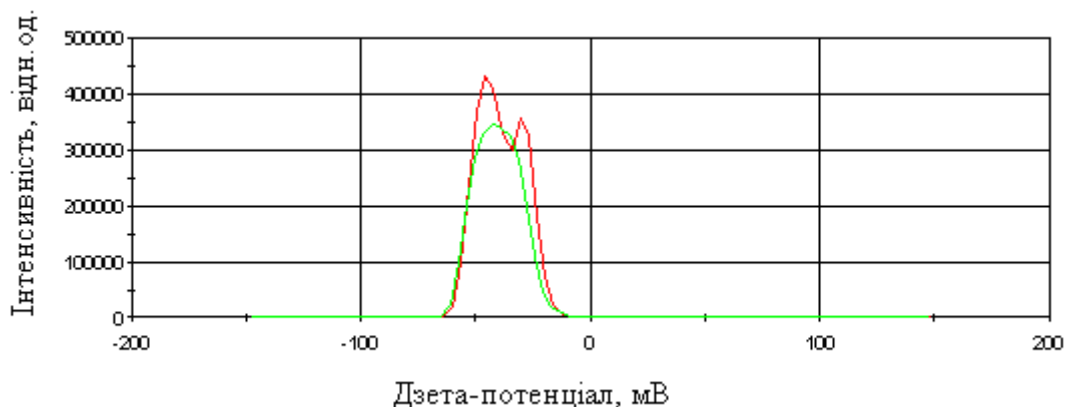


Рис. 3. Розподіл частинок магнітної рідини Fe₃O₄ - DMSA / вода за дзета-потенціалом згідно даних світлорозсіювання.

Методом динамічного світлорозсіювання досліджували розподіл частинок магнітної рідини Fe₃O₄-DMSA/вода залежно від кількості частинок (рис. 4, а) та від інтенсивності розсіювання (рис. 4, б). Було проведено 4 виміри, результати яких показано на графіках.

Рис. 4, а показує розміри найдрібніших частинок, тоді як рис. 4, б позначає також наявність агрегатів, фракція яких є невелика за чисельністю, але вони помітні, оскільки інтенсивність динамічного світлорозсіювання дуже сильно зростає із збільшенням розміру частки.

Для підтвердження властивостей поверхневого заряду проведено вимірювання дзета-потенціалу магнітних наночастинок у водному середовищі при рН = 7. Результат свідчить, що частинки мають високий від'ємний потенціал при такому значенні рН завдяки сильному електростатичному відштовхуванню, яке перешкоджає агрегації час-

тинок у водному середовищі. При зростанні pH, дзета-потенціал зменшується за рахунок підвищення ступеню іонізації COOH- та SH- функціональних груп [10].

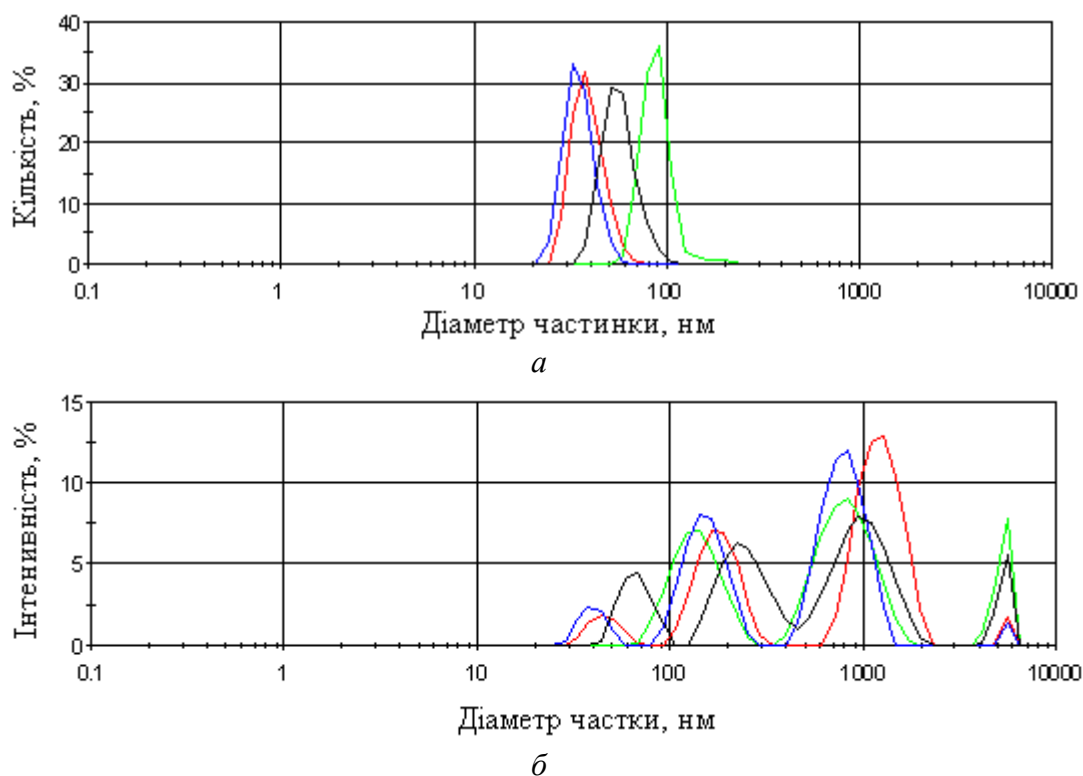


Рис. 4. Розподіл частинок магнітної рідини Fe₃O₄-DMSA/вода згідно даних динамічного світлорозсіювання, *a* – залежно від кількості частинок, *б* – від інтенсивності розсіювання.

Розроблена методика синтезу нанокомпозитів на основі магнетиту має перспективу застосування при виготовленні медико-біологічних нанокомпозитів з функціями розпізнавання мікробіологічних об'єктів внаслідок іммобілізації антитіл.

Висновки

З метою створення імуномагнітних наносорбентів та нанокомпозитів з функціями розпізнавання мікробіологічних об'єктів в біологічних середовищах розроблено методику хімічного модифікування поверхні однодоменного магнетиту тільними групами та досліджено характеристики наноколоїдних магнітних суспензій на їх основі.

Методами РФС та ІЧ спектроскопії доведено наявність дисульфідних містків та SH-груп модифікованої поверхні.

Методом титрування визначено кількісний вміст функціональних SH-груп (19 мкмоль/м²).

Методом динамічного світлорозсіювання визначено дзета-потенціал (-40,3 мВ) та середній розмір (40,5 нм) частинок магнітних суспензій.

Література

1. Controlled synthesis of different types iron oxides nanocrystals in paraffin oil / H. Si, C. Zhou, H. Wang et al. // J. Colloid Interface Sci. – 2008. – V. 327. – P. 466 – 471.
2. Răcuciu M., Creanga D.E., Calugaru G. Synthesis and rheological properties of an aqueous ferrofluid // J. Optoelectronics and Adv. Mater. – 2005. – V. 7, № 6. – P. 2859 – 2864.

3. Polyelectrolyte Stabilized Nanowires from Fe₃O₄ Nanoparticles via Magnetic Field Induced Self-Assembly / R. Sheparovich, Y. Sahoo, M. Motornov et al. // Chem. Mater. – 2006. – V. 18. – P. 591 – 593.
4. Magnetic order in gamma-Fe₂O₃ nanoparticles: a XMCD study / S. Brice-Profeta, M.A. Arrio, E. Tronc, et. al // J. of Magnetism and Magnetic Mater. – 2005. – V. 288. – P. 354 – 365.
5. Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides / A. Gorden, J. Xu, K.N. Raymond, P. Durbin // Chem. Rev. – 2003. – V. 103, № 11. – P. 4207 – 4282.
6. Liu S., Edwards D. Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals // Bioconjugate Chem. – 2001. – V. 12, № 1. – P. 7 – 34.
7. Aposhian H., Aposhian M. Meso-2,3-Dimercaptosuccinic acid: Chemical, Pharmacological and Toxicological Properties of an Orally Effective Metal Chelating Agent // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1990. – V. 30. – P. 279 – 306.
8. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging / Y.-W. Jun, Y.-M. Huh, J. Choi et al. // J. Am. Chem. Soc. – 2005. – V. 127. – P. 5732 – 5733.
9. Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid / N. Fauconnier, J. Pons, J. Roger, A. Bee // J. Colloid Interface Sci. – 1997. – V. 194. – P. 427 – 433.
10. Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays / S. Zhang, Z. Bian, C. Gub et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2007. – V. 55. – P. 143 – 148.
11. Kinetic of magnetic nanoparticles uptake evaluated by morphometry of mice peritoneal cells / L. Silva, S. Kuckelhaus, M. Guedes et al. // J. Magnetism and Magnetic Mater. – 2005. – V. 289. – P. 463 – 465.
12. Wagner D., Moulder J., Davis L. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy // Perking-Elmer Corp, New York. – 1979. – P. 234.

SYNTHESIS AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF NANOCOMPOSITES ON THE BASE OF MAGNETITE, MODIFIED BY MESO-2,3-DIMERCAPTOSUCCINIC ACID

D.G. Usov, A.L. Petranovskaya, M.P. Turelyk, O.M. Korduban, P.P. Gorbyk

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164, ayravata@gmail.com.*

The method of monodomain magnetite surface chemical modifying by the thiol groups has been developed and the characteristics of nanocolloid magnetic suspensions on the base of it have been researched. The presence of disulfide bonds and SH-groups on the modified surface has been proved due to physico-chemical methods (RPS and IR spectroscopy). The amount of functional SH-groups (19 $\mu\text{mole/m}^2$) has been measured by the iodometric titration. By the dynamic light-scattering zeta-potential (-40.3mV) and average size (40.5 nm) of magnetic suspension particles have been measured.

СИНТЕЗ И ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ МАГНЕТИТА, МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕЗО-2, 3- ДИМЕРКАПТОСУКЦИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

**Д.Г. Усов, А.Л. Петрановская, М.П. Турелик, О.М. Кордубан,
П.П. Горбик**

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко АН Украины, ул. Генерала Наумова
17, 03164 Киев-164, Украина, e-mail: ayravata@gmail.com.*

Разработана методика химического модифицирования поверхности однодоменного магнетита тиольными группами и исследованы характеристики нанокolloидных магнитных суспензий на их основе. Физико-химическими методами (РФС и ИК спектроскопии) доказано наличие дисульфидных мостиков и SH-групп на модифицированной поверхности. Иодометрическим титрованием определено количественное содержание функциональных SH- групп (19 мкмоль/м²). Методом динамического светорассеивания измерены дзета-потенциал (- 40,3 мВ) и средний размер (40,5 нм) частиц магнитных суспензий.