

PRIPRAVA NANOKOMPOZITA ZA BIOMEDICINSKE APLIKACIJE

PREPARATION OF NANO-COMPOSITES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Stanislav Čampelj¹, Darko Makovec¹, Luka Škrlep², Miha Drofenik^{1,3}

¹Odsek za sintezo materialov, Institut "Jožef Stefan", Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

²Zavod za gradbeništvo Slovenije, Dimičeva 12, 1000 Ljubljana, Slovenija

³Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Smetanova ul. 17, SI-2000 Maribor, Slovenija
stanislav.campelj@ijs.si

Prejem rokopisa – received: 2007-11-23; sprejem za objavo – accepted for publication: 2008-04-24

Kompozitni nanodelci, ki vsebujejo superparamagnetno maghemitno jedro, prevlečeno s tanko plastjo amorfnega silicijevega oksida so zelo obetaven material za uporabo v medicini. Magnetno jedro omogoča manipulacijo z delci z zunanjim magnetnim poljem, medtem ko plašč amorfnega silicijevega oksida omogoča vezavo različnih molekul na njihovo površino. Vezava različnih organskih molekul, na primer zdravilnih učinkovin, zahteva pripravo nanodelcev, ki imajo na površini sloj funkcionalizacijskih molekul z različnimi funkcionalnimi skupinami.

Funkcionalizacijo nanodelcev smo dosegli s kovalentno vezavo različnih silanskih molekul: (3-aminopropil)trietoksisilan (APS) in viniltrietoksisilan (VTS), na njihovo površino. Reakcija je potekla v mešanici etanola, v katerem je bila predhodno raztopljena izbrana silanska molekula, in stabilne vodne suspenzije kompozitnih nanodelcev. Vezavo različnih silanskih molekul na površino nanodelcev smo spremljali z elektrokinetičnimi meritvami in s konduktometrično meritvijo koncentracije molekul na njihovi površini. Izkazalo se je, da lahko vezemo na delce molekule APS v površinski koncentraciji, ki se sklada s koncentracijo silanolnih skupin na površini amorfnega silicijevega oksida.

Ključne besede: nanodelci, nanokompoziti, silani, zeta-potencial, funkcionalizacija

Composite nano-particles of superparamagnetic maghemite particles coated with a thin layer of silica are very promising material for biomedical applications. The magnetic core of the composite nano-particles allows manipulation of particles with external magnetic field while the silica shell allows additional bonding of molecules to the surface. Different organic molecules, such as medical drugs, require nano-particles with a layer of functionalization molecules with different functional groups.

The functionalization of nano-particles was achieved with covalent bonding of different silanol molecules: (3-aminopropyl) triethoxysilane (APS) and vinyltriethoxysilane (VTS) to their surface. Reaction took place in a mixture of ethanol with previously dissolved silane and stable aqueous suspension of composite nano-particles. The bonding of different silanol molecules was monitored with electro-kinetic measurements and with conductometric measurements of molecules on the surface. The concentration of APS molecules which can be bonded to the surface of the composite nano-particles is in accordance with the concentration of silanol groups on the surface of silica.

Key words: nanoparticles, nanocomposites, silanes, zeta potential, functionalisation

1 UVOD

V zadnjih letih se veliko pozornosti namenja uporabi magnetnih nanodelcev v medicini. Magnetizem delcev nam omogoča, da lahko z njimi na daljavo manipuliramo z zunanjim magnetnim poljem, spremljamo njihov položaj ali jih segrevamo. Uporabljamo jih tako v diagnostične namene, kot je na primer za povečevanje kontrasta pri slikanju z NMR-tehniko, kot tudi v terapevtske namene, kot sta na primer magnetna hipertermija in ciljni vnos zdravilnih učinkovin. Primeren magnetni material za uporabo v medicini je maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ki velja za nestrupen material^{1,2}. Pogoji za uporabo nanodelcev v medicini je poleg majhne velikosti in zadovoljivih magnetnih lastnosti tudi njihova nestrupenost in specifične površinske lastnosti. Če želimo, da je magnetni nanokompozit primeren za uporabo v medicini, je treba na njegovo površino vezati različne biološke učinkovine. Vezavo učinkovin na površino nanokompozita dosežemo s funkcionali-

zacijskim slojem molekul, ki so vezane na njegovo površino. Ta sloj molekul zagotavlja funkcionalne skupine za kemijsko vezavo različnih učinkovin, hkrati pa preprečuje aglomeracijo nanodelcev med uporabo. Narava funkcionalizacijskih molekul določa tudi površinske lastnosti delcev (površinski naboj, polarnost) in s tem njihovo združljivost z biološkimi sistemi³.

Za različne biološke uporabe je treba na površino delcev vezati različne biološke molekule, kot so na primer proteini, antigeni ali deli DNA-molekule, kar zahteva plast molekul z različnimi funkcionalnimi skupinami. Pomembno je, da so molekule močno vezane na površino delcev^{4,5,6}. Ker je površina železovega oksida relativno inertna, ne omogoča močne vezave molekul. Močno kovalentno vezavo različnih molekul na površini delcev omogočimo, če oksidne delce prevlečemo z amorfnim silicijevim oksidom. Silicijev oksid ima namreč na površini močno vezane silanolne OH-skupine. Na površinske OH-skupine lahko nadalje kovalentno vezemo različne funkcionalizacijske mole-

kule. Plast silicijevega oksida na oksidnih delcih mora biti neprekinjena in homogena. Debelina plasti mora biti dovolj debela, da zaščiti magnetno jedro nanokompozita, hkrati pa dovolj tanka, da bistveno ne poslabša njegovih magnetnih lastnosti.

Silanolne skupine na površini amorfnega silicijevega oksida niso primerne za vezavo vseh biološko aktivnih molekul. Tako so za vezavo različnih molekul potrebne različne skupine, kot sta na primer aminoskupina (NH_2) ali karboksilna skupina (COOH). V tem primeru lahko večemo na površinske silanolne skupine silane, ki nosijo želeno funkcionalno skupino. Silani so molekule, ki temeljijo na spojini silan, SiH_4 . Navadno imajo na Si-atom vezane tri etoksidne skupine in eno alkilno verigo, ki se konča s funkcionalno skupino. Silani v vodi hidrolizirajo in reagirajo s površinskimi silanolnimi skupinami ter tako tvorijo močno Si-O-Si-vez s površino silicijevega oksida^{7,8,9} še za APS.

Pri tem delu smo sistematično raziskovali vezavo različno funkcionaliziranih silanskih molekul (APS, VTS) na površino kompozitnih nanodelcev iz maghemitnega jedra in tanke prevleke silicijevega oksida.

2 EKSPERIMENTALNO DELO

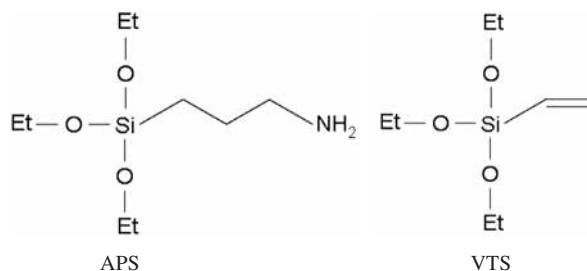
2.1 Priprava nanokompozita

Sintezni postopek za pripravo kompozitnih nanodelcev je podrobno opisan drugje¹⁰. Nanodelce maghemita smo sintetizirali s koprecipitacijo ionov Fe^{2+} in Fe^{3+} v vodni raztopini s koncentrirano raztopino amonijaka. Sintetizirane nanodelce smo sprali z amonijakalno raztopino ($\text{pH} > 10,5$). Na delce smo v naslednji stopnji adsorbirali citronsko kislino. Ta deluje kot surfaktant in prepreči njihovo aglomeracijo. Prekrivanje delcev s silicijevim oksidom je potekalo s hidrolizo tetraetoksisilana (TEOS). V etanolu raztopljen TEOS smo dodali v stabilno suspenzijo maghemitnih nanodelcev. V suspenziji nastane hidroliza TEOS-a in nukleacije silicijevega oksida na površini maghemitnih nanodelcev. Pomembno je, da v suspenziji ni aglomeratov nanodelcev, saj bi v tem primeru prekrili s silicijevim oksidom aglomerate, in ne posameznih nanodelcev. Tako pripravljene kompozitne nanodelce smo sprali in dispergirali v vodi.

Analiza kompozitnih nanodelcev je pokazala, da so iz magnetnega maghemitnega jedra s premerom ($13,7 \pm 2,9$) nm in iz plasti amorfnega silicijevega dioksida z debelino okoli 2 nm. Izračunana masna ploščina nanokompozita je $94,4 \text{ m}^2/\text{g}$. Iz magnetnih meritev je razvidno, da kažejo kompozitni nanodelci superparamagnetizem ob relativno visoki nasičeni magnetizaciji $35 \cdot 10^{-4} \text{ T/g}$.

2.2 Vezava silanskih molekul na površino kompozitnih nanodelcev

Na površino kompozitnih nanodelcev smo vezali naslednje silanske molekule: (3-aminopropil) trietoksi-



Slika 1: Shematski prikaz molekul APS in VTS

Figure 1: Schematic presentation of APS and VTS molecules

silan, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (APS) in viniltrietsilanol, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{SiCHCH}_2$ (VTS) (slika 1). Vezava molekul je potekla v vodnem mediju pri temperaturi 50°C . Stabilni vodni suspenziji (20 mL) z masnim deležem 0,5 % kompozitnih nanodelcev smo dodali etanol (25 mL), v katerem smo predhodno raztopili silan ($\approx 0,02$ mol). Izračunan dodatek silana na površino nanokompozita je bil v vseh primerih 2 mmol/m^2 .

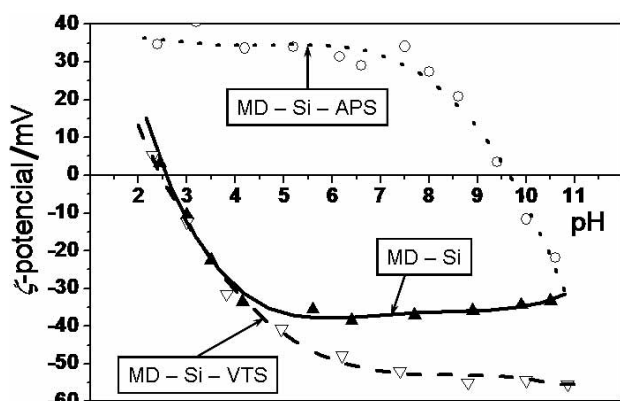
Za spremljanje prekrivanja površine kompozitnih delcev in določitev količine silana, ki je potrebna za popolno prekritje površine nanokompozita pri prej omenjenih pogojih, smo uporabili APS. Pri tem smo dodatek APS spreminjali od $1 \mu\text{mol/m}^2$ do 2 mmol/m^2 .

Po 5 h smo delce magnetno ločili in jih temeljito sprali z destilirano vodo. Uspešnost prekritja nanokompozita s silani smo spremljali z elektrokinetičnimi meritvami, ki so bile opravljene z zetametrom (Brookhaven Instruments Corp., ZetaPALS).

Površinsko koncentracijo aminoskupin na površini kompozitnih nanodelcev smo določali s konduktometrično titracijo. Suspenzijo spranih kompozitnih nanodelcev, prevlečenih z APS v vodi, smo titrirali z razredčeno raztopino klorovodikove kisline (HCl). Prevodnost suspenzije je odvisna od količine raztopljenih ionov v nosilni tekočini (vodi). Na začetku imamo v raztopini le $-\text{NH}_3^+$ vezane na površini delcev in ione OH^- v vodi. Lastni pH suspenzije je 9. Med titracijo poteče reakcija med klorovodikovo kislino in aminoskupino. Pri tem nastaja nedisociirana molekula vode, ki ne prispeva k prevodnosti raztopine, zato se le-ta bistveno ne spremeni. Ko v raztopini ni več površinskih aminoskupin, ki bi bile na voljo za reakcijo s klorovodikovo kislino, se količina ionov z vsakim dodatkom kisline zelo poveča. Posledica je povišana prevodnost raztopine. Ekvivalentna točka se določi iz ostre spremembe v naklonu premice odvisnosti prevodnosti od koncentracije dodane HCl. Prevodnost suspenzije smo merili s konduktometrom (Radiometer analytical IONcheck30).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Slika 2 prikazuje elektrokinetične meritve za kompozitne nanodelce, funkcionalizirane z različnimi silani. Sami kompozitni nanodelci kažejo v nevtralnem močno negativen zeta-potencial, ki je posledica negativno

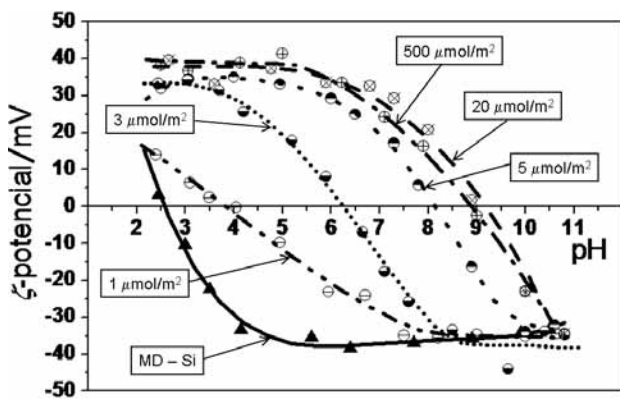


Slika 2: Graf elektrokinetičnih meritev za nanokompozitne delce (polna linija), nanokompozitne delce, funkcionalizirane z APS (pikčasta linija) in nanokompozitne delce, funkcionalizirane z VTS (črtkana linija)

Figure 2: Graph of electro kinetics measurements for nano-composite particles (full line), nano-composite particles functionalized with APS (dotted line) and nano-composite particles functionalized with VTS (dashed line)

nabitih silanolnih OH-skupin na površini. Tako imajo izoelektrično točko (IEP) pri kisli pH-vrednosti okoli 2,5. Iz elektrokinetičnih meritev je razvidno, da je v vseh primerih funkcionalizacije prišlo do sprememb na površini delcev, kar gre pripisati uspešni vezavi silanov na njihovo površino. Po pričakovanju je sprememba najbolj očitna, če na površino delcev vežemo APS. Opazen je premik IEP od pH = 2,5 na pH = 9,5. APS ima na koncu alkilne verige aminoskupino, ki je po naravi bazična. To pomeni, da je v območju visokih pH-vrednosti nedisociirana in ima negativen naboj. Ko se pH-vrednost medija premakne na področje nizkih pH-vrednosti, se aminoskupina protonira in posledično dobimo pozitivno nabito skupino na koncu alkilne verige $-\text{NH}_3^+$.

V primeru vezave VTS na površino nanodelcev se IEP ne spremeni, pač pa se poveča negativni naboj. Vinilna skupina ima zaradi dvojne vezi povečano elektronsko gostoto in posledično višji negativni naboj.



Slika 3: Graf elektrokinetičnih meritev za nanokompozit, funkcionaliziran z različnimi dodatki APS

Figure 3: Graph of electro kinetics measurements for nano-composite functionalized with different amounts of APS

V kislem območju pH-vrednosti poteče reakcija med dvojno vezjo in vodo, pri čemer nastane alkohol. Hidroksilna skupina na koncu alkilne verige je po svojih kemijskih lastnostih podobna silanolnim OH-skupinam, zato se IEP ne premakne.

Slika 3 prikazuje elektrokinetične meritve za različne dodatke APS, uporabljene v procesu vezave na površino kompozitnih nanodelcev. Množina dodanega APS k nanodelcem je izražena v mikromolih APS na kvadratni meter površine nanodelcev. Z višanjem dodatka APS se viša koncentracija APS, vezana na površini nanodelcev, zato se IEP suspenzije postopno povečuje. Končno pH-vrednost IEP dosežemo pri dodatku APS enakem ali večjem od $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Sklepamo, da je v tem primeru površina nanodelcev nasičena z vezanimi molekulami.

Rezultati elektrokemičnih meritev se skladajo s konduktometričnimi meritvami koncentracije aminoskupin na površini nanodelcev (**Tabela 1**). Z večanjem količine dodanega APS se večja tudi izmerjena koncentracija APS na površini nanodelcev. Pri dodatku $20 \mu\text{mol}$ APS na kvadratni meter površine nanodelcev, se je na površino vezal APS v površinski koncentraciji $(8,1 \pm 0,8) \mu\text{mol}/\text{m}^2$ oziroma $4,8 \pm 0,5$ molekul APS na kvadratni nanometer površine nanodelcev. Vrednost se dobro ujema s številom silicijevih atomov oziroma silanolnih OH-skupin na površini amorfne silicijevega oksida, ki je $4,55$ molekul OH na kvadratni nanometer silicijevega oksida¹¹. Na vsako od površinskih silanolnih skupin se namreč lahko veže po ena molekula APS. Pri višjih dodatkih APS je izmerjeno število aminoskupin na površini večje od teoretično možnega. Vzrok za to je verjetno nastanek polimernih molekul med hidrolizo APS zaradi relativno visoke koncentracije APS v suspenziji. Pri tem nastanejo polimerne molekule nižjih molekulskih mas, ki se med seboj povezujejo in pri tem nastajajo polimerne molekule višjih molekulskih mas. Teh z izpiranjem delcev po funkcionalizaciji verjetno nismo popolnoma izločili. Znano je, da ta proces nastane, ko koncentracija silana preseže vrednost $\approx 3 \text{ mmol}/\text{L}$. V primeru dodatka $500 \mu\text{mol}$ APS na kvadratni meter nanodelcev je bila koncentracija silana v vodni fazi suspenzije $86 \text{ mmol}/\text{L}$.

Tabela 1: Rezultati konduktometričnih meritev površinske koncentracije aminoskupin na površini nanodelcev v odvisnosti od dodatka APS uporabljenega v procesu funkcionalizacije.

Table 1: Results of conductometric titration measurements for the nano-composite functionalized with different amounts of APS

Dodatek APS na površini delcev $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	1	3	5	20	500
Izmerjena površinska koncentracija aminoskupin, $c_{\text{amino}}/(\mu\text{mol}/\text{m}^2)$	$3,2 \pm 1,5$	$3,7 \pm 1$	$2,4 \pm 1$	$8,1 \pm 0,8$	$11,0 \pm 1$
Koncentracija molekul APS na površini delcev, c/nm^2	$1,9 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,6$

4 SKLEP

Površino magnetnih nanodelcev smo funkcionalizirali z vezavo različnih silanskih molekul ((3-amino-propil)trietoksisilan (APS) in viniltrietoksisilan (VTS)) na njihovo površino preko vmesne tanke plasti amorfnega silicijevega oksida. Slednji omogoči s svojimi površinskimi silanolnimi OH-skupinami močno kovalentno Si-O-Si-vez silana s površino delcev. Površinska koncentracija silanskih molekul, vezanih na površini nanodelcev, se sklada s koncentracijo silanolnih skupin na površini amorfnega silicijevega oksida.

5 LITERATURA

- ¹ Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003), R167–R181
- ² R. Hiergeist, W. Andrä, N. Buske, R. Hergt, I. Hilger, U. Richter, W. Kaiser, *J. Magn. Magn. Mater.*, 201 (1999), 420–422
- ³ C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D*, 36 (2003), R198–R206
- ⁴ A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials*, 26 (2005), 3995–4021
- ⁵ Y. Ichiyonagi, S. Moritake, S. Taira, M. Setou, *J. Magn. Magn. Mater.*, 310 (2007), 2877–2879
- ⁶ M. E. Park, J. H. Chang, *Mat. Sci. Eng. C*, 27 (2007), 1232–1235
- ⁷ Z. Ma, Y. Guan, H. Liu, *J. Magn. Magn. Mater.* 301 (2006), 469–477
- ⁸ X. Liu, J. Xing, Y. Guan, G. Shan, H. Liu, *Colloids Surf A*, 238 (2004), 127–131
- ⁹ K. Woo, J. Hong, J. P. Ahn, *J. Magn. Magn. Mater.*, 293 (2005), 177–181
- ¹⁰ S. Čampelj, D. Makovec, M. Bele, M. Drogenik, J. Jamnik, *Mater. Tehnol.*, 41 (2007), 103–107
- ¹¹ R. K. Iler, *The chemistry of silica*, John Wiley & Sons, New York 1979, 637