

## Получаване на модифицирани магнитни наночастици и приложението им за имобилизация на биоагенти

Светла Иванова, Явор Иванов, Катя Габровска, Цонка Годжевъргова

*Preparation of modified magnetic nanoparticles and their application for immobilization of bioagents. Modified magnetic nanoparticles with chitosan and 3-aminopropyltriethoxysilane were obtained. The amount of aminogroups on the nanoparticle surface was determined. The optimal concentration of two modified agents was established that provides the highest degree of immobilization of albumin.*

**Key words:** magnetic nanoparticles, chitosan, APTES, immobilization, albumin

### ВЪВЕДЕНИЕ

Получаването на магнитни наночастици и тяхното приложение за създаване на биосензори използвани в биомедицината, биотехнологиите и хранителните технологии е актуален проблем [5]. Възможността магнитните наночастици допълнително да се модифицират повърхностно ги прави още по-перспективни матрици. Модифицирането на наночастиците подобрява тяхната стабилност, предотвратява агрегацията им и ги прави подходящи носители за имобилизация на биоагенти. Хитозанът и силанът са едни от най-често използваните полимери за модифициране на магнитните наночастици [2, 3, 4]. Те осигуряват добра биосъвместимост на носителя и високата плътност на повърхностни аминогрупи, което ги прави идеални матрици за имобилизация на ензими, антитела и др.

Целта на настоящата статия е получаване на различни видове модифицирани магнитни наночастици и определяне на техния имобилизационен капацитет по отношение на албумин.

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Реагенти и химикали

За получаването на магнитните наночастици (МНЧ) се използват  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  от Sigma-Aldrich. С цел въвеждане на свободни amino групи, МНЧ се модифицират с хитозан и (3-аминопропил)триетоксисилан (АПТЕС) от Sigma-Aldrich. Активирането на модифицираните МНЧ се извършва с глутаров алдехид от Merck. Доказването на имобилизационния капацитет на МНЧ се осъществява с албумин от Sigma-Aldrich.

#### 2. Получаване на $\text{Fe}_3\text{O}_4$ МНЧ

Разтвор на  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{FeSO}_4$  в молно съотношение на  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  2:1 се нагрява на водна баня до  $85^\circ\text{C}$  под азотна атмосфера. Реакцията протича при механично разбъркване продължение на 30 мин. рН на разтвора се довежда до  $10 \pm 11$  чрез добавяне на  $\text{NH}_4\text{OH}$  при повишена скорост на разбъркване. След 30 мин температура на разтвора се повишава до  $90^\circ\text{C}$  и се добавя на капки 0.3M натриев цитрат. Разбъркването продължава още 30 мин. Получените МНЧ се промиват двукратно с дейонизирана вода и се отделят на магнит. Лиофилизират се за 8 часа при  $-40^\circ\text{C}$ .

#### 3. Модификация на $\text{Fe}_3\text{O}_4$ МНЧ с хитозан

Варирано е съотношението  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /хитозан 1:1; 1:2 и 1:3 (g/g). 0.05, 0.1 и 0.15g хитозан се разтварят в 9 ml 4%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и към тях се прибавят 0.05g МНЧ. Разтворът се разбърква 20 мин, след което на капки се добавя към смес от 20 ml парафин и 1 ml Span 80. След 30 мин разбъркване, към разтвора се добавя 1M NaOH на капки до рН=9 и разбъркването продължава още 15 мин.

Добавят се 4 ml 12.5% разтвор на глутаров алдехид за 4 часа при същата скорост на разбъркване за активиране на amino групите. Сместа се центрофугира за

20 мин при 5000 об/мин, супернатантата се отстранява и МНЧ се промиват четирикратно с петролев етер и трикратно с 10 mM PBS pH=7.4.

#### 4. Модификация на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>МНЧ с АПТЕС

Концентрацията на модифициращия агент АПТЕС се варира от 0.04 до 0.5 %. Към 100 ml етилов алкохол се добавят 0.05 g МНЧ и се разбъркват 30 мин при 650 об/мин. След това на капки се добавя АПТЕС до крайна концентрация в разтвора съответно 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 и 0.5 %. Пробата се разбърква 7 часа при 700 об/мин. МНЧ-АПТЕС се отделят на магнит и се промиват четирикратно с по 50 mL етилов алкохол и двукратно с 10 mM PBS pH=7.4.

За активирани на аминокислотни групи, 200 µL МНЧ-АПТЕС се поставят в 1.5 mL конични епруветки и към тях се добавя 1 mL 5% глутаров алдехид в 10 mM PBS с pH=8.0, съдържащ 150 mM NaCl. Пробата се разклаща в продължение на 4 часа при 250 об/мин. След това МНЧ се промиват 6 пъти с по 1 mL 10 mM PBS pH 7.4, супернатантата се отстранява и МНЧ са готови за ковалентна имобилизация на албумин.

#### 5. Имобилизация на албумин

МНЧ-NH<sub>2</sub> се сонифицират за 10 мин на ултразвукова вана до получаване на хомогенна суспензия. Към активирани МНЧ (200 µL, 5 mg mL<sup>-1</sup>) се добавя 1 mL от 0.6 mg mL<sup>-1</sup> албумин. Пробата се разклаща 2 часа при 250 об/мин, след което супернатантата се запазва за определяне на несвързаното количество белтък. МНЧ се промиват трикратно с по 1 mL 10 mM PBS pH 7.4 и по метода на Лоури [6] се определя количеството белтък свързан към МНЧ. Измерва се абсорбцията при 750 nm и количеството белтък се определя по предварително построена стандартна права. Получените резултати се изразяват за mg МНЧ.

### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

#### 1. Получаване на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>МНЧ

Получаването на МНЧ се извършва чрез директна копреципитация във воден разтвор, съдържащ Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> йони при добавянето на амониева основа, съгласно уравнение 1:



Реакцията се извършва при pH=10-11, в азотна атмосфера и при моларно съотношение на Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> - 2:1. В противен случай, полученият Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> може да се хидролизира (уравнение 2) или да се трансформира в γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в присъствието на кислород, поради неустойчивостта и чувствителността му към кислорода.

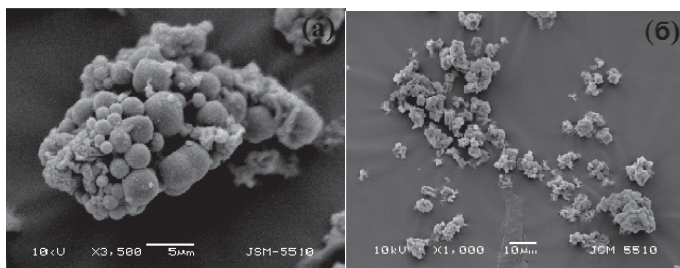


Крайните продукти са плътни, черни и силно намагнитизиращи се частици под действието на магнитно поле, съдържащи голям брой хидроксилни групи на повърхността си.

#### 2. Модификация на повърхността на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>МНЧ с хитозан и имобилизация на албумин

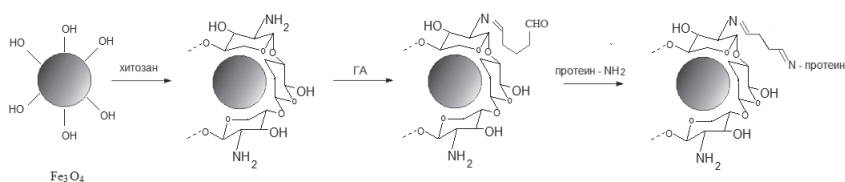
Процесът на модификация се извършва чрез покриване на МНЧ с хитозан. При тази модификация на повърхността на магнитните частици се въвеждат аминокислотни групи.

Варирано е съотношението на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/хитозан - 1:3, 1:2 и 1:1. На фиг.1 са представени SEM снимки (JEOL JSM-5510 microscope - Japan) на модифицирани МНЧ с различно съдържание на хитозан. Установено е, че получените МНЧ - хитозан са склонни силно да агрегират и размерът на частиците е 70-80nm.



Фигура 1. Електронно сканираща микроскопия на МНЧ-хитозан при съотношение  $Fe_3O_4$ /хитозан 1:3 (а) и 1:2 (б)

За осъществяване на ковалентна имобилизация на белтъчните молекули, тези групи предварително се активират с глутаров алдехид, при което се образуват алдехидни групи. На фигура 2 е представена схема на имобилизацията на албумин към МНЧ-хитозан. По време на реакцията, алдехидните групи върху повърхността на частиците взаимодействат с amino групите на албумина, формирайки шифови бази (-CH=N-).



Фигура 2. Схема на имобилизация на албумин към МЧ-хитозан

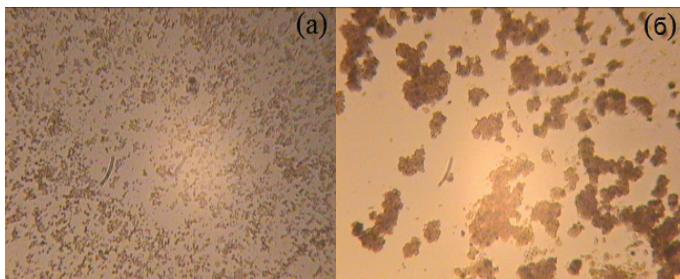
Изследвано е влиянието на концентрацията на хитозана върху имобилизационния капацитет на магнитните наночастици спрямо албумин. Определено е и количеството на свободните amino групи на повърхността на модифицираните МНЧ чрез остатъчно титруване [1]. Резултатите са показани на таблица 1. От таблицата се вижда, че при увеличаване на съотношението  $Fe_3O_4$ /хитозан, се увеличава и количеството на свободните amino групи. Количеството на свързания белтък към МНЧ се определя по метода на Лоури [6], таблица 1. Вижда се, че при увеличаване на съотношението до 1:2, количеството свързан белтък се увеличава с около 31 %, но при съотношение  $Fe_3O_4$ /хитозан 1:3, белтъкът свързан към магнитните частици се увеличава само с 1.7 %.

Таблица 1  
Количество amino групи и количество свързан белтък към МЧН-Хитозан

Модифициращ агент	свободни-NH <sub>2</sub> групи, mg eq vq <sup>-1</sup>	mg свързан белтък за mg МНЧ
1:1 хитозан	0.50	0.04
1:2 хитозан	0.62	0.058
1:3 хитозан	0.75	0.059

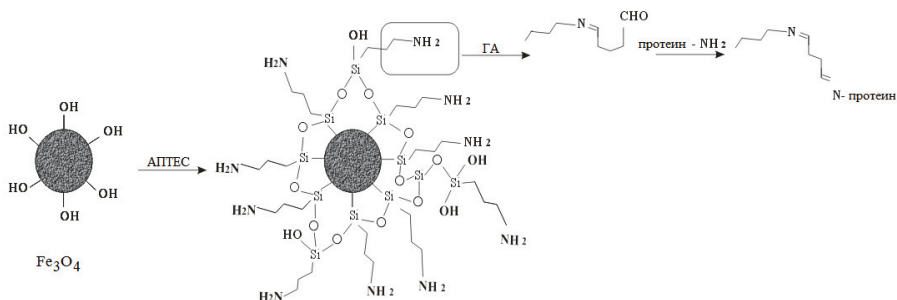
### 3. Модификация на повърхността на $Fe_3O_4$ магнитни наночастици с АПТЕС и имобилизация на албумин

Процесът на модификация се извършва чрез покриване на МНЧ с АПТЕС. Варирана е концентрацията на АПТЕС в интервала от 0.04% до 0.5%. На фигура 3са представени микроскопски снимки (светлинен микроскоп Carl Zeiss Jena с увеличение 400x, камера Pelco) на модифицирани МНЧ с различно съдържание на АПТЕС. Установено е, че получените МНЧ - АПТЕС агрегират в по-малка степен в сравнение с МНЧ - хитозан и размерът на частиците е 30-40nm.



Фигура 3. Микроскопски снимки на МНЧ-АПТЕС при концентрацията на АПТЕС 0.016% (а) и 0.5% (б)

И при тази модификация на повърхността на магнитните частици се въвеждат amino групи и активирането се извършва с глутаров алдехид. Схемата на имобилизацията на албумин към МЧ-АПТЕС е дадена на фигура 4.



Фигура 4. Схемата на имобилизация на албумин към МЧ-АПТЕС

Установено е, че с увеличаване на концентрацията на модифициращия агент, количеството на свободните amino групи на повърхността на наночастиците се увеличава. Резултатите са представени в таблица 2.

Вижда се, че при увеличаване концентрацията на АПТЕС от 0.04 до 0.08%, количеството на свързания белтък се увеличава приблизително 6 пъти. При по-нататъшно увеличаване на концентрацията на АПТЕС, количеството белтък продължава да се увеличава, но в по-малка степен.

Таблица 2  
Количество аминогрупи и количество свързан белтък към МЧ-АПТЕС

Модифициращ агент	свободни - NH <sub>2</sub> групи, mgеqv <sup>-1</sup>	mg свързан белтък за mg МНЧ
0.04 % АПТЕС	0.1	0.0043
0.08 % АПТЕС	0.11	0.025
0.12% АПТЕС	0.23	0.027
0.16 % АПТЕС	0.28	0.031
0.50 % АПТЕС	0.58	0.032

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получените модифицирани магнитни наночастици с АПТЕС и хитозан. Модифицираните с АПТЕС магнитни наночастици са по-малки по размер и агрегират в по-малка степен в сравнение с модифицираните с хитозан магнитни наночастици.

2. Установено е, че оптималната концентрация на модифициращия агент АПТЕС е 0.16%, осигуряващ най-голям имобилизационен капацитет спрямо албумина, докато при хитозана оптималното съотношение МЧ/хитозан е 1:2.

### ЛИТЕРАТУРА

[1] Димов К., Съмарджиева В., Павлов П. Практическо ръководство за синтетични влакна, 1983, Техника, София.

[2] Cao, H.; He, J.; Deng, L.; Gao, X. Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method. Appl. Surf. Sci. 255, 2009, 7974–7980.

[3] Dung, D.T.K.; Hai, T.H.; Phuc, L.H.; Long, B.D.; Vinh L.K.; Truc, P.N. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles with chitosan coating. J. Phys. Conf. Ser. 187, 2009, 012036.

[4] Hritcu, D.; Popa, M.I.; Popa, N.; Badescu, V.; Balan, V. Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres. Turk. J. Chem. 33, 2009, 785 – 796.

[5] Indira, T.K.; Lakshmi, P.K. Magnetic Nanoparticles – A Review. Int. J. Pharm. Sci. Nanotech. 3, 2012, 1035-1042.

[6] Lowry, H.; Rosenbough, N.; Farr, H. J. Chem. 193, 1951, 265-275.

### За контакти:

Светла Иванова Иванова – докторант, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/858333, e-mail: your.svetli@yahoo.com

ас. Явор Луканов Иванов, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/858353, e-mail: qvor\_burgas@abv.bg

доц. д-р Катя Иванова Габровска, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/858471, e-mail: gabrovska@mail.bg

проф. д-р Цонка Иванова Годжеваргова, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com

### Докладът е рецензиран.