

Synthesis and Application of Magnetic Nanoparticles Modified by Dopamine Hydrochloride

Xiang Xu, Qingzhi Liu

College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong
Email: rainerxu@163.com

Received: Dec. 2nd, 2017; accepted: Dec. 18th, 2017; published: Dec. 26th, 2017

Abstract

Due to its special quantum size effect, small size effect, surface effect, macroscopic quantum tunneling effect, magnetic nanoparticles have been widely used in magnetics, biology, optics, with broad application prospects. The ferromagnetic oxide magnetic nanoparticles modified by dopamine hydrochloride were prepared using solvothermal method, and then the application research of immobilizing acetylcholinesterase after covalent attachment of glutaraldehyde was carried out. The structure and property of the synthetic magnetic nanoparticles and modified products were characterized and analyzed using transmission electron microscope, infrared spectrometry, XRD characterization and magnetic property.

Keywords

Ferromagnetic Oxide, Magnetic Nanoparticles, Surface Modification, Immobilized Enzyme

盐酸多巴胺修饰的磁性纳米粒子的合成及应用

徐 香, 刘清芝

青岛农业大学化学与药学院, 山东 青岛
Email: rainerxu@163.com

收稿日期: 2017年12月2日; 录用日期: 2017年12月18日; 发布日期: 2017年12月26日

摘 要

磁性纳米材料因具有特殊的量子尺寸效应、小尺寸效应、表面效应、宏观量子隧道效应, 所以在磁学、

生物学、光学、方面有着广泛的应用, 具有广阔的应用前景。本论文采用溶剂热法制备了盐酸多巴胺修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子, 后用戊二醛共价偶联后进行了固定化乙酰胆碱酯酶的应用研究。对合成的磁性纳米粒子以及其表面改性后的产物进行了透射电镜、红外光谱测定、XRD表征、磁性能分析, 对其结构及性能进行了表征及分析。

关键词

四氧化三铁, 磁性纳米粒子, 表面修饰, 固定化酶

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

作为一种新型前沿材料, 磁性纳米材料因具有特殊的量子尺寸效应、小尺寸效应, 以及特殊的磁学特性, 在我们日常生活中的各个方面, 尤其在磁学、生物学等方面得到了广泛的应用[1] [2] [3]。又因为纳米材料在物理方面具有特殊的稳定性、单分散性、可调控性等大大拓展了它的应用范围和前景[4] [5]。尤为特殊的是, 由于具有特殊的磁学性能, 磁性纳米材料被用于与药物结合, 使某些治疗更为精准, 在生物医学方面取得了很大的进步[6] [7] [8]。

磁性纳米粒子的合成方法有很多, 主要分为化学法、物理法。其中化学法主要包含四种分别是: 沉淀法、溶胶-凝胶法、微乳液法和溶剂热法。物理方法主要有两种分别是: 蒸发冷凝法和磁控溅射方法。利用化学共沉淀的方法合成的纳米粒子不管是从粒径还是分散性都比其他的方法要好得多[9]。因为裸露在表面的四氧化三铁磁性纳米粒子的原子活性很高, 易产生聚沉现象[10]。将一些别的基团加在它的表面用来降低表面活性, 使得不会产生聚沉现象。经修饰后的磁性纳米粒子不仅拥有反应灵敏性, 还有生物相容性[11], 在分离纯化和一些检测上有很大的用处。

磁性纳米材料的一个重要应用是用于固定化酶, 经固定后的酶具有极大优势, 它有游离酶的特性, 又克服了其不足。分离回收的方式简单, 也可以重复的进行使用, 稳定性相对于其他方式也很高。固定化酶技术研究的重点是如何筛选条件相宜的载体及合适的固定化方法。固定化酶技术研究的方法不尽相同[12], 在实验中需要根据酶的应用目的和特性, 综合考虑选择出最恰当的方法。吸附法、包埋法以及交联法和共价结合法这四种方式是目前最常见最传统的方式[13]。

本论文主要是通过溶剂热一锅法, 以乙二醇、氯化铁、醋酸钠和盐酸多巴胺为原料, 合成出经盐酸多巴胺修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子后, 用戊二醛共价偶联固定化乙酰胆碱酯酶。对合成后的磁性四氧化三铁纳米离子进行红外光谱测定、XRD 表征、热重分析、磁性能分析, 从而达到对产物的结构和性质有更好的了解, 并进一步研究固定化酶相关的反应条件优化。

2. 实验仪器、试剂及方法

2.1. 仪器与试剂

实验采用溶剂热一锅法, 以乙二醇、氯化铁、醋酸钠和盐酸多巴胺为原料, 合成出经盐酸多巴胺修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子并进行表征及固定化酶的应用研究。用到的主要试剂和设备如表 1 和表 2 所示。

Table 1. Experimental materials**表 1.** 实验试剂

实验试剂名称	化学式	规格	公司
无水乙醇	C ₂ H ₆ O	AR	国药集团化学试剂有限公司
氯化铁	FeCl ₃ ·6H ₂ O	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
醋酸钠	NaAc	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
鳀乙酰胆碱酯酶	AchE		Sigma 化学试剂公司
牛血清白蛋白	BSA	生化试剂	Sigma 化学试剂公司
盐酸多巴胺	C ₈ H ₁₂ ClNO ₂	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

Table 2. Experimental device**表 2.** 实验设备

实验仪器	名称型号	生产厂家
磁力搅拌器	ZNCL - GS	上海越众仪器有限公司
数控超声波清洗器	KQ3200DB	昆山市超声仪器有限公司
旋转蒸发器	RE - 52C	巩义市予华仪器有限责任公司
高速离心机	TG20 - WS	长沙湘智离心机仪器有限公司
液晶真空干燥箱	DZE - 6050E	上海培因实验仪器有限公司
傅立叶红外变化光谱仪	TENSOR 27	德国 Bruker 公司
超导量子干涉仪	MPMS XL - 7	Quantum Design 公司
差热 - 热重分析仪	STA 409 PG/PC	德国耐驰仪器制造有限公司
X 射线衍射仪	D8 Advance	德国 Bruker 公司
紫外可见分光光度计	721 型	北京天时科技有限公司
震动样品磁强度计	LAKESHORE - 7304	北京兄弟创合科贸有限公司
透射电镜	TecnaïTM G2 F30	上海歌凡生物科技有限公司

2.2. 实验方法

2.2.1. 合成盐酸多巴胺 DA 修饰的磁性纳米粒子

首先在 30 mL 乙二醇中加入 FeCl₃ 并搅拌溶解, 随后依次加入醋酸钠和盐酸多巴胺, 对混合溶液进行加热且持续搅拌大约 30 min 至全部溶解。然后将混合溶液需转移至 50 mL 高压反应釜。烘箱中 200℃ 反应 72 小时。自然冷却至室温, 得到黑色的经盐酸多巴胺修饰的磁性纳米粒子, 用乙醇进行多次洗涤, 在 60℃ 真空干燥箱中干燥 24 小时。

2.2.2. 戊二醛反应

用戊二醛作为双功能试剂, 接枝盐酸多巴胺修饰的磁性纳米粒子, 以便进一步负载乙酰胆碱酯酶。具体方法如下: 在 50 mL 磷酸缓冲液 PBS (1 μmol/L, PH = 7) 中加入 0.79 克 Fe₃-NH₂ 磁性纳米微球, 超声分散一小时。再往里加入戊二醛(5 mL, 5%) 溶液, 室温条件下搅拌反应 4 小时。用磷酸缓冲液 PBS (1 μmol/L, PH = 7) 对磁分离后载体进行多次洗涤。(留存约 0.1 g 磁性纳米微球用来做考虑不同浓度的戊二醛 2%、3%、4%、5%、6%、7% 的影响)。

2.2.3. 磁性 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 纳米微球表面乙酰胆碱酯酶固定化方法

准确称取 10 mg 磁性 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 纳米微球于 10 mL 离心管中, 向离心管中加入不同酶蛋白浓度(0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2.0 U/mL)、不同 pH 的乙酰胆碱酯酶溶液 2 mL (分别由 50 mM pH 5.0

的乙酸-乙酸钠缓冲液; 50 mM pH 6.0~8.0 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液; 50 mM pH 9.0~10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制), 一定温度下摇床反应一段时间, 磁性分离, 收集上清, 用于测定蛋白含量。固定化酶清洗数次后, 直至上清液中无蛋白含量吸收。将固定化酶之后的上清液和清洗液收集在一起测吸光度求吸附率。

3. 结果与分析

3.1. 磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的结构与形态分析

3.1.1. 透射电镜分析

图 1 是多巴胺修饰的磁性纳米粒子和戊二醛接枝后的多巴胺修饰的磁性纳米粒子的透射电镜照片。由图可知, 溶剂热一步法合成的盐酸多巴胺修饰的磁性纳米粒子的粒径在 10 nm 左右, 而经戊二醛接枝后其粒径变为 200 nm 左右。可以发现经戊二醛接枝后, 磁性纳米粒子的分散性变得更好。

3.1.2. 红外光谱(IR)分析

图 2 多巴胺修饰(a)及经戊二醛接枝后(b)的磁性纳米粒子的红外谱图。两种磁性纳米粒子分别在波数为 568.62 与 567.71 cm^{-1} 处出现了 Fe-O 键的吸收峰, 说明经多巴胺修饰的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子及其进一步与戊二醛反应后, 始终保持四氧化三铁的骨架结构。同时图(a)和图(b)中, 波数为 2346.97 和 2075.06 cm^{-1} 对应于四氧化三铁粒子表面的 -OH 伸缩振动吸收峰。在(a)图中的 2075.06 cm^{-1} 和图(b)中的 1572.06 cm^{-1} 处出现了新的吸收峰, 属于 C-H 的伸缩振动吸收峰, 载波数两图中分别为 1795.62 cm^{-1} 和 1460.00 cm^{-1} 处的吸收峰属于 N-H 的变动振动。由此说明多巴胺对 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的表面改性是成功的。

3.1.3. 磁性纳米材料的 XRD 分析

未与戊二醛反应的溶剂热直接合成的多巴胺修饰的 Fe_3O_4 @多巴胺的衍射谱峰 2θ 是 30.30° 、 35.58° 、 43.00° 、 53.98° 、 57.64° 、 62.46° 、这些衍射谱峰分别对应 Fe_3O_4 的(220)、(311)、(400)、(422)、(511)、(440) 的晶面[14]。在图 3 中没有出现一些别的杂峰, 这说明 Fe_3O_4 磁性纳米粒子是比较纯净的尖晶石结构, 物

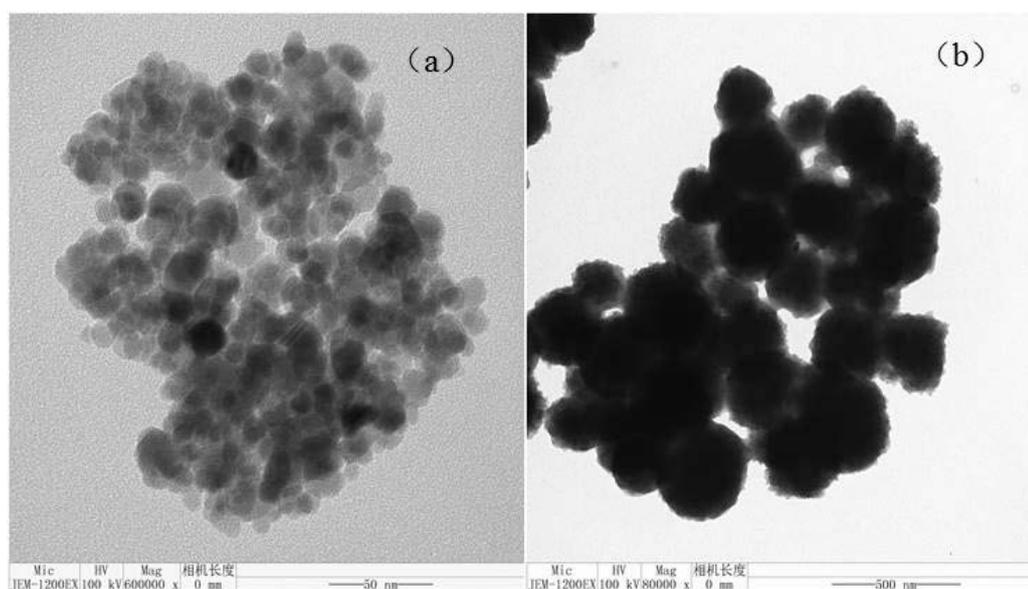
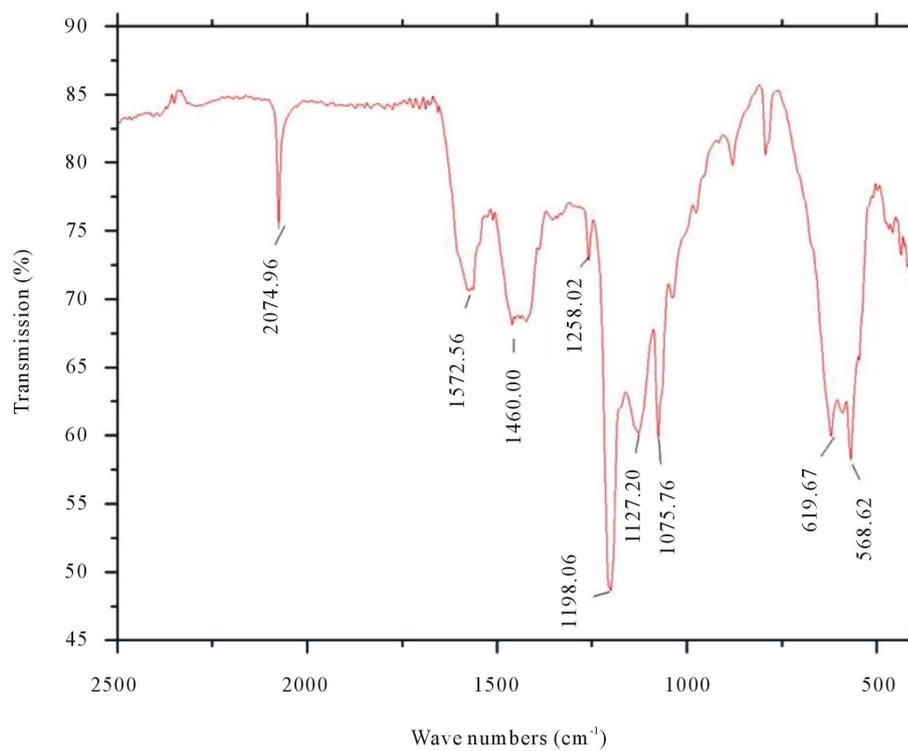
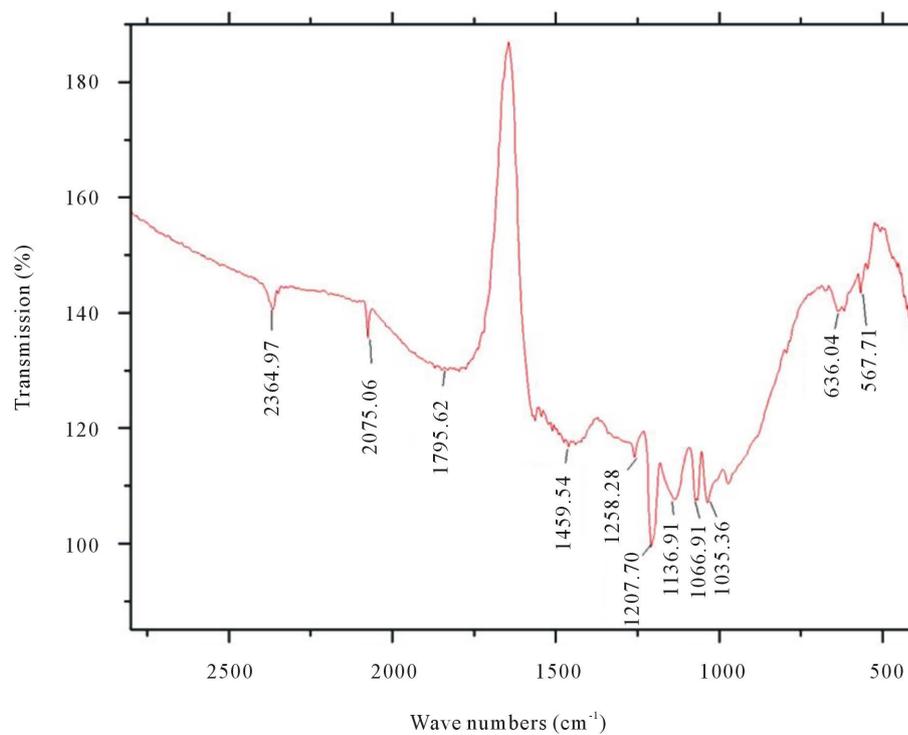


Figure 1. The TEM of magnetic nanoparticles modified by dopamine (a) and grafted by glutaraldehyde (b)

图 1. 多巴胺修饰(a)及经戊二醛接枝后(b)的磁性纳米粒子的透射电镜图



(a)



(b)

Figure 2. The infrared spectrum of magnetic nanoparticles modified by dopamine (a) and grafted by glutaraldehyde (b)

图 2. 多巴胺修饰(a)及经戊二醛接枝后(b)的磁性纳米粒子的红外谱图

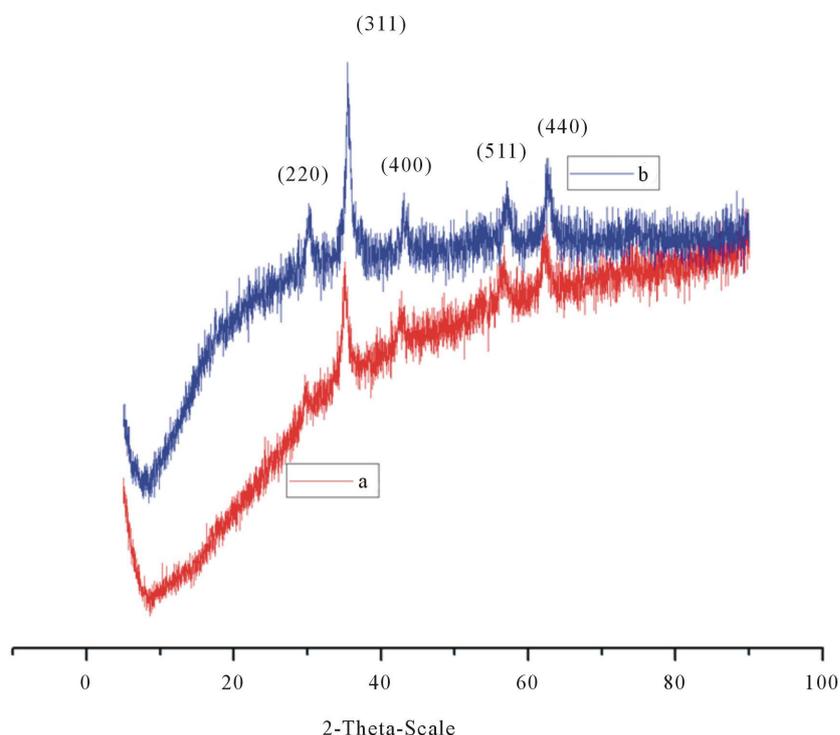


Figure 3. The XRD spectrogram of magnetic nanoparticles modified by dopamine (a) and grafted by glutaraldehyde (b)

图 3. 多巴胺修饰(a)及经戊二醛接枝后(b)的磁性纳米粒子的 XRD 谱图

相比较单一。与戊二醛反应的溶剂热直接合成的多巴胺修饰的 Fe_3O_4 @多巴胺的衍射谱峰 2θ 是 30.12° 、 35.56° 、 43.00° 、 53.34° 、 56.76° 、 62.37° 。这样,在通过图中谱线的相互之间的比较,我们可以得到以下结论:与戊二醛反应的由溶剂热直接产生的多巴胺修饰的四氧化三铁和与戊二醛反应的由溶剂热直接产生的多巴胺修饰的四氧化三铁的出峰位置大体一样,这说明在经过表面修饰后修饰磁性纳米粒子的过程中以及与戊二醛反应后, Fe_3O_4 的结构并没有受到损失,变化不大。从谱线中,可以看到,修饰后的磁性纳米粒子峰强有所变化,但是变化不大,这是由于修饰各种表面活性剂造成的。

3.1.4. 磁性能分析

图 4 是功能化的四氧化三铁磁性纳米粒子的室温磁滞回归线。在 298 K 时,四氧化三铁磁性纳米粒子和经多巴胺修饰的纳米粒子的饱和磁化强度值为分别为 83.7 emu/g 75.0 emu/g 。测试结果表明,制得的磁性纳米粒子的磁性能十分的优异是完全符合要求的。

3.2. 固定化酶的结果讨论

3.2.1. 不同酶蛋白浓度对蛋白吸附率的影响

首先分别量取为 0.25 、 0.5 、 0.75 、 1.0 、 1.25 、 1.5 、 2.0 U/mL 的乙酰胆碱酯酶溶液 2 ml 。然后加入 10 mg 氨基纳米微球。在摇床中反应十小时,摇床控制在 30°C , 200 rpm 左右。考察蛋白吸附率因不同蛋白浓度的酶液产生的影响。

图 5 所示,主要考在浓度为 0.2 U/mL 、 0.5 U/mL 、 1.0 U/mL 、 1.25 U/mL 、 1.5 U/mL 、 2.0 U/mL 条件下,对蛋白吸附率的影响。由图可看得随着酶蛋白浓度的升高,蛋白吸附率随之增加,当达到 1.5 U/mL 酶蛋白浓度对吸附率的影响基本不变。

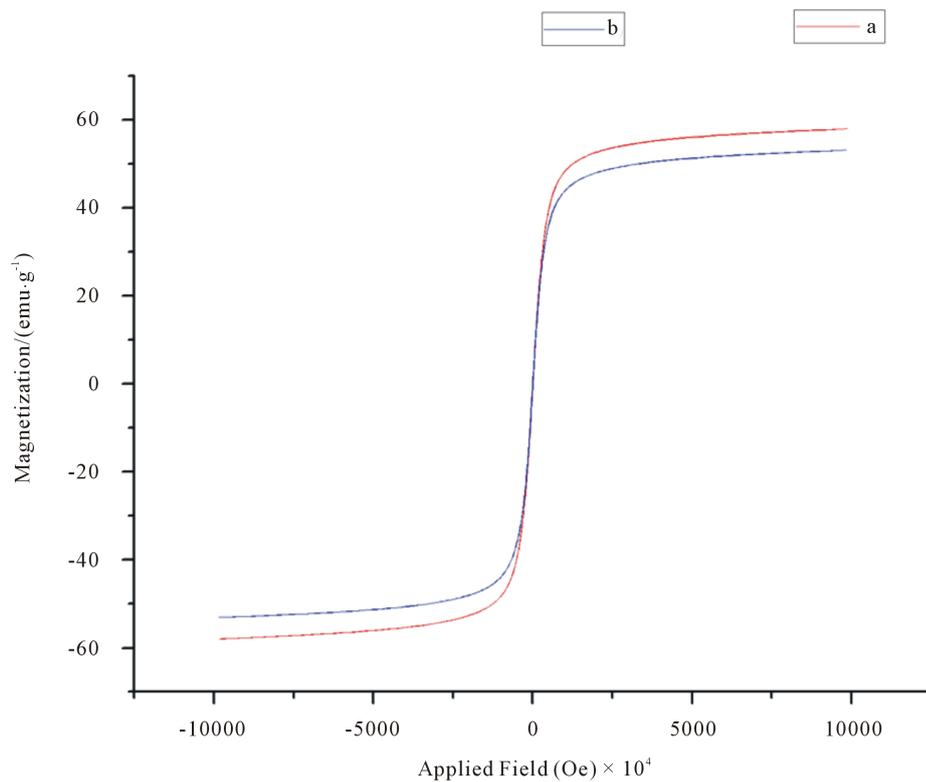


Figure 4. The magnetic analysis of magnetic nanoparticles modified by dopamine (a) and grafted by glutaraldehyde (b)

图 4. 多巴胺修饰(a)及经戊二醛接枝后(b)的磁性纳米粒子的磁性分析

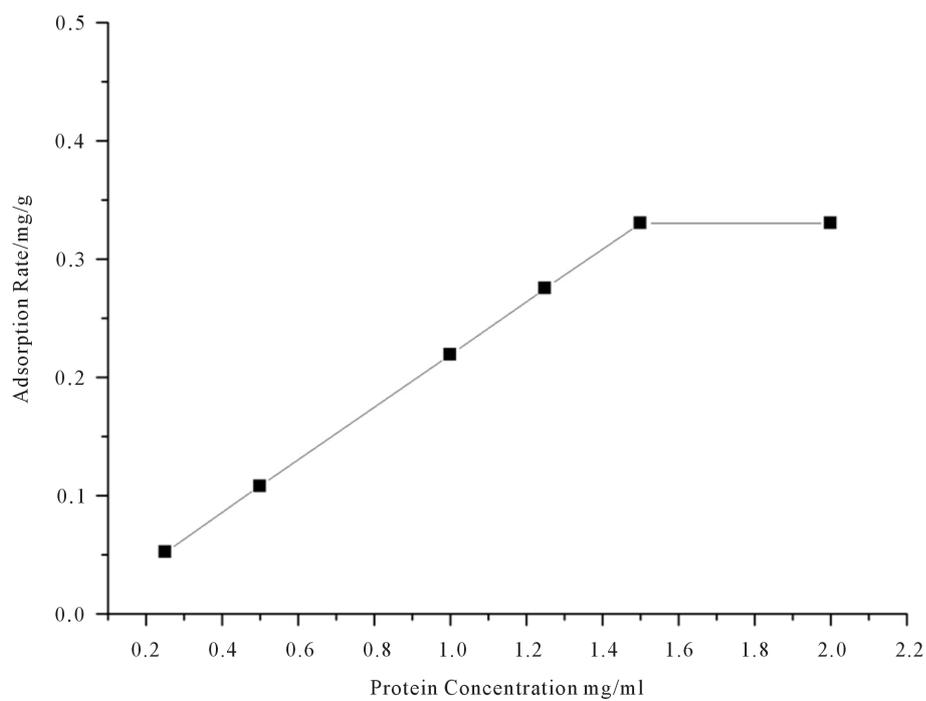


Figure 5. The effect of enzyme protein concentration on adsorption rate

图 5. 酶蛋白浓度对吸附率的影响

3.2.2. 不同反应温度对蛋白吸附率的影响

首先量取 1.0 U/mL 的脂肪酶溶液 2 mL。然后向溶液中加入氨基纳米微球 10 mg。最后分别在 6 个不同温度(20°C、5°C、30°C、35°C、40°C、50°C)的摇床中反应 10 小时。考察酶蛋白吸附率因不同固定化温度产生的影响。

图 6 所示, 我们研究了在 20°C、5°C、30°C、35°C、40°C、50°C 条件下, 不同的温度对蛋白吸附率的影响。由图可以得出随着温度的升高, 蛋白吸附率基本是不变化的, 温度的变化对蛋白吸附率的影响基本不大。但是温度超过 35°C 后, 温度升高使得蛋白吸附率逐渐下降。

3.2.3. 不同 PH 对蛋白吸附率的影响

首先准备 5 份反应体系 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的酶液。随后加入 10 mg 氨基纳米微球。将混合后的溶液放在摇床中反应 10 h。观察酶蛋白吸附率因不同体系 pH 值的产生的影响。

图 7 考虑了在 PH 分别为 5、6、7、8、9、10 下对蛋白吸附率的影响。由图可得随着 PH 的变化对蛋白吸附率影响逐渐升高。PH 为 9 时达到最佳吸附率。

3.2.4. 不同反应时间对蛋白吸附率的影响

首先准备 1.0 U/mL 乙酰胆碱酯酶溶液 2 mL。然互向溶液中加入 10 mg 氨基硅烷微球。分别于摇床中反应四小时、八小时、十二小时、十六小时以及二十四小时和三十二小时。测定酶蛋白吸附率因不同的固定化时间的影响。

图 8 是固定化时间对蛋白吸附率的影响曲线。由图可看出蛋白吸附率随着固定化时间的增加逐渐增大。达到 15 h 时为最佳时间, 随后开始下降。

3.2.5. 不同戊二醛对蛋白吸附率的影响

戊二醛作为具有双功能基团的交联剂, 其可使酶蛋白分子中赖氨酸的 ϵ -NH₂、N 端的 α -NH₂、酪氨酸的酚基或半胱氨酸的巯基与氨基化硅胶载体上的-NH₂ 发生 Schiff 反应, 而相互交联成固定化酶。分别

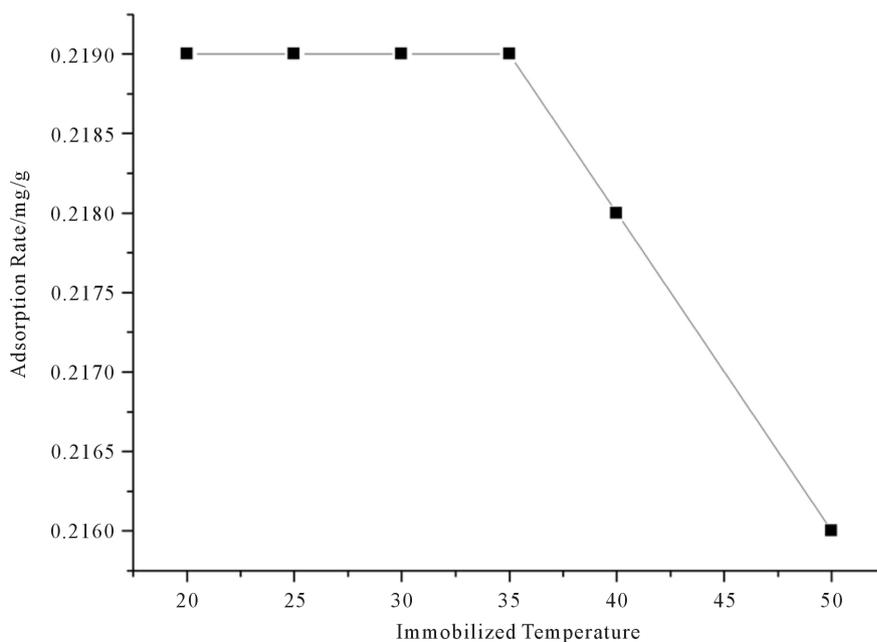


Figure 6. The effect of different reaction temperature on the rate of protein adsorption

图 6. 不同反应温度对蛋白吸附率的影响

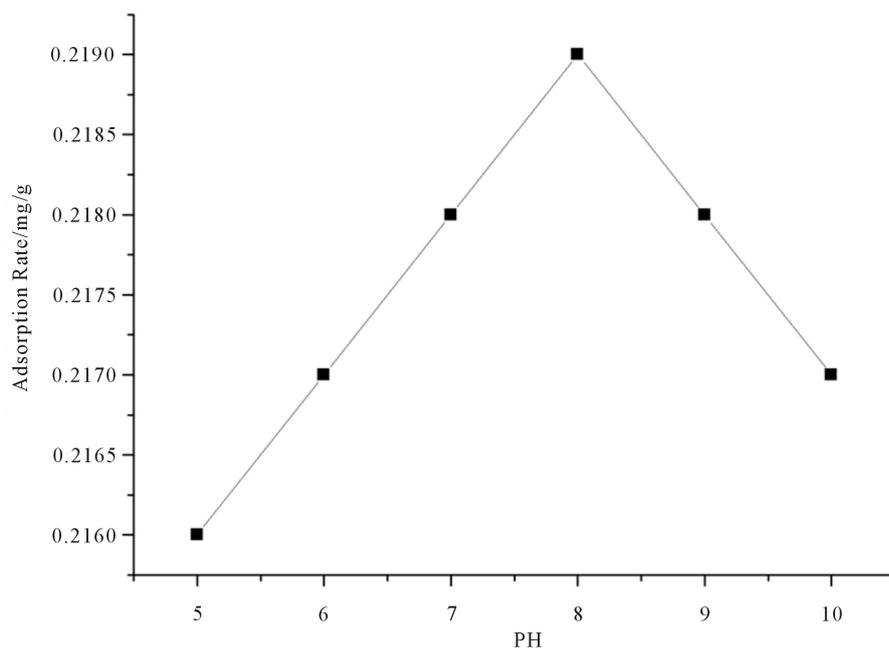


Figure 7. The effect of different PH on the rate of protein adsorption
图 7. 不同 PH 对蛋白吸附率的影响

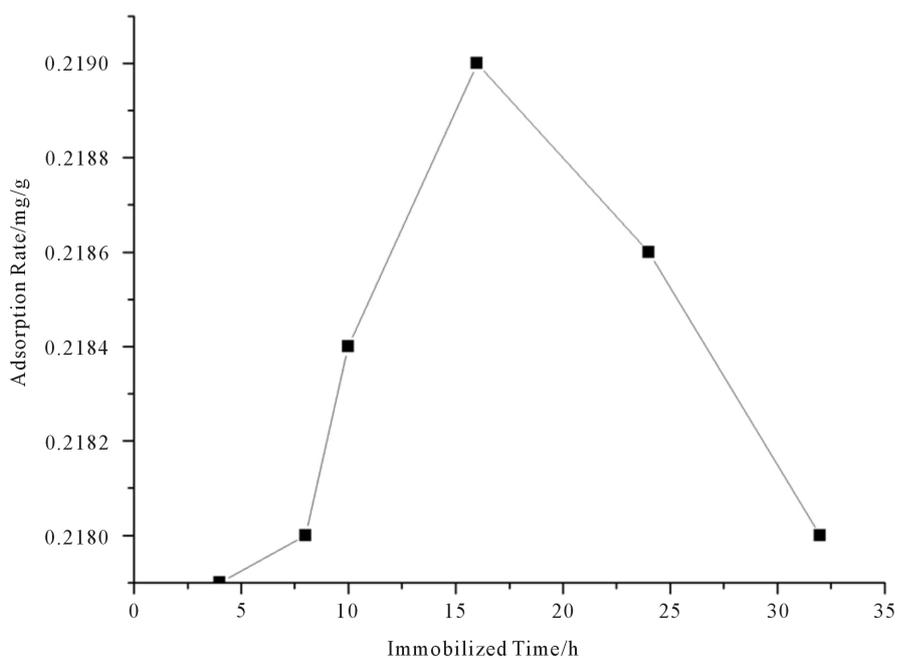


Figure 8. The effect of different immobilization time on the rate of protein adsorption
图 8. 不同固定化时间对蛋白吸附率的影响

将 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7% (体积分数)的戊二醛加入磁性纳米微球处理后, 进行 AChE 固定, 计算各浓度下酶活回收率 η 考察戊二醛用量对固定化酶的影响。

图 9 是戊二醛浓度在 0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 下对蛋白吸附率的影响。由图可看出戊二醛浓度在 0.05 时蛋白吸附率达到最大值。其余浓度下蛋白吸附率基本不变。

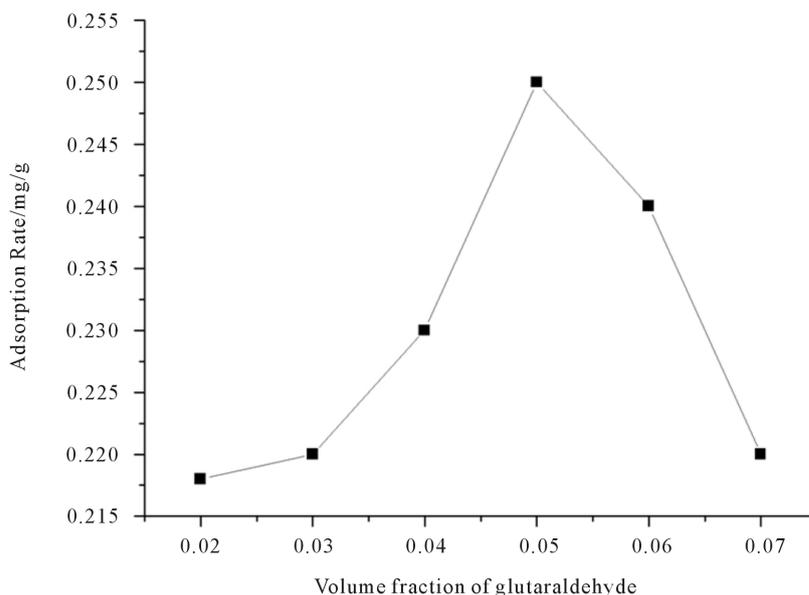


Figure 9. The effect of different glutaraldehyde concentration on the rate of protein adsorption

图 9. 不同戊二醛浓度对蛋白吸附率的影响

综上所述, 固定化酶的最优条件是酶蛋白浓度 1.5 U/mL, 反应温度为 35°C 反应 PH 为 8, 固定化时间是 15 h, 戊二醛浓度为 0.5%。

4. 结论

1) 通过一种简单有效的溶剂热还原法, 以 FeCl_3 、乙二醇、醋酸钠、盐酸多巴胺为原料合成出了多巴胺修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子, 后用戊二醛共价偶联, 随后用于固定化乙酰胆碱酯酶的应用研究。

2) 通过透射电镜、红外光谱、X-ray 单晶结构衍射、磁性能分析等测试手段对实验产物的晶体结构进行表征。结果表明获得的多巴胺修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子的粒径约为 10~20 nm。红外光谱、X-ray 衍射的结果表明对磁性纳米粒子进行的表面修饰是有效的。磁性能分析说明多巴胺修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子, 其饱和磁化值为 75.0 emu/g, 具有十分优秀的磁性能, 并且固定化酶后容易进行控制和再次回收。

3) 将磁性纳米粒子用于乙酰胆碱酯酶的固定化应用研究表明, 固定化酶的最优条件是: 最优条件是酶蛋白浓度 1.5 U/mL, 反应温度为 35°C 反应 PH 为 8, 固定化时间是 15 h, 戊二醛浓度为 0.5%。这种溶剂热合成磁性纳米粒子的方法有望得到更广泛的应用。

基金项目

国家自然科学基金(41406090)、青岛农业大学高层次人才启动基金(No. 631302)。

参考文献 (References)

- [1] 张效岩, 王英, 张亚非. 磁性纳米粒子的制备及应用[J]. 磁性材料及器件, 2004, 35(6): 14-17.
- [2] Frenkel, J. and Dorfman, J. (1930) Spontaneous and Induced Magnetization in Ferromagnetic Bodies. *Nature*, **126**, 274-275. <https://doi.org/10.1038/126274a0>
- [3] Chen, M., Liu, J.P. and Sun, S. (2004) One-Step Synthesis of FePt Nanoparticles with Tunable Size. *Journal of the American Chemical Society Jacs*, **126**, 8394-8395. <https://doi.org/10.1021/ja047648m>

- [4] Zhou, S., Varughese, B., Eichhorn, B., *et al.* (2005) Pt-Cu Core-Shell and Alloy Nanoparticles for Heterogeneous NO_x Reduction: Anomalous Stability and Reactivity of a Core-Shell Nanostructure. *Angewandte Chemie International Edition*, **44**, 4539-4543.
- [5] Teng, X. and Yang, H. (2003) Synthesis of Face-Centered Tetragonal FePt Nanoparticles and Granular Films from Pt@Fe₂O₃ Core-Shell Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 14559-14563. <https://doi.org/10.1021/ja0376700>
- [6] Zhao, F., Zou, Y., Lv, X., *et al.* (2015) Synthesis of CoFe₂O₄-Zeolite Materials and Application to the Adsorption of Gallium and Indium. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **60**, 1338-1344. <https://doi.org/10.1021/je501039u>
- [7] Gao, J., Gu, H. and Xu, B. (2009) ChemInform Abstract: Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Cheminform*, **42**, 1097.
- [8] Stephen, J.B., Yvonne, W., Anthony, D., *et al.* (2007) "Jelly Dots": Synthesis and Cytotoxicity Studies of CdTe Quantum Dot-Gelatin Nanocomposites. *Small*, **3**, 1152-1156. <https://doi.org/10.1002/sml.200700090>
- [9] 林本兰, 沈晓冬, 崔升. 纳米四氧化三铁磁性微粒的表面有机改性[J]. 无机盐工业, 2006, 38(3): 19-21.
- [10] 洪若瑜. 磁性纳米粒和磁性流体制备与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 3-5.
- [11] 李玉宝. 纳米生物医药材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 141-144.
- [12] 李小冬, 吴嘉, 贾东晨, 等. 固定化酶的研究方法概述[J]. 中国酿造, 2011(11): 5-9.
- [13] 刘秀伟, 司芳, 郭林, 等. 酶固定化研究进展[J]. 化学工业, 2003, 21(4): 12-17.
- [14] Yew, Y.P., Shameli, K., Miyake, M., *et al.* (2016) Green Synthesis of Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) Extract. *Nanoscale Research Letters*, **11**, 276. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1498-2>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-7613, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: ms@hanspub.org