

Наноалмазы для биологических исследований

© В.С. Бондарь, А.П. Пузырь

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук,
660036 Красноярск, Россия

E-mail: apuzyr@mail.ru

Сообщается о получении из наноалмазов, выпускаемых в России, наночастиц с модифицированной поверхностью. Приводятся некоторые свойства модифицированных наноалмазов, их гидрозолей и органо-золей. Данные исследования проведены биофизиками и ориентированы на придание наночастицам свойств, позволяющих адаптировать их для решения биологических задач.

Занимаясь в течение ряда лет изучением возможности применения наноалмазов (НА) в биологических исследованиях [1–3], мы пришли к выводу, что НА дотонационного синтеза, имея несомненные достоинства, обладают, с точки зрения биологов и биохимиков, рядом недостатков. К ним можно отнести: невозможность получения устойчивых гидрозолей без обработки ультразвуком; трудности в получении строго определенных концентраций НА в гидрозолях; образование агрегатов НА при автоклавировании гидрозолей (широко распространенный метод стерилизации в биологии и медицине); образование агрегатов НА в процессе замораживания гидрозолей и последующего оттаивания льда (прием, часто применяемый для стабилизации свойств биологических препаратов при длительном хранении). Поэтому мы предприняли попытку модифицировать поверхность наночастиц, стремясь придать им свойства, желательные для биологических исследований.

В экспериментах использованы НА, синтезированные в Отделе физики нанодисперсных материалов Красноярского научного центра (ОФНМ) и Федерального научно-производственного центра „Алтай“, г. Бийск (ФНПЦ). Выбор НА определялся тем, что существуют два типа порошков, которые после добавления воды и обработки ультразвуковым диспергатором образуют или не образуют устойчивые длительное время гидрозоли. НА, синтезированные в ОФНМ методом [4] и прошедшие химическую очистку методом [5], обладают способностью образовывать устойчивые гидрозоли. ФНПЦ выпускает несколько видов НА с различными свойствами, однако мы проводили эксперименты с образцами п. 1-3/91 и п. 30/92, из которых невозможно получить устойчивые гидрозоли.

Как известно, многие физико-химические свойства НА в значительной мере зависят от состава и свойств поверхности частиц, формируемой в процессе синтеза и химической очистки [6]. Вероятно, влиять на физико-химические свойства НА посредством модификации алмазного ядра практически невозможно. Поэтому изменить свойства НА можно только, модифицируя поверхность наночастиц. В результате изменения поверхности НА удалось получить модифицированные наноалмазы (МНА), лишенные перечисленных выше недостатков.

Данная статья посвящена описанию сравнительных характеристик НА и МНА и не включает описания технологии, по которой проводилась модификация частиц.

Необходимо отметить, что все образцы МНА обладают общими, достаточно близкими характеристиками, не зависящими от свойств исходных НА, которые могут существенно различаться по коллоидной устойчивости наночастиц. Поэтому мы не стали дублировать однотипные данные, а привели их для одного вида образца МНА с указанием производителя НА.

Важным параметром, определяющим устойчивость наночастиц в гидрозолях, является энергия электростатического отталкивания (ξ -потенциал). В зависимости от pH гидрозолей и способа очистки значения ξ -потенциала для НА (ОФНМ) находятся в диапазоне -30 — -38 mV [6,7]. Для МНА, полученных из них, ξ -потенциал смещен в область -50 — -52 mV. Согласно расчетам [7], такие изменения ведут к значительному возрастанию энергии электростатического отталкивания частиц, пропорциональному квадрату потенциала диффузного слоя (приравняваемого в разбавленных растворах электролитов к электрокинетическому потенциалу: $U_e \sim \Psi\delta^2$). Вероятно, такое увеличение электростатического фактора устойчивости дисперсной системы обес-

Таблица 1. Процентное содержание примесей в порошках исходных и модифицированных наноалмазов (ОФНМ)

Химический элемент	Порошок НА	Порошок МНА
Fe	5.7	1.20
B	1	1
Na	0.216	0.417
Ca	0.396	0.291
K	0.076	0.075
Cu	0.1	0.08
Al	0.03	0.02
Sr	0.055	0.02
Ti	0.2	0.1
Mg	0.034	0.002
Ni	0.006	0.004
Cr	0.0046	0.002
Sn	0.0016	0.0014
Pb	0.0015	0.0013
Mo	0.0004	0.0003
Mn	0.00033	0.00025
V	0.00012	0.000044
Ag	0.000093	0.000003

печивает повышенную агрегативную устойчивость гидрозолей МНА. Возможно, сказывается характерное для МНА уменьшение поверхностных примесей (табл. 1). Несмотря на то что пока не установлено точных причин наблюдаемых изменений, нам удалось получить МНА с принципиально новыми свойствами.

1. Гидрозоли

Как правило, получение гидрозолей НА возможно только после ультразвуковой обработки смеси порошка с водой. При этом устойчивые в течение длительного времени гидрозолы гарантировано получают при концентрации не более 1 wt.% [8]. Несмотря на „жесткий“ метод приготовления с использованием ультразвука, часть НА образует осадок, что приводит к изменению их количества в суспензии. Для выяснения истинного содержания НА приходится высушивать аликвоту гидрозоль и определять вес частиц. Обычно из НА можно только однократно получить гидрозоль. Уже после первого удаления дисперсионной среды и высушивания порошка в большинстве случаев невозможно повторно получить гидрозоль без его дополнительного механического измельчения, даже с помощью ультразвуковой обработки.

Порошки МНА обладают повышенной коллоидной устойчивостью частиц и образуют устойчивые гидрозолы уже при простом добавлении воды без применения ультразвукового диспергирования. Многократное удаление дисперсионной среды и последующее добавление воды к получаемому каждый раз сухому порошку МНА позволяют вновь получать устойчивую гидрозоль (рис. 1).

При изучении свойств наиболее существенные различия в устойчивости гидрозолей во времени наблюдались

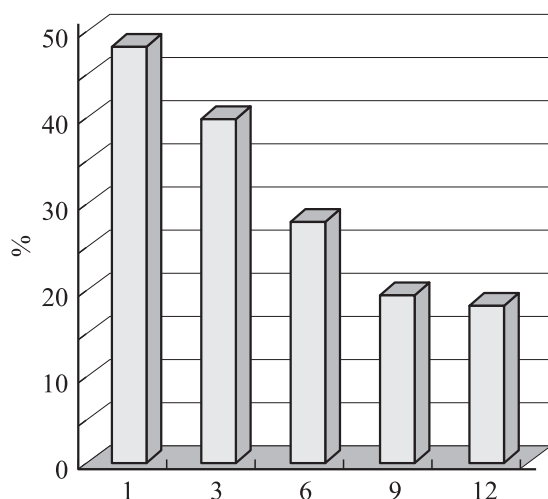


Рис. 1. Динамика содержания МНА в надосадочных жидкостях гидрозоль при 12 циклах удаления и добавления дисперсионной среды. Расчеты произведены из данных оптической плотности гидрозолей МНА (ФНПЦ) после их центрифугирования в течение 10 min при 16 000g. За 100% принята оптическая плотность исходной гидрозоль (первое добавление воды к порошку МНА) без центрифугирования.

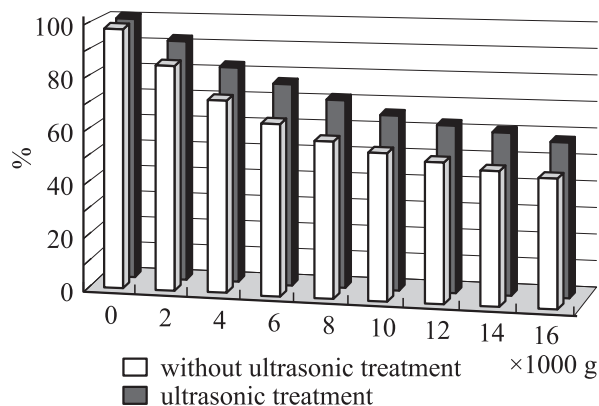


Рис. 2. Содержание МНА (ФНПЦ) в обработанных и необработанных ультразвуком образцах гидрозолей после их центрифугирования. Расчеты произведены из данных оптических плотностей исходных гидрозолей и надосадочных жидкостей после центрифугирования в течение 10 min при разных ускорениях. За 100% приняты оптические плотности исходных гидрозолей без центрифугирования.

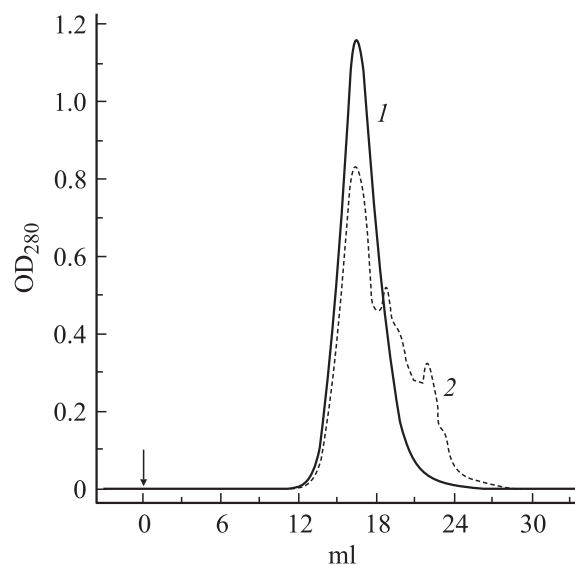


Рис. 3. Хроматография образцов на колонке с гелем Аса 22. 1 — гидрозоль МНА (ОФНМ), 2 — ферритин.

между исходными НА (ФНПЦ) и полученными из них МНА. Выше было указано, что эти НА даже после диспергирования ультразвуком не образуют устойчивую гидрозоль. Полученные из них МНА образуют гидрозоль при простом добавлении воды. Частицы (кластеры) в гидрозоль МНА невозможно полностью осадить даже центрифугированием при 16 000g в течение 10 min (рис. 2). Приведенные данные свидетельствуют о высокой коллоидной устойчивости частиц (кластеров). При этом необходимо отметить, что ультразвуковая обработка способствует еще большему увеличению коллоидной устойчивости МНА в гидрозоль.

С точки зрения биологов, к достоинствам гидрозолей МНА можно отнести также их повышенную коллоидную

устойчивость в растворах, применяемых в биологических исследованиях (буферные системы, питательные среды, физиологические жидкости), и возможность равномерного распределения наночастиц в агаровом геле.

У гидрозолей НА и МНА имеются существенные отличия в поведении при замораживании–оттаивании. В процессе образования кристаллов льда при замораживании гидрозолей НА наночастицы вытесняются из водной фазы и образуют крупные агрегаты. При таянии льда агрегаты НА выпадают в осадок и повторный перевод их в коллоидное состояние проблематичен. При образовании льда в гидрозолях МНА не наблюдается появления крупных агрегатов наночастиц, поэтому после таяния льда МНА сохраняют коллоидную устойчивость.

С образцами гидрозолей МНА можно проводить колоночную хроматографию (гель-фильтрация) без нарушений свойств матрицы сорбента. При гель-фильтрации на колонке размером 1×46.5 см при скорости потока 5 ml/h регистрируется выход частиц в виде одного пика (рис. 3). Можно предположить, что частицы МНА выходят в свободном объеме колонок, не проникая в поры гелевых частиц сорбента. Некоторая асимметрия пика, вероятно, свидетельствует о возможном слабом взаимодействии частиц с поверхностью гелевых шариков. Хроматография гидрозолей НА в тех же условиях приводит к их необратимой локализации в верхней части геля, на которую подается образец.

Использование МНА существенно упрощает приготовление гидрозолей с точной концентрацией наночастиц. Повышенная коллоидная устойчивость МНА позволяет снять ограничение по 1% содержанию частиц в устойчивых гидрозолях.

2. Органозоли

Получение устойчивых коллоидных систем из МНА возможно не только в воде, но и с использованием других дисперсионных сред. В табл. 2 приведены дисперсионные среды (характеристики растворителей взяты из [9]), в которых удастся получить коллоидные системы МНА.

Сухие порошки НА и МНА не способны в чистых органических растворителях образовывать коллоидные растворы (органозоли). Однако в отличие от НА органозоли МНА могут быть получены добавлением к сухому порошку смеси органический растворитель–вода. Например, добавление порошка МНА к 35–40% этанолу приводит к образованию органозоли без обработки ультразвуком.

Повышенная коллоидная устойчивость МНА позволяет сохранить устойчивость наночастиц и в смесях, образующихся при добавлении их гидрозолей к органическому растворителю. В некоторых случаях возможно получение устойчивых органозолей с большим содержанием органического растворителя (например, 80% этанол). В том случае, когда количество добавляемого органического растворителя превышает некоторое

Таблица 2. Растворители, образующие дисперсионные смеси, в которых получены устойчивые коллоидные растворы МНА (ОФНМ)

Растворитель	δ	δ_d	δ_o	δ_a	δ_h	η
Ацетон	9.4	6.8	5	2.5	0	0.79
1,2-дихлорэтан	9.7	8.2	4	0	0	
Этанол	11.2	6.8	4	5	5	1.2
Диметилформамид	11.5	7.9				1.26
Уксусная кислота	12.4	7.0				
Диметилсульфоксид	12.8	8.4	7.5	5	0	2.2
Вода	21	6.3	Большая			

δ — параметр растворимости (рассчитан по точке кипения);

δ_d — параметр дисперсионной растворимости;

δ_o — ориентационный (полярный) параметр растворимости (приблизительные значения);

δ_a — протоноакцепторный параметр растворимости (приблизительные значения);

δ_h — протонодонорный параметр растворимости (приблизительные значения);

η — вязкость (20°C).

пороговое значение, наблюдается образование мелко-дисперсного осадка. Перевести осадок в коллоидное состояние можно, снизив концентрацию органического растворителя добавлением воды.

Высокая устойчивость гидрозолей МНА, практически не зависящая от количества частиц, позволяет получать органозоли с высоким содержанием диспергируемой фазы.

Как правило, органозоли МНА проявляют высокую коллоидную устойчивость в широком диапазоне температур: от температуры кипения дисперсионной фазы до температуры ее замерзания. После оттаивания льда органозоль сохраняет коллоидную устойчивость. Например, органозоль МНА–этанол устойчива до температуры -82.5°C (температура задана с помощью кельвина-тора „ScienTemp“, USA), а также после оттаивания льда, полученного при ее замораживании в жидком азоте.

Ранее нами были показаны возможности применения НА в биотехнологических целях: экспрессное выделение из грубого белкового экстракта бактериальных клеток рекомбинантного белка [1], создание плоскостного люминесцентного биочипа [2]. Получение этих результатов стало возможным благодаря свойству НА адсорбировать белковые молекулы. Данные по исследованию адсорбции на МНА маркерного белка цитохрома С показали, что модификация поверхности наночастиц не привела к изменению их сорбционных свойств.

Необходимо отметить, что МНА не являются идеальными. Об этом, например, свидетельствует снижение их коллоидной устойчивости при многократном высушивании гидрозолей, вероятно, связанное с увеличением агрегации наночастиц (рис. 1). Однако, несмотря на это, для применения в биологических исследованиях МНА обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с НА. Применение МНА позволяет готовить устойчивые гидрозоли со строго определенной весовой

концентрацией частиц. После автоклавирования гидрозоли МНА не образуют осадок или агрегаты, что позволяет применять их в исследованиях, требующих асептических (стерильных) условий. Сохранение гидрозолями МНА коллоидной устойчивости после замораживания–оттаивания наравне с перечисленными выше свойствами позволяет считать их достаточно близкими к другим реагентам, используемым в биологических исследованиях. В некоторых случаях это позволяет не менять методические приемы и стереотипы, сложившиеся в этой области.

Таким образом, результаты работы сводятся к следующему.

1) Из наноалмазов, производимых в России, получены модифицированные наночастицы, обладающие „полезными“ свойствами, которые отсутствуют у исходного материала.

2) Работа по изменению свойств наноалмазов была направлена на их адаптацию к биологическим исследованиям. Однако модифицированные наночастицы, вероятно, могут быть использованы во всех областях, где требуется применение зольей наноалмазов с повышенной коллоидной устойчивостью или с минимальными размерами кластеров наночастиц, а так же предъявляются требования к высокой точности их содержания в золях.

Авторы признательны Г.А. Чигановой за измерение ξ -потенциала и полезное обсуждение полученных результатов, И.С. Ларионовой за предоставленные образцы наноалмазов, А.А. Степень и Г.К. Зиненко за проведение элементного анализа.

Список литературы

- [1] В.С. Бондарь, А.П. Пузырь. ДАН **373**, 2, 251 (2000).
- [2] К.В. Пургов, В.С. Бондарь, А.П. Пузырь. ДАН **380**, 3, 411 (2001).
- [3] А.П. Пузырь, С.В. Тарских, Г.В. Макарская, Г.А. Чиганова, И.С. Ларионова, П.Я. Детков, В.С. Бондарь. ДАН **385**, 4, 561 (2002).
- [4] А.М. Ставер, Н.В. Губарева, А.И. Лямкин, Е.А. Петров. ФГВ **20**, 35, 100 (1984).
- [5] А.С. Чиганов, Г.А. Чиганова, Ю.В. Тушко, А.М. Ставер. Патент РФ № 2004491, МКИ С 01 В 31 / 06. БИ **45–46**, 85 (1993).
- [6] Г.А. Чиганова. Коллоидный журнал **56**, 2, 266 (1994).
- [7] Г.А. Чиганова. Коллоидный журнал **62**, 2, 272 (2000).
- [8] Г.А. Чиганова. Коллоидный журнал **59**, 1, 93 (1997).
- [9] Современное состояние жидкостной хроматографии / Под ред. Дж. Киркланда. Мир, М. (1974). С. 106.