



УДК 577.3

Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора

1. Изучение условий синтеза золотых наночастиц в присутствии поверхностно-активных веществ

Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Поступила в редакцию 17.07.2009 г.

Аннотация

Изучены условия синтеза золотых наночастиц из хлороaurатоводородной кислоты и увеличения их агрегативной устойчивости за счет сорбции поверхностно активных веществ. Показано, что на процесс образования частиц влияет природа и концентрация восстановителя, электролита и pH. Оценено влияние полиэтиленгликоля и додецилсульфата натрия на образование адсорбционного защитного слоя на поверхности золотых наночастиц. Предложены методики синтеза наночастиц диаметром 5-80 нм.

Ключевые слова: золотые наночастицы, дисперсность, адсорбция, поверхностно-активные вещества, спектрофотометрия.

Conditions of synthesis gold nanoparticle from chloraurate acids and increases in their aggregate stability by means sorption of superficially active substances and sulphate compound are studied. It is shown that process of formation of particles is influenced by the nature and concentration of a reducer, electrolyte and pH. Influence of polyethyleneglycol and sodium dodecylsulfate on formation of adsorption protective layer on the surface gold nanoparticles are estimated. Synthesis techniques nanoparticle 5-80 nanometers in diameter are offered.

Key words: gold nanoparticle, dispersion, adsorption, surface activesubstances, thiocompound, spectrophotometry

Введение

В настоящее время для определения низко- и высокомолекулярных соединений применяют золотые наночастицы (AuNP), позволяющие повысить надежность ранней клинической диагностики опасных заболеваний, расширить перечень аналитических методик для определения следовых концентраций биологически активных соединений. Наиболее изучено применение золотых наночастиц (до 30-35 нм) в оптическом анализе и оптических сенсорах [1 - 5], основанное на плазмонном резонансе, а также в электрохимических сенсорах [6,7], предназначенных для определения глюкозы [8], фосфорорганических пестицидов [9] и др.

Коллоидные золотые наночастицы в пьезокварцевых гравиметрических сенсорах применяются значительно реже из-за неоднородности их размеров. Однако использование наночастиц с узкой степенью полидисперсности может существенно повысить чувствительность определения различных соединений.

Технология синтеза золотых наночастиц изучена достаточно подробно [10,11]. В то же время проблема стабилизации и повышения устойчивости AuNP исследована недостаточно. Наиболее известна методика синтеза золотых наночастиц Туркевича [12], основанная на восстановлении золотохлористоводородной кислоты раствором цитрата натрия.

Для повышения устойчивости частиц к коагуляции, изменяющей степень дисперсности системы, рекомендуется создание защитного адсорбционного слоя поверхностно активных веществ (ПАВ), увеличивающих электростатическое отталкивание одноименно заряженных частиц дисперсной фазы и сродство по отношению к белковым молекулам [13, 14].

Цель данной работы – исследование закономерностей получения монодисперсных золотых наночастиц из золотохлористоводородной кислоты с применением различных восстановителей, оптимизация условий синтеза, а также возможности повышения устойчивости AuNP путем сорбции поверхностно активных веществ.

Эксперимент

Были применены следующие реагенты: металлическое золото (сплав 585 пробы); цитрат натрия – $C_6H_5O_7Na_3$, (х.ч); гидроксиламин солянокислый – $NH_2OH \cdot HCl$, (х.ч); сахароза – $C_{12}H_{22}O_{14}$, (х.ч); хлорид олова(II) – $SnCl_2$, (х.ч.); $0,6 \cdot 10^{-3}$ - 0,6 М гидразин солянокислый – $N_2H_4 \cdot 2HCl$, (ч); аскорбиновая кислота – $C_6(OH)_4H_4O_2$, (х.ч), полиэтиленгликоль PEG 3000 (х.ч.) (FERAK), додецилсульфат натрия (SDS, 10 мг/л), 2-меркаптоэтиламин (цистамин) (Sigma), ангидрид s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты (Serva). Все реагенты применялись без дополнительной очистки. Использовались следующие концентрации восстановителей: цитрат натрия – 0,04 - 0,78 М, гидроксиламин солянокислый – 0,0014 - 1,44 М, хлорид олова – $0,4 \cdot 10^{-3}$ - 0,4 М, гидразин солянокислый – $0,6 \cdot 10^{-3}$ - 0,6 М, аскорбиновая кислота - $0,6 \cdot 10^{-3}$ - 0,6 М, сахароза – 0,58 - 2,34 М.

Размер полученных частиц определяли спектрофотометрически, с учетом [15-17]:

λ_{max} , нм	520	530	540	580
диаметр частиц (d), нм	15-20	30	50	70-80

Оценку дисперсности получаемых частиц осуществляли по спектрам поглощения в видимой области спектра. Число атомов в ядре мицеллы (n) рассчитывали с учетом атомного диаметра золота, равного 0,288 нм.

Результаты и обсуждение

Размер и степень дисперсности наночастиц зависят от природы и концентрации восстановителя, электролита, pH и применяемых стабилизаторов (ПАВ). Изучены условия синтеза коллоидных AuNP с применением цитрата натрия, гидроксиламина солянокислого, сахарозы, хлорида олова (II), гидразина солянокислого и аскорбиновой кислоты в среде цитратного буферного раствора.

Синтез золотых наночастиц, согласно классической модели Сведберга [18], протекает через ряд последовательных стадий:

1) Восстановление золотохлористоводородной кислоты с образованием высокопересыщенного раствора золота.

2) Нуклеация частиц. Получению устойчивых частиц коллоидного золота при оптимальной активности восстановителя предшествует образование зародышей новой фазы.

3) Образование коллоидных частиц, формирование двойного электрического слоя (ДЭС), включающего потенциалопределяющие ионы (AuCl_4^-) адсорбционного слоя и противоионы диффузионного слоя (H^+).

В зависимости от условий синтеза кристаллическое ядро коллоидной частицы может включать различное число атомов золота и иметь различный размер. На скорость образования зародышей и степень пересыщения раствора золота, и, следовательно, на получение частиц необходимого размера влияют природа (окислительно-восстановительный потенциал), концентрация восстановителя и pH среды.

При восстановлении HAuCl_4 цитратом натрия на поверхности коллоидных частиц адсорбируются отрицательно заряженные цитрат-, ацетондикарбоксилат- и дикарбоксилат – ионы [19-21], способствующие как дальнейшему восстановлению, так и стабилизации частиц. Изменение концентрации цитрата в интервале 0,04 – 1,16 М приводит к формированию наночастиц различного размера. При применении до 0,12 М раствора цитрата натрия образуется небольшое количество частиц с высокой степенью полидисперсности, что свидетельствует о низкой скорости возникновения зародышей и достаточно высокой конденсации частиц (при низкой степени пересыщения); при увеличении концентрации до 0,31 М эффективность восстановления возрастает, что наглядно демонстрируют спектры поглощения (рис. 1а), свидетельствующие об образовании частиц диаметром 40 нм со сравнительно узкой степенью дисперсности. Повышение концентрации свыше 0,31 М способствует формированию крупных полидисперсных ($d = 40-80$ нм) и нестабильных агрегатов. Вследствие того, что продукты восстановления золота сами его восстанавливают и возникают все новые центры образования зародышей, получаемые частицы коллоидного золота полидисперсны и очень неустойчивы [15].

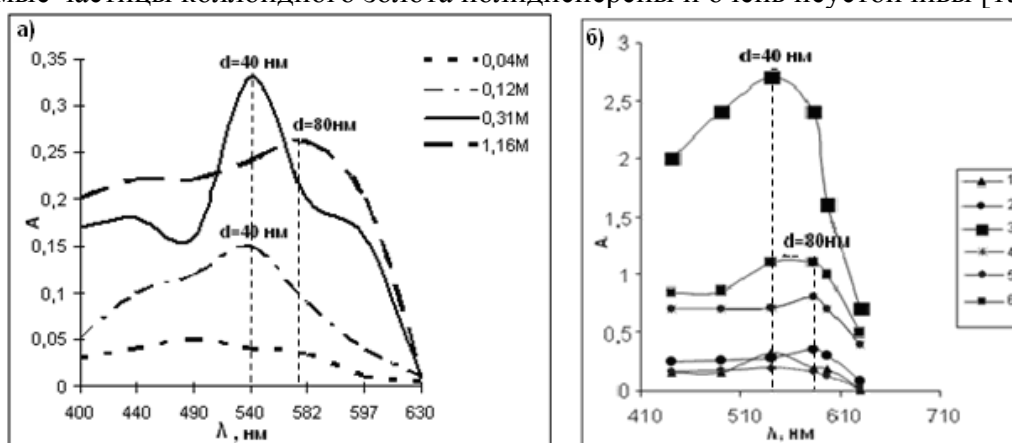
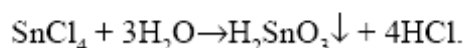
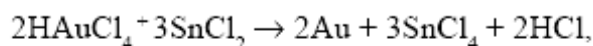


Рис. 1. Влияние концентрации цитрата натрия (а) и природы восстановителя (б) на размер и полноту протекания золотых наночастиц:

- б) 1-цитрат натрия (0,31 М), 2-гидроксиламин солянокислый (0,02 М), 3-хлорид олова (0,04 М), 4-гидразин (0,62 М), 5-аскорбиновая кислота (0,57 М), 6- сахароза (1,9 М)

Сопоставление результатов восстановления золотохлористоводородной кислоты гидроксиламином солянокислым, сахарозой, гидразином солянокислым, аскорбиновой кислотой и хлоридом олова (II) (рис. 1б) выявило наиболее активное образование коллоидных частиц при использовании последнего. В этом случае максимальное значение оптической плотности коллоидного раствора указывает на более полное протекание реакции восстановления, однако наблюдается формирование полидисперсных частиц, о чем свидетельствует размытая форма спектра поглощения (рис. 1б).

Применение хлорида олова как в щелочной, так и сильноокислой средах ограничивается образованием α -оловянной кислоты, что вызывает коагуляцию и оседание частиц из-за образования $m\text{SnO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ [22]:



Синтез наночастиц осуществляли в интервале pH 4,24 – 6,18. При проведении восстановления HAuCl_4 в слабокислой среде при pH 4,24 образуются частицы размером 5 нм, при дальнейшем повышении pH происходит формирование более крупных частиц: при pH 5,25 диаметром 10 нм, при pH 5,47 – 35 нм. Увеличение pH свыше 6,18 приводит к появлению крупных, неустойчивых, полидисперсных частиц (рис.2а).

Увеличение концентрации восстановителя (pH 4,24) смещает равновесие реакции коллоидообразования вправо и способствует образованию более мелких частиц, так как наблюдается высокая степень пересыщения и превалирование скорости образования зародышей над скоростью их роста. При применении 0,005 М хлорида олова наблюдается максимальный выход монодисперсных золотых наночастиц диаметра 5 нм (рис.2б). Напротив, снижение концентрации до 0,00125 М способствует укрупнению частиц до 15 – 30 нм, что может быть объяснено образованием небольшого числа зародышей и более продолжительной стадией роста частиц по сравнению с нуклеацией. Снижение концентрации SnCl_2 до 0,00075 М и ниже вовсе не приводит к коллоидообразованию.

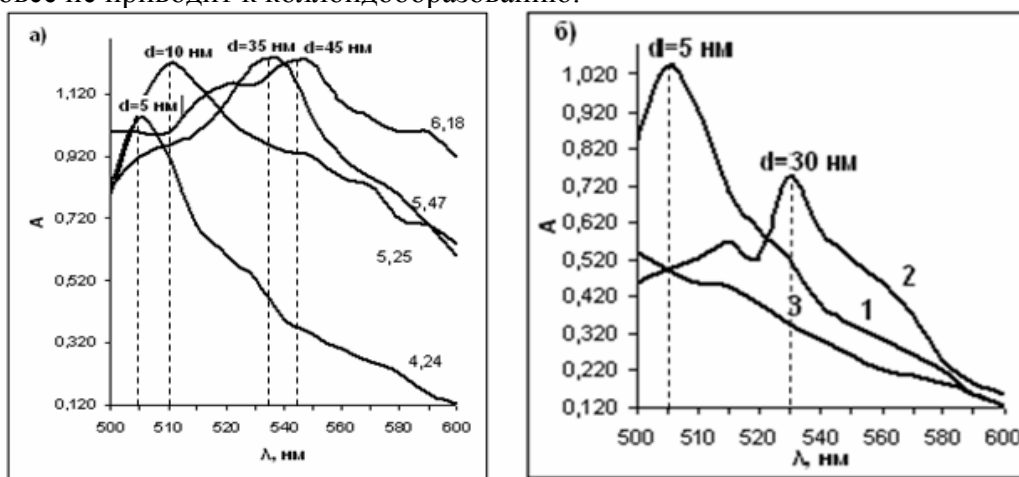


Рис. 2. Влияние pH ($C_{\text{SnCl}_2} = 0.04 \text{ M}$) (а) и концентрации хлорида олова (при pH 4,24) (б) : (C_{SnCl_2} : 1- 0,005 М 2- 0,00125 М, 3- 0,00075 М) на размер и дисперсность частиц коллоидного золота

Укрупнение коллоидных частиц золота может происходить при введении электролитов, которые при невысоких концентрациях повышают агрегативную

устойчивость, а в количествах, близких к порогу коагуляции вызывают седиментацию.

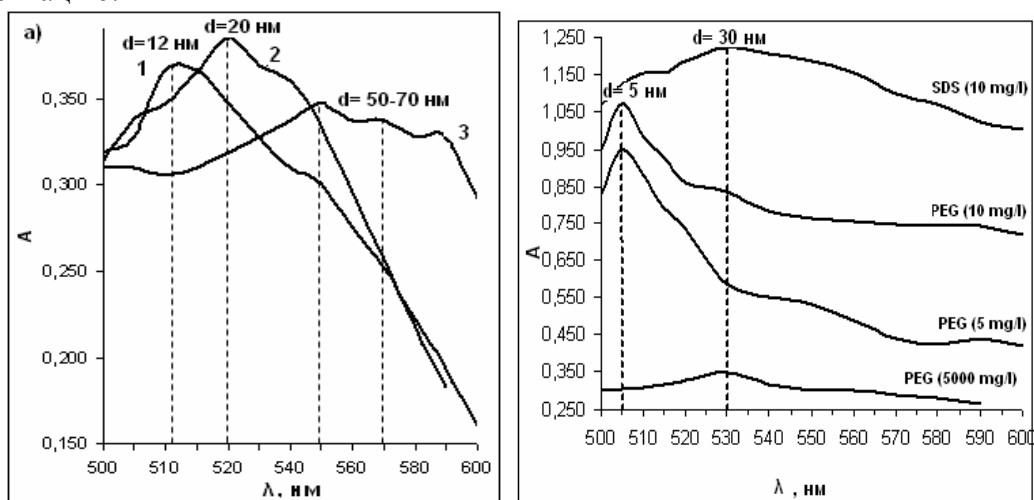


Рис 3. Влияние концентрации хлорида натрия (а): (1 – 0,006 М, 2 – 0,02 М, 3 – 0,6 М) и природы ПАВ (рН 4,24, $C_{\text{SnCl}_2} = 0,005 \text{ М}$) на размер и степень дисперсности золотых наночастиц.

При введении при синтезе до 0,006 М хлорида натрия электростатические силы отталкивания больше молекулярных сил притяжения. Агрегативная устойчивость системы при этом зависит от величины потенциального барьера, препятствующего непосредственному контакту частиц. Повышение заряда коллоидных частиц при введении NaCl происходит вследствие увеличения количества Cl^- -ионов в диффузионном слое мицеллы. Повышение концентрации до 0,6 М увеличивает избыточный отрицательный заряд на поверхности металла, который может компенсироваться положительными ионами Na^+ в близлежащем слое раствора. Возрастание ионной силы растворов способствует снижению броуновской подвижности частиц золя золота, сжатию ДЭС, что приводит к укрупнению агрегированных частиц диаметром 50-70 нм (рис.3б).

Применение аниогенных и неиогенных ПАВ повышает устойчивость коллоидных частиц при добавлении их на стадии синтеза. Эффективность стабилизации системы, включающей цитратный буферный раствор (рН 4,2), 0,03 мМ золотохлористоводородной кислоты и 0,005 М хлорида олова, зависит от гидрофильности и заряда добавляемого ПАВ, способности адсорбироваться на поверхности золота и степени заполнения этой поверхности.

Синтез наносфер в присутствии водных растворов полиэтиленгликоля PEG и додецилсульфата натрия SDS (10 мг/л) способствует повышению устойчивости монодисперсного коллоида золота, препятствуя их слипанию в более крупные агрегаты. Применение SDS приводит к образованию частиц широкого фракционного состава, в то время как PEG, сворачиваясь определенным образом в растворе и на поверхности растущих кристаллов металла, ограничивает их рост и способствует получению частиц диаметром 5 нм (рис.3б) [23, 24]. Поверхностная организация мицеллы таким образом формирует стабильное новое функциональное поверхностное покрытие с уникальной макромолекулярной архитектурой, необходимое для дальнейшего взаимодействия с биомолекулами [23]. Однако чрезмерное увеличение концентрации PEG (свыше 5000 мг/л) затрудняет синтез коллоидных частиц, образуя на поверхности несколько мономолекулярных слоев, что может привести к потере способности к связыванию с биомолекулами.

Таким образом, проведенное исследование позволило обосновать условия синтеза AuNP различного размера с применением в качестве восстановителя хлорид олова (табл. 1).

Таблица 1. Влияние условий синтеза на размер получаемых золотых наночастиц (восстановитель хлорид олова)

Условия синтеза	λ , нм	d, нм	n
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,005 М SnCl ₂ , pH 4,24	505	5	17
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,005 М SnCl ₂ , pH 6,18	540-550	40-50	139 – 174
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,00075М SnCl ₂ , pH 4,24	530	30	104
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,005 М SnCl ₂ , PEG, pH 4,24	505	5	17
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,005М SnCl ₂ , SDS, pH 4,24	530	30	104
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,005М SnCl ₂ , 0,006 М NaCl, pH 4,24	512	12	42
0,03 мМ HAuCl ₄ , 0,005М SnCl ₂ , 0,6 М NaCl, pH 4,24	550-570	50-70	174 - 243

Синтезированные по разработанным методикам золотые наночастицы узкодисперсной фракции могут быть применены при разработке аффинного пьезокварцевого ДНК – сенсоров.

Заключение

Показано, что адсорбция полиэтиленгликоля на поверхности золотых наночастиц повышает их агрегативную устойчивость, а изменение соотношения концентраций золотохлороводородной кислоты и хлорида олова (pH 4,24) позволяет управлять размером AuNP. Для получения частиц диаметром 5 нм в цитратном буферном растворе в присутствии полиэтиленгликоля (10 мг/л) необходимо поддерживать соотношение концентраций HAuCl₄ и SnCl₂ 1 : 6, диаметром 30 нм - 1 : 40. Частицы размером 50 нм и более могут быть получены при введении 0,6 М хлорида натрия и pH 6,18.

Список литературы

1. Jorge Pérez-Just e, Isabel Pastoriza-Santos, Luis M. Liz-Marzán, Paul Mulvaney. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications// Coordination Chemistry Reviews. 2005. V. 249. P. 1870–1901.
2. Штыков С. Н., Русанова Т. Ю. Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения// Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2008. Т. LII, № 2. С. 92-100.
3. Prashant K. Jain, Xiaohua Huang, Ivan H. El-Sayed and Mostafa A. El-Sayed. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in

Imaging, Sensing, Biology, and Medicine// *Acc. Chem. Res.* 2008 V. 41. № 12. P. 1578–1586.

4.Zhang Jin Z., Noguez Cecilia. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures// *Plasmonics*. 2009. V. 3:4. P. 127-150.

5.Newman. J. D. S., Roberts J. M., Blanchard G. J.. Optical Organophosphate Sensor Based upon Gold Nanoparticle Functionalized Fumed Silica Ge// *Anal. Chem.* 2007. V.79. № 9. P. 3448–3454.

6.Jena B. K. Raj C. R. Morphology dependent electrocatalytic activity of Au nanoparticles// *Electrochem. Commun.* 2008. V. 10. P. 951-954

7.Raj C.R., Jena B. K. Synthesis of flower-like gold nanoparticles and their electrocatalytic activity towards the oxidation of methanol and the reduction of oxygen// *Langmuir*. 2007. V. 23

8.Kurniawan F., Tsakova V., Mirsky V.M. Gold Nanoparticles in Nonenzymatic Electrochemical Detection of Sugars// *Electroanalysis*. 2006 V. 18 I. 19-20, P. 1937 – 1942.

9.Su S., He Y., Zhang M., Yang K., Song S., Zhang X., Fan C., Lee S.-T. High-sensitivity pesticide detection via silicon nanowires-supported acetylcholinesterase-based electrochemical sensors// *Appl. Phys. Lett.* 2008. V. 93 I. 2.

10. Lin C.A, Yang T.Y, Lee C.H, Huang S.H, Sperling R.A, Zanella M, Li J.K, Shen J.L, Wang H.H, Yeh H.I, Parak W.J, Chang W.H. Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications// *Nano*. 2009. V. 3(2). P. 395-401.

11. Sung K-M., Mosley D.V., Peelle B.R., Zhang S., Jacobson J. M. Synthesis of Monofunctionalized Gold Nanoparticles by Fmoc Solid-Phase Reactions// *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. V.126 (16). P. 5064–5065.

12. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss.Faradae Soc.* 1951. V. 11. P. 55-75.

13. Porter LA Jr, David JJ, Westcott SL, et al. Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides. *Langmuir* 1998. V. 14. P.73-78

14. Zhang J. Z., Noguez C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures// *Plasmonics*. 2008. V. 3 (4). P. 1557-1963.

15. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. – М.: Наука, 2008. – 319с.

16. Mecea V.M. Is quartz crystal microbalance really a mass sensor? // *Sens. Actuators*. 2006. V.128. P. 270–277.

17. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. // *Успехи химии*. 2007. Т. 76. № 2. С. 199-213.

18. Сведберг Т. Образование коллоидов. -Л.: Науч. хим.-техн. изд-во. 1927. -111 с.

19. Mirkin Ch. Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks // *Inorg. Chem.* 2000. V. 39. P. 2258-2272.

20. Shaw D. J., Introduction to Colloid and Surface Chemistry (4th. ed.), Butterworth-Heinemann, Oxford 1991.

21. Chen B. X., Narayanan R. and El-Sayed M. A., The chemistry and properties of nanocrystals of different shapes // *Chem. Rev.* 2005. V.105. P. 1025.

22. Tarozaitq R., Juškėnas R., Kurtinaitienė M., Jagminiienė A., Vaškėlis A. Gold colloids obtained by Au (III) reduction with Sn (II): preparation and characterization // *Chemija*. 2006. V. 17. № 2-3. P. 1-6

23. Wang C.-H. et al. Optimizing the size and surface properties of polyethylene glycol (PEG)–gold nanoparticles by intense x-ray irradiation// J. Phys. D: Appl. Phys. 2008. V. 41.
24. Kimura K., Yao H., Sato S. Self-assembling of gold and silver nanoparticles at a hydrophilic/hydrophobic interface: a synthetic aspect and superstructure formation // Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry. 2006. V. 36. P. 237-264.
-

Шашканова Ольга Юрьевна – аспирант кафедры химии Липецкий государственный технический университет, кафедра химии, Липецк

Ермолаева Татьяна Николаевна - д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии, Липецкий государственный технический университет, Липецк

Shashkanova Olga Yu. – Post-graduate Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. – D.Sc (Chemistry), Professor, Head of the Chemistry Department, Russia, Lipetsk State Technical University, Chemistry Department, Lipetsk, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru