

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

PRÍPRAVA POVRCHOVO MODIFIKOVANÝCH ZnO NANO- ČASTÍC PRE MOŽNOSŤ FLUORESCENČNÉHO BIO-ZOBRAZOVANIA

MICHAELA ŠIMŠÍKOVÁ^a a MARIÁN ANTALÍK^{a,b}

^a Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita P. J. Šafárika Košice, Šrobárova 2, 041 54 Košice,

^b Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied, Watsonova 47, 040 01 Košice
michaela.simsikova@gmail.com, antalik@saske.sk

Došlo 11.5.12, prepracované 3.2.13, prijaté 1.3.13.

Kľúčové slová: ZnO nanočastice, povrchová modifikácia, kyselina tioglykolová, fluorescenčné zobrazovanie

Úvod

Štúdium nanoštruktúr sa začalo v 50. rokoch minulého storočia a od tej doby nanotechnológie predstavujú priemelnú revolúciu. Objavených bolo množstvo nanomateriálov s využitím v priemysle, životnom prostredí i medicíne a tieto skutočnosti viedli k rýchlemu rozvoju syntézy nanočastíc rôznych veľkostí a tvarov.

Z hľadiska medicínskeho využitia majú nanoštruktúry veľký potenciál pri prenose liečiv, ľahkých alebo iných substancií k špecifickým bunkám v ľudskom tele; môžu byť využité k detekcii a / alebo liečbe príčin ochorení, či ochorení samotných tým, že minimalizujú degradáciu zdravých buniek^{1,2}. Integrácia nanotechnológie s biológiou vedie k ďalšiemu vývoju diagnostických zariadení, kontrastných činidiel, analytických prostriedkov^{3–5}, terapeutických aplikácií^{6–9} a distribučných prostriedkov liečiv⁸.

Pokroky v molekulárnej medicíne so sebou prinášajú potrebu optimálnej detekcie individuálnych biomolekúl, bunkových komponentov, ako i ďalších biologických entít. V centre pozornosti sú v poslednej dobe fluorescenčné polovodičové (II–VI skupina) nanočastice, ktoré sa oproti klasickým organickým fluoroforom vyznačujú úzkymi a symetrickými emisnými spektrami, ktoré závisia od veľkosti častíc; vysokým kvantovým výťažkom a výbornou fotostabilitou¹⁰. Polovodičové nanočastice s obsahom Cd (CdS, CdSe, CdTe) vykazujú značnú eko- a cytotoxicitu¹¹, preto neustále narastá záujem o nanočastice, ktoré sa vyznačujú nízkou toxicitou, ako i vysokou biokompatibilitou.

Podmienku netoxicity a biokompatibility spĺňa oxid zinočnatý, polovodič s priamym optickým prechodom a šírkou zakázaného pásma $E_g = 3,37$ eV a vysokou väzobnou energiou (60 meV). Na základe jeho unikátnych vlastností (antibakteriálne, katalytické, fotokatalytické, fyzikálne, chemické, elektrické a optické) je ZnO výborným kandidátom pre bio-zobrazovanie^{12–14}, ale i ďalšie aplikácie v medicíne, ako napr. tkanivové inžinierstvo¹⁵, či transport liečiv^{16–18}.

Fluorescenčný signál ZnO nanočastíc v biologických vzorkách značne narastá po inkorporácii do biosystému. Bio-aplikácie nanočastíc si však vyžadujú funkcionalizáciu ich povrchu, ktorá môže zvýšiť stabilitu a kontrolovaný rast nanočastíc, ako i vylepšiť ich dôležitými rozpoznávacími, transportnými, či katalytickými vlastnosťami, hydrofilnosťou alebo hydrofóbnosťou. Pomocou vhodnej funkčnej skupiny modifikátora môžu nanočastice interagovať s rôznymi druhmi biomolekúl – vitamínmi, peptidmi, sacharidmi, či väčšími molekulami, akými sú prírodné polyméry zahrňujúce proteíny, enzýmy, DNA a RNA¹⁹.

Napriek obrovskému potenciálu nanoZnO v oblasti bio-aplikácií, jeho výskum značne zaostáva za ostatnými existujúcimi nanočasticami, čo je spôsobené predovšetkým málo preskúmanými možnosťami syntézy, ako i nedostatočne pochopenými mechanizmami povrchovej modifikácie. V predkladanej práci popisujeme prípravu nanočastíc oxidu zinočnatého, ktorých povrch bol modifikovaný prostredníctvom kyseliny tioglykovej, ktorá sa kovalentne naviazala na povrch nanočastíc cez S-mostík, čím zaviedla do nanosystému karboxylovú funkčnú skupinu, ktorou sa nanočastice môžu viazať na biomolekuly.

Experimentálna časť

Chemikálie

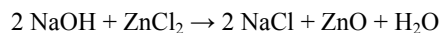
Chlorid zinočnatý ($ZnCl_2$, $\geq 98\%$) bol zakúpený od firmy Centralchem (Slovensko), hydroxid sodný (NaOH, $\geq 98\%$) a kyselina tioglykolová TGA ($HSCH_2COOH$, $\geq 99\%$) od firmy Sigma-Aldrich (USA). Počas všetkých experimentov bola používaná ultračistá voda pripravená na zariadení Millipore Synergy systém (Merck, Nemecko).

Príprava nanočastíc

Nanočastice oxidu zinočnatého boli pripravené zrážacou metódou podľa cit.²⁰ s malými modifikáciami, kde ako východiskové látky bol použitý chlorid zinočnatý a hydroxid sodný. Povrch pripravených nanočastíc sme funkcionalizovali počas procesu ich zretia prostredníctvom kyseliny tioglykovej.

0,06885 g chloridu zinočnatého (0,2 M, 2,5 ml) bolo rozpustených v ultračistej vode (Merck Millipore), násled-

ne 0,1 g hydroxidu sodného (ekvimolárne množstvo; 0,2 M, 12,5 ml) bol postupne pridaný k roztoku ZnCl_2 a kontinuálne miešaný počas 3 hodín pri izbovej teplote (25 ± 1 °C), výsledkom čoho bol mliečno-biely roztok. Priebeh reakcie popisuje rovnica:



Pri povrchovo modifikovaných nanočasticiach bol postup obdobný, iba s tým rozdielom, že do roztoku hydroxidu sodného bolo postupne pridaných 30 ml 0,1 M roztoku kyseliny tioglykovej a až po hodinovom nepretržitom miešaní bol pridaný k roztoku chloridu zinočnatého.

Získaná zrazenina bola niekoľkokrát centrifugovaná (Eppendorf 5804R centrifúga, 6 min, 15 000 rpm, 25 °C) a premytá ultračistou vodou a následne voľne ponechaná pri izbovej teplote k odpareniu prebytočnej vody a získaniu nanočastic v bielej práškovej forme.

Charakterizácia nanočastic

Atómová silová mikroskopia (AFM)

Vzorky pre AFM analýzu boli nanosené na povrch čerstvo očistenej sludy a ponechané počas 5 min k adsorpcii. Výsledné obrázky ZnO-TGA nanočastic boli získane použitím systému Innova AFM (Veeco Instruments) v tapping móde. AFM tip použitý k meraniam bol komerčný antimónom-dopovaný kremičitý kantilever (NCHV, Veeco Instruments) s nominálnym polomerom tipu 10 nm a rezonančnou frekvenciou 301–331 kHz. Získané dáta boli analyzované programom NanoScope Analysis (1.20) k určeniu veľkosti a morfológie skúmaných ZnO-TGA nanočastic.

Meranie zeta potenciálu a distribúcie podľa veľkosti častic

Malvern Zetasizer Nano ZS (4 mW, 633 nm laser) s MPT-2 autotitrátorom bol použitý k meraniu veľkosti častic a zeta potenciálu.

Priemerná veľkosť častic bola určená meraním distribúcie veľkosti častic pri 25 °C a pH 7,01, pričom koncentrácia meraných roztokov bola $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$.

K určeniu zeta potenciálu v závislosti od pH boli použité 0,01M HCl, 0,01M NaOH a 0,1M NaOH ako titračné činidlá. Vzorka bola pripravená rozdispergovaním $0,1 \text{ mg}$ nanočastic v 1 ml ultračistej vody a následnom ultrazvukovaní počas 1 min.

ATR infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (ATR-FTIR)

Infračervené ATR spektrá ZnO nanočastic modifikované tioglykolovou kyselinou boli merané Nicolet 8700 Fourier transform infrared spektrometrom (Thermo Scientific) vybaveným Smart OMNI-Sampler (diamantový kryštál), deuterovaným triglycerid sulfátovým (DTGS) detektorom a KBr deličom lúča. Všetky spektrá boli merané pri 64 skenoch, 4 cm^{-1} rozlíšení, 150 cm^{-1} apertúre, v rozsahu od 4000 do 400 cm^{-1} . Výsledné spektrá boli získané odčítaním pozadia, t.j. referenčného spektra vzduchu namieraného pred nanosením nanočastic na kryštál.

UV-vis a fluorescenčná spektroskopia

UV-vis spektrá ZnO-TGA boli merané v rozsahu vlnových dĺžok od 250 do 500 nm pomocou Shimadzu UV-3600 UV-vis-NIR fotospektrometrom so spektrálnym rozlíšením 2 nm. Roztoky pre UV-vis merania boli pripravené rozdispergovaním $0,0015 \text{ g}$ vzorky v 2 ml ultračistej vody a následne ultrazvukované do rozpustenia.

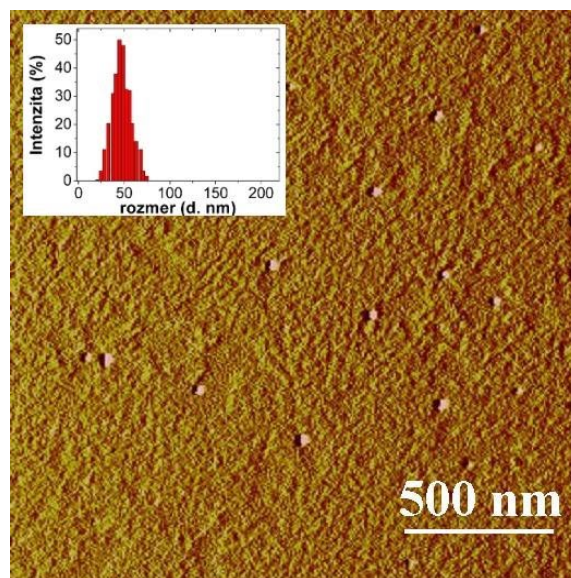
Fluorescenčné spektrá ZnO-TGA nanočastic boli merané Fluoromax 4 HORIBA Jobin Yvon spektrofluorometrom pri izbovej teplote v 1 cm kremennej kyvete. Pre merania emisných spektier bola použitá excitačná vlnová dĺžka pri 360 nm, pričom veľkosť štrbiny bola 5 nm. Vzorky boli pripravené rozdispergovaním 1 mg nanočastic v 7 ml ultračistej vody a následnom ultrazvukovaní počas 1 min.

Výsledky a diskusia

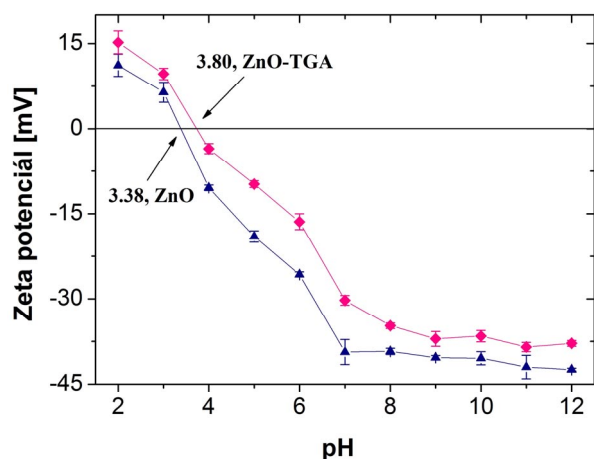
Atómovou silovou mikroskopiou sme študovali tvar a veľkosť pripravených nanočastic. Ako vidieť na obr. 1, nanočastice oxidu zinočnatého pokryté tioglykolovou kyselinou sú sférické, v 40–50 nm rozsahu.

Veľkosť nanočastic ZnO-TGA bola potvrdená prostredníctvom merania malouhlovým rozptylom, pričom priemerná veľkosť nanočastic bola okolo 45 nm v úzkom rozsahu (obr. 1, detail), čo naznačuje absenciu zagregovaných častic, ako i dobrú stabilitu materiálu.

Štúdium zeta potenciálu bolo vykonané k určeniu rozloženia náboja na povrchu nanočastic pri rôznych hodnotách pH (obr. 2). Hodnota zeta potenciálu modifikovaných ZnO nanočastic prostredníctvom kyseliny tioglykovej pri pH 2,02 je okolo 15,21 mV a pre pH 11,98 –



Obr. 1. Atómový silový mikrograf ZnO-TGA nanočastic. Detail zobrazuje distribúciu veľkosti modifikovaných nanočastic ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) pri pH 7,01 a teplote 25 °C



Obr. 2. pH závislost' zeta potenciálu ZnO nanočástic a ZnO nanočástic modifikovaných tioglykolovou kyselinou (0,1 mg ml⁻¹)

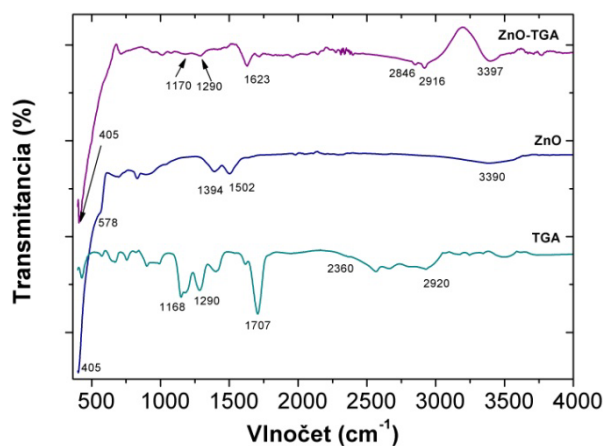
41 mV, pričom oproti nemoifikovaným ZnO nanočasticiam je posunutý ku kladnejším hodnotám. pH izoelektrického bodu pre ZnO-TGA nanočastice je okolo 3,80, t.j. zmena oproti nemoifikovaným častiam je o 0,42 jednotiek.

FT-IR merania boli prevedené na dôkaz úspešnej adsorpcie tioglykolovej kyseliny na povrch nanočastíc oxidu zinočnatého. Spektrum nanočastíc modifikovaných TGA (obr. 3) obsahuje pásy pri 3397, 2916, 2846, 1623, 1290, 1170 a 405 cm⁻¹. Široký pás pri 3397 cm⁻¹ prislúcha -OH skupine; pásy pri 2916 a 2846 cm⁻¹ korešpondujú so symetrickými a asymetrickými vibráciami alkánových skupín. Pomerne intenzívny signál pri 1623 cm⁻¹ odpovedá karboxylovej skupine C=O a slabšie pásy pri 1290 a 1170 cm⁻¹ súvisia s prítomnými C-O vibráciami naviazanej kyseliny. Signál pri 405 cm⁻¹ korešponduje s väzobnou vibráciou Zn-O skupiny.

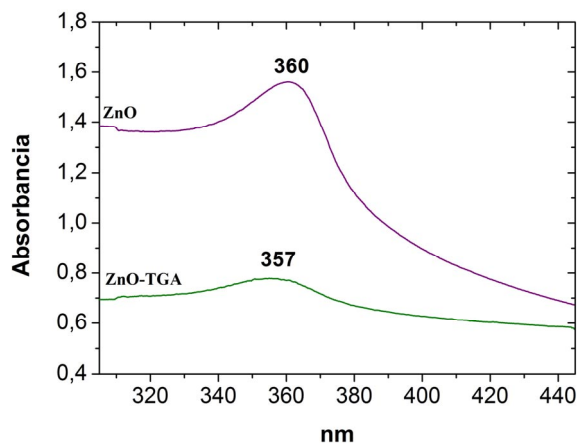
Nepřítomnosť signálu pri 2360 cm⁻¹, ktorý obsahuje spektrum samotnej tioglykolovej kyseliny a odpovedá S-H skupine, súvisí so vznikom ZnO-TGA komplexu interakciou medzi tiolovou skupinou -S⁻ a Zn²⁺.

Pohodlným spôsobom pre sledovanie formovania častíc je určenie optických vlastností, ktoré úzko súvisia s ich veľkosťou. Absorpčné maximum ZnO-TGA nanočastíc (obr. 4) oproti nefunkcionalizovaným nanočasticiam sa mierne posunulo k nižším vlnovým dĺžkam, t.j. z 360 nm na 357 nm. Oveľa väčší vplyv však mala povrchová modifikácia na zvýšenie rozpustnosti a z toho vyplývajúcu turbiditu.

Fluorescenčná spektroskopia je efektívnou metódou k určeniu optických vlastností a odhaleniu defektov ZnO. Spektrá ZnO nanočastíc obvykle obsahujú UV pás okolo 380 nm a emisný pás vo viditeľnej oblasti – pri 500 nm, teda v zelenej oblasti, alebo okolo 600 nm, t.j. v červenej viditeľnej oblasti, ktorý je dôsledkom prítomných nečistôt



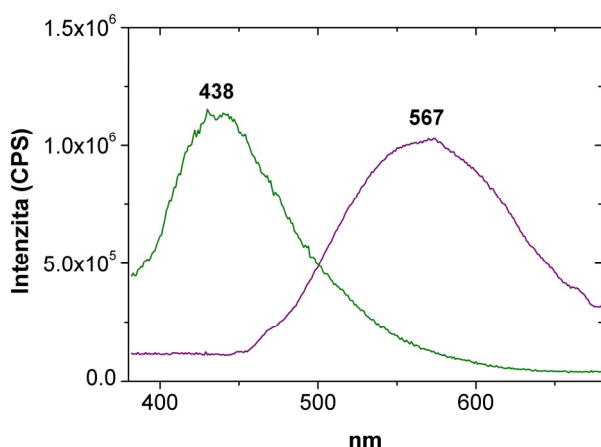
Obr. 3. FT-IR spektrá kyseliny tioglykolovej, ZnO nanočástic a ZnO-TGA nanočástic



Obr. 4. UV-vis spektrum ZnO a ZnO-TGA nanočástic. Mera-
nia boli vykonané v 1 cm kyvete, pH 7,01 a teplote 25 °C

a štruktúrnych defektov, akými sú kyslíkové vakancie alebo intersticiálny kyslík v mriežke ZnO^{21,22}.

K meraniu emisných spektier bola na základe meraní UV-vis spektroskopie, ako i literárnej rešerše vybraná excitačná vlnová dĺžka pri 360 nm. Pozícia emisného pásu použitím tioglykolovej kyseliny ako modifikátora bola posunutá k nižším vlnovým dĺžkam, t.j. z hodnoty 567 nm na 438 nm (obr. 5). Modrý posun emisného maxima bol pravdepodobne spôsobený redukčnými vlastnosťami tiola, teda vytesnením kyslíka sírou, čím došlo k zníženiu koncentrácie kyslíkových vakancií na povrchu nanočastíc. Na posun emisného pásu mala rovnako vplyv aj nižšia priemerná veľkosť nanočastíc v dôsledku dizagregačného účinku tioglykolovej kyseliny.



Obr. 5. Emisné spektrá ZnO a ZnO-TGA nanočastíc. Merania boli vykonané pri $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, v 1cm kyvete, pH 7,01 a teplote 25 °C

Záver

Bio-zobrazovanie je veľmi žiadané pre aplikácie v genetike, patológii, kriminológii, bezpečnosti potravín a mnohých iných odvetviach. Novú triedu materiálov s vysokým potenciálom pre bio-zobrazovanie v dôsledku svojej vysokej senzitivity a selektivity reprezentujú nanočastice oxidov kovov, ako napr. oxid zinočnatý (ZnO). Podmienkou pre aplikácie nanočastíc v biosystémoch je ich povrchová funkcionálna. Pripravili sme nanočastice ZnO potiahnuté kyselinou tioglykolovou o veľkosti 40 až 50 nm. Úspešná funkcionálna bola potvrdená priamo – pomocou FT-Ľ spektroskopie a meraním zeta potenciálu, ako i nepriamo, t.j. prostredníctvom optických techník.

Povrchovou modifikáciou boli syntetizované nanočastice, ktoré sú stabilnejšie a menej náchylné agregácií a vďaka fluorescenčným vlastnostiam a zabudovaným funkčným skupinám využiteľné v detekcii biomolekúl.

LITERATÚRA

- Hirsch L. R., Stafford R. J., Bankson J. A., Sershen S. R., Rivera B., Price R. E., Hazle J. D., Halas N. J., West J. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13549 (2003).
- Tkachenko A. G., Xie H., Coleman D., Glomm W., Ryan J., Anderson M. F., Franzen S., Feldheim D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4700 (2003).
- Fritzsche W., Taton T. A.: *Nanotechnology* 14, 63 (2003).
- Nath N., Chilkoti A.: *J. Fluoresc.* 14, 377 (2004).
- Sapsford K. E., Pons T., Medintz I. L., Mattoussi H.: *Sensors* 6, 925 (2006).

- Friedmann T.: *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratories Press, San Diego 1999.
- Teles F. R. R., Fonseca L. P.: *Talanta* 77, 606 (2008).
- Degim T., Çelebi N.: *Curr. Pharm. Des.* 13, 99 (2007).
- Dai C., Wang B., Zhao H.: *Colloids Surf., B* 41, 117 (2005).
- Alivisatos A. P.: *Science* 271, 933 (1996).
- Guo G., Liu W., Liang J., He Z., Xu H., Yang X.: *Mater. Lett.* 61, 1641 (2007).
- Senthilkumar K., Senthilkumar O., Yamauchi K., Sato M., Morito S., Ohba T., Nakamura M., Fujita Y.: *Phys. Status Solidi B* 246, 885 (2009).
- Tang X., Choo E. S. G., Li L., Ding J., Xue J.: *Chem. Mater.* 22, 3383 (2010).
- Zang J., Li C. M., Cui X., Wang J., Sun X., Dong H., Sunc C. Q.: *Electroanalysis* 19, 1008 (2007).
- Lee J., Kang B. S., Hicks B., Chancellor T. F., Chu B. H., Wang H. T., Keselowsky B. G., Ren F., Lele T. P.: *Biomaterials* 29, 3743 (2008).
- Cloninger M.: *Drug Discovery Today* 9, 111 (2004).
- Yuan Q., Hein S., Misra R. D. K.: *Acta Biomater.* 6, 2732 (2010).
- Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E.: *J. Controlled Release* 70, 1 (2001).
- Niemeyer C. M.: *Angew. Chem. Int.* 40, 4128 (2001).
- Ashtaputre S. S., Deshpande A., Marathe S., Wankhede M. E., Chimanpure J., Pasricha R., Urban J., Haram S. K., Gosavi S. W., Kulkarni S. K.: *Pramana – J. Phys.* 65, 615 (2005).
- Chen S. J., Liu Y. C., Ma J. G., Zhao D. X., Zhi Z. Z., Lu Y. M., Zhang J. Y., Shen D. Z., Fan X. W.: *J. Cryst. Growth* 240, 467 (2002).
- Cross R. B. M., De Souza M. M., Sankara Narayanan E. M.: *Nanotechnology* 16, 2188 (2005).

M. Šimšíková^a and M. Antalík^{a,b} (^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, Košice, ^bDepartment of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Košice): **Preparation of Surface-Modified ZnO Nanoparticles for Potential Fluorescent Biodetection**

ZnO nanoparticles show a big potential as a fluorescent probes in biological fields, such as bioimaging, bio-labeling and biodetection because of their unique optical properties. However, their surface modification is necessary for application in biosystems. We prepared 40–50 nm ZnO nanoparticles functionalized with thioglycolic acid (TGA) for applications in biosystems. The capping with the thiol acid was confirmed by zeta potential measurements and FT-IR spectroscopy. UV-vis and photoluminescence spectroscopies confirmed the effect of modification as well.