

高 Fe_3O_4 含量微米尺寸磁性复合微球的合成 及其在化学发光免疫检测中应用初探*

徐雅雯 徐 宏** 丁玮洁 古宏晨

(上海交通大学 Med-X 研究院纳米生物医学研究中心 上海 200030)

摘 要 采用种子乳液聚合方法制得了微米尺度的高磁性物质含量的磁性复合微球. 聚合体系中, 以 $0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 的 Fe_3O_4 磁性聚集体细乳液作为种子, 将苯乙烯, 二乙烯基苯作为聚合单体加入到磁性聚集体细乳液中, 对 Fe_3O_4 磁性聚集体进行溶胀后进行聚合. 研究了聚合过程中, 溶胀时间对复合微球形貌和磁性物质含量的影响, 获得系列形貌微球. 通过透射电镜 (TEM)、热重分析 (TGA)、红外分析 (FTIR)、振动样品磁强计 (VSM) 等表征手段对所制备的磁性聚合物微球进行分析表征. 结果显示, 所得到的磁性聚合物微球粒度为 $0.7 \sim 1 \mu\text{m}$, 尺寸分布较均一, 具有超顺磁性, 磁性物质含量为 29 wt% ~ 57 wt%. 然后又通过丙烯酸和苯乙烯共聚对微球表面羧基功能化后, 得到了表面羧基密度为 0.92 mmol/g 的微球, 再将所制备的微球与生物分子偶联后 (以 hCG 作为模式待检分子), 在化学发光免疫检测上进行了初步的应用, 取得了较好的应用结果.

关键词 磁性聚合物微球, 高磁性物质含量, 微米, 羧基, 形貌调控, 生物应用

近年来, 具有各种功能化表面与微观结构的磁性聚合物微球因其特殊的性能, 作为一种新型功能材料已经在生物医学, 食品检验检疫, 环境监测等诸多领域得到了广泛的应用^[1,2], 比如生物分子的分离^[3,4]、蛋白的纯化^[5]、靶向给药^[6]、核酸提取与检测^[7]等等, 因其巨大的应用前景而越来越受到人们的重视.

随着磁性聚合物微球在生物医学领域应用的普及, 人们对微球特性的要求也越来越高, 例如, 较好的粒径单分散性以实现其应用的稳定性, 高的磁性物质含量以实现高效且快速的分离操控, 表面功能化以拓宽应用领域与使用效率, 这些都成为确保微球实际应用而需要同时满足的特性^[3].

目前制备磁性聚合物微球的方法有很多, 主要包括, 悬浮聚合法^[8,9], 分散聚合法^[10,11], 乳液聚合法^[12,13], 细乳液聚合法^[14~16], 及在传统方法上的改进方法^[17~19]等. 悬浮聚合, 分散聚合作为传统制备方法具有操作简单, 工艺成熟, 且易于工业化的优点, 但同时所制备的微球通常存在着尺寸均一性不佳以及磁性物质含量普遍较低的问题. 程江^[9]等采用悬浮聚合法, 通过利用微米级磁粉来制备磁性多孔微球, 得到表面含有羧基官

能团, 粒径分布在 $0.4 \sim 0.9 \mu\text{m}$ 之间, 磁粉覆盖率为 12 wt% 的聚合物微球. 近年来, 人们发现细乳液聚合法因其自身特殊的反应机理而在合成高磁性物质含量的复合微球上具有明显优势^[14], 改进的乳液聚合法和细乳液聚合法作为新型制备方法在近几年发展迅速, 所制备微球的磁性物质含量和粒径均一性方面与传统方法相比得到了很大的提高. 其中, Ramírez^[15]采用二步细乳液法, 采用油酸修饰的磁性颗粒得到了磁性物质含量在 35 wt% 的聚合物磁性微球.

此外, 我们课题小组也创新性地提出了杂化细乳液的聚合方法, 制备得到的纳米尺寸的磁性复合微球, 不仅具有良好的尺寸均一性, 也具有很高的磁性物质含量 (77 wt%)^[17,18]. 但是, 由于反应机理的限制, 这些基于细乳液聚合法和杂化细乳液聚合法得到的微球大多为纳米与亚微米尺度 ($50 \sim 500 \text{ nm}$), 尽管具有很高的磁性物质含量且有较大的比表面积, 但由于本身体积较小, 在外磁场下的响应速度较慢, 不易于在实际应用中, 尤其在自动化操作中实现快速且高效的分离和操控.

针对这个问题, 我们采用了种子乳液聚合法, 以 Fe_3O_4 磁性聚集体细乳液作为种子, 以苯乙烯、二乙烯基苯作为聚合单体对种子进行溶胀, 制备

* 2009-12-10 收稿, 2010-01-25 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 20874061)、上海市纳米专项 (项目号 0852nm04100) 和上海交大医工交叉项目 (项目号 YG200712D04) 资助; ** 通讯联系人, E-mail: xuhong@sjtu.edu.cn

得到了 $0.7 \sim 1 \mu\text{m}$ 的磁性聚合物微球,并研究了溶胀时间对微球形貌的影响.所制备的磁性聚合物微球粒度分布均一,磁性物质含量为 $29 \text{ wt}\% \sim 57 \text{ wt}\%$.在此基础上,通过丙烯酸功能单体将微球表面进行羧基功能化后,我们采用得到的功能聚合物磁性微球作为载体,以人绒毛膜促性腺激素(hCG)为待检模式生物分子,进行了化学发光免疫检测^[20]的初步探讨.

1 实验部分

1.1 试剂

本文中所采用的 Fe_3O_4 磁颗粒聚集体细乳液,由上海奥润微纳新材料科技有限公司友情提供,乳液为平均 10 nm 左右的 Fe_3O_4 颗粒分散在油相中形成粒径为 $0.7 \mu\text{m}$ 的聚集体液滴组成,十二烷基硫酸钠(SDS)吸附在液滴表面,使之稳定存在于细乳液中.乳液的中磁性聚集体含量为 10 mg/mL .如图 1 所示,磁性聚集体具有规则的球形形貌,尺寸单分散性较好.

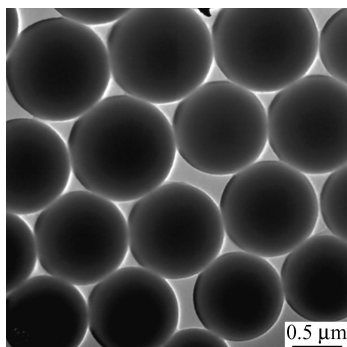


Fig. 1 TEM images of Fe_3O_4 magnetic aggregation

过硫酸钾(KPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)均为分析纯试剂,购自国药集团化学试剂有限公司;二乙烯基苯(DVB),95%化学纯,购自Sigma-Aldrich公司;苯乙烯(St)、丙烯酸(AA)均为化学纯试剂,购自国药集团化学试剂有限公司.将苯乙烯单体,用5% NaOH洗涤3次后再用去离子水洗涤3次,除去阻聚剂;将丙烯酸单体在 65°C 条件下减压蒸馏,除去阻聚剂,以上单体均放在 -20°C 冰箱里备用.

1.2 磁性复合微球的制备

称取 100 g 磁性聚集体细乳液(固含量 10 mg/mL)加入 250 mL 三口烧瓶中,将 1.0 g 苯乙烯单体与 0.4 g 二乙烯基苯单体混合后加入乳液中,在室温条件下,以 400 r/min 的搅拌速度,使

单体对 Fe_3O_4 磁聚集体进行溶胀一定时间.称取 0.02 g KPS作为引发剂加入,通氮气 30 min 后,放入 70°C 恒温水浴进行聚合反应 18 h .

1.3 羧基功能化磁性聚合物微球的制备

在外加磁场的作用下,将 1.2 节所制备得到的磁性复合物微球分离,用去离子水进行洗涤,除去产物中自聚的聚苯乙烯微球后,再加入 80 g 去离子水分散为磁性微球悬浮液.将此悬浮液置于 250 mL 三口烧瓶中,加入 0.01 g KPS后,通氮气 30 min ,加入 0.4 g 丙烯酸单体(AA)和 1 g 苯乙烯单体(St),放入 70°C 恒温水浴聚合反应 18 h .

1.4 免疫磁性聚合物微球的制备

取 2 mg 由 1.3 节制备得到的羧基磁性聚合物微球置于 2 mL 的离心管中,并加入 $200 \mu\text{L}$ 的活化洗涤液形成悬浮液,然后加入 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)和 *N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)各 2 mg ,室温反应 15 min .反应结束后,弃上清,用磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L 0.05% Tween 配置)洗涤磁性微球,并使之悬浮于 $500 \mu\text{L}$ 的磷酸盐缓冲液中,再加入 $300 \mu\text{g}$ 的抗人绒毛膜促性腺激素(hCG)的抗体,室温反应 2 h .反应结束后,检测上清液中的蛋白含量,计算磁性微球上抗体的固定量.再用磷酸盐缓冲液洗涤磁球 3 次后加入封闭液,室温反应 45 min ,得到表面固定有抗 hCG 抗体的免疫磁性聚合物微球.取 $30 \mu\text{g}$ 的免疫磁性聚合物微球,加入 $20 \mu\text{L}$ 的待检测抗原和 $100 \mu\text{L}$ 的酶标抗体,室温混匀 10 min , 37°C 水浴 1 h .反应结束后,用以 0.02 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 7.4 的三羟基甲基氨基甲烷(Tris)溶液洗涤 5 次,加入 $100 \mu\text{L}$ 的发光底物,混匀 1 min ,避光放置 5 min 后,上机进行化学发光检测.

1.5 测试表征

在外加磁场下作用下,将所制备的羧基功能化的磁性聚合物微球用去离子水多次洗涤,除去产物中自聚的聚苯乙烯微球和吸附于微球表面的残余表面活性剂后,用于各项性能的表征.

利用透射电镜(TEM, JEOL JEM22010)观察复合微球的微观形貌,粒径大小及其粒径分布,本文量取电镜照片中 100 个微球的直径计算平均值后作为微球的平均粒径.利用自动电导电位滴定仪(LabX Titrator, METTLER)来测定复合微球表面的羧基含量.

将洗涤过的磁性聚合物微球冷冻干燥后,用

热重分析仪(TGA, NETZSCH TG209)分析微球中的 Fe_3O_4 含量. 采用红外光谱(FIR, Spectrometer Bruker Equinox 55), 用 KBr 压片法制样, 对复合微球的成分与聚合物官能团进行表征. 采用振动样品磁强计(VSM Lake Shore 7407)在室温条件下测定复合微球的磁性能.

2 结果与讨论

2.1 羧基功能化磁性复合微球的制备

为制备高 Fe_3O_4 含量的微米尺度的复合微球, 本文采用了两步种子乳液聚合法. 首先, 磁颗粒聚集乳液($0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$)作为种子, 然后将苯乙烯和二乙烯基苯的单体混合物作为油相加入体系中, 由于相似相溶的作用, 单体会扩散到 Fe_3O_4 磁性聚集液滴中的有机相中, 对液滴进行溶胀, 使之成为溶胀有一定聚合物单体的磁性

聚集体液滴. 反应开始后, 由于与单体液滴相比具有相对较大的表面积, 该液滴捕捉水中被引发的单体自由基或自由基低聚物, 成为独立的反应场所, 开始聚合反应, 得到磁性复合微球. 然后, 将所制备得到的微球在外磁场帮助下, 以去离子水洗涤, 分散在水中作为种子, 再次加入苯乙烯以及功能单体丙烯酸, 进行第二次的种子乳液聚合, 丙烯酸与苯乙烯单体在微球表面共聚, 从而使微球表面羧基功能化.

2.2 羧基功能化磁性复合微球的表征

图2(a)的 TEM 电镜照片中可以看到, 所制备的磁性复合微球具有规则的球形形貌, 黑色的 Fe_3O_4 磁性物质弥散于整个复合微球中, 几乎没有明显的聚合物相, 说明了磁球具有较高的磁性物质含量, 如图所示, 微球具有均一的尺寸分布, 经测量后, 得到其平均直径为 $0.82 \mu\text{m}$.

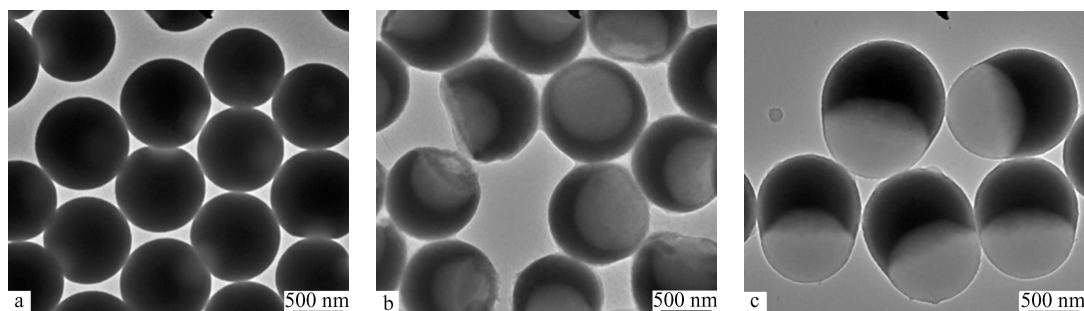


Fig. 2 TEM images of magnetic polymer composite microspheres with different swelling-time (a) 3 h, (b) 0.5 h and (c) 0 h

采用热重分析测试微球中的 Fe_3O_4 含量, 如图3所示. 聚合前, 磁颗粒聚集体的磁性物质含量为 74 wt% (曲线 a), 聚合后得到的磁性聚合物微球, 参照热失重曲线(b)可以看出有两个明显的失重区间, 分别是 $200 \sim 250^\circ\text{C}$, 为磁颗粒聚集体的油酸等小分子的分解, 失重率为 25 wt%; 在一个恒重阶段后, 在 $375 \sim 425^\circ\text{C}$ 微球中的聚合物(聚苯乙烯, 聚丙烯酸)发生了分解, 失重率为 18 wt%, 而在 500°C 后样品质量基本保持恒定, 故可经计算得到微球的磁性物质含量为 57 wt%, 具有较高的磁性物质含量.

本文采用红外光谱表征的方法来定性表征磁性复合微球中的组分. 图4为复合微球的红外光谱图, 如图所示在 586 cm^{-1} 处的强吸收峰对应为 Fe_3O_4 的特征峰 ($\text{Fe}-\text{O}$ 的弯曲振动); $2700 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ (苯环上 CH 伸缩振动带)、 1407 cm^{-1} (苯环的骨架振动) 为聚苯乙烯的特征峰; 在

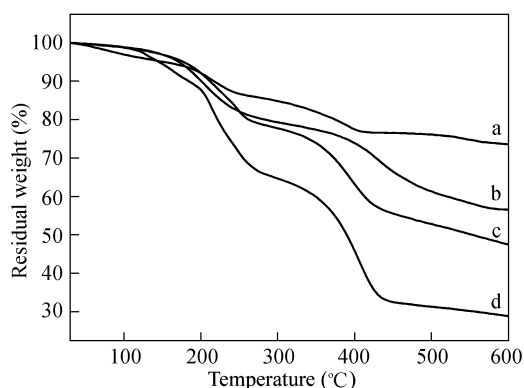


Fig. 3 TGA of (a) Fe_3O_4 magnetic aggregation, (b) ~ (d) composite microspheres using Fe_3O_4 magnetic aggregation as seeds with different swelling-time (b) 3 h, (c) 0.5 h, (d) 0 h

1714 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$)、 968 cm^{-1} ($-\text{OH}$) 为羧基的吸收峰, 表明所合成的磁性聚合物微球为中存在羧基.

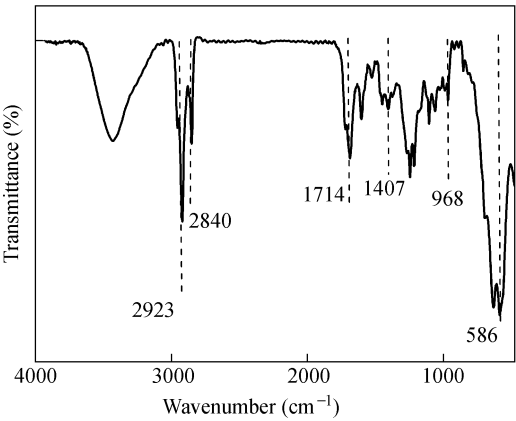


Fig. 4 FTIR spectrum of magnetic polymer composite microspheres

采用电导率滴定的方法^[21]来测定磁性聚合物微球表面的羧基含量,经滴定并计算得到磁性聚合物微球表面的羧基含量为 0.92 mmol/g.

利用振动样品磁强计(VSM)对复合微球的磁性能进行测试.如图 5 为 300 K 下 Fe₃O₄ 磁性高分子复合微球的室温磁滞回线,从图中可以看出其剩磁与矫顽力均为零,说明微球呈现出典型的超顺磁性的特征.

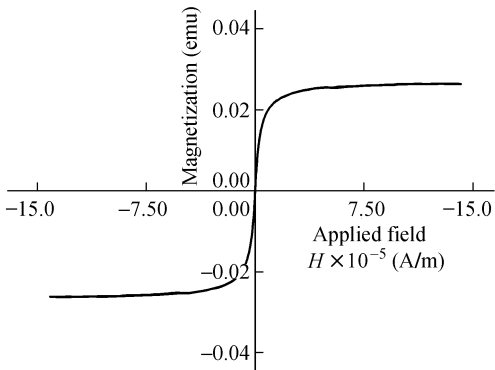


Fig. 5 Magnetization curve of magnetic polymer composite microspheres obtained by VSM at 300 K

2.3 溶胀时间对于磁性复合微球形貌的影响

溶胀时间是指在体系中,单体从单体液滴向磁性颗粒聚集体表面扩散过程的时间,溶胀过程的发生是因为,在体系中水相,单体液滴,磁性颗粒聚集体三相之间的相互作用以达到热力学平衡过程^[22].由于相似相溶作用机制,磁性聚集体中的有机相会与单体相溶胀直达到饱和^[23].

图 2 电镜中显示了不同的溶胀时间条件下所合成的磁性聚合物微球的形貌.单体溶胀 3 h 后进行聚合,微球中的磁性物质均匀分布在微球中,且微球呈匀称的球形.当溶胀时间缩短到 0.5 h,

磁性颗粒向微球的一侧发生部分的偏析,但微球基本还是保持了球形的形貌.而当完全没有溶胀时,微球内部发生了明显的相分离现象,磁性物质与聚合物分别位于微球的两侧,整个微球也从球形变为了胶囊形.

图 3 的热重分析中可以看到,(b),(c),(d)分别为不同溶胀时间聚合得到微球的热失重曲线,可以看到随着溶胀时间变短,复合微球的磁性物质含量也明显降低了,溶胀时间为 3、0.5、0 h 所对应的磁性物质含量分别为,57 wt%、47 wt%、29 wt%,这是由于复合微球中聚合物含量升高所引起的,这一结果也与电镜表征的结果相吻合,溶胀时间短,在发生偏析后,聚合物相的含量明显变多了.

电镜和热重分析结果均说明了,在本文的种子乳液体系中,溶胀时间对于微球的微观形貌有着极大的影响,这可能是因为溶胀时间决定了单体在反应前对磁性颗粒聚集体液滴的渗入情况,溶胀时间越长,单体与磁性聚集体中的有机相接触越充分,越不容易发生相分离,相反的,当完全没有溶胀时间时,单体在水相中引发后被磁性聚集体液滴捕获后就直接在微球的局部表面引发聚合,并不断从单体库中获得单体而逐渐聚合.关于溶胀时间对于磁性聚合物微球中聚合物含量的影响还有待进一步的研究.

2.4 磁性复合微球在化学发光免疫检测中的应用

我们将所制备的磁性复合微球与抗体偶联之后,制成免疫磁性复合微球,并以所制备的免疫微球为载体,以 hCG 为模式待检物,进行化学发光免疫检测^[1]的初步评价.图 6 是相对发光信号强

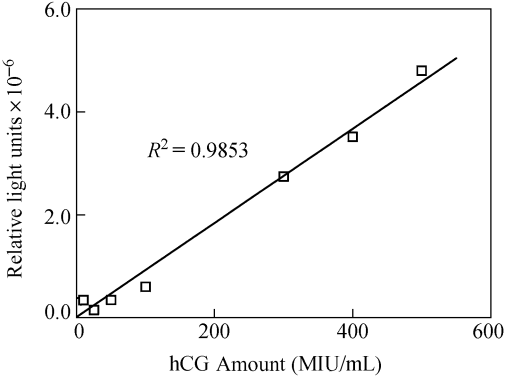


Fig. 6 The relative light units with increase of hCG concentration using magnetic polymer composite microspheres as carriers

度随 hCG 浓度变化的曲线,其中磁性微球表面抗 hCG 抗体的固定量可以通过在制备免疫磁珠时调节抗 hCG 抗体的加入量来控制,并通过检测上清液中的蛋白含量,对磁性微球上抗体的固定量进行计算. 从检测结果可以看到, hCG 浓度由 0 MIU/mL 增加到 500 MIU/mL,对应的相对发光信号强度也相应的从 2.98×10^5 增加到 4.08×10^6 ,检测曲线线性相关性较高($R^2 = 0.9853$). 因而初步证明了本文制备的羧基磁性复合微球适宜作为化学发光免疫检测的载体物质,在免疫检测中具有较好的应用前景.

3 结论

通过种子乳液聚合法,得到了微米尺寸(0.7

$\sim 1 \mu\text{m}$),粒径单分散性好,且具有高磁性物质含量的超顺磁性复合微球. 并研究了聚合过程中单体的溶胀时间对复合微球形貌以及磁性物质含量的影响,结果表明在没有或较少溶胀时间时,微球的微观形貌会发生偏析的现象,微球中磁性物质含量明显降低. 将微球表面进行羧基功能化后,将其应用于化学发光免疫检测中,取得了较好的应用结果,可以预见其作为新型载体材料在生物医学领域具有良好的应用前景.

REFERENCES

- 1 Hsing I M, Xu Y, Zhao W T. *Electroanalysis*, 2007, 19: 755 ~ 768
- 2 Li XiuTao(李秀涛), Huang JunSheng(黄军生), Zhang Yong(张勇), Guo Miao(郭淼), Yan Husheng(阎虎生). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2008, (7): 697 ~ 702
- 3 Safarik I, Safarikova M. *Biomagn Res Technol*, 2004, 2: 7
- 4 Nikitin L V, Stepanov G V, Mironova L S, Samus A N. *J Magn and Magn Mater*, 2003, 258: 468 ~ 470
- 5 Guo N, Wu D C, Pan X H, Lu M L. *J Appl Polym Sci*, 2009, 112: 2383 ~ 2390
- 6 Hu S H, Liu T Y, Huang H Y, Liu D M, Chen S Y. *Langmuir*, 2008, 24: 239 ~ 244
- 7 Vitharana S N, Wilson G S. *Genomics*, 2006, 87: 158 ~ 164
- 8 Li Handong(李汉东). *Journal of WuHan University of Technology*(武汉理工大学大学学报), 2006, (5): 24 ~ 26
- 9 Kong Sifang(孔丝纺), Wen Xiufang(文秀芳), Pi Pihui(皮丕辉), Chen Jiang(程江), Yang Zhuoru(杨卓如). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2008, (2): 168 ~ 173
- 10 Lee Y, Rho J, Jung B. *J Appl Polym Sci*, 2003, 89: 2058 ~ 2067
- 11 Qiu G M, Zhu B K, Xu Y Y. *J Appl Polym Sci*, 2005, 95: 328 ~ 335
- 12 Gu S, Onishi J, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 289: 419 ~ 426
- 13 Deng Jianguo(邓建国), He Chuanlan(贺传兰), Long Xiping(龙新平), Peng Yuxing(彭宇行), Li Pei(李蓓), Chen Xinzi(陈新滋). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2003, (3): 393 ~ 397
- 14 Landefster K. *Adv Mater*, 2001, 13: 765 ~ 769
- 15 Ramírez L P, Landfester K. *Macromol Chem Phys*, 2003, 204: 22 ~ 31
- 16 Shang H, Chang WS, Kan S, Majetich SA, Lee G U. *Langmuir*, 2006, 22: 2516 ~ 2522
- 17 He Ping(贺坪), Cui Longlan(崔陇兰), Qiang Weili(强伟丽), Xu Hong(徐宏), Gu Hongchen(古宏晨). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2007, (8): 731 ~ 736
- 18 Xu H, Cui L L, Tong N H, Gu H C. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 15582 ~ 11583
- 19 Gong Tao(龚涛), Wang Changchun(汪长春). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2008, (11): 1037 ~ 1042
- 20 Wang X, Lin J M, Ying X T. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 598: 261 ~ 267
- 21 Seigou K, Ahmad Y, Mitchell A W. *J Colloid Interface Sci*, 1995, 176: 362 ~ 369
- 22 Ugelstad J, Mork P C, Kaggerud K H, Ellingsen T, Berge A. *Adv Colloid Interface Sci*, 1980, 13: 101 ~ 140
- 23 Frank M, Oliver M, Christian P, Abdelhamid E. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2006, 44: 2642 ~ 2656

PREPARATION AND BIO-APPLICATION OF MONODISPERSE COMPOSITE MICROSPHERES WITH HIGH Fe_3O_4 CONTENT

XU Yawen, XU Hong, DING Weijie, GU Hongchen

(*Nano Biomedical Research Center, Med-X Research Institute, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030*)

Abstract Monodisperse superparamagnetic polymer composite microspheres with high magnetite content were prepared by seed emulsion co-polymerization. In this system, $0.7 \sim 0.8 \mu\text{m}$ Fe_3O_4 magnetic aggregation droplets which were consisting of Fe_3O_4 nanoparticles with an average particle size of 10 nm were severed as seeds and droplets of styrene and divinylbenzene were used as monomers to swell the seeds before the polymerization. The influence of the swelling time on the morphology and magnetite nanoparticles content of the composite microspheres was also investigated. The obtained microspheres with diameter of $0.7 \sim 1.0 \mu\text{m}$ were superparamagnetic and with the magnetite nanoparticles content of 29 wt% $\sim$ 57 wt%, which were extensively characterized by transmission electron microscopy (TEM), thermo-gravimetric analysis (TGA), Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and vibrating sample magnetometer (VSM). By adjusting the swelling time, a series of microspheres with different morphologies were also obtained and characterized. The result indicated that the degree of phase separation of the obtained microspheres increased when the swelling time decreased. On the other hand, the carboxyl group was introduced onto the surface of the above magnetic microspheres *via* a two-step seed emulsion co-polymerization using acrylic acid as a functional polymeric monomer. After that, the as synthesized superparamagnetic polymer composite microspheres with carboxyl groups (the density of carboxyl group was about 0.92 mmol/g beads) were conjugated with the bio-molecules (hCG was used as a model detection of bio-molecules in this study) and then applied into the chemiluminescence immunoassay. The obtained well performance showed the feasibility of the microsphere to be used as a potential and promising material for bio-detection.

Keywords Magnetic composite microspheres, High magnetic content, Micron, Carboxyl group, Morphology manipulation, Bio-application