复合材料学报 Acta Materiae Compositae Sinica
第 25 卷 第 6 期 12 月 2008 年
Vol. 25 No. 6 December 2008

文章编号：1000-3851(2008)06-0186-06

氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的制备及应用

陈丽娜[1]，舒孟军[2]，薛 莲[3]，周光明*[1]，曾献生[2]，盛蓉生[2]

(1. 西南大学 化学与化工学院，重庆 400715；2. 卡南吉医药技术(上海)有限公司，上海 201203；
3. 西南大学 生命科学学院，重庆 400715)

摘 要： 采用溶胶-凝胶法通过正硅酸四乙酯(TEOS)碱催化水解，在 Fe_3O_4 纳米粒子表面包裹氧化硅。利用生物倒置显微镜、场发射透射电镜、X 射线衍射仪、激光粒度仪、振动样品磁强计对氧化硅/Fe_3O_4 复合粒子的外貌、粒径及粒径分布、饱和磁化强度、化学成分进行了表征。结果表明，所制得的复合粒子性能良好，粒径在 15 nm 左右，饱和磁化强度为 10.9 emu/g。用该磁性纳米复合粒子提取质粒 DNA 和基因组 DNA 取得良好的效果，可用于食品中致病菌的分析判定和疾病的基因诊断分析。

关键词： 氧化硅-Fe_3O_4 复合纳米粒子；TEOS 水解；核酸提取；PCR 扩增

中图分类号： O69；TB332 **文献标志码：** A

Preparation and application of silica coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

CHEN Lina[1], SHU Mengjun[2], XUE Lian[3], ZHOU Guangming*[1], ZENG Xiansheng[2], SHENG Rongsheng[2]

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Challenge Meditech Company, Ltd., Shanghai 201203, China;
3. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Silica was coated on the surface of magnetite nanoparticles by the sol-gel method and alkali catalyzing hydrolysis of tetraethyl orthosilicate (TEOS). Inversion biomicroscope, field emission transmission electron microscope, X-ray diffraction, laser particle size analyzer and vibrating sample magnetometry were used to characterize the appearance, size and size distribution, magnetic characteristics, crystal structure and chemical composition of the composite. The results show that the particles have good performances, the diameter is about 15 nm, and the magnetic property is 10.9 emu/g. The silica coated magnetite nanoparticles were used to isolate plasmid DNA and genomic DNA.

Keywords: silica coated magnetite nanoparticles; hydrolysis of TEOS; extracting nucleic acid; PCR

纳米粒子(Nanoparticles)一般是指尺寸在 1～100 nm 间的粒子。由于具有很大的比表面积，纳米粒子与同样组成的宏观物质具有不同的物理化学性质。表面的反应活性使纳米粒子能在极性或非极性溶剂的许多介质中分散，但由于粒子之间很容易团聚，分散稳定性不好。为了使粒子稳定地分散在溶剂里，需要对粒子表面进行修饰，以满足不同使用需求[1]。纳米粒子在生物医药上有很好的应用前景，作为药物载体，它将使药物在人体内的传输更为方便，用数层纳米粒子包裹的智能药物进入人体后可主动识别并攻击癌细胞或修补损伤的组织[2]。特别是磁性纳米粒子，它具有超顺磁性，即在外加磁场下能按磁力线方向排列，并快速移向磁场梯度最高区，从而达到分离的目的，磁场撤除后，又能靠热运动快速分散，使磁性纳米粒子在生物医学中得到广泛应用，如细胞的分离、核酸的分离、免疫诊断分析等[3-4]，利用磁性纳米粒子的磁可控性，可实现自动化操作。使用纳米技术的新型诊断仪器只需检测少量血液，就能通过其中的蛋白质和 DNA 诊断出各种疾病。

收稿日期： 2007-12-05；**收修改稿日期：** 2008-03-18
基金项目： 上海市科技型中小企业技术创新基金(0502H1100)；重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5370)
通讯作者： 周光明，教授，从事纳米粒子制备应用 E-mail：gmzhou@swu.edu.cn

目前氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的应用较广，制备方法很多，研究发展很快，本文中采用专利技术的化学共沉淀法[5-6]及溶胶凝胶法通过正硅酸四乙脂 TEOS 水解[7-9]制备了氧化硅包覆的 Fe_3O_4 纳米粒子，对复合粒子的性能进行了表征分析，并进行核酸提取的应用研究。

1 实 验

1.1 试 剂

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$，AR；$FeCl_2 \cdot 4H_2O$，AR；TEOS，AR；无水乙醇，AR；95%乙醇，AR；25%氨水，AR。$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 购于上海山海工学团实验二厂，其他均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 氧化硅/磁性 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

试验采用的化学共沉淀法[5]，通过严格控制反应过程的热力学和动力学条件，制备出 Fe_3O_4 纳米颗粒：

$$2Fe^{3+} + Fe^{2+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 \downarrow + 4H_2O$$

以摩尔比 2∶1的比例将 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$，$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶解(通上 N_2 气保护)，用 IKARET basic 磁力搅拌器搅拌均匀，再与浓氨水混合在 Senco S312-210H 恒速搅拌机上高速搅拌，室温(25℃)反应 2 h，在磁场下分离，制得具有超顺磁性的 Fe_3O_4 纳米粒子。再将粒子用 KUDOS 超声清洗仪超声均匀分散到 95%的乙醇里，适量 TEOS 和浓氨水，高速搅拌反应一定时间后，在磁场下分离，即制得所需氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子样品。

1.3 性能测试

取样品分散到蒸馏水中，用 XSP-17CE 生物倒置显微镜、JEOL LaB6 型 JEM-2010 场发射透射电镜观测其形貌；用 HPPS Mallvern Siberhegner 激光粒度仪测量其水化半径及分布范围；用 NUM760 振动样品磁强计测量其饱和磁化强度；用 Spectrometer Bruker Equinox55 型红外光谱分析仪测定粒子的成分。取样品置于真空干燥器干燥后，用日本理学 D/max-2500 型 X 射线衍射仪测定其成分及一次粒径。

2 结果和讨论

2.1 结构成分

通过 XRD 检测了产物的晶体结构(图 1)。从图 1 可以看出，样品是标准的尖晶石型 Fe_3O_4，能明显看到几个尖锐的尖晶石结构特征峰，而外层通过 TEOS 水解包裹的氧化硅大部分是无定形的结构，XRD 图谱上几乎看不到氧化硅的特征峰。检测报告显示，只有少量的氧化硅被测出，通过软件 Jade 5.0 分析图谱，计算得该样品的组成式为 $Fe_{2.95}Si_{0.05}O_4$，Fe_3O_4 的一次平均粒径约 10 nm。

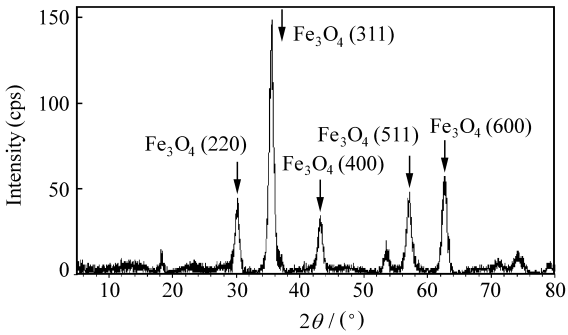


图 1 氧化硅-磁性 Fe_3O_4 纳米复合粒子的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD image of silica coated magnetic nanoparticles

从复合粒子的红外图谱(图 2)上可以看到，580 cm^{-1} 的 Fe—O 峰和 1100 cm^{-1} 的—Si═O 峰。说明氧化硅能通过 TEOS 水解的方法包裹到磁性 Fe_3O_4 纳米粒子表面。

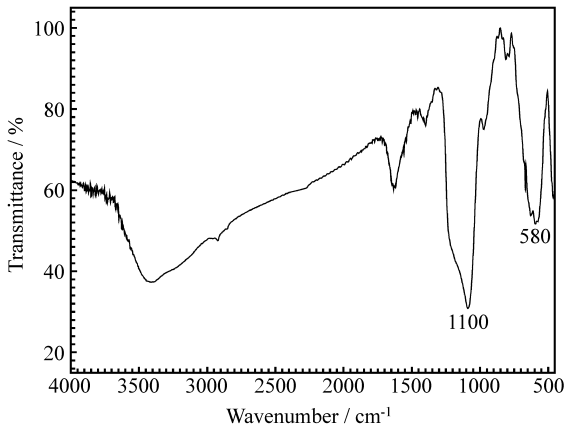


图 2 氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的红外图谱

Fig. 2 FTIR spectra of silica coated magnetic nanoparticles

2.2 形 貌

通过透射电镜测得制备的氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合粒子的粒径约为 15 nm。图 3 是复合粒子的 TEM 照片，可以清楚看到黑色 Fe_3O_4 粒子外包裹了薄薄一层浅色的氧化硅层，也有一些包裹不完全的黑色粒子存在，对生物分离实验造成的影响不大。

在生物倒置显微镜下(物镜 40 倍)，通过电脑软件处理放大(放大约 50 倍)，能看见部分较大的

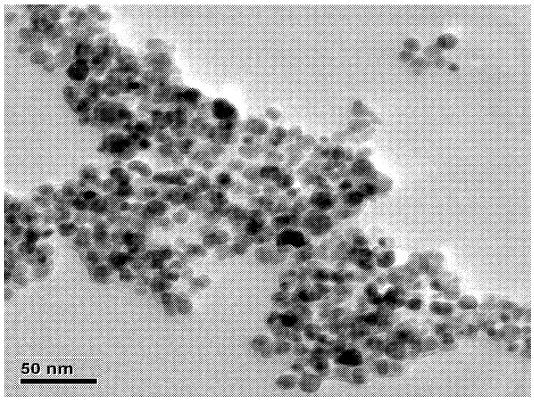
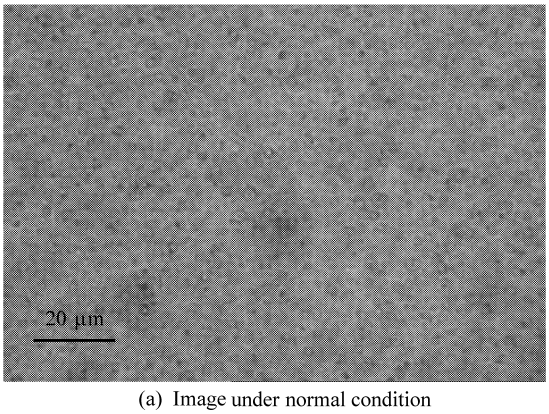
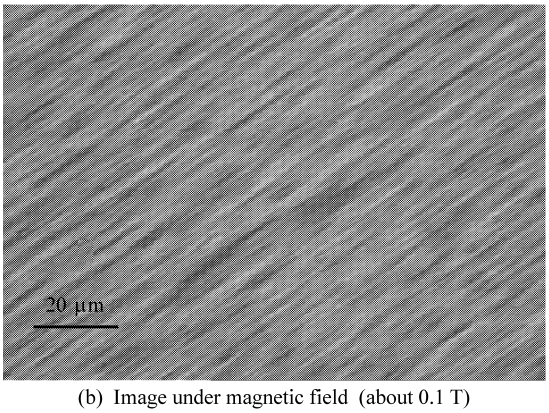


图 3　氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的 TEM 照片

Fig. 3　TEM micrograph of silica coated magnetic nanoparticles



(a) Image under normal condition



(b) Image under magnetic field (about 0.1 T)

图 4　生物倒置显微镜下拍摄的氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的照片

Fig. 4　Inversion biomicroscope image of silica coated magnetic nanoparticles

微米级粒子。图 4(a)是在自然状态下通过软件处理放大拍摄得到的照片，图 4(b)是外加磁场(约 0.1 T)状态下拍摄得到的照片，可见粒子沿磁力线方向排列成线状，说明制得的复合粒子磁性能好。

2.3　磁学性能

将样品的粒子质量分数稀释到 20%，用震动样品磁强计测量饱和磁化强度为11.67 emu/g，Butter 等制备的纳米磁粒子饱和磁化强度为 10.9 emu/g[10]，Liu 等制备的为 19.8 emu/g[11]。从图 5 可以看出，2 条磁滞曲线完全重合，没有任何的磁滞环，说明该复合粒子没有剩磁现象，具有良好的超顺磁性。

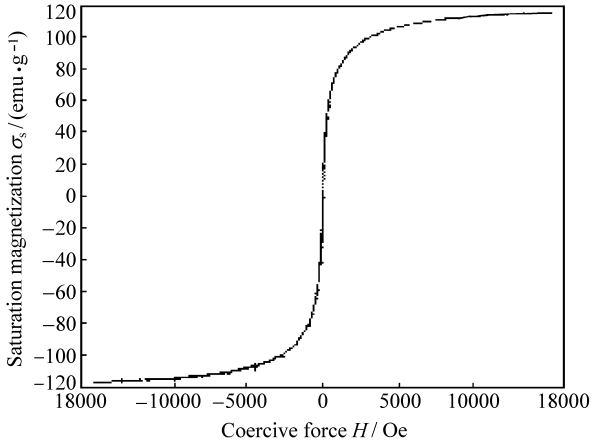


图 5　震动样品磁强计测量氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的磁性能

Fig. 5　Image of silica coated magnetic nanoparticles characteristics by vibrating sample magnetometry

2.4　反应体系与复合粒子的粒径变化

通过溶胶凝胶法在 Fe_3O_4 纳米粒子上包裹氧化硅层时，反应体系对得到的粒子粒径有很大影响[7]，而粒径的大小决定于硅层的厚度和密度。因此设计一组正交实验，所选因子包括：TEOS 滴加浓度(C(TEOS)，mol/L)、TEOS 与 Fe_3O_4 的摩尔比(n(TEOS/Fe_3O_4))、氨水与 TEOS 的摩尔比(n(Ammonia/TEOS))、反应时间(Reaction time/h)、反应温度(T/℃)，改变各因子的水平(反应温度有 3 个水平，其他因子均有 5 个水平)，考察反应条件与粒径(Diameter)之间的关系，结果见表 1。正交实验数据处理之后，得到表 2。由于在制备过程中存在许多个 Fe_3O_4 纳米粒子被氧化硅包裹成一个网状结构，它们非常疏松地分散在溶液中。激光粒度仪是测量每个网状结构的粒径，反映复合粒子在溶液中的分散状态，因此，表中的粒径较大，与电镜照片测量到的相差较大，但在电镜照片上也看到一层浅色的氧化硅裹着许多粒子团聚在一起，两者结果是相符的。

试验中，每个因子的水平都有重复，通过除以重复次数 x(反应温度每个水平重复 5 次，其他均重复3次)来计算出每个水平的平均粒径。由表2

表 1　改变反应体系得到的氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子的粒径

Table 1　Different reaction systems and the diameter of the silica coated nanoparticles

No.	T/℃	C(TEOS)/(mol·L^{-1})	n(TEOS/Fe_3O_4)	n(Ammonia/TEOS)	Reaction time/h	Diameter/nm
1	25	0.2	2/5	1.0	4	176
2	25	0.4	4/5	1.5	5	207
3	25	0.6	6/5	2.0	6	297
4	25	0.8	8/5	2.5	7	322
5	25	1.0	10/5	3.0	8	393
6	40	0.2	4/5	2.0	7	227
7	40	0.4	6/5	2.5	8	220
8	40	0.6	8/5	3.0	4	283
9	40	0.8	10/5	1.0	5	229
10	40	1.0	2/5	1.5	6	183
11	50	0.2	6/5	3.0	5	278
12	50	0.4	8/5	1.0	6	264
13	50	0.6	10/5	1.5	7	316
14	50	0.8	2/5	2.0	8	183
15	50	1.0	4/5	2.5	4	150

表 2　改变反应体系得到的正交实验数据计算结果

Table 2　Experimental data of different reaction systems　nm

Genes' different level	T	C(TEOS)	n(TEOS/Fe_3O_4)	n(Ammonia/TEOS)	Reaction time	Average diameter
Ⅰ/x	279.0	227.0	180.7	223.0	203.0	
Ⅱ/x	228.4	230.3	194.7	235.3	238.0	
Ⅲ/x	238.2	298.7	265.0	235.7	248.0	248.5
Ⅳ/x	—	244.7	289.7	286.0	288.3	
Ⅴ/x	—	242.0	312.7	318.0	265.3	

Note: The Roman alphabets denote level

可以看出：温度在 40℃左右平均粒径最小；TEOS 滴加浓度为 0.6 mol/L 时平均粒径最大；反应时间越长平均粒径越大，在 5 h 以后反应速度减慢，粒径变化不大；TEOS 与 Fe_3O_4 的摩尔比和氨水与 TEOS 的摩尔比对粒径的影响都是成正比，其中 TEOS 与 Fe_3O_4 的摩尔比改变以后粒径的变化范围最大，说明它的影响最大。而氧化硅包裹是复杂的过程，目前还没有权威的方法能测定出具体的参数，如硅层厚度、密度、均匀度。

3　应　用

这种磁性复合纳米粒子在生物医药方面有很好的应用前景。将氧化硅包裹的磁性粒子用于核酸的分离提取，该法基于在高浓度离液剂存在条件下如异硫氰酸胍和高氯酸钠，DNA 双链结合到粒子表面硅上，然后用高盐溶液洗去非特异性吸附，在水或者低盐缓冲液条件下，结合到氧化硅表面的 DNA 解吸附[12]。这些超顺磁性的磁性粒子仅在磁场下有磁性，这有利于撤去磁场后磁粒子的再分散。

以 TEOS/Fe_3O_4 摩尔比为 2/5、4/5、6/5、8/5、10/5 来制备 5 种样品粒子，并进行质粒 DNA 抽提对比试验。从电泳图(图 6)可以看出，几个泳道亮度差别很大，其中 6/5 泳道最亮即提取效果最好。

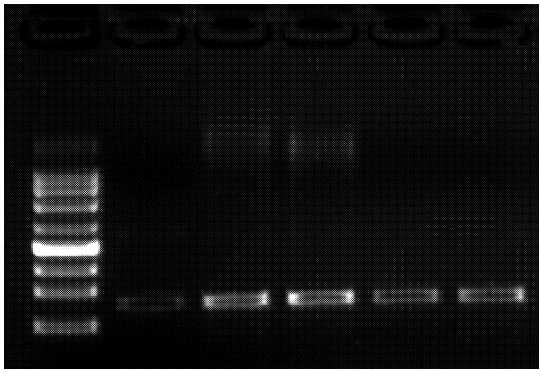


图 6　不同 TEOS 与 Fe_3O_4 摩尔比制备的氧化硅-磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子提取质粒 DNA 的电泳图

Fig. 6　Agrose gel electrophoresis of plasmid DNA purified by silica coated magnetic nanoparticles with different n(TEOS/Fe_3O_4)

(M: Supercoiled DNA ladder marker)

因为随着 TEOS 加入量的增加，氧化硅包裹层从不完全包裹到完全包裹在纳米 Fe_3O_4 表面，使分离提取 DNA 的效果好；当 TEOS 浓度过高时，在反应体系中部分 TEOS 可能自成核生成氧化硅，而没有包裹在 Fe_3O_4 纳米表面上，提取效果反而不好。另一方面随着 TEOS 加入量的增加，生成的复合粒子的粒径变大，在提取过程中，相同量的复合粒子粒径越大比表面就越小，分离提取的效果变差。所以应用实验均使用 TEOS/Fe_3O_4 摩尔比为 6/5 制备的氧化硅/磁性 Fe_3O_4 复合纳米粒子。

图 7 是进行质粒 DNA 抽提对比实验的电泳图，左起 1 和 2 是用进口试剂盒提取，左起 3 和 4 是用国产试剂盒提取，其余是用此实验方法制备的不同批样品提取，从图上可以看出实验结果稳定。

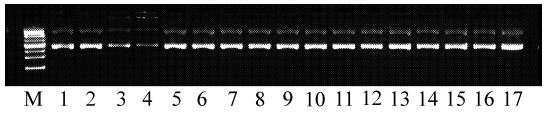
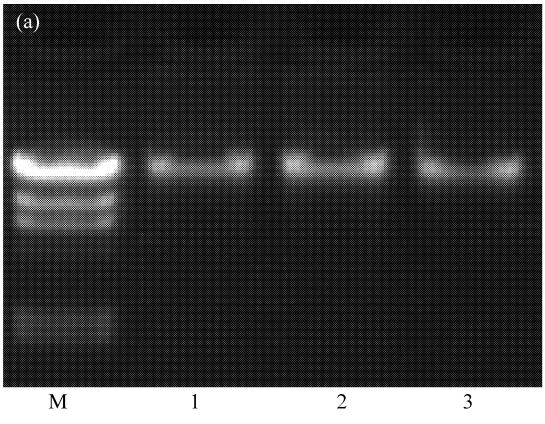


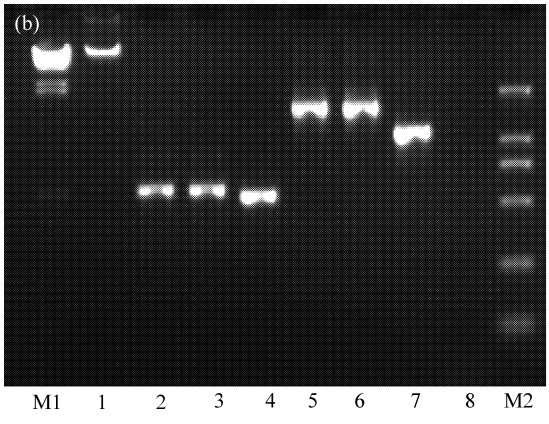
图 7　磁性复合纳米粒子提取质粒 DNA 的电泳图

Fig. 7　Agrose gel electrophoresis of plasmid DNA purified by silica coated magnetic composite nanoparticles

将粒子用于基因组 DNA 提取实验，以及应用提取的基因组 DNA 进行 PCR 反应都得到良好的结果。采用制备的氧化硅-纳米 Fe_3O_4 复合纳米粒子从 100 μL 过夜培养的 Escherichia coli 菌液中提取基因组 DNA，到了高纯度的基因组 DNA (OD260/OD280＝1.8～2.0)，结果见图 8(a) Escherichia coli 基因组电泳图。用提取得到的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，电泳结果见图 8(b)。2、3 泳道为 16S rDNA 前 500bp 的 DNA 片段；5、6 泳道为全序列的 DNA 片段；4、7 泳道为阳性扩增；8 泳道为阴性扩增。16S rDNA 前 500 bp 序列变化较大，包含丰富的细菌种属的特异性信息，通常用该片段的 DNA 进行测序，来鉴定被测细菌的种类，这是一种较为经济便捷的 16S rDNA 鉴定方法。如



(a) M: λ DNA/HIND Ⅲ;
Lane 1, 2, 3: Geneome DNA purified by silica coated magnetic composite nanoparticles



(b) M1: λ DNA/HIND Ⅲ; Lane 1: Genomic DNA;
Lane 1, 2, 3: Escherichia coli (forward 500bp);
Lane 4: Positive control (forward 500bp);
Lane 5, 6: Escherichia coli (whole);
Lane 7: Positive control (whole);
Lane 8: Negative control; M2: DL 2000 Marer

图 8　Escherichia coli 基因组电泳图

Fig. 8　Agrose gel electrophoresis image

果前 500 bp 序列不足以反应细菌的种属信息时，则可以进行 16S rDNA 全序列 PCR 扩增及 DNA 测序，得到较为全面的 16S rDNA 序列信息，将 DNA 测序结果与相应的数据库(NCBI)进行对比，确定细菌的种类。

图 8 的结果表明，制得的复合纳米粒子可用于基因组 DNA 提取及 PCR 扩增反应，也可用于 Southern 杂交以及 RAPD、AFLP、RFLP 等各种分子生物学实验。

4 结 论

(1) 本试验方法制得的复合纳米粒子具有很好的超顺磁性，Fe_3O_4 一次粒径约 10 nm，包裹氧化硅后粒径约为 15 nm，饱和磁化强度为 11.67 emu/g (20 wt%)，具有良好的分散性和稳定性。

(2) 用该复合粒子抽提质粒 DNA 和基因组 DNA，效果良好。目前基因组分析的新技术已成为分子诊断的重要工具[13]。磁珠法分离 DNA 快速省时，减少化学试剂的使用，磁性分离易于实现自动化操作，减少手工劳动，且质量高、重复性好，有望应用于食品中致病菌的便捷分析判定和疾病的基因诊断分析。

参考文献：

[1] 张心亚，沈慧芬，黄 洪. 纳米粒子材料的表面改性及其应用研究进展[J]. 材料工程，2005，10：58-63.
Zhang Xinya，Shen Huifen，Huang Hong. Novel progress of application and surface - modification technique for nano - particles materials [J]. Journal of Materials Engineering，2005，10：58-63.

[2] 刑在臣，潘可风. 磁性纳米颗粒在医学中的应用[J]. 口腔颌面外科杂志，2005，15(4)：393-396.
Xing Zaichen，Pan Kefeng. Apllication of nano - particles in medicine science [J]. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery，2005，15(14)：393-396.

[3] 丁建芳，姜继森. 核壳结构二氧化硅/磁性纳米粒子的制备及应用[J]. 材料导报，2006，20(11)：201-205.
Ding Jianfang，Jiang Jisen. Preparation and application of core - shell silicon/magnetic nanoparticle composites [J]. Materials Review，2006，20(11)：201-205.

[4] 李贵平，张 辉，汪勇先. 磁性纳米微粒在磁性分离技术中的应用进展[J]. 放射免疫杂志，2005，18(5)：380-383.
Li Guiping，Zhang Hui，Wang Yongxian. Progress of application of magnetic nano - particles in magnetic separation technique [J]. Journal of Radioimmunology，2005，18(5)：380-383.

[5] 盛蓉生，朱 绫. 一种亲水性磁性纳米微粒及其分散液的制备技术：中国，2004100736806 [P]. 2005-07-20.

[6] Du G H，Liu Z L，Xia X，et al. Characterization and application of Fe_3O_4/SiO_2 nanocomposites [J]. J Sol - Gel Tech，2006，39：285-291.

[7] Jitianu A，Raileanu M，Crisan M，et al. $Fe_3O_4 - SiO_2$ nano composites obtained via alkoxide and colloidal route [J]. J Sol-Gel Tech，2006，40：317-323.

[8] Lu Y，Yin Y D，Mayers T B，et al. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach [J]. Nano Letters，2002，3(2)：183-186.

[9] Xu Z Z，Wang C C，Yang W L，et al. Synthesis of superparamagnetic Fe_3O_4/SiO_2 composite particles via sol-gel process based on inverse miniemulsion [J]. Journal of Materials Science，2005，40(17)：4667-4669.

[10] Butter M D，Bell S A，Armes S P，et al. Preparation and properties of colloidal iron dispersions [J]. Journal of Colloid and Interface Science，1996，183：91-99.

[11] Liu X Q，Xing J M，Guan Y P，et al. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization [J]. Colloids and Surface A，2004，238：127-131.

[12] Kathryn A M，Chris S S，Robin F B T. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions [J]. Journal of Colloid and Interface Science，1996，181：635-644.

[13] Earley J J，Kuivaniemi H，Prockop D J，Tromp G. Robotic automation of dideoxyribonu - cleotide sequencing reactions [J]. Biotechniques，1994，17：156-165.