

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Peter NOVAK

**SINTEZA IN FUNKCIONALIZAJA SUPERPARAMAGNETNIH
NANODELCEV ZA BIOLOŠKE APLIKACIJE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF
SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES FOR BIOLOGICAL
APPLICATIONS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v sodelovanju Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) in Kolektor Nanotesla inštituta (NTI). Sinteza in funkcionalizacija superparamagnetnih nanodelcev je potekala na NTI, kjer je bil opravljen tudi del karakterizacije pripravljenih nanodelcev. Preostali del karakterizacije nanodelcev je bil izveden na Institutu Jožef Stefan, na Kemijskem inštitutu Ljubljana in na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnika, za somentorja diplomskega dela pa dr. Aljošo Košaka (NTI).

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Tom TURK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Recenzentka:	prof. dr. Damjana DROBNE Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Mentorica:	prof. dr. Maja RAVNIKAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Somentor:	dr. Aljoša KOŠAK Kolektor Nanotesla inštitut

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji

Datum zagovora: 09.10.2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Peter Novak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 537.612:57 (043.2) = 163.6
KG superparamagnetni nanodelci/funkcionalizacija magnetnih nanodelcev/magnetni nanodelci v biologiji
AV NOVAK, Peter
SA RAVNIKAR, Maja (mentor)/KOŠAK Aljoša (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN SINTEZA IN FUNKCIONALIZACIJA SUPERPARAMAGNETNIH NANODELCEV ZA BIOLOŠKE APLIKACIJE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XVII, 118 str., 20 pregl., 65 sl., 91 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Magnetni nanodelci (MND) predstavljajo obetavno področje nanotehnologije, saj nudijo številne aplikativne možnosti razvoja na področjih biotehnologije, biomedicine, medicine farmacije in drugih. Magnetni delci (MD), ki jih danes najdemo na tržišču in se že uporabljajo za našete namene, spadajo glede na velikost večinoma v mikronsko področje med 0,5 in 2 μm . Ker takšna velikost MD pogosto ni ustrezna za navedene aplikacije, se področje razvoja MD, njihove sinteze in funkcionalizacije, seli v nano- področje (t.j. pod 100 nm). Cilj in predmet tega diplomskega dela sta bili sinteza in površinska funkcionalizacija Co-feritnih MND za biološke potrebe. Sintetizirali smo Co-feritne MND, velikosti 10 – 12 nm, jih funkcionalizirali s tetraetoksisilanom (TEOS) in s 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilanom (DETA) ter na MND funkcionalizirane z DETA vezali glutaraldehid. Znotraj eksperimentov funkcionalizacije MND s TEOS, smo določili debelino silikatne prevleke, ki se je gibala v območju pod 20 nm. Uspešnost funkcionalizacije z DETA smo potrdili z magnetnimi meritvami, rentgensko praškovno difrakcijo (XRD), rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF), presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) v kombinaciji z energijsko disperzijsko analizo X-žarkov (EDS) ter termičnimi analiznimi metodami: Diferencialna vrstična kalorimetrija (DSC), termogravimetrija (TG), diferenčna termična analiza (DTA) in analiza plinskih produktov termičnega razpada (EGA). Omenjene analize metode so potrdile prisotnost DETA na površini MND, s termogravimetrijo (TG) pa smo določili masni delež vezane DETA, ki znaša 4,5 ut. %. Rezultati vezave glutaraldehida na funkcionalizirane MND z DETA pa so pokazali, da je ob ustreznih fizikalno – kemijskih pogojih možno doseči visoko stopnjo vezave glutaraldehid neposredno na DETA v ozkem nevtralnem pH območju reakcijskega medija. Tako pripravljene MND predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje aplikacije na omenjenih področjih uporabe, saj DETA in glutaraldehid predstavljata učinkovito povezovalno molekulo med MND in biomolekulami kot so nukleinske kisline, aminokisline in proteini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 537.612:57 (043.2) = 163.6
CX superparamagnetic nanoparticles/functionalization of magnetic nanoparticles/magnetic nanoparticles in biology
AU NOVAK, Peter
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/KOŠAK Aljoša (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2008
TI SYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVII, 118 p., 20 tab., 65 fig., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Magnetic nanoparticles represent an important part of nanotechnology as they open several applicative opportunities of development in the field of biotechnology, biomedicine, medicine, pharmacy etc. Magnetic particles present in the market and already used for the above listed purposes belong mainly – concerning their size - to the micron sphere between 0,5 and 2 μm . Because this size of magnetic particles is usually not adequate for listed applications the area of development of magnetic particles, their synthesis and functionalization belong to the nano-sphere i.e. sphere under 100 nm. The goal and subject of this thesis were synthesis and functionalization of Co-ferrite magnetic nanoparticles for biological purposes. 10 – 12 nm Co-ferrite magnetic nanoparticles (Košak, Žnidaršič, P-200700112) were synthesized and functionalized with tetraethoxysilane (TEOS) and 3-[2-(2-Aminoethylamino)ethylamino]propyl-trimethoxysilane (DETA). Magnetic nanoparticles functionalized with DETA were also bound with glutaraldehyde. During the experiment of functionalization of magnetic nanoparticles with TEOS the thickness of silicate cover was measured, ranging between 0 and 20 nm. The success of functionalization with DETA was confirmed through magnetic measurements, X-ray powder diffraction (XRD), X-ray fluorescence spectrometry (XRF), transmission electron microscopy (TEM) in combination with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and thermal analysis methods: differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), differential thermal analysis (DTA) and exhaust gas analysis (EGA). Analysis methods mentioned above confirmed presence of DETA on the magnetic nanoparticles surface and through thermogravimetry the bound DETA mass proportion of 4,5% was calculated. The results of binding glutaraldehyde onto DETA functionalized magnetic nanoparticles showed that under relevant physical-chemical conditions the binding of glutaraldehyde in a wide binding range is possible. Such magnetic nanoparticles represent a good disposition for further applications in the mentioned fields.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK	X
KAZALO PREGLEDNIC	XV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XVII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 LASTNOSTI MAGNETNIH MATERIALOV IN TIPI MAGNETNIH NANODELCEV	4
2.1.1 Kristalna struktura magnetnih nanodelcev.....	4
2.1.2 Magnetne lastnosti magnetnih materialov.....	5
2.1.3 Tipi magnetnih nanodelcev, ki v svoji strukturi vsebujejo železo	8
2.1.3.1 Nanodelci iz železovega oksida.....	8
2.1.3.2 Kovinski nanodelci	9
2.1.3.3 Nanodelci zlitin	9
2.2 TIPI POVRŠINSKIH PREVLEK MAGNETNIH NANODELCEV.....	10
2.2.1 Polimerne prevleke	10
2.2.2 Liposomi in micle.....	11
2.2.3 Magnetni nanodelci, sestavljeni iz jedra in anorganskega ovoja.....	11
2.2.4 Funkcionalni ligandi.....	11
2.3 KOLOIDNI SISTEMI IN GELIRANJE V MREŽE.....	12
2.3.1 Teorija silanov in sol-gel kemija	12
2.3.2 Lastnosti in uporaba funkcionalnega bilinkerja glutaraldehida	15

2.3.3	Koloidni sistemi in njihova stabilnost	15
2.4	UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV V BIOLOGIJI IN BIOKEMIJI	20
2.5	UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV V MEDICINI	23
2.5.1	Uporaba magnetnih nanodelcev v diagnostične namene	24
2.5.2	Uporaba magnetnih nanodelcev v terapevtske namene	27
2.6	ANALIZNI INSTRUMENTI IN METODE	29
2.6.1	Merjenje magnetnih lastnosti materialov	29
2.6.2	Rentgenska praškovna difrakcija (XRD)	31
2.6.3	Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF)	33
2.6.4	Presevna elektronska mikroskopija (TEM)	36
2.6.5	Energijska disperzijska analiza X-žarkov (EDS)	37
2.6.6	Merjenje specifične površine vzorcev po metodi BET	38
2.6.7	Diferencialna vrstična kalorimerija (DSC).....	40
2.6.8	Termogravimetrija (TG)	41
2.6.9	Diferenčna termična analiza (DTA).....	42
2.6.10	Analiza plinskih produktov termičnega razpada (EGA)	43
3	MATERIALI IN METODE.....	44
3.1	SINTEZA Z METODO SOOBARJANJA V VODNIH RAZTOPINAH IN LASTNOSTI MAGNETNIH NANODELCEV CoFe_2O_4	44
3.1.1	Sinteza magnetnih nanodelcev Co-ferita	45
3.1.2	Elektrostatska stabilizacija Co-feritnih magnetnih nanodelcev in priprava stabilnih magnetnih koloidov na vodni osnovi	45
3.2	FUNKCIONALIZACIJA KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV S TEOS	46
3.3	FUNKCIONALIZACIJA KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z DETA	48

3.3.1	Vpliv pH na funkcionaliziranost Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA	49
3.3.2	Vpliv temperature na funkcionaliziranost Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA	50
3.3.3	Vpliv trajanja reakcije na funkcionaliziranost Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA	51
3.3.4	Vpliv koncentracije DETA med reakcijo na funkcionalizacijo magnetnih nanodelcev z DETA	52
3.4	VEZAVA GLUTARALDEHIDA NA FUNKCIONALIZIRANE KOBALT-FERITNE MAGNETNE NANODELCE Z DETA	52
3.4.1	Reakcijski medij in njegov pH za vezavo glutaraldehida na površino Co-feritnih magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih z DETA	52
3.4.2	Titracijska metoda za kvantifikacijo vezanega glutaraldehida	54
3.5	KOLOIDNA STABILNOST SINTETIZIRANIH MAGNETNIH NANODELCEV V FOSFATNEM PUFRU IN DESTILIRANI VODI	56
3.5.1	Koloidna stabilnost Co-feritnih magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih z DETA v PB in destilirani vodi	56
3.6	ANALIZNE METODE	58
3.6.1	Merjenje magnetnih lastnosti materialov	59
3.6.2	Rentgenska praškovna difrakcija (XRD)	60
3.6.3	Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF)	61
3.6.4	Presevna elektronska mikroskopija (TEM)	62
3.6.5	Energijska disperzijska analiza X-žarkov (EDS)	64
3.6.6	Merjenje specifične površine vzorcev po metodi BET	64
3.6.7	Diferencialna vrstična kalorimetrija (DSC)	65
3.6.8	Meritve termogravimetrije (TG), diferenčne termične analize (DTA) in analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA)	66
4	REZULTATI	67

4.1	REZULTATI FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV S TEOS	67
4.2	REZULTATI FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV z DETA.....	69
4.2.1	Rezultati vpliva pH na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA.....	69
4.2.2	Rezultati vpliva temperature na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA	71
4.2.3	Rezultati vpliva trajanja reakcije na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA.....	72
4.2.4	Rezultati vpliva koncentracije DETA na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA.....	73
4.2.5	Rezultati opazovanja s transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM)	74
4.2.6	Rezultati meritev energijske disperzijske analize X-žarkov (EDS)	76
4.2.7	Primerjava vodne suspenzije nefunkcionaliziranih in z DETA funkcionaliziranih MND pri različnih pH vrednostih	77
4.2.8	Rezultati meritev rentgenske praškovne difrakcije (XRD).....	79
4.2.9	Rezultati termogravimetrije (TG), diferencialno termične analize (DTA) in analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA)	80
4.2.10	Rezultati diferencialne vrstične kalorimetrije (DSC).....	83
4.3	REZULTATI NADALJNJE FUNKCIONALIZACIJE Z GLUTARALDEHIDOM	84
4.4	REZULTATI ISKANJA OBMOČJA KOLOIDNE STABILNOSTI SINTETIZIRANIH MAGNETNIH NANODELCEV V FOSFATNEM PUFRU IN DESTILIRANI VODI	87
4.4.1	Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti Co-feritnih magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih z DETA, v PB in destilirani vodi	87
5	RAZPRAVA	93

5.1	VREDNOTENJE REZULTATOV FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV S TEOS	94
5.2	VREDNOTENJE REZULTATOV FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z DETA.....	95
5.3	VREDNOTENJE REZULTATOV FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z GLUTARALDEHIDOM	100
5.4	VIZUALNO VREDNOTENJE REZULTATOV KOLOIDNE STABILNOSTI FUNKCIONALIZIRANIH MAGNETNIH NANODELCEV, V FOSFATNEM PUFRU IN DESTILIRANI VODI.....	102
5.5	POGLED V PRIHODNOST IN MOŽNOSTI ZA NADALJNJE RAZISKAVE NA TEM PODROČJU	103
6	POVZETEK (SUMMERY)	105
6.1	POVZETEK.....	105
6.2	SUMMARY	106
7	VIRI.....	108
7.1	CITIRANI VIRI.....	108
7.2	DRUGI VIRI.....	118

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna celica spinela (Košak, 2006: 2).....	5
Slika 2: Histerezna zanka (Košak, 2006: 15).....	7
Slika 3: Shema nekaterih osnovnih tipovov površinskih obdelav MND: Polimerna prevleka pri kateri je polimer vezan na površino MND v eni točki (A), polimerna prevleka, ki v slojih popolnoma obdaja MND (B), MND enkapsuliran v liposom (C), MND iz jedra in anorganskega ovoja (D) in heterodimerni MND (E) (Sun s sod., 2008: 1256).....	10
Slika 4: Primeri površinske obdelave MND z različnimi vrstami ligandov (Salata, 2004).	12
Slika 5: Kemijska struktura 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilana (DETA).....	13
Slika 6: Shematični prikaz sklopljenih reakcij hidrolize in kondenzacije, katerih rezultat je geliranje silanov (Šimunič, 2007: 8).	14
Slika 7: Kemijska struktura tetraetoksisilana (TEOS).....	14
Slika 8: Kemijska struktura molekule glutaraldehida.....	15
Slika 9: Dinamika procesov flokulacije, koagulacije in sedimentacije, ki se dogajajo, ko sistem prehajo od koloidno stabilnega h koloidno nestabilnemu (Malvern instruments).....	17
Slika 10: Vpliv odbojnih (V_R) in privlačnih (V_A) sil na celotno interakcijsko energijo v odvisnosti od razdalje med delci (s). Če privlačne sile med delci prevladujejo nad odbojnimi, se ti približujejo in združujejo, kar ima za posledico koloidno nestabilen sistem.....	19
Sliki 11 (levo) in 12 (desno): Sterično (na levi) in elektrostatsko stabilizirani delci (na desni).....	20
Slika 13: Shema poteka magnetofekcije, kjer s pomočjo funkcionaliziranih MND lahko vezemo biomolekule kot so plazmidna DNK, oligonukleotidi, siRNA in virusi ter omogočimo transfekcijo v celične kulture (Chemicell GmbH, Magnetofection).	21
Slika 14: Instrument za magnetno resonančno slikanje (Good Shepherd).	25

Sliki 15 in 16: Primer uporabe MND za odkrivanje zgodnjih stadijev raka jeter. S puščicami so označene zgoščine MND, ki vezani na tumorsko tkivo služijo kot kontrastna sredstva za MRI (Semelka in Helmberger, 2001: 31).....	26
Slika 17: Slikovno vodeno vstavljanje vektorja z vezanim p53 genom za gensko terapijo pri zdravljenju pljučnega raka. Puščica kaže na obolelo tkivo, kamor so s pomočjo igle vstavili MND z vezanim p53 genom (Weissleeder in Mahmood, 2001: 321).....	28
Slika 18: Shematski prikaz delovanja magnetometra DSM-10 VOLTREG 1,4 (Košak, 2006: 66).....	29
Slika 19: 7 skupin Bravaisovih kristalnih rešetk, ki se med seboj razlikujejo po položaju gljišč, kar zajema različne razdalje med ogljišči in različne kote med daljicami, ki ogljišča povezujejo (Wikipedia).....	31
Slika 20: Shema rentgenske cevi, kakršno uporabljamo pri rentgenski fluorescenčni spektrometriji. X-žarki potujejo od katode, proti anodi in nato skozi okno rentgenske cevi proti vzorcu (Veber, zapiski: 4).....	34
Slika 21: Geometrija rentgenskega spektrometra z ravnim kristalom (Veber, zapiski: 7). ..	35
Slika 22: Shema energijsko disperzijskega spektrometra (Veber, zapiski: 9). ..	36
Slika 23: FlowPrep 060 – Sample Degas System, ki omogoča istočasno segrevanje in prepihanje vzorca z dušikom ali drugim inertnim plinom. S tem instrumentom vzorec pripravimo za meritve specifične površine.....	40
Slika 24. Posnetek grelna-senzorične plošče diferencialno vrstičnega kalorimetra DSC823 ^e (premer 3 cm) zg. in shematični prerez skozi to ploščo sp.....	41
Slika 25: Kemijska struktura bisulfitnega kompleksa z glutaraldehidom.....	55
Slika 26. Magnetometer DSM-10 DRUSCH & CIE VOLTREG 1,4.	60
Sliki 27 in 28: Rentgenski praškovni difraktometer PANalytical X'Pert PRO (Kemijski inštitut Ljubljana).....	61
Slika 29 (levo) in 30 (desno): Rentgenski fluorescenčni spektrometer OXFORD ED ²⁰⁰⁰ , instrument v celoti (levo) in detajl – prostor za vzorce (desno).....	62
Slika 31: Presevni elektronski mikroskop PHILIPS CM-100 s CCD kamero za slikanje opazovanih vzorcev v digitalni obliki.	63

Slika 32 (levo) in 33 (desno): Merilec specifične površine in poroznost praškastih materialov – TriStar 3000, celoten instrument (levo) in detajl – merilni prostor z vpetimi bučkami in posodo s tekočim dušikom (desno).	65
Slika 34: Diferencialni vrstični kalorimeter DSC823 ^e	66
Slika 35: Odvisnost velikosti MND funkcionaliziranih s TEOS in njihova specifične magnetizacije od koncentracije TEOS v reakcijskem mediju.	68
Slika 36: Primerjava potekov delnih histereznih krivulj neoblečenih MND (t.j. nefunkcionaliziranih MND) in MND z ralično delbelino silikatne prevleke. Vsaka točka prikazuje vrednost magnetizacije vzorca (M) pri določeni magnetni poljski jakosti (H).....	68
Slika 37: Odvisnost velikosti z DETA funkcionaliziranih MND od pH reakcijskega medija.	70
Slika 38: Odvisnost specifične magnetizacije od pH reakcijskega medija pri funkcionalizaciji MND z DETA – izsek iz koloidno stabilnega področja.	71
Slika 39: Odvisnost specifične površine MND in njihove specifične magnetizacija od temperature funkcionalizacije MND z DETA.	72
Slika 40: Odvisnost maksimalne magnetizacije MND od trajanja funkcionalizacije MND z DETA.....	73
Slika 41: Odvisnost velikosti MND in njihove maksimalne magnetizacije od volumna dodanega DETA v vzorcu.....	74
Sliki 42 (L) in 43 (D): Posnetek vzorca nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND – vzorec z oznako CF-FF 4 (L) in z DETA funkcionaliziranih Co-feritnih MND – vzorec z oznako S2-j (D).	75
Sliki 44 (L) in 45 (D): Posnetek vzorca S2-j s presevnim elektronskim mikroskopom pri 800 000 kratni povečavi. Puščica označuje amorfni sloj, ki ga sestavljajo molekule DETA (L). Posnetek Co-feritnih MND prevlečenih z 8 nm debelo silikatno prevleko pri 240 000 kratni povečavi (D).	76
Slika 46: EDS spekter posnet na MND vzorca S2-j. Puščica kaže na vrh, ki potrjuje prisotnost Si v vzorcu.	77

Slika 47: Koloidna stabilnost nefunkcionaliziranih MND (desno) in z DETA funkcionaliziranih MND (levo) pri pH 2, pri čemer je desna suspenzija koloidno stabilna, leva pa ne.	78
Slika 48: Koloidna stabilnost nefunkcionaliziranih MND (desno) in z DETA funkcionaliziranih MND (levo) pri pH 7, pri čemer je leva suspenzija koloidno stabilna, desna pa ne.	78
Slika 49: Koloidna stabilnost nefunkcionaliziranih MND (desno) in z DETA funkcionaliziranih MND (levo) pri pH 9,5, pri čemer je desna suspenzija koloidno stabilna, leva pa ne.	79
Slika 50: Spekter rentgenske praškovne difrakcije, kjer karakteristični vrhovi obeh vzorcev sovpadajo in ustrezajo kristalni strukturi spinela.	80
Slika 51: Rezultati meritev TG in DTA nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND.	81
Slika 52: Rezultati meritev TG in DTA funkcionaliziranih Co-feritnih MND z DETA – vzorec S2-j.	81
Slika 53: Rezultati meritev analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA) nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND.	82
Slika 54: Rezultati meritev analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA) funkcionaliziranih Co-feritnih MND z DETA – vzorec S2-j.	83
Slika 55: Rezultati diferencialne vrstične kalorimetrije ob primerjavi nefunkcionaliziranih MND (CF FF8), referenčnega spektra čistega DETA in funkcionaliziranih MND z DETA (S2-j).	84
Slika 56: Preizkus natančnosti titracijske metode za določanje glutaraldehida (GA) s pomočjo timolftaleina. Primerjava med eksperimentalno določeno maso GA v posameznem volumnu 25 % GA (titracija) in teoretičnim izračunom mase GA v enakem volumnu 25 % GA.	85
Slika 57: Rezultati mase na MND vezanega glutaraldehida in specifične magnetizacije v odvisnosti od pH reakcijskega medija, z večinskim deležem destilirane vode. ..	86
Slika 58: Rezultati mase na MND vezanega glutaraldehida in specifične magnetizacije v odvisnosti od pH reakcijskega medija, z večinskim deležem 2-propanola.	87

Slika 59: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti destilirane vode. Od leve proti desni sledijo naslednje pH vrednosti: pH 3,0, pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0, pH 9,5 in pH 10,0.	89
Slika 60: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v 0,02 M PB, ob spreminjanju pH vrednosti pufru. Od leve proti desni sledijo naslednje pH vrednosti: pH 2,9, pH 3,9, pH 4,5, pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,1, pH 8,0, pH 9,0, pH 9,5 in pH 10,0.	90
Slika 61: Rezultati vpliva koncentracije nanodelcev na koloidno stabilnost vzorca S2-j v 0,02 M PB.	91
Slika 62: Rezultati vpliva koncentracije pufru na koloidno stabilnost vzorca S2-j v PB. Od leve proti desni si sledijo naslednje koncentracije fosfatnega pufru: 2 M, 1,5 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M, 0,1 M, 0,075 M, 0,05 M, 0,01 M, 0,0075 M, 0,005 M in 0,002 M.	92
Slika 63: Mehanizem vezave DETA na anorgansko površino preko kisikovih atomov (Liu in Tan, 1999).	95
Slika 64: Shema vezave molekule glutaraldehida na molekulo DETA.	101
Slika 65: Shema sosledja preiskovanih faz sinteze in funkcionalizacije magnetnih nanodelcev (MND) z opisom ključnih rezultatov. Medij 1 sestavljajo 2-propanol, dH ₂ O in vodna koloidna disperzija MND (z deležem suhe snovi 0,071 g/ml) v razmerju 66,6 : 13,3 : 1. Medij 2 sestavljajo 2-propanol, dH ₂ O in vodna koloidna disperzija MND (z deležem suhe snovi 0,026 g/ml) v razmerju 65,8 : 13,2 : 1. Medij 3 sestavljata 2-propanol, vodna koloidna disperzija MND (z deležem suhe snovi 0,003 g/ml) in 25% raztopina glutaraldehida v razmerju 4 : 1 : 0,02.	104

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Dielektričnost nekaterih snovi.....	18
Preglednica 2: Eksperimenti funkcionalizacije MND Co-ferita s TEOS, pri čemer se spreminja koncentracija TEOS v reakcijskem mediju.....	47
Preglednica 3: Eksperimenti, ki zajemajo različne pH vrednosti med funkcionalizacijo Co-feritnih MND z DETA.	50
Preglednica 4: Eksperimenti, ki zajemajo različne temperaturne vrednosti med funkcionalizacijo Co-feritnih MND z DETA.....	51
Preglednica 5: Eksperimenti, ki zajemajo različno dolg čas reakcije na funkcionaliziranost Co-feritnih MND z DETA.	51
Preglednica 6: Eksperimenti, ki zajemajo različno koncentracijo DETA med reakcijo na funkcionaliziranost Co-feritnih MND z DETA.....	52
Preglednica 7: Parametri nekaterih pomembnejših eksperimentov vezave glutaraldehida na MND funkcionalizirane z DETA.	54
Preglednica 8: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND funkcionaliziranih z DETA v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti.....	57
Preglednica 9: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND funkcionaliziranih z DETA v 0,02 M PB ob spreminjanju pH vrednosti.....	57
Preglednica 10: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND funkcionaliziranih z DETA v 0,02 M PB (pH = 6,8) pri različnih koncentracijah MND.	58
Preglednica 11: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND funkcionaliziranih z DETA v PB (pH = 6,8) pri različnih koncentracijah pufra.....	58
Preglednica 12: Rezultati meritev velikosti Co-feritnih MND in njihove specifične magnetizacije po funkcionalizaciji s TEOS, ob spreminjanju koncentracije TEOS v reakcijskem mediju.....	67

Preglednica 13: Rezultati vpliva pH reakcije na stopnjo funkcionalizacije MND z DETA, ki zajemajo podatke o začetni aglomeraciji vzorca, specifični površini (BET) in specifični magnetizaciji vzorca (M_s) ter deležu Si v vzorcu.....	70
Preglednica 14: Rezultati meritev specifične površine vzorca (BET) in specifične magnetizacije vzorca (M_s) pri eksperimentih, ki so potekali pri različnih temperaturah funkcionalizacije MND z DETA.....	71
Preglednica 15: Rezultati meritev specifične površine vzorca (BET) in specifične magnetizacije vzorca (M_s) pri eksperimentih pri katerih smo spreminjali trajanje funkcionalizacije z MND z DETA.....	73
Preglednica 16: Rezultati vpliva koncentracije DETA v reakcijskem mediju na stopnjo funkcionalizacije MND z DETA.....	74
Preglednica 16: Rezultati vezave glutaraldehida na funkcionalizirane MND z DETA, pri dveh različnih reakcijskih medijih in različnih pH vrednostih.....	86
Preglednica 17: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti destilirane vode.	88
Preglednica 17: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v 0,02 M PB ob spreminjanju pH vrednosti puфра.	90
Preglednica 18: Rezultati vpliva koncentracije nanodelcev na koloidno stabilnost vzorca S2-j v 0,02 M PB.	91
Preglednica 19: Rezultati vpliva koncentracije puфра na koloidno stabilnost vzorca S2-j v PB.....	92
Preglednica 20: Izvor elementov (razen Si), ki smo jih določili z EDS analizo metodo na MND vzorca S2-j.....	99

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MD	magnetni delci
MND	magnetni nanodelci
TEOS	tetraetoksisilan
DETA	3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilan
GA	glutaraldehyd
BET	metoda Brunnauer – Emmett – Teller za izračin specifične površine materiala, ki jo uporablja programska oprema instrumenta TriStar 3000
XRD	rentgenska praškovna difrakcija
XRF	rentgenska fluorescenčna spektrometrija
TEM	presevna elektronska mikroskopija
EDS	energijska disperzijska analiza X-žarkov
DSC	diferencialna vrstična kalorimetrija
TG	termogravimetrija
DTA	diferencialna termična analiza
EGA	analiza plinskih produktov termičnega razpada
PB	fosfatni pufer
MRI	slikanje z magnetno resonanco
DNK	deoksiribonukleinska kislina
RNK	ribonukleinska kislina
TMAH	tetrametilamonijev hidroksid

1 UVOD

Z razvojem nanotehnologije, predvsem z razvojem različnih delcev in struktur nano velikosti, se odpirajo nove možnosti in povsem nove poti na različnih področjih znanosti. V zadnjem času potekajo številne raziskave na področju sinteze in nadaljnje površinske obdelave (funkcionalizacije) različnih nanostrukturnih materialov, predvsem nanodelcev bolj ali manj sferičnih oblik in nano-cevk (nano-tubes), ki so lahko izdelani iz različnih materialov, glede na nadaljnjo uporabo. Nanodelci so uporabni na številnih področjih znanosti kot so: biotehnologija, biomedicina, farmacija, elektronika, računalništvo, avtomobilska industrija, brezžične telekomunikacije, itd. Posebno področje zavzemata sinteza in funkcionalizacija magnetnih nanodelcev (MND). Zaradi svoje majhnosti lahko MND potujejo po tkivu, hkrati pa so zaradi interakcije z magnetnim poljem sledljivi in vodljivi pod vplivom zunanega magnetnega polja. Ker imajo absorpcijske sposobnosti, lahko služijo kot prenašalci ciljnih snovi na ciljna mesta v organizmu. Uporabnost MND lahko razdelimo na štiri velika področja uporabe:

- Služijo lahko kot vektorji za prenos različnih zdravilnih učinkovin do želenih tkiv ali organov.
- Uporabni so kot vektorji za izolacijo različnih biomolekul in živih struktur (RNK, DNK, proteini, virusi, bakterije, ...) iz medijev.
- Po transportu na želeno mesto v tkivu, jih lahko uporabimo kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco (MRI).
- Po transportu na želeno mesto so uporabni tudi za magnetno hipertermijo, kjer izkoriščamo lastnost paramagnetnih materialov, da se segrejejo pod vplivom magnetnega polja.

Ker MND lahko služijo kot nosilci, ki se preko protiteles vežejo na površino virusa, bi lahko z uporabo MND ekstrahirali želeni virus iz tkivnega homogenata s pomočjo magnetne sile permanentnega ali elektromagneta. Nekaterih virusov namreč še ne znamo izolirati iz njihovega naravnega okolja (npr. iz nekega organizma), ker so zelo občutljivi na klasične tehnike izolacije in kemikalije, ki se pri tem uporabljajo, znamo pa pridobiti ustrezna protitelesa za njihovo izolacijo.

Magnetni nosilci danes na trgu že obstajajo, vendar so njihove dimenzije prevelike za učinkovito in raznovrstno uporabo znotraj organizma (in-vivo). Običajne dimenzije takšnih nosilcev se gibljejo od 0,5 do 2,0 μm , kar je dosti preveliko za vse možnosti, ki jih MND ponujajo.

MND pridobijo svojo vrednost šele takrat, ko so predhodno ustrezno površinsko obdelani, ker šele takrat lahko služijo v opisane namene. V procesu površinske obdelave ali funkcionalizacije gre za vezavo ali sosledje vezav kemijskih substanc na površino nanodelcev, da bi bili v zadnji stopnji vezave sposobni vezati želeno biomolekulo ali zdravilno učinkovino. To ni enostaven postopek, saj vezava vsake vezne kemijske substance (posrednika ali povezovalca) zahteva svoje, dostikrat precej specifične pogoje. Ker je za učinkovito vezavo posrednika na nanodelce v vzorcu potrebno vzdrževati fino disperzijo (koloid) teh delcev, so mnogi pogoji vezave povezovalca neprimerni saj porušijo koloidno stabilnost delcev. Tako je potrebno vseskozi vzdrževati kompromis med koloidno stabilnostjo nanodelcev v vzorcu (koloidno raztopino) in fizikalno-kemijskimi pogoji vezave želenega povezovalca.

Namen in cilj tega diplomskega dela sta bili priprava in funkcionalizacija MND, ki omogočajo vezavo različnih biomolekul in so zato kar najširše uporabni. Ker so na trgu prisotni MND, ki jih uporabljajo za nosilce različnih biomolekul in kemijskih učinkovin preveliki za optimalno manipuliranje znotraj organizma, smo izdelali in površinsko obdelali manjše, okoli 10 nm velike MND. Za funkcionalizacijo smo izbrali takšne povezovalce, ki omogočajo dober spoj organskih in anorganskih molekul in hkrati omogočajo nadaljnje vezave drugih biomolekul ali kemijskih učinkovin. Zato smo v prvi fazi uporabili družino povezovalcev, ki jim s skupnim imenom pravimo silani. Ti so znani po dobri vezavi na anorganske materiale, hkrati pa omogočajo nadaljnjo vezavo organskih molekul. V drugi fazi pa smo na funkcionalizirane nanodelce s silanom vezali preprosto organsko molekulo, ki omogoča nadaljnje vezave biomolekul. Pri tem pa s funkcionalizacijskimi molekulami nismo porušili koloidne stabilnosti magnetnih nanodelcev v disperziji.

V diplomskem delu smo predpostavili, da je okoli 10 nm velike MND možno uspešno površinsko obdelati z ustreznim silanom, ki omogoča nadaljnjo vezavo organske molekule, in na ta način pripraviti MND za nadaljnje aplikacije v biologiji in medicini.

2 PREGLED OBJAV

Nanotehnologije so danes trend razvoja v znanosti. Kljub temu, da so magnetne nanodelce (MND) razvijali že pred več desetletji, jim je šele današnji hitri razvoj preciznih tehnik funkcionalizacije in karakterizacije omogočil prodor na različna področja znanosti.

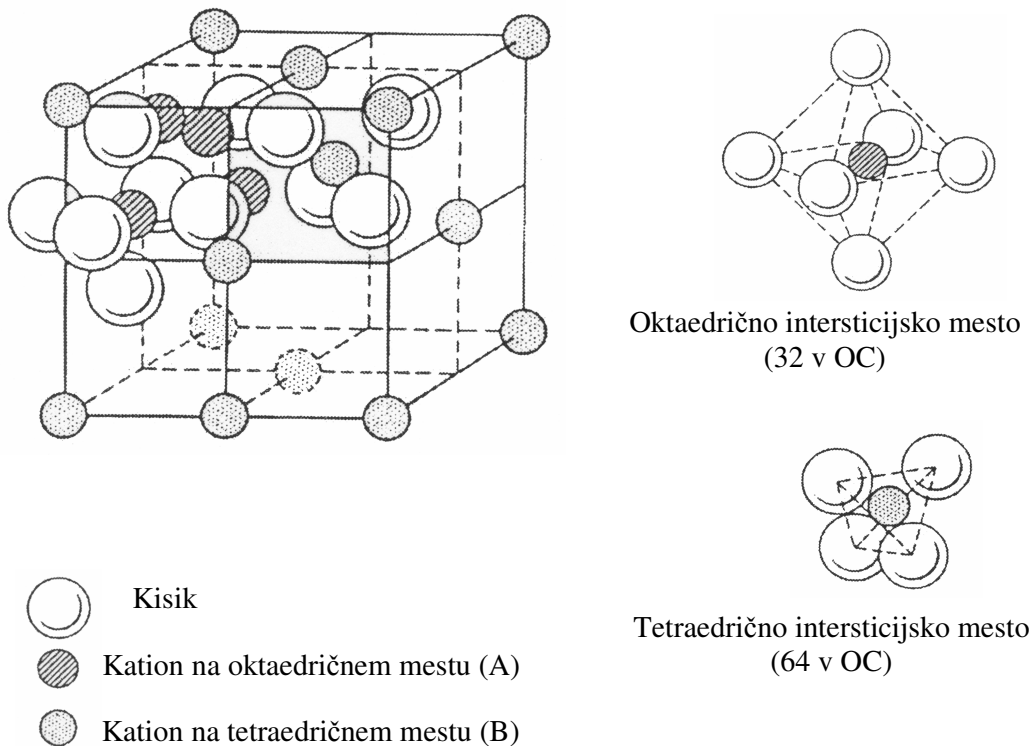
2.1 LASTNOSTI MAGNETNIH MATERIALOV IN TIPI MAGNETNIH NANODELCEV

Rezultat hitrega razvoja nanomaterialov, še posebej magnetnih nanodelcev (MND), je veliko število različnih tipov le-teh. Med seboj se razlikujejo po magnetnih in drugih lastnostih, velikosti in elementih, ki jih sestavljajo.

2.1.1 Kristalna struktura magnetnih nanodelcev

Feriti, kovinski oksidi $\text{Me}^{\text{II}}\text{O}\cdot\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_3$ ali $\text{Me}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_4$, kjer Me predstavlja dvovalentni kovinski ion (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) ali kombinacijo dvo- in trovalentnih kovinskih ionov, kristalizirajo v kubični, ploskovno centrirani spinelni strukturi. Spinelnna struktura je dobila ime po naravnem mineralu spinelu (MgAl_2O_4), ki jo je prvi opisal Bragg leta 1915 (Košak, 2006).

Slika 1 prikazuje osnovno celico spinela, ki je sestavljena iz osmih podcelic AB_2O_4 kar ustreza formuli $\text{Mg}_8\text{Al}_{16}\text{O}_{32}$ pri spinelu. Vsaka podcelica vsebuje štiri O^{2-} ione, ki tvorijo štiri oktaedrične (A) in osem tetraedričnih (B) intersticijskih mest. Ta mesta morajo zapolniti trije kationi, eden dvovalenten (A^{2+}) in dva trivalentna (B^{3+}). Kationi zasedejo v vsaki podcelici dve oktaedrični in eno tetraedrično mesto. Celotna celica tako vsebuje 32 O^{2-} ionov, 16 oktaedrično in 8 tetraedrično koordiniranih kationov.



Slika 1: Osnovna celica spinela (Košak, 2006: 2)

2.1.2 Magnetne lastnosti magnetnih materialov

Magnetne lastnosti materiala so posledica magnetnih momentov elektronov v atomih, ki sestavljajo material. Elektroni, ki krožijo okoli jedra atoma, povzročajo magnetni moment, katerega vrednost predstavlja osnovno enoto magnetizma elektronov. Če se magnetni momenti elektronov v celoti medsebojno kompenzirajo (so si medsebojno nasprotni) je magnetni moment atoma enak nič – govorimo o diamagnetikih. Če pa je kompenzacija magnetnih momentov elektronov le delna, ima atom določen magnetni moment – govorimo o paramagnetikih, feromagnetikih, antiferomagnetikih in ferimagnetikih. Posebno področje zavzemajo superparamagnetne snovi (Košak, 2006).

Magnetne lastnosti materialov opisuje susceptibilnost (χ), ki predstavlja razmerje med magnetizacijo magnetnega materiala (M) in zunanjim magnetnim poljem (H), ki nanj vpliva. Materiali, ki posedujejo diamagnetne lastnosti imajo, magnetni moment usmerjen

antiparalelno na magnetno polje, v katerem se nahajajo. To se odraža v negativni in precej nizki susceptibilnosti reda velikosti -10^{-5} cm³/mol. Po odstranitvi takega materiala iz magnetnega polja ta ne poseduje nobenih magnetnih lastnosti več. Primeri diamagnetnih materialov so snovi, ki nimajo prostih elektronov, kot npr. Cu, Au in Ag (Sun s sod., 2008).

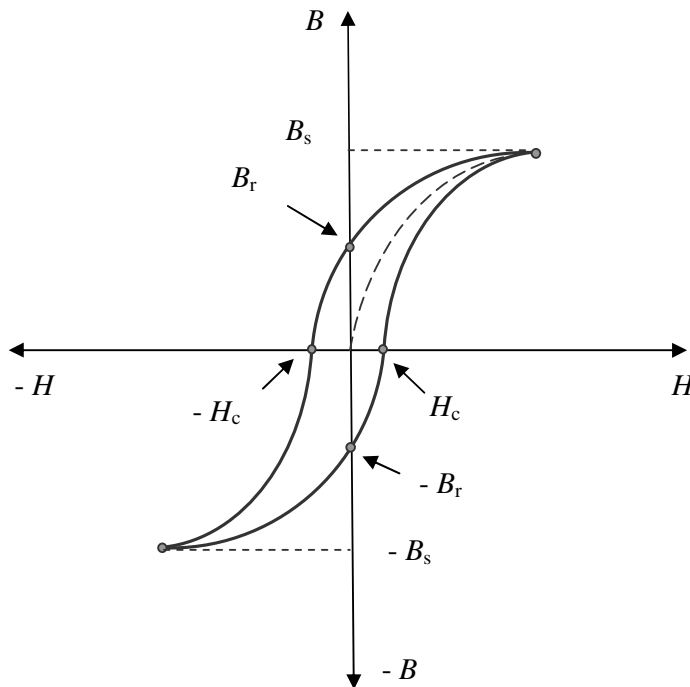
Pri materialih s paramagnetnimi lastnostmi gre za paralelno usmerjen magnetni moment materiala s silami magnetnega polja. Tu je susceptibilnost pozitivno predznačena in nekoliko višja, reda velikosti 10^{-1} cm³/mol. Tak material po odstranitvi zunanjega magnetnega polja ohranja magnetizacijo. Primer takega materiala so magnetni delci sestavljeni iz več magnetnih območij – domen. Atomi, ki jih sestavljajo, so lahko: Pt, Pd, Al, Sn, Cr, Mn, Mg, Ca ali W, lahko pa gre za različne soli (npr.: kloridi, sulfati, karbonati) (Sun s sod., 2008).

Pri materialih s superparamagnetnimi lastnostmi gre za magnetne nanodelce, ki so monodomenski. Magnetne lastnosti so enake kot pri paramagnetnih materialih, s to razliko, da material po odstranitvi iz magnetnega polja ne poseduje nobenih magnetnih lastnosti (Sun s sod., 2008).

Tako kot pri dia-, para- in superparamagnetikih je tudi pri feri-, fero- in antiferomagnetikih kristalna snov zgrajena iz kristalnih zrn. Vsako kristalno zrno je pri fero- ali feromagnetnih snoveh razdeljeno na domene, kjer je usmerjenost magnetnih momentov istosmerna. V vsaki od domen prevladuje nasičena magnetizacija, ki nastane spontano, brez vpliva zunanjega magnetnega polja. Primeri feromagnetnih materialov so Fe, Co, Ni in mnoge njihove zlitine. Ko tako snov postavimo v zunanje magnetno polje, se postopno magneti vsaka domena posebej, dokler nimajo vse domene magnetnega momenta usmerjenega v smeri zunanjega magnetnega polja. Feromagnetne snovi so v osnovi podobne feromagnetnim s to razliko, da imajo celotno magnetizacijo nekoliko manjšo. Najbolj znan feromagnetni material je magnetit (Fe₃O₄). Antiferomagnetne snovi so ravno tako razdeljene na domene, vendar imajo te domene magnetne spine antiparalelno usmerjene druga na drugo, tako da je celotna magnetizacija enaka nič (usmerjenost magnetnih momentov imenujemo tudi magnetni spin). Susceptibilnost pri takih materialih je nizka in

temperaturno odvisna. Primeri antiferomagnetnih snovi so MnO, FeO, NiO in ZnFe₂O₄ (Košak, 2006).

Pri preučevanju magnetnih lastnosti magnetnega materiala ne moremo mimo histerezne zanke. To je krivulja, ki kaže odvisnost magnetne poljske gostote (B), kar označujemo tudi kot magnetizacija magnetnega materiala (M) od magnetne poljske jakosti (H) pri cikličnem magnetenju preučevanega magnetnega materiala (slika 2). Če materialu v katerikoli fazi magnetenja, posebej v fazi nasičenja, zmanjšamo zunanje polje, se razmagnetenje ne vrača po magnetilni krivulji, pač pa po neki krivulji, ki opisuje zaostajanje magnetenja za poljem. Ko opravimo pri magnetenju en cikel, porabimo energijo, ki je sorazmerna ploščini histerezne zanke. Gostoto magnetnega polja, ki ostane v feromagnetni snovi, pri vrednosti magnetne poljske jakosti nič, imenujemo remanentna magnetna poljska gostota (B_r). Če hočemo izničiti remanentno magnetno poljsko gostoto, moramo postaviti snov v magnetno polje z nasprotno smerjo remanentnega polja. Magnetno poljsko jakost tega polja imenujemo koercitivna magnetna poljska jakost (H_c) (Košak, 2006).



Slika 2: Histerezna zanka (Košak, 2006: 15)

2.1.3 Tipi magnetnih nanodelcev, ki v svoji strukturi vsebujejo železo

2.1.3.1 Nanodelci iz železovega oksida

Ko govorimo o nanodelcih iz železovega oksida imamo v mislih nanodelce magnetita (Fe_3O_4) ali maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ki imata spinelno kristalno strukturo. Ti nanodelci so najbolj raziskani MND za uporabo v biomedicini, saj imajo dobro biokompatibilnost, so biorazgradljivi in jih je lahko sintetizirati. V metaboličnih procesih organizma ti nanodelci razpadejo na železove ione, ki jih organizem ponovno uporabi za lastne potrebe (npr. v molekuli hemoglobina) (Weissleder s sod. 1989).

Nanodelce iz železovega oksida je možno sintetizirati na več različnih načinov. Večinoma se za biomedicinske aplikacije uporablja nanodelce, sintetizirane s koprecipitacijo iz vodnih raztopin železovih oksidov (opisano v poglavju Sinteza magnetnih nanodelcev Co-ferita), možne pa so tudi drugačne sinteze, kot sta laserska piroliza ali kemična depozicija par (Tartaj s sod., 2003, Gupta, 2005 in Willard s sod., 2004).

Specifična magnetizacija enako velikih, z različnimi metodami sintetiziranih MND, lahko zelo variira (Gupta, 2005). Magnetne lastnosti nanodelcev iz železovega oksida je možno izboljšati z dopiranjem nekaterih kovinskih ionov drugih oksidov. Ti metal-feriti imajo spinelno strukturo in sledijo osnovni sestavi $\text{MeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, kjer Me predstavlja dvovalentni kation Mn, Fe, Co ali Ni, in jih lahko sintetiziramo na več različnih načinov (Willard s sod., 2004). Pri poskusih in-vitro je Lee s sod. v svoji študiji pokazal, da nanodelci MnFe_2O_4 niso toksični, obenem pa imajo boljše magnetne lastnosti in so zato primerni za medicinske aplikacije (Lee s sod., 2007).

Pred kratkim je bilo ugotovljeno, da je z izbiro različnih izhodnih reagentov za sintezo nanodelcev iz železovega oksida in z variiranjem temperature reakcije možno vplivati na velikost, porazdelitev velikosti ter kristaliničnosti nanodelcev (Sun s sod., 2004 in Lee s sod., 2007).

2.1.3.2 Kovinski nanodelci

Kovinski nanodelci železa, kobalta ali niklja se zelo redko omenjajo, ko govorimo o bioloških aplikacijah, predvsem zaradi njihove kemične nestabilnosti. Oblečeni v zlato ali silikatno prevleko (SiO_2) imajo ti nanodelci v primerjavi z nanodelci železovega oksida relativno visoko magnetizacijo in ohranjajo superparamagnetne lastnosti tudi pri večjih dimenzijah (Huber, 2005).

Te nanodelce je možno obdati s kristalinično prevleko iz železovega oksida, tako da dobimo kombiniran delec z robustno prevleko. Kljub temu pa so takšni kombinirani delci lahko veliki manj kot 10 nm, obenem pa je njihova specifična magnetizacija kar $102,6 \text{ Am}^2/\text{kg}$ (Peng s sod., 2006).

2.1.3.3 Nanodelci zlitin

Tudi nanodelci zlitin imajo superparamagnetne lastnosti in so s primerno površinsko obdelavo primerni za biomedicinske aplikacije. FePt nanodelci vsebujejo skoraj enako molsko razmerje Fe in Pt, kar jim daje večjo koloidno stabilnost, površinska kemija teh delcev pa omogoča vezavo karboksilatnih in aaminskih surfaktantov, kar lahko pripomore k večji koloidni stabilnosti teh nanodelcev v vodnih medijih (Sun, 2006).

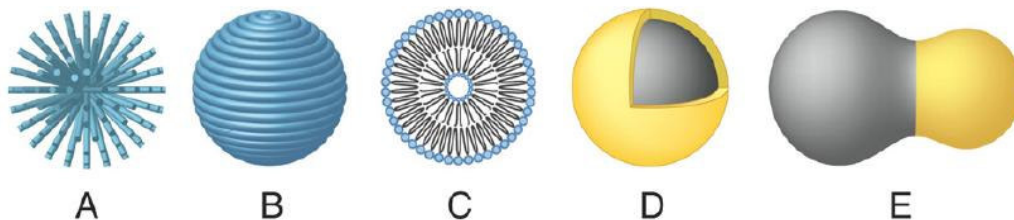
Možnosti za površinsko obdelavo teh delcev je veliko. Hong s sod. poroča o površinski obdelavi FePt nanodelcev s polietilenglikolom (PEG), ki poveča koloidno stabilnost v pufrih, kot je PBS, in medijih, ki se pogosto uporabljajo za celične kulture v biomedicini in biologiji. Tako pripravljene nanodelci lahko na svojo površino vežejo tudi DNK in proteine (Hong s sod., 2005). FePt nanodelce je možno obdati tudi z CoS_2 ali CdO prevleko, kar omogoča multifunkcionalnost tem delcem, deluje citotoksično na rakave celice in hkrati kot fluorescenčni marker (Gao s sod., 2007a in Gao s sod., 2007b).

FeCo nanodelci imajo visoko specifično magnetizacijo, vendar potrebujejo zaščitno površinsko prevleko, ki prepreči oksidacijo in korozijo jedra (Reiss in Hutten, 2005).

Bimetalni FeCo nanodelci z 10–20 nm premerom jedra in 1–3 nm debelim površinskim nanosom zlata ali srebra imajo do trikrat višjo specifično magnetizacijo kot primerljivi nanodelci iz železovega oksida (Bai in Wang, 2005). Na površino FeCo nanodelcev je možno nanesti tudi sloj grafita s segrevanjem v vodiku in s pomočjo kemične depozicije par metana. Ti delci so lahko manjši od 5 nm in imajo specifično magnetizacijo višjo od $160 \text{ Am}^2/\text{kg}$ (Seo s sod., 2006).

2.2 TIPI POVRŠINSKIH PREVLEK MAGNETNIH NANODELCEV

Da bi dosegli želene lastnosti magnetnih nanodelcev (MND), imamo na razpolago različne oblike površinske obdelave. Izbira površinske obdelave (funkcionalizacije) je odvisna od sistema, v katerem bodo nanodelci uporabljeni, funkcionalnih molekul, ki jih želimo pripeti in želenih fizikalno-kemijskih lastnosti funkcionaliziranih MND. Z razvojem različnih tipov MND in področij njihove uporabe se nenehno razvijajo tudi metode površinskih obdelav. Obstaja več osnovnih tipov površinskih obdelav MND (slika 3).



Slika 3: Shema nekaterih osnovnih tipov površinskih obdelav MND: Polimerna prevleka, pri kateri je polimer vezan na površino MND v eni točki (A), polimerna prevleka, ki v slojih popolnoma obdaja MND, (B), MND enkapsuliran v liposom (C), MND iz jedra in anorganskega ovoja (D) in heterodimerni MND (E) (Sun s sod., 2008: 1256)

2.2.1 Polimerne prevleke

Zaradi majhnosti in posledično visokega razmerja med površino in volumnom MND so površinske sile, ki silijo MND k aglomeraciji, precej velike. Temu se skušamo izogniti z elektrostatsko stabilizacijo MND na površini, vendar tudi to ni dovolj, če želimo doseči

koloidno stabilnost v fizioloških sistemih, kjer so prisotne soli. Prav tako so MND brez prevleke izpostavljeni hitremu izločanju iz krvnega obtoka zaradi delovanja imunskega sistema organizma (Berry in Curtis, 2003). V ta namen je potrebno MND površinsko obdelati s polimernimi prevlekami, ki nato zagotavljajo primeren odboj delcev in njihovo koloidno stabilnost. Najpogosteje uporabljana tovrstna polimera za in-vivo aplikacije sta polisaharid dekstran in polietilenglikol (PEG). Te in druge uporabne polimere za tovrstne aplikacije opisujejo nekateri pregledni članki (Wissleder s sod., 1995 in Corot s sod., 2006).

2.2.2 Liposomi in micelle

Razvoj tehnologije vnosa zdravilnih učinkovin v telo s pomočjo liposomov se postavlja na sam začetek zgodovine nanomedicine. Velikostni razred teh struktur je med 100 nm in 5 μm , uporabne pa so za vnos manjših molekul, DNK, proteinov in kontrastnih sredstev za MRI (Torchilin, 2005). Prednost uporabe liposomov je v njihovi biokompatibilnosti, saj jih imunski sistem ne prepozna kot antigen, obenem pa v eno liposomsko strukturo lahko zaobjamemo večje število funkcionaliziranih MND, s čimer vplivamo na večjo koncentracijo funkcionaliziranih MND v tarčnem tkivu. Podobno velja tudi za multifunkcijske micelle (Nasongkla s sod., 2006 in Lecommandoux s sod., 2006).

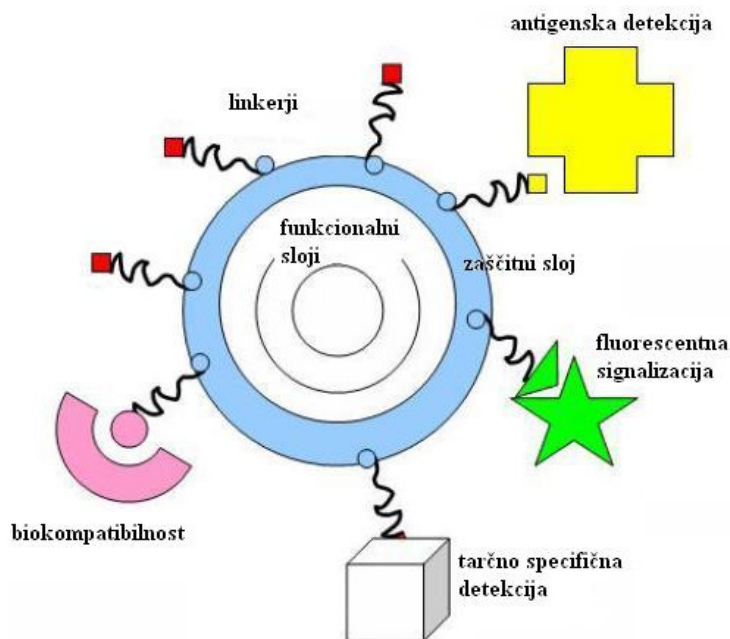
2.2.3 Magnetni nanodelci, sestavljeni iz jedra in anorganskega ovoja

Za koloidno stabilizacijo v fizioloških sistemih se pogosto uporabljajo tudi t.i. »core-shell« delci, ki so zgrajeni iz magnetnega jedra in obdani z anorganskim, homogenim slojem iz silikata (SiO_2) (Lu s sod., 2002 in Stober s sod., 1968) ali zlata (Prime in Whitesides, 1991 in Bain s sod., 1989). Funkcija anorganskega sloja je predvsem zaščita jedra pred kemičnimi vplivi iz okolja in izničenje potencialnih toksičnih vplivov jedra na okolico MND.

2.2.4 Funkcionalni ligandi

V procesu funkcionalizacije na površino MND vežemo različne funkcionalne ligande, ki dajo MND funkcionalnost in uporabnost (slika 4). Ligandi so lahko: tarčne molekule,

sredstva, ki omogočajo prehod nanodelca skozi membrano, optična barvila in terapevtska sredstva. Ker so po strukturi ligandi velikokrat proteinske molekule, so se razvile tehnike za pripenjanje proteinov na površine MND (Aslam in Dent, 1998 in Hermanson, 1996).



Slika 4: Primeri površinske obdelave MND z različnimi vrstami ligandov (Salata, 2004)

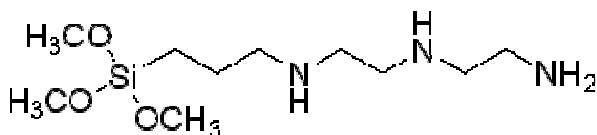
2.3 KOLOIDNI SISTEMI IN GELIRANJE V MREŽE

2.3.1 Teorija silanov in sol-gel kemija

Silani so spojine s silicijem in so po tem elementu dobili tudi ime, pri čemer vse spojine, ki vsebujejo silicij, niso silani. Silicij spada v isto skupino elementov kot ogljik in ravno tako kot slednji v najbolj stabilnem stanju tvori vez s štirimi drugimi atomi. Silicij je bolj elektropozitiven kot ogljik, ne tvori stabilnih dvojnih vezi, lahko pa tvori specifične in uporabne kemijske reakcije. Organosilane, kamor spada tudi 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilan (DETA), lahko zapišemo s splošno formulo R_nSiX_{4-n} , pri čemer n zavzema vrednosti med 0 in 3, X pa lahko predstavlja klor

(klorosilani), OEt, OMe (alkoksisilani), OAc (acetoksisilani) ali NMe₂ (aminosilani) (Šimunič, 2007).

DETA je spojina, ki spada med alkoksisilane, ker pa v radikalni skupini vsebuje več aaminskih skupin, jo uvrščamo tudi med aminosilane. Znotraj alkoksisilanov lahko DETA uvrstimo med trialkoksisilane, saj ima na silicij poleg radikalne vezane še tri metoksi skupine. Njena molekulska formula je: (CH₃O)₃Si(CH₂)₃NHCH₂CH₂NHCH₂-CH₂NH₂, kemijsko strukturo prikazuje spodnja slika (slika 5)(Gelest, 02Naming.pdf).

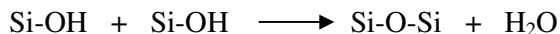
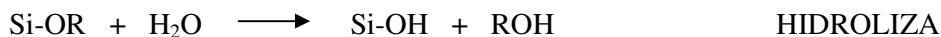


Slika 5: Kemijska struktura 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilana (DETA)

V zadnjih tridesetih letih se je raziskovanje in uporaba sol-gel tehnike močno razširila. V povezavi z nanomateriali omogočajo te tehnike možnost priprave homogenih večkomponentnih sistemov, kot so: nanosi tankih plasti in prevlek na nanodelce, sinteze monodisperznih delcev, izdelave raznih membran, vlaken in kompozitov ter matriksov, v katerih so lahko ujeti različni delci. Razvoj sol-gel kemije se je začel sredi 19. stoletja, ko so sintetizirali prve kovinske alkoksidge in ugotovili, da ob stiku z zrakom gelirajo. Ti materiali so dobili praktično uporabo šele v tridesetih letih 20. stoletja, ko sta Geffcken in Berger odkrila, da lahko s pomočjo alkoksidov pripravimo tanke oksidne filme. Ponovni razcvet je sol-gel kemija doživela v sedemdesetih letih 20. stoletja, ko so pri nizkih temperaturah pripravili monolitne anorganske gele in jih pretvorili v steklo brez taljenja pri visokih temperaturah. S tem postopkom se lahko pri sobni temperaturi pripravi homogena anorganska oksidna materiala z željeno trdoto, optično prepustnostjo, kemijsko odpornostjo, poroznostjo in termično obstojnostjo (Šimunič, 2007).

Sol-gel proces predstavlja tvorbo anorganske mreže preko koloidne suspenzije (sol) in geliranja v mrežo (gel). Geliranje silanov poteka v dveh sklopljenih reakcijah. Prva je hidroliza ali solvoliza silana, ki ji sledi delna ali popolna kondenzacija. Pri hidrolizi gre za tvorbo silanolov (Si-OH), pri čemer je nujna prisotnost vode. Pri kondenzaciji pride do

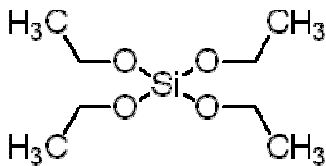
reakcije med dvema silanoloma, pri čemer se tvori siloksanska (Si-O-Si) vez, možne pa so tudi reakcije z vmesnimi produkti (slika 5) (Šimunič, 2007).



Slika 6: Shematični prikaz sklopljenih reakcij hidrolize in kondenzacije, katerih rezultat je geliranje silanov (Šimunič, 2007: 8)

Hidroliza poteka hitreje kot kondenzacija, zato lahko z njo vplivamo na hitrost in preko tvorbe vmesnih produktov tudi na način kondenzacije. Tudi z dodajanjem topil lahko vplivamo na hitrost kondenzacije, lahko pa jo tudi ustavimo (Šimunič, 2007).

Tetraalkoksisilani, kakršen je tetraetoksisilan (TEOS) (slika 7), lahko tvorijo štiri siloksanske vezi, trialkoksisilani (kakršen je DETA) pa tri. Iz tega sledi, da je zamreženje tetraalkoksisilanov večje od zamreženja trialkoksisilanov. Trialkoksisilani imajo tri alkoksi skupine (-O-(CH₂)_n-CH₃), kar jim, tako kot tetraalkoksisilanom, pri kondenzaciji omogoča tvorbo urejenih tridimenzionalnih struktur. Pri kondenzaciji se namreč tvorijo poliseskvioksani s splošno formulo (R-SiO_{3/2})_n, ki so znani že več kot sto let in so bili predmet intenzivnega proučevanja v sredini 20. stoletja. So del organosilanskih materialov in se uporabljajo kot zaščitni premazi, sklopitveni dejavniki, enkapsulanti za encime ter žive strukture. Struktura je lahko povsem amorfna, tvorijo pa tudi urejene, kristalinične strukture, pri čemer gre največkrat za poliedre ali verige. Na strukture lahko vplivamo s spreminjanjem fizikalno-kemijskih pogojev pri geliranju. Kisla hidroliza tako favorizira nastanek poliedrov, bazična pa verižnih struktur (Šimunič, 2007).



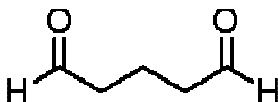
Slika 7: Kemijska struktura tetraetoksisilana (TEOS)

Ena izmed glavnih prednosti sol-gel procesa je zagotovo sposobnost sinteze hibridnih organsko-anorganskih materialov, ki združujejo lastnosti obeh komponent v enem materialu. Da bi dobili materiale točno določenih lastnosti, kombiniramo organske in anorganske materiale, pri čemer skušamo izkoristiti ugodne lastnosti obeh (Šimunič, 2007).

2.3.2 Lastnosti in uporaba funkcionalnega bilinkerja glutaraldehida

Glutaraldehyd (slika 8) je spojina, ki jo uporabljamo na številnih področjih, tako v znanosti, medicini kot v industriji. Najpogosteje je v uporabi kot fiksativ za tkivne preparate še posebej za potrebe elektronske mikroskopije. Uporablja se pri tretiranju industrijskih voda, močno razredčen pa tudi kot dezinfekcijsko sredstvo v medicini, saj je toksičen za mikroorganizme. V medicini se uporablja še pri fiksiranju rentgenskih posnetkov. V biokemiji je uporaben kot bifunkcionalna vezna molekula, ki veže aminoskupine (DHHS, 2001).

Zaradi vloge vezne molekule in afinitete do aminoskupine ga uporabljamo tudi v diplomskem delu za vezavo na radikal molekule DETA.



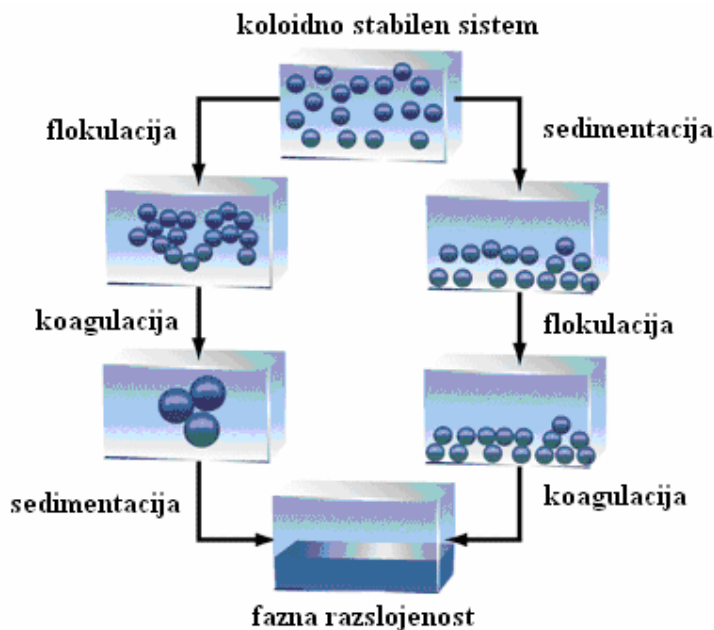
Slika 8: Kemijska struktura molekule glutaraldehida

2.3.3 Koloidni sistemi in njihova stabilnost

Zeta potencial je fizikalna lastnost delca v suspenziji, ki opredeljuje njeno stabilnost v daljšem časovnem obdobju. Zeta potencial je tesno povezan s pH, saj je pH vrednost, pri kateri je zeta potencial blizu 0 (običajno med +30 mV in -30 mV), tista, pri kateri se bodo delci aglomerirali in posedali zaradi pomanjkanja naboja na njihovi površini (Hunter, 1988).

Kadar so majhni delci trdne snovi (najpogosteje med 1 nm in 100 nm) fino in stabilno dispergirani v tekočini, imamo koloidni sistem. Ko govorimo o načinu razporejanja netopnih delcev trdne snovi v tekočem mediju, poznamo dva ekstrema: koloidne suspenzije in kristalinične suspenzije. Za kristalinično suspenzijo je značilno, da so delci dovolj veliki (ponavadi večji od 1 μm), da se sčasoma posedejo in izločijo iz tekočega medija kot oborina, zaradi vpliva gravitacije. Za koloidne suspenzije pa je značilno, da gre za majhne delce (običajno manjše od 1 μm), ki se ne posedajo, pač pa ostanejo stabilno dispergirani v suspenziji. Razen velikosti delcev vpliva na njihovo posedanje tudi elektrokemijski naboj na površini delcev, ki ovira posedanje delcem z enakim nabojem na površini. Če naboj na površini delcev, manjših od 1 μm , ni prisoten, obstaja velika verjetnost, da se bodo ti delci prav tako oborili iz suspenzije (Skoog s sod., 1996).

Ko govorimo o posedanju delcev, razlikujemo več faz: fazo koagulacije, fazo flokulacije in fazo sedimentacije. V fazi koagulacije se delci med seboj sprimejo, pri čemer gre za ireverzibilen proces, medtem ko je flokulacija ali tvorba flokul ravno tako grupiranje delcev, vendar se ti lahko naknadno deflokulirajo, saj med njimi ni prisotnih kovalentnih vezi. V procesu sedimentacije (v ožjem pomenu) pa se delci posedejo in zberejo na dnu, kjer tvorijo sediment (slika 9) (Shaw, 1992).



Slika 9: Dinamika procesov flokulacije, koagulacije in sedimentacije, ki se dogajajo, ko sistem prehaja od koloidno stabilnega h koloidno nestabilnemu (Malvern instruments)

Stabilnost koloidnih sistemov opisuje DVLO teorija, ki so jo okoli leta 1940 zasnovali Derjaguin, Verwey, Landau in Overbeek. Ta teorija predvideva, da je stabilnost delca v suspenziji odvisna od njegovega skupnega energetskega potenciala (V_T), ta pa je v razmerju še s tremi prispevnimi parametri, kot opisuje spodnja enačba (1):

$$V_T = V_A + V_R + V_S \quad \dots (1)$$

V tej enačbi V_S predstavlja energetskega potencial topila, ki običajno le malo prispeva k skupnemu energetskega potencialu delca, saj vpliva le na krajše (nanometriške) razdalje. Veliko pomembnejša sta V_A in V_R , ki predstavljata privlačni (attractive) in odbojni (repulsive) prispevek in vplivata na veliko večje razdalje. Potencial privlaka V_A opisuje sledeča enačba (2):

$$V_A = -H / (12 \pi D^2) \quad \dots (2)$$

kjer je s Hamaker-jeva konstanta, π je permeabilnost topila in D je razdalja med delci. Potencial odboja V_R je dosti bolj kompleksna zveza, ki jo predstavlja sledeča enačba (3):

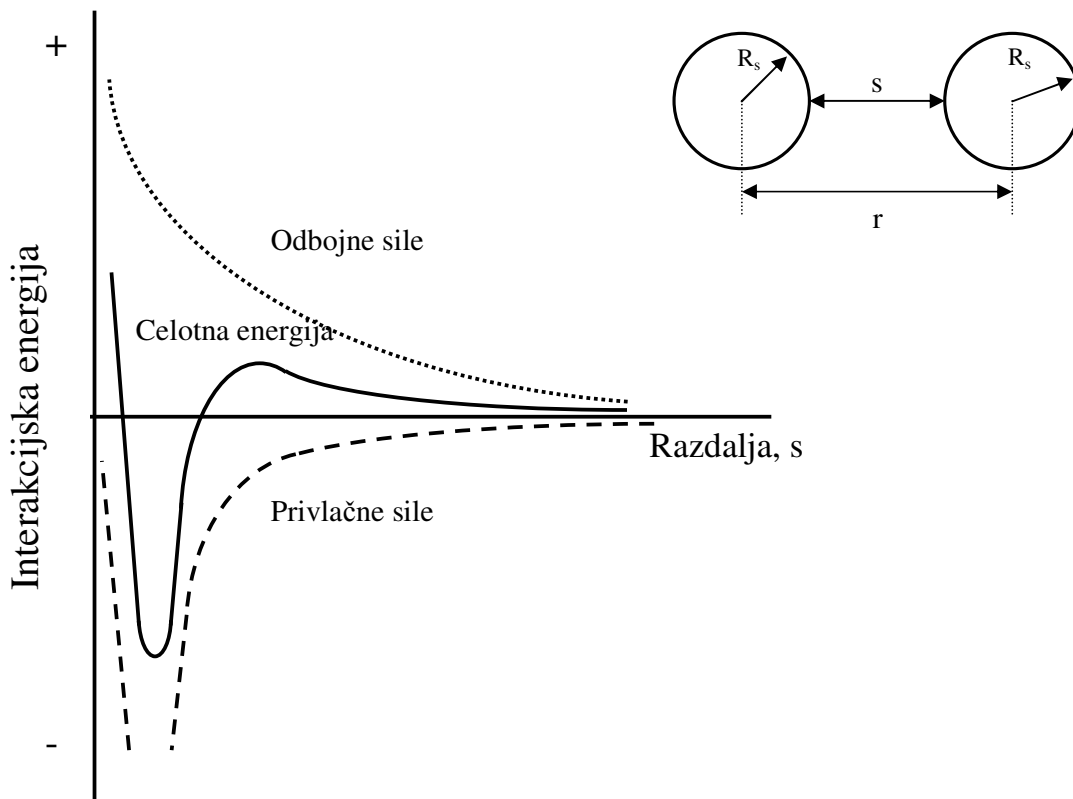
$$V_R = 2 \pi \epsilon a \zeta^2 \exp(-\kappa D) \quad \dots (3)$$

kjer je ϵ dielektričnost, a polmer delca, π je permeabilnost topila, κ je funkcija ionske sestave in ζ je zeta potencial. Dielektrična konstanta ϵ_0 (tudi influenčna konstanta) je definirana kot razmerje med gostoto in jakostjo električnega polja v praznem prostoru, v tem primeru pa govorimo o dielektričnosti (ϵ_r), ki se močno razlikuje od snovi do snovi in je karakteristična za vsako snov (v preglednici 1 so prikazane dielektričnosti nekaterih snovi) (Shaw, 1992).

Preglednica 1: Dielektričnost nekaterih snovi

Snov	dielektričnost ϵ_r (20 °C)
N-metilformamid	190
voda	80
metanol	33
slana voda	32
25 % raztopina amoniaka	31,6
30 % raztopina glukoze	30
acetone	21,5
2-propanol	18
etanol	16,2
očetna kislina	6,2
olivno olje	3,1
askorbinska kislina	2,1
heksan	1,9
zrak	1,00059
vakuum	1,0 (po definiciji)

DVLO teorija predvideva, da je stabilnost koloidnega sistema odvisna od potenciala privlaka (V_A), ki ga opisujejo Van der Waalove sile, in potenciala odboja (V_R), ki obstaja med delci, ko se delci približujejo drug drugemu zaradi Brownovega gibanja (slika 10). Iz tega sledi, da bo koloidni sistem stabilen, če bodo delci, ki so suspendirani v njem, imeli zadosti visok potencial odboja (V_R) in bodo kljubovali flokulaciji ali koagulaciji.

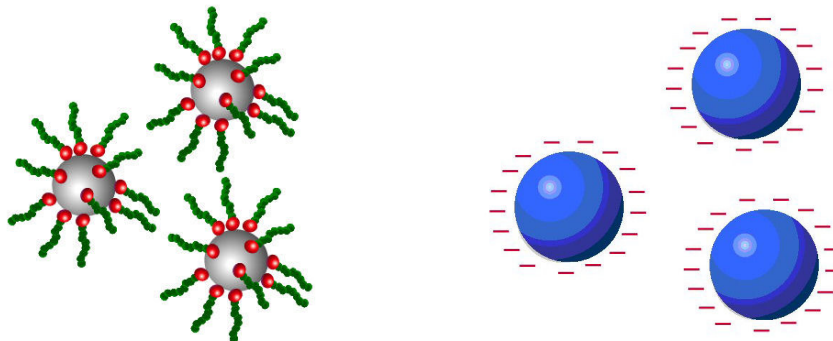


Slika 10: Vpliv odbojnih (V_R) in privlačnih (V_A) sil na celotno interakcijsko energijo v odvisnosti od razdalje med delci (s). Če privlačne sile med delci prevladujejo nad odbojnimi, se ti približujejo in združujejo, kar ima za posledico koloidno nestabilen sistem

Z drugimi besedami: če se zeta potencial približa vrednosti 0 mV (npr. ob visokih koncentracijah soli), je možno, da bo v določeni fazi obstajala šibka privlačnost med delci. Ta lahko tvori flokule, ki jih sile Brownovega gibanja ne morejo razbiti, zunanje sile (kot je močno mešanje) pa. Če torej želimo, da bo koloiden sistem tudi ostal stabilen, moramo zagotoviti, da bo potencial odboja (V_R) ostal dominanten nad potencialom privlaka (V_A). Obstajata dva osnovna mehanizma, s katerima lahko vplivamo na stabilnost koloidnih disperzij:

- sterična stabilizacija, pri kateri lahko na površino delcev vežemo polimere, surfaktante ali disperzante, ki zagotovijo sterično oviro, da delci ne pridejo v medsebojni kontakt (slika 11), in

- elektrostatska stabilizacija, pri kateri lahko površino delcev obdelamo na tak način, da v disperzijo dodamo elektrostatsko nabite kemijske skupine, ki zagotavljajo elektrostatski odboj med delci. To isto lahko dosežemo tudi z uravnavanjem pH vrednosti (slika 12) (Shaw, 1992).



Sliki 11 (levo) in 12 (desno): Sterično (na levi) in elektrostatsko stabilizirani delci (na desni)

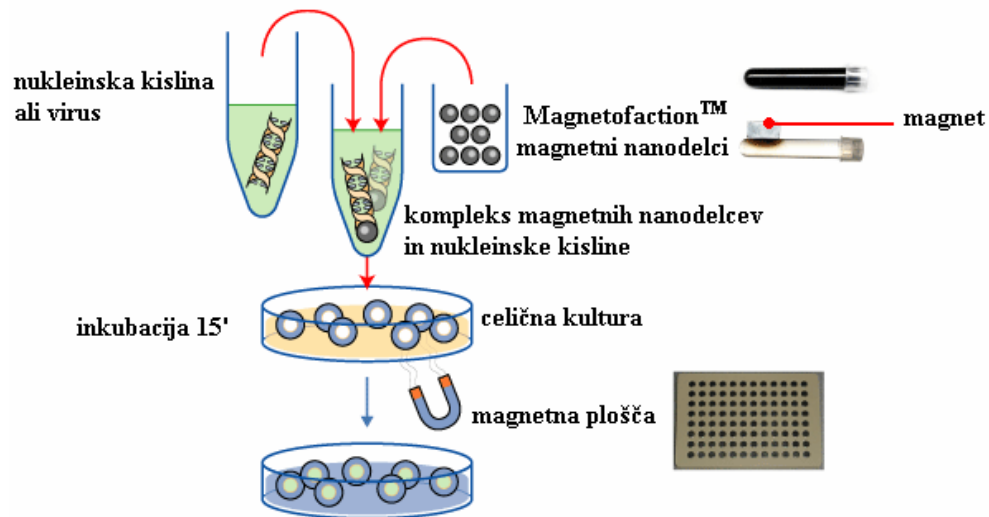
2.4 UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV V BIOLOGIJI IN BIOKEMIJI

Še preden se je uporaba magnetnih nano- in mikrodelcev razširila na področje medicine in njenih panog, so se magnetni delci (MD) uporabljali v bioloških sistemih in-vitro. Tako so nastale številne metode za detekcijo, kvantifikacijo, separacijo in izolacijo bioloških objektov, kot so razne evkarionske celice, bakterije, virusi in najrazličnejše biomolekule (proteini, nukleinske kisline ...). Te metode nastajajo in se izpopolnjujejo še danes. Področje uporabe MD v biologiji (v širšem pomenu) je postalo obsežno in obetajoče, saj nudi nova znanja in uporabo v medicini (v širšem pomenu).

Na svetovnem trgu je mogoče najti mnogo podjetij, kot na primer: Dynal Inc., Bangs Laboratories, Promega, Advanced Magnetics Inc., CPG Inc., Cortex Biochem, Ferro Tec, FeRx Inc., Veridex LLC, Miltenyi Biotec GmbH, Seradyn Inc., Spherotech Inc. in Chemicell GmbH, ki se ukvarjajo s sintezo in funkcionalizacijo magnetnih nano- in mikrodelcev, ki so uporabni za izolacijo ali čiščenje raznih biomolekul, detekcijo tumorjev

ali gensko terapijo. V svoji ponudbi imajo različno funkcionalizirane MD (nano- in mikrometrске velikosti), s katerimi se lahko vežejo specifične evkariontske celice, bakterije, virusi, proteini in nukleinske kisline. Nekatera med njimi ponujajo tudi tehnologijo za separacijo, detekcijo in informacijsko obdelavo rezultatov uporabe pripravljenih delcev.

MND so se izkazali kot učinkovito orodje za izboljšanje transfekcije celic v celičnih kulturah. Trenutno so na tržišču prisotni nanodelci Magnetofection™, ki so funkcionalizirani tako, da lahko vežejo biomolekule, kot so plazmidna DNK, oligonukleotidi, siRNA in virusi, in omogočajo transfekcijo v celične kulture (slika 13). V primerjavi s standardnimi metodami povečajo stopnjo transfekcije, skrajšajo inkubacijske čase in zmanjšajo količine uporabljenih reagentov. Jedra teh nanodelcev predstavljajo železo-oksadni kristali, ki tvorijo feritne magnetne nanodelce velikosti med 50 in 200 nm (Chemicell GmbH, Magnetofection).



Slika 13: Shema poteka magnetofekcije, kjer s pomočjo funkcionaliziranih MND lahko vežemo biomolekule, kot so plazmidna DNK, oligonukleotidi, siRNK in virusi, ter omogočimo transfekcijo v celične kulture (Chemicell GmbH, Magnetofection)

Pomembno področje uporabe magnetnih nanodelcev je separacija bioloških objektov in raznih biomolekul. Separacija biomolekul s pomočjo magnetne sile ni tako nedavna iznajdba. V začetku so bili v uporabi MD mikrometrskih dimenzij, kasneje pa tudi MD

nanometrskih dimenzij. Avtorji so v začetku na MD vezali bakterije, evkarionske celice in viruse posredno z vezavo specifičnih protiteles, ta pa so bila neposredno vezana na površino MD brez uporabe povezovalca ali kakršnekoli druge vezne plasti (Giaver, 1976). Pri kasnejših avtorjih lahko zasledimo uporabo naravnega ali sintetičnega polimera, ki ima afiniteto do primerne posrednika (npr. protein A – membranski protein, izoliran iz bakterije *Staphylococcus aureus*), ki nato veže želeni biološki objekt (Senyei in Widder, 1980). Uporaba proteina A, kot posrednika pri vezavi raznih protiteles, je splošno razširjena, saj gre za majhen, trpežen in zelo uporaben protein, ki usmerjeno veže protitelesa, tako da slednja ostanejo aktivna in lahko neovirano vežejo antigen (Giaver, 1976, Kakita s sod., 1993). Poleg proteina A se za posrednika lahko uporablja tudi vrsta drugih molekul, ki se vežejo direktno na površino MD in delujejo kot povezovalci za vezavo bioloških objektov, kot na primer protein aneksin (Halbreich s sod., 1997).

Nedavne študije kažejo na to, da je za ločevanje biomolekul možno uporabiti mikrosfere, ki imajo jedro iz naravnega ali sintetičnega polimera, proteina, stekla, keramike ali keramičnega oksida. Sledita funkcionalni sloj in zaščitni sloj iz oksidov aluminija, titana, silicija, magnezija ali cirkonija. Te mikrosfere je možno tudi barvno ali radioaktivno označiti z uporabo različnih barvil ali radioaktivnih izotopov, ki se vežejo neposredno na jedro mikrosfere. Na ta način pripravljene mikrosfere so uporabne tudi za in-vivo aplikacije (Oldfield s sod., 2006).

Za izolacijo biomolekul lahko služijo tudi agregati MND (Perez s sod., 2002). Na ta način lahko ugotavljamo prisotnost na primer proteinaz in peroksidaz v bioloških vzorcih. Pri tem je na MND vezan substrat, ki ob prisotnosti encimov (proteinaze in peroksidaze) spremeni strukturo in povzroči aglomeriranje in posedanje MND v suspenziji (Josephson s sod., 2005).

Za separacijo in kvantifikacijo biomolekul lahko služijo tudi razne oblike gelov, katerih sestavni del so MD. V večini primerov se za takšne aplikacije uporabljajo MD mikronske velikosti (Avrameas in Guesdon, 1980 in Gombinski 2001).

2.5 UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV V MEDICINI

V najpreprostejši obliki so MND, ki se uporabljajo v biomedicini, sestavljeni iz anorganskega jedra in biokompatibilne prevleke, njihova nadaljnja površinska obdelava pa omogoča interakcije s specifičnimi ligandi. Takšna sestava omogoča simultano multifunkcijsko delovanje nanodelcev. MND omogočajo revolucionarne spremembe na področju klinične diagnostike in metod zdravljenja. Področje uporabe MND, ki največ obljublja, je razvoj kontrastnih sredstev za slikanje z magnetno resonanco (MRI), za kar so najbolj uporabni superparamagnetni nanodelci iz železovih oksidov, ki se na tem področju uporabljajo in razvijajo že več kot 20 let. Danes so na tržišču številna MRI kontrastna sredstva na osnovi nanodelcev, ki se vežejo na specifična tkiva v telesu in med drugim omogočajo vizualizacijo tarčnega tkiva (Sun s sod., 2008).

V nasprotju s klasičnimi citostatiki se MND lahko sistemsko razporejajo po telesu. Z uporabo magnetnega polja in specifičnih tarčnih biomarkerjev MND predstavljajo dragoceno orodje, ki ga lahko upravljamo na daljavo, obenem pa omogočajo lokalizirano delovanje v majhnih količinah, kar bistveno zmanjša stranske učinke (Sun s sod., 2008).

Eden izmed problemov uporabe MND in-vivo je povezan z aktivnostjo retikuloendotelialnega sistema (RES), ki je del imunskega sistema in prepozna MND kot tujek v organizmu ter ga zato odstrani, še preden ta doseže svoj cilj. Drugi problem je prehajanje skozi membrane in tkiva na meji med krvnim obtokom in tarčnim tkivom (to še posebej velja za možgane). Razsežnost obeh problemov je predvsem povezana z velikostjo, obliko, nabojem na površini in površinsko kemijo MND (Sun s sod., 2008).

Ker so MND pogosto tarča retikuloendotelialnega sistema, mnogo kontrastnih sredstev na bazi MND ne doseže želenega cilja. Da bi podaljšali čas prisotnosti tovrstnih kontrastnih sredstev v krvnem obtoku, je možno MND zaobjeti z lipidnim ovojem, s čimer dobimo t.i. feroliposom (Kirpotin s sod., 1995).

MND nove generacije, ki so namenjeni uporabi za MRI ali kot prenašalci terapevtskih učinkovin, vsebujejo izboljšana nanokristalinična jedra, površinske prevleke in funkcionalne ligande za boljšo detekcijo, obstojnost in tarčno delovanje (Sun s sod., 2008).

2.5.1 Uporaba magnetnih nanodelcev v diagnostične namene

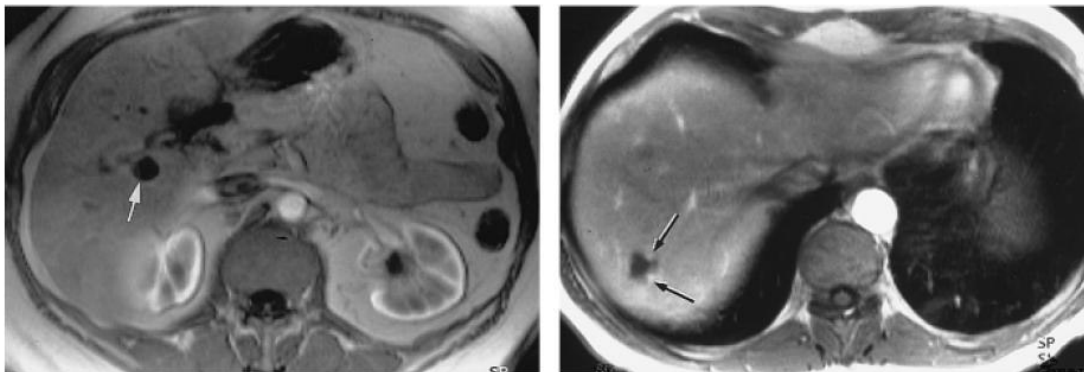
MND je možno funkcionalizirati tudi tako, da so kot kontrastna sredstva uporabni za različne diagnostične postopke, kot so rentgen (X-žarki), MRI in ultrazvok, tovrstna kontrastna sredstva pa so uporabna tudi v nuklearni medicini (Klaveness s sod., 2000).

MND se v medicini lahko uporabljajo kot kontrastna sredstva pri MRI rakavega tkiva, obbolelega tkiva pri kardiovaskularnih boleznih in detekciji raznih struktur na molekularni ravni (slika 14). Obstaja veliko število metod za funkcionalizacijo MND za MRI. Za ta namen je možno na površino MND preko povezovalca vezati različne biomolekule, kot so: polisaharidi, oligosaharidi ali njihovi derivati (dekstran, škrob, celuloza), proteini ali njihovi derivati (albumin), sintetični polimeri (polivinilpirolidon) ali bifunkcionalna ogljikova kislina (Akhtari in Engel, 2006). Funkcionalizacijske metode za uporabo pri MRI veljajo tudi za MND s silikatno prevleko (SiO_2), ki imajo pred neprevlečenimi MND nekaj pomembnih prednosti. Ovoj iz SiO_2 namreč podaljša življenjsko dobo magnetnim nanodelcem, saj preprečuje kemijsko razpadanje jedra, dodatno preprečuje aglomeracijo delcev, ustvarja inertnost delca do okolja, je biokompatibilen, saj je po strukturi najbolj podoben steklu, obenem pa predstavlja učinkovit posrednik za vezavo mnogih funkcionalnih molekul (Tan s sod., 2003).



Slika 14: Instrument za magnetno resonančno slikanje (Good Shepherd)

Danes so v znanosti zelo popularne raziskave uporabnosti različnih MND na področju odkrivanja, diagnosticiranja in zdravljenja različnih oblik tumorjev. Velik napredek je bil storjen pri odkrivanju raka jeter (sliki 15 in 16), kjer lahko zaznamo že 2–3 mm velike rakave tvorbe (Semelka in Helmberger, 2001). Prav tako lahko z MND v kombinaciji z MRI odkrijemo 5–10 mm velike metastaze v limfnih vozlih (Harisinghani s sod., 2003). Na ta način se je povečala možnost za odkrivanje raka prostate, prsi in debelega črevesa, katerih zasevke, v eni izmed razvojnih faz, najdemo v limfnem sistemu (Harisinghani in Weissleder, 2004). Nadalje so MND uporabni za odkrivanje in oceno volumna možganskih tumorjev (Enochs s sod., 1999 in Neuwelt s sod., 2004).



Sliki 15 in 16: Primer uporabe MND za odkrivanje zgodnjih stadijev raka jeter. S puščicami so označene zgoščine MND, ki vezani na tumorsko tkivo služijo kot kontrastna sredstva za MRI (Semelka in Helmberger, 2001: 31)

Vse bolj se kažejo možnosti za uporabo MND na področju MRI za odkrivanje poškodb miokardija, ateroskleroze in drugih vaskularnih obolenj (Sosnovik s sod., 2007 in Wickline s sod., 2007). Nedavna študija je razkrila obstoj 30-ih novih družin peptidov, ki se dobro vežejo na poškodovano tkivo zaradi delovanja ateroskleroze in bi v kombinaciji z MND lahko predstavljali pomemben napredek na področju MRI (Kelly s sod., 2006).

Pri MRI na molekularni ravni gre za občutljiv in specifični monitoring ključnih tarčnih molekul in odziva gostiteljske celice nanje. Na ta način lahko proučujemo zgodnje dogodke pri karcinogenezi, opazujemo celični transport, encimsko aktivnost in sosledje dogodkov pri programirani celični smrti. S kombiniranjem novih MRI tehnik, ki temeljijo na uporabi MND in molekularne ter celične biologije, je možno hitrejše odkrivanje raznih bolezni, individualno zdravljenje in razvoj novih zdravil (Weissleder in Mahmood, 2001 in Weissleder, 2006).

Uporaba MND je možna tudi pri označevanju in koncentriranju zelenih krvnih celic in drugih elementov krvi, pri čemer je prav tako možna uporaba magnetnih delcev mikronske velikosti. V krvnih bankah je pred shranjevanjem krvi potrebno opraviti številne teste, katere bi bilo možno nadomestiti s primerno funkcionaliziranimi magnetnimi nano- in mikrodelci (Graham s sod., 2007).

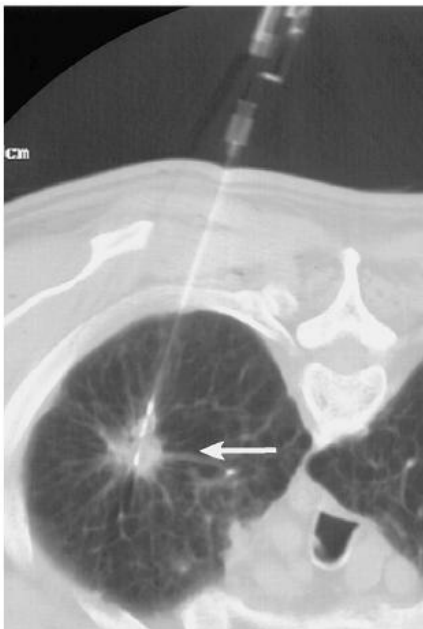
2.5.2 Uporaba magnetnih nanodelcev v terapevtske namene

Glavni problem večine kemoterapevtskih sredstev je njihova relativna nespecifičnost in posledični stranski učinki na zdravem tkivu. Enako velja za obsevanje z γ -žarki, saj se ta oblika zdravljenja uporablja zgolj zato, ker ima močno negativen vpliv predvsem na hitro deleče se celice, kakršne so tumorske celice. Da bi zaobšli ta problem, pri uporabi MND lokaliziramo njihovo prisotnost v določenem delu teles s pomočjo zunanjega magnetnega polja. Ko na površino MND vežemo terapevtsko učinkovino, lahko ti nanodelci služijo za prenos te učinkovine do obolelega tkiva. Ker je razmerje med površino in volumnom sferičnih delcev nanometerske velikosti v prid površini, lahko na posamezni MND vežemo veliko število molekul terapevtskega sredstva. Zaradi magnetnih lastnosti, ki jih ti delci posedujejo, lahko spremljamo potovanje terapevtske učinkovine do tarčnega mesta s pomočjo MRI (Kohler s sod., 2005). V splošnem to pomeni intravenozni vnos MND z vezano citotoksično učinkovino in koncentriranje MND v okolici obolelega tkiva s pomočjo zunanjega magnetnega polja. Ta splošna metoda pa v mnogih primerih naleti na oviro, ki je povezana s fizikalno-kemičnimi parametri MND, jakostjo magnetnega polja, globino, na kateri se nahaja tarčno tkivo v telesu, pretokom krvi in količino MND v krvnem obtoku (Dobson, 2006b in Neuberger s sod., 2005). Kljub omenjenim oviram novejša študija na zajcih, ki jo je izvedel Alexiou s sodelavci z nekoliko modificiranim pristopom, kaže na to, da je uporaba MND kljub vsemu upravičena, saj je tumor na zadnjih okončinah zajcev iz te študije izginil po 35-ih dneh od začetka zdravljenja (Alexiou s sod., 2006).

Na površino MND je možno vezati številna tradicionalna terapevtska sredstva, kot so etoposid, doksorubicin, metotreksat, cisplatin in gemcitabin za zdravljenje raznih obolenj, od revmatoidnega artritisa do malignih oblik tumorjev prostate in prsi (Schulze s sod., 2005, Jain s sod., 2005 in Kohler s sod., 2005).

S pomočjo MND je možno v organizem vnašati tudi različne molekule DNK in RNK za gensko terapijo (slika 17), vendar so se tu v začetku pojavili številni problemi zaradi kratkoživosti tako funkcionaliziranih MND v krvnem obtoku, nespecifičnosti delovanja in slabega prenosa preko bioloških membran (Brigger s sod., 2002 in Juliano s sod., 1999). V

kasnejših študijah so mnogi te probleme uspešno rešili in razvili posebno tehniko prenosa dednega materiala s pomočjo MND, imenovano magnetofekcija (Dobson, 2006a).



Slika 17: Slikovno vodeno vstavljanje vektora z vezanim p53 genom za gensko terapijo pri zdravljenju pljučnega raka. Puščica kaže na obolelo tkivo, kamor so s pomočjo igle vstavili MND z vezanim p53 genom (Weissleeder in Mahmood, 2001: 321)

V smislu tarčnega vnosa se lahko kot terapevtska učinkovina uporabljajo tudi razni proteini, kot je Herceptin™ (znan tudi kot trastuzumab) (Huh s sod., 2005).

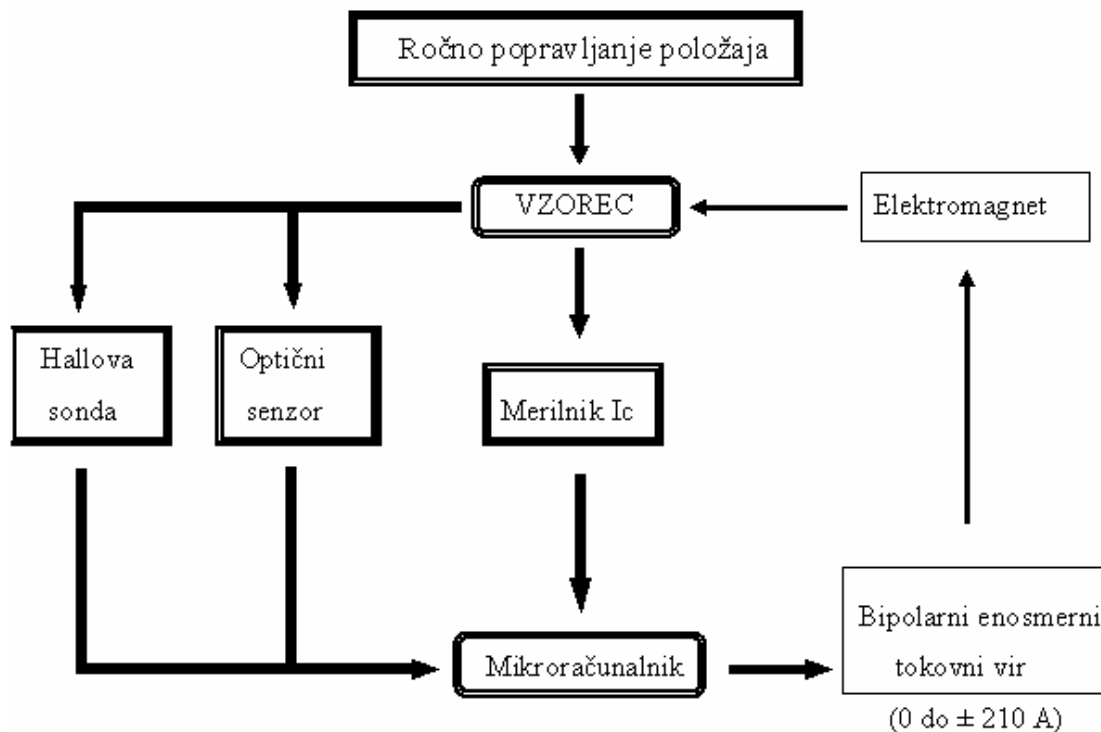
Med nove metode na področju zdravljenja raka s pomočjo MND lahko štejemo tudi metode z magnetno hipertermijo, kjer izkoriščamo lastnost paramagnetnih materialov, da se segrejejo pod vplivom zunanega magnetnega polja. Kirpotin s sodelavci je pripravil kombinirane magnetne nanodelce povprečne velikosti med 15 in 30 nm, sestavljene iz maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) in polimera dekstrana, ki jih je funkcionaliziral z vezavo kemijskih sredstev za zdravljenje raka. Tako pripravljene nanodelce so oblekli z lipidnim ovojem, da je nastal feroliposom. Na površino feroliposomov so vezali protitelesa, ki so omogočala koncentriranje feroliposomov v bližini tumorskega tkiva. Zaradi daljše obstojnosti feroliposomov v krvnem obtoku je obstajala večja verjetnost, da se bo v bližini tumorskega tkiva skoncentriralo večje število funkcionaliziranih MND. Ob indukciji hipertermije z

zunanjim magnetnim poljem so se MND segreli, s čimer se je zaradi povišane temperature porušila struktura liposoma. Ob tem so se funkcionalizirani MND sprostili, specifično vezali na tumorske celice in jih zaradi termičnega vpliva uničili (Kirpotin s sod., 1995).

2.6 ANALIZNI INSTRUMENTI IN METODE

2.6.1 Merjenje magnetnih lastnosti materialov

Princip delovanja magnetometra je shematsko prikazan na sliki 18. Poglavitni namen teh meritev je bil primerjati magnetne lastnosti vzorcev z različnim nanosom silanov, saj je znano, da z večanjem debeline nanosa (npr. silikata) upada magnetizacija nanodelcev.



Slika 18: Shematski prikaz delovanja magnetometra DSM-10 VOLTREG 1,4 (Košak, 2006: 66)

Magnetometer sestavljajo naslednji elementi:

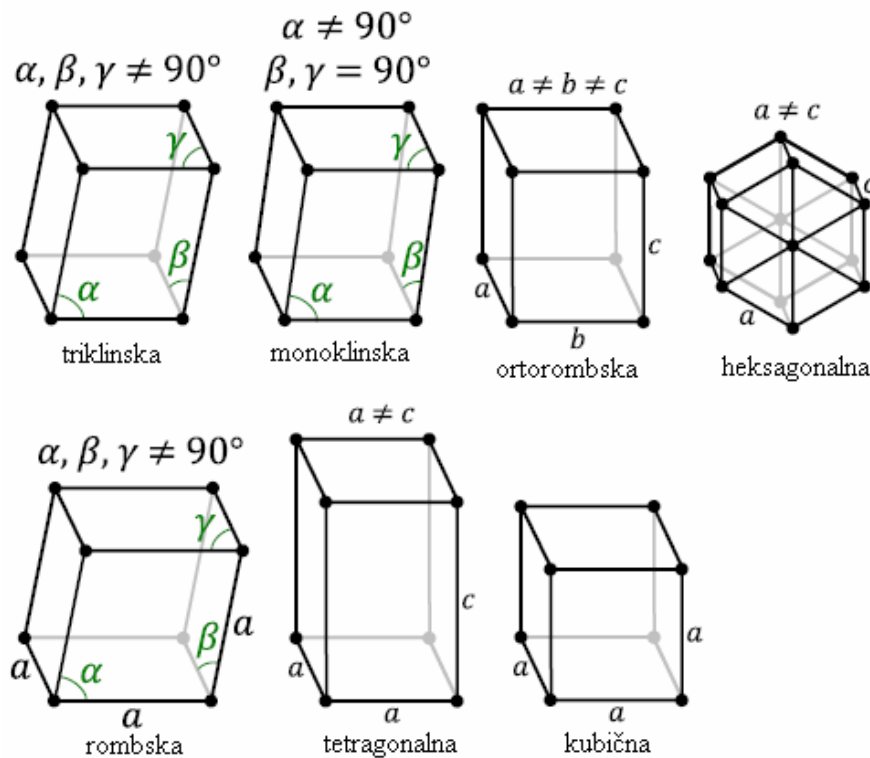
- mehanski del oziroma merilna glava (Drusch),
- kontrolna enota, ki sestoji iz računalnika in vmesne enote (Manics),
- merilec magnetne gostote s Hall-ovo sondo (Bruker),
- kriostat (TBT) s kontrolerjem (Oxford),
- peč (Manics) s kontrolerjem (Eurotherm).

Sistem je zasnovan tako, da lahko meritve opravimo v vakuumu ali ob pretoku različnih plinov v širokem temperaturnem območju (1,5–1050 K). Meritev temelji na principu ničelne pozicije vzorca, meri se torej odklik od začetne lege. Vzorec v kvarčnem ali teflonskem lončku ($V \sim 0,6 \text{ cm}^3$) je pritrjen na konec toge steklene palice dolžine 1 m, ki je izpostavljena nehomogenemu magnetnemu polju. Gradient tega polja je pravokoten na os nosilca vzorca, tako da si sila magnetnega polja prizadeva potisniti vzorec stran od začetne lege. Odvisno od narave vzorca (feromagnetna, paramagnetna ali diamagnetna), vrste vzorca (maghemit, magnetit, Co-ferit, ...) in količine samega vzorca v lončku je ta odklik v smeri zunanje magnetne sile lahko različno velik. Merjeni signal je premosorazmeren kompenzacijski sili, ki vzdržuje drog z nosilcem v ničelni legi in je nasprotno enaka sili, ki povzroča odklik od ničelne lege, to je magnetizaciji vzorca. V procesu meritve aparatura povečuje nehomogeno magnetno polje v merilnem območju vzorca, tako da se ta namagnetni in odmakne od ničelne lege. Nato postopek ponovi z zmanjševanjem tega polja, dokler vzorec (če gre za paramagnetne nanodelce) ne kaže nobenih magnetnih lastnosti, kar sovpada z ničelno lego vzorca. Maksimalni odklik ozančujemo z M_s in ustreza specifični magnetizaciji vzorca, ki smo jo v našem primeru smatrali kar za magnetizacijo merjenih vzorcev. Med meritvijo pa lahko izmerimo še koercitivnost in remanenco za merjeni vzorec. Vzorec za merjenje magnetnih lastnosti običajno tehtata le nekaj mg in je lahko v tekoči ali trdni obliki (Košak, 2006).

2.6.2 Rentgenska praškovna difrakcija (XRD)

Ta metoda je namenjena karakterizaciji materialov in je pogosto v uporabi v geologiji za rutinsko identifikacijo mineralov. S to metodo lahko določimo: osnovno fazno sestavo minerala, stopnjo kristaliničnosti in stopnjo hidratacije (Flohr, 1997).

Amorfni materialov s tem instrumentom ne moremo meriti. Kristalinični materiali imajo specifično urejeno ponavljajočo 3D-strukturo, ki jo definirajo enakomerno razporejeni atomi v vseh treh prostorskih ravninah kristalne rešetke. Kristalna rešetka je osnovna celica kristala in je definirana z razporedom atomov ali skupin atomov (kristalnih vozlišč) v prostorskem koordinatnem sistemu. Tako razporeditev atomov imajo vsi minerali, na enak način pa je urejeno tudi jedro magnetnih nanodelcev, ki smo jih uporabljali. Po obliki kristalne rešetke le-te lahko razdelimo v 14 Bravaisovih ali prostorskih mrež, ki jih lahko združimo v 7 natančno definiranih skupin (slika 19) (Flohr, 1997).



Slika 19: 7 skupin Bravaisovih kristalnih rešetk, ki se med seboj razlikujejo po položaju oglišč, kar zajema različne razdalje med oglišči in različne kote med daljicami, ki oglišča povezujejo (Wikipedia)

Instrument uporablja natančno fokusirano rentgensko (X) žarčenje. Ko rentgenski žarek interagira z ravninami atomov Bravaisove kristalne rešetke, se del žarka absorbira na vzorcu, del se odbije in razprši, del pa se specifično ukloni odvisno od elementarne strukture in oblike kristalne rešetke. Instrument za rentgensko praškovno difrakcijo vsebuje dobro zatesnjeno vakuumsko cev, v kateri se generira rentgenski žarek. Večji, kot je tok, ki teče skozi filament v cevi, večje je število emitiranih elektronov, ki potujejo do bakrenega filtra (lahko tudi nikljev filter), ki nato producira rentgenske žarke. V ta namen se uporabljajo veliki tokovi od 15 do 60 kV. Rentgenski žarek je nato usmerjen na preiskovani vzorec, ki ga je predhodno potrebno zmlati na delce, manjše od 10 μm . Detektor nato zazna uklonjene žarke z vzorca in signal s pomočjo mikroprocesorja pretvori v števno vrednost. S spreminjanjem kota med izvorom rentgenskih žarkov, preiskovanim vzorcem in detektorjem dobimo spekter, ki ustreza preiskovanemu vzorcu. Ko rentgenski žarek zadane preiskovani vzorec in se specifično ukloni, lahko iz uklonskega kota z uporabo Braggovega zakona (enačba 4) izračunamo razdaljo med ravninami kristalne rešetke (d) (Flohr, 1997).

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad \dots (4)$$

V tej enačbi n (ki je celo število) predstavlja urejenost uklonskega žarka, λ je valovna dolžina vpadnega rentgenskega žarka, d je mrežna konstanta kristala, ki predstavlja razdaljo med ravninami atomov v kristalni rešetki, in θ je kot, pod katerim vpadni rentgenski žarek pada na preučevani vzorec.

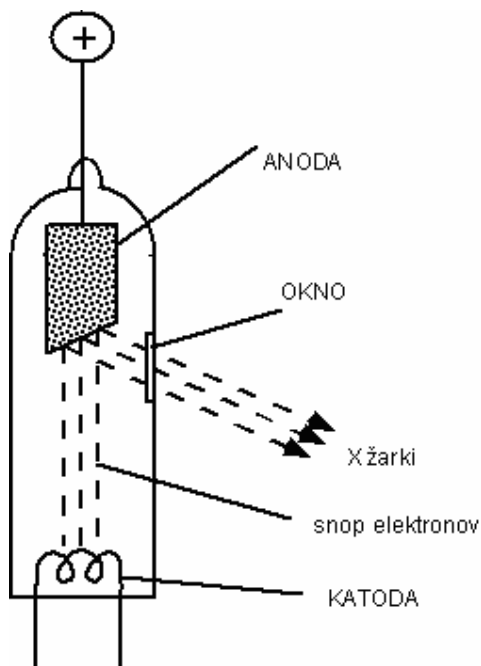
Glede na to, da poznamo valovno dolžino vpadnega rentgenskega žarka (λ) in lahko izmerimo kot, pod katerim vpadni rentgenski žarek pada na preučevani vzorec (θ), lahko izračunamo razdaljo med ravninami atomov v kristalni rešetki (d). Vsak kristal ima specifičen d (mrežno konstanto) pri natančno definiranjem rentgenskem žarku (λ in θ), kar omogoča meritev tega instrumenta (Flohr, 1997).

2.6.3 Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF)

Rentgenska spektrometrija temelji na vzbujanju atoma s hitrimi elektroni ali z rentgenskimi žarki ter na nastanku novega karakterističnega žarčenja. Pri rentgenski fluorescenčni spektrometriji obsevamo preiskovani vzorec s primarnim rentgenskim žarkom iz rentgenske cevi ter merimo valovno dolžino in intenziteto sekundarnega sevanja, ki je značilno za element v vzorcu (Veber, zapiski).

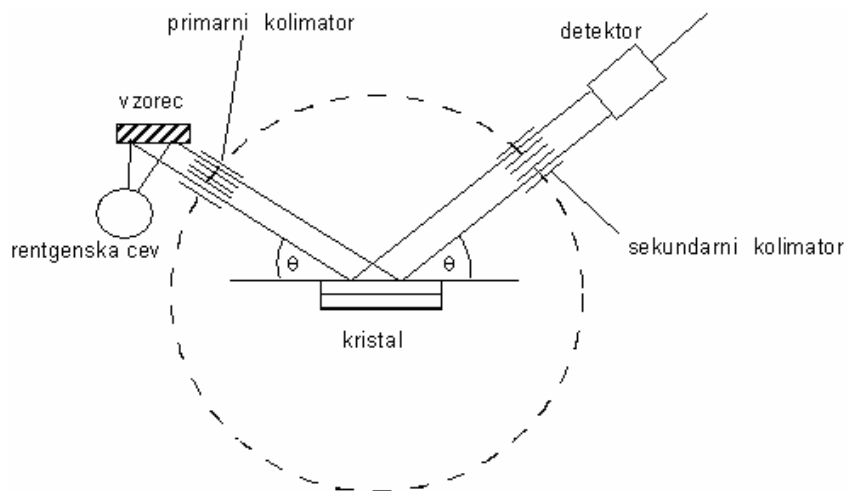
Rentgenski žarki so del elektromagnetskega spektra med 0,1 in 100 Å, v rentgenski fluorescenci delamo predvsem z žarki dolžine 0,1–15 Å. Če obsevamo atome elementa s pospešenimi elektroni, α -delci ali fotoni, lahko vzbudimo elektrone notranjih elektronskih orbital. Praznina na teh orbitalah se nemudoma zapolni s prehodom elektronov z energetsko višjih nivojev. Posledica teh prehodov je emisija karakteristične rentgenske svetlobe, katere energija ustreza energetskim razlikam posameznih elektronskih stanj (Veber, zapiski).

Sevanje pri tej tehniki izvira v rentgenski cevi, ki sestoji iz katode (običajno volframova žica), anode (navadno iz kroma, molibdena, volframa, zlata ali srebra) in okna, kjer nastali rentgenski žarki izstopajo (slika 20). Katodo segrevamo z električnim tokom, nastale elektrone, ki izstopajo iz žice, pa pospešimo vzdolž cevi z napetostno razliko med žico in anodo (Veber, zapiski).



Slika 20: Shema rentgenske cevi, kakršno uporabljamo pri rentgenski fluorescenčni spektrometriji. X-žarki potujejo od katode, proti anodi in nato skozi okno rentgenske cevi proti vzorcu (Veber, zapiski: 4)

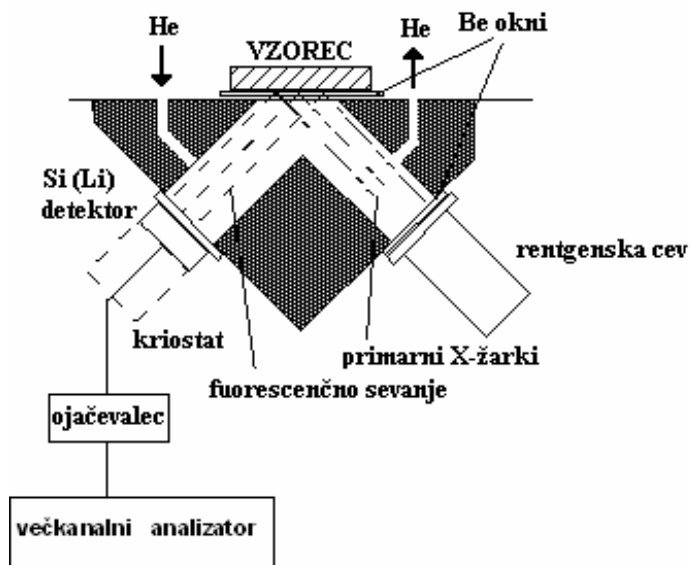
Optično ureditev spektrometra za rentgensko fluorescenco kaže slika 21. Kontinuirano rentgensko sevanje iz rentgenske cevi pada na vzorec (pod kotom 60°), v katerem vzbudi sekundarno rentgensko sevanje. To polikromatsko fluorescenčno sevanje se razširja v vseh smereh, del tega sevanja (kot $\cong 30^\circ$) prehaja kolimator in pada na analizatorski kristal, ki loči določeno valovno dolžino. Z detektorjem merimo intenziteto monokromatskega sevanja. Lego detektorja določimo s pomočjo preciznega goniometra, ki je usmerjen v difrakcijskih kotih θ . Difrakcijski kot θ je merilo za valovno dolžino karakteristične črte, t.j. valovno dolžino, ki je posledica elektronskih vzbujanj. Električni signal iz detektorja ojačamo z ustrezno elektroniko. Optična pot spektrometra mora biti pri določevanju lahkih elementov (z manj kot 20 elektroni na orbitalah) v vakuumu (Veber, zapiski).



Slika 21: Geometrija rentgenskega spektrometra z ravnim kristalom (Veber, zapiski: 7)

Rentgensko sevanje analiziramo s pomočjo uklona na kristalu. Iz Braggovega zakona (enačba 4) sledi, da je teoretična vrednost valovne dolžine, ki jo še lahko zajamemo s kristalom, določena z mrežno konstanto kristala (d) in znaša $2d$ (v praksi $1,9d$). Za merjenje sekundarnega sevanja lahkih elementov rabimo zato kristale z dobro ločljivostjo, torej majhnimi d . Izbirati moramo tudi med kristali različnih refleksijskih lastnosti. Spektrometri imajo zato 1–5 kristalov (Veber, zapiski).

Razen instrumentov, pri katerih analiziramo rentgensko sevanje s pomočjo kristalov, uporabljamo tudi energijsko disperzijske rentgenske spektrometre, pri katerih ločujemo različne valovne dolžine sekundarnih X-žarkov s pomočjo detektorja in ustrezne elektronike. Geometrija le-teh je preprostejša, saj ne vključujejo goniometriškega dela. Zaradi krajše poti doseže vzorec tudi do 100-krat več primarnega sevanja, zato pri teh instrumentih lahko kot izvor uporabimo šibkejše izvore X-žarkov (nižje energetska rentgenska cev ali radioaktivni izotopi). Shema takega instrumenta je prikazana na sliki 22 (Veber, zapiski).



Slika 22: Shema energijsko disperzijskega spektrometra (Veber, zapiski: 9)

2.6.4 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Razlog za uporabo elektronske mikroskopije leži v omejitvah, ki jih ima svetlobni mikroskop. Valovna dolžina vidne svetlobe namreč določa manjšo ločljivost, kot jo omogoča elektronski mikroskop, ki ima različno močan snop elektronov za vir sevanja. Vir teh elektronov je filament, ki oddaja elektrone medtem, ko skozenj teče tok z visoko napetostjo. Energija elektronskega žarka se pri današnjih elektronskih mikroskopih v povprečju giblje med 100 000 in 400 000 eV. Ta žarek nato potuje skozi vakuum v kolono elektronskega mikroskopa, kjer ga zbere sistem leč. Za razliko od steklenih leč pri svetlobnem mikroskopu se pri elektronskem uporabljajo elektromagnetne leče, ki zberejo elektrone v izredno tanek snop. Ta nato potuje skozi preučevani vzorec, ki ga nanese na posebno mrežico, vpeto v nosilec. Elektroni, ki uspejo priti skozi vzorec ali prostor okoli vzorca, zadanejo fluorescenten zaslon na skrajnem spodnjem delu elektronskega mikroskopa in na njem proizvedejo sliko. Temni deli slike (sence) so gostejši deli vzorca, saj ti prepustijo manj elektronov žarka skozi vzorec. Bolj natančno, gre za razlike v elektronski gostoti vzorca, ki je odvisna od vsebnosti elementov z večjim številom elektronov (večje atomsko število). Elektronsko bolj gosti deli vzorca puščajo na fluorescentnem zaslonu temnejše sence. Usoda elektronov žarka pa ni le absorpcija v

vzorcu in prehod skozi vzorec ter absorpcija na fluorescentnem zaslonu. Veliko število elektronov se od vzorca tudi odbije ali pretvori v drugo obliko energije in izseva s površine vzorca v obliki sekundarnih elektronov, karakterističnih X-žarkov, vidne svetlobe, razpršenih elektronov (BSE) in Auger elektronov. Tudi vsi elektroni, ki pridejo skozi vzorec, ne dosežejo fluorescentnega zaslona, pač pa se razpršijo v obliki elastično in neelastično razpršenih elektronov ter zavornega sevanja X-žarkov. Za produkcijo slike pa so, kot že rečeno, pomembni le elektroni, ki pridejo skozi vzorec in se pri tem ne razpršijo (Williams in Carter, 1996a).

Na presevni elektronski mikroskop je možno priključiti tudi nekaj pomembnih instrumentov za slikanje in karakterizacijo vzorca na mrežici. Za prevod v elektronsko obliko slike se pogosto uporablja CCD kamera, katero lahko vstavimo pred fluorescentni zaslon. Za karakterizacijo vzorca pa se uporabljajo različne oblike spektrometrije, kot sta EDS in spektrometer za merjenje X-žarkov (Williams in Carter, 1996a).

2.6.5 Energijaska disperzijska analiza X-žarkov (EDS)

Energijski disperzijski analizator žarkov X (EDS) je instrument, ki deluje v tesni povezavi z elektronskim mikroskopom. Rezultat meritve s tem instrumentom je spekter, ki prikazuje odvisnost med številčno distribucijo X-žarkov (pogosto poenostavljeno kot intenziteta X-žarkov) in energijo le-teh. Obstajata dva tipa X-žarkov. Prvi so karakteristični X-žarki, ki nastanejo, ko elektroni ionizirajo atome v vzorcu in ti izsevajo energijo v obliki X-žarkov, ki je karakteristična za natanko določen atom. Drugi pa so X-žarki zavornega sevanja, ki nastanejo, ko jedra atomov v vzorcu upočasnijo elektrone v elektronskem snopu. Prej omenjeni spekter je rezultat obeh tipov X-žarkov (Williams in Carter, 1996b).

EDS analizator je sestavljen iz treh pomembnih delov: detektorja, procesne elektronike in predvajalnika. Detektor zaznava X-žarke in jih pretvarja v signal v obliki napetosti, procesna elektronika najprej ojača te signale in jih nato analizira, MCA predvajalnik pa te ojačane in analizirane signale vizualizira na zaslonu (Williams in Carter, 1996b).

2.6.6 Merjenje specifične površine vzorcev po metodi BET

Določevanje specifične površine z metodo BET je osnovano na fizikalni adsorpciji in kapilarni kondenzaciji inertnega plina na površino vzorca. Specifična površina je površina delcev na enoto mase ali prostornine materiala, zato je izražena v m^2/g ali m^2/cm^3 . Meritev poteka tako, da v bučko natančno natehtamo vzorec in jo vpnemo v instrument. Instrument zatem avtomatsko potopi vse vpete bučke (pri našem instrumentu so tri) v posodo s tekočim dušikom, da se prostornina bučke skupaj z vzorcem ohladi na kriogeno temperaturo, in prične z meritvijo. Instrument nato v bučko dovaja natančno določeno količino inertnega plina, ki se nato adsorbira na površino vzorca. Dodatek plina je vedno večji, pri čemer je tlak natančno izmerjen, na površini vzorca pa se adsorbira vedno več molekul plina. Izmerjeni tlak ob ravnotežju se nato primerja s tlakom ob nasičenju, njuno relativno razmerje pa se beleži v odvisnosti od adsorbiranega plina na vzorcu. Med procesom adsorpcije se večja debelina adsorbiranega filma. Najprej se zapolnijo najmanjše pore na površini materiala, nato se popolnoma prekrije vsa površina vzorca in na koncu se zapolnijo še največje pore v procesu kapilarne kondenzacije. Ko instrument doseže maksimalen tlak in so vse površine vzorca prekrte z molekulami plina, se postopek ponovi v obratnem vrstnem redu, pri čemer gre za zniževanje tlaka inertnega plina in desorpcijo plina s površine vzorca. Krivulji, ki jih dobimo na ta način, opisujejo adsorpcijsko-desorpcijske izoterme, katerih analiza nam daje informacije o površini in poroznosti vzorčnega materiala. Podlaga meritev je enačba metode BET:

$$\frac{P}{V_a (P_s - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(P/P_s)(C-1)}{V_m C} \quad \dots (5)$$

V tej enačbi je V_a volumen adsorbiranega plina, V_m volumen monoplasti adsorbiranega plina, P parcialni tlak adsorbata, P_s nasičeni parni tlak adsorbata pri eksperimentalni temperaturi in C je konstanta, katere približek lahko izračunamo s sledečim izrazom:

$$c \approx \exp\left(\frac{\Delta H_A - \Delta H_L}{RT}\right) \quad \dots (6)$$

kjer sta ΔH_A toplota adsorpcije monoplasti inertnega plina na površino delcev in ΔH_L toplota kondenzacije plina vsake naslednje adsorbirane plasti.

Izračun specifične površine materiala v vzorcu pa poteka po sledeči enačbi:

$$S = \frac{N_a V_m A_m}{V_{mol} m_s} \quad \dots (7)$$

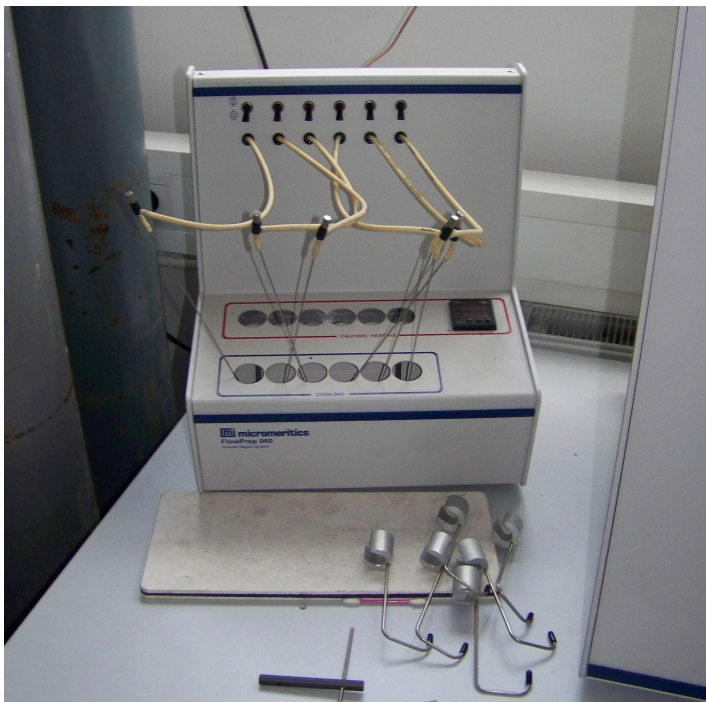
V tej enačbi je N_a Avogadrovo število (6×10^{23} at/mol), A_m površina adsorbirane molekule ($16,2 \times 10^{-20}$ m² za N₂), V_{mol} volumen mola plina pri normalnih pogojih (22,4 l/mol) in m_s masa vzorca (Košak, 2006).

Ker nas v primeru meritev na MND pogosto zanima podatek o velikosti nanodelcev v vzorcu, lahko iz podatka o specifični površini vzorca (S) izračunamo povprečno velikost nanodelcev v vzorcu (d_{BET}). Poleg znanih podatkov potrebujemo le še podatek o gostoti materiala, ki ga merimo, v tem primeru gostota MND, da lahko predpostavimo:

$$d_{BET} = 6 / \rho \cdot S \quad \dots (8)$$

kjer je ρ gostota merjenega materiala in S specifična površina tega materiala, izmerjena po metodi BET.

TriStar 3000 analizator je optimiziran za uporabo dušika, v splošnem pa je možno uporabljati tudi druge inertne pline (argon, kripton). Pred vsako meritvijo je treba vzorec v bučki posušiti, da se odstrani vsa vlaga, s pomočjo instrumenta FlowPrep 060 – Sample Degas System (slika 23), ki omogoča istočasno segrevanje in prepihanje vzorca z dušikom ali drugim inertnim plinom (Košak, 2006).



Slika 23: FlowPrep 060 – Sample Degas System, ki omogoča istočasno segrevanje in preprihanje vzorca z dušikom ali drugim inertnim plinom. S tem instrumentom vzorec pripravimo za meritve specifične površine

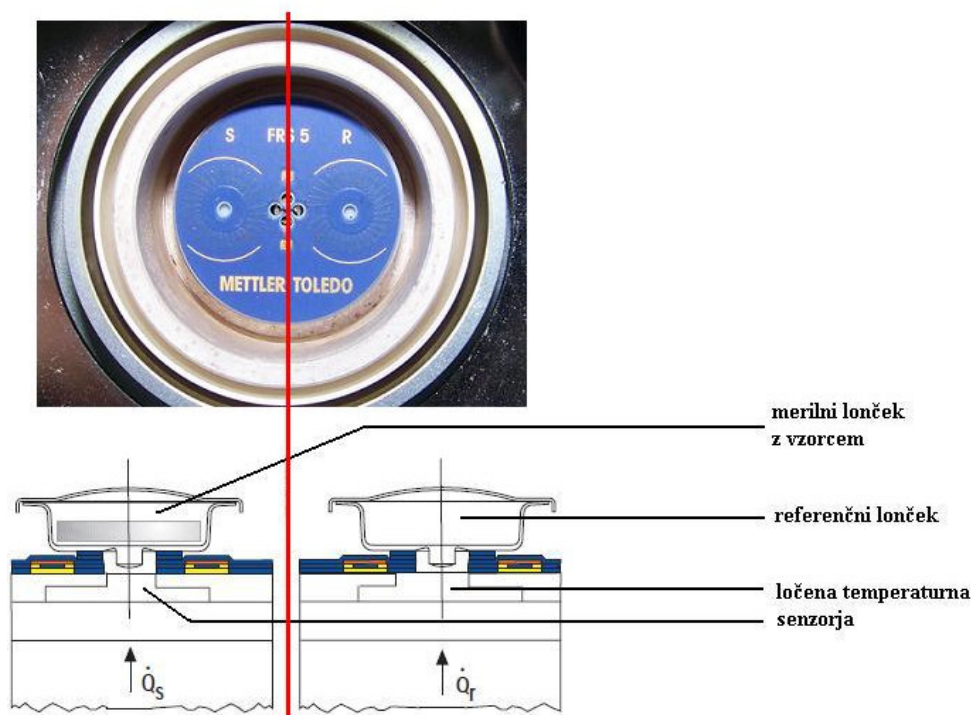
2.6.7 Diferencialna vrstična kalorimerija (DSC)

Ta metoda spada med kalorimetrične metode, ki omogočajo spremljanje entalpijskih sprememb preučevanega vzorca, ki nastanejo kot posledica fizikalno-kemijskih sprememb vzorca med njegovim segrevanjem ali ohlajanjem. Po principu delovanja v grobem ločimo dva tipa tovrstnih instrumentov, ki ju pogosto imenujemo kar DSC. Ključni del prvega instrumenta je grelna enota, sestavljena iz dveh ločenih grelcev. Na enega položimo lonček z vzorcem, na drugega pa referenčni lonček (običajno prazen). Nato grelna enota istočasno segreva in meri temperaturo obeh lončkov, tako da med njima ni nobene temperaturne razlike. Instrument medtem preračunava razlike v dovedeni električni energiji, katere zagotavljajo enako temperaturo obeh lončkov. Tako lahko pridobimo nekaj informacij o preučevanem vzorcu, kot so:

- temperatura vrelišča vzorca ali njegovih komponent,
- temperatura tališča vzorca ali njegovih komponent,

- vrednost kalorimetrične entalpije v faznem prehodu in
- entropijo v faznem prehodu (Brown, 1998).

Drugi instrument pa ima samo en grelec, na katerega sta postavljena oba lončka (vzorec in referenca). Instrument nato med segrevanjem meri neposredno temperaturo v obeh lončkih in preračunava temperaturne razlike med obema (slika 24). To metodo bolj strokovno imenujemo DTA, kar pomeni diferencialna termična analiza (Brown, 1998).



Slika 24. Posnetek grelno-senzorične plošče diferencialno vrstičnega kalorimetra DSC823^e (premer 3 cm) zg. in shematični prerez skozi to ploščo sp.

2.6.8 Termogravimetrija (TG)

Termogravimetrija (TG) je kvantitativna analizna metoda, s katero določimo spremembo mase vzorca v odvisnosti od temperature in/ali časa. To storimo tako, da vzorec podvržemo določenemu temperaturnemu programu v vnaprej izbrani atmosferi. Občutljiva termotehcnica nam omogoča kontinuirano tehtanje vzorcev kot funkcijo temperature in/ali

časa. Vzorec lahko segrevamo ali ohlajamo z izbrano hitrostjo ali pa ga vzdržujemo pri konstantni temperaturi. Pri meritvah je pomembno, da podamo hitrost segrevanja ali ohlajanja, ki je običajno med 5 in 10 K/min. Dobljene podatke prikazujemo v obliki TG krivulj (Cilenšek, 2002).

Na potek meritev ter natančnost rezultatov vplivajo instrumentalni faktorji in značilnosti vzorca. Med instrumentalne faktorje prištevamo: vpliv atmosfere v peči, temperaturni program (segrevanje, ohlajanje in izoterme), oblika in velikost peči, material, iz katerega so vzorčni lončki, geometrija vzorčnih lončkov, položaj termočlena glede na vzorec, lastnosti termočlena (premer žic in velikost stičišča), hitrost in odziv instrumenta ter občutljivost termotehnice. Značilnosti vzorca, ki vplivajo na potek termičnega razkroja so: masa, velikost delcev in nasutje vzorca ter vpliv reakcijske toplote na TG krivuljo (Cilenšek, 2002).

2.6.9 Diferenčna termična analiza (DTA)

Diferencialna termična analiza (DTA) je dinamična metoda, s katero zasledujemo toplotne efekte pri segrevanju ali ohlajanju vzorcev. Pri tej metodi merimo razliko med temperaturo vzorca in temperaturo termično inertnega materiala – reference (običajno α -Al₂O₃), kot funkcijo temperature ali časa. Razliko v temperaturi vzorca in referenčnega materiala merimo na podlagi razlike v napetosti termočlena, izražene v mV. Površina pod DTA krivuljo je sorazmerna količini sproščene oziroma porabljene toplote (Cilenšek, 2002).

Fizikalne spremembe, ki jih zaznamo z DTA, so: fazni prehodi, spremembe strukture, absorpcija in desorpcija. Med kemijske spremembe, ki jih z instrumentom zasledujemo sodijo: oksidacija, redukcija, dehidracija, kemisorpcija, razkroj, reakcije v trdnem, reakcije v talini in reakcije s plinsko fazo (Cilenšek, 2002).

2.6.10 Analiza plinskih produktov termičnega razpada (EGA)

Razpadne plinske produkte lahko analiziramo z več metodami, npr. z infrardečo spektroskopijo, z masno spektroskopijo, z merjenjem volumna plinov in z merjenjem prevodnosti plinov. Od naštetih je masna spektroskopija najbolj univerzalna metoda za analizo razpadnih plinskih produktov (Cilenšek, 2002).

Masni spektrometer je instrument, ki ločuje ione v plinski fazi in meri razmerje med maso iona (m) in njegovim nabojem (e). Vsak masni spektrometer vsebuje štiri funkcionalne elemente: izvor ionov (ionizator), masni analizator za ločevanje ionov, detektor in vakuumski sistem. Slednji zagotavlja visok vakuum, ki omogoča potovanje ionov od njihovega izvora do detektorja brez trkov z drugimi ioni ali molekulami. Najpomembnejši parameter masnega spektrometra je resolucija ali moč razdvajanja. Teoretična resolucija masnega spektrometra je definirana kot najmanjša razlika mas, ki jih instrument še razdvaja (Cilenšek, 2002).

Rezultat meritev z masnim spektrometrom je masni spekter. Na ordinati je predstavljena intenziteta posameznih ionov v odvisnosti od m/e na abscisi. Pri opazovanju masnega spektra lahko vidimo večje število vrhov, ki vsak zase ustreza določeni vrsti ionov iz vzorca. Številnost vrhov je posledica velikega presežka notranje energije, ki se sprošča pri ionizaciji molekul in povzroča fragmentacijo, preureditev ionov in podobno (Cilenšek, 2002).

3 MATERIALI IN METODE

Pri eksperimentalnem delu smo magnetne nanodelce (MND) pripravljali sami vsakič znova ter jih okarakterizirali z analiznimi metodami.

3.1 SINTEZA Z METODO SOOBARJANJA V VODNIH RAZTOPINAH IN LASTNOSTI MAGNETNIH NANODELCEV CoFe_2O_4

MND Co-ferita smo sintetizirali po postopku, ki je last Kolektor Nanotesla Inštituta (Košak in Žnidaršič, 2007a). Postopek obsega 2 koraka. V prvem se sintetizirajo sami delci, v drugem pa se ti delci hidrostatsko stabilizirajo. Namen drugega koraka je ustvariti naboj na površini delcev, ki preprečuje njihovo spontano aglomeracijo in posledično posedanje.

MND Co-ferita, pripravljani po tej metodi, tvorijo v vodi stabilno koloidno suspenzijo. Pri koncentrirani magnetni tekočini opazimo posebnost in to je tvorba bodic, ki se orientirajo v smeri magnetnega polja, ko magnetni tekočini približamo permanenten magnet. Omenjeni magnetni nanodelci imajo namreč paramagnetne lastnosti, kar pomeni, da sami po sebi nimajo magnetnih lastnosti, jih pa privzamejo, če jim približamo nek permanenten magnet. Pri nekaterih drugih magnetnih tekočinah je ta pojav še bolj izrazit, veliko pa je odvisno tudi od medija, v katerem poteka njegova sinteza (Košak, 2006).

Magnetizacija koncentrirane kobalt-feritne magnetne tekočine znaša med 60 in 65 emu/g ($1 \text{ emu/g} = 1 \text{ Am}^2/\text{kg}$, slednja je SI enota) (Košak, 2006). Velikostni razred na ta način sintetiziranih delcev je med 10 in 12 nm, preračunano iz podatka o povprečni specifični površini delcev v vzorcu, izmerjeni po metodi BET (Košak, 2006).

3.1.1 Sinteza magnetnih nanodelcev Co-ferita

MND Co-ferita smo sintetizirali z metodo obarjanja 1 M vodne raztopine železovega (III) klorida (FeCl_3) in 1 M vodne raztopine kobaltovega (II) klorida (CoCl_2) v volumskem razmerju $\text{Fe}^{3+}/\text{Co}^{2+} = 2/1$, kar ustreza stehiometriji končnega produkta, CoFe_2O_4 .

V steklenih posodah smo ločeno pripravili 1 M vodno raztopino Co^{2+} in Fe^{2+} ionov iz vhodnih surovin $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$. V stekleno čašo smo odmerili 75 ml tako pripravljene vodne raztopine Co^{2+} in Fe^{2+} ionov v volumskem razmerju $\text{Co}^{2+}:\text{Fe}^{2+} = 1:2$. Vsebino čaše smo med mešanjem segreli in termostatirali 30 minut pri temperaturi 40 ± 2 °C.

V reaktorsko posodo smo odmerili 400 ml 1 M vodne raztopine NaOH, ki je služila kot obarjalni reagent. Raztopino NaOH smo med mešanjem segreli ter termostatirali 30 minut pri temperaturi 85 ± 2 °C. Po 30-ih minutah termostatiranja smo dodali v reaktorsko posodo 75 ml predhodno pripravljene vodne raztopine Co^{2+} in Fe^{2+} . Reakcijo smo vzdrževali 1 h pri temperaturi 85 ± 2 °C. Reakcija je potekala dvostopenjsko. V prvi stopnji je prišlo do obarjanja $\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ hidroksidov, v drugi stopnji pa do oksidacije oborjenih kovinskih (II) hidroksidov ter nastanka magnetne spinelne faze CoFe_2O_4 .

Po končani reakciji smo MND CoFe_2O_4 magnetno ločili od tekoče faze in večkrat sprali z destilirano vodo (Košak in Žnidaršič, 2007a).

3.1.2 Elektrostatska stabilizacija Co-feritnih magnetnih nanodelcev in priprava stabilnih magnetnih koloidov na vodni osnovi

Ker pripravljenih MND po sintezi nismo mogli neposredno dispergirati v ustreznem disperznem mediju, smo površino MND fizikalno-kemijsko modificirali tako, da smo na površini MND zagotovili ustrezno elektrostatsko bariero, ki je v disperznem mediju preprečevala neposreden kontakt med nanodelci. Ti bi se sicer zaradi močnih medsebojnih

privlačnih sil agregirali v skupke (aglomerate) in posedali. Istočasno pa smo na ta način zagotovili tudi visoko koloidno stabilnost.

Pripravljene MND CoFe_2O_4 smo prenesli v 100 ml bučko z ravnim dnom. Dolili smo 50 ml predhodno pripravljene 2 M vodne raztopine HNO_3 in mešali 1 h pri sobni temperaturi. Po 1 h smo MND magnetno ločili od bistro-rumene zgornje faze, nanodelcem dodali 75 ml vodne raztopine $\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ v volumskem razmerju 1/2 in mešali 1 h pri 85 °C.

Reakcijsko mešanico smo ohladili na sobno temperaturo in MND ponovno magnetno ločili od bistre zgornje faze. Ločene MND smo dvakrat sprali z 1 M HNO_3 in zatem še z acetonom. Sprane nanodelce smo prenesli v 50 ml plastično centrifugirko, v presledkih dodali 3 ml destilirane vode in s stresanjem centrifugirke delce dispergirali v vodnem mediju. Dobljenemu vodnemu magnetnemu koloidu smo prilagodili vsebnost trdne magnetne faze na 0,065–0,070 g suhe snovi/ml (Košak in Žnidaršič, 2007a).

3.2 FUNKCIONALIZACIJA KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV S TEOS

Za tvorbo silikatne prevleke smo uporabili tetraetoksisilan (TEOS), ki smo ga na Co-feritne MND nanесли tako, da je v prvi reakciji potekala hidroliza, pri čemer so se ob prisotnosti vode odcepile metilne skupine in se je tvoril metanol kot stranski produkt. V drugi fazi je potekala kondenzacija oligomerov, ko se je nekaj takih enot povežalo med seboj. V tretji fazi pa je potekala vezava oligomerov na površino MND, za kar je bil potreben negativen naboj na površini, oz. da so bile na površini proste $-\text{OH}$ skupine. Slednje smo dosegli z bazičnim medijem, v katerem je potekala reakcija (Košak in Žnidaršič, 2007b).

Površinska obdelava stabilno koloidno dispergiranih CoFe_2O_4 nanodelcev s plastjo SiO_2 je potekala v 2-propanolu, kot nosilnem mediju, ob prisotnosti prebitka vode, ki je nujen za izvedbo hidrolize TEOS. V bučki z ravnim dnom smo zmešali 66,6 ml 2-propanola, 13,3 ml destilirane vode in 1 ml koloidno dispergiranih Co-feritnih MND v vodi z vsebnostjo 0,071 g suhe snovi/ml. Da bi zagotovili alkalni medij in katalizacijo reakcije, smo dodali še

1,7 ml 25 % vodne raztopine amoniaka. TEOS smo dodali postopoma s tremi dodatki po 111 μ l v 30 min intervalih. Reakcijo smo pustili teči 5 ur od prvega dodatka TEOS (Kořak in Źnidarřiĉ, 2007b).

Da bi preuĉili vpliv koncentracije TEOS na debelino silikatne prevleke, smo variirali koncentracijo TEOS v reakcijskem mediju. Serijo razliĉnih eksperimentov funkcionalizacije MND Co-ferita s TEOS prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Eksperimenti funkcionalizacije MND Co-ferita s TEOS, pri ĉemer se spreminja koncentracija TEOS v reakcijskem mediju

oznaka vzorca	V_{TEOS}/m_{delcev} [ml/g]	m_{delcev} [mg]	temperatura in ĉas reakcije
CF/SiO ₂ -19	1,014 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -5	2,338 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -4	3,521 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -3	4,690 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -11	5,282 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -10	5,831 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -9	7,014 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -18	8,028 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h
CF/SiO ₂ -8	9,380 ml/g	71	sobna T (~23 °C), 5h

Po konĉani reakciji smo vzorec v buĉki z ravnim dnom posedli s pomoĉjo magneta in ga trikrat sprali z 20 ml 96 % etanola z vmesnim posedanjem na magnetu. Po zadnjem spiranju smo MND, funkcionalizirane s TEOS (usedlino), redispergirali v 10 ml 96 % etanola, jih prenesli v petrijevko in suřili 3 h v suřilniku pri 100 °C. Po koncu suřenja smo suh vzorec s spatulo prenesli v oznaĉeno prahovko in ga shranili za kasnejše analize.

3.3 FUNKCIONALIZACIJA KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z DETA

Aminosilan, kot je DETA, lahko služi kot posrednik, saj je primeren za obdelavo anorganskih površin, na katere želimo vezati biomolekule. Za optimizacijo pogojev funkcionalizacije MND z DETA smo izvedli serijo eksperimentov, pri katerih smo spreminjali: pH, temperaturo reakcije, trajanje eksperimenta in količino dodanega DETA ter vlogo amoniaka v reakciji.

Za vsak nadaljnji eksperiment smo se odločili na osnovi vizualnih opažanj med samo reakcijo in rezultatov analiznih metod (BET, XRF, TEM, EDS in merjenje magnetnih lastnosti vzorca). Vizualna opažanja so nam dala podatek o aglomeraciji MND, analizne metode pa so nam dale podatke o povprečni velikosti MND (BET), velikosti in morfologiji MND (TEM), vsebnosti Si v vzorcu (XRF) in na površini posameznega MND (EDS) ter o magnetnih lastnostih vzorca.

Reakcijski medij za funkcionalizacijo Co-feritnih MND z DETA je predstavljala mešanica 2-propanola in destilirane vode, po zgledu funkcionalizacije s TEOS. V reakcijski medij smo dodali vedno enako količino razredčene magnetne tekočine Co-ferita ter kislino ali bazo, s katerima smo uravnali začetno pH vrednost. Sledilo je postopno dodajanje DETA v 5-ih enakih odmerkih in 10 min intervalih, s čimer smo želeli doseči čimbolj enakomeren nanos DETA na posamezen MND v reakcijski mešanici. Ker se pH vrednost čistega DETA giblje okoli 11, smo po vsakem dodatku v večini primerov morali uravnati še pH reakcijske mešanice z uporabo kisline ali baze. V spodnjih preglednicah je navedena skupna poraba kisline ali baze za uravnanje pH vrednosti. Reakcija je potekala v bučki z ravnim dnom med enakomernim mešanjem na magnetnem mešalu pri zastavljenih pogojih. Po preteku reakcijskega časa smo izmerili končno pH vrednost in vsebino iz bučke z ravnim dnom prelili v 50 ml centrifugirke. Slednje smo centrifugirali trikrat, vsakič pri sobni temperaturi, po 3 min in pri 5000 obratih/min, z vmesnim spiranjem z 2-propanolom. Po zadnjem centrifugiranju smo supernatant zavrgli in usedlini dodali 10 ml destilirane vode, v kateri smo vzorec ponovno redispergirali z uporabo ultrasonične kopeli (10 min). Nato smo vzorec prenesli v petrijevko in ga 5 h sušili v sušilniku pri 100 °C. Po koncu

sušenja smo suh vzorec s spatulo prenesli v označeno prahovko in ga shranili za kasnejše analize.

3.3.1 Vpliv pH na funkcionaliziranost Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

Ker je pH vrednost eden ključnih parametrov, ki vpliva na vezavo neke molekule na površino, smo temu sklopu eksperimentov posvetili največ pozornosti. Z dodatkom kisline smo znižali pH reakcijskega medija in obenem inducirali pozitiven naboj (H^+), medtem ko smo z dodatkom baze zvišali pH reakcijskega medija in inducirali negativen naboj (OH^-) na površini MN. Če so površine delcev nabite, se ti medsebojno odbijajo in je tako disperzija takih delcev stabilna, ob predpogoju, da so delci dovolj majhni. Tako stanje imamo levo in desno od izoelektrične točke. Pri eksperimentih oblačenja magnetnih nanodelcev z DETA smo za uravnavanje pH vrednosti uporabljali amoniak in dušikovo kislino (HNO_3). Ta par smo izbrali zato, ker sta šibka baza in šibka kislina. MND v uporabljeni magnetni tekočini so bili že elektrostatsko stabilizirani v postopku priprave in stabilizacije samih nanodelcev, ta stabilizacija pa v neugodnem pH območju v in okoli izoelektrične točke ($-30 \text{ mV} < \xi < + 30 \text{ mV}$) ne zadostuje, da se nanodelci ne bi spontano aglomerirali in posedali. Zato je iskanje ugodnega pH območja pri funkcionalizaciji magnetnih delcev z DETA izrednega pomena za nadaljnje delo. V preglednici 3 so zbrani parametri pomembnejših eksperimentov tega sklopa.

Preglednica 3: Eksperimenti, ki zajemajo različne pH vrednosti med funkcionalizacijo Co-feritnih MND z DETA

<i>Oznaka vzorca</i>	<i>Vsebnost komponent</i>			<i>Reakcijski pogoji</i>			
	<i>NH₃ 25 % [ml]</i>	<i>HNO₃ 13 % [ml]</i>	<i>DETA [ml]</i>	<i>čas [min]</i>	<i>T [°C]</i>	<i>pH (zač.)</i>	<i>pH (konč.)</i>
S2-c	35	0	0,25	150	23	12,0	12,0
S2-d	10,7	0	0,25	150	23	11,0	11,1
S2-e	0,2	0,015	0,25	150	23	10,0	10,0
S2-f	0,044	0,183	0,25	150	23	9,0	8,9
S2-h	0,02	0,433	0,25	150	23	8,0	8,0
S2-n	0,01	0,531	0,25	150	23	7,5	7,0
S2-i	0,031	0,572	0,25	150	23	6,0	6,0
S2-j	0,005	0,625	0,25	150	23	5,1	5,1
S2-k	0	0,641	0,25	150	23	4,0	3,9
S2-o	0	0,752	0,25	150	23	3,0	3,0
S2-p	0	2,235	0,25	150	23	2,0	2,0

3.3.2 Vpliv temperature na funkcionaliziranost Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

Reakcijska temperatura ima pri mnogih kemijskih reakcijah pomemben vpliv na potek same reakcije, saj med drugim dovede potrebno aktivacijsko energijo, da reakcija lahko steče. Ker je temperaturni profil reakcije navzgor omejen s temperaturo vrelišča 2-propanola, ki znaša ~ 81 °C, smo eksperimente izvajali pri največ 60 °C. V preglednici 4 so zbrani parametri pomembnejših eksperimentov tega sklopa.

Preglednica 4: Eksperimenti, ki zajemajo različne temperaturne vrednosti med funkcionalizacijo Co-feritnih MND z DETA

<i>Oznaka vzorca</i>	<i>Vsebnost komponent</i>			<i>Reakcijski pogoji</i>			
	<i>NH₃ 25 % [ml]</i>	<i>HNO₃ 13 % [ml]</i>	<i>DETA [ml]</i>	<i>čas [min]</i>	<i>T [°C]</i>	<i>pH (zač.)</i>	<i>pH (konč.)</i>
S2-j	0,005	0,625	0,25	150	23	5,1	5,1
S2-j/T₄₀	0,005	0,626	0,25	150	40	5,1	5,1
S2-j/T₆₀	0,01	0,61	0,25	150	60	5,0	5,0

3.3.3 Vpliv trajanja reakcije na funkcionaliziranost Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

Ker vemo, da različne kemijske reakcije potekajo različno hitro, smo v tem sklopu eksperimentov variirali trajanje reakcije. V preglednici 5 so zbrani parametri pomembnejših eksperimentov tega sklopa.

Preglednica 5: Eksperimenti, ki zajemajo različno dolg čas reakcije glede na funkcionaliziranost Co-feritnih MND z DETA

<i>Oznaka vzorca</i>	<i>Vsebnost komponent</i>			<i>Reakcijski pogoji</i>			
	<i>NH₃ 25 % [ml]</i>	<i>HNO₃ 13 % [ml]</i>	<i>DETA [ml]</i>	<i>čas [min]</i>	<i>T [°C]</i>	<i>pH (zač.)</i>	<i>pH (konč.)</i>
S2-j/t₆₀	0,004	0,582	0,25	60	23	5,1	4,9
S2-j	0,005	0,625	0,25	150	23	5,1	5,1
S2-j/t₃₀₀	0,006	0,595	0,25	300	23	5,2	5,1
S2-j/t₁₂₀₀	0,002	0,595	0,25	1200	23	4,9	4,5

3.3.4 Vpliv koncentracije DETA med reakcijo na funkcionalizacijo magnetnih nanodelcev z DETA

Ker smo predpostavili, da se DETA veže na površino magnetnih nanodelcev v obliki monoplasti, smo temu sklopu eksperimentov posvetili najmanj pozornosti. V preglednici 6 so zbrani parametri pomembnejših eksperimentov tega sklopa.

Preglednica 6: Eksperimenti, ki zajemajo različno koncentracijo DETA med reakcijo na funkcionalizacijo Co-feritnih MND z DETA

Oznaka vzorca	Vsebnost komponent			Reakcijski pogoji			
	NH_3 25 % [ml]	HNO_3 13 % [ml]	DETA [ml]	čas [min]	T [°C]	pH (zač.)	pH (konč.)
S2-j/D1	0,008	0,260	0,10	150	23	5,0	5,1
S2-j	0,005	0,625	0,25	150	23	5,1	5,1
S2-j/D2	0,007	1,209	0,50	150	23	5,1	5,2
S2-j/D3	0,006	2,124	0,75	150	23	5,0	4,9

3.4 VEZAVA GLUTARALDEHIDA NA FUNKCIONALIZIRANE KOBALT-FERITNE MAGNETNE NANODELCE Z DETA

Glutaraldehyd smo vezali na MND, funkcionalizirane z DETA, kot posrednik za vezavo biomolekul na MND.

3.4.1 Reakcijski medij in njegov pH za vezavo glutaraldehyda na površino Co-feritnih magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih z DETA

Pri izbiri reakcijskega medija te reakcije smo izbirali med 2-propanolom in destilirano vodo. Po zgledu funkcionalizacije s TEOS in DETA bi tudi to reakcijo bilo možno izvajati v 2-propanolu, vendar tudi v destilirani vodi, saj izhajamo iz magnetnih nanodelcev v prejšnjem segmentu, funkcionaliziranih z DETA, ki so dispergirani v slednjem mediju.

Glede na končno uporabnost teh delcev (vezava biomolekul) pa bi bil primernejši vodni medij. Zato smo za ta segment raziskave najprej zastavili manjši sklop eksperimentov, s katerimi smo ugotovili primeren reakcijski medij in pH območje za ugodno vezavo glutaraldehida. Primeren medij in pH območje smo ugotovili z vizualnim opazovanjem med samo reakcijo (ugotavljanje aglomeracije delcev) in hitrostjo posedanja delcev v posameznem eksperimentu.

Vsi eksperimenti tega segmenta so potekali v bučki z ravnim dnom, kamor smo odmerili 20 ml 2-propanola ali 20 ml destilirane vode (odvisno od eksperimenta) in 5 ml razredčenega vzorca S2-j (funkcionalizirani MND z DETA) z vsebnostjo suhe snovi 2,6 mg/ml. Nato smo z dodatkom 25 % raztopine amoniaka ali 13 % razredčine dušikove V kisline (odvisno od eksperimenta) uravnali željeno začetno pH vrednost (pH(záč.)) in dodali 100 µl 25 % raztopine glutaraldehida. Vsi eksperimenti so potekali 2 h, ob enakomernem mešanju na magnetnem mešalu, pri sobni temperaturi. Po preteku reakcijskega časa smo izmerili končno pH vrednost (pH(konč.)), vsebino bučke prelili v 50 ml centrifugirke in centrifugirali pri takšnih obratih, da so se delci posedli. Koloidno bolj stabilne vzorce smo centrifugirali 15 min pri 7000 obratih/min, za koloidno manj stabilne vzorce pa je zadoščalo 4-minutno centrifugiranje pri 4000 obratih/min. Vzorce smo vedno centrifugirali pri sobni temperaturi. Parametri nekaterih pomembnejših eksperimentov so zbrani v spodnji preglednici (preglednica 7).

Po zadnjem centrifugiranju smo supernatant oddekantirali in shranili za določitev količine nevezanega glutaraldehida, funkcionalizirane MND v sedimentu pa smo redispergirali v 10 ml destilirane vode. Vzorec smo nato prenesli v petrijevko in ga 5 h sušili v sušilniku pri 100 °C. Po koncu sušenja smo suh vzorec s spatulo prenesli v označeno prahovko in ga shranili za kasnejše analize.

Preglednica 7: Parametri nekaterih pomembnejših eksperimentov vezave glutaraldehida na MND, funkcionalizirane z DETA

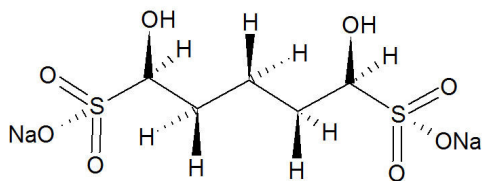
<i>Oznaka vzorca</i>	<i>Vsebnost komponent</i>						<i>Reakcijski pogoji</i>	
	<i>2-prop. [ml]</i>	<i>d. H₂O [ml]</i>	<i>masa MND [mg]</i>	<i>NH₃ 25 % [μl]</i>	<i>HNO₃ 13 % [μl]</i>	<i>GA [ml]</i>	<i>pH (zač.)</i>	<i>pH (konč.)</i>
G5-a	20	0	13	20	0	0,1	8,2	8,6
G5-b	0	20	13	6	0	0,1	8,6	8,7
G8-a	20	0	13	1	0	0,1	6,2	6,0
G8-b	0	20	13	1	0	0,1	7,0	6,6
G7-a	20	0	13	0	0	0,1	5,6	4,8
G7-b	0	20	13	0	0	0,1	5,9	5,3
G6-a	20	0	13	0	4	0,1	3,6	3,6
G6-b	0	20	13	0	4	0,1	3,5	3,5

3.4.2 Titracijska metoda za kvantifikacijo vezanega glutaraldehida

Ker je glutaraldehyd precej majhna molekula, sestavljena le iz ogljika, vodika in kisika, ki so vsi lahki elementi z majhnim številom elektronov, predstavlja precejšen problem za detekcijo. Metode, s katerimi smo prej karakterizirali funkcionalizirane magnetne nanodelce, so v tem primeru neuporabne. Zato smo se zatekli k posrednemu določevanju glutaraldehida s pomočjo titracije. Ta metoda ni primerna za določanje vezanega glutaraldehida na nanodelcih, lahko pa določimo preostanek le-tega v reakcijskem mediju po preteku reakcijskega časa.

Pred titracijo smo v filtrat reakcijskega medija dodali natrijev sulfit (Na₂SO₃), ki z glutaraldehydom tvori komplekse (slika 25), ki sodelujejo v titraciji (sam glutaraldehyd ne sodeluje neposredno pri titraciji). Uporabili smo dva volumska deleža 0,1 M Na₂SO₃ in en volumski delež filtrata s prostim glutaraldehydom, da smo zagotovili zadostno količino Na₂SO₃. Nato smo dodali 4 kapljice barvnega indikatorja timolftaleina (0,1 M raztopina v etanolu), ki je reagiral s prostim natrijevim lugom (NaOH). Ta je nastajal, ko je OH⁻ ion,

prisoten v vodi, reagiral z izstopajočim Na^+ ionom, ki se sprostí po vezavi molekule Na_2SO_3 na vsaki strani kompleksa. Timolftalein se je ob prisotnosti NaOH obarval sinje modro in predstavljal vizualno podlago za titiranje. Sledila je titracija z 0,1 N HCl , pri čemer kislina nevtralizira bazo in obarvanost izginja. Iz porabe titra (0,1 N HCl) smo izračunali maso glutaraldehyda, ki je sodeloval pri titraciji po sledeči formuli (enačba 9) (OSHA, method 64).



Slika 25: Kemijska struktura bisulfitnega kompleksa z glutaraldehydom

$$m\text{GA} = V\text{HCl} \times \text{CHCl} \times 50.06 \quad \dots (9)$$

Maso glutaraldehyda (v enačbi označen z GA) po tej formuli izračunamo iz produkta volumna in koncentracije titra ter polovice molekulske mase glutaraldehyda.

Maso na MND vezanega glutaraldehyda (GA_v) pa lahko določimo iz razlike med maso GA, določenega s titracijo enakega volumna 25 % GA, kot nastopa v posameznem vzorcu (referenca), in maso GA, prisotnega v reakcijski mešanici po reakciji (preostanek) (enačba 10).

$$\begin{aligned} m\text{GA}_v &= m\text{GA}_r - m\text{GA}_p \\ m\text{GA}_v &= (V\text{HCl} \times \text{CHCl} \times 50.06)_r - (V\text{HCl} \times \text{CHCl} \times 50.06)_p \quad \dots (10) \end{aligned}$$

kjer je GA_v vezani glutaraldehyd, GA_r referenčni glutaraldehyd in GA_p preostanek nevezanega glutaraldehyda.

3.5 KOLOIDNA STABILNOST SINTETIZIRANIH MAGNETNIH NANODELCEV V FOSFATNEM PUFRU IN DESTILIRANI VODI

Večina biokemijskih reakcij, ki zadevajo biomolekule, poteka v bolj ali manj nevtralnem mediju ob prisotnosti manjših količin soli. Najpogosteje so zato v uporabi različni pufri z vnaprej določenim pH. Soli v pufru lahko stabilizirajo nekatere biološke strukture, omogočajo različne vezave biomolekul med seboj in zagotavljajo primerno izotonično okolje za mikroorganizme, obenem pa nekoliko ohranjajo in stabilizirajo nastavljeno pH vrednost. Da bi bila nadaljnja uporaba sintetiziranih magnetnih nanodelcev čimbolj enostavna, smo želeli preveriti stabilnost teh delcev v enem izmed pogosto uporabljenih pufrov, t.j. fosfatni pufer (PB).

3.5.1 Koloidna stabilnost Co-feritnih magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih z DETA v PB in destilirani vodi

Da bi preverili koloidno stabilnost Co-feritnih MND, funkcionaliziranih z DETA v PB in destilirani vodi, smo zastavili več serij eksperimentov. V njih smo preučili stabilnost MND, funkcionaliziranih z DETA v vodnem mediju z različnimi pH vrednostmi, v PB z različnimi pH vrednostmi, v PB z različnimi koncentracijami soli in v PB z različnimi koncentracijami nanodelcev. Za spreminjanje pH vrednosti smo uporabljali HNO₃ in tetrametil amonijev hidroksid (TMAH). Eksperimenti so bili izvedeni v steklenih epruvetah in z enakimi volumni posameznih komponent, tako da so bili čimbolj primerljivi med seboj. Stabilnost nanodelcev smo ocenili z opazovanjem in primerjanjem različnih eksperimentov med seboj. Zanimala nas je hitrost in način posedanja nanodelcev na dnu epruvete ter obarvanost neposedene faze nad usedlino. V spodnjih preglednicah so zbrani pomembnejši parametri zastavljenih eksperimentov (preglednice 8, 9, 10 in 11).

Preglednica 8: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND, funkcionaliziranih z DETA v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti

pH (zač.) H ₂ O	pH (konč.) H ₂ O	vol. medija	delci-vzorec	vol. vzorca	masa delcev
3	3,3	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
4	4,7	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
4,5	6,0	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
5	6,3	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
5,5	6,5	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
6	6,5	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
6,5	6,4	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
7	6,5	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
8	6,7	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
9	6,9	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
9,5	7,4	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
10	9,5	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg

Preglednica 9: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND, funkcionaliziranih z DETA v 0,02 M PB ob spreminjanju pH vrednosti

pH (zač.) PB	pH (konč.) PB	vol. medija	delci-vzorec	vol. vzorca	masa delcev
2,9	3,1	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
3,9	4,9	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
4,5	5,3	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
5	5,5	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
5,5	5,8	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
6	6,2	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
6,5	6,6	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
7,1	7,2	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
8	7,8	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
9	8,2	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
9,5	8,8	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg
10	9,5	5 ml	S2-j	500 µl	3 mg

Preglednica 10: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND, funkcionaliziranih z DETA v 0,02 M PB (pH = 6,8) pri različnih koncentracijah MND

vol. medija	delci-vzorec	vol. vzorca	masa delcev
5 ml	S2-j	400 μ l	2,4 mg
5 ml	S2-j	600 μ l	3,6 mg
5 ml	S2-j	800 μ l	4,8 mg
5 ml	S2-j	1,5 ml	9 mg

Preglednica 11: Parametri pomembnejših eksperimentov ugotavljanja stabilnosti Co-feritnih MND, funkcionaliziranih z DETA v PB (pH = 6,8) pri različnih koncentracijah pufru

konc. medija	vol. medija	delci-vzorec	vol. vzorca	masa delcev
2 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
1,5 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
1 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,5 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,25 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,1 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,075 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,05 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,02 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,01 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,0075 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,005 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg
0,002 M	5 ml	S2-j	500 μ l	3 mg

3.6 ANALIZNE METODE

Pri analizi pripravljenih vzorcev smo si pomagali s številnimi analiznimi metodami, da bi ugotovili uspešnost funkcionalizacije MND ter njihove strukturne lastnosti. Ker delci, ki smo jih uporabljali v tej raziskavi, spadajo v nanometrski velikostni razred (t.j. pod 100 nm), smo morali za analizo pridobljenih delcev uporabljati temu primerne analizne metode. Ker je uspešnost vezave funkcionalnih skupin na površino MND izredno težko potrditi, smo si morali pomagati s čimvečjim številom analiznih metod, da bi bili lahko prepričani v rezultat. V celotni raziskavi smo si poleg osnovnih analiznih instrumentov, s katerimi smo spremljali potek in učinkovitost reakcije in jih pogosto najdemo v kemijskem

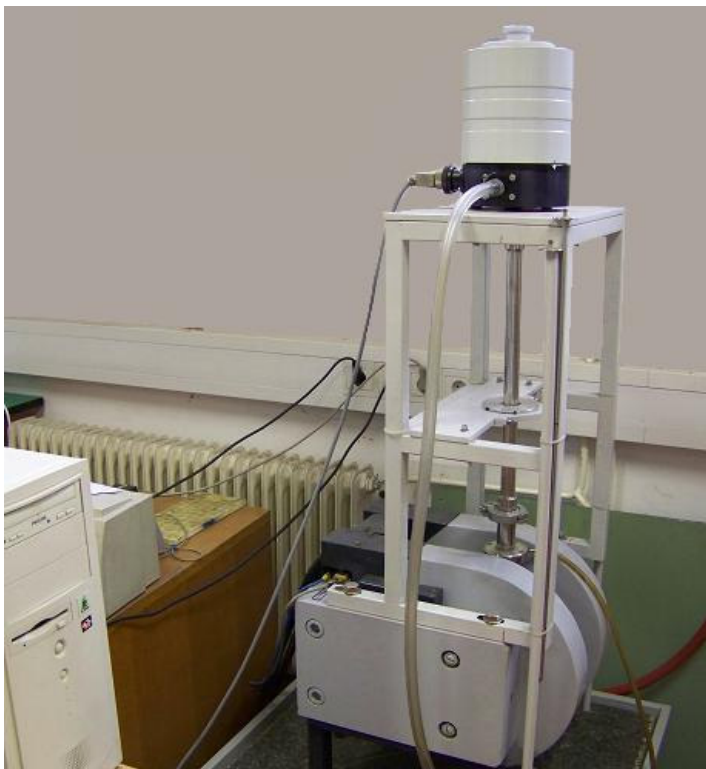
ali biokemijskem laboratoriju, pomagali tudi z nekoliko redkeje uporabljenimi analiznimi metodami, s katerimi smo potrdili rezultate površinske obdelave MND.

3.6.1 Merjenje magnetnih lastnosti materialov

Specifično magnetizacijo vzorcev smo merili z magnetometrom DSM-10 DRUSCH & CIE VOLTREG 1,4 (Manics) v enosmernem magnetnem polju z gostoto magnetnega pretoka med -1,5 T in 1,5 T (slika 26).

Vsakemu uspešno pripravljenemu vzorcu MND (funkcionaliziranih ali nefunkcionaliziranih) smo izmerili specifično magnetizacijo (M_s), ki je predstavljala eno izmed osnovnih informacij o vzorcu. Iz razlike v M_s med vzorci funkcionaliziranih MND in nefunkcionaliziranih MND smo sklepali na uspešnost funkcionalizacije.

Od vsakega vzorca smo zatehtali 4–5 mg MND v teflonski lonček za magnetne meritve ter zapisali natančno maso zatehte na 0,01 mg natančno. Lonček smo z zgornje strani zamašili s približno 12 mg vate ter ga privijačili na drog, katerega smo vstavili v magnetometer. V program instrumenta smo vnesli natančno maso zatehtanega vzorca ter pognali program meritve, ki je nato beležil magnetizacijo vzorca (magnetno poljsko gostoto) ob spreminjanju magnetne poljske jakosti.



Slika 26: Magnetometer DSM-10 DRUSCH & CIE VOLTREG 1,4

3.6.2 Rentgenska praškovna difrakcija (XRD)

Vzorci smo analizirali na PANalytical X'Pert PRO difraktometru (sliki 27 in 28) z Ni filtriranim $\text{CuK}\alpha$ sevanjem, z valovno dolžino $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, v območju $2\theta = 20\text{--}70^\circ$.

S pomočjo tega instrumenta smo analizirali le nefunkcionalizirane MND in MND, funkcionalizirane z DETA (vzorec S2-j). Tako kot pri meritvah specifične magnetizacije smo tudi pri tej metodi uporabili suhe oblike vzorcev. Ker do instrumenta nismo imeli neposrednega dostopa, smo oba vzorca poslali na Kemijski inštitut Ljubljana, kjer jih je z omenjenim instrumentom analiziral Edi Kranjc.

Rezultat meritve rentgenske praškovne difrakcije je spekter, kjer sta v funkcijski odvisnosti vpadni kot, ki je odvisen od kristalne strukture preučevanega materiala, in intenziteta (t.j. jakost signala).

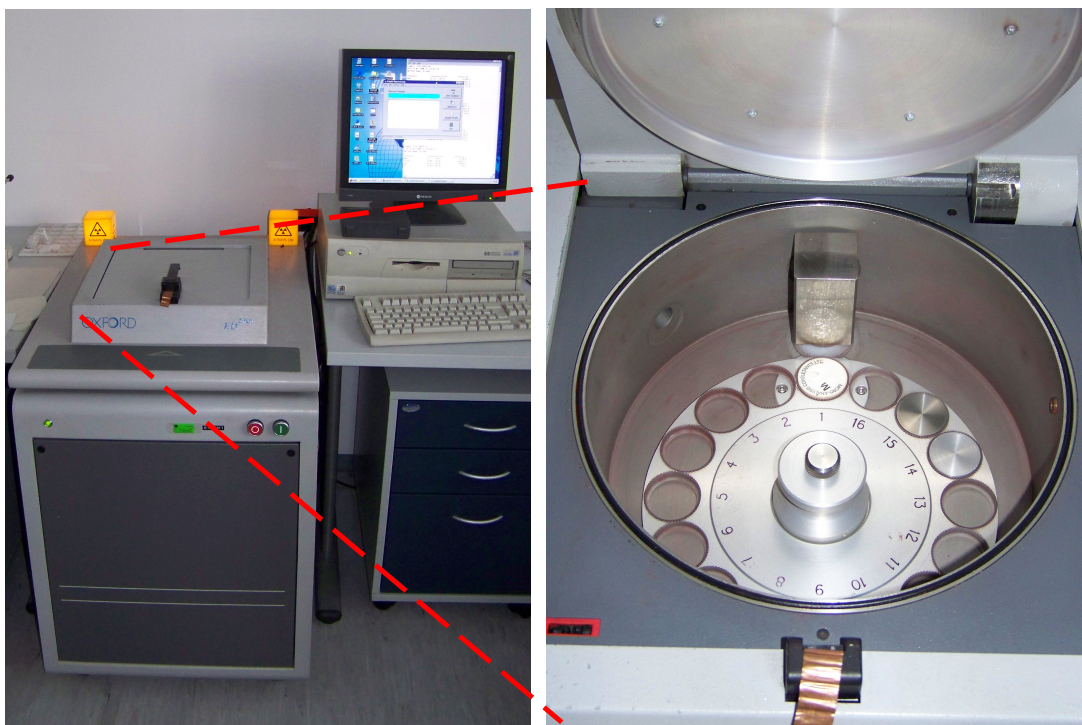


Sliki 27 in 28: Rentgenski praškovni difraktometer PANalytical X'Pert PRO (Kemijski inštitut Ljubljana)

3.6.3 Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF)

Meritve smo opravljali na rentgenskem fluorescenčnem spektrometru OXFORD ED²⁰⁰⁰ z berilijevo sondo (sliki 29 in 30), da smo ugotovili elementarno sestavo vzorca. Vzorec (v prašni obliki) smo iz prahovke, kjer je bil shranjen, pretresli v merilni lonček, opremljen s prozorno folijo na dnu, ki omogoča prehajanje rentgenskega žarka v vzorec. Lonček smo pokrili s pokrovčkom in ga postavili v merilno komoro (slika 30). Ko so bili vsi lončki, skupaj s preiskovanimi vzorci, v merilni komori, smo le-to zaprli ter v njej vzpostavili vakuum. Nato smo zagnali program, ki je beležil analize vsakega od vzorcev.

S to metodo smo analizirali vzorce MND, funkcionaliziranih z DETA, pri različnih pH vrednostih.



Slika 29 (levo) in 30 (desno): Rentgenski fluorescenčni spektrometer OXFORD ED²⁰⁰⁰; instrument v celoti (levo) in detajl – prostor za vzorce (desno)

3.6.4 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

S presevno elektronsko mikroskopijo (JEOL 2000FX, JEOL 2010FX in PHILIPS CM-100) smo proučevali morfologijo sintetiziranih nanodelcev (slika 31). Iz pregleda vzorcev smo dobili informacijo o aglomeraciji, obliki in velikosti MND, njihovi stopnji kristaliničnosti in površinski funkcionalizaciji (npr. homogenost in debelina silikatne prevleke).

Od vzorcev, ki smo jih želeli pregledati s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM), smo pred prenosom vzorca v petrijevko in sušenjem odpipetirali 20 μ l v vodi dispergiranih MND v 2 ml eppendorf mikrocentrifugirko ter jim dodali 1,5 ml destilirane vode. Tako dobljeni podvzorec smo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Nato smo na papirnato brisačo položili z ogljikom prevlečeno mrežico za elektronsko mikroskopijo in s pomočjo pipete nanjo spustili 3–4 kaplice podvzorca, da je ta spolzel preko in skozi

odprtin mrežice v papirnato brisačo. Mrežico z vzorcem smo pustili približno 10 min, da se je na zraku posušila in jo do pregleda pod mikroskopom vstavili v škatlico za mrežice.

Večino vzorcev nefunkcionaliziranih MND, MND, funkcionaliziranih z DETA in TEOS, ter MND, funkcionaliziranih z DETA, na katere smo vezali glutaraldehid, smo lastnoročno pregledovali na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani (PHILIPS CM-100) in na Institutu Jožef Stefan (JEOL 2000FX) s povečavami do 200 000-krat. Za večje povečave smo se obrnili na dr. Majo Remškar z Instituta Jožef Stefan, ki je izvedla pregled vzorca S2-j pri povečavah od 800 000-krat do 1 200 000-krat (JEOL 2010FX).



Slika 31: Presevni elektronski mikroskop PHILIPS CM-100 s CCD kamero za slikanje opazovanih vzorcev v digitalni obliki

3.6.5 Energijska disperzijska analiza X-žarkov (EDS)

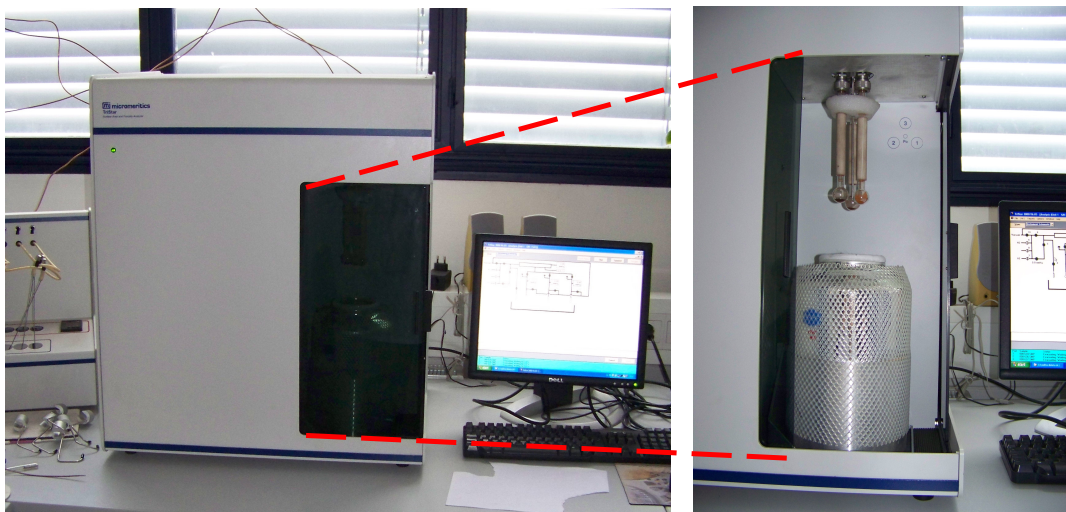
Za potrebe te diplomske naloge smo uporabili energijski disperzijski analizator X-žarkov v povezavi z elektronskim mikroskopom JEOL 2010FX in pridobili podatke o elementarni sestavi vzorca S2-j na območju enega samega funkcionaliziranega MND Co-ferita. Analizo je skupaj s pregledom vzorca izvedla dr. Maja Remškar z Instituta Jožef Stefan.

Analiza se je izvedla na delu mrežice z vzorcem, med opazovanjem s presevnim elektronskim mikroskopom.

3.6.6 Merjenje specifične površine vzorcev po metodi BET

Analizo specifičnih površin nefunkcionaliziranih MND in MND, funkcionaliziranih z DETA in TEOS, smo izvedli z instrumentom TriStar 3000 (Micrometrics) (sliki 32 in 33). Instrument med drugim omogoča merjenje specifičnih površin praškastih vzorcev po metodi Brunnauer – Emmett – Teller (BET).

Vzorec MND smo iz prahovke preko lija prenesli v bučko z dolgim vratom znane mase ter določili maso vzorca na 0,01 mg natančno. Ker instrument lahko meri 3 vzorce naenkrat, smo v bučke na isti način zatehtali 3 vzorce in bučke vpeli v instrument. V posodo za tekoči dušik smo po potrebi dolili tekoči dušik do oznake ter pognali program za meritev.

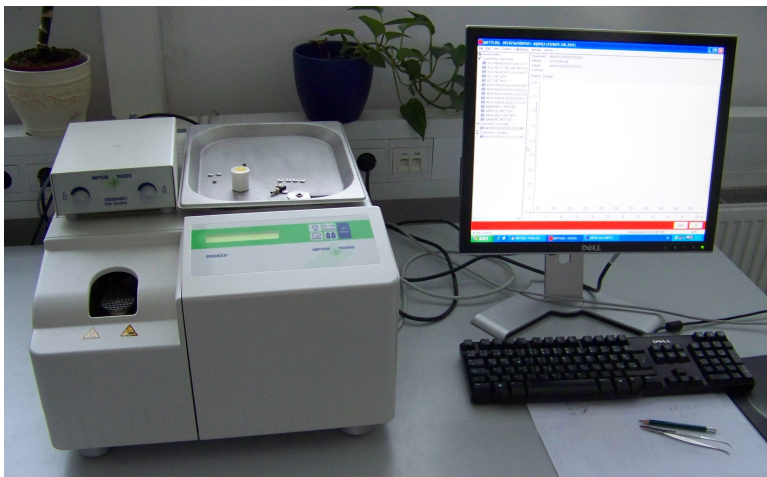


Slika 32 (levo) in 33 (desno): Merilec specifične površine in poroznost praškastih materialov – TriStar 3000, celoten instrument (levo) in detajl – merilni prostor z vpetimi bučkami in posodo s tekočim dušikom (desno)

3.6.7 Diferencialna vrstična kalorimetrija (DSC)

Pri diplomskem delu smo to metodo uporabili za pomoč pri analizi in primerjavi med nefunkcionaliziranimi MND in MND, funkcionaliziranimi z DETA (vzorec S2-j). Meritve smo izvajali z diferencialnim vrstičnim kalorimetrom DSC823^o (Mettler Toledo) (slika 34).

V aluminijaste lončke za DSC smo natančno zatehtali majhen delež vzorcev (nefunkcionalizirani MND, vzorec S2-j in čista DETA), lončke pokrili s pripadajočimi aluminijastimi pokrovčki, ki smo jih predhodno prebodli z iglo in pokrovčke zaprešali na lončke z ročno namizno prešo za tovrstno uporabo. Nato smo lončke z vzorci vsakega posebej vstavili v instrument na merilno mesto in vpisali maso vzorca ter temperaturni obseg segrevanja v program. Določili smo tudi korak (hitrost) segrevanja in pognali program za meritve.



Slika 34: Diferencialni vrstični kalorimeter DSC823^e

3.6.8 Meritve termogravimetrije (TG), diferenčne termične analize (DTA) in analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA)

Meritve termogravimetrije (TG), diferenčne termične analize (DTA) in analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA) smo opravili z instrumentom NETZSCH STA 409 C/CD. Meritve smo opravili na vzorcu nefunkcionaliziranih MND in MND, funkcionaliziranih z DETA (S2-j). Ker do instrumenta nismo imeli neposrednega dostopa, smo oba vzorca (v prašni obliki) poslali na Kemijski inštitut Ljubljana, kjer jih je z omenjenim instrumentom analiziral Jana Cilenšek.

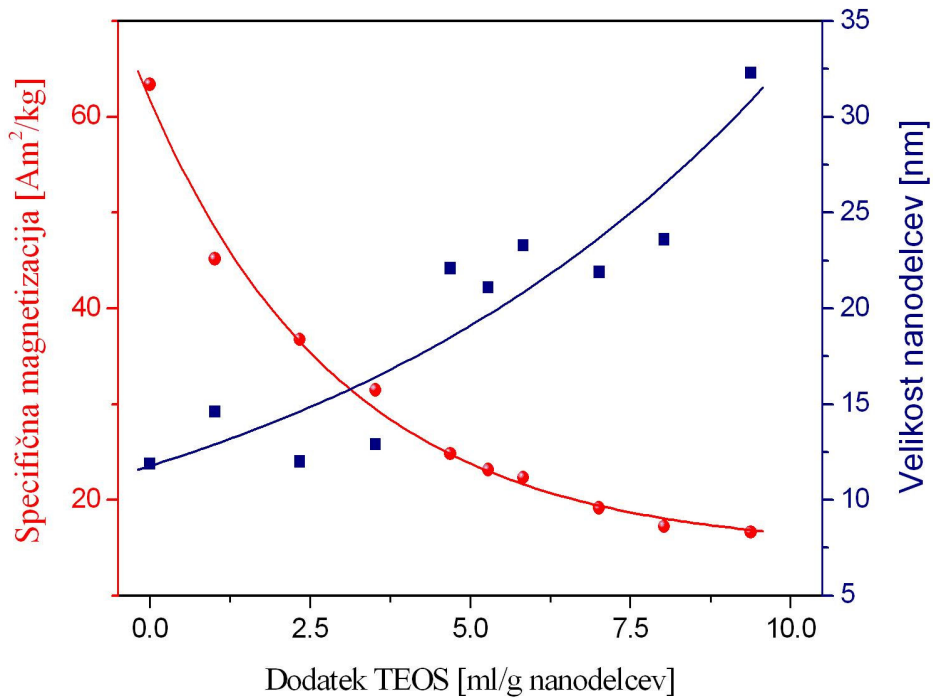
4 REZULTATI

4.1 REZULTATI FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV S TEOS

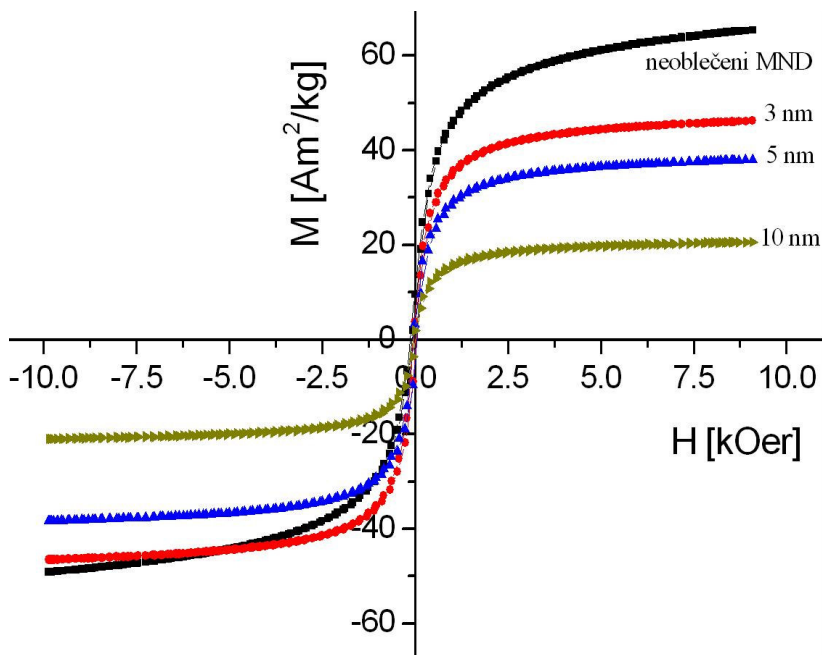
Rezultati funkcionalizacije Co-feritnih magnetnih nanodelcev (MND) s tetraetoksisilanom (TEOS) so pokazali, da z večanjem koncentracije TEOS v reakcijskem mediju raste debelina silikatne prevleke (SiO_2), s čimer raste skupna velikost delcev (d_{BET}) in upada specifična magnetizacija (M_s) (slika 35). Podatki o rezultatih posameznega eksperimenta so zbrani v preglednici 12, poteki delnih histereznih krivulj pa so ilustrativno prikazani na sliki 36.

Preglednica 12: Rezultati meritev velikosti Co-feritnih MND in njihove specifične magnetizacije po funkcionalizaciji s TEOS, ob spreminjanju koncentracije TEOS v reakcijskem mediju

<i>oznaka vzorca</i>	<i>$V_{\text{TEOS}}/m_{\text{MND}}$ [ml/g]</i>	<i>d_{BET} [nm]</i>	<i>d_{SiO_2} prevleke [nm]</i>	<i>M_s [Am^2/kg]</i>
CF/FF-4	0	11,9	0	63,4
CF/SiO₂-19	1,014	14,6	2,7	45,2
CF/SiO₂-5	2,338	12,0	0,1	36,8
CF/SiO₂-4	3,521	12,9	1,0	31,5
CF/SiO₂-3	4,690	22,1	10,2	24,8
CF/SiO₂-11	5,282	21,1	9,2	23,1
CF/SiO₂-10	5,831	23,3	11,4	22,3
CF/SiO₂-9	7,014	21,9	10,0	19,2
CF/SiO₂-18	8,028	23,6	11,7	17,2
CF/SiO₂-8	9,380	32,3	20,4	16,6



Slika 35: Odvisnost velikosti MND, funkcionaliziranih s TEOS, in njihove specifične magnetizacije od koncentracije TEOS v reakcijskem mediju.



Slika 36: Primerjava potekov delnih histereznih krivulj neoblečenih MND (t.j. nefunkcionaliziranih MND) in MND z različno debelino silikatne prevleke. Vsaka točka prikazuje vrednost magnetizacije vzorca (M) pri določeni magnetni poljski jakosti (H)

4.2 REZULTATI FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z DETA

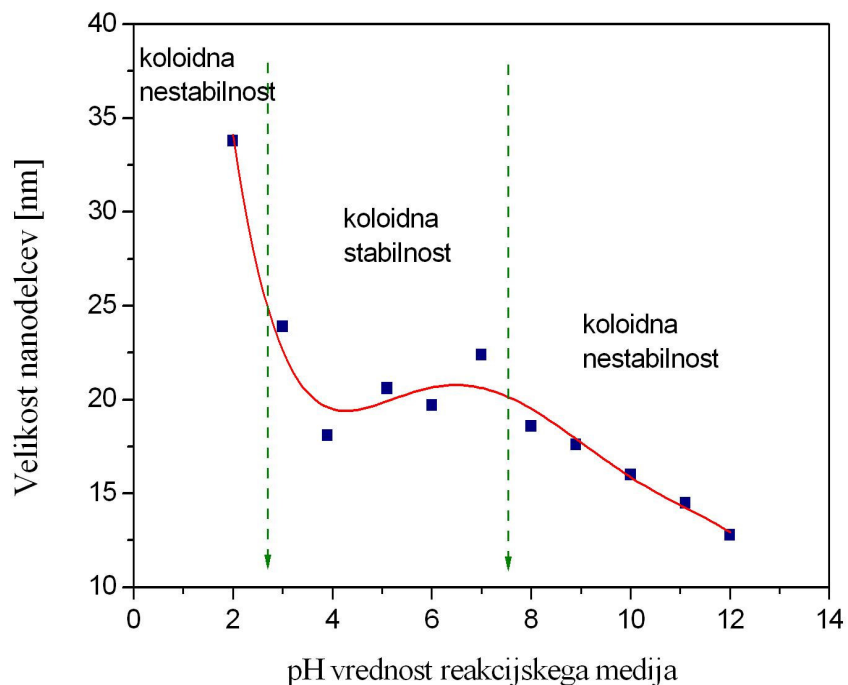
Na osnovi rezultatov analiznih metod se je pokazalo, da je vzorec Co-feritnih MND, funkcionaliziranih s 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilanom (DETA), z oznako S2-j, tisti, ki ima na površini MND največ vezane DETA in je najprimernejši za nadaljnjo uporabo.

4.2.1 Rezultati vpliva pH na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

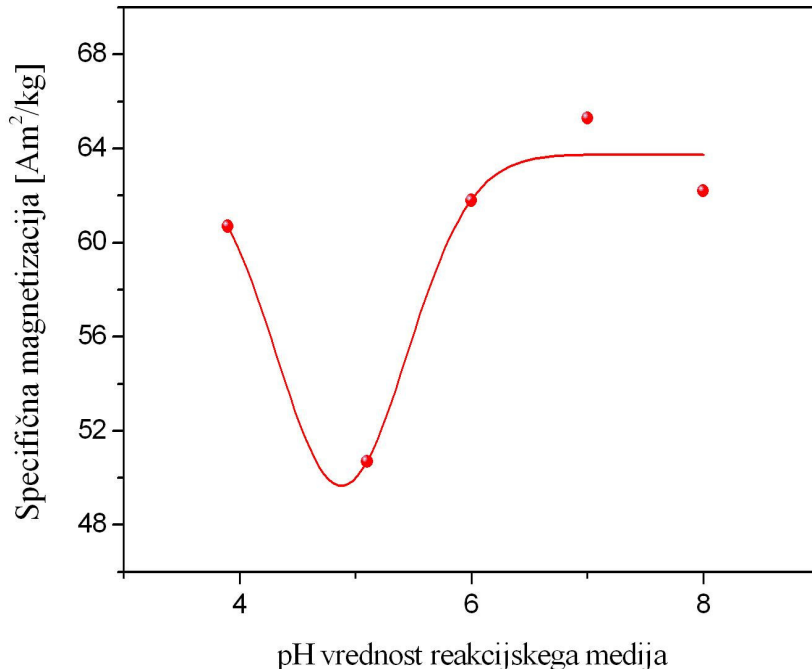
Iz rezultatov vpliva pH reakcijskega medija na stopnjo funkcionalizacije Co-feritnih MND z DETA je razvidno, da je funkcionalizacija z DETA najboljše potekala v nevtralnem do kislem pH območju reakcijskega medija, saj je bila v tem pH območju zabeležena najnižja magnetizacija (preglednica 13). Podobno velja za opazovanja začetne aglomeracije, pri čemer je ta interval še nekoliko ožji (med pH 6 in pH 3) (slika 37). Kot najboljši vzorec smo zato izbrali vzorec z oznako S2-j, s katerim smo nato vstopali v reakcije, kjer smo iskali vpliv temperature na funkcionalizacijo z DETA. Ta ima od vseh vzorcev te serije eksperimentov najnižjo specifično magnetizacijo (M_s) (slika 38).

Preglednica 13: Rezultati vpliva pH reakcije na stopnjo funkcionalizacije MND z DETA, ki zajemajo podatke o začetni aglomeraciji vzorca, specifični površini (BET) in specifični magnetizaciji vzorca (M_s) ter deležu Si v vzorcu

oznaka vzorca	pH (konč.)	zač. aglomeracija	BET [m^2/g]	M_s [Am^2/kg]	delež Si
CF/FF4	/	/	79,42	63,4	0,0
S2-c	12,0	da	92,10	63,4	0,4
S2-d	11,1	da	74,92	62,8	0,4
S2-e	10,0	da	73,64	59,7	0,5
S2-f	8,9	da	66,80	62,4	0,5
S2-h	8,0	opazno kasneje	63,22	62,2	0,3
S2-n	7,0	opazno kasneje	52,57	64,2	0,5
S2-i	6,0	ne	59,60	61,8	0,4
S2-j	5,1	ne	52,88	50,7	0,4
S2-k	3,9	ne	64,97	60,7	0,4
S2-o	3,0	ne	49,28	55,4	0,3
S2-p	2,0	da	34,80	59,7	0,4



Slika 37: Odvisnost velikosti z DETA funkcionaliziranih MND od pH reakcijskega medija



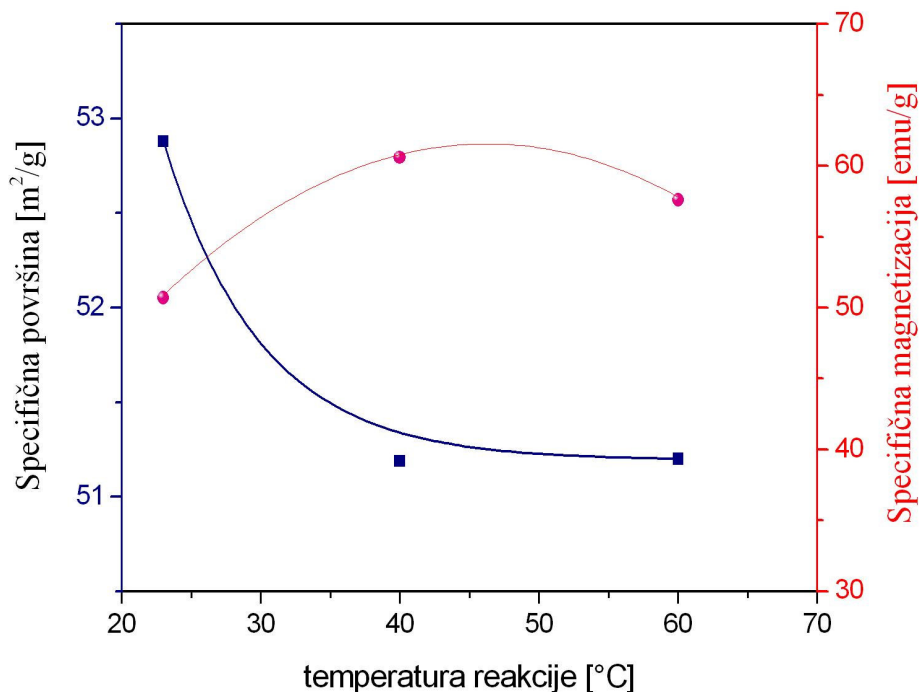
Slika 38: Odvisnost specifične magnetizacije od pH reakcijskega medija pri funkcionalizaciji MND z DETA – izsek iz koloidno stabilnega področja

4.2.2 Rezultati vpliva temperature na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

Iz rezultatov lahko vidimo, da temperatura v obsegu teh eksperimentov nima značilnega vpliva na stopnjo funkcionalizacije Co-feritnih MND z DETA (preglednica 14). S2-j vzorec, funkcionaliziran pri sobni temperaturi, ima tudi v tej seriji eksperimentov najnižjo specifično magnetizacijo (M_s) (slika 39).

Preglednica 14: Rezultati meritev specifične površine vzorca (BET) in specifične magnetizacije vzorca (M_s) pri eksperimentih, ki so potekali pri različnih temperaturah funkcionalizacije MND z DETA

oznaka vzorca	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	BET [m^2/g]	M_s [Am^2/kg]
S2-j	23	52,88	50,7
S2-j/T ₄₀	40	51,19	60,6
S2-j/T ₆₀	60	51,20	57,6



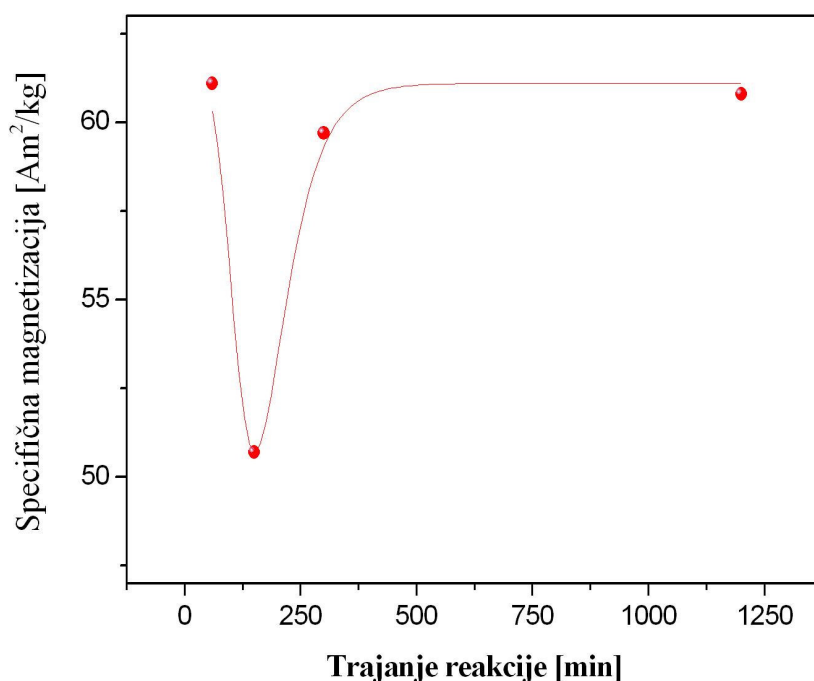
Slika 39: Odvisnost specifične površine MND in njihove specifične magnetizacije od temperature funkcionalizacije MND z DETA

4.2.3 Rezultati vpliva trajanja reakcije na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

Pri spreminjanju trajanja reakcije ni opazne korelacije med podaljševanjem trajanja reakcije in višji stopnji funkcionalizacije Co-feritnih MND z DETA (preglednica 15). Edini opazni rezultat daljšega časa reakcije je slabše redispergiranje vzorca v končnem, vodnem mediju. V nasprotju s tem pa lahko opazimo nižjo maksimalno magnetizacijo vzorca S2-j, kar potrjuje, da je 150 min optimalno trajanje reakcije (slika 40).

Preglednica 15: Rezultati meritev specifične površine vzorca (BET) in specifične magnetizacije vzorca (M_s) pri eksperimentih, pri katerih smo spreminjali trajanje funkcionalizacije MND z DETA

oznaka vzorca	trajanje reakcije [min]	BET [m^2/g]	M_s [Am^2/kg]
S2-j/t ₆₀	60	48,10	61,1
S2-j	150	52,88	50,7
S2-j/t ₃₀₀	300	78,92	59,7
S2-j/t ₁₂₀₀	1200	52,27	60,8



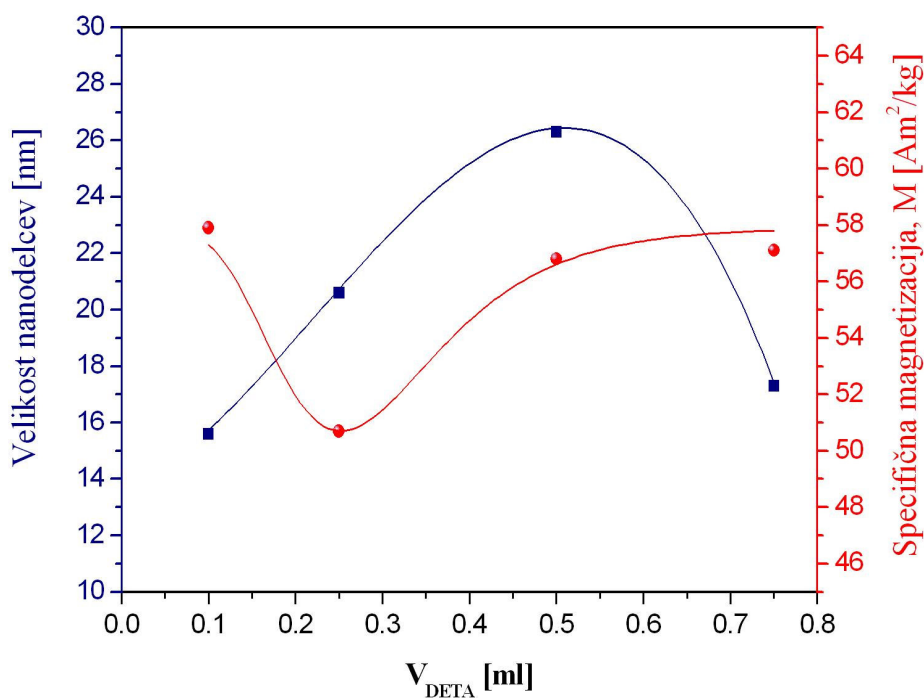
Slika 40: Odvisnost maksimalne magnetizacije MND od trajanja funkcionalizacije MND z DETA

4.2.4 Rezultati vpliva koncentracije DETA na funkcionalizacijo Co-feritnih magnetnih nanodelcev z DETA

Enako kot pri trajanju reakcije ima tudi večja koncentracija DETA v vzorcu vpliv na slabše redispergiranje vzorca v končnem, vodnem mediju. Iz rezultatov je razvidno, da večja koncentracija DETA v reakcijskem mediju nima značilnega vpliva na stopnjo funkcionalizacije MND z DETA poleg omenjene aglomeracije (preglednica 16). Vzorec z najnižjo specifično magnetizacijo tudi v tem primeru ostaja S2-j (slika 41).

Preglednica 16: Rezultati vpliva koncentracije DETA v reakcijskem mediju na stopnjo funkcionalizacije MND z DETA

<i>oznaka vzorca</i>	<i>V_{DETA}/vzorec [ml]</i>	<i>konc. DETA [ml/g]</i>	<i>BET [m²/g]</i>	<i>M_s [Am²/kg]</i>
S2-j/D1	0,10	1,012	75,53	57,9
S2-j	0,25	2,530	52,88	50,7
S2-j/D2	0,50	5,061	44,72	56,8
S2-j/D3	0,75	7,591	67,98	57,1

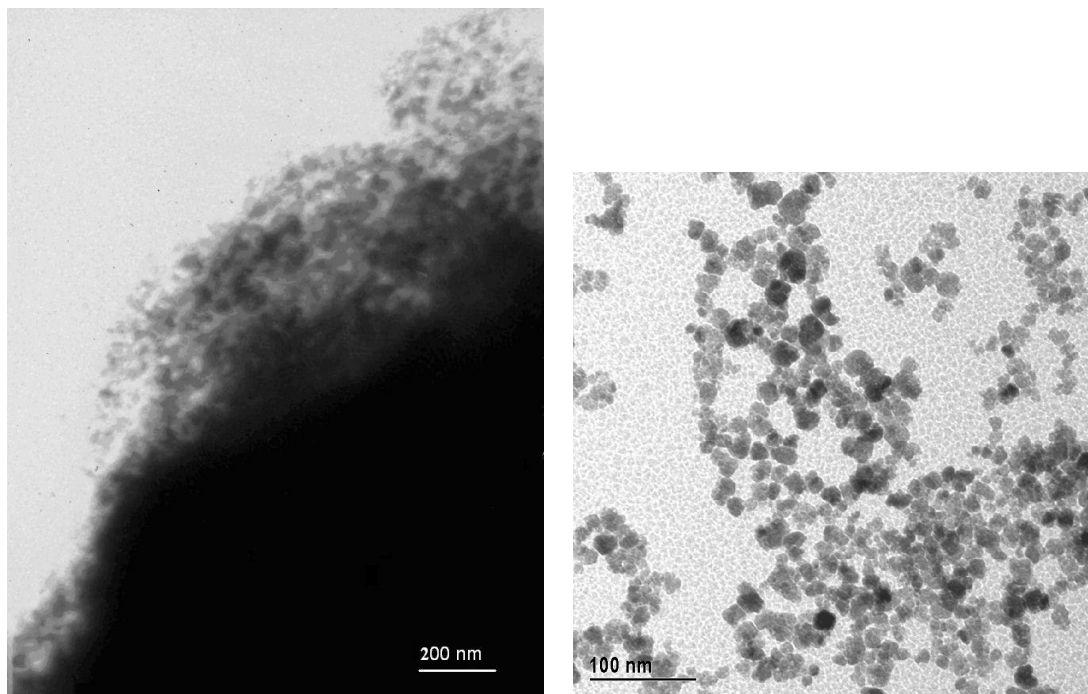


Slika 41: Odvisnost velikosti MND in njihove maksimalne magnetizacije od volumna dodanega DETA v vzorcu

4.2.5 Rezultati opazovanja s transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM)

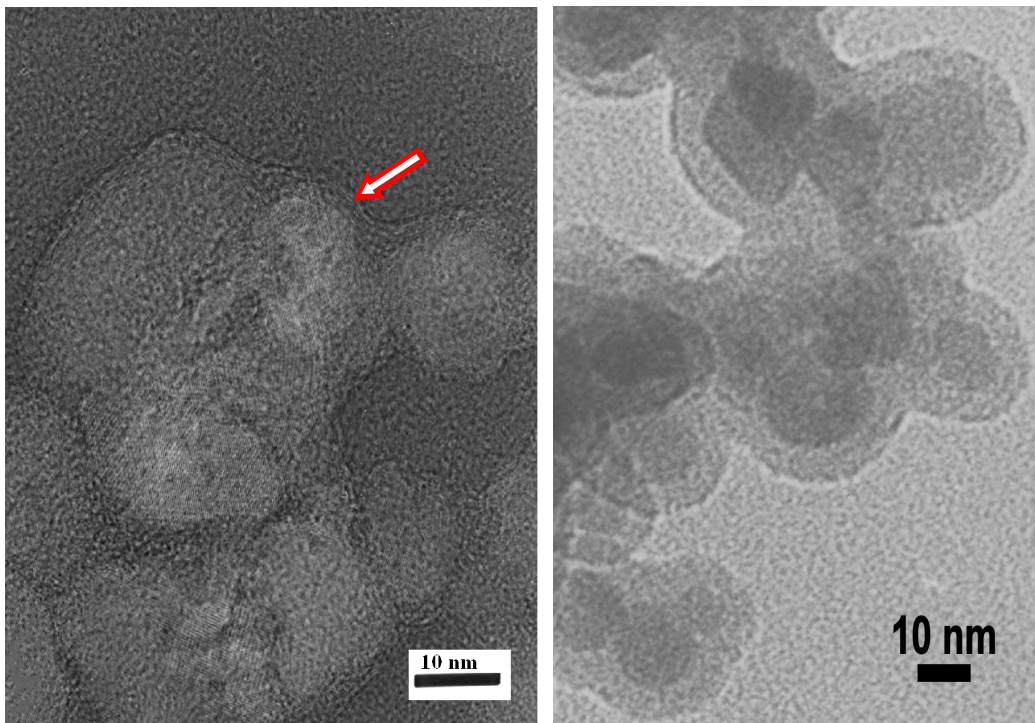
Pri opazovanju nefunkcionaliziranih in z DETA funkcionaliziranih Co-feritnih MND smo opazili veliko razliko v razporeditvi delcev v obeh vzorcih. Nefunkcionalizirani MND so se v procesu sušenja na mrežici za elektronsko mikroskopijo povsem skepili, medtem ko so ostali z DETA funkcionalizirani MND tudi med sušenjem na mrežici toliko stran drug od

druega, da se niso prekrivali. To je dalo slednjemu vzorcu značilen mrežast videz (sliki 42 in 43).



Sliki 42 (L) in 43 (D): Posnetek vzorca nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND – vzorec z oznako CF-FF 4 (L) in z DETA funkcionaliziranih Co-feritnih MND – vzorec z oznako S2-j (D)

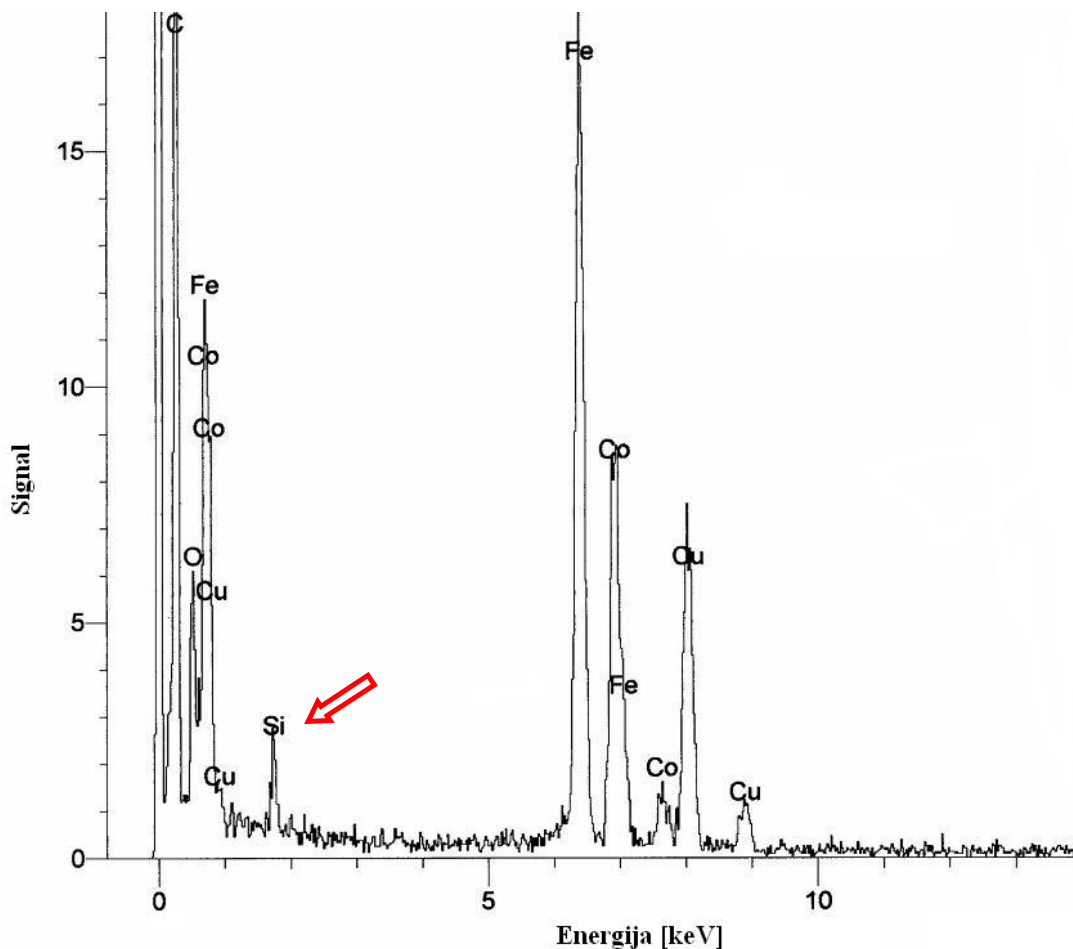
MND, funkcionalizirani s TEOS, so bili na videz precej podobni MND, funkcionaliziranim z DETA, vendar je bila silikatna prevleka precej bolj enakomerno nanešana in bolj kompaktna, kot je bilo to v primeru DETA (sliki 44 in 45).



Sliki 44 (L) in 45 (D): Posnetek vzorca S2-j s presevnim elektronskim mikroskopom pri 800 000-kratni povečavi. Puščica označuje amorfni sloj, ki ga sestavljajo molekule DETA (L). Posnetek Co-firitnih MND, prevlečenih z 8 nm debelo silikatno prevleko, pri 240 000-kratni povečavi (D)

4.2.6 Rezultati meritev energijske disperzijske analize X-žarkov (EDS)

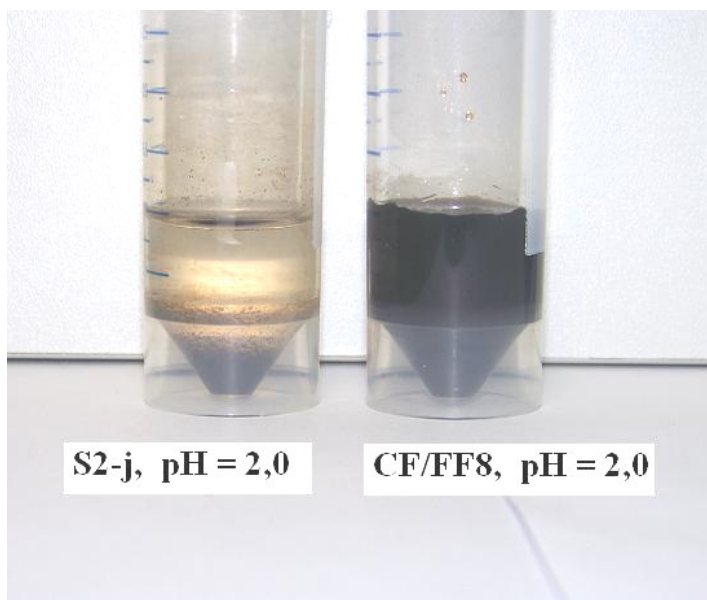
Na označenem MND, ki ga vidimo na sliki 44, je bil posnet EDS spekter, prikazan na sliki 46. Analiza je pokazala prisotnost sledečih elementov: O, C, Cu, Fe, Co in Si, s čimer je potrjena prisotnost Si na površini MND.



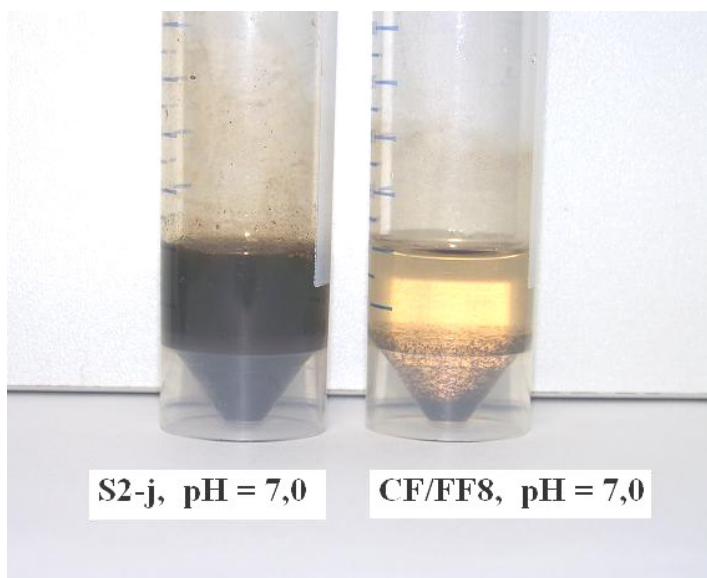
Slika 46: EDS spekter, posnet na MND vzorca S2-j. Puščica kaže na vrh, ki potrjuje prisotnost Si v vzorcu

4.2.7 Primerjava vodne suspenzije nefunkcionaliziranih in z DETA funkcionaliziranih MND pri različnih pH vrednostih

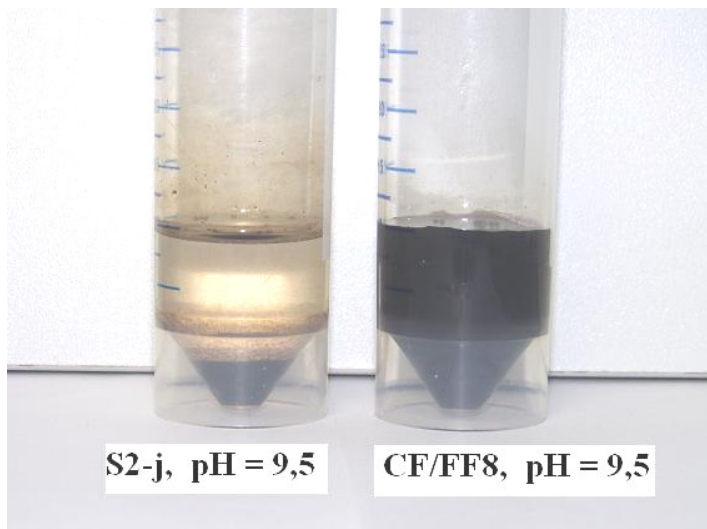
S primerjavo vodne suspenzije nefunkcionaliziranih in z DETA funkcionaliziranih MND pri različnih pH vrednostih lahko ugotovimo področje koloidne nestabilnosti za obe suspenziji. Vodna suspenzija nefunkcionaliziranih MND (CF/FF8) ni koloidno stabilna v pH območju okoli 7, medtem ko je vodna suspenzija z DETA funkcionaliziranih MND (S2-j) koloidno stabilna ravno v pH območju okoli 7 (slike 47, 48 in 49). Ker se v našem primeru področje koloidne nestabilnosti pri obeh suspenzijah razlikuje, lahko sklepamo na premik izoelektrične točke pri funkcionaliziranih MND v primerjavi z nefunkcionaliziranimi.



Slika 47: Koloidna stabilnost nefunkcionaliziranih MND (desno) in z DETA funkcionaliziranih MND (levo) pri pH 2, pri čemer je desna suspenzija koloidno stabilna, leva pa ne



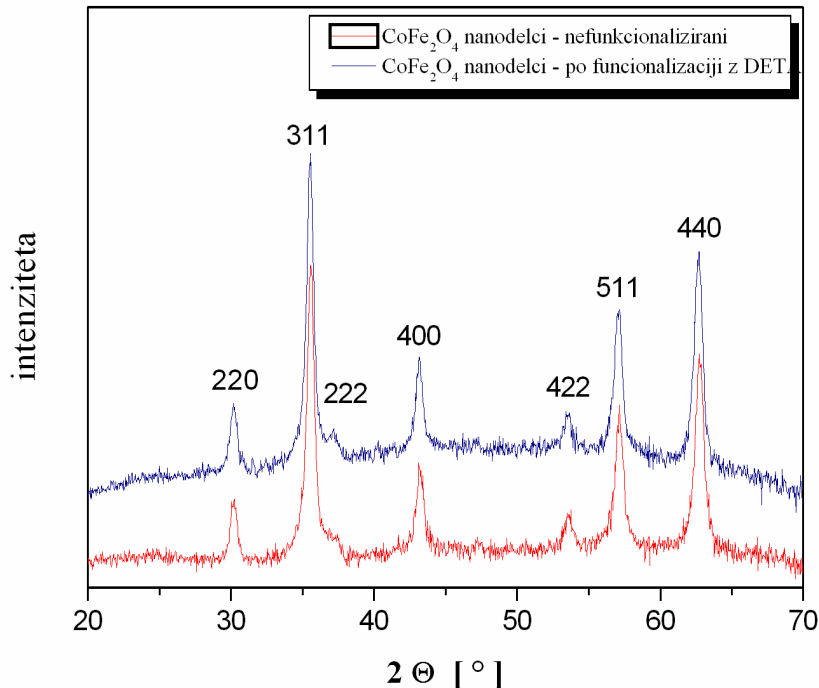
Slika 48: Koloidna stabilnost nefunkcionaliziranih MND (desno) in z DETA funkcionaliziranih MND (levo) pri pH 7, pri čemer je leva suspenzija koloidno stabilna, desna pa ne



Slika 49: Koloidna stabilnost nefunkcionaliziranih MND (desno) in z DETA funkcionaliziranih MND (levo) pri pH 9,5, pri čemer je desna suspenzija koloidno stabilna, leva pa ne

4.2.8 Rezultati meritev rentgenske praškovne difrakcije (XRD)

Rezultati meritev rentgenske praškovne difrakcije (XRD) so pokazali, da sintetizirani MND (nefunkcionalizirani in z DETA funkcionalizirani) po kristalni strukturi ustrezajo spinelu, na kar kažejo karakteristični vrhovi XRD spektra. Ker sta oba spektra povsem identična, pomeni da v kristalni strukturi ni nobene razlike med nefunkcionaliziranimi in z DETA funkcionaliziranimi MND (slika 50).

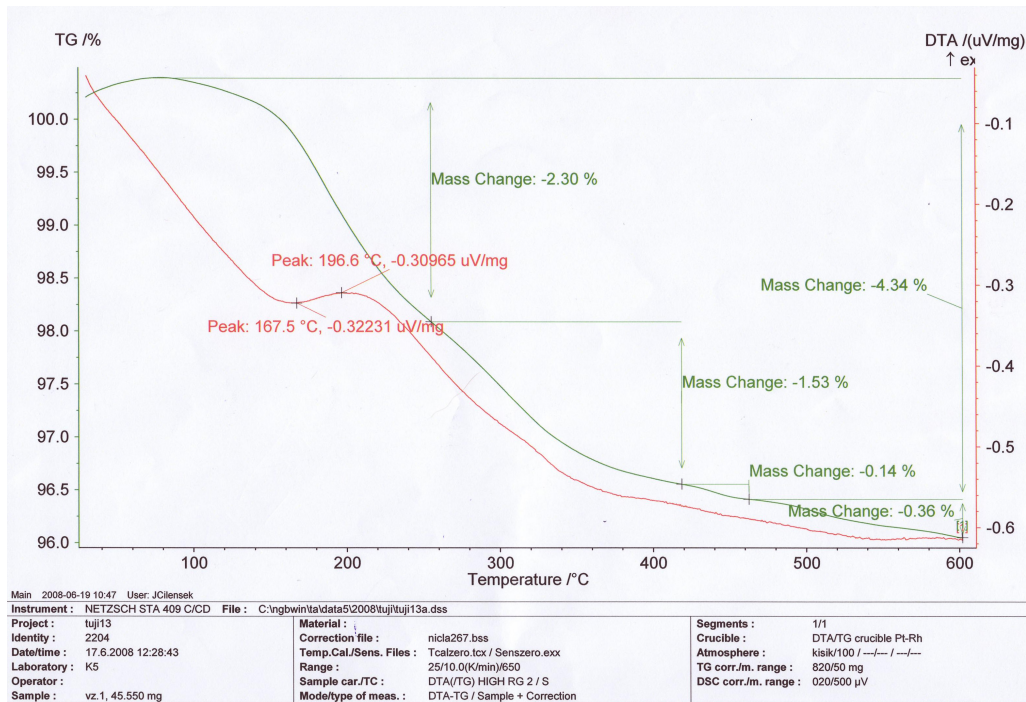


Slika 50: Spekter rentgenske praškovne difrakcije, kjer karakteristični vrhovi obeh vzorcev sovpadajo in ustrezajo kristalni strukturi spinela

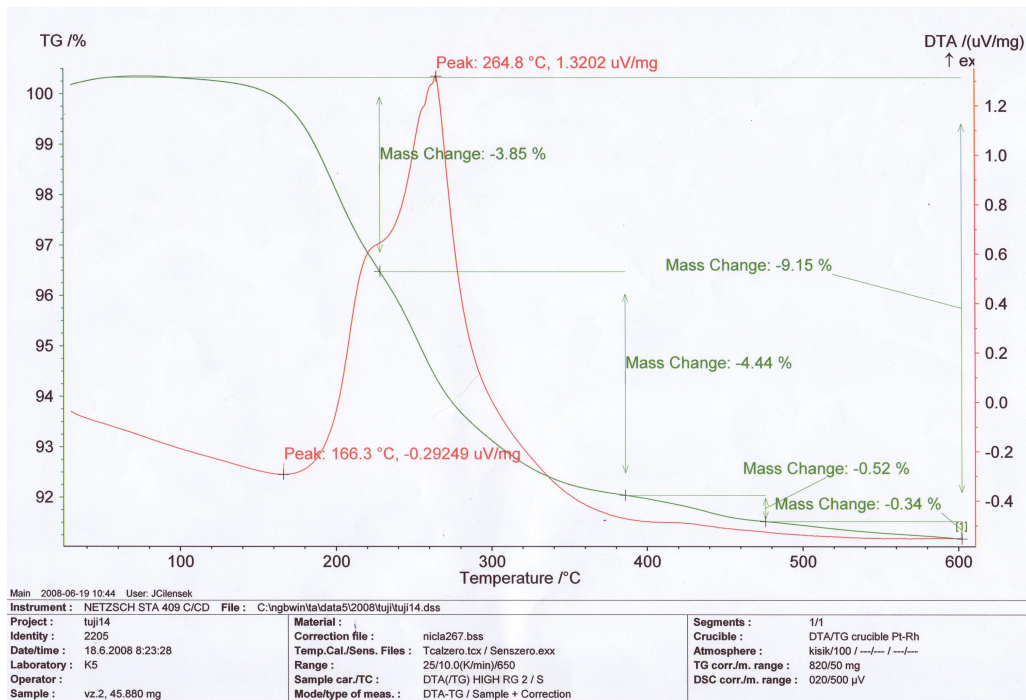
4.2.9 Rezultati termogravimetrije (TG), diferencialno termične analize (DTA) in analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA)

Rezultati termogravimetrije (TG) v kombinaciji z diferencialno termično analizo (DTA) so pokazali, da je skupna izguba mase pri MND, funkcionaliziranih z DETA (vzorec S2-j), več kot dvakrat večja kot pri vzorcu z nefunkcionaliziranimi MND (sliki 51 in 52). Poleg tega lahko na DTA krivulji vzorca S2-j opazimo veliko entalpijsko spremembo z eksotermnim vrhom pri 265 °C. Zadnji od dveh eksotermnih vrhov ustreza izgubi DETA, kar se na TG krivulji odraža v spremembi mase, ki znaša 4,44 ut. %.

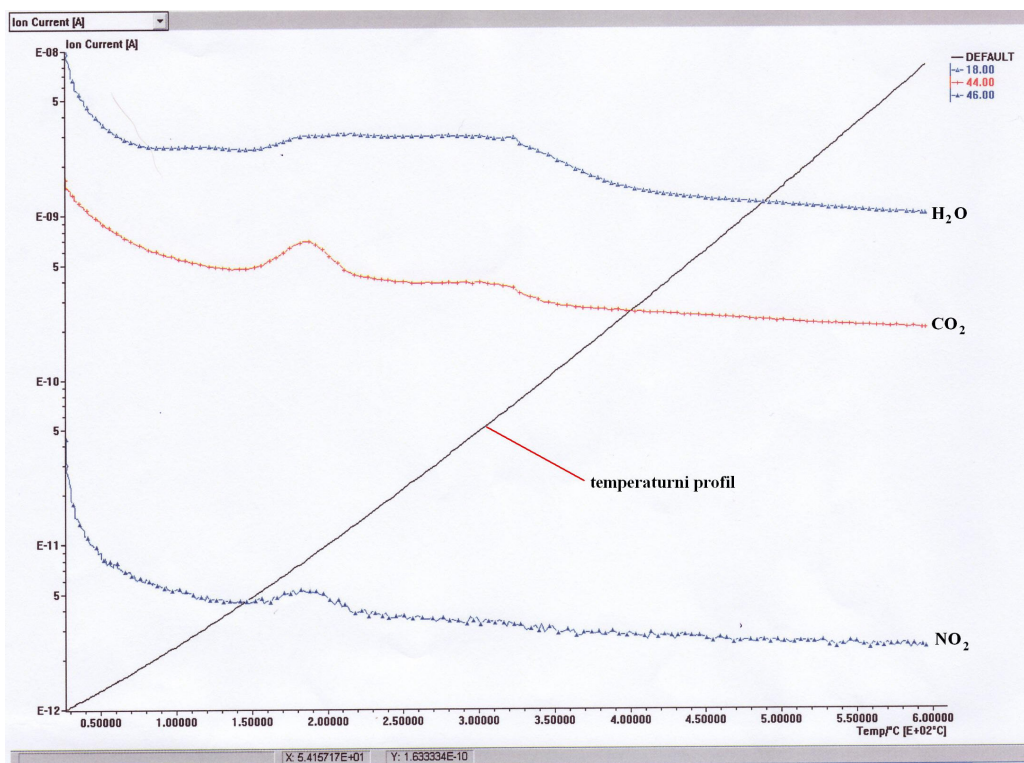
S temi rezultati se ujemajo tudi analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA), kjer največjo količino plinskih produktov zasledimo pri S2-j vzorcu, pri temperaturi od 250 do 270 °C (slika 53). Ta vrh je pri vzorcu z nefunkcionaliziranimi MND odsoten (slika 54).



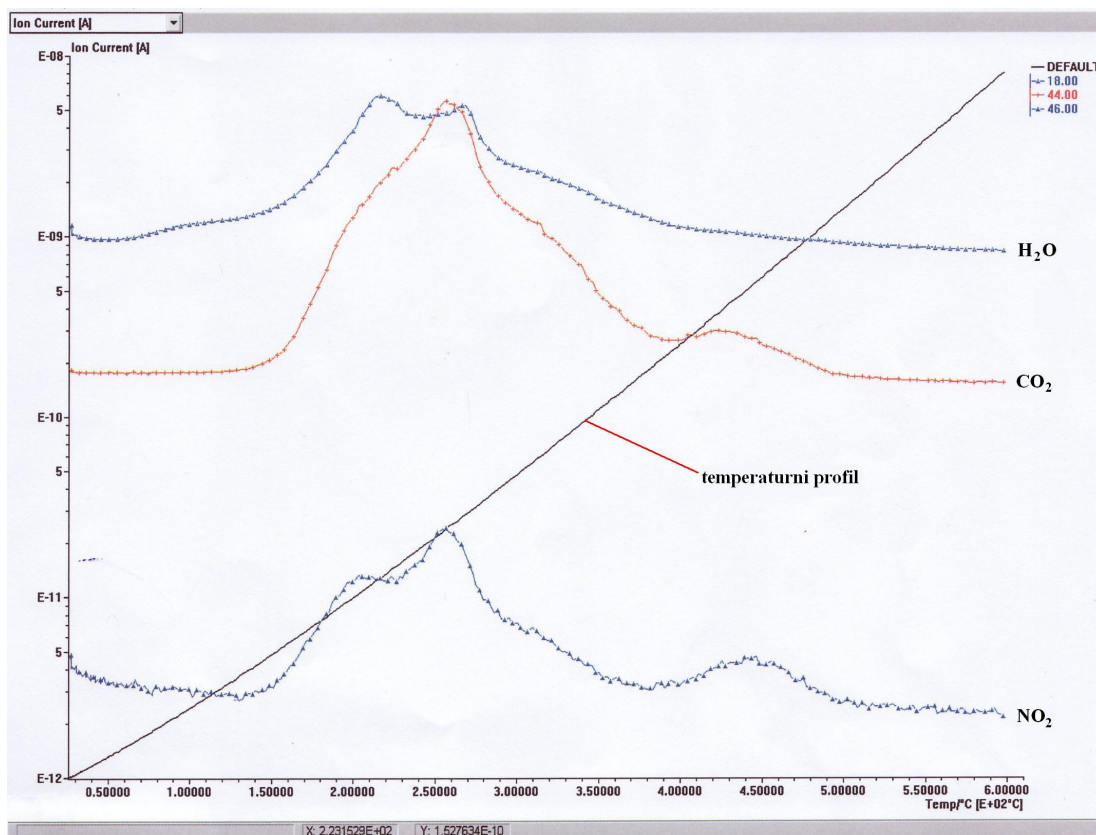
Slika 51: Rezultati meritev TG in DTA nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND



Slika 52: Rezultati meritev TG in DTA funkcionaliziranih Co-feritnih MND z DETA – vzorec S2-j



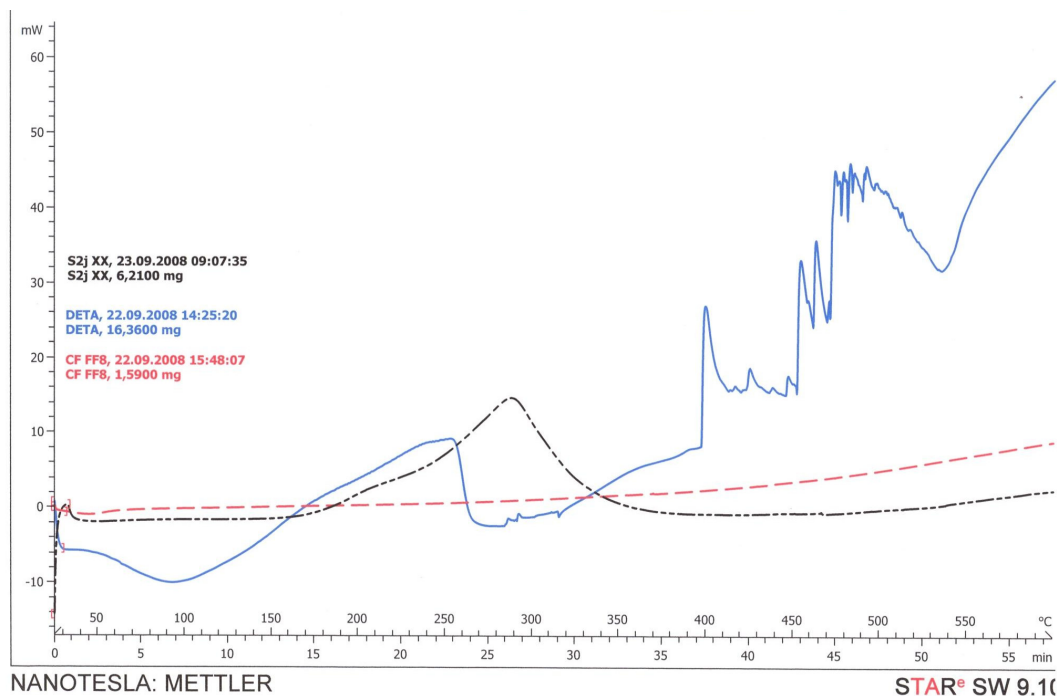
Slika 53: Rezultati meritev analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA) nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND



Slika 54: Rezultati meritev analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA) funkcionaliziranih Co-ferritnih MND z DETA – vzorec S2-j

4.2.10 Rezultati diferencialne vrstične kalorimetrije (DSC)

Rezultati, pridobljeni z uporabo diferencialne vrstične kalorimetrije (DSC), kažejo na razliko med nefunkcionaliziranimi MND, čistim DETA in funkcionaliziranimi MND z DETA (vzorec S2-j) (slika 55). Pri čistem DETA vidimo prvi eksotermni vrh pri 250 °C. Tega jasno zasledimo tudi pri MND, funkcionaliziranih z DETA, le da je zaradi vezave DETA na nanodelce zamaknjen za 50 °C. Nefunkcionalizirani MND po drugi strani ne kažejo nobene entalpijske spremembe.



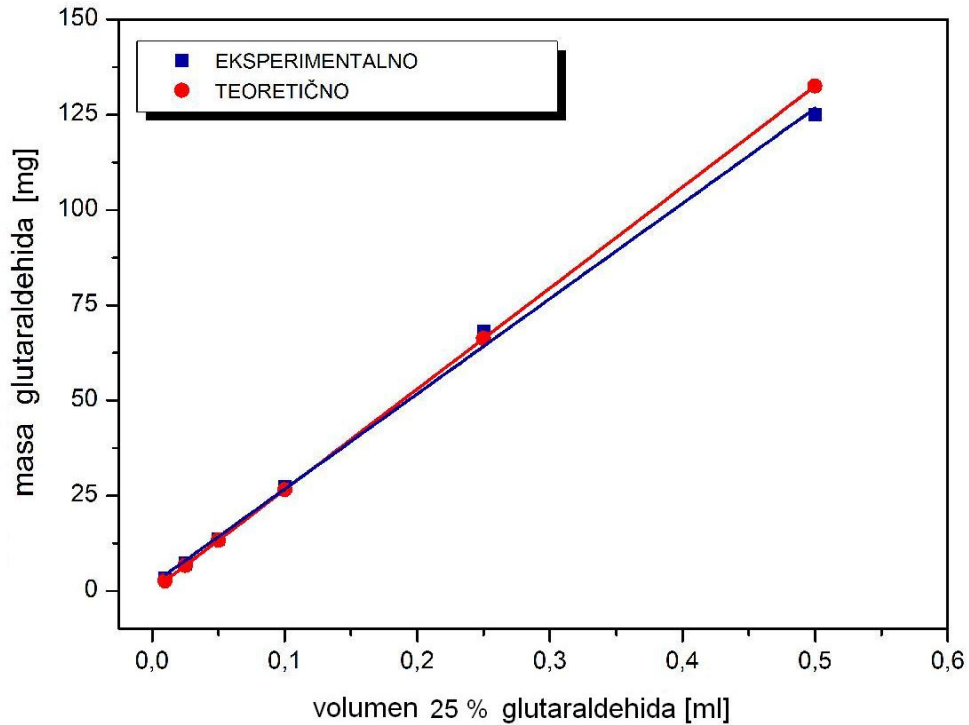
Slika 55: Rezultati diferencialne vrstične kalorimetrije ob primerjavi nefunkcionaliziranih MND (CF FF8), referenčnega spektra čistega DETA in funkcionaliziranih MND z DETA (S2-j)

4.3 REZULTATI NADALJNJE FUNKCIONALIZACIJE Z GLUTARALDEHIDOM

MND, ki smo jih predhodno funkcionalizirali z DETA (vzorec S2-j), smo v nadaljevanju funkcionalizirali še z glutaraldehidom. Pri tem smo iskali optimalen reakcijski medij in pH območje ter posredno določili vsebnost glutaraldehida v vzorcu s titracijsko metodo. Iz rezultatov je razvidno, da je za vezavo glutaraldehida na MND, funkcionalizirane z DETA, večinoma bolj ugoden reakcijski medij z večinskim deležem 2-propanola, vendar sta v pH območju med 6 in 7 oba medija primerna za vezavo glutaraldehida (preglednica 16 ter sliki 57 in 58).

Da bi preverili natančnost te titracijske metode, smo titrirali nekaj znanih volumnov GA in izračunali maso GA po zgornji enačbi ter te rezultate primerjali s teoretično izračunanimi vrednostmi mase GA v vsakem od titriranih volumnov. Rezultati teh titracij so prikazani na spodnji sliki (slika 56). Opazimo lahko, da eksperimentalni podatki dobro sledijo

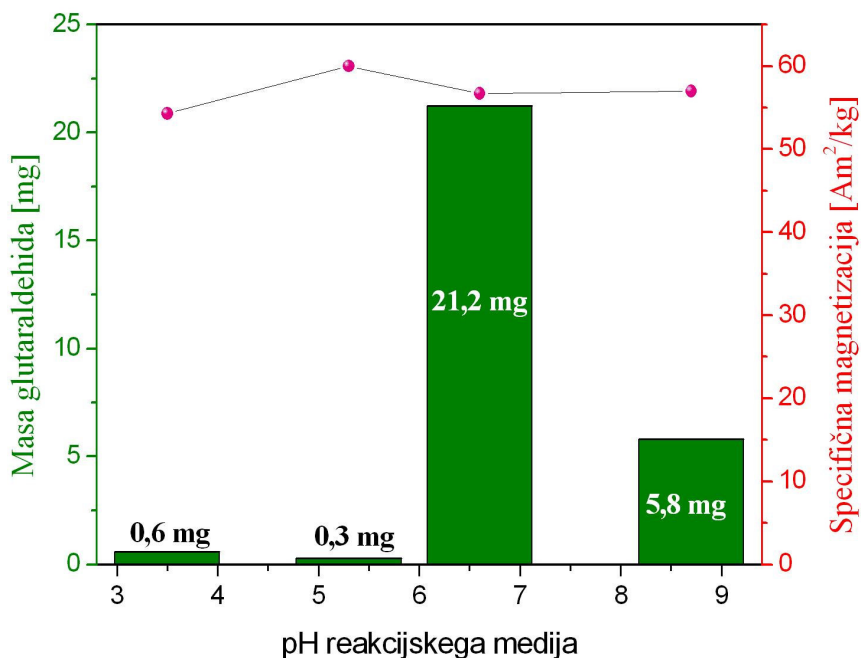
teoretičnemu izračunu, še posebej v območju pod 0,3 ml, kar je tudi območje, v katerem so potekale naše titracije.



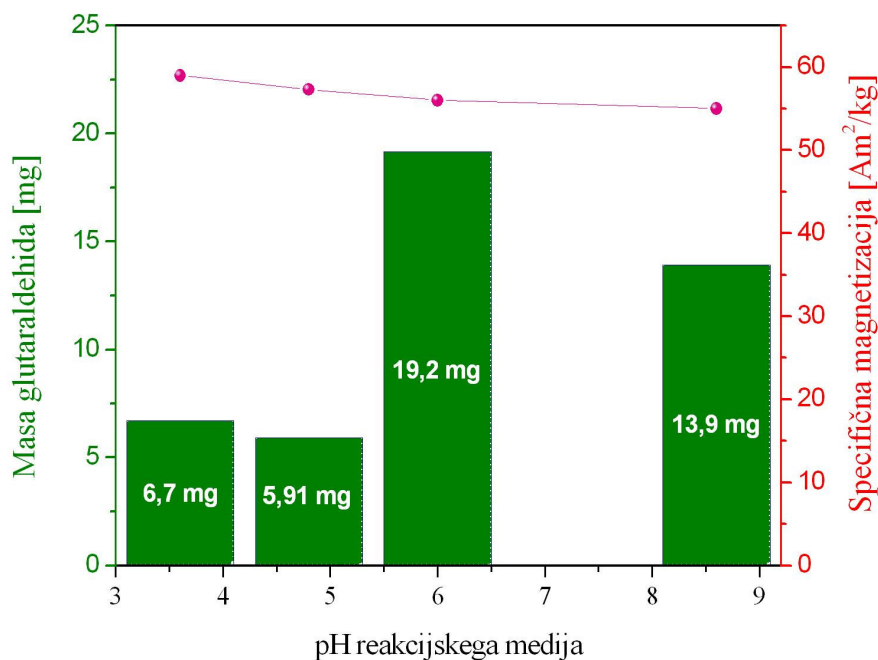
Slika 56: Preizkus natančnosti titracijske metode za določanje glutaraldehida (GA) s pomočjo timolftaleina. Primerjava med eksperimentalno določeno maso GA v posameznem volumnu 25 % GA (titracija) in teoretičnim izračunom mase GA v enakem volumnu 25 % GA

Preglednica 16: Rezultati vezave glutaraldehida na funkcionalizirane MND z DETA, pri dveh različnih reakcijskih medijih in različnih pH vrednostih

<i>oznaka vzorca</i>	<i>reakcijski medij</i>	<i>pH (konč.)</i>	<i>aglomeracija</i>	<i>m GA v vzorcu [mg]</i>	<i>M_s [Am²/kg]</i>
GA 100 μl	/	/	/	21,23	/
G5-a	2-propanol	8,6	rahla	13,92	55,0
G5-b	destilirana voda	8,7	rahla	5,81	57,0
G8-a	2-propanol	6,0	močna	19,17	56,0
G8-b	destilirana voda	6,6	močna	21,23	56,7
G7-a	2-propanol	4,8	rahla	5,91	57,3
G7-b	destilirana voda	5,3	rahla	0,3	60,0
G6-a	2-propanol	3,6	je ni	6,71	59,0
G6-b	destilirana voda	3,5	je ni	0,6	54,3



Slika 57: Rezultati mase na MND vezanega glutaraldehida in specifične magnetizacije v odvisnosti od pH reakcijskega medija, z večinskim deležem destilirane vode



Slika 58: Rezultati mase na MND vezanega glutaraldehida in specifične magnetizacije v odvisnosti od pH reakcijskega medija, z večinskim deležem 2-propanola

4.4 REZULTATI ISKANJA OBMOČJA KOLOIDNE STABILNOSTI SINTETIZIRANIH MAGNETNIH NANODELCEV V FOSFATNEM PUFRU IN DESTILIRANI VODI

Splošno opažanje je, da funkcionalizirani MND niso kazali koloidne stabilnosti v fosfatnem pufru (PB), medtem ko so bile njihove vodne suspenzije večinoma koloidne. Masa MND v vsakem od vzorcev je znašala 3 mg, razen v primerih, ko je to drugače določeno.

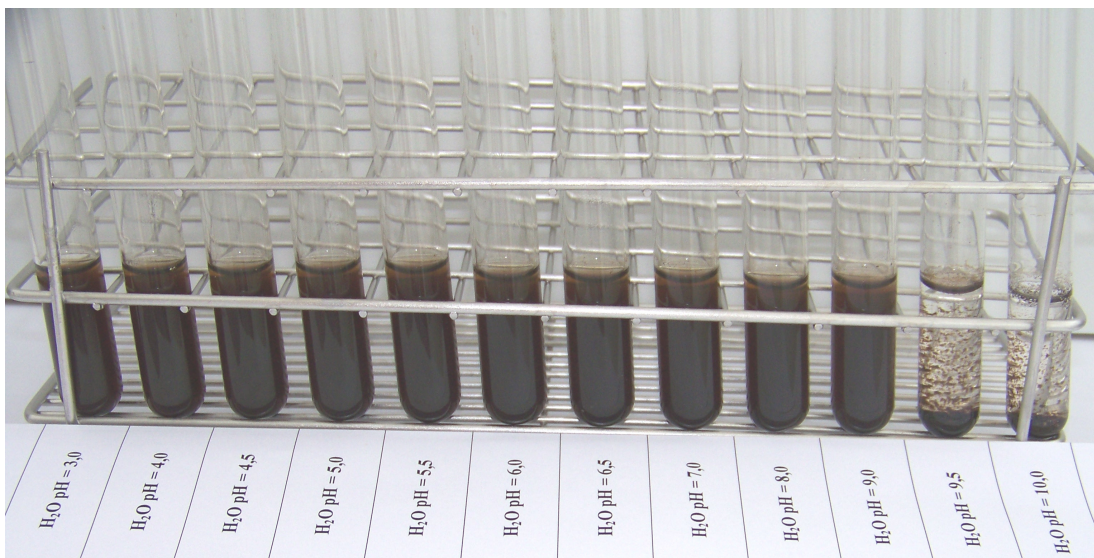
4.4.1 Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti Co-feritnih magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih z DETA, v PB in destilirani vodi

Pri iskanju koloidne stabilnosti MND, funkcionaliziranih z DETA, v destilirani vodi smo ugotovili, da obstaja široko pH območje koloidne stabilnosti, ki sega od pH vrednosti 3 do najmanj pH 7. Ob tem pa je opazno precejšnje razhajanje med začetnimi (nastavljenimi)

pH vrednostmi in končnimi pH vrednostmi, izmerjenimi po 24 h (preglednica 17). Kolodno stabilnost S2-j vzorca v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti prikazuje slika 59.

Preglednica 17: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti destilirane vode

pH (zač.) H ₂ O	pH (konč.) H ₂ O	koloidna stabilnost
3	3,3	DA
4	4,7	DA
4,5	6,0	DA
5	6,3	DA
5,5	6,5	DA
6	6,5	DA
6,5	6,4	DA
7	6,5	DA
8	6,7	DA
9	6,9	DA
9,5	7,4	NE
10	9,5	NE

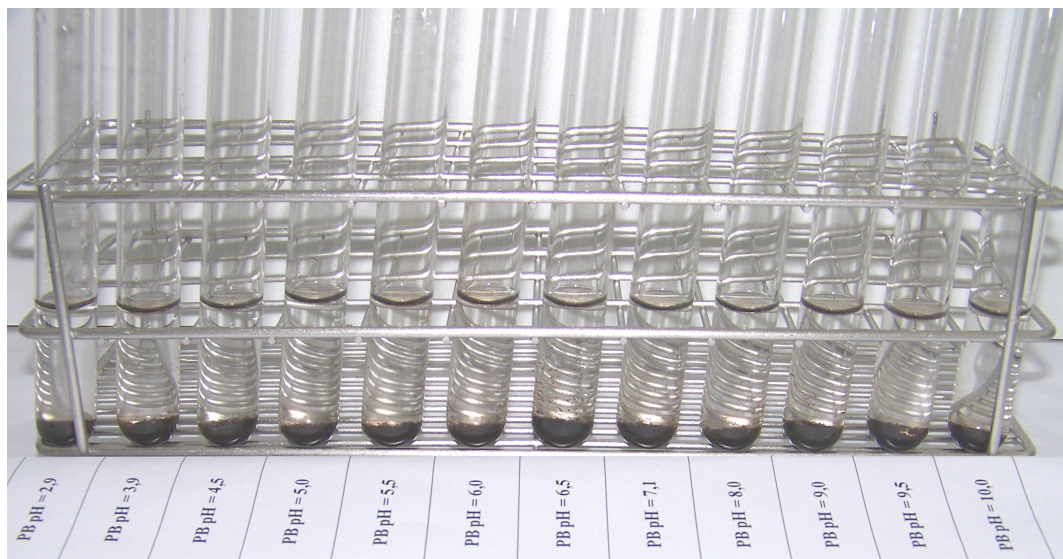


Slika 59: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v destilirani vodi ob spreminjanju pH vrednosti destilirane vode. Od leve proti desni si sledijo naslednje pH vrednosti: pH 3,0, pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0, pH 9,5 in pH 10,0

Pri iskanju koloidne stabilnosti MND, funkcionaliziranih z DETA, v 0,02 M PB ob spreminjanju pH vrednosti smo ugotovili, da v tem mediju vzorec S2-j ni stabilen v nobenem pH območju (preglednica 17). Kolodno stabilnost S2-j vzorca v 0,02 M PB ob spreminjanju pH vrednosti prikazuje slika 60.

Preglednica 17: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v 0,02 M PB ob spreminjanju pH vrednosti pufra

pH (zač.) PB	pH (konč.) PB	koloidna stabilnost
2,9	3,1	NE
3,9	4,9	NE
4,5	5,4	NE
5	5,5	NE
5,5	5,8	NE
6	6,2	NE
6,5	6,6	NE
7,1	7,2	NE
8	7,8	NE
9	8,2	NE
9,5	8,8	NE
10	9,5	NE

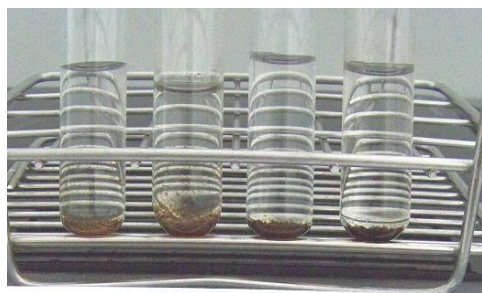


Slika 60: Rezultati iskanja območja koloidne stabilnosti vzorca S2-j v 0,02 M PB, ob spreminjanju pH vrednosti pufra. Od leve proti desni si sledijo naslednje pH vrednosti: pH 2,9, pH 3,9, pH 4,5, pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,1, pH 8,0, pH 9,0, pH 9,5 in pH 10,0

Pri iskanju koloidne stabilnosti MND, funkcionaliziranih z DETA, v 0,02 M PB ob spreminjanju koncentracije MND v vzorcu smo ugotovili, da v tem mediju vzorec S2-j ni stabilen (preglednica 18). Kolodno stabilnost S2-j vzorca v 0,02 M PB pri različnih koncentracijah MND prikazuje slika 61.

Preglednica 18: Rezultati vpliva koncentracije nanodelcev na koloidno stabilnost vzorca S2-j v 0,02 M PB

vol. vzorca	masa delcev	koloidna stabilnost
400 μ l	2,4 mg	NE
600 μ l	3,6 mg	NE
800 μ l	4,8 mg	NE
1,5 ml	9 mg	NE



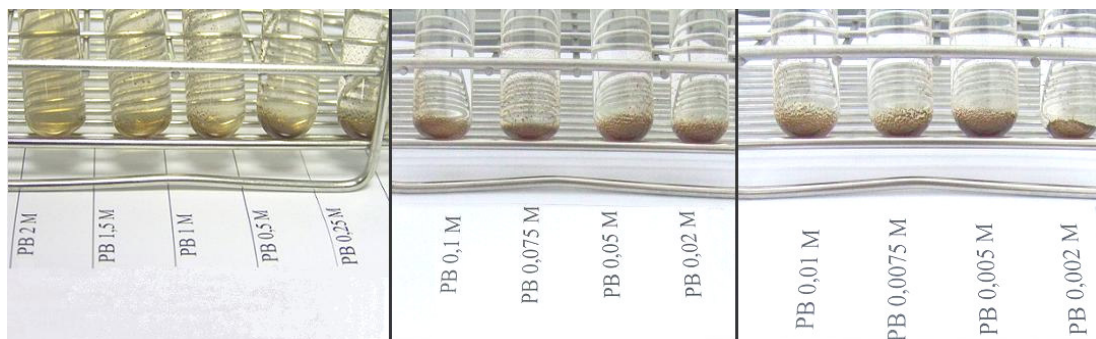
400 μ l S2-j PB 0,02 M
600 μ l S2-j PB 0,02 M
800 μ l S2-j PB 0,02 M
1,5 ml S2-j PB 0,02 M

Slika 61: Rezultati vpliva koncentracije nanodelcev na koloidno stabilnost vzorca S2-j v 0,02 M PB

Pri iskanju koloidne stabilnosti MND, funkcionaliziranih z DETA, v PB ob spreminjanju koncentracije pufra v vzorcu smo ugotovili, da v tem mediju vzorec S2-j večinoma ni stabilen, le pri visokih koncentracijah pufra kaže na delno stabilnost (preglednica 19). Kolodno stabilnost S2-j vzorca v PB pri koncentracijah pufra prikazuje slika 62.

Preglednica 19: Rezultati vpliva koncentracije pufra na koloidno stabilnost vzorca S2-j v PB

konc. medija	koloidna stabilnost
2 M	DELNA
1,5 M	DELNA
1 M	DELNA
0,5 M	NE
0,25 M	NE
0,1 M	NE
0,075 M	NE
0,05 M	NE
0,02 M	NE
0,01 M	NE
0,0075 M	NE
0,005 M	NE
0,002 M	NE



Slika 62: Rezultati vpliva koncentracije pufra na koloidno stabilnost vzorca S2-j v PB. Od leve proti desni si sledijo naslednje koncentracije fosfatnega pufra: 2 M, 1,5 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M, 0,1 M, 0,075 M, 0,05 M, 0,02 M, 0,01 M, 0,0075 M, 0,005 M in 0,002 M

5 RAZPRAVA

Pred vrednotenjem rezultatov po posameznih segmentih raziskave si je potrebno ogledati splošne lastnosti in razlike med analiznimi metodami, ki pripeljejo do rezultata. V nadaljevanju pa sledita vrednotenje rezultatov in razprava glede funkcionalizacije Coferitnih magnetnih nanodelcev (MND) s tetraetoksisilanom (TEOS), s 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilanom (DETA), z glutaraldehydom (GA) ter uvod v možno nadaljevanje raziskave s preučevanjem koloidne stabilnosti funkcionaliziranih MND v vodnih raztopinah.

Ko vrednotimo rezultate analiznih metod, lahko hitro zaidemo v slepo ulico, če ne upoštevamo velikosti podvzorca, na katerem je analiza opravljena, saj ne moremo biti prepričani, da je celoten vzorec (ki predstavlja rezultat nekega eksperimenta) povsem homogen in da se posamezni podvzorci istega vzorca ne razlikujejo med seboj. Analizo na posameznem MND lahko izvedemo le s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) in energijsko disperzijsko analizo X-žarkov (EDS), vse ostale uporabljene analizne metode obravnavajo bolj ali manj velik podvzorec z velikim številom MND. Prednost analiznih metod, ki se lahko osredotočijo le na en sam MND, je v tem, da lahko npr. opazujemo in izmerimo debelino anorganske prevleke na izbranem delcu, kar predstavlja konkretni podatek. Ostale analizne metode, ki obravnavajo različno velik podvzorec, pa omogočajo izračun neke povprečne vrednosti debeline anorganske prevleke, pri čemer je ta rezultat lahko precej zavajajoč. Z osredotočanjem na posamezen MND se izognemo številnim motnjam, ki se v vzorcu lahko pojavljajo (npr. aglomeracija MND ali nečistoče v vzorcu) in vplivajo na interpretacijo rezultata analize. Po drugi strani pa, manjši, kot je podvzorec (v skrajnosti en sam MND), slabšo imamo predstavo o celotnem vzorcu, saj ni nujno, da bomo z naključno izbiro zajeli ravno reprezentativen MND, zato je npr. pri presevni elektronski mikroskopiji potrebno pregledati čim večji del mrežice z vzorcem.

Za ilustracijo tega lahko vzamemo primer meritve velikosti MND. Po metodi BET je možno izračunati povprečno velikost delcev v vzorcu, meritev sama pa ne more razlikovati med velikim magnetnim delcem (MD) in aglomeratom MND. V obeh primerih bi meritev specifične površine pokazala nizko vrednost, medtem ko lahko s TEM z ustrezno povečavo

natančno določimo velikost posameznega MND. Iz primera je razvidno, da je do zanesljivejših rezultatov in njihove prave interpretacije možno priti s kombiniranjem več različnih analitskih metod za isti vzorec ter v našem primeru s primerjavo med funkcionaliziranimi in nefunkcionaliziranimi MND.

5.1 VREDNOTENJE REZULTATOV FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV S TEOS

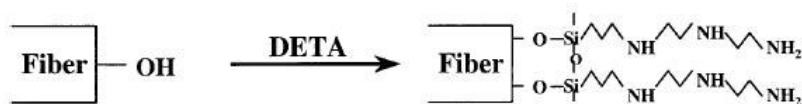
Funkcionalizacija Co-feritnih magnetnih nanodelcev (MND) s tetraetoksisilanom (TEOS) je znan postopek (Košak in Žnidaršič, 2007b). Za izvedbo eksperimentov s patentiranim postopkom smo se odločili iz več razlogov. Prvi razlog je strukturna podobnost TEOS-a silanu, ki je predmet te raziskave – 3-[2-(2-eminioetilamino)etilamino] propil-trimetoksisilan (DETA). Obe molekuli uvrščamo med silane, za katere je značilno, da so pogosto vezni posredniki med površino anorganskega materiala in organskimi komponentami, ki jih želimo vezati nanjo. Na površino anorganskih materialov se vežejo v procesih hidrolize in kondenzacije, ki so opisani v poglavju 2 (Pregled objav). Drugi razlog je v spoznavanju funkcionalizacije MND z znano komponento (TEOS) in v smeri raziskave, od znanega proti neznanemu. Tretji razlog pa izvira v literaturi, kjer lahko zasledimo, da je DETA možno vezati neposredno na silikatno prevleko (Qhobosheane s sod., 2001) ali na druge anorganske površine (Tan in Liu, 1999).

Rezultati eksperimentov spreminjanja debeline silikatne prevleke na Co-feritnih MND v odvisnosti od dodatka TEOS med procesom funkcionalizacije sovpadajo z našimi pričakovanji. Debelejša, kot je silikatna prevleka na površini MND, manjša je specifična magnetizacija in večja je velikost nanodelcev (d_{BET} izračunamo iz specifične površine delcev, izmerjene po metodi BET), oboje je lepo vidno na sliki 35. Razlog v zmanjševanju specifične magnetizacije (M_s) ob večanju debeline nemagnetne prevleke na delcih je povsem fizikalen. Večja, kot je razdalja med MND, ki nastane z večanjem debeline silikatne prevleke, manjše so magnetne interakcije med nanodelci, kar vodi v zmanjšanje specifične magnetizacije vzorca. Zmanjšanje specifične magnetizacije je lahko precej

veliko, od $65 \text{ Am}^2/\text{kg}$ za nefunkcionalizirane MND do $18 \text{ Am}^2/\text{kg}$ za MND z 10 nm debelo silikatno prevleko (Kořak in Źnidarřiĉ, 2006).

5.2 VREDNOTENJE REZULTATOV FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z DETA

Ĉprav sta si DETA in TEOS v strukturi podobna, se na povrřini magnetnih nanodelcev (MND) odraŹata precej drugaĉe. TEOS v procesih hidrolize in kondenzacije ustvarja homogen in amorfen silikatni sloj, katerega debelino uravnavamo s koliĉino dodanega TEOS. DETA na drugi strani verjetno ustvarja le monosloj, katerega dolgi radikali (3-[2-(2-eminoetilamino)etilamino]propil-) Źtrlijo stran od povrřine MND (slika 63) (Liu in Tan, 1999). Razlog za razliko v vezavi se skriva v strukturi obeh molekul. TEOS je tetraalkoksisilan, kar pomeni, da se Si atom lahko preko Źtirih alkilnih skupin povezuje s svojo okolico, DETA pa trialkoksisilan, kar rezultira v treh moŹnih povezavah z okolico. Iz tega sledi, da se tetraalkoksisilan lahko dosti bolj zamreŹi kot trialkoksisilan (řimuniĉ, 2007).



Slika 63: Mehanizem vezave DETA na anorgansko povrřino preko kisikovih atomov (Liu in Tan, 1999)

Naĉin vezave DETA na anorgansko povrřino MND v literaturi Źe ni povsem opisan, prav tako tudi ni razjasnjena obstojnost te vezave in moŹne interakcije med radikali in povrřino MND. MoŹno je, da se verige radikala v neustreznem pH obmoĉju poleŹejo na povrřino MND in ne Źtrlijo veĉ s povrřine MND. Prav tako je moŹno, da DETA v neugodnem pH obmoĉju, ob prisotnosti visoke koncentracije soli, ob daljšem trajanju reakcije, ob poviřani reakcijski temperaturi ali ob prisotnosti veĉjih koncentracijah DETA v reakcijski meřanici deadsorbira s povrřine MN v celoti ali delno. V teh primerih pa lahko prihaja tudi do zdruŹevanja molekul DETA v agregacijske strukture. Na nekatere izmed nařtetih moŹnosti lahko sklepamo iz te raziskave, nekatere pa lahko le predpostavimo.

Eden izmed fizikalno-kemijskih parametrov, ki vpliva na uspešnost vezave DETA na površino MND, je pH reakcijskega medija. Iz rezultatov (preglednica 13 in slika 37) so razvidna tri pH območja, ki vplivajo na učinkovitost vezave DETA na površino MND. Vizualna opažanja ter meritve specifične površine po metodi BET so v območju z izrazito kislim pH ($\text{pH} < 3$) pokazala popolno koloidno nestabilnost MND, funkcionaliziranih z DETA. Razlog za to je iskati v visoki stopnji aglomeracije nanodelcev, najverjetneje zaradi kemijske neobstoynosti in posledično nekontrolirane desorpcije površinsko vezanih molekul DETA. V kislem pH območju so končne aminoskupine, kakršne najdemo tudi v strukturi DETA, lahko v celoti ali delno protonirane in omogočajo vezavo s preostalimi molekulami DETA preko alkoksi skupine v močno zamrežene strukture. Podobno je bilo visoko stopnjo koloidne nestabilnosti opaziti v izrazito alkalnem pH območju ($\text{pH} > 8$), ki je zaradi visoke pH vrednosti in posledično visokega negativnega potenciala (površinskega naboja) na površini MND skrajno neugodno za vezavo DETA ali pa je vezava nepopolna, po drugi strani pa na ta račun favorizira visoko stopnjo aglomeracije in posedanje MND. V splošnem gre pri vezavi DETA na površino MND za kompleksen in dinamičen adsorpcijski mehanizem, ki primarno poteka z ionsko izmenjavo med ioni, ki so prisotni ob površini MND zaradi elektrostatske stabilizacije in so v termodinamskem ravnotežju z ioni v raztopini ter vezanimi molekulami silana (Košak s sod., 2005). Nova vez, ki se tvori neposredno med površino MND, rezultira v zmanjšanju celotnega površinskega naboja in povečanju stopnje adsorpcije zaradi medsebojnih učinkov elektrostatskega privlaka in stranskih interakcij med hidrofobnimi skupinami (radikali) adsorbiranih molekul DETA vsled povečevanja površinske koncentracije vezanih molekul. Na ta način se vsled vezave DETA s površine MND odstranjuje naboj, ki je bil prisoten zaradi elektrostatske stabilizacije. Ko adsorpcijski proces doseže stopnjo popolne nevtralizacije izvornega površinskega naboja z vezanimi molekulami DETA, preide sistem svojo izoelektrično točko. Stranske interakcije med sosednjimi hidrofobnimi skupinami (radikali) postanejo prevladujoče, kar vodi celoten sistem k agregiranju in koloidni nestabilnosti.

Posebno območje, ki zagotavlja visoko stopnjo učinkovitosti vezave DETA na površino MND in doseganje visoke koloidne stabilnosti sistema, ko vzorec dispergiramo v ustreznem mediju, je območje pH vrednosti med 3 in 7 (slika 37), kar se posebej odraža na meritvah specifične magnetizacije (slika 38).

Pri iskanju ustrezne pH vrednosti medija med potekom površinske funkcionalizacije z DETA smo na osnovi meritev specifične magnetizacije in analize površine MND s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) ter v kombinaciji z energijsko disperzijsko spektroskopijo (EDS) ugotovili, da je vezava DETA na površino MND najučinkovitejša v vodnem mediju (z večinskim volumskim deležem 2-propanola) s pH vrednostjo v območju med 5,0 in 5,5. Vodni medij s pH vrednostjo v tem območju je služil za pripravo vzorcev, s katerimi smo v nadaljevanju izvajali eksperimente, kjer smo iskali optimalno reakcijsko temperaturo, optimalno trajanje reakcije in optimalno koncentracijo DETA. Rezultati meritev specifične magnetizacije in specifične površine MND po metodi BET niso pri slednjih eksperimentih pokazali na nikakršno izboljšanje vzorca S2-j, ki je bil sintetiziran pri pH vrednosti 5, s trajanjem reakcije 150 min, pri sobni temperaturi in s koncentracijo DETA 2,530 ml/g MND v prvi seriji eksperimentov. Slednji vzorec (S2-j) je glede na vse izvedene meritve predstavljal odlično izhodišče za naslednji segment raziskovanja, t.j. funkcionalizacija z glutaralhidom.

Pri preučevanju vpliva povišane temperature reakcije na funkcionalizacijo MND z DETA (ob nespremenjenih ostalih reakcijskih pogojih za pripravo vzorca S2-j) smo ugotovili, da vsakršno poviševanje temperature reakcije vodi le v višanje stopnje aglomeracije. To se zgodi zaradi zmanjšanja stopnje vezave, ki je najverjetneje posledica termodinamske neugodnosti kemijske vezave in strukturne nestabilnosti molekule DETA.

Pri preučevanju trajanja reakcije (ob nespremenjenih ostalih reakcijskih pogojih za pripravo vzorca S2-j) lahko na osnovi magnetnih meritev zaključimo, da je 60 min prekratek čas za optimalno vezavo DETA na površino MND. Daljši čas (300 in več min) pa verjetno preko intenzitete vpliva reakcijskega medija povzroča spremembe v prostorski orientaciji molekul DETA na površini MND. Kot sem že omenil, se radikali organosilanov lahko tudi poležejo na površino MND in zaradi vpliva reakcijskega medija medsebojno povežejo. Posledica je manjša medsebojna razdalja med MND, kar se odraža v višjih vrednostih specifične magnetizacije.

Pri ugotavljanju optimalne koncentracije DETA v reakcijskem mediju (ob nespremenjenih ostalih reakcijskih pogojih za pripravo vzorca S2-j) smo na osnovi vrednosti specifične

magnetizacije vzorcev ugotovili, da je koncentracija 1,012 ml/g MND prenizka za funkcionalizacijo vseh MND v vzorcu. Višje koncentracije od 2,530 ml/g MND pa kažejo na višek DETA v vzorcu, kar se odraža v pojavu rahle aglomeracije in nekoliko višji specifični magnetizaciji.

Skozi celoten proces optimizacije vezave DETA na površino MND smo ugotovili, da merjenje specifične površine ni povsem ustrezna metoda za karakterizacijo funkcionaliziranih MND z DETA. Ta metoda deluje namreč na principu adsorpcije inertnega plina na površino MND in ni najbolj primerna za karakterizacijo MND, funkcionaliziranih z organo-silani. Način vezave le-teh na površino MND, njihova obstojnost in prostorska organizacija postavlja številna vprašanja o načinu adsorpcije plina na in med dolge radikale organo-silanolov. Zato je interpretacija rezultatov, pridobljenih z omenjeno metodo, dostikrat zapletena. Večjo težo pri karakterizaciji omenjenih vzorcev nosijo magnetne meritve (zaradi znižanja specifične magnetizacije ob prisotnosti nemagnetne prevleke na površini MND), opazovanje s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) v kombinaciji z energijsko disperzijsko analizo X-žarkov (EDS) in termična analiza, v katero spadajo: diferencialna vrstična kalorimetrija (DSC), termogravimetrija (TG), diferencialna termična analiza (DTA) in analiza plinskih produktov termičnega razpada (EGA).

Energijska disperzijska analiza X-žarkov (EDS) neizpodbitno dokazuje prisotnost Si na površini posameznih MND vzorca S2-j in ne le v vzorcu. Izvor ostalih elementov, ki smo jih določili s to analizo metodo, prikazuje spodnja preglednica (preglednica 20).

Preglednica 20: Izvor elementov (razen Si), ki smo jih določili z EDS analizo metodo na MND vzorca S2-j

kemijski element	izvor
Fe	zgradba uporabljenih Co-feritnih MN
Co	zgradba uporabljenih Co-feritnih MN
O	zgradba uporabljenih Co-feritnih MN in del strukture molekule DETA
C	prevleka površine mrežic za elektronsko mikroskopijo in del strukture molekule DETA
Cu	material, iz katerega je izdelana mrežica za elektronsko mikroskopijo

S primerjavo koloidne stabilnosti vodnih suspenzij nefunkcionaliziranih in z DETA funkcionaliziranih MND pri različnih pH vrednostih (slike 47, 48 in 49) smo želeli pokazati na pojav stopnje aglomeracije in koloidne nestabilnosti, kot posledice prehoda sistema preko izoelektrične točke iz nevtralnega območja pri pH 7, kjer je izoelektrična točka nefunkcionaliziranih MND (Čampelj s sod., 2007), v bazično področje pri pH 9, kjer je najverjetneje izoelektrična točka funkcionaliziranih MND z DETA. To se ne more zgoditi brez spremembe strukture MND ali brez uspešne površinske funkcionalizacije MND.

Rezultati meritev diferencialne vrstične kalorimetrije (DSC) kažejo na pričakovano razliko med vzorcem nefunkcionaliziranih MND, čistim DETA in funkcionaliziranimi MND z DETA (vzorec S2-j) (slika 55). Čisti DETA ima značilni eksotermni vrh pri 250 °C, vendar pri tej temperaturi ne razpade celotna molekula, o čemer pričajo številni eksotermni vrhovi nad 400 °C. Kot dokaz, da je na vzorcu S2-j prisoten DETA, lahko pri DSC krivulji, ki predstavlja vzorec S2-j, opazimo podoben eksotermen vrh kot pri čistem DETA, le da je za 50 °C zamaknjen. To je pogost pojav, saj molekula ob vezavi z drugimi molekulami nekoliko spremeni svoje fizikalno-kemijske lastnosti in s tem tudi točko termičnega razpada. Da eksotermni vrh pri 300 °C pri vzorcu S2-j res predstavlja izgubo DETA, kaže tudi DSC krivulja nefunkcionaliziranih MND, ki ne kažejo entalpijskih sprememb.

Na osnovi rezultatov termogravimetrične (TGA) in diferencialne termične analize (DTA) v kombinaciji z analizo plinskih produktov termičnega razpada (EGA) smo dobili vpogled v učinkovitost vezave in vsebnosti vezane DETA na površino MND. Slika 51 kaže TGA in DTA krivulji nefunkcionaliziranih Co-feritnih MND pri segrevanju 10 °C/min od sobne temperature do 650 °C. TGA krivulja prikazuje izgubo mase le na račun vode in acetona,

ki sta v majhnih količinah prisotna v vzorcu zaradi predhodne elektrostatske stabilizacije, na kar lahko sklepamo tudi iz krivulj EGA analize (slika 53). Slika 52 po drugi strani prikazuje precej drugačni TGA in DTA krivulji, v primerjavi s sliko 51. Gre namreč za analizo funkcionaliziranih Co-feritnih MND z DETA, kjer izguba mase (TGA krivulja) v območju drugega eksotermnega vrha (DTA krivulja) predstavlja količino vezane DETA v vzorcu S2-j. To podpirajo tudi krivulje EGA analize, kjer imamo ravno tako dva vrhova, prvi predstavlja izgubo ostankov topila (reakcijskega medija), medtem ko drugi predstavlja izgubo DETA (slika 54).

Na osnovi analize plinskih produktov termičnega razpada (EGA) lahko opazimo precejšnjo razliko v ionskih tokovih, ki ustrezajo molekulam H_2O , CO_2 in NO_2 , ki lahko izvirajo izključno iz molekule DETA. Majhne koncentracije omenjenih plinov v nefunkcionaliziranem vzorcu so posledica uporabljenih kemikalij (npr. aceton, dušikova kislina in amoniak) pri pripravi in elektrostatski stabilizaciji magnetne tekočine iz katere ti delci izvirajo. Gre za majhne količine omenjenih kemikalij, ki so kljub spiranju in redčenju nanodelcev v magnetni tekočini ostali v vzorcu.

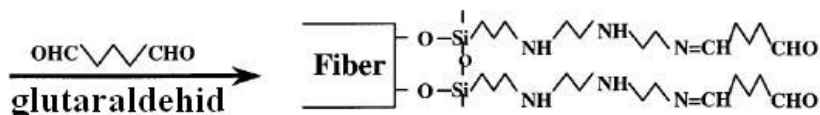
Slika 50 prikazuje rentgenski praškovni difraktogram funkcionaliziranega in nefunkcionaliziranega vzorca Co-ferita. XRD nefunkcionaliziranih MND kaže zelo široke, difuzne vrhove, ki ustrezajo majhni velikosti delcev okoli 11 nm in so karakteristični za spinelno fazo. Kot je razvidno iz omenjene slike, rezultati rentgenske praškovne difrakcije (XRD) ne kažejo nobene razlike med nefunkcionaliziranimi MN in funkcionaliziranimi MN z DETA, kar je v skladu s pričakovanji, zaradi amorfne (nekrystalinične) narave strukture DETA, katere dolge radikalske verige ne tvorijo urejenih kristalnih oblik.

5.3 VREDNOTENJE REZULTATOV FUNKCIONALIZACIJE KOBALT-FERITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z GLUTARALDEHIDOM

Problem, ki se pojavi pri vrednotenju rezultatov funkcionalizacije z glutaraldehidom (GA), je njegova detekcija, saj gre za majhno organsko molekulo, na prisotnost katere lahko sklepamo le iz rezultatov termičnih analiznih metod ter posredno s pomočjo titracijske

metode. V našem primeru smo izbrali posredno metodo določanja GA v reakcijskem mediju po poteku reakcije – torej nevezanega GA. Razlog za takšno izbiro je v preprosti izvedbi titracijske metode, ki jo lahko izvajamo brez uporabe dragih in zahtevnih instrumentov, kot je to v primeru termičnih analiznih metod. Kljub preprosti izvedbi titracijske metode pa umeritvena krivulja (slika 56) kaže na natančnost te metode, saj eksperimentalno določeni podatki zelo dobro sledijo teoretično izračunanim. To še posebej velja za količine GA, ki smo jih uporabili v naših eksperimentih (t.j. pod 300 μ l).

O načinu vezave GA na molekulo 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilana (DETA) lahko sklepamo iz literaturnih virov, kjer izvemo, da se GA veže na DETA preko terminalne aminoskupine na slednji molekuli (slika 64) (Liu in Tan, 1999).



Slika 64: Shema vezave molekule glutaraldehida na molekulo DETA

Pri vezavi GA na MND, predhodno funkcionalizirane z DETA, smo ugotovili, da imata velik pomen pri vezavi reakcijski medij in njegova pH vrednost (preglednica 16). Pri primerjavi ustreznosti reakcijskega medija smo ugotovili, da je za omenjeno vezavo bistveno boljši reakcijski medij z večinskim deležem 2-propanola. Ob spreminjanju pH vrednosti reakcijskega medija pa smo ugotovili, da se največji delež razpoložljivega GA veže na MND, funkcionalizirane z DETA, v nevtralnem do rahlo bazičnem pH območju s pH vrednostmi med 6 in 8. Skupaj z učinkovitostjo vezave GA na MND, funkcionalizirane z DETA, pa raste tudi stopnja aglomeracije MND. To je razumljivo, saj se GA pogosto uporablja kot sredstvo za fiksiranje mikroskopskih preparatov, pri čemer se izkorišča lastnost GA, da zamreži preparat. Pri tem se molekule GA povežejo s strukturami preparata in med seboj, kar smo dosegli na primeru MND, funkcionaliziranih z DETA, tudi mi, ko smo našli ustrezen reakcijski medij in njegovo pH vrednost. Ta rezultat kaže na to, da bi v nadaljevanju te raziskave bilo potrebno izbrati kompromisno točko med maso vezanega GA in aglomeriranostjo vzorca v skladu s končno uporabo na ta način

funkcionaliziranih MND, saj aglomeriranost vzorca ni zaželjena. To je možno doseči z izbiro suboptimalnega pH območja ali z zmanjševanjem koncentracije GA v reakcijskem mediju.

5.4 VIZUALNO VREDNOTENJE REZULTATOV KOLOIDNE STABILNOSTI FUNKCIONALIZIRANIH MAGNETNIH NANODELCEV, V FOSFATNEM PUFRU IN DESTILIRANI VODI

Ker večina bioloških aplikacij temelji na uporabi vode ali ustreznih pufrov, smo funkcionalizirane magnetne nanodelce (MND) s 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilanom (DETA) in glutaraldehydom (GA) poizkušali koloidno dispergirati v fosfatnem pufru (PB) s pH vrednostmi med 3 in 10 ter v destilirani vodi z enakim razponom pH vrednosti.

Ker se vzorci MND, funkcionaliziranih z DETA in nato še z GA, posedajo že med funkcionalizacijo z GA, smo v tem delu raziskav uporabljali vzorce MND, funkcionaliziranih le z DETA, katerih vodna suspenzija po funkcionalizaciji ostaja koloidno stabilna. Opazili smo, da se MND, funkcionalizirani z DETA, zaradi prisotnih soli v fosfatnem pufru (PB) spontano sedimentirajo. Izjema so visoke koncentracije PB, nad 0,1 M PB, kjer se z večanjem koncentracije PB zmanjšuje delež sedimentiranih nanodelcev. Razlog za to je v sproščanju DETA z MND v prisotnosti visoke koncentracije soli.

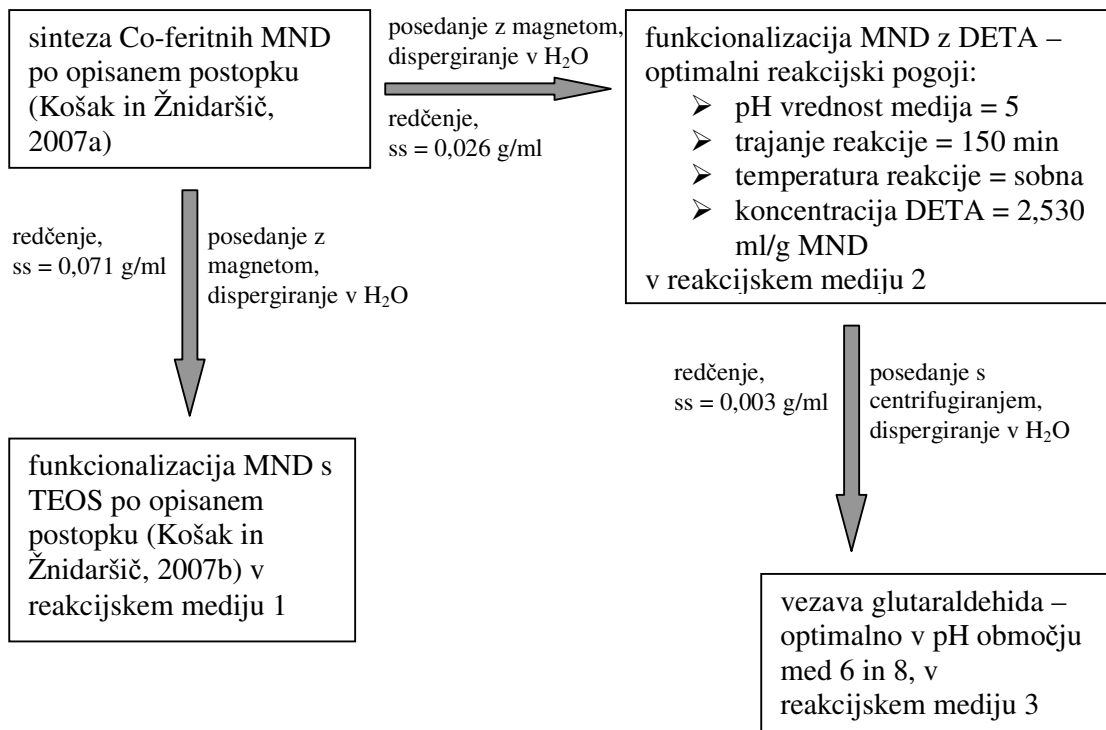
Za razliko od opazovanja koloidne stabilnosti MND, funkcionaliziranih z DETA v PB, dejanske koloidne stabilnosti teh MND v destilirani vodi ne moremo zlahka določiti, saj se pH vrednosti s časom spreminjajo zaradi nizke pufrske kapacitete, ki jo ima destilirana voda. Meritve pH vrednosti te serije eksperimentov so namreč po 24 urah pokazale velika odstopanja od nastavljenih pH vrednosti. Kljub temu lahko okvirno določimo pH območje, v katerem so MND, funkcionalizirani z DETA, koloidno stabilno dispergirani v destilirani vodi. To je območje pH vrednosti od 3 do 7, pri čemer je omenjena zgornja meja vprašljiva, ravno zaradi odstopanj končnih meritev pH vrednosti od nastavljene pH

vrednosti. Možno je namreč, da je pH vrednost 9,5 takšna, da povzroči aglomeracijo MND, funkcionaliziranih z DETA, kljub temu, da se pH vrednost naknadno spremeni. Natančne pH vrednosti, ki omogočajo koloidno suspenzijo MND, funkcionaliziranih z DETA, bi lahko določili z meritvami zeta potenciala in določitve izoelektrične točke.

5.5 POGLED V PRIHODNOST IN MOŽNOSTI ZA NADALJNJE RAZISKAVE NA TEM PODROČJU

Možnosti za nadaljevanje tega diplomskega dela je veliko, za lažji pregled nad delom si lahko pomagamo s sliko 65. Pri funkcionalizaciji MND s TEOS in DETA bi lahko preučili kombiniranje obeh silanov v reakcijskem mediju med funkcionalizacijo. Pri vezavi glutaraldehida na MND, funkcionalizirane z DETA, bi bilo potrebno optimizirati vezavo in s spreminjanjem koncentracije glutaraldehida in pH vrednosti najti ustrezen kompromis med maso vezanega glutaraldehida in stopnjo aglomeracije vzorca.

Rezultat tega diplomskega dela pa je že sam po sebi dovolj obetaven, saj ponuja majhne MND (pod 20 nm), na katere je možno vezati dve različni in zelo uporabni vezni molekuli – DETA in glutaraldehyd. Ker obe ponujata številne možnosti za vezavo raznih biomolekul, bi se tako pripravljene MND lahko uporabljali na številnih področjih znanosti, predvsem tam, kjer se magnetni delci mikrometrskih velikosti ne morejo uveljaviti.



Slika 65: Shema sosledja preiskovanih faz sinteze in funkcionalizacije magnetnih nanodelcev (MND) z opisom ključnih rezultatov. Medij 1 sestavljajo 2-propanol, dH₂O in vodna koloidna disperzija MND (z deležem suhe snovi 0,071 g/ml) v razmerju 66,6 : 13,3 : 1. Medij 2 sestavljajo 2-propanol, dH₂O in vodna koloidna disperzija MND (z deležem suhe snovi 0,026 g/ml) v razmerju 65,8 : 13,2 : 1. Medij 3 sestavljata 2-propanol, vodna koloidna disperzija MND (z deležem suhe snovi 0,003 g/ml) in 25% raztopina glutaraldehida v razmerju 4 : 1 : 0,02

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Rezultati diplomskega dela so pokazali, da je možno sintetizirati in funkcionalizirati magnetne nanodelce (MND) z velikostjo pod 20 nm, ki so primerni za aplikacije v biotehnologiji, biomedicini, medicini in farmaciji.

Sintetizirali smo Co-feritne MND velikosti 10–12 nm s specifično magnetizacijo (M_s) 63 Am²/kg in jih uspešno površinsko funkcionalizirali s tetraetoksisilanom (TEOS) ter s 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilanom (DETA). Debelina silikatne prevleke na MND po funkcionalizaciji s TEOS se je gibala v območju pod 20 nm, odvisno od koncentracije TEOS. Pri površinski funkcionalizaciji MND z DETA smo tekom optimiranja reakcije pripravili vzorec z optimalno količino vezane DETA v reakcijskem mediju s pH vrednostjo 5, reakcija je potekala pri sobni temperaturi, reakcijski čas je bil 150 min, koncentracija DETA v reakcijski mešanici pa je bila 2,53 ml/g MND. Ob dispergiranju tega vzorca v destilirani vodi smo ugotovili, da je koloidno stabilen, kar odpira nadaljnje možnosti za delo na tem področju.

Vzorec z optimalno količino vezane DETA smo analizirali z naslednjimi analiznimi metodami: magnetne meritve, rentgenska praškovna difrakcija (XRD), rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF), presečna elektronska mikroskopija (TEM) v kombinaciji z energijsko disperzijsko analizo X-žarkov (EDS) ter termične analize metode: diferencialna vrstična kalorimetrija (DSC), termogravimetrija (TG), diferenčna termična analiza (DTA) in analiza plinskih produktov termičnega razpada (EGA). Vsi rezultati omenjenih analiz so kazali na uspešno vezavo DETA na površino MND, rezultat termogravimetrije (TG) pa je pokazal, da je masni delež vezane DETA 4,5 ut. %.

Eksperimenti nadaljnje vezave glutaraldehida na MND, funkcionalizirane z DETA, so pokazali, da je stopnja te vezave močno odvisna od vrste in pH vrednosti reakcijskega medija. Pri tem smo ugotovili, da je najučinkovitejša vezava glutaraldehida na MND,

funkcionalizirane z DETA, dosežena v reakcijskem mediju z večinskim deležem 2-propanola in pH vrednostjo med 6 in 7. Slednji rezultat smo pridobili z uporabo titracijske metode, s pomočjo Na_2SO_3 , za barvni indikator pa smo uporabili timolftalein.

Sintetizirani in funkcionalizirani MND z DETA, kot tudi MND, funkcionalizirani z DETA in z vezanim glutaraldehydom, omogočajo številne nadaljnje aplikacije v biotehnologiji, biomedicini, medicini in farmaciji. Posrednika, tako DETA kot tudi glutaraldehyd, omogočata številne možnosti nadaljnje vezave željenih biomolekul, obenem pa majhnost MND omogoča nekatere možnosti uporabe, za katere magnetni delci mikronske velikosti niso primerni.

6.2 SUMMARY

Thesis results show that magnetic nanoparticles (under 20 nm), which are appropriate for applications in biotechnology, biomedicine, medicine and pharmacy, can be synthesized and functionalized. Co-ferrite magnetic nanoparticles with specific magnetization (M_s) $63 \text{ Am}^2/\text{kg}$ were synthesized and successfully functionalized with tetraethoxysilane (TEOS) and 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propil-trimetoksisilanom (DETA). Thickness of the magnetic nanoparticles silicate cover after the functionalization with TEOS was ranging between 0 and 20 nm depending on concentration of TEOS. While functionalizing magnetic nanoparticles with DETA the sample with optimal quantity of bound DETA at pH reaction medium of range 5 was gained. The reaction was carried out at room temperature, the reaction time was 150 min and DETA concentration in reaction mixture was 3,53 ml/g of magnetic nanoparticles. While dispersing this sample in destilated water it has been found out that it is collide stable, what creates new opportunities for further researches in this field. The sample with optimal quantity of bound DETA was analysed with the following analysis methods: magnetic meassurments, X-ray powder diffraction (XRD), X-ray fluorescence spectrometry (XRF), transmission electron microscopy (TEM) in combination with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and thermal analysis methods: differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), differential thermal analysis (DTA) and exhaust gas analysis (EGA). All results of the above-

mentioned analyses showed a successful DETA binding onto magnetic nanoparticles surface. And the result of thermogravimetry (TG) shows the mass proportion of bound DETA of 4,5%. Other experiments of binding glutaraldehyde onto magnetic nanoparticles functionalized with DETA showed that the level of this binding depends on pH reaction medium. It has been also discovered that the best result of binding glutaraldehyde onto magnetic nanoparticles functionalized with DETA is achieved in reaction medium with major proportion of 2-propanol at pH range between 6 and 7. This result has been gained through titration with help of Na_2SO_3 and as colour indicator thymol phtalein was used. With DETA synthesized and functionalized magnetic nanoparticles just as magnetic nanoparticles functionalized with DETA and bound with glutaraldehyde enable several further application in biotechnology, biomedicine, medicine and pharmacy. DETA and glutaraldehyde as agents enable further opportunities for bonds of biomolecules, as well as small size of magnetic nanoparticles opens a possibility of their usage in those processes where magnetic particles of micron size can not be used.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

Košak A. 2006. Sinteza in karakterizacija feritnih nanodelcev in priprava magnetnih tekočin. Doktorska disertacija. FKKT, Univerza v Mariboru: 142 str.

Sun C., Lee J.S.H., Zhang M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 11, 1252–1265

Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L., Bacon B.R., Compton C.C., White D.L., Jacobs P., Lewis J. 1989. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology*, 152, 167–173

Tartaj P., Morales M.D., Veintemillas-Verdaguer S., Gonzalez-Carreno T., Serna C.J. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, 13, R182–R197

Gupta A.K., Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 18, 3995–4021

Willard M.A., Kurihara L.K., Carpenter E.E., Calvin S., Harris V.G. 2004. Chemically prepared magnetic nanoparticles. *International Materials Reviews*, 49, 3–4, 125–170

Lee J.H., Huh Y.M., Jun Y.W., Seo J.W., Jang J.T., Song H.T., Kim S., Cho E.J., Yoon H.G., Suh J.S., Cheon J. 2007. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultrasensitive molecular imaging. *Natural Medicines*, 13, 95–99

Sun S.H., Zeng H., Robinson D.B., Raoux S., Rice P.M., Wang S.X., Li G.X. 2004. Monodisperse MFe_2O_4 (M=Fe, Co, Mn) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 1, 273–279

Huber D.L. 2005. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1, 5, 482–501

Peng S., Wang C., Xie J., Sun S. 2006. Synthesis and stabilization of monodisperse Fe-nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 33, 10676–10677

Sun S.H. 2006. Recent advances in chemical synthesis, self-assembly, and applications of FePt nanoparticles. *Advanced Materials*, 18, 4, 393–403

Hong R., Fischer N.O., Emrick T., Rotello V.M. 2005. Surface PEGylation and ligand exchange chemistry of FePt nanoparticles for biological applications. *Chemistry of Materials*, 17, 18, 4617–4621

Gao J., Liang G., Zhang B., Kuang Y., Zhang X., Xu B. 2007a. FePt@CoS₂ yolk-shell nanocrystals as a potent agent to kill HeLa cells. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 5, 1428–1433

Gao J., Zhang B., Gao Y., Pan Y., Zhang X., Xu B. 2007b. Fluorescent magnetic nanocrystals by sequential addition of reagents in a one-pot reaction: a simple preparation for multifunctional nanostructures. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 39, 11928–11935

Reiss G., Hutten A. 2005. Magnetic nanoparticles – applications beyond data storage. *Nature Materials*, 4, 10, 725–726

Bai J.M., Wang J.P. 2005. High-magnetic-moment core-shell-type FeCo-Au/Ag nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 87, 15, 152502

Seo W.S., Lee J.H., Sun X., Suzuki Y., Mann D., Liu Z., Terashima M., Yang P.C., McConnell M.V., Nishimura D.G., Dai H. 2006. FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. *Nature Materials*, 5, 12, 971–976

Berry C.C., Curtis A.S.G. 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, 13, R198–R206

Corot C., Robert P., Idee J.M., Port M. 2006. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 14, 1471–1504

Weissleder R., Bogdanov A., Neiwelt E.A., Papisov M. 1995. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 2–3, 321–334

Torchilin V.P. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 2, 145–160

Nasongkla N., Bey E., Ren J.M., Ai H., Khemtong C., Guthi J.S., Chin S.F., Sherry A.D., Boothman D.A., Gao J.M. 2006. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Letters*, 6, 11, 2427–2430

Lecommandoux S., Sandre O., Checot F., Perzynski R. 2006. Smart hybrid magnetic selfassembled micelles and hollow capsules. *Progress in Solid State Chemistry*, 34, 2-4, 171–179

Lu Y., Yin Y.D., Mayers B.T., Xia Y.N. 2002. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol–gel approach. *Nano Letters*, 2, 3, 183–186

Stober W., Fink A., Bohn E. 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 1, 62–69

Prime K.L., Whitesides G.M. 1991. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*, 252, 5009, 1164–1167

Bain C.D., Troughton E.B., Tao Y.T., Evall J., Whitesides G.M., Nuzzo R.G. 1989. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal Of The American Chemical Society*, 111, 1, 321–335

Aslam M., Dent A. 1998. *Bioconjugation*. Macmillan Reference Ltd: 833 str.

Hermanson G.T. 1996. *Bioconjugate techniques*. Academic Press: 785 str.

Šimunič E. 2007. Priprava in uporaba nanokompozitov z metakriloksipropiltrimetoksi-silanom. Diplomsko delo. FKKT, Univerza v Ljubljani, 54 str.

Gelest, Inc., Morrisville, North Carolina, ZDA. Naming silicon compounds. Technical information.
<http://www.gelest.com/Library/02Naming.pdf> (20.7.2008)

DHHS (NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health). 2001. Glutaraldehyde – Occupational Hazards in Hospitals. Publication No. 2001-115
<http://www.cdc.gov/niosh/pdfs/01-115.pdf> (6.7.2008)

Hunter R.J. 1981. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press: 386 str.

Skoog D.A., West D.M., Holler F.J. 1996. *Fundamentals of analytical chemistry*. Seventh edition. Saunders college publishing: 812 str.

Shaw D.J. 1992. Introduction To Colloid And Surface Chemistry. Butterworth-Heinemann: 306 str.

Chemicell GmbH – new tools in bioscience, Berlin, Nemčija. Magnetofection: the new gene transfection technology

<http://www.chemicell.com/products/magnetofection/docs/magnetofection.pdf>

(29.junij 2008)

Giaver I. 1976. Magnetic separation of biological particles. US patent application US 3,970,518 A

Senyei A.E., Widder K.J. 1980. Method of magnetic separation of cells and the like, and microspheres for use therein. US patent application US 4,230,685 A1

Kakita H., Komiya K., Nakamura K., Kato Y. 1993. Method for binding immunoglobulin G to protein A. Evropski patent EP 0 544 115 A2

Halbreich A., Sabolovic D., Sestier C., Geldwerth D., Pons J.-N., Roger J. 1997. Magnetic nanoparticles coupled to annexin, and utilization thereof. Mednarodni patent WO 97/01760

Oldfield C., Johnston T., Banks M., Nichols D. 2006. Coated microspheres. Mednarodni patent WO 2007036682 A1

Perez M.J., Josephson L., Weissleder R. 2002. Magnetic-nanoparticle conjugates and methods of use. Mednarodni patent WO 02098364 A3

Josephson L., Weissleder R., Perez M.J. 2005. Self-assembling nanoparticle conjugates. Mednarodni patent WO 2005061724 A1

Avrameas S., Guesdon J.-L. 1980. Magnetic gel suitable to immunoenzymatic determinations. US patent application US 4,241,176 A

Gombinski M. 2001. Separation by magnetic particles. US patent application US 6297062 A

Kirpotin D., Chan D.C.F., Bunn P.A. Jr. 1995. Magnetic microparticles. US patent application US 5,411,730 A

Klaveness J., Fuglaas B., Rongved P., Johannesen E., Henrich P.M., Heinrich W.H. Heinrich-Gunther W.H., Bacon E.R., Toner J.L., McIntire G.L., Desai V.C. 2003. Light imaging contrast agents. US patent application US 2003/0157021 A1

Akhtari M., Engel J. 2006. Functionalized magnetic nanoparticles and methods of use thereof. Mednarodni patent WO 2006/102377 A2

Tan W., Santra S., Zhang P., Tapeç R., Dobson J. 2003. Coated nanoparticles. US patent application US 6,548,264 B1

Semelka R.C., Helmberger T.K. 2001. Contrast agents for MR imaging of the liver. *Radiology*, 218, 1, 27–38

Harisinghani M.G., Barentsz J., Hahn P.F., Deserno W.M., Tabatabaei S., van de Kaa C.H., de la Rosette J. Weissleder R. 2003. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 348, 25, 2491–2499

Harisinghani M.G., Weissleder R. 2004. Sensitive, noninvasive detection of lymph node metastases. *PloS Medicine*, 1, 3, (e66) 202–209

Enochs W.S., Harsh G., Hochberg F., Weissleder R. 1999. Improved delineation of human brain tumors on MR images using a long-circulating, superparamagnetic iron oxide agent. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 9, 2, 228–232

- Neuwelt E.A., Varallyay P., Bago A.G., Muldoon L.L., Nesbit G., Nixon R. 2004. Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30, 5, 456–471
- Sosnovik D.E., Nahrendorf M., Weissleder R. 2007. Molecular magnetic resonance imaging in cardiovascular medicine. *Circulation*, 115, 15, 2076–2086
- Wickline S.A., Neubauer A.M., Winter P.M., Caruthers S.D., Lanza G.M. 2007. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 25, 4, 667–680
- Kelly K.A., Nahrendorf M., Yu A.M., Reynolds F., Weissleder R. 2006. In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging. *Molecular Imaging and Biology*, 8, 4, 201–207
- Weissleder R., Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radiology*, 219, 2, 316–333
- Weissleder R. 2006. Molecular imaging in cancer. *Science*, 312, 5777, 1168–1171
- Graham H., Gorman J.G., Rowell J.P. 2007. Magnetic particle-tagged blood bank reagents and techniques. Mednarodni patent WO 2007/033078 A2
- Kohler N., Sun C., Wang J., Zhang M.Q. 2005. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir*, 21, 19, 8858–8864
- Dobson J. 2006b. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*, 67, 1, 55–60

Neuberger T., Schopf B., Hofmann H., Hofmann M., von Rechenberg B. 2005. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 1, 483–496

Alexiou C., Schmid R.J., Jurgons R., Kremer M., Wanner G., Bergemann C., Huenges E., Nawroth T., Arnold W., Parak F.G. 2006. Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *European Biophysics Journal*, 35, 5, 446–450

Schulze K., Koch A., Schopf B., Petri A., Steitz B., Chastellain M., Hofmann M., Hofmann H., von Rechenberg B. 2005. Intraarticular application of superparamagnetic nanoparticles and their uptake by synovial membrane – an experimental study in sheep. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 1, 419–432

Jain T.K., Morales M.A., Sahoo S.K., Leslie-Pelecky D.L., Labhasetwar V. 2005. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Molecular Pharmaceutics*, 2, 3, 194–205

Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 5, 631–651

Juliano R.L., Alahari S., Yoo H., Kole R., Cho M. 1999. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharmaceutical Research*, 16, 4, 494–502

Dobson J. 2006a. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Therapy*, 13, 4, 283–287

Huh Y.M., Jun Y.W., Song H.T., Kim S., Choi J.S., Lee J.H., Yoon S., Kim K.S., Shin J.S., Suh J.S., Cheon J. 2005. In vivo magnetic resonance detection of cancer

by using multifunctional magnetic nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 35, 12387–12391

Flohr M.J.K. 1997. X-Ray Powder Diffraction. USGS – science for a changing world.
<http://www.bccmeteorites.com/XRD.PDF> (12.7.2008)

Veber M. Rentgenska fluorescenčna spektrometrija. Zapiski s predavanj
<http://abra.fkkt.uni-lj.si/veber/xrf-s.zip> (12.7.2008)

Williams D.B., Carter C.B. 1996a. Transmission electron microscopy. A Textbook for Materials Science. Basics (I). Plenum Press: 173 str.

Williams D.B., Carter C.B. 1996b. Transmission electron microscopy. A Textbook for Materials Science. Spectrometry (IV). Plenum Press: 176 str.

Brown M.E. 1998. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Principles and Practice. Volume 1. Elsevier: 722 str.

Cilenšek J. 2002. Termična analiza alkoksidnega prekursorja $\text{Pb}(\text{Zr}_{0.30}\text{Ti}_{0.70})\text{O}_3$.
Diplomska naloga. FKKT, Univerza v Mariboru, 58 str.

Košak A., Žnidaršič A. 2007a. Sinteza in karakterizacija superparamagnetnih nanodelcev z metodo soobarjanja v vodnih raztopinah. Urad RS za intelektualno lastnino. Patentna prijava št. P-200700112.

Košak A., Žnidaršič A. 2007b. Postopek površinske obdelave superparamagnetnih nanodelcev z internimi anorganskimi oksidnimi materiali. Urad RS za intelektualno lastnino. Patentna prijava št. P-200700301

OSHA (U.S. Department of Labor – Occupational Safety & Health Administration).
Glutaraldehyde. Analytical Method No. 64

<http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org064/org064.html> (7.7.2008)

Qhobosheane M., Santra S., Zhang P., Tan W. 2001. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst*, 126, 8, 1274–1278

Liu X., Tan W. 1999. Development of an optical fiber lactate sensor. *Mikrochimica Acta*, 131, 129–135

Košak A., Žnidaršič A. 2006. The preparation technology of core-shell magnetic nanoparticles. V: 42th International Conference on Microelectronics, Devices and Materials and the Workshop on MEMS and NEMS, Strunjan, 13–15 sept. 2006. Vrtačnik D. (ur.), Šorli I. (ur.). MIDEM - Society for Microelectronics, Electronic Components and Materials, 145–150

Košak A., Makovec D., Žnidaršič A., Drogenik M. 2005. Priprava magnetnih tekočin. *Materiali in tehnologije*, 39, 1, 37–41

7.2 DRUGI VIRI

Kohler N., Sun C., Fichtenholtz A., Gunn J., Fang C., Zhang M.Q. 2006.

Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small*, 2, 6, 785–792

Yang J., Lee H., Hyung W., Park S.B., Haam S. 2006. Magnetic PECA nanoparticles as drug carriers for targeted delivery: synthesis and release characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 23, 2, 203–212

Salata O.V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine – Review. *Journal of nanobiotechnology*, 2, 3

<http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3> (16.7.2008)

Malvern instruments. Zetasizer nano series technical note. MRK654-01

[www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000734/\\$file/MRK654-01%20An%20Introduction%20to%20Zeta%20Potential%20v3.pdf](http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000734/$file/MRK654-01%20An%20Introduction%20to%20Zeta%20Potential%20v3.pdf) (05.03.2008)

Good Shepherd – health care system

http://www.gshealth.org/Hospital/Services/magnetic_resonance_imaging.htm
(14.9.2008)

Thorek D.L.J., Chen A.K., Czupryna J., Tsourkas A. 2006. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Annals of Biomedical Engineering*, 34, 1, 23–38

Sealy C. 2006. Nanoparticles target cancer cells in vivo. *Nano Today*, 1, 2, 9

Sealy C. 2006. Nanoparticles turn up the heat. *Nano Today*, 1, 2, 9

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalil somentorju dr. Aljoši Košaku s Kolektor Nanotesla instituta (NTI) in dr. Maruši Pompe Novak z Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB), za strokovno vodstvo, nasvete in odgovore na moja številna vprašanja v zvezi s tem diplomskim delom. Hvala tudi za vse pripombe in pomoč pri pisanju diplomskega dela.

Hvala mentorici prof. dr. Maji Ravnikar, ki mi je omogočila temo diplomske naloge in sodelavo s Kolektor Nanotesla institutom ter za pregled diplomskega dela.

Hvala recenzentki prof. dr. Damjani Drobne in predsedniku komisije prof. dr. Tomu Turku za zadnje napotke pri pisanju diplomskega dela.

Hvala vsem, ki so prispevali svoj delež k temu diplomskemu delu z izvajanjem analiznih metod karakterizacije funkcionaliziranih in nefunkcionaliziranih magnetnih nanodelcev:

- Nevenka Rajnar (NTI) – analiza vzorcev z diferencialno vrstično kalorimetrijo (DSC) in rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF) ter določanje specifične površine magnetnih nanodelcev v vzorcu po metodi BET,
- Magda Tušek (NIB) – pregledovanje vzorcev s pomočjo presevnega transmisijskega mikroskopa (TEM) na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete,
- dr. Maja Remškar (Institut Jožef Stefan) – pregledovanje vzorcev s pomočjo presevnega transmisijskega mikroskopa (TEM) v kombinaciji z energijsko disperzijsko analizo X-žarkov (EDS) na Institutu Jožef Stefan,
- Jana Cilenšek (Kemijski inštitut Ljubljana) – analiza vzorcev s termogravimetrijo (TG), diferenčno termično analizo (DTA) in analizo plinskih produktov termičnega razpada (EGA) na Kemijskem inštitutu Ljubljana in
- Edi Kranjc (Kemijski inštitut Ljubljana) – analiza vzorcev z rentgensko praškovno difrakcijo (XRD) na Kemijskem inštitutu Ljubljana.

Hvala Urški Čepin z NIB in Ani Drmota z NTI za pomoč pri spoznavanju laboratorijev, načinu dela v njih in pripadajoče opreme.

Hvala Mateji Erman Repe za slovnični pregled diplomskega dela in Manji Marciuš za prevod izvlečka in povzetka v angleški jezik.

Hvala tudi vsem, ki so kakorkoli pripomogli k realizaciji tega diplomskega dela in vsem prijateljem za nepozabna študentska leta.