URAVNAVANJE LASTNOSTI VODNIH SUSPENZIJ NANODELCEV ŽELEZOVEGA OKSIDA Z AMINOKISLINAMI

Klementina Pušnik

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: prof. dr. Darko Makovec, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:
prof. dr. Mihael Drofenik, predsednik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,Univerza v Mariboru, Slovenija
doc. dr. Danjela Kuščer Hrovatin, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija
doc. dr. Sašo Gyergyek, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Klementina Pušnik

URAVNAVANJE LASTNOSTI VODNIH SUSPENZIJ NANODELCEV ŽELEZOVEGA OKSIDA Z AMINOKISLINAMI

Doktorska disertacija

ENGINEERING PROPERTIES OF AQUEOUS SUSPENSIONS OF IRON-OXIDE NANOPARTICLES USING AMINO ACIDS

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. dr. Darko Makovec

Ljubljana, Slovenija, september 2016

Mojim najdražjim…

Zahvala

"Ljudje bi se morali več učiti drug od drugega in manj učiti drug drugega."
Peter Ustinov

Zahvala je namenjena vsem, ki so pripomogli k temu, da sem se v času doktorskega usposabljanja od njih lahko učila.

Prof. dr. Mihaelu Drofeniku za izkazano zaupanje pri opravljanju dela mlade raziskovalke in pozitivno uvajanje v svet raziskovanja. Prof. dr. Darku Makovcu, mentorju, ki me je vodil z zmeraj konstruktivnimi nasveti, debatami, strokovnostjo, potrpežljivostjo in iskrenostjo ter tako pripomogel, da sem se seznanila z raziskovalnim delom.
Za pomoč pri *in situ* FT-IR analizah se zahvaljujem tehnični sodelavki Juditi Erjavec in Nevenki Rajnar, tehnični svetovalki, v. d. vodji Nano lab, Nanotesla Instituta Ljubljana.
Zahvala gre prof. dr. Kseniji Kogej z Oddelka za fizikalno kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani za vedno pozitivne sugestije, debate in strokovne nasvete ter Vesni Arrigler za pomoč pri opravljanju meritev s področja koligativnih lastnosti nanodelcev železovega oksida in koligativnih lastnosti raztopin aminokislin.
Zahvalila bi se izr. prof. dr. Ireni Kralj Cigić, dr. Gregorju Maroltu, Mojci Peterlin z Oddelka za analizno kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani za pomoč pri izvedbi HPLC meritev.
Zahvala gre tudi sodelavcem Odseka za sintezo materialov in kolegom z Instituta »Jožef Stefan« za prijetno vzpodbudno delovno vzdušje, konstruktivne debate in sproščene trenutke izven delovnega časa.
Zahvaljujem se ARRS, Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za financiranje.

Posebna zahvala mojim najdražjim. Mihu, ki me je z izkazovanjem razumevanja tempa raziskovalnega dela spodbujal, me podpiral in tako nemalokrat brezhibno opravljal tako vlogo očeta kot tudi mame hčeri Viti. Hvala.

Povzetek

Prenos znanja o uporabi magnetnih nanodelcev iz bazičnih raziskav na področju medicine v mnoge praktične uporabe v različnih tehnologijah bo povzročil veliko potrebo po sintezi velikih količin stabilnih vodnih suspenzij magnetnih nanodelcev železovega oksida. Te se bodo kmalu široko uporabljale predvsem v tehnologijah, povezanih z magnetno separacijo, kot na primer pri čiščenju vode, pri izločanju neželenih mikroorganizmov ali toksinov iz tekočin v prehranski tehnologiji ali kot surovina pri sintezi različnih večnamenskih nanokompozitov, ki spajajo magnetne nanodelce z drugimi uporabnimi materiali ((foto)katalitskimi nanodelci, encimi itd.).

Za uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev in stabilizacijo njihovih vodnih suspenzij lahko uporabimo adsorpcijo aminokislin na njihovo površino. Velik nabor različnih aminokislin bi nam teoretično lahko omogočil spreminjanje površinskih lastnosti nanodelcev, kot je površinski naboj ali dostopnost specifičnih funkcionalnih skupin na njihovi površini, v širokem območju.

V svojem delu sem raziskala pripravo stabilnih vodnih suspenzij nanodelcev železovega oksida z adsorpcijo aminokislin, aspartanske kisline in lizina, na površino nanodelcev. Nanodelce maghemita (γ-Fe_2O_3) sem sintetizirala z obarjanjem ionov Fe^{3+}/Fe^{2+} z amoniakom iz vodnih raztopin. Z adsorpcijo aminokislin sem pripravila stabilne vodne suspenzije. Karakterizacija suspenzij je pokazala površinske lastnosti (zeta potencial, hidrodinamske velikosti), ki se niso skladale z osnovnimi mehanizmi adsorpcije aminokislin, kot jih podaja relevantna znanstvena literatura, in ki temeljijo na adsorpciji monosloja molekul. Glavni del disertacije zato predstavlja sistematična študija adsorpcije obeh aminokislin na nanodelce maghemita. Na osnovi direktne analize aminokislin v supernatantih suspenzij nanodelcev in na njihovi površini v odvisnosti od pH z metodo HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) sem zaključila, da se aminokisline adsorbirajo v obliki molekularnih asociatov. Obe aminokislini se asociirata že v sami vodni raztopini, kar sem potrdila z določanjem osmolalnosti na osnovi meritev znižanja zmrzišča. Prisotnost asociatov bistveno vpliva na lastnosti suspenzij. Izkazalo se je namreč, da je površinska plast asociiranih molekul na površini relativno nestabilna, odvisna od pH in lahko hitro razpade v prisotnosti drugih molekul. Da bi izboljšala stabilnost površinskega sloja molekul na nanodelcih, sem aminokisline med seboj poskusila zamrežiti. Z aktivacijo karboksilnih skupin s karbodiimidom (EDC) sem omogočila reakcijo z amino skupinami sosednjih aminokislin na površini nanodelcev.

Poleg adsorpcije aminokislin na predhodno sintetizirane nanodelce lahko suspenzije pripravimo tudi s sintezo nanodelcev z obarjanjem železovih ionov v prisotnosti aminokisline. Aminokislina v tem primeru pomembno vpliva na nastanek nanodelcev. Aspartanska kislina tvori koordinacijsko spojino s Fe^{3+} ioni in s tem spremeni mehanizem obarjanja.

Abstract

Recently, iron-oxide magnetic nanoparticles have been intensively studied, especially in relation to their possible applications in biomedicine. The transfer of basic knowledge gathered in this research to many practical applications in different technologies will induce the need for the synthesis of large quantities of these nanoparticles. It is expected that large quantities of stable aqueous suspensions of iron-oxide nanoparticles will soon be required in technologies related to a magnetic separation, for instance, in wastewater treatment, for the elimination of unwanted micro-organisms or toxins from beverages, or as the starting materials for the synthesis of different magnetically retractable nanocomposites. These nanocomposites will combine the magnetic nanoparticles with other functional materials ((photo)catalytic nanoparticles, enzymes, etc.).

One of the possible options for controlling the surface properties of the iron-oxide nanoparticles and for the preparation of their stable suspensions is the adsorption of amino acids onto their surfaces. In theory, a large number of amino acids would enable a change of the surface properties, such as the surface charge or the availability of specific functional groups, across a broad range.

Following this, the primary task of my thesis was the preparation of stable aqueous suspensions of iron-oxide nanoparticles using the absorption of two different amino acids, i.e., aspartic acid and lysine, onto their surfaces. The maghemite (γ-Fe_2O_3) nanoparticles were synthesized using the co-precipitation of Fe^{2+}/Fe^{3+} ions with ammonia from aqueous solutions. The adsorption of the amino acids enabled the preparation of the stable aqueous suspensions. However, characterization of the surface properties of the nanoparticles in the suspensions showed properties (zeta potential, hydrodynamic size) that cannot be explained based on basic adsorption mechanisms known from the literature. In the relevant scientific literature the adsorption of amino acids is explained based on molecular single layers. To explain the properties of the suspensions, the absorption of both amino acids onto maghemite nanoparticles was systematically studied. Direct HPLC analyses of amino acids in the supernatants of the suspensions and at the nanoparticles' surfaces showed that the amino acids absorb onto the iron-oxide nanoparticles in the form of large molecular associates. Osmolality measurements based on freezing-point depression measurements confirmed that both the amino acids form molecular associates already in the aqueous solutions. The adsorption of the amino acids in the form of molecular associates decisively influences the properties of the formed suspensions. The layer of associated molecules at the nanoparticle surfaces is relatively unstable, pH dependent and can desorb in the presence of other charged molecules. I tried to improve the stability of the surface layer with cross-linking of the adsorbed amino acids. The cross-linking was achieved with the activation of carboxyl

groups using carbodiimide (EDC) and their reaction with the amino groups.

As an alternative to the adsorption of the amino acid onto pre-synthesized nanoparticles, stable aqueous suspensions can be prepared by the precipitation of the iron-oxide nanoparticles in the presence of the amino acid. In this case, the amino acid strongly influences the nanoparticles' formation mechanism. The aspartic acid forms coordinative compounds with the Fe^{3+} ions and thus changes the course of their precipitation.

Kazalo

Slike **xv**

Tabele **xviii**

Simboli **xix**

Kratice **xxii**

1 Uvod **1**
1.1 Magnetizem 2
1.2 Magnetni nanodelci 4
1.3 Magnetni nanodelci železovega oksida 5
1.4 Sinteza nanodelcev z obarjanjem 7
1.4.1 Nastanek nevtralnega prekurzorja 7
1.4.2 Nukleacija 8
1.4.3 Rast delcev 8
1.4.4 Zorenje 8
1.5 Sinteza nanodelcev železovega oksida s soobarjanjem železovih ionov v vodnih raztopinah 9
1.6 Koloidne lastnosti nanodelcev 13
1.7 Aminokisline 18
1.8 Adsorpcija 20
1.8.1 Adsorpcija aminokislin 22
1.8.2 Adsorpcija aminokislin na nanodelce železovega oksida 24

2 Namen dela **28**

3 Materiali in metode **30**
3.1 Materiali 30
3.2 Sintezne metode 30
3.3 Karakterizacija 34

4 Rezultati **38**
4.1 Lastnosti izhodnih nanodelcev železovega oksida 39
4.2 Priprava stabilne suspenzije z adsorpcijo aminokislin na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida 42
4.3 Adsorpcija aminokislin na površino nanodelcev železovega oksida 49
4.3.1 Adsorpcija aspartanske kisline na površino nanodelcev železovega oksida 49
4.3.2 Adsorpcija lizina na površino nanodelcev železovega oksida 52
4.3.3 Sočasna adsorpcija dveh aminokislin, ASP in LYS, na nanodelce železovega oksida 53
4.4 Asociacija molekul aminokislin v vodnih raztopinah 55
4.5 Komentar adsorpcije aminokislin na nanodelce železovega oksida 57
4.6 Priprava stabilne suspenzije nanodelcev železovega oksida z dodatkom aminokisline v reakcijsko zmes med soobarjanjem železovih ionov 60

4.6.1 Vpliv dodatka aspartanske kisline na lastnosti sintetiziranih nanodelcev železovega oksida 61
4.6.1.1 Sinteza nanodelcev železovega oksida brez dodatka aspartanske kisline.....61
4.6.1.2 Sinteza nanodelcev železovega oksida z dodatkom aspartanske kisline.....67
4.6.2 Analiza procesa nastanka nanodelcev železovega oksida z obarjanjem v prisotnosti aspartanske kisline 71
4.6.3 Lastnosti suspenzije nanodelcev železovega oksida v prisotnosti aminokislin, pripravljene z obarjanjem železovih ionov iz raztopine 76
4.6.4 Komentar sinteze nanodelcev z obarjanjem železovih ionov v prisotnosti aspartanske kisline 79
4.7 Kovalentno zamreženje aminokislin na površini nanodelcev 81
4.7.1 Kovalentno zamreženje aspartanske kisline na površini nanodelcev železovega oksida 81
4.7.2 Kovalentno zamreženje aspartanske kisline in lizina na površini nanodelcev železovega oksida 83

5 Zaključki 86

6 Literatura 89

7 Bibliografija 95
Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci 95
Elaborat, predštudija, študija.....96
Prispevek na konferenci brez natisa.....96

Slike

Slika 1.1: Histerezna zanka feromagnetnega materiala [4]..... 3
Slika 1.2: Vpliv velikosti delcev na koercitivnost [5]..... 4
Slika 1.3: Odziv superparamagnetnih nanodelcev v zunanjem magnetnem polju [4]. 5
Slika 1.4: V spinelni strukturi se nahajajo kationi v tetraedrskih (rdeče) in oktaedrskih (modro) intersticijah. S puščicami so označene smeri spontane orientacije magnetnih momentov atomov. 7
Slika 1.5: LaMerjev diagram – koncentracija netopnega produkta v odvisnosti od časa obarjanja [14]. 9
Slika 1.6: Kondenzacija heksaaqua kompleksov pri procesu olacije, z eliminacijo vode in nastankom hidroksi povezav [9]. 10
Slika 1.7: Kondenzacija heksaaqua kompleksov z dvostopenjskim procesom in nastanku okso povezav [9]. 10
Slika 1.8: Posnetek magnetotaktne bakterije M.gryphiswaldense s presevnim elektronskim mikroskopom [25]. 11
Slika 1.9: Sintezni koraki nastanka kristala železovega oksida v magnetotaktni bakteriji M.gryphiswaldense, MSR-1 [25]. 12
Slika 1.10: Shematski prikaz difuznega dvosloja [26]..... 14
Slika 1.11: Električni potencial a) in koncentracija b) v odvisnosti od razdalje od površine [26]. 15
Slika 1.12: Shematski prikaz difuznega dvosloja..... 15
Slika 1.13: Energija interakcij v odvisnosti od razdalje med delcema [28]. 17
Slika 1.14: Strukturne formule aminokislin [32]..... 19
Slika 1.15: Stopnje disociacije ASP v odvisnosti od pH..... 20
Slika 1.16: Stopnje disociacije LYS v odvisnosti od pH..... 20
Slika 1.17: Primer Langmuir adsorpcijske izoterme..... 22
Slika 1.18: Naboj aminokislin v odvisnosti od pH [30]..... 23
Slika 1.19: Primer specifične adsorpcije aminokislin glicina: a) s kovalentno vezjo s površino silike in b) s koordinacijo s površino titanovega dioksida [30]. 24
Slika 1.20: Primer specifične adsorpcije s tvorbo vodikove vezi med aminokislino glicinom in površinskimi silanolnimi skupinami silike [30]. 24
Slika 1.21: Ninhidrinska reakcija..... 26
Slika 1.22: Reakcija derivatizacije aminokislin z 3-MPA/OPA.. 27
Slika 3.1: Umeritvena krivulja vodnih raztopin KCl..... 33
Slika 3.2: Potek priprave vzorca za analizo AK, adsorbiranih na nanodelcih železovega oksida, z ionsko izmenjevalno kromatografijo. 37
Slika 4.1: a) TEM posnetek sintetiziranih nanodelcev NDŽO-RT in b) porazdelitev njihove velikosti. 39
Slika 4.2: Rentgenski difraktogram nanodelcev NDŽO. Ukloni v difraktogramu so indeksirani glede na spinelno strukturo. 40
Slika 4.3: Ramanski spekter nanodelcev železovega oksida NDŽO-RT. 41
Slika 4.4: Magnetizacija nanodelcev NDŽO-RT v odvisnosti od magnetnega polja. Meritev je bila opravljena pri sobni temperaturi. 42
Slika 4.5: Številska porazdelitev hidrodinamskih premerov nanodelcev NDŽO-ASP v suspenziji (pH = 11, 2 mg/mL). 44

Slika 4.6: Številska porazdelitev hidrodinamskih premerov nanodelcev NDŽO-LYS v supenziji (pH = 4, 2 mg/mL).....45
Slika 4.7: Spreminjanje zeta potenciala s pH vrednostjo suspenzij NDŽO-ASP in NDŽO-LYS ter suspenzije NDŽO-RT brez adsorbiranih AK. 45
Slika 4.8: Shematski prikaz vezave ASP (a, b) in LYS (c) na površino nanodelcev maghemita.....46
Slika 4.9: Shematski prikaz molekulskih asociatov na površini nanodelcev maghemita.....47
Slika 4.10: Gostota adsorbiranih molekul ASP na površini nanodelcev NDŽO v odvisnosti od koncentracije ASP v suspenziji pri različnih pH vrednostih.....50
Slika 4.11: Zeta potencial suspenzij NDŽO z ASP v odvisnosti od pH pri različnih masnih razmerjih med ASP/ NDŽO.....51
Slika 4.12: Gostota adsorbiranih molekul LYS na površini nanodelcev NDŽO v odvisnosti od koncentracije LYS v suspenziji pri različnih pH vrednostih.....52
Slika 4.13: Zeta potencial suspenzij NDŽO z adsorbiranim LYS v odvisnosti od pH pri različnih masnih razmerjih med LYS/ NDŽO. 53
Slika 4.14: Primerjava meritev zeta potenciala nanodelcev železovega oksida v odvisnosti od pH vodne suspenzije za nanodelce z adsorbirano AK pred in po izpostavitvi PBS.....60
Slika 4.15: Difraktogrami izbranih nanodelcev, oborjenih iz raztopin Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov brez ASP ((a) NDŽO-RT, (b) NDŽO-RT-80, (c) NDŽO-RT-HT-160, (d) NDŽO-80).....65
Slika 4.16: TEM posnetki nanodelcev, oborjenih iz raztopin Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov brez dodane ASP ((a) NDŽO-RT, (b) NDŽO-RT-80, (c) NDŽO-RT-HT-160, (d) NDŽO-RT-HT-200 (e) NDŽO-80, (f) NDŽO-RT-2 step). 66
Slika 4.17: Magnetizacija nanodelcev v odvisnosti od magnetnega polja, izmerjena pri sobni temperaturi (a) NDŽO-RT, (b) NDŽO-RT-HT-200, (c) NDŽO-RT-2step, (d) NDŽO-Asp1.5-RT.....66
Slika 4.18: TEM posnetki nanodelcev, oborjenih iz raztopine železovih ionov v prisotnosti ASP: a)NDŽO-ASP12-RT, b)NDŽO-ASP1.5-RT-80 in c) NDŽO-ASP1.5-HT-200.....68
Slika 4.19: (a) TEM posnetek nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT, sintetiziranih z obarjanjem v prisotnosti ASP (ASP/Fe^{3+} = 1,5) pri sobni temperaturi, (b) primerjava porazdelitve velikosti nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi v prisotnosti ASP (NDŽO-ASP1.5-RT) in brez ASP (NDŽO-RT).....69
Slika 4.20: Difraktogrami izbranih nanodelcev, oborjenih iz raztopin Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov v prisotnosti ASP ((a) NDŽO-ASP12-RT, (b) NDŽO-ASP1.5-RT, (c) NDŽO-ASP1.5-RT-80, (d) NDŽO-ASP1.5-RT-HT160 in (e) NDŽO-ASP1.5-80).....70
Slika 4.21: a) Raztopina Fe^{2+}/Fe^{3+} sulfatov pred dodatkom ASP in b) po dodatku ASP.....72
Slika 4.22: Spektra FT-IR vodnih raztopin ASP pri pH = 11 (a) in pH = 2,2 (b) ter in-situ FT-IR spektri, posneti v različnih stopnjah procesa obarjanja: 1 minuto po dodatku raztopine ASP v raztopino železovih ionov pri pH = 2,2 (c), 28 minut po dodatku raztopine ASP v raztopino železovih ionov pri pH = 2,08 (d), 2 minuti po dodatku amonijaka (pH = 11) (e) in ob koncu sinteze 32 minut po dodatku amonijaka (pH = 11) (f).....73
Slika 4.23: TEM posnetki in pripadajoče elektronske difrakcije produktov obarjanja s postopnim dodajanjem amonijaka raztopini železovih ionov brez dodane ASP. Vzorci so bili odvzeti pri različnih vrednostih pH: (a) pH = 5,1 (b) pH = 7,4 in (c) pH = 8,4. Pripadajoče elektronske difrakcije so indeksirane glede na strukture getita (G), lepidokrocita (L) in spinela (S).....74
Slika 4.24: Primerjava difraktogramov produktov obarjanja s postopnim dodajanjem amonijaka raztopini železovih ionov: (a) pH = 7,4 brez dodane ASP, (b) pH = 8,4 brez dodane ASP, (c) pH = 7,4

z ASP in (d) pH = 8,4 z ASP. Difraktogrami so indeksirani glede na strukture getita (G), lepidokrocita (L) in spinela (S). ... 75
Slika 4.25: TEM posnetki in elektronske difrakcije materiala, oborjenega iz raztopine železovih ionov v prisotnosti ASP s postopnim dodajanjem raztopine amonijaka: (a) pH = 2,07 (pred dodatkom amonijaka), (b) pH = 7,4, (c) pH = 8,4 in (d) pH = 11. 76
Slika 4.26: Povprečen hidrodinamski premer nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT. 77
Slika 4.27: TGA krivulja nanodelcev železovega oksida brez prisotnosti AK(NDŽO-RT) in nanodelcev z adsorbiranimi AK (NDŽO-ASP1.5-RT). 78
Slika 4.28: Številska porazdelitev hidrodinamskih premerov nanodelcev NDŽO-ASP-E. 82
Slika 4.29: Primerjava meritev zeta potenciala v odvisnosti od pH vodne suspenzije za nanodelce železovega oksida z adsorbiranimi AK pred (NDŽO-ASP) in po zamreženju (NDŽO-ASP-E). 83
Slika 4.30: Primerjava meritev zeta potenciala nanodelcev železovega oksida v odvisnosti od pH vodne suspenzije za nanodelce z adsorbiranimi AK pred (NDŽO-ASP-LYS) in po zamreženju (NDŽO-ASP-LYS-E). 85

Tabele

Tabela 4.1: Lastnosti suspenzij z adsorbiranimi aminokislinami (ξ-potencial, hidrodinamski premer d_{DLS} in koncentracije aminokislin v supernatantu in na nanodelcih, izmerjene s HPLC metodo). 48
Tabela 4.2: Izmerjena koncentracija AK v supernatantu suspenzij nanodelcev NDŽO, adsorbiranih posamič (ASP, LYS) in istočasno (ASP+LYS) na površino nanodelcev NDŽO. Celokupna koncentracija AK v suspenziji je bila 3,2 mg/mL in masno razmerje AK / NDŽO = 1,44. 55
Tabela 4.3: Osmolalnost in stopnja asociacije za raztopine ASP in LYS ter suspenzije nanodelcev z adsorbiranimi ASP in LYS. ..57
Tabela 4.4: Eksperimentalni pogoji, uporabljeni pri sintezi nanodelcev železovega oksida brez dodatka ASP, in njihove lastnosti. 63
Tabela 4.5: Eksperimentalni pogoji, uporabljeni pri sintezi nanodelcev v prisotnosti ASP. 70
Tabela 4.6: Koncentracije ASP in LYS, izmerjene z metodo HPLC po njunem zamreženju in naknadni hidrolizi dobljenega peptida. ...84
Tabela 4.7: Izmerjene koncentracije ASP in LYS v supernatantu suspenzije po zamreženju in po hidrolizi. 84

Simboli

B	.	magnetna indukcija
H	.	jakost magnetnega polja
μ_0	.	permeabilnost praznega prostora
M	.	magnetizacija
m	.	magnetni moment
m_s	.	masa snovi
χ	.	magnetna susceptibilnost
M_S	.	nasičena magnetizacija
M_R	.	remanentna magnetizacija
H_C	.	koercitivnost
Ψ_0	.	električni potencial na površini
Ψ	.	potencial v oddaljenosti x od površine
n_+n_-	.	število pozitivnih in negativnih ionov na volumsko enoto
ρ	.	gostota naboja v točki, kjer je potencial Ψ
κ	.	Debyejeva dolžina
μ	.	elektroforetska mobilnost
v	.	hitrost

E	.	električno polje
ξ	.	zeta potencial
η	.	viskoznost
ε	.	dielektričnost
E_g	.	energija gravitacijskega polja
$\Delta\rho$	.	razlika gostot delcev in medija
g	.	gravitacijski pospešek
h	.	višina vzorca
V_A	.	energija van der Waalsove sile
H	.	razdalja med enakima delcema
A	.	Hamakerjeva konstanta
V_T	.	celokupna energija interakcije
V_R	.	energija odbojnih sil
S	.	površina adsorbenta
X	.	neadsorbiran adsorbat
$S\text{-}X$	.	adsorbat v adsorbiranem stanju
K_{ads}	.	konstanta ravnotežja
ΔG_{ads}	.	prosta Gibbsova energija adsorpcije
X_{aq}	.	ravnotežna koncentracija adsorbata
Γ_x	.	masa adsorbata/masa adsorbenta
Γ_{max}	.	koncentracija adsorbata, potrebna za nasičenje površine nanodelcev

Kratice

AK	. . .	aminokisline
ASP	. . .	aspartanska kislina
LYS	. . .	lizin
NDŽO-ASP	. . .	nanodelci železovega oksida z adsorbirano aspartansko kislino
NDŽO-LYS	. . .	nanodelci železovega oksida z adsorbiranim lizinom
NDŽO-RT	. . .	nanodelci železovega oksida, oborjeni z enkratnim, hitrim dodatkom amonijakalne raztopine raztopini železovih ionov
NDŽO-RT-2step	. . .	nanodelci železovega oksida, sintetizirani z dodatkom hidroksida v dveh stopnjah
NDŽO-80	. . .	nanodelci železovega oksida, sintetizirani pri povišani temperaturi soobarjanja in povišani temperaturi staranja nanodelcev
NDŽO-RT-80	. . .	nanodelci železovega oksida, sintetizirani s soobarjanjem pri sobni temperaturi in povišani temperaturi staranja nanodelcev
NDŽO-RT-HT-160	. . .	nanodelci železovega oksida po hidrotermalni obdelavi nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi za 30 minut pri 160 °C
NDŽO-RT-HT-200	. . .	nanodelci železovega oksida po hidrotermalni obdelavi nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi za 30 minut pri 200 °C
NDŽO-ASP1,5-RT	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP, oborjeni z enkratnim, hitrim dodatkom amonijakalne raztopine raztopini železovih ionov
NDŽO-ASP1,5-RT-80	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP, sintetizirani s soobarjanjem pri sobni temperaturi in povišani temperaturi staranja nanodelcev
NDŽO-ASP1,5-RT-HT160	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP po hidrotermalni obdelavi nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi za 30 minut pri 160 °C
NDŽO-ASP1,5-RT-HT200	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP po hidrotermalni obdelavi nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi za 30 minut pri 200 °C
NDŽO-ASP1,5-80	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP, sintetizirani pri povišani temperaturi soobarjanja in povišani temperaturi staranja nanodelcev

NDŽO-ASP1,5-RT-2step	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP, sintetizirani z dodatkom hidroksida v dveh stopnjah
NDŽO-ASP-E	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP, zamreženi s kemijsko vezjo
NDŽO-ASP-LYS	. . .	nanodelci železovega oksida z adsorbiranima AK ASP in LYS
NDŽO-ASP-LYS-E	. . .	nanodelci železovega oksida z ASP in LYS, zamreženi s kemijsko vezjo

Poglavje 1

Uvod

Stabilne vodne suspenzije (superpara) magnetnih nanodelcev postajajo vse bolj pomembne tudi v praksi. Razen v medicini, kjer se hitro razvijajo različne nove tehnike zdravljenja in diagnostike, osnovane na uporabi magnetnih nanodelcev, se pričakuje tudi njihova masovna uporaba v različnih tehnologijah. Posebno v povezavi z magnetno separacijo, na primer pri čiščenju vode v okoljskih tehnologijah, za izločanje neželenih snovi iz tekočin v prehranskih tehnologijah in v mnogih drugih podobnih tehnologijah bodo potrebne velike količine vodnih suspenzij nanodelcev. Suspenzije magnetnih nanodelcev tudi pogosto služijo kot izhodne surovine pri sintezi različnih nanokompozitov. Pri masovni proizvodnji je ključna enostavna sinteza suspenzije, okoljska sprejemljivost tehnologije in pa predvsem nizka cena.

Nanodelci se po sintezi zaradi svoje zelo velike površine običajno močno aglomerirajo. Da preprečimo aglomeracijo in pripravimo stabilno suspenzijo, je potrebno zagotoviti odbojne sile med nanodelci. To običajno dosežemo z vezavo določenih molekul na njihovo površino. Molekule, vezane na površini nanodelcev, tudi v največji meri določajo površinske lastnosti nanodelcev, kot je hidrofilnost/hidrofobnost, površinski naboj v suspenziji in prisotnost specifičnih funkcionalnih skupin na njihovi površini. Površinski sloj molekul na nanodelcih tudi pomembno vpliva na njihove interakcije z biološkimi sistemi, na primer na obnašanje nanodelcev po vbrizganju v krvni obtok.

V svojem delu sem raziskala možnost uporabe aminokislin (AK), aspartanske kisline (ASP) in lizina (LYS) za pripravo stabilnih vodnih suspenzij magnetnih nanodelcev železovega oksida. V literaturi je bilo relativno veliko podatkov o adsorpciji AK, vendar pa so si bili podatki o vplivu na površinske lastnosti nanodelcev pogosto nasprotujoči.

AK so nestrupene in relativno poceni, kar pride do izraza predvsem pri masovni proizvodnji suspenzij. Predpostavili smo, da bi lahko z izbiro različnih AK načrtovano spreminjali površinske lastnosti nanodelcev, na primer površinski naboj in dostopnost specifičnih funkcionalnih skupin. Poznavanje mehanizmov adsorpcije je nujno za uporabo AK pri pripravi stabilnih vodnih suspenzij nanodelcev z načrtovanimi površinskimi lastnostmi. V povezavi z uporabo v medicini je vezava AK na magnetne nanodelce pomembna tudi za njihovo možno dostavo v celice *in vivo* pri zdravljenju nekaterih bolezni. Uporaba AK na površini nanodelcev pa bi bila lahko zelo pomembna tudi na splošno pri uporabah nanodelcev z direktnim injiciranjem nanodelcev v krvni obtok, saj se pričakuje, da bi lahko nanodelci s površinskim slojem AK izkazovali zelo dolge zadrževalne čase v krvnem obtoku. Adsorpcija AK na površino nanodelcev je pomembna tudi v kontekstu splošne Bernalove hipoteze o nastanku življenja na Zemlji, ki predpostavlja nastanek kompleksnih beljakovin s polimerizacijo AK, adsorbiranih na minerale, kot je železov oksid. Razumevanje interakcij AK s površino nanodelcev je pomembno tudi za

razumevanje interakcij nanodelcev z beljakovinami, kar pa je pomembno tako pri uporabi nanodelcev v medicini kot tudi za razumevanje njihove potencialne toksičnosti.

Stabilne vodne suspenzije nanodelcev lahko pripravimo z adsorpcijo AK na površino predhodno sintetiziranih nanodelcev ali s sintezo nanodelcev s soobarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodnih raztopin v prisotnosti AK. Če sintetiziramo nanodelce v prisotnosti AK, lahko pričakujemo, da bo AK vplivala na mehanizme njihovega nastanka. Znano je, da različni živi organizmi, na primer magnetotaktične bakterije, uporabljajo specifične AK in polipeptide za uravnavanje lastnosti anorganskih materialov, kot je železov oksid, pri njihovem nastanku z biomineralizacijo. Vpliv AK na nastanek nanodelcev je bil tako pogosta tema raziskav v smislu biomimetske sinteze nanodelcev.

1.1 Magnetizem

Magnetni moment atoma izvira iz gibanja elektrona okoli jedra. Magnetna momenta dveh sparjenih elektronov v posamezni orbitali se med seboj izničita, če pa je v orbitali le en elektron, pa ta povzroči, da izkazuje tak atom magnetni moment. Posebno nekateri elementi prehoda, kot so Ni, Fe in Co, izkazujejo zelo velike magnetne momente, saj imajo več orbital z nesparjenimi elektroni [1].

Če izpostavimo magnetni material magnetnemu polju H, magnetni moment atoma v materialu prispeva k magnetni indukciji B:

$$B = \mu_0(H + M), \tag{1.1}$$

kjer je μ_0 permeabilnost v praznem prostoru in M magnetizacija, ki je izražena kot magnetni moment (m) na maso snovi (m_s):

$$M = \frac{m}{m_s} \tag{1.2}$$

Kako se določen material odziva v magnetnem polju, je odvisno od njegove atomske sestave, strukture in temperature. Tako lahko materiale razvrstimo v različne skupine glede na magnetno susceptibilnost χ, ki definira razmerje med inducirano magnetizacijo in jakostjo magnetnega polja:

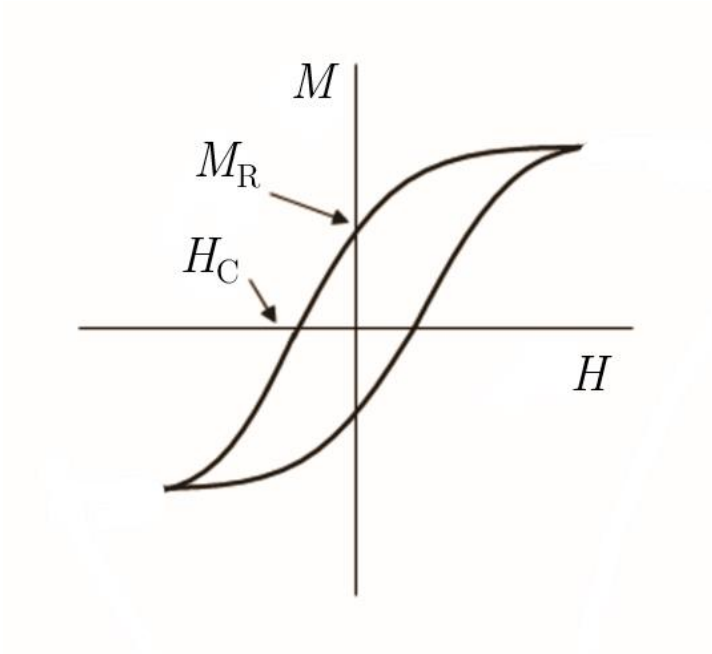
$$\chi = \frac{M}{H} \tag{1.3}$$

Diamagnetni materiali vsebujejo le atome s sparjenimi elektroni v orbitalah. Njihova susceptibilnost je majhna in negativna. Paramagnetni materiali vsebujejo tudi atome z nesparjenimi elektroni in izkazujejo majhno, pozitivno susceptibilnost. Diamagnetnim in paramagnetnim materialom se M linearno spreminja

s H (pri čemer je χ konstantna). V paramagnetnem materialu magnetizacija narašča linearno z naraščajočim magnetnim poljem, saj se vse večji delež magnetnih momentov posameznih atomov usmeri v smer zunanjega polja. Ko magnetno polje izklopimo, se magnetni momenti atomov zopet naključno usmerijo in magnetizacija pade na 0.

Kot magnetne materiale običajno razumevamo feromagnetne ali ferimagnetne materiale. Pri teh se zaradi medsebojnih magnetnih interakcij magnetni atomi spontano usmerijo v določeno smer. Magnetna urejenost v fero/ferimagnetnih materialih je odvisna od temperature; pri določeni povišani temperaturi, t. i. Curiejevi temperaturi, preidejo v paramagnetno stanje. Zaradi težnje po minimiziranju magnetostatske energije se v velikem kosu magnetnega materiala vzpostavijo diskretna področja z enotno urejenostjo magnetnih momentov atomov, ki jih imenujemo magnetne domene. Domene so ločene z domenskimi stenami. Usmeritve magnetnih momentov posameznih domen večjega kosa materiala so usmerjene tako, da je celotno magnetno polje minimalno. Večdomenski materiali po nastanku običajno ne kažejo spontane magnetizacije. Magnetenje feri/feromagnetnega materiala opisuje histerezna zanka (slika 1.1). Z naraščanjem zunanjega magnetnega polja se magnetni momenti domen v materialu postopoma uredijo v smeri polja, običajno s tem, da se premikajo domenske stene. Ko so vsi magnetni momenti usmerjeni v smer zunanjega magnetnega polja, je material v nasičenju in izkazuje nasičeno magnetizacijo M_S. Z zmanjševanjem magnetnega polja se magnetni momenti ne relaksirajo povsem, zato izkazuje material po izpostavitvi zunanjemu magnetnemu polju določeno magnetizacijo, ki jo imenujemo remanentna magnetizacija ali remanenca, M_R kot je označena na sliki 1.1. Remanentna magnetizacija M_R označuje vrednost magnetizacije, ko je $H = 0$. Jakost polja, ki ga potrebujemo, da material razmagnetimo, imenujemo koercitivnost, H_C (slika 1.1) [2][3].

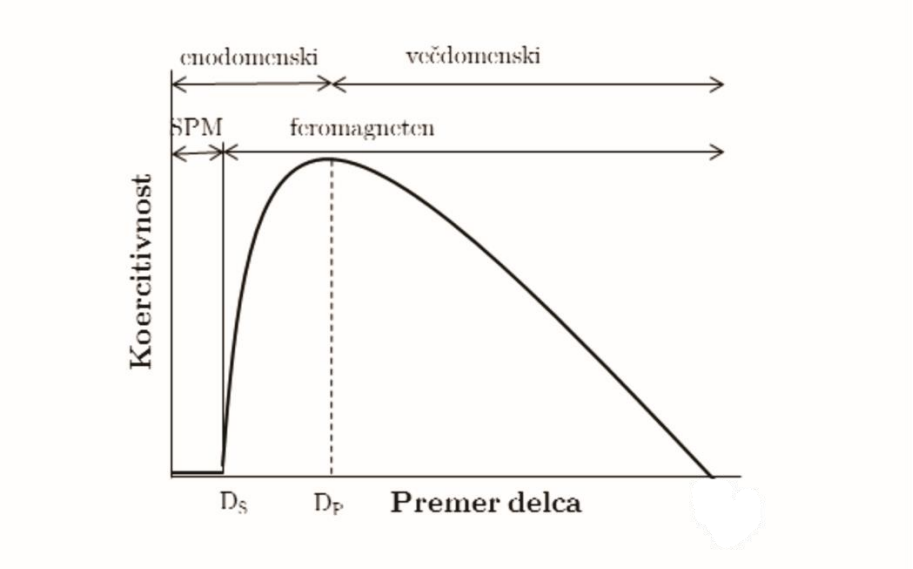
.



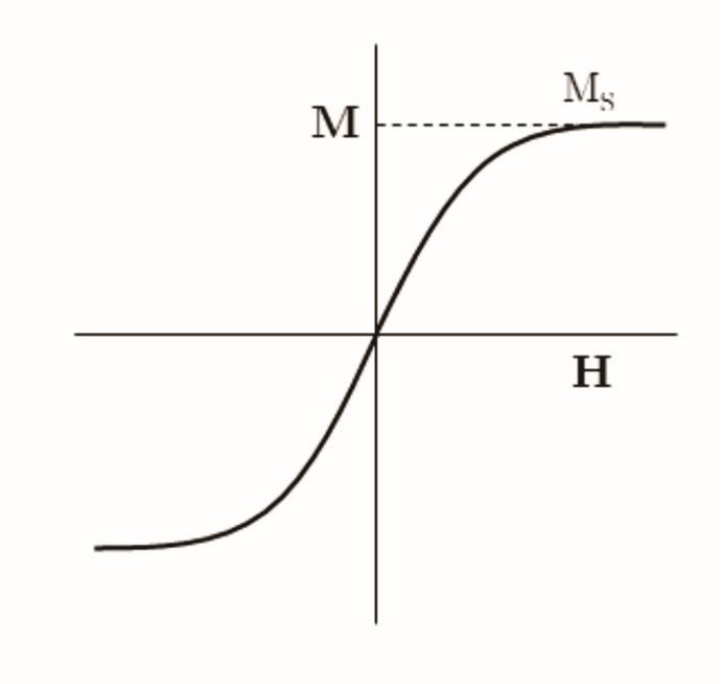
Slika 1.1: Histerezna zanka feromagnetnega materiala [4].

1.2 Magnetni nanodelci

Če pripravimo magnetni material v obliki majhnih delcev, se mu magnetne lastnosti spremenijo. Vpliv velikosti delcev na magnetne lastnosti je najbolj očiten pri spremembi koercitivnosti (H_C). Z zmanjševanjem velikosti delcev koercitivnost najprej narašča, doseže maksimalno vrednost in potem pade na ničnо vrednost (slika 1.2). Večji, večdomenski delci izkazujejo relativno nizko H_C. Majhne vrednosti koercitivnosti večjih delcev so povezane z relativno majhno energijo, ki jo delec potrebuje za premikanje domenskih sten. Velikost magnetne domene je odvisna od lastnosti materiala, običajno pa je reda velikosti nekaj 100 nm. Ko velikost delcev zmanjšamo do te mere, da se znotraj posameznega delca ne more vzpostaviti več domen, nastanejo enodomenski delci kot prikazuje slika 1.2. Za spremembo usmeritve magnetizacije je potrebno magnetne momente celotnega enodomenskega delca obrniti v nasprotno smer (ali pa fizično obrniti delec), kar zahteva veliko energijo. Zato izkazujejo enodomenski delci največjo H_C. Če pa velikost delcev nadalje zmanjšujemo, Hc nenadno pade na 0. Pri tej kritični velikosti D_S, ki je običajno 10–20 nm, magnetni delci postanejo superparamagnetni. V superparamagnetnem nanodelcu ostanejo magnetni momenti atomov urejeni, medtem ko se usmeritev magnetnega momenta celotnega nanodelca hitro spreminja pod vplivom termične energije. V odsotnosti magnetnega polja superparamagnetni nanodelci ne izkazujejo magnetizacije, njihova remanenca je enaka nič. Dobimo sigmoidno obliko krivulje M–H, ki pa ne izkazuje histereze, kot prikazuje slika 1.3 [4], [5], [6].



Slika 1.2: Vpliv velikosti delcev na koercitivnost [5].



Slika 1.3: Odziv superparamagnetnih nanodelcev v zunanjem magnetnem polju [4].

Z manjšanjem velikosti se nanodelcem manjša tudi nasičena magnetizacija. Zaradi povečanja razmerja med površino in volumnom je z manjšanjem nanodelcev vse večji delež magnetnih atomov na površini nanodelcev. Ker površinski atomi nimajo popolne okolice drugih atomov, usmeritev njihovih magnetnih momentov ni poravnana z usmeritvijo momentov v notranjosti nanodelca. V približku lahko rečemo, da je na površini delcev tanek sloj materiala, ki ni magneten, t. i. magnetno mrtev sloj. Debelina magnetno mrtvega sloja je približno med 0,5 in 1 nm. Zaradi nemagnetnega površinskega sloja je M_S nanodelcev nižja od M_S volumenskega materiala ($M_{S(BULK)}$). Magnetizacija magnetnega nanodelca M velikosti d je torej odvisna od magnetizacije materiala (M_{BULK}) in širine nemagnetnega sloja t v skladu z enačbo 1.4 [7].

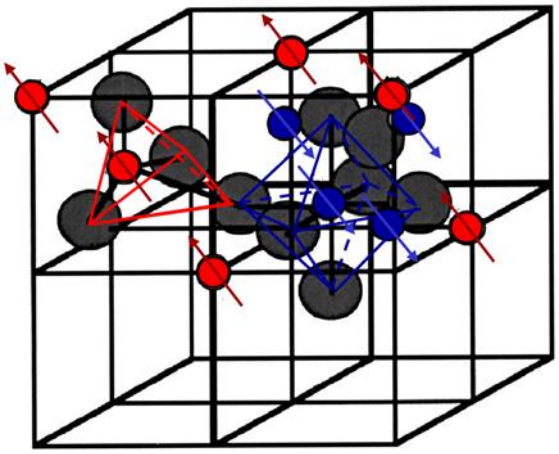
$$M = M_{bulk}\left(1 - 6\frac{t}{d}\right) \qquad (1.4)$$

1.3 Magnetni nanodelci železovega oksida

V zadnjem času so se predvsem za razvoj novih tehnik zdravljenja in diagnostike v medicini uveljavili magnetni nanodelci železovega oksida s spinelno strukturo. Spinelno strukturo izkazujeta dva železova oksida, magnetit (Fe_3O_4) in maghemit (γ-Fe_2O_3), ki ju uvrščamo v skupino kubičnih feritov. Kubični feriti izkazujejo spinelno strukturo (imenovano po mineralu spinelu, $MgAl_2O_4$) s splošno formulo AB_2O_4 (slika 1.4). Osnovna celica je zgrajena iz 8 molekulskih enot AB_2O_4. Kisikovi anioni gradijo kubični najgostejši zlog, kationi pa zasedejo intersticije v kisikovi podmreži. Med kisikovimi ioni je 32 oktaedrskih B in 64 tetraedrskih A intersticijskih mest. Spinele lahko tako zapišemo s strukturno formulo $(A)[B]_2O_4$, kjer označujejo običajni oklepaji tetraedrska in oglati oklepaji oktaedrska mesta. Ločimo normalne in inverzne spinele. Pri normalnih spinelih se trivalentni kationi vgradijo na oktaedrska mesta, na tetraedrska mesta pa dvovalentni kationi ($(A^{2+})[B^{3+}]_2O_4$), medtem ko so pri inverznih spinelih tetraedrska mesta zasedena s trivalentnimi kationi, oktaedrska mesta pa z dvovalentnimi in trovalentnimi kationi ($B^{3+})[A^{2+}B^{3+}]O_4$). Maghemit (γ-Fe_2O_3) izkazuje spinelno strukturo, vendar vsebuje samo trovalentne železove ione, elektronevtralnost celice pa se ohranja z nastankom dodatnih vrzeli na oktaedrskih mestih ($(Fe^{3+})[Fe^{3+}_{5/3}\square_{1/3}]O_4$, kjer predstavlja $\square$ vrzeli)[8].

Feriti kot tudi ostali oksidni materiali izkazujejo ferimagnetizem. Kot je bilo pojasnjeno zgoraj, so magnetni ioni v spinelnih feritih razvrščeni v dve podmreži, tetraedrsko koordinirano podmrežo (A) in oktaedrsko koordinirano podmrežo [B]. Magnetni moment spinelnega ferita izvira iz dejstva, da se magnetni momenti atomov v posamezni kationski podmreži usmerijo v isto smer, pri čemer pa so magnetni momenti v podmreži (A) usmerjeni nasprotno od magnetnih momentov v podmreži [B]. Magnetni moment osnovne celice ferita je posledica razlike v magnetnih momentih obeh podmrež [2] (slika 1.4). Podmreža [B] v osnovi vsebuje dvakrat več atomov od podmreže (A), magnetni moment pa je seveda odvisen predvsem od tega, katere atome vsebujeta obe podmreži. Ionski magnetni moment Fe(III) izvira predvsem iz njegovih petih nesparjenih elektronov, medtem ko ima Fe(II) 4 nesparjene elektrone. Magnetni moment magnetita z inverzno spinelno strukturo ($(Fe^{3+})[Fe^{2+}Fe^{3+}]O_4$) je tako okoli 4 Bohrove magnetone na enoto formule, nasičena magnetizacija volumenskega magnetita je 92 Am^2/kg. Maghemit ($(Fe^{3+})[Fe^{3+}_{5/3}\square_{1/3}]O_4$) izkazuje moment okoli 3.3 Bohrove magnetone na enoto formule in zato na nekoliko nižjo nasičeno magnetizacijo, okoli 79 Am^2/kg [8]. Če pripravimo magnetit v obliki majhnih nanodelcev, se na zraku običajno oksidira v maghemit [9].

V biomedicini se uporabljajo predvsem nanodelci železovega oksida maghemita, saj ima vse atome železa v oksidirani obliki, medtem ko imajo nanodelci magnetita 1/3 atomov železa v obliki Fe^{2+}, ki za *in vivo* medicinsko uporabo ni zaželen. Znano je, da sproščeni Fe^{2+} ioni sodelujejo v Fentonovi reakciji in tvorijo reaktiven hidroksilni radikal $HO^{\cdot}$, ki povzroča poškodbe DNK in oksidacijo beljakovin [10]–[12].



Slika 1.4: V spinelni strukturi se nahajajo kationi v tetraedrskih (rdeče) in oktaedrskih (modro) intersticijah. S puščicami so označene smeri spontane orientacije magnetnih momentov atomov.

Prednost železovega oksida kot materiala za magnetne nanodelce je predvsem v nizki ceni in relativno enostavni sintezi. Pri uporabi v medicini je pomembna njihova nestrupenost. Nanodelci železovega oksida maghemita so bili pri ameriškem regulatornem organu (FDA – American food and Drug Administration) registrirani za *in vivo* medicinsko uporabo. S tem imajo zelo veliko prednost pred ostalimi materiali v vseh medicinskih uporabah [13].

Magnetni nanodelci železovih oksidov se v medicini uporabljajo za zdravljenje anemij, pri zdravljenju s hipertermijo, pri slikanju z magnetno resonanco, ciljnem dostavljanju zdravilnih učinkovin. Pomembna je tudi uporaba nanodelcev v tehniki, kjer se uporabljajo pri magnetni separaciji, čiščenju vode, v prehranski industriji, uporabi nanodelcev za sintezo različnih nanokompozitov.

1.4 Sinteza nanodelcev z obarjanjem

V svojem delu sem sintetizirala magnetne nanodelce železovega oksida z metodo soobarjanja Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodne raztopine.

Do obarjanja pride, ko v raztopini s kemijsko reakcijo povzročimo prenasičenje netopnega produkta. V mojem primeru v raztopino železovih ionov dodam hidroksid. Kot posledica kemijske reakcije nastanejo netopni železovi hidroksidi. V splošnem lahko proces obarjanja razdelimo na 4 kinetične stopnje: 1. nastanek nevtralnega prekurzorja, 2. nukleacija trdnih delcev, 3. rast delcev in 4. zorenje.

1.4.1 Nastanek nevtralnega prekurzorja

Nevtralni prekurzor $[M(OH)_z(OH_2)_{N-z}]^0$ nastane z reakcijo kationov s hidroksilnimi ioni in molekulami vode v vodni raztopini. V splošnem lahko nastane nevtralni prekurzor z dodajanjem hidroksida h kationskemu kompleksu, s termičnim razpadom ali s termično hidrolizo. Nastanek nevtralnega prekurzorja je na sliki 1.5 prikazan na območju I.[14].

1.4.2 **Nukleacija**

Naslednja stopnja je nukleacija, kjer nastanejo pri procesu kondenzacije nevtralnega prekurzorja zametki trdne snovi, jedra ali nukleusi. Gonilna sila obarjanja je stopnja prenasičenja, ki je definirana kot razmerje med koncentracijo netopnega produkta v danem trenutku, C_L, in topnostjo tega produkta v raztopini, C_S. Netopen produkt nastaja s kondenzacijo nevtralnega prekurzorja, ki je odvisna od njegove koncentracije in reakcijskih pogojev. Najprej nastanejo majhni delci produkta, t. i. embrii, ki so še tako majhni, da so termodinamsko nestabilni in je velika verjetnost, da se bodo s časom raztopili. S časom reakcije velikost embrijev raste (stopnja II na sliki 1.5) in ko dosežejo določeno velikost, postanejo termodinamsko stabilni delci. Najmanjše, termodinamsko stabilne delce trdne snovi, ki nastane kot posledica obarjanja, imenujemo jedra ali nukleusi. Verjetnost za njihovo rast je večja od verjetnosti, da se raztopijo. Nukleusi se lahko tvorijo v raztopini pri procesu homogene nukleacije ali pa nastanejo z rastjo produkta na določeni površini pri heterogeni nukleaciji. V primeru prikaza naraščanja koncentracije produkta v odvisnosti od časa na sliki 1.5 pride do nukleacije pri kritični vrednosti (C_{min}) (območju III). Kljub temu, da se začne produkt izločati, njegovo prenasičenje zaradi potekajočih kemijskih reakcij še kar narašča. V področju III sočasno nadalje poteka hitra nukleacija in rast nukleusov. Z zmanjševanjem količine reaktantov postane hitrost izločanja produkta večja od hitrosti njegovega nastanka. Prenasičenje produkta se zmanjša in ko pade pod C_{min}, se nukleacija ustavi [14].

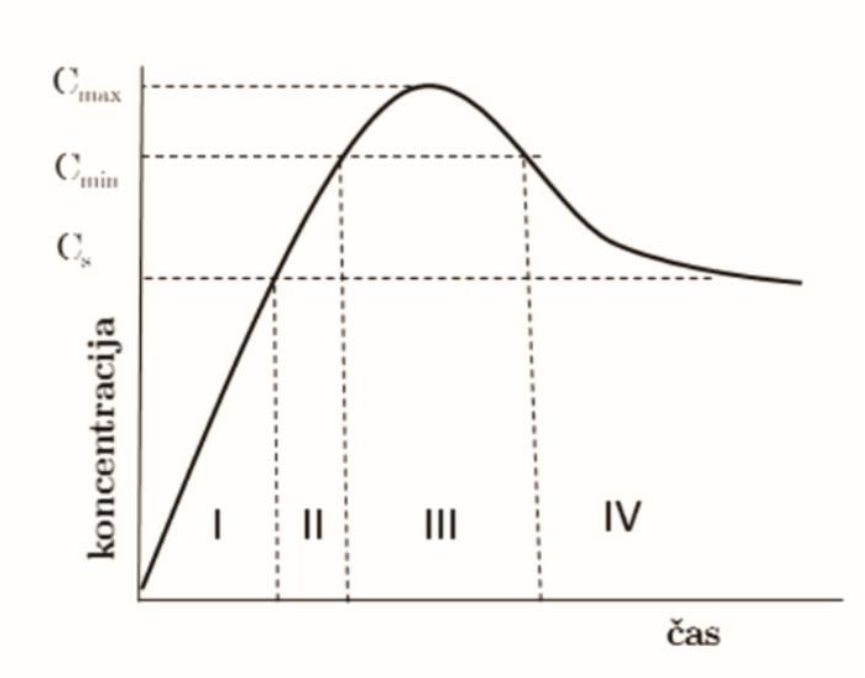
1.4.3 **Rast delcev**

Že prvi nukleusi, ki nastanejo, ko prenasičenje produkta preseže C_{min}, rastejo. V območju III se tako prekrivata procesa nukleacije in rasti. Ko pa prenasičenje pade pod C_{min}, je možna samo še rast, dokler se padajoča koncentracija produkta ne izenači z njegovo topnostjo (področje IV, slika 1.5). V tej stopnji je koncentracija prekurzorja višja od koncentracije C_s, vendar prenizka za nastanek novih jeder (pod C_{min}). Končna velikost delcev je odvisna od števila nastalih jeder in količine snovi, ki je na voljo za njihovo rast. Tako s sočasnim, hitrim nastankom jeder, kjer je faza rasti ločena od nukleacije, dobimo monodisperzne delce z ozko porazdelitvijo velikosti. Monodisperzni delci nastanejo, kadar koncentracija prekurzorja po nastanku jeder pade pod C_{min} in med fazo rasti ne preseže omenjene koncentracije. V primeru, ko pa se faza nukleacije in rasti prekrivata, pa dobimo polidisperzne delce [14].

1.4.4 **Zorenje**

Nastanek trdne faze je zaključen, ko zmanjka reaktantov. Vendar nastali delci v reakcijski raztopini niso v ravnotežnem stanju in nimajo definirane končne kristalne strukture, velikosti in morfologije. V fazi zorenja tako delci preidejo v termodinamsko stabilno stanje. Proces zorenja lahko traja od nekaj ur do nekaj mesecev. Delci bodisi prekristalizirajo v termodinamsko stabilnejšo modifikacijo kristalne strukture bodisi spremenijo morfologijo. Delci, ki so manjši od kritične velikosti in raztopina zanje ni nasičena, se raztapljajo, medtem ko večji delci rastejo na račun manjših delcev. Rast večjih delcev na račun

manjših, ki se raztapljajo, imenujemo sekundarna rekristalizacija ali Ostwaldova pogrobitev [14].

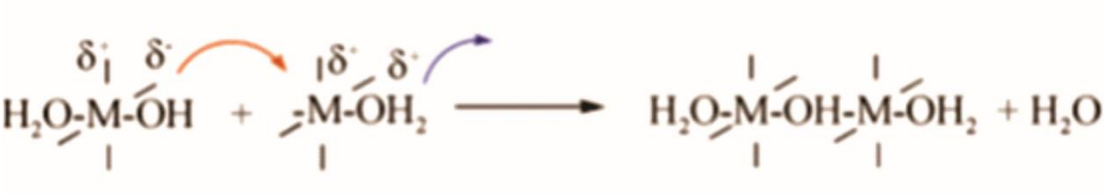


Slika 1.5: LaMerjev diagram – koncentracija netopnega produkta v odvisnosti od časa obarjanja [14].

1.5 Sinteza nanodelcev železovega oksida s soobarjanjem železovih ionov v vodnih raztopinah

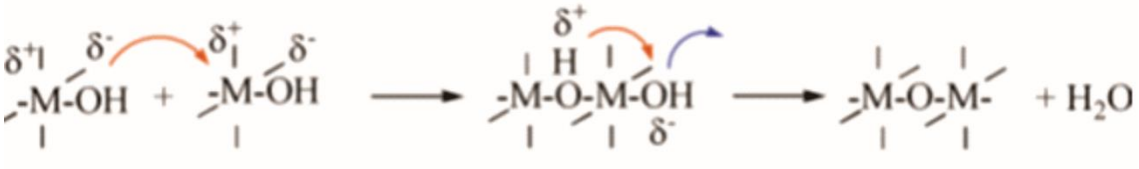
Nanodelci železovega oksida maghemita nastanejo med obarjanjem dveh različnih ionov, Fe^{2+} in Fe^{3+}, iz vodne raztopine z dodatkom primerne baze.

Problem soobarjanja dveh ionov je v tem, da se vsak izmed ionov obarja pri drugačnih pogojih [15]. Kot številni drugi ioni v vodi tudi železovi kationi tvorijo heksaaqua koordinirane komplekse $[Fe(OH_2)_6]^{Z+}$, pri katerih je polarizacija koordiniranih vodnih molekul odvisna od oksidacijskega stanja in velikosti kationa. Kondenzacija heksaaqua kompleksov poteka pri procesu olacije z eliminacijo vode in nastankom hidroksi povezav (mostičkov) kot prikazuje slika 1.6.



Slika 1.6: Kondenzacija heksaaqua kompleksov pri procesu olacije, z eliminacijo vode in nastankom hidroksi povezav [9].

Pri oksohidroksi kompleksih, ki v svoji strukturi nimajo vezane molekule vode, pa kondenzacija poteka s tako imenovanim dvostopenjskim procesom, pri katerem nastanejo okso povezave [9] kot prikazuje slika 1.7.



Slika 1.7: Kondenzacija heksaaqua kompleksov z dvostopenjskim procesom in nastanku okso povezav [9].

Fe^{3+} se obori že pri nizkem pH, okoli 2,8 in nastane Fe-oksihidroksid. Običajno se izloči najprej oksihidroksid lepodokrocit (γ-FeOOH), če pa delci lepidokrocita zrastejo, pa se pretvorijo v termodinamsko stabilno modifikacijo getit (α-FeOOH). Fe^{2+} se obori pri višjem pH nad 5. Pri soobarjanju obeh ionov Fe^{2+} reagira s predhodno oborjenim lepidokrocitom in nastane železov oksid s spinelno strukturo, najprej magnetit, ki pa na zraku običajno oksidira do maghemita (γ-Fe_2O_3) [16].

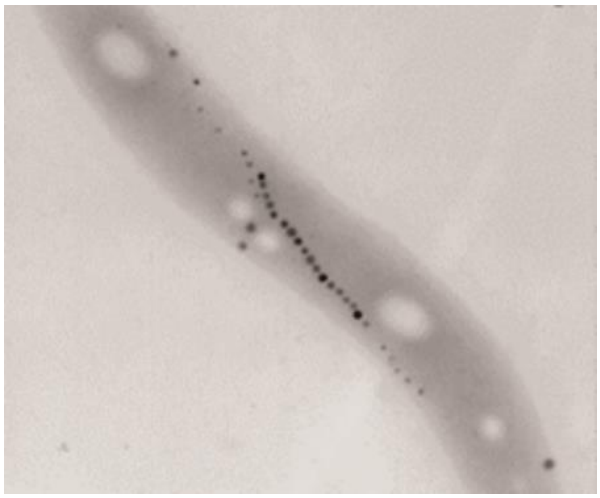
Kemijsko reakcijo nastanka železovih oksidov s soobarjanjem v vodni raztopini lahko opišemo z enačbo:

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O \qquad (1.5)$$

Magnetit (Fe_3O_4) v obliki majhnih delcev se na zraku oksidira v maghemit (γ-Fe_2O_3).

V svojem delu sem nanodelce železovih oksidov sintetizirala tudi z obarjanjem v prisotnosti AK. V našem primeru uporabljamo AK za stabilizacijo vodnih suspenzij nanodelcev. Vodne suspenzije nanodelcev železovega oksida lahko pripravimo na dva načina, z adsorpcijo AK na predhodno sintetizirane nanodelce ali pa s sintezo nanodelcev v prisotnosti AK. Pri obarjanju železovih ionov v prisotnosti AK lahko le-ta bistveno spremeni mehanizem nastanka nanodelcev [17]–[19]. Vpliv prisotnost AK in peptidov na lastnosti nanodelcev železovega oksida so intenzivno proučevali tudi pri procesu biomineralizacije v živih organizmih, kot so magnetotaktne bakterije [19]–[24]. Gre za proces biološke sinteze minerala železovega oksida, kjer v specializiranih bakterijskih organelih, magnetosomih, poteka biomineralizacija magnetnega železovega

oksida magnetita (Fe_3O_4) in v manjši meri še železovega sulfida (Fe_3S_4). Magnetotaktne bakterije so vodni prokarioti številnih oblik, ki za svoje okolje izbirajo tako sladkovodne kot tudi morske vode in njihove sedimente (slika 1.8).



Slika 1.8: Posnetek magnetotaktne bakterije M.gryphiswaldense s presevnim elektronskim mikroskopom [25].

Magnetotaktne bakterije so mikroaerofili, anaerobi, kar pomeni, da rast in nastanek mineralov železovega oksida magnetita ne potekata v prisotnosti kisika. Imajo lastnost kopičenja železa v svojih magnetosomskih organelih, od 0,01 do 1 mg/L, oz. 4 % teže bakterije. Magnetosom, kjer poteka sinteza kristalov železovega oksida, je tako zgrajen iz anorganskega jedra in magnetosomske membrane. Anorganski del tvorijo kristali železovega oksida. Velik vpliv na samo sintezo kristala železovega oksida v magnetosomu imajo magnetosomske membrane. Sestavljajo jih lipidni dvosloji z različnimi proteini. Glede na prisotnost različnih proteinov v lipidnem dvosloju ločimo različne tipe magnetotaktnih bakterij. Nekateri od omenjenih proteinov so tesno vezani s kristalom, drugi so vgrajeni znotraj membrane. Torej je specifična prisotnost proteinov magnetosomske membrane ključna pri sami sintezi kristala. Slika 1.9 prikazuje sintezne korake nastanka kristala železovega oksida v magnetotaktni bakteriji M.gryphiswaldense, MSR-1.

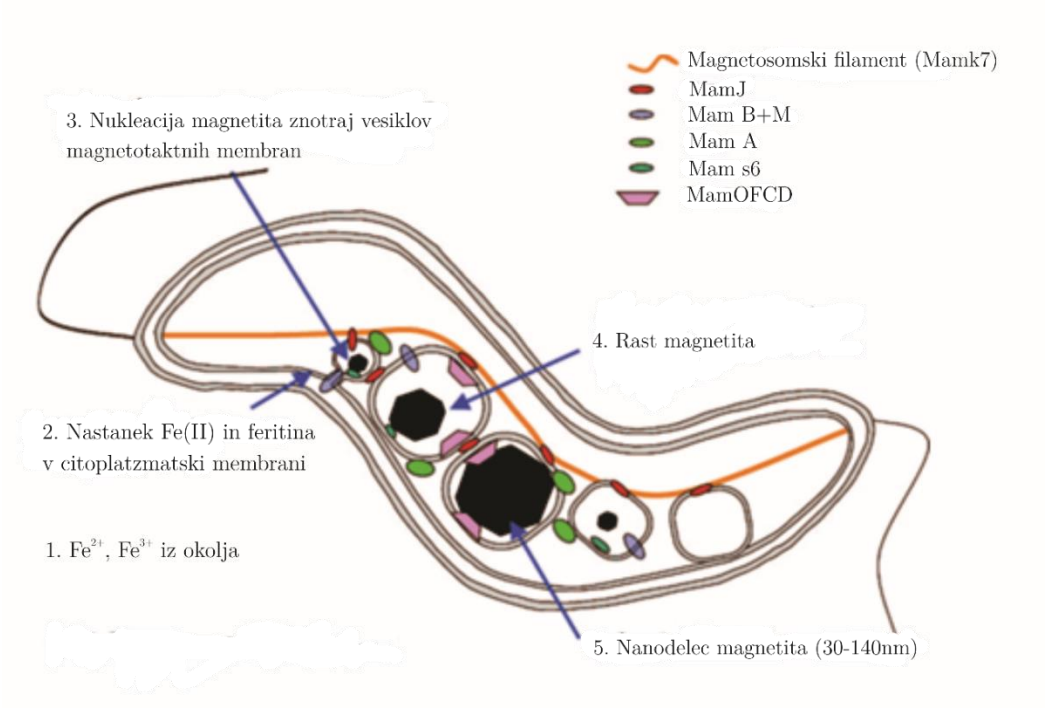
Izhodna reaktanta, potrebna za sintezo, ki ju bakterija črpa iz okolja, sta Fe^{3+} in Fe^{2+}. Železo se v citoplazmatski membrani pretvori v Fe(II) in feritin. Feritin je beljakovina, ki predstavlja skladiščno mesto za železo (železovi ioni v kompleksu s feritinom so v topni in netoksični obliki). Sam prenos železa poteka s pomočjo proteinov, MamB in MamM, ki opravljajo vlogo črpalke železovih ionov v citoplazmatsko membrano. Znotraj magnetosomskega vezikla, ki je bazičen, poteka hitro soobarjanje železa. Sledi rast magnetita v magnetosomu.

Reakcija nastanka železovega oksida magnetita je opisana s spodnjo enačbo:

$$\begin{aligned} Fe^{2+}A + 2Fe^{3+}B + (2X + Y + 4)H_2O \\ \rightarrow 2FeOH_x^{3-x} + FeOH_y^{2-y} + (2x + y)H^+ + A^{2-} + 2B^{3-} + 4\,H_2\,O \\ \rightarrow Fe_3\,O_4 + (2X + Y)H_2\,O + H^+, \end{aligned} \quad (1.6)$$

kjer je A neznana organska snov, B je feritin. Gre za predpostavljen mehanizem nastanka magnetita, ki pa je v molekularni ravni še ne povsem razložen in razumljen. Kisik, prisoten v kristalu magnetita, izvira iz molekul vode in se ne nahaja v molekularni obliki kot O_2.

Pri sami nukleaciji in rasti kristala magnetita ima veliko vlogo struktura magnetosomske membrane. Vemo, da se nukleacija zgodi, kadar je doseženo prenasičenje netopne železove spojine. Izmerjeno je bilo, da mora biti koncentracija prenasičenja železa v magnetotaktni bakteriji ok. 30 mmol/L. Mms6 protein, ki je zgrajen iz AK in je tesno vezan na magnetosomsko membrano, vpliva na samo kristalizacijo magnetita. Predvidevajo, da lahko omenjeni protein regulira velikost kristala tako, da upočasni nukleacijo in zmanjša rast. Tako nastanejo verige nanodelcev železovega oksida magnetita s premerom od 30 do 140 nm. Verige nanodelcev železovega oksida magnetita so vgrajene znotraj magnetotaktne bakterije, obdane s proteini in na takšen način stabilizirane znotraj celice [25].



Slika 1.9: Sintezni koraki nastanka kristala železovega oksida v magnetotaktni bakteriji M.gryphiswaldense, MSR-1 [25].

Magnetni nanodelci, sintetizirani v magnetotaktnih bakterijah, izkazujejo enakomerno velikost in odlične magnetne lastnosti. Da bi podobne nanodelce sintetizirali v laboratoriju, so raziskovalci raziskovali vpliv AK in polipeptidov na mineralizacijo železovih ionov pri obarjanju iz vodnih raztopin. Raziskave so običajno povezovali z biomimetsko sintezo. Izraz biomimetska sinteza označuje prenos idej iz narave, biologije v tehnologijo. Številni polipeptidi in aminokisline se lahko uporabljajo v biomimetski sintezi za stabilizacijo sicer nestabilnih kristalnih faz [22]. Baumgartner in sodelavci [24] so pokazali, da prisotnost negativno nabitih proteinov zavira nastanek magnetita med obarjanjem, saj

zavira nukleacijo s stabilizacijo amorfne strukture prek koordinacije železovih ionov [24]. Mantion in sodelavci [19] so raziskali vpliv različnih aminokislin na soobarjanje Fe^{2+} iz vodne raztopine na zraku. Pokazali so, da imajo izbrane AK močan vpliv na oblikovanje kristalne faze produkta. Opažen vpliv AK na rast delcev so pojasnili z adsorpcijo AK na nastale nanodelce, kar naj bi omejilo transport snovi in s tem vplivalo predvsem na kinetiko procesov. Vpliv AK na obarjanje železovih ionov se je razlikoval med različnimi AK. AK, ki naj bi izkazovale večjo afiniteto do površine oborjenih nanodelcev, naj bi imele večji vpliv na obarjanje [19]. Lenders in sodelavci [23] so raziskovali vpliv naključnih polipeptidov, ki jih sestavljajo različne AK, na soobarjanje magnetita v bazičnem mediju. Izkazalo se je, da polipeptidi iz kislih AK (aspartanska kislina, glutaminska kislina) stabilizirajo nastanek prekurzorja ferihidrita in s tem kinetično vplivajo na velikost produkta z upočasnjeno nukleacijo in zmanjševanjem rasti [23]. Iz raziskav Culiţă in sodelavcev [17] lahko v nasprotju s prej omenjenimi raziskavami sklepamo, da na nastanek produkta pri obarjanju železovih ionov v prisotnosti AK vpliva nastanek koordinacijske spojine med aminokislino in železovimi ioni. Nastanek koordinacijske spojine pri nizkih vrednostih pH raztopine so pokazali na primeru aminokislin histidin in tirozin. Možno je, da nastanek koordinacijske spojine spremeni mehanizem nastanka produkta obarjanja železovih ionov [17].

1.6 Koloidne lastnosti nanodelcev

Nanodelci se uporabljajo v obliki koloidno stabilnih suspenzij. Koloidni delci izkazujejo električni naboj na površini, kadar so dispergirani v polarnem mediju. Naboj delcev je lahko posledica nabitih skupin, ki so del strukture delca ali pa so posledica adsorbiranih nabitih skupin. Površina oksidnih delcev (M–OH) v vodi disociira, kot prikazujeta spodnji enačbi 1.5 [16]:

$$\mathrm{M-OH_2^+ \leftrightarrow M-OH + H_3O^+}$$

$$\mathrm{M-OH \leftrightarrow M-O^- + H_3O^+} \qquad (1.7)$$

Tako so v kislem območju –OH skupine protonirane $M–OH_2^+$ in je naboj na površini pozitiven, v bazičnem pa deprotonirane $M–O^-$ in je naboj negativen. Območje, kjer je koncentracija protoniranih in deprotoniranih nabitih centrov enaka, imenujemo izoelektrična točka .

Naboj na površini se tako najpogosteje pojavi bodisi zaradi adsorpcije ionov na površini bodisi zaradi disociacije površinskih skupin. V mediju se ob površini ustvari še ravnotežni sloj nasprotno nabitih ionov, ki tvorijo tako imenovani difuzni dvosloj [26]. Difuzni dvosloj je tako razdeljen na notranjo ali Sternovo plast in zunanjo ali difuzno plast. Zunanja, difuzna plast bo obravnavana najprej.

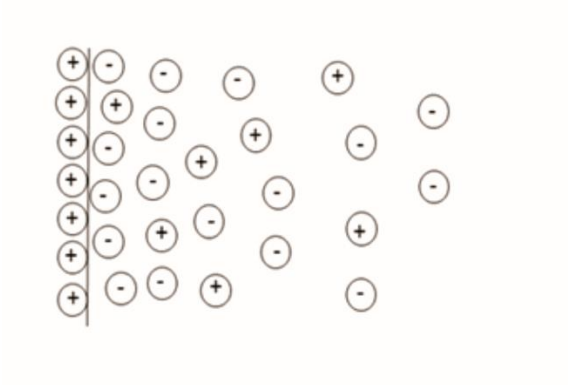
Predpostavimo, da je električni potencial na površini Ψ_0 in potencial Ψ na oddaljenosti x od površine delca. Če je površina

pozitivno nabita, kot prikazuje slika 1.10, lahko, upoštevajoč Boltzmanovo porazdelitev, zapišemo:

$$n_+ = n_0^{\frac{-ze\Psi}{kT}} \qquad n_- = n_0^{\frac{+ze\Psi}{kT}}, \tag{1.8}$$

kjer je n_+ in n_- število pozitivnih in negativnih ionov na volumsko enoto v točki, kjer je potencial Ψ. Gostota naboja (ρ) v točki, kjer je potencial Ψ, je definirana kot:

$$\rho = ze\,(n_+ - n_-) \tag{1.9}$$



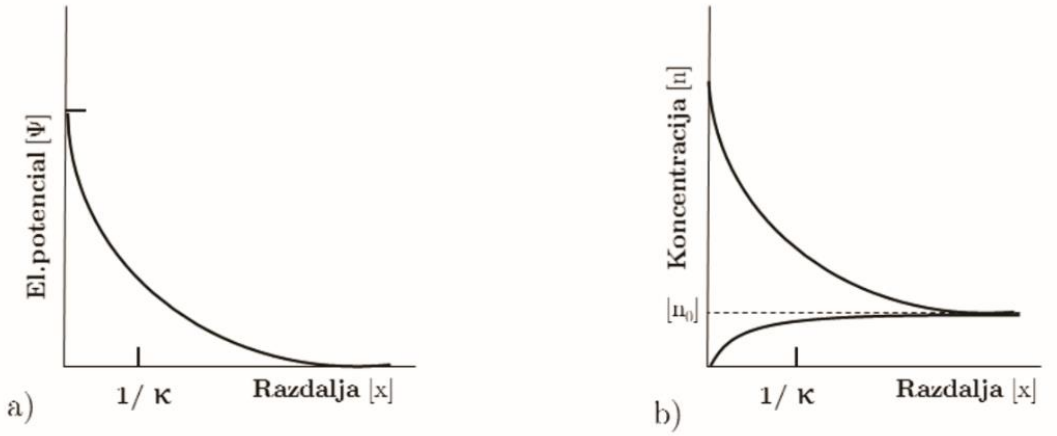
Slika 1.10: Shematski prikaz difuznega dvosloja [26].

Upoštevajoč enačbo 1.8 in povezavo, kjer je gostota naboja povezana z Ψ v Poissonovi enačbi, ter upoštevajoč dielektričnost (ε) (konstanta, povezana z enačbo o sili, med delcema: $F = (Q_1Q_2)/(4\Pi\ \varepsilon\ r^2)$, pri čemer je $\Psi = \Psi_0$, kadar je $x = 0$, $\Psi = 0$, kadar je $d\Psi/dx = 0$ je $x = \infty$, dobimo enačbo:

$$\Psi = \Psi_0^{-\kappa x} \tag{1.10}$$

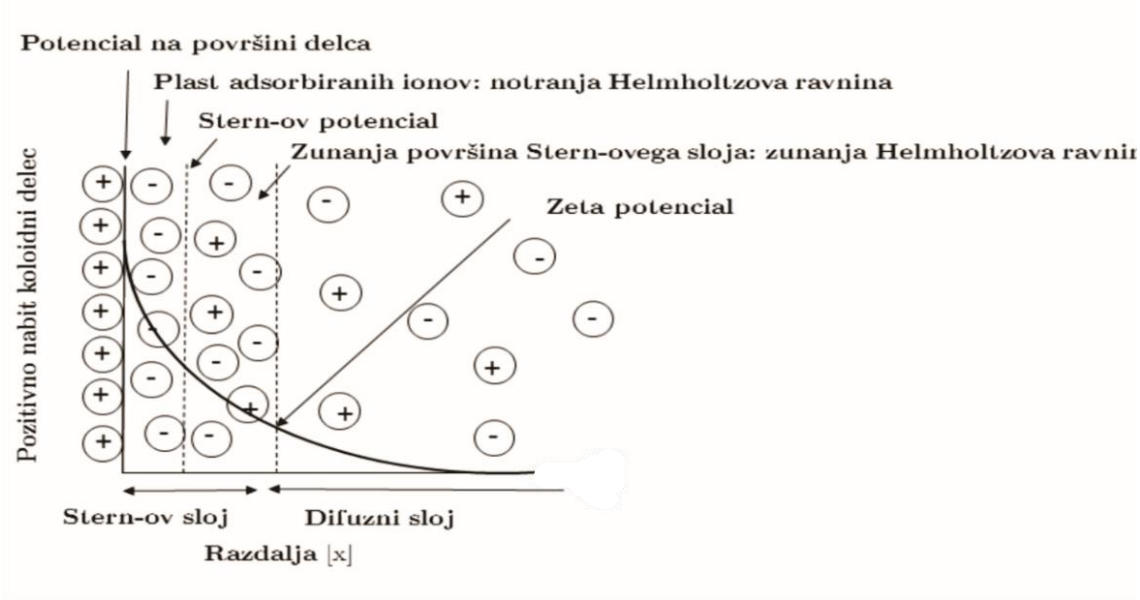
Enačba 1.10 kaže, da se potencial eksponencialno zmanjšuje z razdaljo od nabitega delca-površine, kot prikazuje slika 1.11 a. Na porazdelitev ionov vpliva njihova velikost in interakcije med njimi. Inverzna debelina difuznega sloja, ki določa razdaljo, na katero se dva delca približata, je izražena kot Debyejeva dolžina, κ. Na primer, za okrogle delce s polmerom a in razdaljo r od središča delca lahko zapišemo vrednost električnega potenciala:

$$\Psi = \Psi_0\ \frac{a^{-\kappa(r-a)}}{r} \tag{1.11}$$



Slika 1.11: Električni potencial a) in koncentracija b) v odvisnosti od razdalje od površine [26].

Poleg difuzne plasti poznamo še plast adsorbiranih ionov oz. Sternovo plast, ki je razdeljena na dva dela, in sicer na notranjo in zunanjo Helmholtzovo ravnino, kot je prikazano s shemo na sliki 1.12. V notranji Helmholtzovi ravnini so adsorbirani ioni na površini. Nasprotno nabiti ioni, obdani z molekulami topila, se razporedijo v zunanji Helmholtzovi ravnini. Potencial med zunanjo Helmholtzovo ravnino in topilom imenujemo zeta potencial. Zeta potencial je količina, ki je pomembna pri karakterizaciji nanodelcev, dispergiranih v suspenzijah. Definira naravo naboja na strižni ravnini delca v odvisnosti od pH [26].



Slika 1.12: Shematski prikaz difuznega dvosloja.

Ko govorimo o merjenju zeta potenciala delcev, je pomembno omeniti, da vrednost zeta potenciala ni merjena, pač pa izračunana, kajti pri procesu elektroforeze dejansko merimo

mobilnost delcev v električnem polju, zeta potencial pa iz mobilnosti preračunamo z uporabo enačbe Helmholtz-Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} = \frac{\eta v}{\varepsilon E} \tag{1.12}$$

μ elektroforetska mobilnost, v hitrost, E električno polje, ζ zeta potencial, η viskoznost, ε je dielektričnost.

Na koloidno stabilnost suspenzij vplivajo različne sile: sila vzgona, sila gravitacije, privlačne sile in odbojne sile med delci. Če je sila vzgona, ki ga povzroča termična energija (k_BT), večja od sile gravitacije, ostane suspenzija delcev stabilna. Energija delcev v gravitacijskem polju je torej odvisna od velikosti delcev in razlike v gostoti med delci in medijem.

Pri manjših delcih je energija gravitacije manjša in delci se lažje dispergirajo. Delci se v mediju gibljejo z Brownovim gibanjem in tako omogočajo interakcije med delci. Van der Waalsove interakcije so privlačne, elektrostatske sile med isto nabitimi delci in sterične sile pa so odbojne. Če med delci prevladujejo privlačne interakcije, se delci v suspenziji aglomerirajo, narastejo gravitacijske sile in se zato iz suspenzije posedejo.

Da se delci v suspenziji ne posedejo, je potrebno preprečiti rast delcev z njihovo aglomeracijo. Elektrostatska stabilizacija suspenzije je rezultat delovanja elektrostatskih odbojnih sil, ki prevladajo nad privlačnimi van der Waalsovimi silami. Energija privlačnih van der Waalsovih sil (V_A) se veča z zmanjševanjem razdalje med delci. Med dvema enakima delcema ($a_1 = a_2 = a$) na razdalji H ($x = H/2$a) je van der Waalsova interakcija V_A definirana kot:

$$V_A = -\frac{A}{12}\left[\frac{1}{x(x+1)} + \frac{1}{(x+1)^2} + 2ln\left(\frac{x(x+1)}{(x+1)^2}\right)\right] \tag{1.13}$$

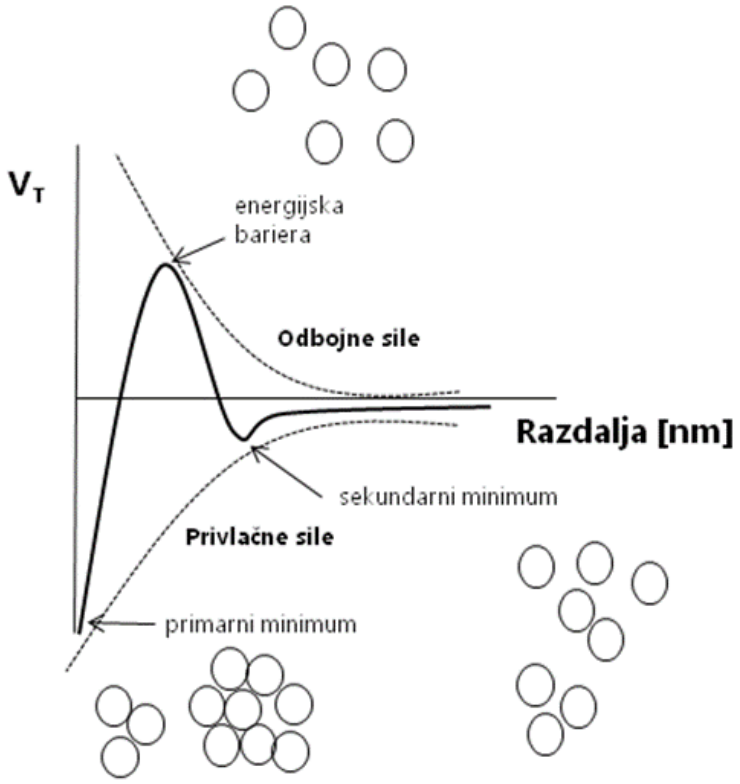
A je Hamakerjeva konstanta.

Večja kot je energija van der Waalsovih sil, večja je težnja delcev po aglomeraciji. Privlačnim van der Waalsovim silam v mediju nasprotujejo odbojne elektrostatske sile in omogočajo stabilnost suspenzije. Ravnotežje med van der Waalsovimi privlačnimi in elektrostatskimi odbojnimi silami med delci v suspenziji običajno opišemo z uporabo teorije DLVO. Teorijo DLVO so postavili štirje raziskovalci, Derjaguin, Verwey, Landau in Overbeek. Celokupna energija interakcije V_T je definirana kot seštevek odbojnih (V_R) in privlačnih sil (V_A):

$$V_T = V_A + V_R \tag{1.14}$$

Energija odboja je odvisna od pH in ionske jakosti medija ter narašča eksponentno z zmanjševanjem razdalje med delcema. Privlačne sile, ki so neodvisne od medija, imajo negativno vrednost, njihova absolutna vrednost pa se prav tako eksponencialno veča z zmanjševanjem razdalje med delci. Za koloidno nestabilne suspenzije, kjer se delci aglomerirajo, je

značilno, da je energija privlačnih interakcij večja od energije odbojnih interakcij. Krivulja V_T izkazuje minimum na kratkih razdaljah med delci. Omenjeni minimum imenujemo primarni minimum in v splošnem pomeni, da se delci, ki pridejo v tesen kontakt, ireverzibilno aglomerirajo. Če pa med delci v suspenziji prevladujejo odbojne sile, izkazuje krivulja V_T maksimum, ki prestavlja energijsko bariero proti aglomeraciji delcev (slika 1.13). Višina energijske bariere je odvisna od velikosti delcev, ionske moči in vrednosti pH. Delci se v splošnem ne bodo aglomerirali, če izkazuje V_T vrednost energijske bariere okoli 25 kT. V primeru, da izkazujejo delci močno nabite površine in povečano ionsko jakost, izkazuje V_T še manjši minimum, ki ga imenujemo sekundarni minimum. Sekundarni minimum omogoča, da se delci ustalijo na določeni razdalji eden od drugega. V splošnem ta pojav imenujemo (šibka) flokulacija, ker lahko v tem primeru delce običajno redispergiramo [26] [27].



Slika 1.13: Energija interakcij v odvisnosti od razdalje med delcema [28].

Razen elektrostatske stabilizacije, ki je rezultat delovanja elektrostatskih odbojnih sil, poznamo še sterično stabilizacijo. Pri sterični stabilizaciji na površino delcev vežemo molekule surfaktanta, ki imajo polarno glavo in nepolaren rep. Molekule, vezane s polarno glavo na površino delca in orientacijo repa navzven proti mediju, preprečuje kontakt med delci. Sterično stabilizacijo večinoma uporabimo za stabilizacijo suspenzij v nepolarnem mediju.

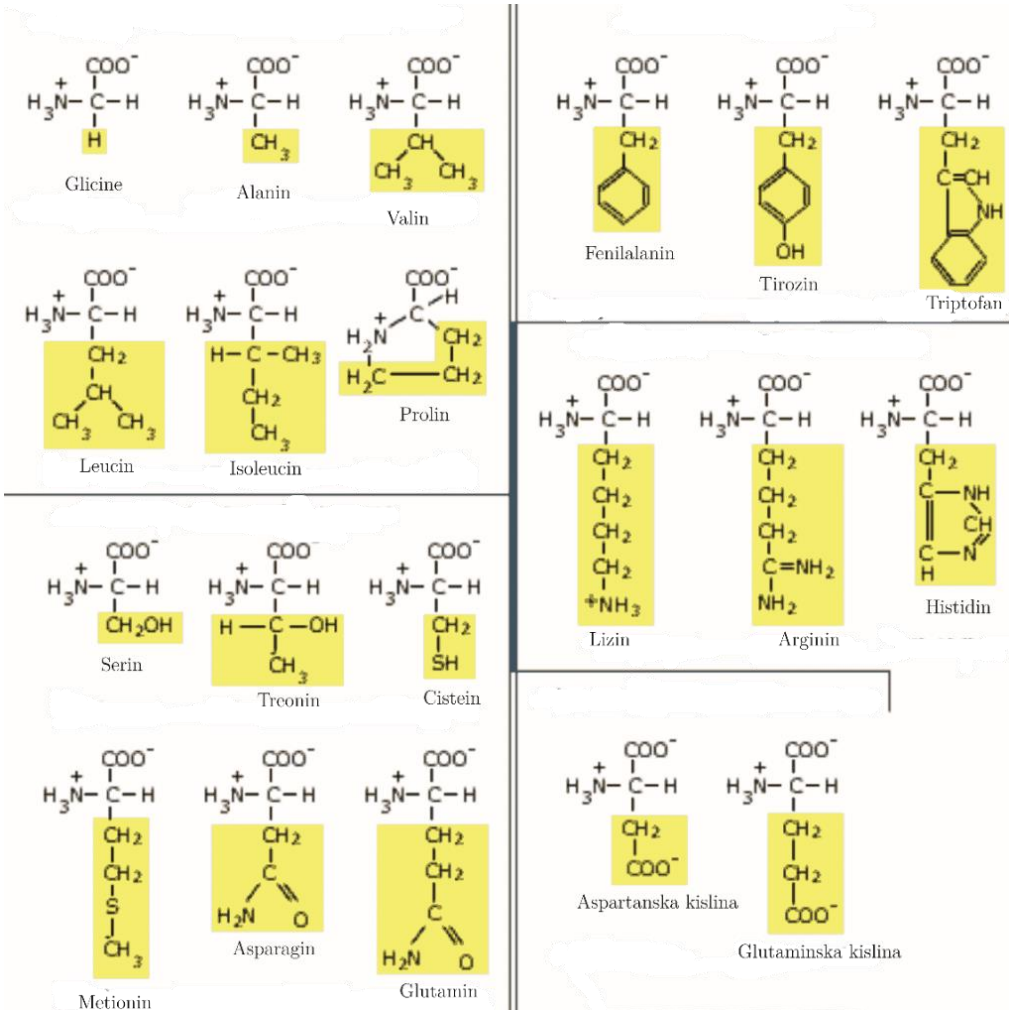
Če povzamem, stabilnost vodnih suspenzij nanodelcev običajno uravnavamo z vezavo organskih molekul na površino nanodelcev. Ionizirane molekule vežemo na delce za elektrostatsko

stabilizacijo suspenzij v polarnih medijih, medtem ko za stabilizacijo v nepolarnih medijih na površino delcev običajno vežemo surfaktante, ki z dolgim repom sterično preprečujejo aglomeracijo. Stabilizacija je lahko tudi posledica delovanja kombinacije elektrostatskih in steričnih odbojnih sil (elektrosterična). Organske molekule lahko na površino vežemo bodisi kovalentno bodisi jih na površino adsorbiramo. Plast organskih molekul pa v največji meri določa tudi površinske lastnosti delcev, kot je površinski naboj v polarnem mediju ali pa razpoložljivost funkcionalnih skupin, ki so potrebne za nadaljnjo vezavo oz. konjugacijo specifičnih molekul na površino. Posebno pri uporabi v medicini je potrebno na površino nanodelcev vezati različne molekule, kot na primer zdravilne učinkovine, kromofore, tarčne ligande itd. Površinski sloj organskih molekul na nanodelcih določa v veliki meri tudi interakcije nanodelcev z biološkimi sistemi, kot so na primer celice, in s tem njihovo usodo po aplikaciji v krvni obtok ali njihovo strupenost [13]. Skupina organskih molekul, s katerimi lahko zagotavljamo stabilnost vodnih suspenzij in z njimi hkrati uravnavamo površinske lastnosti nanodelcev, so aminokisline [29].

1.7 Aminokisline

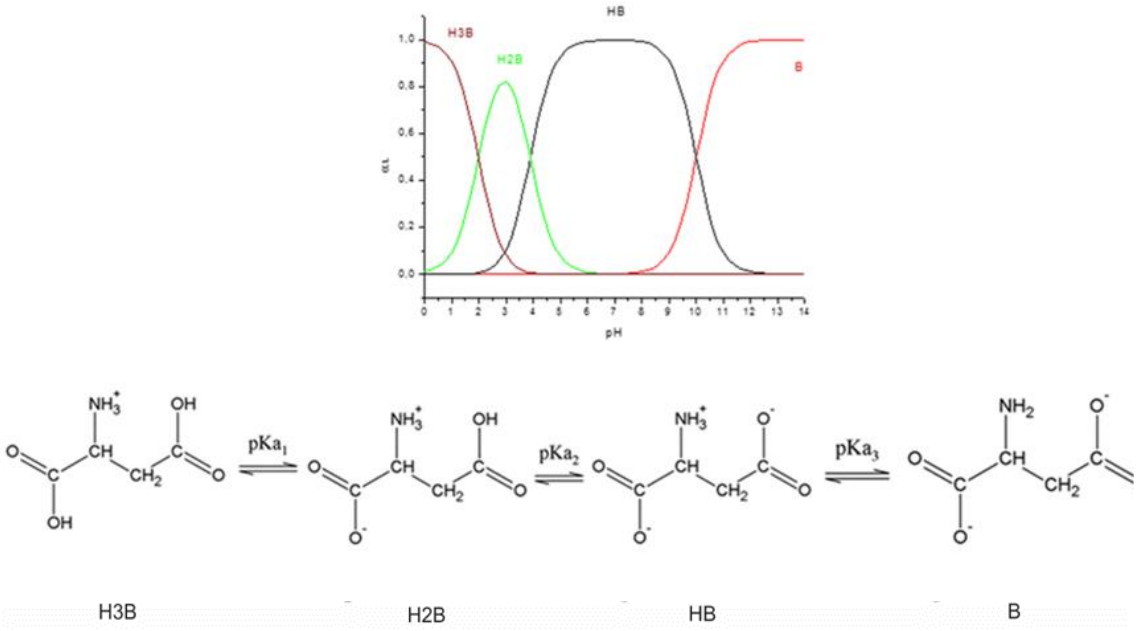
Izraz aminokisline (AK) se v splošnem nanaša na aminoalkanojske kisline, ki jih opišemo s splošno formulo $H_3N^+-(CR^1R^{2-})_n-CO_2$, (kjer je n = 1 za α-aminokisline, n = 2 za β-aminokisline itd). V naravi je bilo raziskanih več kot 700 AK in večina od teh je α- AK, za katere velja zgornji zapis formule, torej imajo na isti ogljikov atom vezani dve funkcionalni skupini, karboksilno skupino in amino skupino ter stransko verigo. Glede na skupino na koncu stranske verige (stransko skupino) AK delimo na polarne s pozitivno- ali negativno-nabito stransko skupino ali nepolarne.

20 AK oz. 19 α- AK in ena α-iminokislina (slika 1.14) je pomembnih v celicah pri sintezi proteinov, so osnovni gradniki peptidov in proteinov ter gradniki mnogih drugih bioloških molekul [30],[31]. AK imajo zato pomembno vlogo v telesu, na primer sodelujejo pri celični rasti in pri procesih regeneracije tkiv.

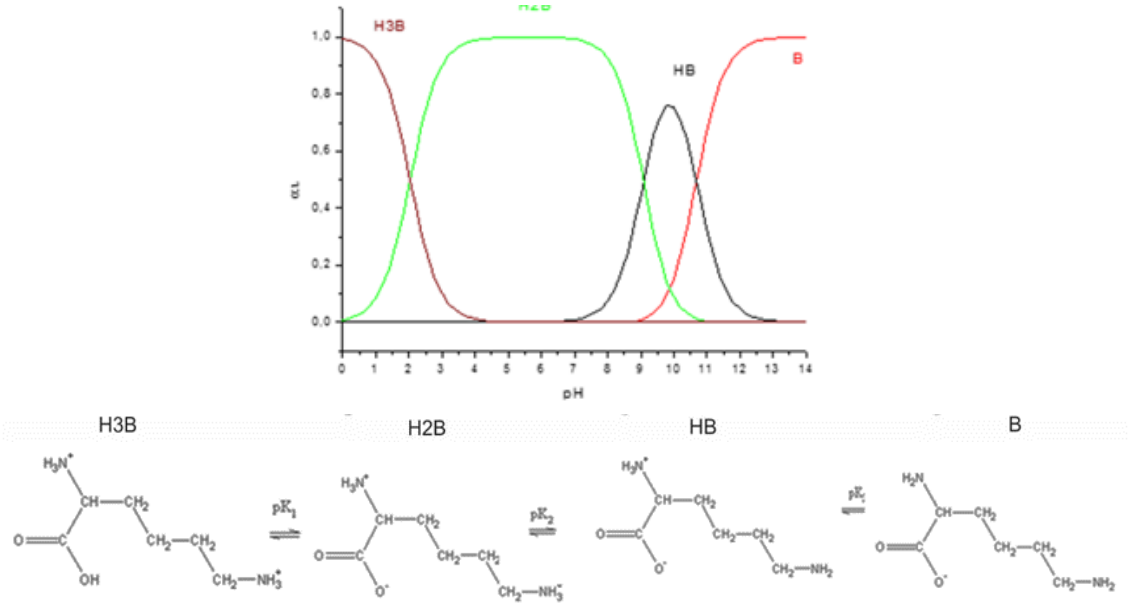


Slika 1.14: Strukturne formule aminokislin [32].

V svojem delu sem uporabljala dve AK, aspartansko kislino (ASP) in lizin (LYS). Molekula ASP ($HOOC-CH_2-CH-(NH_2)COOH$) ima dve funkcionalni skupini in eno amino skupino ($pK_1 = 2,09$, $pK_2 = 3,86$, in $pK_3 = 9,82$), medtem ko ima molekula LYS ($H_2N-(CH_2)_4-CH-(NH_2)COOH$) eno karboksilno skupino in dve aminoskupini (pK1 = 2,2, pK2 = 8,5, in pK3 = 10,28). Stopnje disociacije obeh AK prikazujeta sliki 1.15 in 1.16.



Slika 1.15: Stopnje disociacije ASP v odvisnosti od pH.



Slika 1.16: Stopnje disociacije LYS v odvisnosti od pH.

1.8 Adsorpcija

Adsorpcija predstavlja adhezijo molekul adsorbata iz tekočine ali plina na površino adsorbenta. Adsorpcijo običajno eksperimentalno opišemo z adsorpcijskimi izotermami, to je krivuljami naraščanja površinske koncentracije molekul adsorbata na površini adsorbenta

v odvisnosti od njegove koncentracije pri konstantni temperaturi. Potek adsorpcije opisujejo številni teoretični modeli, kot so na primer Langmuirjeva izoterma, Freundlichova izoterma ali Temkinova izoterma [16],[33][34]. Največkrat uporabljen adsorpcijski model je Langmuirjeva izoterma (slika 1.17), ki opisuje ravnotežje med adsorbiranimi molekulami adsorbata in površino:

$$S + X \leftrightarrow S - X \tag{1.15}$$

S… površina adsorbenta
X … neadsorbiran adsorbat
S-X … adsorbat v adsorbiranem stanju

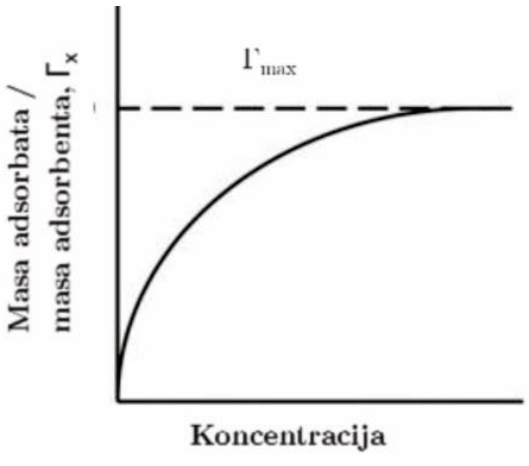
Konstanta ravnotežja je definirana kot:

$$K_{ads} = \mathrm{e}^{\frac{(-\Delta Gads)}{RT}}, \tag{1.16}$$

kjer je ΔG_{ads} prosta Gibbsova energija adsorpcije.

$$\Gamma_x = \Gamma_{\max} \left(\frac{K_{ads} \cdot X_{aq}}{1 + K_{ads} \cdot X_{aq}}\right) \tag{1.17}$$

kjer je X_{aq} ravnotežna koncentracija adsorbata in Γ_x = masa adsorbata/masa adsorbenta. Γ_{max} ustreza koncentraciji adsorbata, potrebni za nasičenje s površino nanodelcev (na $\Gamma_{aq} \geq 1$), in tako zagotovi pokritost adsorbata v tako imenovanem monosloju (adsorbirana ena plast adsorbata na površini adsorbenta). Iz enačbe 1.18 lahko določimo ravnotežno koncentracijo adsorbirane aminokisline na površini nanodelcev. Konstanta ravnotežne koncentracije, K_{ads}, je merilo afinitete adsorbata do adsorbenta.



Slika 1.17: Primer Langmuir adsorpcijske izoterme.

1.8.1 **Adsorpcija aminokislin**

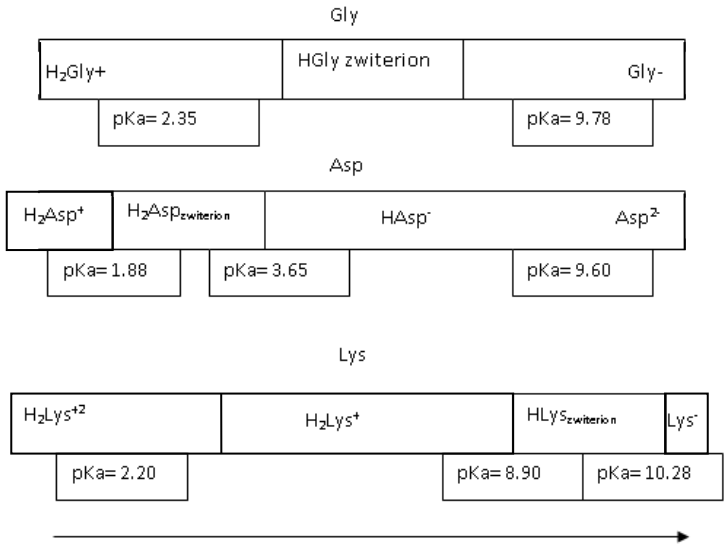
Stabilne vodne suspenzije lahko pripravimo z adsorpcijo AK na površino nanodelcev. AK so posebno zanimive za stabilizacijo suspenzij nanodelcev za uporabo v biomedicini, saj so nestrupene in biokompatibilne. V nekaterih primerih je adsorpcija AK na površino nanodelcev pomembna tudi zaradi njihove ciljane dostave na specifična tkiva v človeškem telesu. V industriji bi bile lahko AK zelo pomembne za pripravo suspenzij nanodelcev s prilagojenimi površinskimi lastnostmi. Velik nabor različnih AK bi nam načeloma lahko zagotovil možnost uravnavanja površinskih lastnosti nanodelcev v širokem območju. Pri pripravi vodnih suspenzij nanodelcev za uporabo v medicini in tehniki so pomembne predvsem lastnosti, kot so površinski naboj in dostopnost specifičnih funkcionalnih skupin za nadaljnjo vezavo (konjugacijo) različnih molekul na površino nanodelcev. Pomembna je stabilnost vezi med molekulo in površino ter koncentracija molekul na površini.

Poleg tega je adsorpcija AK na površino mineralov pomembna za razumevanje nastanka življenja na zemlji po tako imenovani Bernalovi hipotezi [30]. Bernal je predlagal hipotezo pred okoli 50 leti. Po tej hipotezi naj bi nastale kompleksne organske molekule kot gradniki življenja s polimerizacijo AK, adsorbiranih na površini mineralov. Da bi potrdili hipotezo, so različni raziskovalci preučili adsorpcijo AK na različne minerale, vključno z delci železovega oksida/hidroksida, kot so getit (α-FeOOH), lepidokrocit (γ-FeOOH), maghemit (γ-Fe_2O_3), magnetit (Fe_3O_4), ter na druge podobne minerale (TiO_2, Al_2O_3, SiO_2, alumosilikati). Izkazalo se je sicer, da je verjetnost, da bi prišlo do spontanega spajanja AK v peptide, zanemarljiva, tudi če so v adsorbiranem stanju. V primeru spontane polimerizacije 0,5 mol/L glicina pri sobni temperaturi je ob prosti entalpiji reakcije 10,45kJ/mol izračunana koncentracija polimeriziranega glicina $2{,}6.10^{-30}$ mol/L, kar seveda ni dovolj za spontani nastanek peptidov na Zemlji. Poudariti je potrebno, da je ta predpostavka postavljena na osnovi verjetnosti polimerizacije samo molekul glicina, v realnosti pa je najverjetneje obstajala zmes različnih aminokislin in je tako verjetnost, da bi se le-te povezale, mnogo večja. Pri polimerizaciji peptidov ima velik vpliv katalizator, ki pospešuje tvorbo peptidne vezi, a obenem pospeši hidrolizo polimera, kar so proučili na primeru adsorpcije AK na površini silikatov [30].

AK se na različne minerale adsorbirajo po enem od osnovnih mehanizmov, najpogosteje na osnovi elektrostatskih interakcij, možna pa je tudi vezava s kemijsko vezjo ali z vodikovo vezjo [30]. Elektrostatska adsorpcija je nespecifična, adsorpcija pa je lahko tudi specifična in vključuje dobro opredeljene lokalne vezi, bodisi kovalentno bodisi vodikovo vez med aminokislino in površino minerala [30].

a) Nespecifična adsorpcija

V primeru oksidov in silikatnih mineralov se nabite AK lahko adsorbirajo na površine, ki izkazujejo nasprotni naboj z elektrostatskim privlakom. Elektrostatske interakcije AK na površini so odvisne od pH vrednosti. Na primer, površina oksidov, kot je železov oksid, je pri nizkem pH pozitivno nabita in pri visokih vrednostih pH negativno nabita. Nasprotno je amorfni silicijev oksid (silika) zaradi površinskih silanolnih skupin (Si-OH) negativno nabit pri pH vrednostih nad okoli 2,5. Naboj aminokislin je določen s konstantami disociacije njenih funkcionalnih skupin in s pH vrednostjo raztopine (slika 1.18).



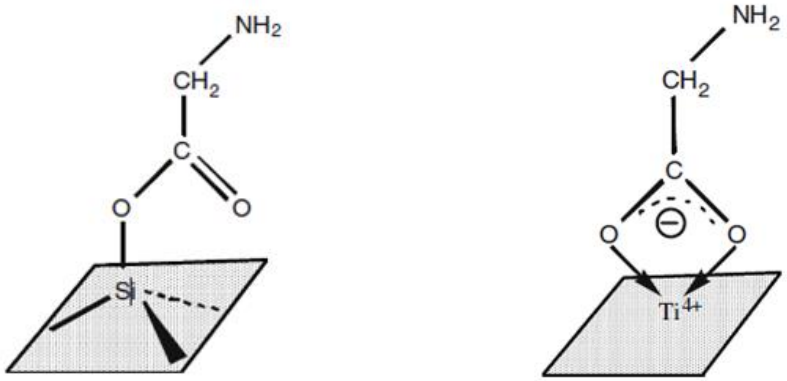
Slika 1.18: Naboj aminokislin v odvisnosti od pH [30].

b) Specifična adsorpcija

Poleg elektrostatske vezave med molekulami je možna tudi specifična vezava AK na površino mineralov. Pri specifični adsorpciji, kjer se molekule AK povežejo s površino mineralov s kovalentnimi vezmi, lahko takšni površini določimo nasičeno pokritost, ki je odvisna od števila posameznih adsorpcijskih mest.

Na primer molekule AK glicina se lahko adsorbirajo na površino silike s kovalentno vezjo med karboksilno skupino AK in silanolno skupino na površini silike in tako tvorijo površinski ester, kot prikazuje slika 1.19.a. Pri adsorpciji na ionske minerale, kot so oksidi železa, aluminija ali titana, pa se molekula AK poveže s koordinativno vezjo med karboksilno skupino in površinskimi

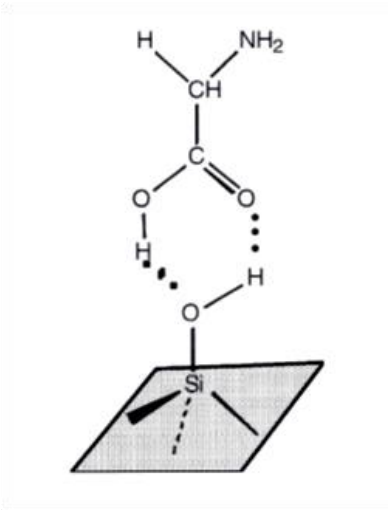
kationi, kot je to prikazano na sliki 1.19 b v primeru vezave glicina na površino titanovega dioksida.



a) b)

Slika 1.19: Primer specifične adsorpcije aminokislin glicina: a) s kovalentno vezjo s površino silike in b) s koordinacijo s površino titanovega dioksida [30].

Med specifične interakcije sodijo tudi šibke vodikove vezi med AK in površinskimi skupinami. Slika 1.20 predstavlja primer adsorpcije AK glicin s tvorbo vodikovih vezi med karboksilno skupino in površinskimi silanolnimi skupinami Si-OH [30].



Slika 1.20: Primer specifične adsorpcije s tvorbo vodikove vezi med aminokislino glicinom in površinskimi silanolnimi skupinami silike [30].

1.8.2 **Adsorpcija aminokislin na nanodelce železovega oksida**

Predvsem z namenom, da bi pojasnili lastnosti suspenzij nanodelcev, so pogosto študirali tudi adsorpcijo AK na površino nanodelcev železovega oksida. Uporabljene so bile različne

eksperimentalne metode, kot so infrardeča spektroskopija FT-IR, Ramanska spektroskopija in spektroskopija UV, ali pa so o mehanizmu adsorpcije AK sklepali na osnovi lastnosti suspenzij nanodelcev (zeta potencial) ali pa iz poteka adsorpcijskih izoterm, ki so jih običajno določali s spremljanjem koncentracij aminokisline v suspenzijah s posrednimi metodami, kot je kolorimetrija z ninhidrinom ali konduktometrija. Kljub številnim raziskavam pa so rezultati pogosto nepopolni ali nasprotujoči [35][36][37][36]–[43][44]–[51].

V osnovi se različni raziskovalci strinjajo, da se AK vežejo na površino železovega oksida s kelatno vezjo karboksilne skupine z železovimi ioni na površini.

V svojem delu sem se osredotočila na dve AK, ASP, ki je pri bioloških pogojih negativno nabita, in na pozitivno nabiti LYS.

Sousa in sodelavci [52] so s pomočjo infrardeče (FT-IR) in Raman spektroskopije pokazali, da se ASP adsorbira na površini oksida s tvorbo kemijske kelatne vezi, ki vključuje Fe (III) ione na površini delcev in karboksilno skupino AK. Nanodelci železovega oksida z ASP na površini tvorijo stabilno koloidno suspenzijo pri pH med 5 in 8.

Mikhylova in sodelavci [53] so na osnovi analiz FT-IR pokazali, da AK reagira s površino nanodelcev železovega oksida s stransko karboksilno skupino, medtem ko niti amino skupina niti α-karboksilna skupina ne sodelujeta pri interakciji. V nasprotju s to predpostavko so meritve zeta potenciala pokazale, da se je izoelektrična točka (IEP) suspenzije nanodelcev železovega oksida z adsorpcijo ASP premaknila iz nevtralne v alkalno območje pH (pH_{IEP} ~ 8,5). To nasprotno kaže na adsorpcijo ASP z obema karboksilnima skupinama na površino in na usmerjenost amino skupine molekule navzven proti mediju.

Schwaminger in sodelavci [54] so na osnovi rezultatov ATR analiz predlagali, da se glutaminska kislina, druga AK, s karboksilno stransko skupino, bolj verjetno veže na površino magnetita pri pH = 6, bodisi s svojo stransko karboksilno skupino bodisi z alfa karboksilno skupino, kot pa z interakcijo obeh karboksilnih skupin naenkrat. AK ne tvorijo ionske vezi s površino magnetita preko amino skupine [54].

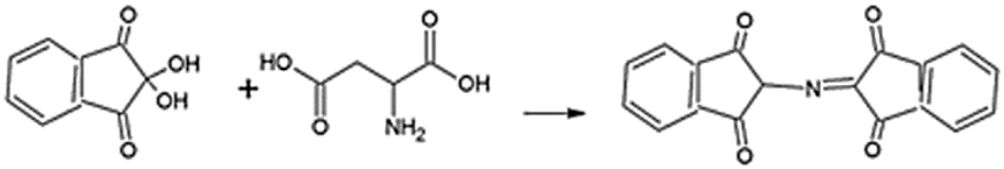
Tudi pozitivno nabita AK LYS se veže na površino železovega oksida preko karboksilne skupine, medtem ko do vezi med površino delca in amino skupinama ne pride. Amino skupine so tako usmerjene proti površini in ohranjajo močan in pozitiven zeta-potencial suspenzije pri nevtralnem pH, to pa omogoči pripravo stabilnih koloidnih suspenzij nanodelcev v vodi [55], [56], [57].

V literaturi so redkeje predstavljene raziskave, pri katerih so določali adsorpcijske izoterme adsorpcije AK na nanodelce železovih oksidov. Običajno so določali koncentracijo AK v supernatantih suspenzij nanodelcev v ravnotežju z določeno koncentracijo AK posredno, s konduktometrijo ali pa s spektroskopsko metodo s pomočjo ninhidrina. Direktno določanje koncentracije AK je namreč precej zahtevno in v dosedanjih raziskavah ni bilo uporabljeno.

Sousa in sodelavci [52] so določili adsorpcijske izoterme L-aspartanske kisline in L-glutaminske kisline na površino nanodelcev železovega oksida maghemita s konduktometrično metodo. Pojasnili so, da se s povečanjem koncentracije AK povečuje tudi prevodnost do vrednosti, kjer doseže nasičenje. Predpostavili so izotermo Langmuirjevega tipa in izračunali ravnotežne konstante Langmuirjeve enačbe, ki za L-aspartansko kislino znaša $1{,}08 \times 10^2$. Ta vrednost potrjuje, da se ASP adsorbira na površino nanodelcev

maghemita s kemijsko vezjo. Konduktometrične meritve so pokazale, da se največ ASP na površini železovega oksida adsorbira pri pH blizu 3, medtem ko se s povečanjem pH vrednosti količina adsorbirane kisline zmanjšuje. Nasičenost površine pri pH 3 je bila dosežena pri približno 150 μmol aspartanske kisline / m^2 površine oksida, kar ustreza približno 90 molekulam ASP / nm^2. Ta vrednost je zelo visoka in ne podpira preprostega modela, ki temelji na adsorpciji AK v obliki monosloja [53].

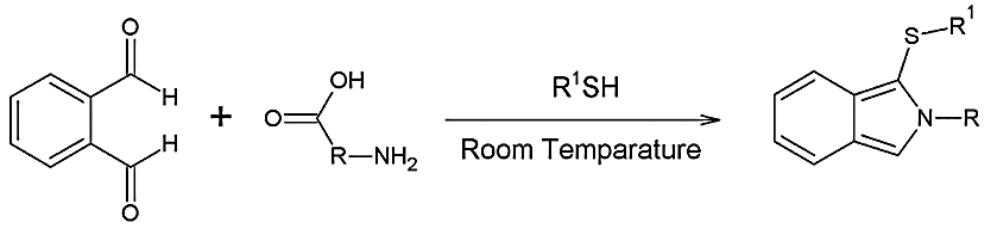
Viota in sodelavci [58] so kvantitativno ovrednotili adsorpcijo LYS na nanodelce železovega oksida z uporabo kolorimetrične metode z ninhidrinom. Spektroskopska metoda z ninhidrinom temelji na reakciji ninhidrina in AK ter na nadaljnji detekciji nastalega ninhidrinskega kompleksa na osnovi optičnih meritev v vidnem območju (UV-VIS). Ninhidrin ali 2,2-dihidroksi-1,3-indandion se v splošnem pogosto uporablja za kvantitativno detekcijo α- AK. Mehanizem ninhidrinske reakcije vključuje oksidativno deaminacijo in dekarboksilacijo AK in naknadno kondenzacijo sproščenega prostega amonijaka. Ta reakcija je odvisna od pH. Vodne raztopine AK reagirajo z ninhidrinom v območju od pH 5 do pH 7 in nastane vijolično barvilo, t. i. Ruhemannsko vijolično kot prikazuje slika 1.21 [14].



Slika 1.21: Ninhidrinska reakcija.

V svojem delu Viota in sodelavci [58] navajajo, da se količina adsorbiranega LYS povečuje s koncentracijo LYS v suspenziji in sledi Langmuirjevemu tipu izoterme, čeprav so nasičenje opazili le pri najvišjih koncentracijah LYS pri nizkem pH. Gostota adsorpcije LYS je bila odvisna od pH, pri čemer je bila najnižja v kislem, najvišja v nevtralnem in se je zopet znižala v bazičnem. Največja absolutna vrednost izmerjene koncentracije LYS na površini nanodelcev v suspenziji 10 mg/mL je bila ~0,17 μmol/m^2 (pH = 7), kar ustreza eni molekuli LYS na 10 nm^2 (0,1 molekule Lys /nm^2) [58].

V zgoraj navedenih raziskavah so določali adsorpcijske izoterme na osnovi posrednega določanja koncentracij AK v suspenzijah nanodelcev, zato jih je potrebno jemati z določeno rezervo. Metoda, ki se običajno uporablja za določanje koncentracije AK v vodnih raztopinah, je sicer tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Metoda temelji na derivatizaciji v dveh korakih, in sicer najprej poteka reakcija s 3-merkapto propionsko kislino (3-MPA), nakar sledi reakcija z o-ftalaldehidom (OPA), kot je prikazano na sliki 1.22. Aminokislinski derivat se detektira pri valovni dolžini 338 nm. Meja detekcije metode je bila ocenjena na 10 mg /L [59].



Slika 1.22: Reakcija derivatizacije aminokislin z 3-MPA/OPA.

Poglavje 2

Namen dela

Adsorpcijo AK na površino magnetnih nanodelcev železovega oksida, kot je maghemit (γ-Fe_2O_3), lahko uporabljamo za uravnavanje njihovih površinskih lastnosti in s tem za pripravo stabilnih koloidnih suspenzij. Stabilne vodne suspenzije magnetnih nanodelcev so pomembne tako za uporabo v medicini, kjer je pomembna prednost AK njihova nestrupenost in biokompatibilnost, kot pri masovni proizvodnji suspenzij za uporabo v različnih tehnologijah, kjer je dodatno pomembna njihova relativna nizka cena. Predpostavila sem, da nam lahko velik nabor različnih AK omogoči uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev, kot je površinski naboj ali dostopnost specifičnih funkcionalnih skupin, v širokem območju.

Namen mojega doktorskega dela je bil ovrednotiti možnost uporabe različnih AK za uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev maghemita in pripravo njihovih stabilnih vodnih suspenzij. Za načrtovano uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev pa je potrebno podrobno poznavanje mehanizmov adsorpcije. V znanstveni literaturi je bilo sicer o adsorpciji AK na magnetne nanodelce veliko podatkov, vendar pa so si bili pogosto nasprotujoči. Da bi razjasnila ključne mehanizme, ki vplivajo na lastnosti nanodelcev z adsorbiranimi AK in na njihove lastnosti vodnih suspenzij, sem sistematično raziskala adsorpcijo dveh AK na nanodelce, ASP z negativno nabito stransko verigo in LYS s pozitivno nabito stransko verigo. Prav poznavanje mehanizma adsorpcije pa je omogočilo razumevanje površinskih lastnosti suspenzij nanodelcev, ko sta zeta potencial in koloidna stabilnost.

Za pripravo stabilnih suspenzij lahko AK adsorbiramo na predhodno sintetizirane nanodelce ali pa nanodelce sintetiziramo z obarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodne raztopine v prisotnosti AK. Slednji način je zelo preprost in zato posebno primeren za masovno proizvodnjo stabilnih suspenzij. Upoštevati pa je potrebno, da lahko dodana AK pomembno spremeni nastanek nanodelcev. Namen mojega dela je bil tudi ovrednotiti, na kašen način vpliva dodana AK, ASP, na nastanek nanodelcev med soobarjanjem. Podatki o vplivu AK na postopek sinteze nanodelcev maghemita v njeni prisotnosti so posebno pomembni pri prenosu znanj o sintezi vodnih suspenzij nanodelcev z laboratorijskega nivoja v masovno proizvodnjo.

Izkazalo se je, da se AK ASP in LYS adsorbirata na površino nanodelcev v obliki velikih molekularnih asociatov, kar omejuje uporabo AK za uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev za večino uporab. Asociati šibko povezanih AK so namreč občutljivi na pH suspenzije in lahko hitro razpadejo v prisotnosti drugih nabitih molekul, kar spremeni površinske lastnosti nanodelcev. Predpostavila sem, da bi lahko izboljšala stabilnost organskega sloja na površini nanodelcev s tem, da bi adsorbirane AK na površini nanodelcev med seboj zamrežila. Tako sem uporabila proces aktivacije karboksilnih skupin z EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-

3-etilkarboimin hidroklorid), in njihovo reakcijo z amino skupinami sosednjih AK z namenom, da bi se na površini nanodelcev tvorili zamreženi polipetidi.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

Pri svojem doktorskem delu sem uporabila naslednje spojine:

- Železov (II) sulfat heptahidrat, ACS, 99+ %, Alfa Aesar,
- Železov (III) sulfat hidrat, 97 %, reagent grade, Alfa Aesar,
- Amonijev hidroksid, 25ut %, vodna raztopina, Carlo Erba,
- Natrijev hidroksid, 98 %, Alfa Aesar,
- Natrijev hidroksid, 98 %, Alfa Aesar,
- DL-Aspartanska kislina, 98+ %, Alfa Aesar,
- Lizin monohidrat, 98+ %, Alfa Aesar,
- DL-Norvalin, Sigma Grade, Sigma-Aldrich
- Natrijev acetat, hidrat, Kemika,
- Borova kislina, ACS, >99,5 %, Fluka,
- Kalijev klorid, Riedel-deHaën,
- 3-mekaptopropanojska kislina, ≥99,0 %, Sigma-Aldrich,
- O-ftaldialdehid, ≥99,0 % Sigma-Aldrich,
- Acetonitril, ≥99,9 %; HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich,
- Metanol, ≥99,9 %, HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich,
- Dodatno prečiščena voda s sistemom Milli-Q (Millipore),
- Klorovodikova kislina, 32 %, ACS reagent, Sigma-Aldrich,
- Ocetna kislina (≥ 99,8 %), Sigma-Aldrich,
- Ninhidrinski reagent, 99%, Alfa Aesar,
- Anionski izmenjevalec, Dowex ®1x8, 100-200mesh, Serva ElectropHoresis Gmbh,
- EDC, (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarboimin hidroklorid), 98 %+, AlfaAesar
- PBS, fosfatni pufer (10X), pH = 6,8, Alfa Aesar.

3.2 Sintezne metode

3.2.1 **Sinteza nanodelcev železovega oksida brez dodatka aminokisline**

3.2.1.1 **Sinteza nanodelcev železovega oksida, s soobarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodne raztopine z dodatkom baze v eni stopnji**

Nanodelce NDŽO-RT sem pripravila z metodo soobarjanja železovih ionov ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7{,}7H_2O$). Raztopino železovih ionov

(500 mL; 27 mmol Fe^{2+}/L, 23 mmol Fe^{3+}/L) sem mešala 30 minut. Nato sem pH vrednost dvignila na pH > 11 s hitrim dodatkom koncentrirane raztopine NH_4OH (250 mL, 25 ut.%). Pri tem so se oborili nanodelci železovega oksida. Suspenzijo sem mešala nadaljnjih 30 minut. Nanodelce NDŽO-RT sem nato ločila z magnetom in jih 4-krat sprala s 150 mL amonijakalne raztopine pri pH ~ 10,5.

3.2.1.2 Sinteza nanodelcev železovega oksida s soobarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodne raztopine z dodatkom baze v dveh stopnjah

Nanodelce železovega oksida (NDŽO-RT-2step) sem sintetizirala z metodo soobarjanja železovih ionov ($FeSO_4$.$7H_2O$; $Fe_2(SO_4)_3$.$7,7H_2O$). Raztopini železovih ionov (500 mL; 27 mmol Fe^{2+}/L, 23 mmol Fe^{3+}/L) sem s počasnim dodatkom vodne raztopine NH_4OH (0,5 ut. %) pH vrednost raztopine zvišala na pH = 3 in jo ob konstantnem mešanju vzdrževala na tej vrednosti pH 30 minut. Nato sem pH vrednost dvignila na pH > 11 s hitrim dodatkom koncentrirane raztopine NH_4OH (250 mL, 25 ut.%). Nastalo suspenzijo sem mešala nadaljnjih 30 minut. Nanodelce sem nato ločila z magnetom in jih 4-krat sprala s 150 mL amonijakalne raztopine (pH ~ 10,5).

3.2.1.3 Sinteza nanodelcev železovega oksida s soobarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodne raztopine pri povišani temperaturi

Nanodelce železovega oksida sem pripravila z metodo soobarjanja železovih ionov na dva načina: pri povišani temperaturi soobarjanja železovih ionov in pri povišani temperaturi staranja nanodelcev.

Raztopini železovih ionov (500 mL; 27 mmol Fe^{2+}/L, 23 mmol Fe^{3+}/L), ki sem jo segrela na 80 °C pod refluksom, sem dodala raztopino amonijaka. Temperatura se je znižala na 68 °C in čez nekaj minut ustalila na 73 °C. Nastalo suspenzijo nanodelcev NDŽO-80 sem starala pri temperaturi 30 minut. Nanodelce NDŽO-80 sem nato ločila z magnetom in jih sprala z amonijakalno raztopino (pH ~ 10,5).

Pri povišani temperaturi staranja nanodelcev je poteklo soobarjanje pri sobni temperaturi v posodi avtoklava kot v 3.2.1.1. Avtoklav sem takoj po obarjanju zaprla in ga segrevala pri povišani temperaturi. Temperatura staranja je bila 80 °C, 160 °C in 200 °C. V primeru, ko je temperatura presegla 100 °C, govorimo o hidrotermalni obdelavi produkta, saj se v avtoklavu vzpostavi povišan (ravnotežni) tlak vodne pare. Nanodelce NDŽO-RT-80, NDŽO-RT-HT-160, NDŽO-RT-HT-200 sem nato ločila z magnetom in jih sprala z amonijakalno raztopino (pH ~ 10,5).

3.2.2 Sinteza nanodelcev železovega oksida z dodatkom aminokisline

Enako kot opisano zgoraj v poglavju 3.2.1 sem sintetizirala tudi nanodelce železovega oksida v prisotnosti AK. Aspartansko kislino (ASP) sem raztopila v raztopini Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov pred obarjanjem. Količina dodane ASP je bila različna, med 1,5 mol ASP na mol Fe^{3+} (ASP/Fe^{3+} = 1,5) in 12 mol ASP na mol Fe^{3+} (ASP/Fe^{3+} = 12). V imenu vzorcev NDŽO-ASPXX-RT »XX« označuje molsko razmerje med ASP in Fe^{3+}. Pogoji sinteze so bili, kot je bilo možno, enaki kot v primeru sinteze brez AK.

3.2.3 Priprava stabilne suspenzije nanodelcev železovega oksida z dodatkom aminokisline v reakcijsko zmes med soobarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz vodne raztopine

Nanodelce NDŽO-ASP1,5-RT, sintetizirane v prisotnosti ASP, sem po spiranju z amonijakalno raztopino pri pH ~ 10,5 dispergirala v vodni raztopini amonijaka pri pH = 11 z uporabo sonifikatorja. Suspenzijo sem nato dodatno očistila z uporabo ultrafiltracije. Z ultrafiltracijo sem uporabila ultrafiltracijsko celico s polprepustno membrano (Millipore, Ultracel, 10 kDa, Amicon) pri tlaku okoli 3 bare. Pri ultrafiltraciji polprepustna membrana prepušča manjše molekule, kot so AK, nanodelci pa ostajajo v suspenziji, ki ji konstantno dodajamo destilirano vodo. Kot merilo intenzitete spiranja v tekstu navajam količino vode, uporabljene za spiranje.

3.2.4 **Priprava stabilne suspenzije nanodelcev železovega oksida z adsorpcijo aminokislin na predhodno sintetizirane nanodelce**

Za pripravo stabilne vodne suspenzije sem dodala 2,89 g AK (AK = ASP ali LYS) v 450 mL vodne suspenzije NDŽO-RT, ki je vsebovala 1 g nanodelcev. pH vrednost sem uravnala na 2 z raztopino amonijaka v primeru adsorpcije ASP in z raztopino HCl v primeru adsorpcije LYS. Suspenzijo sem mešala 5 ur in nato pH dvignila na vrednost 11 v primeru adsorpcije ASP in na vrednost 4 v primeru LYS z uporabo raztopine NaOH. Presežek neadsorbirane AK v suspenziji sem sprala z uporabo ultrafiltracije, kjer sem 100 ml suspenzije sprala s 300 mL razredčene vodne raztopine amonijaka ali HCl s pH prvotne suspenzije.

3.2.5 **Adsorpcija aspartanske kisline na površino nanodelcev železovega oksida**

Za raziskave adsorpcije AK na površino nanodelcev sem pripravila matično suspenzijo nanodelcev NDŽO-RT s koncentracijo 2,2 g/L.

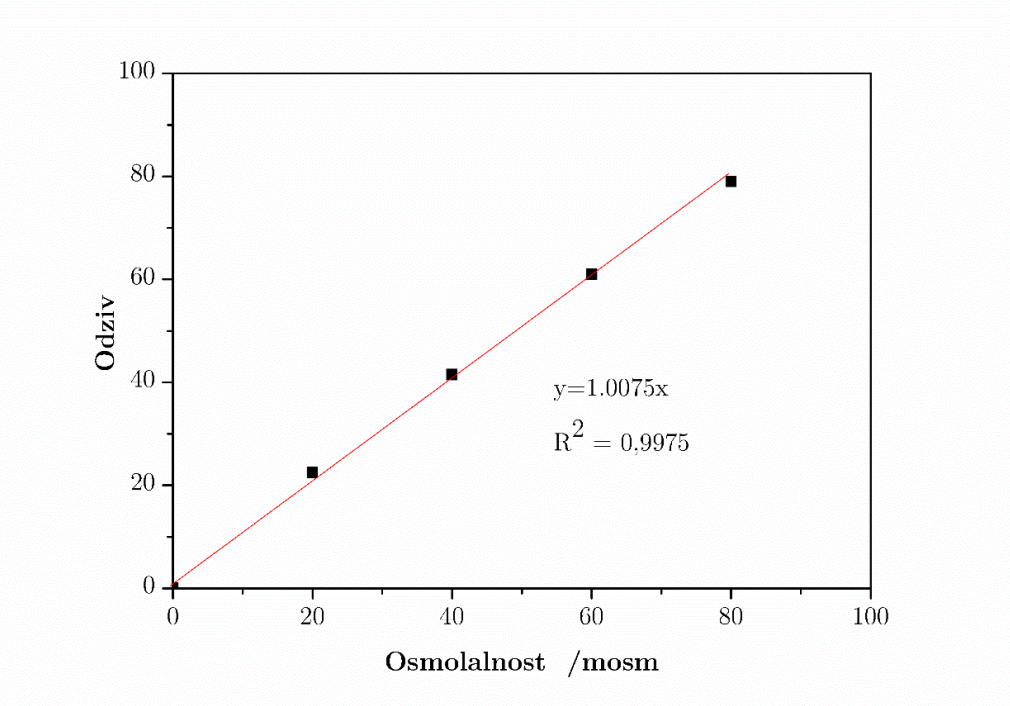
Suspenzijo sem razdelila v centrifugirke. V vsaki centrifugirki je bilo 45 mL suspenzije, ki je vsebovala 0,1 g nanodelcev. V suspenzijo sem dodala AK v različnem masnem razmerju glede na nanodelce (vrednost masnega razmerja med aminokislino in nanodelci (AK/ND) je bila 2,88; 1,44; 0,405; 0,135; 0,115; 0,0405; 0,023 in 0,0115) ter uravnala pH na različne vrednosti z razredčeno raztopino NaOH (od pH 2 do pH 11). Suspenzije sem nato sonificirala 2 min in jih nadalje mešala na orbitalnem stresalniku en teden, da se je v suspenziji vzpostavilo ravnotežje. Koncentracije ASP v supernatantu smo določili s pomočjo metode HPLC. Iz suspenzije sem nanodelce izločila s pomočjo ultracentrifugiranja (Thermo Scientifics, Sorvall WX 100). Vzorce za analizo sem pripravila v najmanj dveh neodvisnih ponovitvah celotnega eksperimenta adsorpcije in priprave vzorca za analizo. Rezultate podajam kot srednjo vrednost dveh paralelk.

3.2.6 **Določevanje osmolalnosti z meritvami znižanja zmrzišča raztopin aminokislin in suspenzij nanodelcev z adsorbiranimi aminokislinami**

Na adsorpcijo AK vpliva asociacija molekul AK v raztopini. Zaradi nastanka asociatov AK se zmanjša število delcev (osmolalnost) v raztopini. Osmolalnost sem določala z merjenjem zmrzišča raztopin in suspenzij.

Osmolalnost je merilo koncentracije raztopljenih delcev na enoto mase raztopine. Na račun asociacije molekul v molekulske asociate se število delcev in s tem osmolalnost zmanjša, kar se odraža v spremembi koligativnih lastnosti, kot je znižanja zmrzišča raztopine. Za meritve znižanja zmrzišča sem uporabila osmometer Knauer Cryoscopic Unit Type 7312400000. Osmometer omogoča merjenje znižanja zmrzišča, osmolalnost pa določimo z uporabo umeritvene krivulje. Instrument je opremljen s hlajenjem

Peltier in meritev je popolnoma avtomatizirana. Vzorčna raztopina se ohladi brez mešanja. Zamrznitev hitro poteče z uporabo vibratorja, temperatura ledišča pa se izmeri z vgrajeno sondo. Instrument je bil umerjen s pomočjo vodnih raztopin KCl znanih koncentracij (0,01-0,05 mol/L) in osmolalnosti (0,02-0,10 osm/L, pri čemer je "osm" enota za osmole). Osmolalnost KCl je bila izračunana z upoštevanjem popolne ionizacije KCl v vodi in je torej dvakratnik njegove koncentracije. Slika 3.1 prikazuje primer umeritvene krivulje vodnih raztopin KCl.



Slika 3.1: Umeritvena krivulja vodnih raztopin KCl.

3.2.7 **Kovalentno zamreženje aspartanske kisline na površini nanodelcev železovega oksida z uporabo EDC**

10 mL suspenzije nanodelcev z adsorbirano AK sem uravnala pH na 5,5 in dodala EDC (1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil) karboimid hidroklorid) v množini, ki je bila 5-kratni prebitek glede na množino prisotnih karboksilnih skupin. Po 20 min mešanja sem pH zvišala na 7,5, da je potekla reakcija med aktiviranimi karboksilnimi skupinami in amino skupinami.

V primeru zamreženja ASP in LYS sem reakcijo izvedla tudi v raztopini brez prisotnosti nanodelcev. 45 ml raztopine ASP in LYS (molsko razmerje ASP:LYS = 1:1) sem uravnala pH na 5,5 in dodala EDC (n(EDC) = 5n(ASP)). Po 20 min mešanja sem pH zvišala na 7,5, da je potekla reakcija med aktiviranimi karboksilnimi skupinami in amino skupinami.

Koncentracijo nezreagiranih AK v raztopini in supernatantih suspenzije po zamreženju smo določili z metodo HPLC. Supernatant suspenzij sem pridobila s centrifugiranjem 5 min pri 4500. Predvidevala sem, da supernatant poleg prostih AK vsebuje še

zamrežene AK s peptidno vezjo. Te sem sprostila s hidrolizo z dodatkom 6,2M HCl in mešanjem pod refluksom 24 h pri 80 °C.

3.3 Karakterizacija

3.3.1 **Meritve magnetnih lastnosti nanodelcev železovega oksida**

Magnetizacije nanodelcev v odvisnosti od jakosti magnetnega polja sem merila z magnetometrom z vibrijajočim vzorcem Lake Shore 7307 VSM pri magnetnem polju od -1T do 1T. Magnetizacije vzorcev nanodelcev z adsorbirano AK sem normalizirala na vsebnost Fe_2O_3, ki sem jo določila termogravimetrično.

3.3.2 **Rentgenska praškovna difraktometrija**

Strukturne lastnosti nanodelcev sem spremljala z rentgensko praškovno difraktometrijo (XRD), z aparaturo Siemens D5000. Difraktogrami so bili posneti v območju 2 Θ med 20 in 60° s korakom 0,04° in zadrževanjem 6 s na korak. S pomočjo Sheererjeve metode in programa Diffrac^{plus} Topas ™ sem določila velikost nanodelcev. Sheererjeva enačba povezuje širino vrhov v difraktogramu s povprečno velikostjo kristalitov:

$$d_x = \frac{K\lambda}{\beta cos\Theta} \tag{3.1}$$

d_x velikost kristalita
K oblikovni faktor
λ valovna dolžina rentgenskega žarka
β širina uklona na polovični višini
Θ Braggov kot

3.3.3 **Presevna elektronska mikroskopija**

Z uporabo presevnega elektronskega mikroskopa (TEM) JEOL 2010F smo določali velikost in obliko nanodelcev. Vzorce za TEM sem pripravila tako, da sem na bakreni mrežici posušila nekaj kapljic suspenzije nanodelcev. Velikost nanodelcev sem določila iz TEM posnetkov z ročnim označevanjem njihovega oboda s programsko opremo Gatan Inc.DigitalMicrographH™. V vsakem vzorcu sem izmerila najmanj 300 nanodelcev. Velikost nanodelcev je izražena kot ekvivalentni premer (premer kroga s površino, ki je enaka površini izmerjenega delca). Empirične meritve velikosti sem popisala z Gaussovo funkcijo porazdelitve in tako dobila povprečno vrednost in standardno deviacijo porazdelitve velikosti.

3.3.4 **Ramanska spektroskopija**

Z Ramansko spektroskopijo z uporabo aparature RAMAN (Horiba Yvon Lab Ram) smo analizirali vzorce posušenih nanodelcev železovega oksida maghemita γ-Fe_2O_3, predvsem v območju od 800 do 200 cm^{-1}, ki s širokimi vrhovi pri 379 cm^{-1}, 485 cm^{-1} in asimetričnim vrhom okoli 690 cm^{-1} nakazuje značilen spekter maghemita.

3.3.5 **Meritve specifične površine**

Meritev specifične površine (metoda BET) in velikost por smo izvedli s pomočjo aparature Quantachrome Nova 2000e. 100mg

nanodelcev železovega oksida smo pred analizo čez noč liofilizirali in nadalje izvedli meritev.

3.3.6 **Termogravimetrična analiza**

Za termogravimetrično analizo (TGA) sem nanodelce posušila pri 60 °C. Krivulje TGA so bile posnete s hitrostjo segrevanja 5K/min z uporabo aparature Mettler Toledo 851.

3.3.7 **Meritve zeta potenciala**

Zeta potencial vodne suspenzije nanodelcev sem merila z uporabo aparature ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corporation, v odvisnosti od vrednosti pH. Če ni v opisu rezultatov navedeno drugače, sem meritev začela pri lastnem pH suspenzije in nato pH vrednost nižala z uporabo HCl. V drugem vzorcu sem pH med meritvijo večala z NaOH.

3.3.8 **Meritve hidrodinamske velikosti nanodelcev z dinamičnim sipanjem laserske svetlobe**

Hidrodinamsko velikost nanodelcev v suspenziji sem zasledovala z metodo na osnovi dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) z aparature Analysette 12 DynaSizer, Fritsch.

3.3.9 ***In-situ* FT-IR spektroskopija**

Kemijske reakcije v reakcijski mešanici tekom nastanka nanodelcev z obarjanjem železovih ionov v prisotnosti AK sem spremljala s tako imenovano *in-situ* FT-IR spektroskopijo z uporabo aparature React ICIR 10, Mettler Toledo. Spektre FT-IR (odvisnost adsorbance od valovnega števila) sem spremljala z uporabo programske opreme React ICIR 10.

3.3.10 **Analiza CHNS**

Elementno sestavo organskega dela produktov med obarjanjem nanodelcev v prisotnosti AK smo določali tudi z metodo CHNS (Elementar, Vario EL CUBE).

3.3.11 **Določanje koncentracije aminokislin v supernatantu z uporabo ninidrinskega reagenta in ultravijolične spektroskopije**

Za hitro določanje koncentracije AK v supernatantih nanodelcev po adsorpciji AK sem uporabila reakcijo derivatizacije ninhidrinskega reagenta in AK. Derivat, ninhidrinsko barvilo sem določala kolorimetrično z uporabo spektrofotometra (HP 8453 UV-Vis spektrometer) pri valovni dolžini 570 nm. Vzorcu raztopine aminokisline sem uravnala pH na 5 z raztopino HCl ali NaOH. V 2 mL epico sem odpipetirala 0,1 mL raztopine in dodala 1 mL ninhidrinskega reagenta ter segrevala pri 80 °C v termostatski kopeli 20 min. Nato sem mešanico ohladila na sobno temperaturo in 0,2 mL le-te odpipetirala k 5 mL raztopine etanol/voda = 1/1 in v času 15 min izmerila absorbanco. Vsebnost AK sem določila iz umeritvene krivulje.

3.3.12 **Določevanje koncentracije aminokislin z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC)**

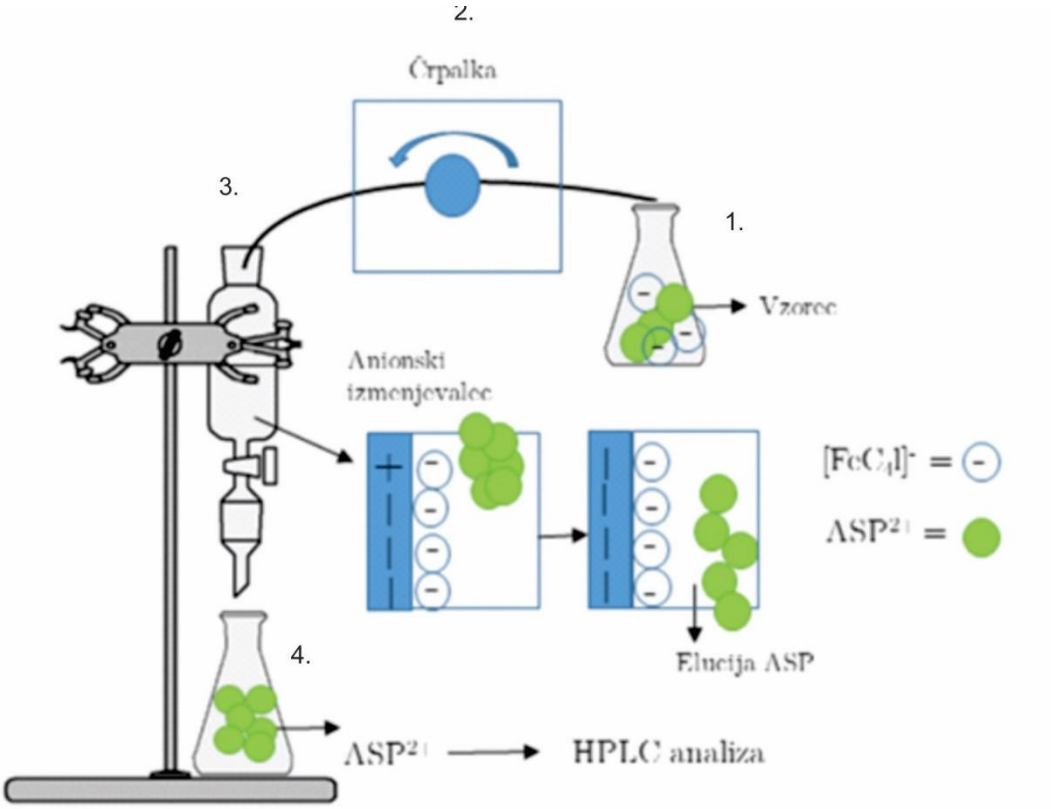
Visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) smo uporabili za ovrednotenje koncentracij AK, adsorbiranih na nanodelcih. Za

določanje koncentracij v supernatantu sem suspenzije nanodelcev centrifugirala in odpipetirala supernatant. Reakcijo derivatizacije AK s 3-merkaptopropionsko kislino in o-ftaldehida (3-MPA/OPA) smo izvršili v boratnem pufru pri pH 9,9 z avtomatskim injektorjem. pH derivatizacijskega reagenta 3-MPA/OPA je bil uravnan na pH = 9,3. Uporabili smo še interni standard norvalin, ki je služil za vrednotenje reakcije AK z derivatizacijskim reagentom pri valovni dolžini 338 nm. Meja detekcije je bila ocenjena na 10 mg/L [29].

HPLC analiza AK je potekala na osnovi derivatizacije (3-MPA/OPA) z uporabo HPLC aparature Agilent HPLC system 1100 (Palo Alto, USA), ki je opremljena s črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom in diodnim detektorjem pri 338 nm. Uporabili smo Kromasil Eternity-5-C18 (4,6x100 mm) kolono. Pretok mobilne faze je bil 2 mL/min. Ločitev je potekala z uporabo gradienta štirih različnih eluentov [59].

Za analizo AK, adsorbirane na nanodelcih, sem nanodelce, dobljene z (ultra) centrifugiranjem suspenzije posušila v vakumu pri sobni temperaturi in raztopila v HCl. Da pa lahko analiziramo dobljeno raztopino s HPLC, je potrebno iz nje izločiti železove ione Potek priprave vzorca za analizo AK, adsorbiranih na nanodelcih z ionsko izmenjevalno kromatografijo je prikazan na sliki 3.2.

Znano maso delcev sem raztopila v 6,2 M HCl kot je prikazano na koraku 1, slike 3.2. V raztopini je železo prisotno v obliki negativno nabitega tetrakloroferatnega kompleksa $[FeCl4]^-$, medtem ko je AK popolnoma protonirana in ima prevladujoč pozitivni naboj. Negativno nabit železov kompleks sem izločala z anionskim izmenjevalcem (Dowex®1x8,100-200mesh, Serva ElectropHoresis Gmbh [60]. Anionski izmenjevalec sem dispergirala v vodi in ga prenesla v kolono. Sledilo je spiranje z vodo in uravnoteženje s 6,2 M HCl. Nato sem v kolono dodajala vzorec z uporabo peristatske črpalke (kot je razvidno s koraka 2 na sliki 3.2). Na koncu sem kolono še sprala s 6,2 M HCl za popolno elucijo AK(koraka 3 in 4, slike 3.2). Zbranemu eluatu sem nastavila pH na 9 s 50 % NaOH. Koncentracijo AK v eluatu, izmerjeno z metodo HPLC, sem preračunala glede na površino zatehtanih nanodelcev.



Slika 3.2: Potek priprave vzorca za analizo AK, adsorbiranih na nanodelcih železovega oksida, z ionsko izmenjevalno kromatografijo.

Poglavje 4

Rezultati

V literaturi je bilo relativno veliko podatkov o adsorpciji AK, vendar pa so si podatki o vplivu na površinske lastnosti nanodelcev železovega oksida pogosto nasprotujoči.

V prvih dveh poglavjih predstavljam rezultate raziskave adsorpcije dveh izbranih AK, ASP in LYS, na predhodno sintetizirane nanodelce. Poznavanje mehanizmov adsorpcije je nujno za uporabo AK pri pripravi stabilnih vodnih suspenzij nanodelcev z načrtovanimi površinskimi lastnostmi. V povezavi z uporabo v medicini je vezava AK na magnetne nanodelce pomembna tudi za njihovo možno dostavo v celice *in vivo* pri zdravljenju nekaterih bolezni. Uporaba AK na površini nanodelcev pa bi bila lahko zelo pomembna tudi v splošnem pri uporabah nanodelcev z direktnim injiciranjem nanodelcev v krvni obtok, saj se pričakuje, da bi lahko nanodelci s površinskim slojem AK izkazovali zelo dolge zadrževalne čase v krvnem obtoku. Adsorpcija AK na površino nanodelcev je pomembna tudi v kontekstu splošne Bernalove hipoteze o nastanku življenja na Zemlji, ki predpostavlja nastanek kompleksnih beljakovin s polimerizacijo AK, adsorbiranih na minerale, kot je železov oksid. Razumevanje interakcij AK s površino nanodelcev je pomembno tudi za razumevanje interakcij nanodelcev z beljakovinami, kar pa je pomembno tako pri uporabi nanodelcev v medicini kot tudi za razumevanje njihove potencialne toksičnosti.

Z adsorpcijo AK na površino nanodelcev (v nadaljevanju oznaka: nanodelci železovega oksida-NDŽO) lahko pripravimo stabilne vodne suspenzije. V svojem delu sem se osredotočila na dve sintezni poti priprave stabilne vodne suspenzije. V prvi dodamo AK v reakcijsko zmes med soobarjanjem Fe^{2+}/Fe^{3+} ionov iz vodne raztopine, medtem ko druga sintezna pot vključuje adsorpcijo AK na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida. Postopek priprave stabilne vodne suspenzije nanodelcev z AK s soobarjanjem iz vodne raztopine železovih ionov je relativno enostaven, poceni in okolju prijazen. Na ta način dobimo koncentrirano vodno suspenzijo nanodelcev z AK.

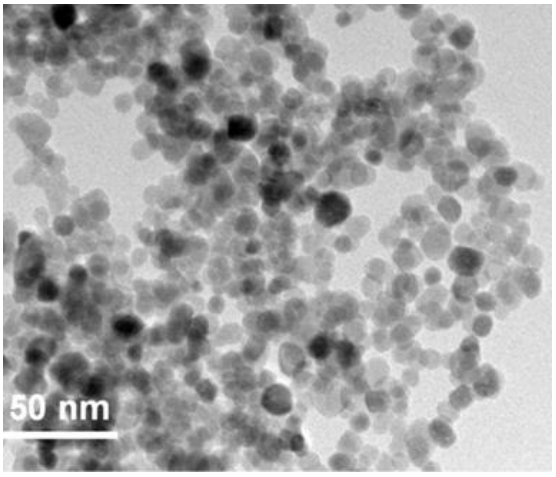
Nanodelci z adsorbiranimi AK, pripravljeni z obema zgoraj omenjenima načinoma, izkazujejo uniformne lastnosti, ki se razlikujejo od nanodelcev NDŽO brez AK. Eksperimentalni rezultati kažejo, da se na površini nanodelcev NDŽO z AK adsorbirajo AK v obliki molekulskih asociatov. Torej, v nadaljnjem delu smo v ta namen preučili vpliv adsorpcije AK na površino nanodelcev NDŽO v odvisnosti od pH in koncentracije, tako da smo spremljali koncentracijo AK tako v supernatantu kot tudi na površini nanodelcev NDŽO.

AK so gradniki proteinov, zato nas je v zadnjem delu zanimal postopek kovalentne vezave aminokislin v peptide na površini predhodno sintetiziranih nanodelcev NDŽO in ovrednotenje njihovih površinskih lastnosti.

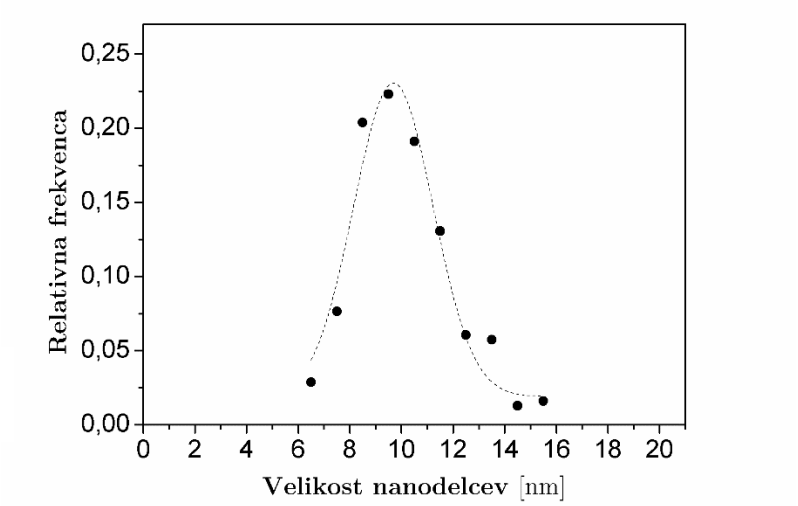
4.1 Lastnosti izhodnih nanodelcev železovega oksida

V raziskavah adsorpcije AK na magnetne nanodelce sem uporabljala magnetne nanodelce železovega oksida. Nanodelce železovega oksida NDŽO-RT sem sintetizirala z metodo soobarjanja ionov Fe^{2+}/Fe^{3+} iz vodne raztopine z dodatkom amonijaka. TEM posnetki sintetiziranih nanodelcev železovega oksida (slika 4.1) so pokazali nanodelce sferične oblike. Velikost nanodelcev, izmerjena iz slik, posnetih na TEM, izražena kot ekvivalentni premer, je bila 9,7 ± 1,5 nm. Tako je izračunana specifična površina (predpostavila sem okroglo obliko nanodelcev in teoretično gostoto maghemita 4,8 g/cm^3) znašala 129 m^2/g. Specifično površino nanodelcev smo izmerili tudi z metodo BET, ki je pokazala vrednost 89,9 m^2/g. Metoda BET običajno pokaže nižjo specifično površino od izračunane iz velikosti nanodelcev. Razlog je v (delni) aglomeraciji nanodelcev med sušenjem (vzorec za meritev BET je bil pripravljen z liofilizacijo suspenzije nanodelcev NDŽO-RT).

a)

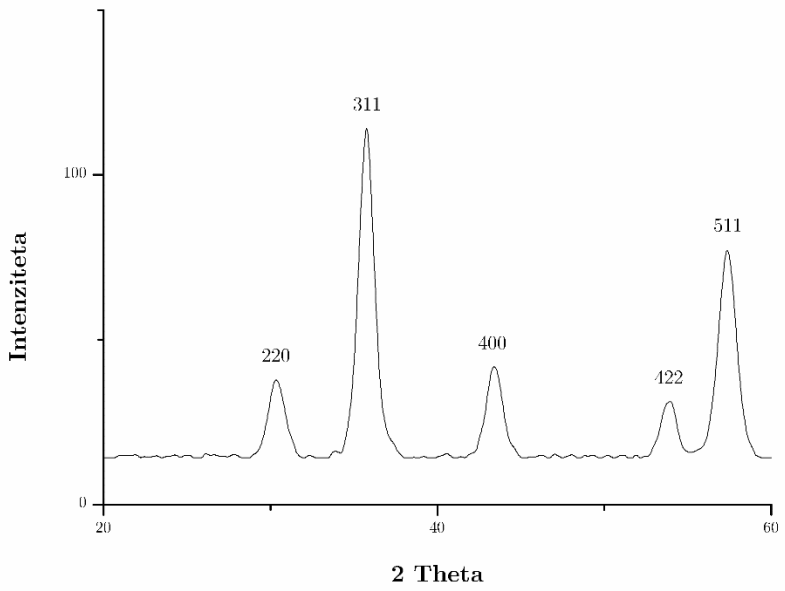


b)



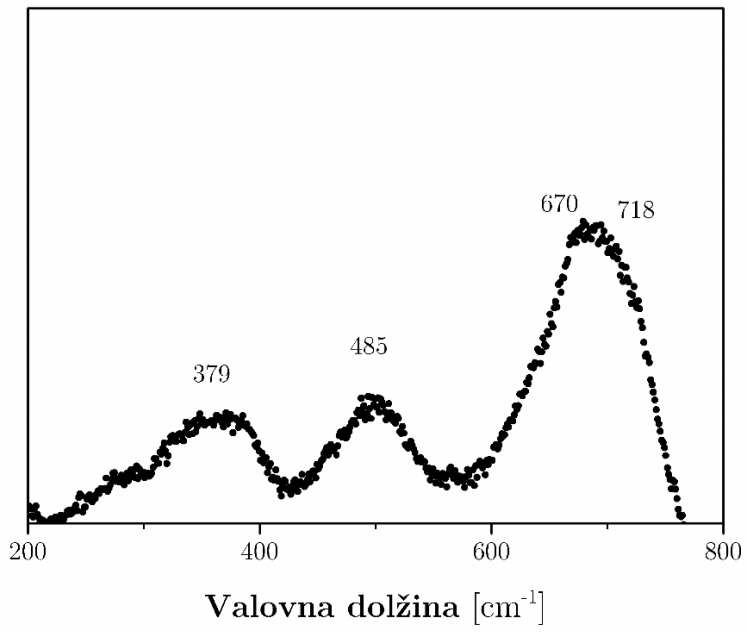
Slika 4.1: a) TEM posnetek sintetiziranih nanodelcev NDŽO-RT in b) porazdelitev njihove velikosti.

XRD analiza nanodelcev NDŽO-RT je pokazala karakteristične uklone, značilne za spinelno strukturo (slika 4.2). S pomočjo Sheererjeve metode in programa Diffrac^{plus}Topas^{TM} sem določila velikost kristalitov. Določena povprečna velikost kristalitov je znašala 10,2 nm, kar se dobro ujema s povprečno velikostjo nanodelca iz TEM posnetkov.



Slika 4.2: Rentgenski difraktogram nanodelcev NDŽO. Ukloni v difraktogramu so indeksirani glede na spinelno strukturo.

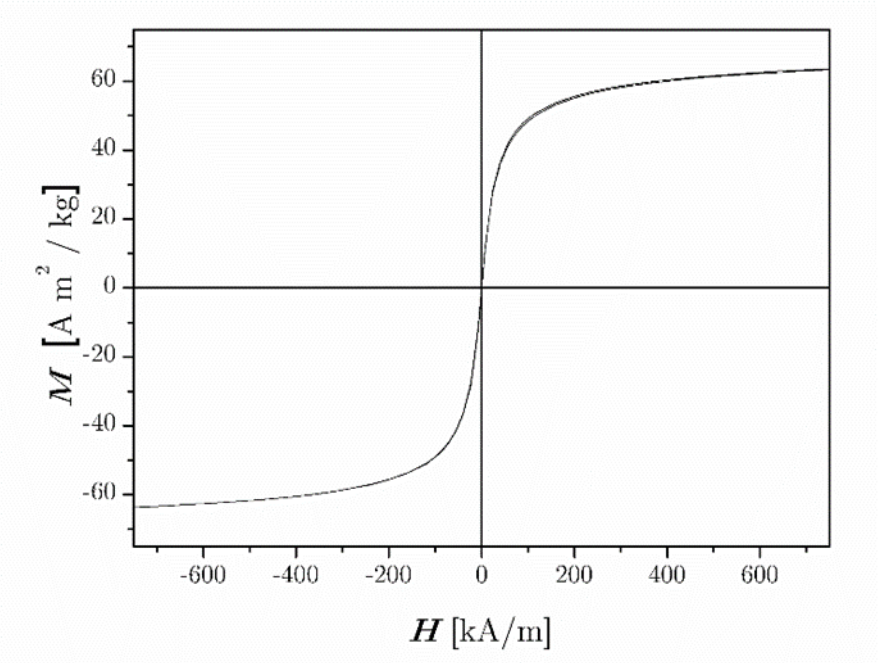
Spinelno strukturo izkazujeta dva železova oksida, magnetit (Fe_3O_4) in maghemit (γ-Fe_2O_3). Slika 4.3 prikazuje Ramanski spekter nanodelcev. Ramanski spekter posušenih nanodelcev NDŽO-RT po sintezi vsebuje široke vrhove pri 379 cm^{-1}, 485 cm^{-1} in asimetričen vrh okoli 690 cm^{-1}. Za slednjega lahko pričakujemo, da je sestavljen iz dveh komponent z vrhoma pri 670 cm^{-1} in 718 cm^{-1}. Tak spekter je značilen za železov oksid maghemit (γ-Fe_2O_3) [16].



Slika 4.3: Ramanski spekter nanodelcev železovega oksida NDŽO-RT.

Nastanek maghemita med sintezo nanodelcev je pričakovan, saj je sinteza potekala na zraku in tako lahko sklepamo, da se je Fe^{2+} v veliki meri oksidiral. Kemijska analiza nanodelcev, sintetiziranih pod enakimi pogoji, je pokazala, da je manj kot 3 % vseh železovih ionov v oksidacijskem stanju 2+ [61]. Verjetno nanodelci že po samem nastanku vsebujejo manj Fe^{2+} kot čisti magnetit. Zaradi svoje majhne velikosti pa se nato s časom nadalje oksidirajo. Oksidacija poteka verjetno na površini nanodelcev. Pričakujemo lahko torej, da so na površini nanodelcev prisotni le ioni Fe^{3+}, medtem ko vsebujejo nanodelci v svoji notranjosti tudi nekaj Fe^{2+}.

Nanodelci NDŽO-RT izkazujejo nasičeno magnetizacijo 63,9 Am^2/kg, kot prikazuje meritev magnetizacije v odvisnosti od jakosti magnetnega polja na sliki 4.4. Krivulja ne izkazuje remanence, kar potrjuje, da gre za superparamagnetni material. Privzeto je, da je vrednost nasičene magnetizacije *M*s odvisna od lastnosti grobozrnatega materiala, prisotnosti (nemagnetnih) nečistoč, velikosti delcev in njihove porazdelitve [62]. *Ms* narašča z deležem Fe^{2+}, ker je vrednost grobozrnatega materiala za magnetit večja (92 Am^2/kg) kot za maghemit (76 Am^2/kg) [63].



Slika 4.4: Magnetizacija nanodelcev NDŽO-RT v odvisnosti od magnetnega polja. Meritev je bila opravljena pri sobni temperaturi.

4.2 Priprava stabilne suspenzije z adsorpcijo aminokislin na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida

Vodna suspenzija nanodelcev po sintezi se hitro posede, saj se nanodelci zaradi svoje velike površine močno aglomerirajo. Za pripravo stabilne suspenzije je potrebno površinske lastnosti nanodelcev prilagoditi tako, da prevladujejo med nanodelci v suspenziji odbojne sile. V vodnih suspenzijah odbojne sile običajno zagotovimo z vezavo nabitih molekul na njihovo površino. S tem povečamo naboj na nanodelcih in zagotovimo elektrostatske odbojne sile med njimi ter s tem preprečimo njihovo aglomeracijo. V svojem delu sem za pripravo stabilnih suspenzij magnetnih nanodelcev železovega oksida uporabljala AK, aspartansko kislino (ASP) in lizin (LYS). Obe AK sem adsorbirala na nanodelce v kislem pri pH 2. Znano je, da se organske kisline vežejo na površino železovih oksidov s tvorbo kelatne vezi med karboksilno skupino in površinskimi ioni železa. Adsorpcija je močno odvisna od pH vrednosti medija [52], [53], [64][17], [54]–[56], [58], [65]–[67], [68]. Sousa in sodelavci [52] pojasnjujejo, da lahko pričakujemo optimalno vrednost za adsorpcijo organskih kislin, ki bo privedla do največje površinske koncentracije adsorbata na površini, pri pH vrednosti med pKa za ligand in pK_S za površino. Maghemit naj bi imel vrednost pK_S okoli 3,3 [52].

Molekula ASP ($HOOC-CH_2-CH-(NH_2)COOH$) ima dve funkcionalni skupini in eno amino skupino (pK_1 = 2,09; pK_2 = 3,86; and pK_3 = 9,82), medtem ko ima molekula LYS ($H_2N-(CH_2)_4-CH-(NH_2)COOH$) eno karboksilno skupino in dve aminoskupini (pK_1 = 2,2, pK_2 = 8,5, in

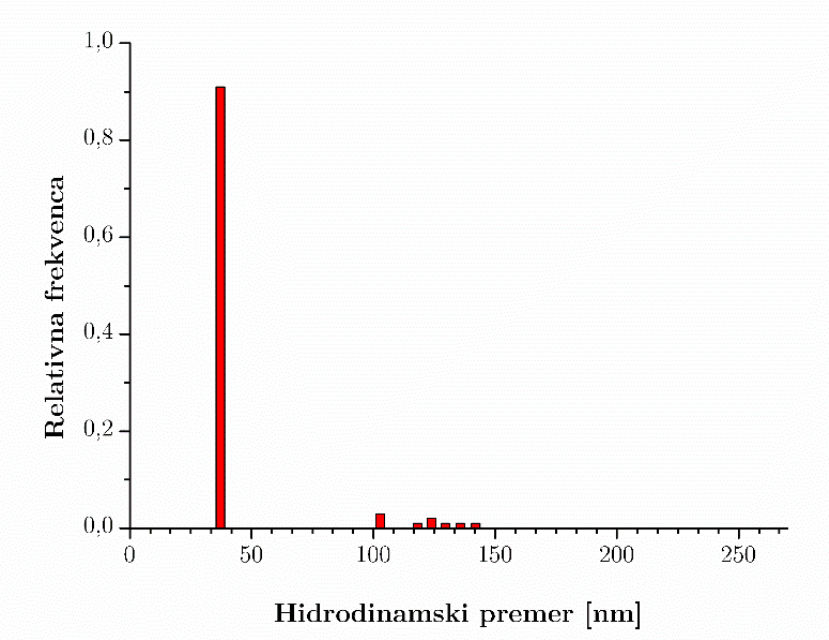
pK_3 = 10,28). Glede na vrednosti pKa za obe AK in pK_S za maghemit, bi pričakovali najmočnejšo adsorpcijo pri vrednosti pH okoli 3.

Eksperimentalno smo pokazali, da pride do adsorpcije obeh AK v največji površinski koncentraciji pri pH = 2, za vrednost pH = 3 pa nismo opravili meritev (glej poglavje 4.3).

AK sem adsorbirala pri pH = 2. Glede na pH raztopine tvorijo AK v vodni raztopini več disociacijskih stanj, ki so povezana s pKa vrednostmi karboksilnih skupin in amino skupin. ASP ima pri pH vrednosti adsorpcije pH = 2 amino skupino in eno od karboksilnih skupin protonirano, druga karboksilna skupina pa je delno disociirana (slika 1.15). Disociirane karboksilne skupine zagotovijo molekulam ASP negativen naboj, medtem ko izkazujejo nanodelci železovega oksida v kislem pozitiven površinski naboj. Nasprotni naboj med molekulami AK in površino pomaga pri privlaku molekul na površino. Dejansko pa pride na površini nanodelcev maghemita do močne kemijske interakcije, kelatne vezi med protoniranimi karboksilnimi skupinami AK in železovimi ioni na površini nanodelcev. Podobno ima pri pH adsorpcije LYS obe amino skupini protonirani in karboksilno skupino delno deprotonirano (slika 1.16).

Po adsorpciji AK ASP ostane suspenzija nanodelcev nestabilna. Da zagotovimo stabilnost, moramo iz suspenzije sprati odvečno AK in uravnati pH na vrednost, ko bodo nanodelci izkazovali največji površinski naboj in se bodo zato med seboj elektrostatsko odbijali. Glede na pK funkcionalnih skupin ASP (slika 1.15) lahko pričakujemo, da bo suspenzija stabilna v bazičnem. Stabilnost suspenzije nanodelcev z adsorbirano ASP v odvisnosti od vrednosti pH sem zasledovala vizualno (spremljanje posedanja zaradi aglomeracije) in z meritvami DLS. Izkazalo se je, da je suspenzija z ASP stabilna v bazičnem, pri pH nad 9. Za podrobnejšo karakterizacijo sem izbrala suspenzijo pri pH = 11.

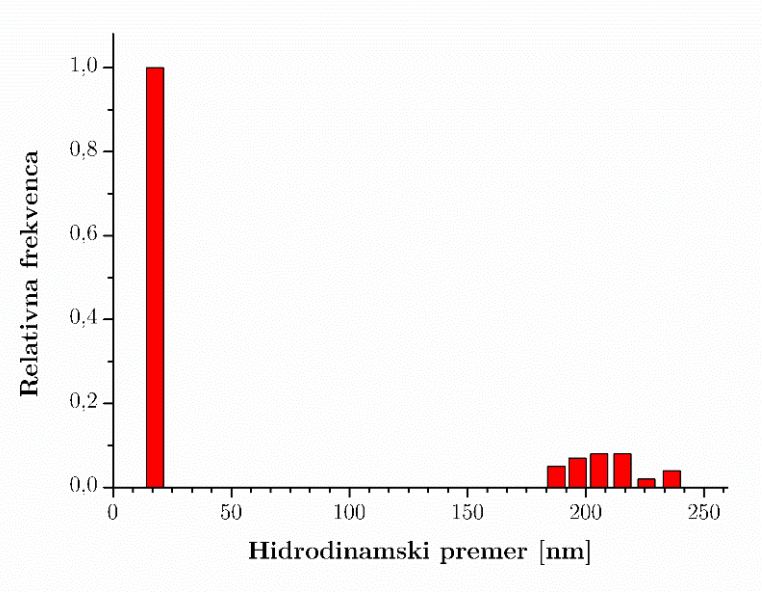
Hidrodinamski premer delcev v suspenziji nanodelcev, stabilizirani z ASP, NDŽO-ASP (koncentracija 2 mg/mL), sem spremljala z metodo DLS. Suspenzija je stabilna od pH 9 dalje. Številska porazdelitev hidrodinamskega premera suspenzije nanodelcev NDŽO-ASP pri pH 11 je prikazana na sliki 4.5. Velika večina delcev izkazuje hidrodinamski premer okoli 37 nm, prisotni pa so še večji delci s hidrodinamskim premerom med 100 in 150 nm. Hidrodinamski premer se nanaša na velikost anorganskega jedra nanodelcev (maghemita) in plasti adsorbiranih molekul/ionov, ki se v raztopini giblje skupaj z jedrom. Predvidevam, da predstavlja 37 nm povprečno vrednost za hidrodinamski premer posameznih nanodelcev NDŽO-ASP v suspenziji. Ta je mnogo večja od velikosti samih anorganskih jeder nanodelcev, ki sem jo določila iz TEM velikosti. Velika razlika med hidrodinamskim premerom, izmerjenim z DLS in velikostjo jeder, kaže na to, da je na površini jeder debelejša plast molekul. Seveda pa je potrebno upoštevati, da je meritev velikosti iz TEM mnogo bolj natančna od meritve DLS. Rezultat meritve DLS se ni spreminjal niti po daljšem času (več tednov), kar kaže na dobro stabilnost suspenzije. Tudi z redčenjem suspenzije z vodo se hidrodinamski premer ni spreminjal. Šele ko sem suspenzijo razredčila pod 0,05 mg/mL, sem opazila počasno flokulacijo.



Slika 4.5: Številska porazdelitev hidrodinamskih premerov nanodelcev NDŽO-ASP v suspenziji (pH = 11, 2 mg/mL).

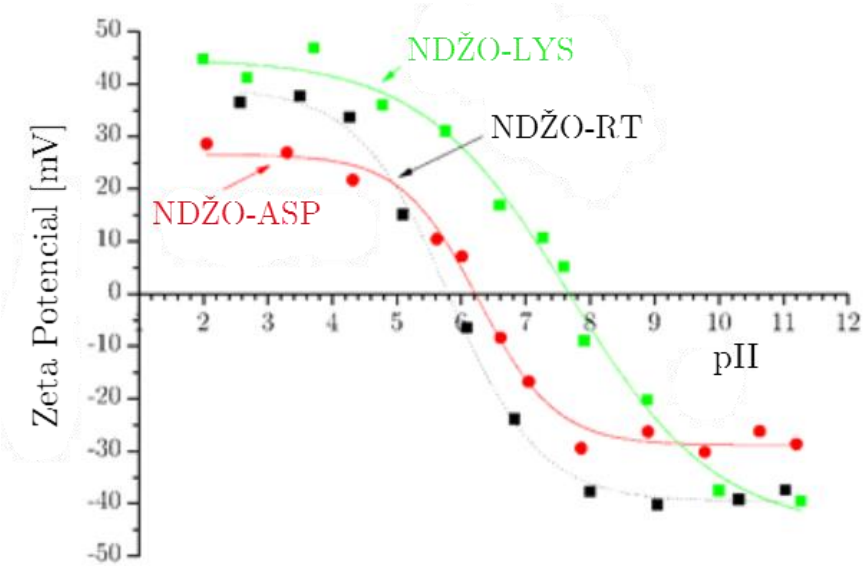
Tudi AK LYS sem adsorbirala na nanodelce železovega oksida pri pH = 2. Glede na pH raztopine tvori AK LYS več disociacijskih stanj, ki so povezane s pKa vrednostmi karboksilne skupine in amino skupin, kot je prikazano na sliki 1.16. Pri pH adsorpcije ima molekula LYS obe amino skupini protonirani, delno deprotonirana karboksilna skupina pa reagira z železovimi ioni na površini nanodelcev.

Po spiranju odvečne AK LYS je bila suspenzija nanodelcev NDŽO-LYS stabilna v kislem, med pH vrednostmi 2 in 4,5, medtem ko se delci posedajo v območju pH med 5 in 9. Nad vrednostjo pH ~ 9 je suspenzija videti stabilna, vendar se po dolgem času delno posede. Za podrobnejšo analizo sem izbrala suspenzijo NDŽO-LYS pri pH = 4. Slika 4.6 prikazuje DLS meritev suspenzije NDŽO-LYS pri pH = 4 (2 mg/mL). Največje število delcev v suspenziji izkazuje hidrodinamski premer okoli 18 nm, prisotno pa je tudi manjše število večjih delcev s hidrodinamskim premerom med 180 in 240 nm. Vrednost 18 nm, ki sem jo pripisala povprečnemu hidrodinamskemu premeru posameznih dispergiranih nanodelcev v suspenziji, je precej manjša kot hidrodinamski premer posameznih nanodelcev NDŽO-ASP, kar nakazuje na to, da je plast LYS na površini nanodelcev manjša od plasti ASP.



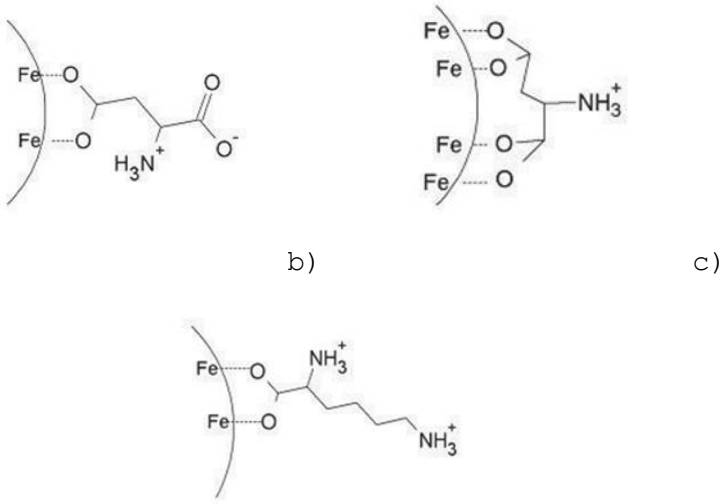
Slika 4.6: Številska porazdelitev hidrodinamskih premerov nanodelcev NDŽO-LYS v supenziji (pH = 4, 2 mg/mL).

Stabilnosti suspenzij nanodelcev, stabiliziranih na osnovi elektrostatskih odbojnih sil med nanodelci, običajno pojasnjujemo na osnovi meritev zeta potenciala. Zeta potencial suspenzij NDŽO-ASP in NDŽO-LYS ter suspenzije NDŽO brez adsorbiranih AK je prikazan na sliki 4.7. Nanodelci NDŽO-RT izkazujejo izoelektrično točko (IEP) okrog pH = 6, v kislem izkazujejo pozitivni naboj zaradi prisotnosti OH_2^+ skupin, v bazičnem negativnega zaradi O^- skupin.



Slika 4.7: Spreminjanje zeta potenciala s pH vrednostjo suspenzij NDŽO-ASP in NDŽO-LYS ter suspenzije NDŽO-RT brez adsorbiranih AK.

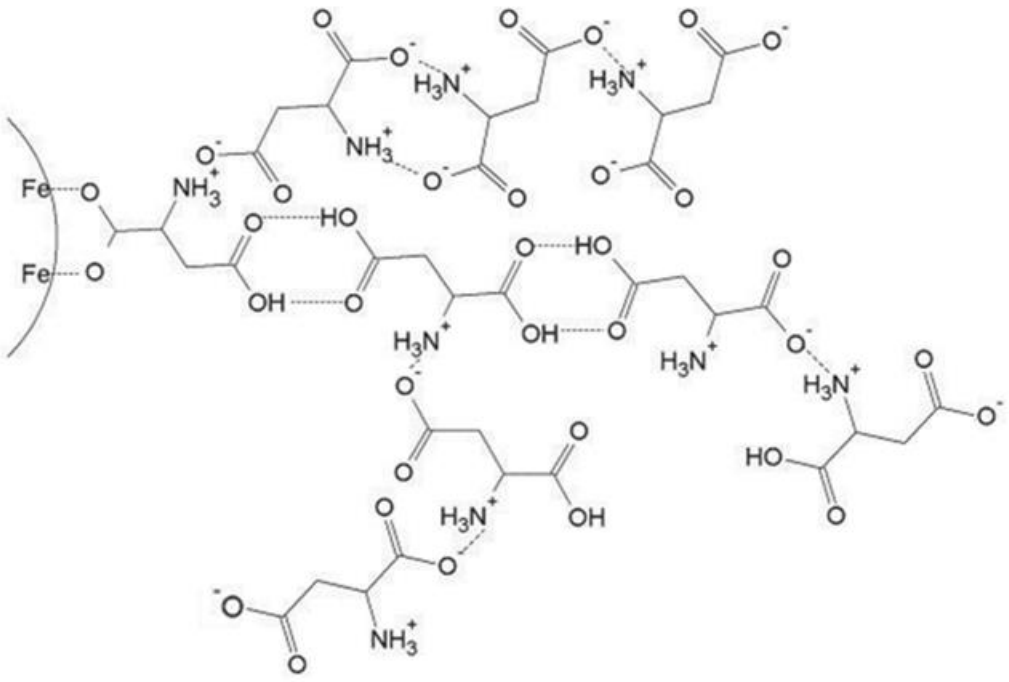
Z adsorpcijo ASP na površino nanodelcev železovega oksida ostane izoelektrična točka skoraj nespremenjena, medtem ko se z adsorpcijo LYS izoelektrična točka nekoliko pomakne proti bazičnim vrednostim, k pH okoli 7,8. V literaturi je na podlagi FTIR in Raman spektroskopije sprejeto, da adsorbirane AK tvorijo kelatno vez med karboksilnimi skupinami in ioni Fe^{3+} na površini nanodelcev [17], [18], [52], [53], [56]. Ker ima ASP dve karboksilni skupini, je možno, da se veže na površino z eno od karboksilnih skupin ali z obema hkrati. Literaturni podatki navajajo, da je preferenčna vezava s stransko karboksilno skupino ali pa z obema karboksilnima skupinama, medtem ko se ASP naj ne bi vezala na površino izključno z α-karboksilno skupino [53], [54]. Na podlagi tega sem predpostavila dva različna modela, kako se ASP adsorbira na površino nanodelcev maghemita. V obeh primerih sem predpostavila adsorpcijo v obliki molekularnega monosloja; z vezavo karboksilne skupine na stranski verigi s površino, kot prikazuje slika 4.8 a, in z vezavo obeh karboksilnih skupin, kot prikazuje slika 4.8 b.



a) b) c)

Slika 4.8: Shematski prikaz vezave ASP (a, b) in LYS (c) na površino nanodelcev maghemita.

V primeru adsorpcije ASP v obliki monosloja z vezavo obeh karboksilnih skupin na površino (slika 4.8 b) bi pričakovali, da se bo izoelektrična točka premaknila v bazično območje, saj so proti mediju obrnjene amino skupine, ki imajo pozitiven naboj. Z adsorpcijo ASP na površino NDŽO pa dejansko ni zaznati spremembe izoelektrične točke. Tako je rezultat meritev zeta potenciala skladen z modelom adsorpcije ASP na površino NDŽO v obliki monosloja z vezavo karboksilne skupine stranske verige na površino. Ker sta v tem primeru tako α-karboksilna skupina kot amino skupina orientirani proti mediju in imata nasproten naboj, ni za pričakovati velikega vpliva na izoelektrično točko. Prav tako pa lahko to, da pri adsorpciji ne pride do spremembe izoelektrične točke, pojasnimo z adsorpcijo ASP v več slojih oziroma v obliki večjih skupkov – molekulskih asociatov, kot je prikazano na sliki 4.9.



Slika 4.9: Shematski prikaz molekulskih asociatov na površini nanodelcev maghemita.

V primeru LYS pričakovan mehanizem adsorpcije ni tako zapleten kot pri ASP. Znano je, da se LYS adsorbira na površino maghemita z alfa karboksilno skupino (slika 4.8 c), medtem ko sta obe amino skupini orientirani proti mediju. Pričakovali bi torej večji premik IEP k bazičnemu pH, vendar pa je meritev zeta potenciala pokazala relativno majhen premik IEP v bazično. Tako majhen premik izoelektrične točke lahko pojasnimo z majhno površinsko koncentracijo adsorbiranega LYS ali pa z adsorpcijo v obliki več plasti molekul oziroma molekulskih asociatov LYS.

Za podrobnejšo razlago površinskih lastnosti nanodelcev ob adsorpciji obeh AK je torej potrebno vedeti, kolikšna je površinska koncentracija AK na površini nanodelcev in kolikšna je koncentracija AK, raztopljene v mediju. Koncentracija AK v suspenziji je določena z intenzivnostjo spiranja nanodelcev po adsorpciji. Obe koncentraciji AK v suspenziji smo določili z analizo HPLC. Iz stabilne suspenzije sem izločila nanodelce z ultracentrifugiranjem. HPLC analiza supernatanta predstavlja koncentracijo AK, raztopljene v mediju. Za določitev koncentracije adsorbirane AK sem posedene nanodelce raztopila in izločila železove ione. Iz rezultatov HPLC analize raztopine sem izračunala površinsko koncentracijo AK, ki je bila adsorbirana na nanodelcih. Pri tem sem upoštevala površino, izračunano iz povprečne velikosti nanodelcev, določene s TEM (129 m^2/g). V tabeli 4.1 so predstavljene lastnosti stabilnih suspenzij z adsorbirano ASP in LYS. Iz koncentracij AK v supernatantu in na nanodelcih, izmerjenih s HPLC analizo, lahko sklepam, da so na nanodelcih NDŽO molekule AK vezane v več slojih oziroma kot molekulski asociati. Koncentracija obeh AK v supernatantih stabilnih suspenzij je relativno majhna, na površini nanodelcev pa je zelo velika površinska koncentracija AK. Tako je v suspenziji nanodelcev NDŽO-ASP, stabiliziranih z ASP (2mg/mL, pH = 11), izmerjena

koncentracija ASP v supernatantu 32 mg/L. Nasprotno je koncentracija ASP adsorbirana na nanodelcih NDŽO-ASP relativno zelo velika; 0,49 g ASP je adsorbirano na g NDŽO. Izračunana površinska koncentracija ASP na površini je tako 28,7 μmol/m^2, kar ustreza adsorbiranim 17 molekulam ASP na nm^2. Tako visoke površinske koncentracije nikakor ne moremo pojasniti z adsorpcijo v obliki monosloja molekul.

V primeru suspenzij nanodelcev NDŽO-LYS, stabiliziranih z LYS (2mg/mL, pH = 4), je bila izmerjena koncentracija LYS v supernatantu nekoliko višja kot v primeru ASP (91 mg/L), koncentracija LYS, adsorbiranega na nanodelcih, pa je bila nekoliko nižja kot pri ASP, 0,12 g LYS je ostalo adsorbirano na g NDŽO. Tako je koncentracija LYS na površini 6,4 μmol/m^2, kar ustreza adsorbiranim približno 5 molekulam LYS na nm^2. Tudi v tem primeru ne moremo govoriti o monosloju molekul na površini, saj predvidevam, da zasede posamezna molekula AK, kot je LYS ali ASP, okoli 0,5–1 nm^2 površine.

Tabela 4.1: Lastnosti suspenzij z adsorbiranimi aminokislinami (ξ-potencial, hidrodinamski premer d_{DLS} in koncentracije aminokislin v supernatantu in na nanodelcih, izmerjene s HPLC metodo).

AK	pH □/□	ξ-potencial □mV□	d_{DLS} □nm□	Koncentracija AK	
				Supernatant □mg/L□	Na nanodelcih NDŽO □μmol/m^2□
ASP	11,0	-28	37	32	28,7
LYS	4,0	+30	18	91	6,4

Na podlagi rezultatov, izmerjenih s HPLC metodo, lahko sklepamo, da se ASP ne adsorbira na površino nanodelcev NDŽO v obliki molekularnega monosloja, temveč tvorijo molekule ASP na površini molekulske asociate (slika 4.9). V asociatu so molekule med seboj povezane z elektrostatskimi interakcijami med funkcionalnimi skupinami z nasprotnim nabojem. V kislem lahko na povezovanje molekul v asociate dodatno vplivajo vodikove vezi. Tvorba asociatov AK v vodnih raztopinah in suspenzijah nanodelcev je podrobneje obravnavana v poglavju 4.3 v nadaljevanju.
Vezava molekul AK na površino nanodelcev NDŽO v obliki asociatov je lahko razlog, zakaj kljub velikemu številu adsorbiranih molekul ASP ni spremembe v izoelektrični točki. Naboji prostih funkcionalnih skupin molekul na površini se med seboj (delno) izničijo ob elektrostatskem povezovanju v asociat. Na vezavo v obliki asociatov kaže tudi velika razlika v hidrodinamski velikosti nanodelcev (37nm) v primerjavi z velikostjo anorganskih jeder nanodelcev, izmerjeno z uporabo TEM (10 nm). Rezultati kažejo, da se molekule LYS na površino NDŽO adsorbirajo v manjših molekulskih asociatih kot molekule ASP. Od tod tudi razlog za manjši povprečen hidrodinamski premer nanodelcev, stabiliziranih z LYS (18 nm), v primerjavi s hidrodinamskim premerom nanodelcev, stabiliziranih z ASP (37 nm).

Zanimivo je tudi dejstvo, da so suspenzije nanodelcev NDŽO-ASP in NDŽO-LYS popolnoma koloidno stabilne kljub relativno nizki absolutni vrednosti zeta potenciala. Odbojne sile med nanodelci in s tem koloidno stabilnost suspenzij lahko namreč neposredno povežemo z absolutno vrednostjo izmerjenega zeta potenciala. Znano je, da naj bi izkazovala suspenzija, stabilizirana na osnovi elektrostatskih odbojnih sil, absolutno vrednost nad 30 mV, da bi

bila koloidno stabilna [69]. Dejansko sem pri suspenziji NDŽO-ASP (pH = 11) izmerila vrednost zeta potenciala -28 mV in pri suspenziji NDŽO-LYS (pH = 4) vrednost +30 mV (tabela 4.1). Verjetno je, da sta obe suspenziji dodatno stabilizirani sterično z relativno debelo plastjo molekul, adsorbiranih v obliki molekulskih asociatov.

4.3 Adsorpcija aminokislin na površino nanodelcev železovega oksida

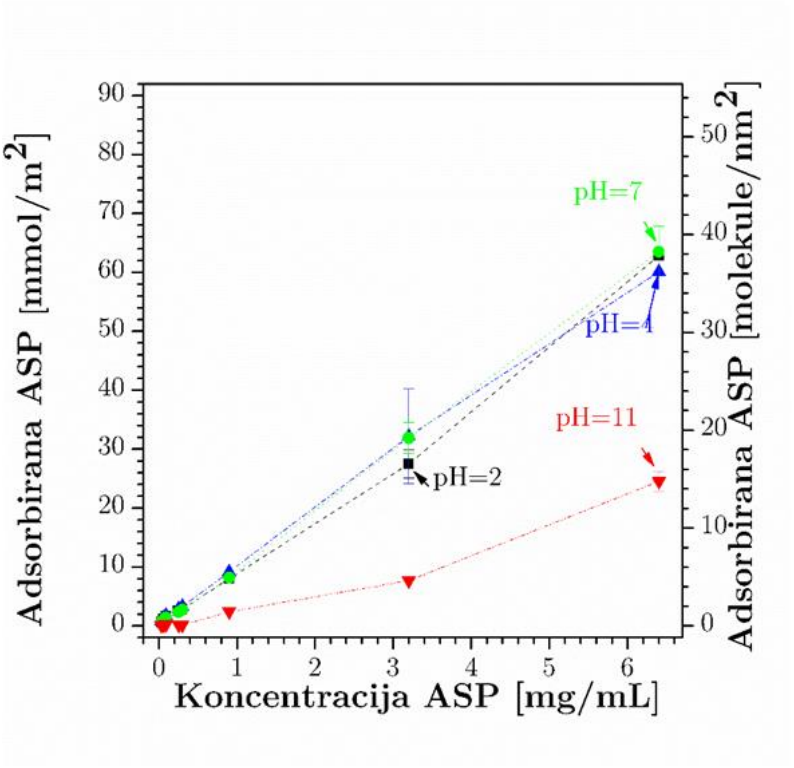
HPLC analiza supernatanta in nanodelcev stabilne suspenzije, pripravljene z adsorpcijo AK (ASP, LYS) na predhodno sintetizirane nanodelce maghemita, je pokazala, da se na površino nanodelcev maghemita AK adsorbira v več slojih, oziroma v obliki tako imenovanih molekulskih asociatov.

V pričujočem poglavju bom prikazala rezultate podrobne študije adsorpcije obeh AK (ASP, LYS) na površino nanodelcev maghemita. Znano množino nanodelcev NDŽO (0,1 g, ocenjena površina 12,3 m^2) sem v vodni suspenziji (45 mL) izpostavila različnim koncentracijam AK (0,03–6,4 mg/mL). Po daljšem času, ko se je vzpostavilo ravnotežje, smo nanodelce izločili z ultracentrifuganjem in z analizo HPLC določili koncentracijo AK v supernatantu. Koncentracijo AK, adsorbirane na nanodelcih, sem izračunala iz razlike med množino dodane AK in nevezane AK, določene v supernatantu. Adsorpcijske izoterme AK sem določala v odvisnosti od pH (adsorpcijo smo ovrednotili pri pH = 2, 4, 7 in 11).

4.3.1 Adsorpcija aspartanske kisline na površino nanodelcev železovega oksida

Na sliki 4.10 je prikazana gostota adsorbiranih molekul ASP na površini nanodelcev NDŽO v odvisnosti od koncentracije ASP v suspenziji pri različnih pH vrednostih. Na levi abscisi je prikazana površinska koncentracija AK na nanodelcih v $\mu mol/m^2$, na desni pa površinska koncentracija v številu molekul na nm^2 površine. Rezultati kažejo, da gostota adsorbiranih molekul ASP narašča linearno s koncentracijo v suspenziji in ne kaže nasičenja. Prav tako je razvidno, da doseže koncentracija adsorbiranih molekul ASP na nanodelcih pri velikih koncentracijah dodane ASP relativno zelo visoke vrednosti. Tako je pri najvišji koncentraciji dodane ASP, 6,4 mg/mL, adsorbiranih 37 molekul ASP na nm^2 površine nanodelcev NDŽO. To jasno potrjuje našo predpostavko, da se AK veže na površino nanodelcev v obliki molekulskih asociatov. Najvišja koncentracija ASP, 6,4 mg/mL, ustreza 2,88 g ASP na g nanodelcev NDŽO (ASP/ NDŽO = 2,88). Pri tej koncentraciji dodane ASP je dejansko že presežena topnost ASP v vodi [70]. Kljub temu pa se vsa ASP raztopi v suspenziji nanodelcev, saj je ASP v veliki meri adsorbirana na površini nanodelcev. Da sem lahko nadalje povečevala masno razmerje ASP/ NDŽO, sem količino nanodelcev v suspenziji zmanjševala, medtem ko je ostala koncentracija ASP pri 6,4 mg/mL. S povečevanjem razmerja med ASP in nanodelci je količina ASP, ki se po centrifugiranju izloči iz suspenzije skupaj z delci, nadalje naraščala. Tako je pri masnem razmerju med ASP/ NDŽO = 28,8 gostota adsorbiranih molekul ASP dosegla zelo veliko vrednost preko 1500 $\mu mol/m^2$. Seveda pa je potrebno pri tem upoštevati napako meritve, ki je v tem primeru relativno velika.

Zaradi spreminjanja površinskega naboja nanodelcev in stopnje disociacije ASP (slika 1.15) bi pričakovali, da bo adsorpcija ASP močno odvisna od vrednosti pH suspenzije [70]. Nasprotno pa so meritve pokazale relativno zelo majhno odvisnost površinske koncentracije adsorbirane ASP od pH. Pri pH vrednostih do vključno pH 7, vrednost pH suspenzije ni imela znatnega vpliva na gostoto adsorbiranih molekul ASP na površini nanodelcev. V primeru adsorpcije pri pH 11 pa se je gostota adsorbiranih molekul ASP na površini nanodelcev znatno zmanjšala, a kljub temu dosegla vrednost 15 molekul ASP na nm^2 površine nanodelcev pri najvišji koncentraciji dodane ASP.



Slika 4.10: Gostota adsorbiranih molekul ASP na površini nanodelcev NDŽO v odvisnosti od koncentracije ASP v suspenziji pri različnih pH vrednostih.

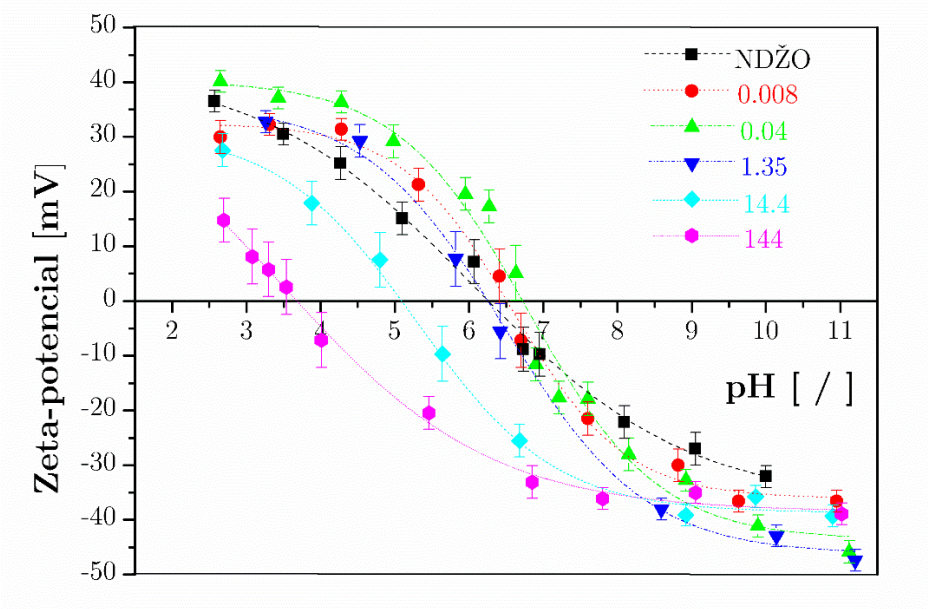
Meritve adsorpcijskih izoterm jasno potrjujejo vezavo AK na površino nanodelcev v obliki molekulskih asociatov. Pri tem se pojavlja pomembno vprašanje: ali je nastanek molekulskih asociatov dejansko povezan s koncentracijo AK, oziroma drugače povedano, ali molekulski asociati na površini nanodelcev nastajajo samo pri višjih koncentracijah AK? Ali se pri nižjih koncentracijah AK lahko adsorbira na površini nanodelcev v obliki monosloja brez tvorbe asociatov?

Da bi odgovorila na ta vprašanja, sem AK adsorbirala v zelo nizkih površinskih koncentracijah. Za analizo suspenzij v tem primeru ne moremo uporabljati HPLC analize, saj so koncentracije ASP pod mejo detekcije. Kakšen je način vezave ASP na površino nanodelcev pri zelo majhnem razmerju ASP/ NDŽO, sem zato sklepala na osnovi meritev zeta potenciala kot funkcije pH suspenzije. V 45 mL suspenzij z 0,01 mg/ml nanodelcev NDŽO sem dodala ASP v različnih masnih razmerjih ASP/ NDŽO pri nizkem pH. Nizek pH = 2

je omogočil adsorpcijo ASP na površino nanodelcev s kelatnimi vezmi med karboksilnimi skupinami ASP in površinskimi Fe^{3+}. Po času, namenjenemu temu, da se vzpostavi ravnotežje, sem izmerila zeta potencial v odvisnosti od vrednosti pH, pri čemer sem pH višala z dodajanjem NaOH.

Slika 4.11 prikazuje rezultate meritev zeta potenciala v odvisnosti od pH suspenzij nanodelcev z adsorbirano ASP in različnimi masnimi razmerji ASP/ NDŽO. Meritve kažejo, da izoelektrična točka nekoliko naraste, če na nanodelce vežemo ASP v zelo nizkem masnem razmerju ASP/ NDŽO. Pri najvišji pH vrednosti je bila izmerjena izoelektrična točka pri razmerju ASP/ NDŽO = 0,04. Premik v izoelektrični točki je bil glede na izoelektrično točko »čistih« nanodelcev NDŽO (IEP = 6,4) sicer zelo majhen, vendar lahko na osnovi velikega števila opravljenih meritev ocenim, da je signifikanten. Razmerje ASP/ NDŽO = 0,04 ustreza adsorbiranim 1,4 molekulam ASP na nm^2 površine nanodelcev NDŽO. Pričakovati je, da se ASP adsorbira na površino nanodelcev v tako imenovanem monosloju in so adsorbirane molekule v ravnotežju z raztopljenimi molekulami ASP. Tako naraščanje izoelektrične točke lahko pripišemo adsorpciji ASP z vezavo obeh karboksilnih skupin na površino nanodelcev. ASP je zato orientirana z amino skupino, orientirano proti mediju, kot prikazuje slika 4.8 b.

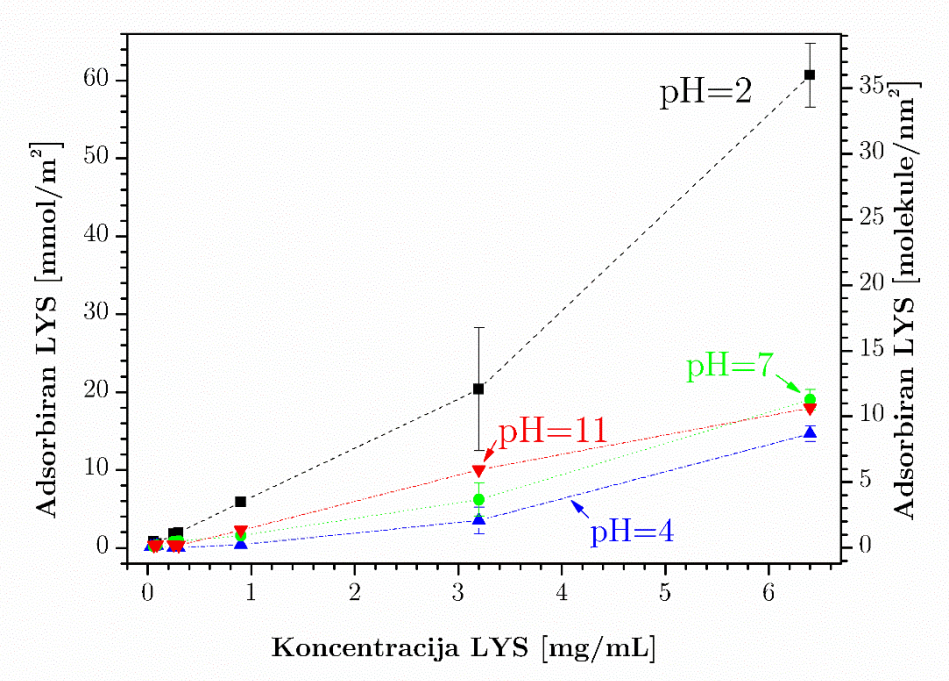
Če adsorbiramo ASP v večjih razmerjih ASP/ NDŽO, se izoelektrična točka nanodelcem premakne proti nižjim vrednostim pH in z naraščajočim razmerjem nadalje pada. Zmanjševanje izoelektrične točke lahko pripišemo nastanku molekulskih asociatov, pri čemer je z naraščanjem masnega razmerja med ASP/ NDŽO v suspenziji vedno več molekul ASP povezanih v asociat, adsorbiran na površino nanodelcev, orientirano s karboksilnimi skupinami navzven proti topilu. Absolutna vrednost zeta potenciala v kislem pada s koncentracijo dodane ASP, kar lahko pripišemo naraščanju ionske moči zaradi presežka raztopljene ASP.



Slika 4.11: Zeta potencial suspenzij NDŽO z ASP v odvisnosti od pH pri različnih masnih razmerjih med ASP/ NDŽO.

4.3.2 Adsorpcija lizina na površino nanodelcev železovega oksida

V primeru LYS je adsorpcija bolj občutljiva na pH kot pri ASP. Tudi v primeru LYS niti pri največjih preučevanih dodatkih LYS ne dosežemo nasičenja površine nanodelcev z adsorbiranimi molekulami. Na sliki 4.12 je prikazana gostota adsorbiranih molekul LYS na površini nanodelcev NDŽO v odvisnosti od koncentracije LYS v suspenziji pri različnih pH vrednostih. Rezultati kažejo, da je gostota adsorbiranih molekul LYS največja pri pH = 2, primerljiva z gostoto molekul ASP. Pri višjih vrednostih pH se adsorbira mnogo manj LYS. Kljub temu ostajajo površinske koncentracije pri velikem dodatku LYS relativno velike, kar nedvoumno kaže na adsorpcijo v obliki molekulskih asociatov. Pri pH = 4 in koncentraciji dodanega LYS 6,4 mg/ml (LYS/ NDŽO = 2,88) se je na površino nanodelcev NDŽO adsorbiralo okoli 9 molekul LYS na nm^2. Tako kot pri adsorpciji ASP tudi pri adsorpciji LYS na površino nanodelcev nisem opazila nasičenja površine, niti če sem močno povečala razmerje LYS/ NDŽO z zmanjševanjem vsebnosti nanodelcev pri maksimalni koncentraciji LYS 6,4 g/ml.

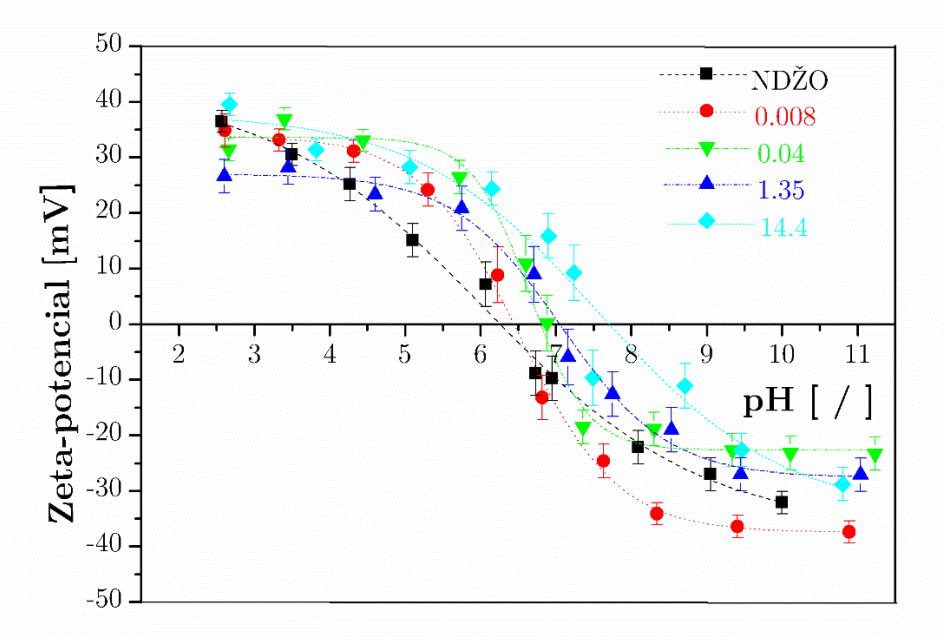


Slika 4.12: Gostota adsorbiranih molekul LYS na površini nanodelcev NDŽO v odvisnosti od koncentracije LYS v suspenziji pri različnih pH vrednostih.

Rezultati kažejo, da tudi v primeru adsorpcije LYS na površino nanodelcev NDŽO lahko govorimo o adsorpciji v obliki molekulskih asociatov. Kot pri ASP sem tudi v primeru LYS adsorpcijo raziskala tudi z meritvami zeta potenciala v širokem območju razmerij LYS/ NDŽO (za podrobnosti meritev glej poglavje o adsorpciji ASP).

Slika 4.13 prikazuje rezultate meritev zeta potenciala v odvisnosti od pH suspenzij nanodelcev z adsorbiranim LYS v različnih masnih razmerjih LYS/ NDŽO. Meritve kažejo, da izoelektrična točka počasi narašča z naraščajočo koncentracijo

dodanega LYS. Pričakovati gre, da se molekule LYS adsorbirajo na površino nanodelcev NDŽO s karboksilno skupino v obliki monosloja pri nižjih koncentracijah LYS (slika 4.8 c), medtem ko se pri višjih koncentracijah molekule LYS povežejo v molekulske asociate. Ker so molekule v obeh primerih orientirane z amino skupinami proti mediju, pa na osnovi meritev zeta potenciala med obema možnostma adsorpcije (monosloj/asociati) ne pričakujemo razlike. Meritve pokažejo, da se koncentracija amino skupin, ki prispevajo k zeta potencialu nanodelcev, z večanjem razmerja LYS/ NDŽO povečuje, saj se izoelektrična točka premika k višjim pH vrednostim.



Slika 4.13: Zeta potencial suspenzij NDŽO z adsorbiranim LYS v odvisnosti od pH pri različnih masnih razmerjih med LYS/ NDŽO.

4.3.3 Sočasna adsorpcija dveh aminokislin, ASP in LYS, na nanodelce železovega oksida

Na površino nanodelcev železovega oksida sem pri različnih pH vrednostih (pH 4, pH 7 in pH 11) istočasno adsorbirala tudi obe AK, ASP in LYS pri ekvimolarnem razmerju. Celokupna koncentracija AK v suspenziji je bila 3,2 mg/mL in masno razmerje AK / NDŽO = 1,44. Suspenzijo sem po adsorpciji ultracentrifugirala in analizirala supernatant z metodo HPLC.

Rezultati meritev koncentracije AK, ki ostane v supernatantu suspenzije po ultracentrifugiranju nanodelcev (tabela 4.2), kažejo, da se tudi pri sočasni adsorpciji ASP in LYS obe AK adsorbirata v relativno visoki površinski koncentraciji neodvisno od vrednosti pH. Pri pH = 4 se pri sočasnem dodatku obeh AK adsorbira na nanodelcih okoli 0,5 g obeh AK na g NDŽO. Izračunana površinska koncentracija obeh AK na nanodelcih ustreza adsorbiranim 16 molekulam na nm^2, od tega je na površini več LYS (10 molekul /nm^2) kot ASP (6 molekul/nm^2). Večja adsorpcija LYS kot ASP na nanodelcih je zanimiva, saj je bil pri vezavi posamezne

AK trend prav nasproten. Pri dodatku posamezne kisline v AK se je na nanodelce vezalo 17 molekul ASP/nm^2 in le 3 molekule LYS /nm^2 (tabela 4.2).

Tudi pri sočasni adsorpciji obeh AK pri višjih pH vrednostih je ostal trend enak – vezalo se je več LYS kot ASP. V primeru posameznega dodatka AK je z višanjem pH površinska koncentracija adsorbiranih molekul padala. V primeru sočasne adsorpcije pa je površinska koncentracija molekul nekoliko padla pri pH = 7 (2 molekuli ASP/nm^2 in 6 molekul LYS /nm^2) in se zopet povečala pri pH = 11 (6 molekul ASP/nm^2 in 9 molekul LYS /nm^2).

Velika površinska koncentracija adsorbiranih molekul AK kaže na to, da tudi v primeru sočasne adsorpcije dveh AK pride do vezave molekul na površino nanodelcev v obliki molekulskih asociatov. Pri visokem pH = 11 je bila koncentracija adsorbiranih AK na površini nanodelcev bistveno višja kot v primeru adsorpcije samo ene od AK. To lahko pojasnimo z ugodnejšimi interakcijami med različnimi molekulami v asociatu v primerjavi z enakimi molekulami. Pričakovane so predvsem povečane elektrostatske interakcije med amino skupinami LYS in karboksilnimi skupinami ASP. Razmerje interakcij med molekulami v asociatu je verjetno odgovorno tudi za več adsorbirane LYS kot ASP v primeru sočasne adsorpcije.

Tabela 4.2: Izmerjena koncentracija AK v supernatantu suspenzij nanodelcev NDŽO, adsorbiranih posamič (ASP, LYS) in istočasno (ASP+LYS) na površino nanodelcev NDŽO. Celokupna koncentracija AK v suspenziji je bila 3,2 mg/mL in masno razmerje AK / NDŽO = 1,44.

AK	Konc .AK v suspenziji		pH /	Konc .AK v supernatantu		Adsorbirana ASP/LYS
	ASP [g /L]	LYS [g/ L]		ASP [g /L]	LYS [g /L]	molekule/nm²
ASP	3,2	/		2,1	/	17
LYS	/	3,2	4	/	3,0	3
ASP+LYS	1,5	1,7		1,1	1,0	6 ASP+10 LYS
ASP	3,2	/		2,1	/	14
LYS	/	3,2	7	/	2,9	4
ASP+LYS	1,5	1,7		1,4	1,3	2 ASP+6 LYS
ASP	3,2	/		2,5	/	11
LYS		3,2	11	/	3,1	1,5
ASP+LYS	1,5	1,7		1,1	1,1	6 ASP+9 LYS

4.4 Asociacija molekul aminokislin v vodnih raztopinah

Adsorpcija AK na površino nanodelcev železovega oksida je odvisna od urejanja molekul AK v obliki molekulskih asociatov v suspenziji. Zanimivo vprašanje je, ali se AK povezujejo v molekulske asociate že v vodni raztopini brez prisotnih nanodelcev? Prisotnost molekulskih asociatov ASP in LYS v vodni raztopini in suspenziji nanodelcev smo študirali z metodo določevanja znižanja zmrzišča. Znižanje zmrzišča je koligativna lastnost raztopine in je torej odvisno le od števila raztopljenih delcev. Z asociacijo se število delcev v raztopini zmanjša in je zato znižanje zmrzišča manjše, kot bi ga pričakovali zaradi nominalne koncentracije topljenca.

Rezultati, predstavljeni v tabeli 4.3, kažejo, da je osmolalnost raztopine ASP s koncentracijo 30,1 mmol/L (pH = 3,2) izmerjena s pomočjo umeritvene krivulje KCl, 13,98 mosm/L, medtem ko je osmolalnost LYS s koncentracijo 21,9 $mmolL^{-1}$ (pH = 9,7), 10,2 mosm/L. Izmerjena osmolalnost (π) je nižja od osmolalnosti idealne raztopine ($\pi_{id.}$) neasociiranih molekul.

Simbol π, ki v splošnem označuje osmotski tlak, je uporabljen s posebnim namenom. Osmolalnost je namreč direktno povezana z osmotskim tlakom raztopine v zvezi $\pi = cRT$, pri čemer je c koncentracija osmotsko aktivnih zvrsti, R plinska konstanta in T temperatura. Vrednost $\pi/\pi_{id} = c/c_{id.}$ ($c_{id.}$ je koncentracija delcev v idealni raztopini AK, kjer ne poteka disociacija COOH skupin oziroma asociacija molekul), ki je manjša od 1, nakazuje, da so molekule topljenca asociirane v vodni raztopini pri njenem intrinzičnem pH.

Stopnjo disociacije (nastanek dimerov, trimerov in asociatov z večjim nedoločenim številom molekul, n-merov) smo izračunali iz izmerjene osmolalnosti raztopin AK in suspenzij nanodelcev z adsorbirano AK. V vseh primerih tako za raztopine ASP, LYS kot suspenzije z adsorbirano ASP, LYS se izkaže, da je stopnja tvorbe dimerov nerealna, kajti stopnja asociacije nastanka dimera je več kot 100 %. To nakazuje, da je asociacija zelo kompleksna in vključuje asociacijo več kot dveh molekul. Stopnja asociacije nastanka tri-merov je v primeru raztopine ASP 82 % in n-merov 55 %, medtem ko je stopnja asociacije raztopine LYS med 87 % za nastanek tri-merov in 56 % za nastanek n-merov. Omenjene stopnje asociacije so grobi približki, kajti pričakovati je, da v raztopini dejansko poteka asociacija v več stopnjah, torej v sistemu nimamo opravka samo s prisotnostjo di-merov, samo tri-merov ali n-merov, pač pa s kombinacijo vseh.

Tudi v suspenzijah nanodelcev NDŽO z adsorbirano ASP in LYS (2 mg/mL) je merjena osmolalnost nižja, kot je osmolalnost v raztopini. Osmolalnost je znašala 11,57 $mosmL^{-1}$ za suspenzijo nanodelcev, ki je vključevala 30,1 $mmolL^{-1}$ ASP (pH = 3,2) in 9,15 $mosmL^{-1}$ za suspenzijo nanodelcev z 21,9 $mmolL^{-1}$ LYS (pH = 9,6). Omenjeni vrednosti osmolalnosti za suspenziji z adsorbirano ASP in LYS sta nižji kot vrednosti osmolalnosti za čiste raztopine ASP in LYS, predvsem zaradi adsorpcije AK na nanodelce. V primeru meritve znižanja zmrzišča nanodelcev brez adsorbiranih AK ni bilo izmerjenih razlik v znižanju zmrzišča.

Rezultati znižanja zmrzišča kažejo, da AK tvorijo molekulske asociate že v sami raztopini. Adsorpcija AK na nanodelce v obliki molekulskih asociatov, ki je razvidna iz HPLC analiz suspenzij, je torej povsem pričakovana.

Tabela 4.3: Osmolalnost in stopnja asociacije za raztopine ASP in LYS ter suspenzije nanodelcev z adsorbiranimi ASP in LYS.

Vzorec	c □mmol/L□	pH □/□	osmolalnost □mosm□	π/π_{id} □/□	Stopnja asociacije		
					dimeri □%□	trimeri □%□	n-meri □%□
Raztopina ASP	31	3,2	13,98	0,45	110	82	56
Suspenzija ASP	31	3,2	11,57	0,37	126	94	63
Raztopina LYS	21	9,7	10,12	0,46	104	78	56
Suspenzija LYS	21	9,7	9,15	0,41	118	88,5	59

4.5 Komentar adsorpcije aminokislin na nanodelce železovega oksida

Meritve adsorpcijskih izoterm z neposrednim določanjem koncentracij AK v supernatantih suspenzij niso pokazale nasičenja površine z adsorbatom do najvišjih raziskovanih koncentracij dodanih AK. AK se na površino adsorbirajo v zelo veliki površinski koncentraciji, mnogo večji od pričakovane na osnovi vezave AK v obliki monosloja. Površinska koncentracija adsorbirane ASP se v kislem in nevtralnem ni bistveno spreminjala z vrednostjo pH, v bazičnem (pH = 11) pa se je zmanjšala. Največja površinska koncentracija absorbiranega LYS je bila določena po adsorpciji LYS pri pH 2, že po adsorpciji pri pH = 4 pa je bistveno padla in se pri nadaljnjem višanju pH ni bistveno spreminjala.

V nasprotju z našimi rezultati so Sousa in sodelavci [52] določili na osnovi meritev prevodnosti suspenzij nanodelcev NDŽO, da sledi adsorpcija ASP Langmuirjevi adsorpcijski izotermi. Površinska koncentracija adsorbirane ASP na maghemitnih nanodelcih se je močno nižala z vrednostjo pH, vendar pa je prišlo do nasičenja površine pri zelo veliki površinski koncentraciji adsorbirane ASP – pri pH = 3 se je adsorbiralo do okoli 150 □mol ASP/m^2. V članku sicer avtorji zelo visokih površinskih koncentracij ne izpostavijo. Šele ocena koncentracije v obliki števila molekul na nm^2 površine pokaže, da so površinske koncentracije previsoke za adsorpcijo v obliki monosloja. Koncentracija 150 mol ASP/m^2 ustreza namreč adsorpciji okoli 90 molekul ASP na nm^2 površine.

Viota in sodelavci [58] so ovrednotili adsorpcijo LYS na nanodelce železovega oksida z uporabo kolorimetrične metode z ninhidrinom. Tudi v tem primeru so pojasnjevali adsorpcijo z izotermo Langmuirjevega tipa, pri čemer pa so opazili nasičenje površine le pri najvišjih dodatkih LYS pri nizkih vrednostih pH. Površinska koncentracija adsorbiranega LYS na nanodelcih je bila močno odvisna od pH, pri čemer je bila najnižja v kislem, višja v nevtralnem in se je ponovno znižala v bazičnem. Največja izmerjena vrednost je bila okoli 0,17 mol/m^2 (pH = 7), kar ustreza 1 molekuli

LYS na 10 nm^2 površine (0,1 molekula LYS /nm^2) [58]. V naši študiji smo torej izmerili mnogo višje vrednosti površinskih koncentracij LYS na nanodelcih maghemita kot v raziskavi Viote in sodelavcev.

Razlike med rezultati naših meritev adsorpcije obeh AK in literaturnimi podatki bi lahko delno pripisali različnim nečistočam, prisotnim v suspenzijah. Nečistoče, ki so adsorbirane na površini nanodelcev pred adsorpcijo AK, določajo površinske lastnosti v vodni suspenziji. Nanodelce NDŽO sem sintetizirala s soobarjanjem iz sulfatnih raztopin železovih ionov z amonijakom, torej lahko v suspenziji sintetiziranih nanodelcev kljub intenzivnemu spiranju pričakujemo ione SO_4^{2-} in NH_4^+. Da bi ovrednotila vpliv teh ionov na adsorpcijo AK, sem naredila tudi eksperiment, v katerem sem sintetizirane nanodelce sprala 10-krat bolj intenzivno kot v običajnih eksperimentih. Običajno sem za spiranje nanodelcev uporabila razredčeno amonijakalno raztopino pri pH = 10,5. Naredila pa sem tudi eksperiment, kjer sem nanodelce po sintezi posebno intenzivno sprala z raztopino NaOH pri pH = 10,5 in z destilirano vodo. Niti kvantifikacija adsorpcije obeh AK z metodo HPLC niti meritve odvisnosti zeta potenciala od pH niso pokazale signifikantnih razlik med vzorci, spranimi z različnimi mediji. Po analizi HPLC se je adsorbiralo na nanodelcih enako AK ne glede na način spiranja (v mejah pričakovane napake meritve).

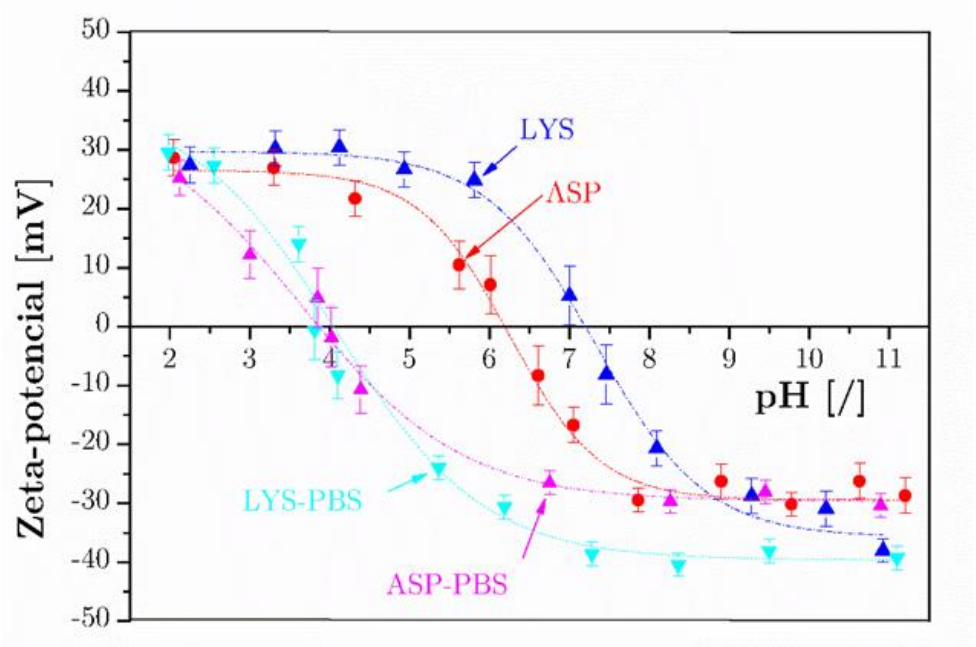
Adsorpcijo lahko predstavimo kot izmenjavo šibko vezanega liganda na površini nanodelcev z adsorbatom, AK. Tako lahko ioni, ki imajo močno interakcijo s površino železovega oksida, v veliki meri vplivajo na mehanizem adsorpcije [50], [67]. Ion, pri katerem je za razliko od inertnega sulfatnega iona pričakovati močnejšo interakcijo s površino železovega oksida, je nitrat (NO_3^-). Tako imenovana peptizacija suspenzije nanodelcev železovih oksidov z dušikovo kislino je običajen postopek priprave kislih stabilnih suspenzij [44], [71]. Da bi ovrednotila možen vpliv nitratnega iona na adsorpcijo, sem vrednost pH suspenzije za adsorpcijo (pH = 2) nastavila s HNO_3 namesto s HCl. Vendar pa analiza vzorcev, pripravljenih z adsorpcijo AK, v prisotnosti nitratnih ionov ni pokazala signifikantnega vpliva nitratnih ionov. Količine AK v supernatantih suspenzij in tudi zeta potencial nanodelcev se ni signifikantno razlikoval od adsorpcije brez posebne obdelave z nitratom.

Naše meritve adsorpcije obeh AK na nanodelcih železovega oksida kažejo zelo velike vrednosti površinskih koncentracij, ki jih nikakor ne moremo pripisati adsorpciji molekul v enem sloju. Očitno gre za adsorpcijo v več slojih oziroma v obliki molekularnih asociatov. Meritve znižanja zmrzišča raztopin obeh AK so pokazale, da se asociati tvorijo že v samih raztopinah. Adsorpcijo si lahko v prvem približku predstavljamo torej kot vezavo asociatov na površino nanodelcev. Znano je, da se AK vežejo na nanodelce železovega oksida s koordinativno vezjo med karboksilnimi skupinami AK in površinskimi železovimi ioni. Verjetno imobilizacija prvega sloja molekul ali molekulskih asociatov na površini nanodelcev omogoči nadaljnjo vezavo molekul AK iz raztopine in s tem večanje asociatov na površini nanodelcev. Predpostavili smo, da se v kislem območju pH molekule povezujejo v asociate z vodikovo vezjo, pri višjih vrednostih pH pa asociate združujejo elektrostatske interakcije med nabitimi amino in karboksilnimi skupinami (glej sliko 4.9). Pri visokih vrednostih pH sta obe funkcionalni skupini deprotonirani, zato ne izkazujeta posebnega naboja. Vseeno pa so molekule AK polarne in zato molekule vseeno ostanejo delno povezane v asociate. Na primer, pri pH vrednosti 11 je množina ASP, vezana na nanodelce, zaradi delnega razpada asociatov bistveno nižja kot pri nižjih vrednostih pH, vendar pa površinske koncentracije ASP kljub temu presegajo

10 molekul na nm^2, kar je bistveno previsoka površinska koncentracija za adsorpcijo v obliki monosloja.

Predvidevamo lahko, da so sile med molekulami v asociatu pri visokih pH vrednostih relativno šibke in so zato asociati dokaj fleksibilni. Na nastanek molekulskih asociatov ima tako lahko velik vpliv sama priprava suspenzij (vpliv mešanja, vpliv ultracentrifugiranja). To se je dejansko odrazilo v relativno visoki napaki meritev. Tako je pri koncentraciji ASP 6,4 mg/mL relativna napaka adsorpcije, ki vključuje pripravo suspenzije in določitev koncentracije ASP v supernatantu z metodo HPLC, ± 7%, medtem ko znaša relativna standardna deviacija same meritve HPLC ±4,3 %.

Adsorpcija AK v obliki relativno slabo definiranih molekulskih asociatov lahko predstavlja oviro pri uporabah suspenzij nanodelcev. Zaradi asociatov nanodelci ne izkazujejo površinskega naboja, kot bi ga pričakovali pri adsorpciji v obliki monosloja. To seveda zmanjšuje možnost, da bi AK uporabljali za uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev. Vezi med molekulami znotraj asociata so relativno šibke in močno odvisne od pH. Ni povsem realno pričakovati, da bi lahko na funkcionalne skupine površinskega sloja AK na nanodelce vezali (konjugirali) različne (makro)molekule, ki jih potrebujemo za specifične uporabe. Na primer, različni raziskovalci [52], [53], [67] so predvideli, da bi lahko uporabili sloj adsorbiranih AK za funkcionalizacijo nanodelcev, torej za vmesno plast na površini nanodelcev, ki zagotovi na površini specifične funkcionalne skupine za nadaljnjo konjugacijo različnih molekul (zdravilnih učinkovin, tarčnih ligandov, fluoroforjev itd.), potrebnih za uporabo v medicini. Pričakujemo lahko, da bo asociat po vezavi makromolekule razpadel in konjugirana molekula se bo sprostila s površine. Asociati lahko tudi razpadejo v prisotnosti drugih (nabitih) molekul. Da bi ilustrirala ta problem, sem nanodelce z adsorbiranimi AK, ASP in LYS dispergirala v fosfatni pufer (phosphate-buffered saline – PBS), ki se običajno uporablja za testiranja nanodelcev v biomedicinskih raziskavah. Meritve zeta potenciala v odvisnosti od pH nanodelcev, izločenih iz PBS in redispergiranih v destilirani vodi, so pokazale, da pride po izpostavi PBS do velike spremembe v zeta potencialu nanodelcev. Slika 4.14 prikazuje meritve zeta potenciala nanodelcev v vodni suspenziji po izpostavitvi PBS in pred tem. Po izpostavitvi PBS se izoelektrična točka nanodelcev v vodni suspenziji premakne k pH 4. Premik v izoelektrični točki lahko pojasnim z zamenjavo ligandov – AK, adsorbirana na površini nanodelcev, se je v PBS izmenjala s hidrogen fosfatnimi in dihidrogen fosfatnimi ioni. Za nanodelce z adsorbiranimi fosfatnimi ioni lahko pričakujemo izoelektrično točko v kislem, ravno pri pH vrednosti okoli 4.



Slika 4.14: Primerjava meritev zeta potenciala nanodelcev železovega oksida v odvisnosti od pH vodne suspenzije za nanodelce z adsorbirano AK pred in po izpostavitvi PBS.

4.6 Priprava stabilne suspenzije nanodelcev železovega oksida z dodatkom aminokisline v reakcijsko zmes med soobarjanjem železovih ionov

Potrebe po velikih količinah stabilnih vodnih suspenzij magnetnih nanodelcev se bodo povečale z razvojem novih tehnologij, ki temeljijo na uporabi magnetnih nanodelcev, predvsem tehnologij, vezanih na magnetno separacijo, kot je na primer separacija mikroorganizmov v pridelavi pijač [72]. Velike količine suspenzij magnetnih nanodelcev z uravnanimi površinskimi lastnostmi se bodo potrebovale tudi pri novih okoljskih tehnologijah, na primer za čiščenje vode z adsorpcijo onesnažil (težkih kovin, strupenih molekul) na nanodelce oziroma z razgradnjo onesnažil z uporabo katalitskih kompozitov, ki vsebujejo magnetne delce, da omogočijo magnetno izločanje materialov po čiščenju iz vode [73], [74]. Zaradi svoje cenenosti in nestrupenosti so kot stabilizatorji suspenzij nanodelcev posebno primerne AK. Stabilne suspenzije nanodelcev železovega oksida z uravnavanimi površinskimi lastnostmi lahko pripravimo na dva načina: z adsorpcijo AK na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida ali z dodatkom AK v reakcijsko zmes med soobarjanjem nanodelcev iz vodne raztopine Fe^{2+}/Fe^{3+} ionov. Slednja metoda je preprostejša, saj poteka v eni stopnji in je zato primerna za pripravo vodnih suspenzij magnetnih nanodelcev, t. i. vodnih magnetnih tekočin, tudi na industrijskem nivoju. V slednjem primeru AK vpliva na mehanizem nastanka nanodelcev tekom soobarjanja.

Da bi preučila vpliv prisotnosti AK na nastanek nanodelcev železovega oksida, sem nanodelce, sintetizirane v prisotnosti ASP,

primerjala z nanodelci, sintetiziranimi brez AK. V naslednjem podpoglavju bom predstavila, kakšen je vpliv ASP na lastnosti sintetiziranih nanodelcev. Pri analizi vpliva ASP na lastnosti nanodelcev se nisem osredotočila le na vpliv ASP na nanodelce, sintetizirane pri sobni temperaturi, ampak sem primerjala lastnosti nanodelcev, sintetiziranih brez ASP in z ASP pri različnih pogojih sinteze. Izbrali smo take pogoje sinteze, ki so relevantni za uravnavanje velikosti nanodelcev med sintezo. Za večino omenjenih uporab namreč želimo nanodelce maghemita z velikostjo na meji superparamagnetnosti, ki je pri velikosti okoli 15 nm. Taki nanodelci izkazujejo namreč največjo magnetizacijo, pri čemer so še vedno superparamagnetni. Superparamagnetnost omogoči pripravo stabilnih suspenzij, saj se večji nanodelci, ki sicer lahko izkazujejo še višjo magnetizacijo, v suspenziji aglomerirajo zaradi magnetnih interakcij. Podatki o vplivu ASP na možnost spreminjanja velikosti nanodelcev med sintezo so posebno pomembni pri prenosu postopka sinteze iz laboratorijskega nivoja v masovno proizvodnjo.

4.6.1 Vpliv dodatka aspartanske kisline na lastnosti sintetiziranih nanodelcev železovega oksida

Z namenom, da bi raziskala vpliv ASP na lastnosti nastalih nanodelcev, sem najprej analizirala sam vpliv različnih parametrov sinteznega postopka nanodelcev maghemita brez dodane ASP. Pri tem sem se osredotočila na parametre, ki jih običajno izrabljamo za vplivanje na velikost nanodelcev med obarjanjem železovih ionov. Za večino aplikacij se namreč zahteva uporaba nanodelcev z ozko porazdelitvijo velikosti okoli 15 nm, ki so na zgornji meji velikosti, da še izkazujejo superparamagnetnost.

4.6.1.1 Sinteza nanodelcev železovega oksida brez dodatka aspartanske kisline

Nanodelci železovega oksida nastanejo z reakcijo Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov v vodni raztopini z $(OH)^-$ v seriji kompleksnih reakcij [16]. Ob počasnem dodatku baze se najprej oborijo Fe^{3+} ioni pri pH okoli 2,8 in nastane FeOOH. Pri nadaljnjem zviševanju pH se okoli vrednosti 6 obori še Fe^{2+} in reagira s predhodno oborjenim FeOOH, da nastane spinelni ferit, najprej magnetit, ki pa se na zraku, če je v obliki majhnih nanodelcev, običajno povsem oksidira v maghemit. Po hitrem dodatku baze raztopini Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov so reakcije zelo hitre že, če poteka obarjanje pri sobni temperaturi. Hitre ionske kemijske reakcije, sprožene s hitrim dodatkom baze, privedejo do velikega prenasičenja produktov in tako do hitre homogene nukleacije trdnih delcev. Zaradi hitre nukleacije nastane veliko število nukleusov, rast pa je omejena, zato dobimo majne delce – nanodelce. Običajno se vsi reaktanti porabijo skoraj izključno za nukleacijo, rasti pa skoraj da ni. Po kratkem času, ko se za reakcije nastanka trdnih produktov porabijo vsi reaktanti, železovi ioni, se lahko velikost nanodelcev spreminja še z rekristalizacijo, t. i. Ostwaldovo pogrobitvijo, pri kateri večji nanodelci v reakcijski zmesi rastejo na račun manjših nanodelcev, ki se raztapljajo. Sinteza soobarjanja nanodelcev, sintetiziranih pri sobni temperaturi, v splošnem ne dopušča veliko možnosti za uravnavanje velikosti nanodelcev. Običajno lahko uporabimo tri pristope:

1. Nanodelce oborimo pri sobni temperaturi, nato pa reakcijsko zmes segrejemo. Velikost nanodelcev s tem povečamo z Ostwaldovo pogrobitvijo pri povišani temperaturi. Če poteka segrevanje v zaprti posodi (avtoklavu) in temperatura preseže vrelišče (100 °C), govorimo o hidrotermalni obdelavi. Pri tem na procese v reakcijski mešanici vpliva tudi povišan tlak v avtoklavu (ravnotežni tlak vodne pare).
2. Nanodelce oborimo pri povišani temperaturi. S tem pospešimo tako procese med obarjanjem kot tudi Ostwaldovo pogrobitev.
3. Velikost nanodelcev med obarjanjem pri sobni temperaturi lahko povečamo tudi z dodajanjem hidroksida v dveh stopnjah. Najprej raztopini Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov dvignemo vrednost pH na 3, da oborimo Fe^{3+}. Z zadrževanjem okoli 30 min pri pH = 3 dosežemo, da se poveča velikost oborjenih nanodelcev FeOOH, to pa verjetno vpliva na končno povečanje velikosti nanodelcev maghemita, ki nastanejo pri končnem, hitrem dodatku hidroksida.

V tabeli 4.4. so zbrane lastnosti nanodelcev železovega oksida, ki sem jih sintetizirala brez dodatka ASP po zgoraj razloženih pristopih.

Lastnosti nanodelcev, oborjenih z enkratnim, hitrim dodatkom amonijakalne raztopine raztopini železovih ionov, so podrobneje prikazane v poglavju 4.1. Globularni nanodelci maghemita so izkazovali velikost, izmerjeno iz XRD d_{XRD} = 10,2 nm (slika 4.2), in velikost, izmerjeno iz TEM d_{TEM} = 9,7±1,5 nm (slika 4.1). Bili so superparamagnetni in so izkazovali nasičeno magnetizacijo M_S = 63,9 Am^2kg^{-1} (slika 4.4).

Za povečanje velikosti nanodelcev sem železove ione oborila pri sobni temperaturi in nato reakcijsko zmes segrevala pri povišanih temperaturah, da bi omogočila rast nastalih nanodelcev v suspenziji s procesom Ostwaldove pogrobitve. Pri nanodelcih, oborjenih pri sobni temperaturi in naknadno segrevanih pri 80 °C za 30 minut (vzorec NDŽO-RT-80), se je velikost povečala (na d_{XRD} = 16,3 nm (slika 4.15) in d_{TEM} = 14,2±2,2nm (slika 4.16 b in tabela 4.4)). Nanodelci so ohranili globularno obliko in relativno ozko porazdelitev velikosti. Zaradi večje velikosti so izkazovali večjo magnetizacijo M_s = 64,6 Am^2kg^{-1} kot nanodelci NDŽO-RT, oborjeni pri sobni temperaturi. Ker pa ima manjši delež nanodelcev že velikost nad mejo superparamagnetnosti, kažejo že znatno remenencoM_R = 1,6 Am^2kg^{-1} (slika 4.17, tabela 4.4).

Velikost nanodelcev lahko nadalje povečamo tako, da delce, oborjene pri sobni temperaturi, obdelamo hidrotermalno pri povišanem tlaku in temperaturi. S tem močno izboljšamo pogoje za rast nanodelcev z mehanizmom Ostwaldove pogrobitve. Po hidrotermalni obdelavi nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi za 30 minut, pri 160 °C (vzorec NDŽO-RT-HT-160) so nanodelci večinoma sferične oblike s premerom d_{TEM} = 16,6±4,5 nm (slika 4.16 c in tabela 4.4). S povečevanjem temperature hidrotermalne obdelave na 200 °C (vzorec NDŽO-RT-HT-200) se je končna velikost nanodelcev povečala na d_{TEM} = 17,3±2,5 nm. Nanodelci izkazujejo oktaedrično obliko, značilno za spinelne ferite (slika 4.16 d). Oboji nanodelci, pripravljeni z naknadno hidrotermalno obdelavo, izkazujejo velikosti nad mejo za superparamagnetnost. Nanodelci, hidrotermalno obdelani pri 200 °C, so izkazovali najvišjo nasičeno magnetizacijo M_S = 69,8 Am^2kg^{-1} in vrednost remanence M_R = 5,3 Am^2kg^{-1} (slika 4.17). Nasičena magnetizacija teh nanodelcev se že približuje vrednosti za grobozrnat maghemit (74 Am^2kg^{-1}) [8].

Velikost nanodelcev pa lahko povečamo tudi tako, da nanodelce oborimo pri povišani temperaturi. Slika 4.16 e prikazuje nanodelce NDŽO-80, sintetizirane s soobarjanjem z dodatkom raztopine amonijaka k raztopini železovih ionov, segrete na 80 °C pod refluksom. Dejanska temperatura v reakcijski mešanici je bila sicer nekoliko nižja (76 °C), ker pride do vretja amonijaka. Nanodelci izkazujejo relativno neenakomerno porazdelitev velikosti. Velikost, izmerjena iz TEM posnetkov, je bila sicer relativno majhna, d_{TEM} = 11,4±5,5 nm. Znatno večja je bila velikost, izmerjena z XRD (d_{XRD} = 14.9 nm). To nakazuje na veliko porazdelitev velikosti nanodelcev, saj na XRD neproporcionalno vplivajo veliki nanodelci, medtem ko pri TEM verjetno večje nanodelce zaradi njihove poudarjene aglomeracije izgubimo. Vrednost nasičene magnetizacije je bila relativno nizka, M_S = 63,1 Am^2kg^{-1}, če upoštevamo izmerjeno velikost nanodelcev.

Uporaba segrevanja za uravnavanje velikosti nanodelcev lahko predstavlja slabost. Predvsem pri masovni proizvodnji nanodelcev bi se običajno radi segrevanju izognili. Znano je, da lahko velikost nanodelcev, sintetiziranih s soobarjanjem železovih ionov pri sobni temperaturi, povečamo v dveh korakih [75]. Najprej se pri pH = 3 Fe^{3+} obori kot FeOOH [16]. Po krajšem času, namenjenem rasti delcev vmesnega produkta FeOOH pri pH = 3, dodamo v drugi stopnji preostanek baze za obarjanje Fe^{2+}. Oborjeni Fe^{2+} reagira z delci FeOOH in tako nastane končni produkt, nanodelci železovega oksida. Nanodelci NDŽO-RT-2step so bili sintetizirani z dodatkom hidroksida v dveh stopnjah, kjer je v prvi stopnji potekalo staranje oborjenega FeOOH pri pH = 3 za 30 minut, šele nato pa je bil v drugi stopnji dodan preostanek hidroksida. Velikost nanodelcev se glede na nanodelce, oborjene v eni stopnji, znatno poveča d_{TEM} = 13,7±2,9nm (slika 4.16 f), d_{XRD} = 14,5 nm. Nanodelci ne kažejo remanence. Izmerjena vrednost nasičene magnetizacije je bila relativno visoka, M_S = 66,1 Am^2kg^{-1}.

Tabela 4.4: Eksperimentalni pogoji, uporabljeni pri sintezi nanodelcev železovega oksida brez dodatka ASP, in njihove lastnosti.

Vzorec	**ASP/Fe^{3+} [/]**	**Fe_{tot} [mmol/L]**	**Dodatek amonijaka**	***T_{prec}* [°C]**	***T_{age}* [°C]**	**Priso-tne faze [b]**	***d_{XRD}* [nm]**	***D_{TEM}* [nm]**	***M_S*[a] [Am^2/kg]**	***M_R* [Am^2/kg]**
NDŽO-RT	0	50	One-step	25	25	S	10,2	9,7±1,5	63,9	0,3
NDŽO-RT-80	0	50	One-step	25	80	S	16,3	14,2±2,2	64,6	1,6
NDŽO-RT-HT-160	0	50	One-step	25	160	S	19	16,6±4,5	67,0	5,1
NDŽO-RT-HT-200	0	50	One-step	25	200	S	22	17,3±2,5	69,8	5,3
NDŽO-80	0	50	One-step	80	73	S	14,9	11,4±5,5	63,1	1,9

NDŽO-RT-2step	0	50	Two-step	25	25	S	14,5	13,7 ±2,9	66,1	>0,1

Legenda:

ASP/ Fe^{3+} – molsko razmerje med ASP in Fe^{3+}

Fe_{tot} – celokupna koncentracija železovih (Fe^{3+}+ Fe^{2+})

One-step/ Two step – dodatek amonijaka v eni ali dveh stopnjah, T_{prc} – temperatura obarjanja

T_{age} – temperatura staranja

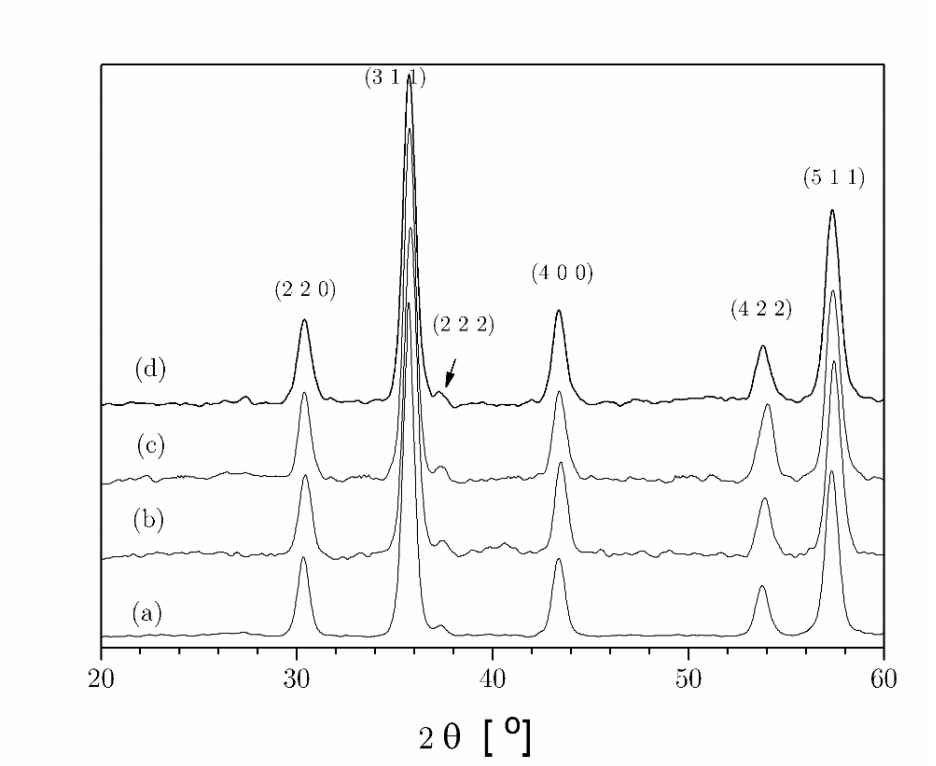
d_{XRD} – velikost kristalita, določena iz XRD

D_{TEM} – velikost, določena s TEM posnetkov

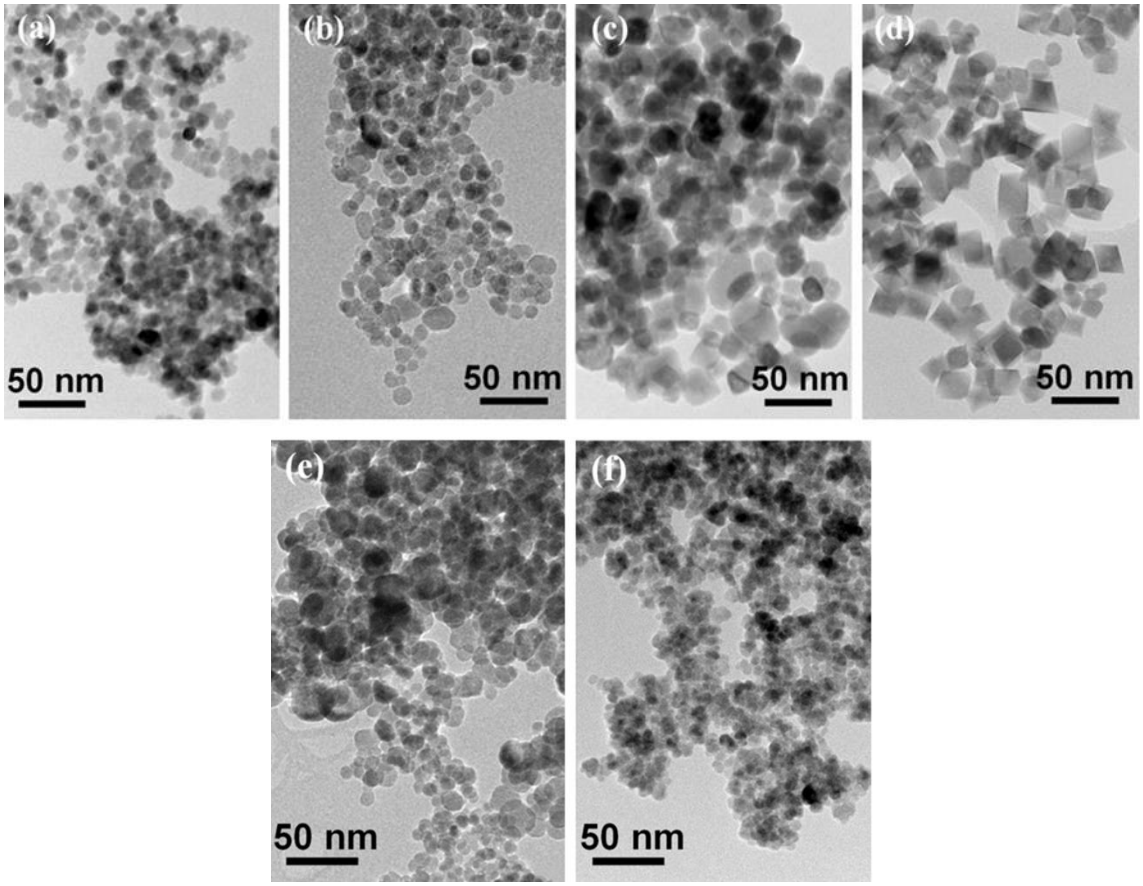
M_S – nasičena magnetizacija

M_R – remanentna magnetizacija

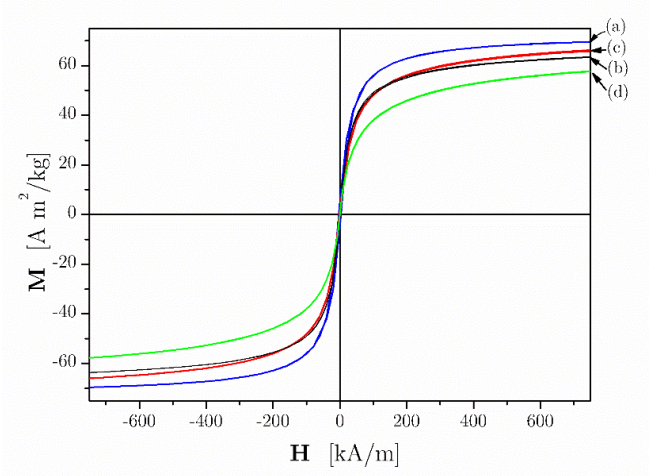
[a] vrednost nasičene magnetizacije Ms nanodelcev železovega oksida, je bila normalizirana na delež Fe_2O_3, določen s termogravimetrično metodo
[b] S-spinel ferite



Slika 4.15: Difraktogrami izbranih nanodelcev, oborjenih iz raztopin Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov brez ASP ((a) NDŽO-RT, (b) NDŽO-RT-80, (c) NDŽO-RT-HT-160, (d) NDŽO-80).



Slika 4.16: TEM posnetki nanodelcev, oborjenih iz raztopin Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov brez dodane ASP ((a) NDŽO-RT, (b) NDŽO-RT-80, (c) NDŽO-RT-HT-160, (d) NDŽO-RT-HT-200 (e) NDŽO-80, (f) NDŽO-RT-2 step).

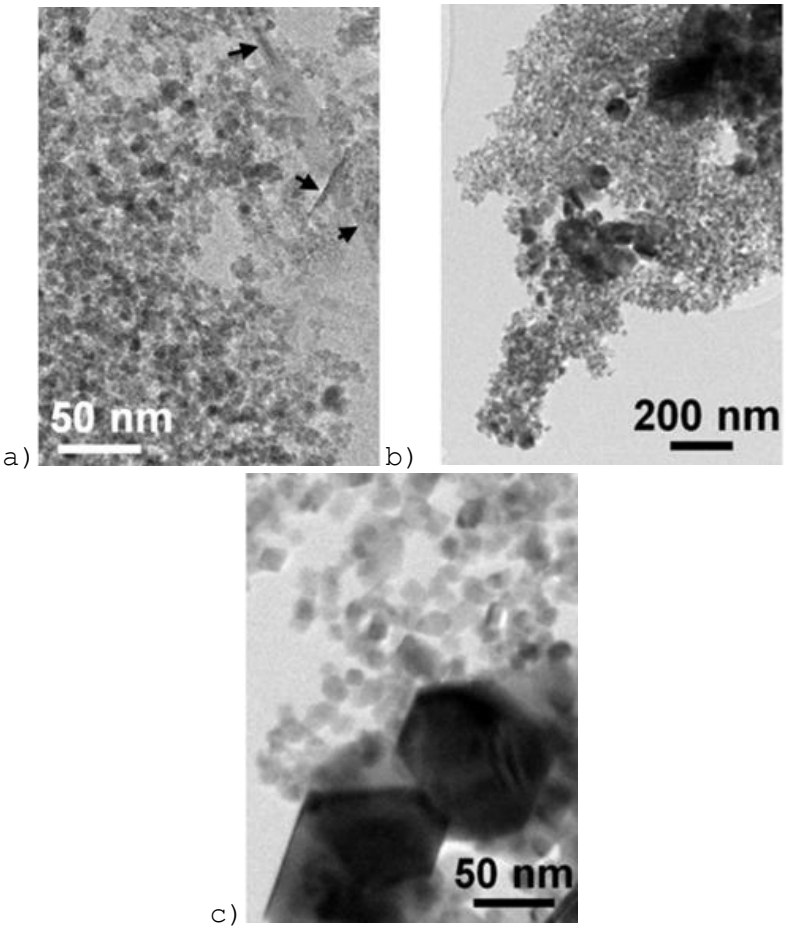


Slika 4.17: Magnetizacija nanodelcev v odvisnosti od magnetnega polja, izmerjena pri sobni temperaturi (a) NDŽO-RT, (b) NDŽO-RT-HT-200, (c) NDŽO-RT-2step, (d) NDŽO-Asp1.5-RT.

4.6.1.2 Sinteza nanodelcev železovega oksida z dodatkom aspartanske kisline

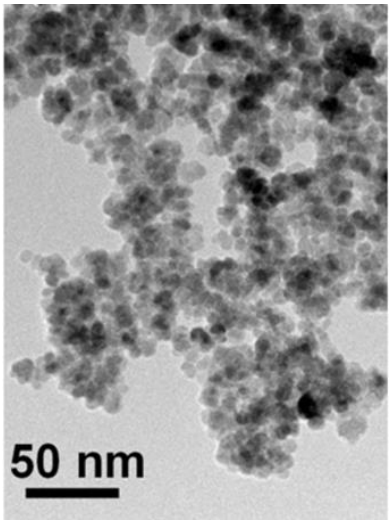
Nanodelci železovega oksida se po sintezi hitro aglomerirajo. Da bi pripravili stabilne suspenzije, moramo na površino nanodelcev adsorbirati primerne molekule, kot je ASP. Če dodamo take molekule v reakcijsko zmes med sintezo nanodelcev, pa lahko pričakujemo, da bodo vplivale na nastanek nanodelcev.

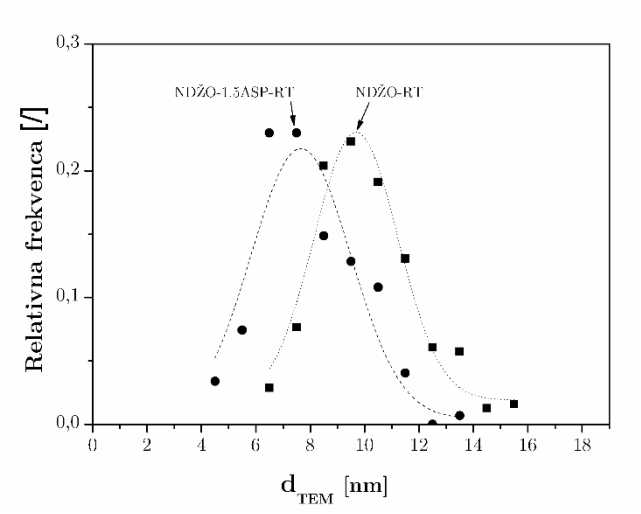
Izkazalo se je, da večji dodatki ASP v raztopino železovih ionov pred obarjanjem celo onemogočijo sintezo čistih nanodelcev maghemita. Ko je bila ASP dodana v raztopino železovih ionov v razmerju ASP /Fe^{3+} = 12, je produkt obarjanja vseboval poleg majhnih sferičnih nanodelcev železovega oksida neenakomerne velikosti okrog 9 nm še večje delce v obliki ploščic (delci, označeni s puščicami na sliki 4.18 a). Ti ploščati delci so bili široki od 10 do 150 nm in 10 nm debeli. Elektronska difrakcija, posneta na področju s ploščatimi delci, se je skladala s strukturo getita (α-FeOOH). XRD analiza je pokazala samo karakteristične uklone, značilne za spinelno strukturo (slika 4.20). Verjetno so nanoploščice preslabo kristalinične, da bi jih lahko zaznali z analizo XRD. Če je bila prisotna velika količina ASP, monofaznih nanodelcev maghemita nismo dobili niti pri obarjanju pri povišani temperaturi (80 °C).



Slika 4.18: TEM posnetki nanodelcev, oborjenih iz raztopine železovih ionov v prisotnosti ASP: a)NDŽO-ASP12-RT, b)NDŽO-ASP1.5-RT-80 in c) NDŽO-ASP1.5-HT-200.

Pri zmanjšanju dodatka ASP pa vpliv ASP na lastnosti nanodelcev maghemita ni tako očiten. V primeru dodatka ASP v raztopino železovih ionov pri molskem razmerju ASP /Fe^{3+} = 1,5 smo dobili po obarjanju Fe ionov pri sobni temperaturi spinelne nanodelce železovega oksida, ki so bili nekoliko manjši kot nanodelci, oborjeni brez ASP. Slika 4.19 (b) prikazuje primerjavo velikosti nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi v prisotnosti ASP (NDŽO-ASP1.5-RT) in brez ASP (NDŽO-RT). Velikost nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT, izmerjena iz TEM, d_{TEM} = 7,7±1,8 nm, medtem ko je bila velikost, zmerjena z XRD, d_{XRD} = 8,8 nm (tabela 4.5, slika 4.19 b). Zaradi prisotne nemagnetne ASP na površini nanodelcev izkazujejo posušeni nanodelci relativno nizke magnetizacije. V tabeli 4.5 so za primerjavo z nanodelci, pripravljenimi brez ASP, vrednosti za M_S in M_R normalizirane na g Fe_2O_3. Vsebnost Fe_2O_3 v vzorcih je bila določena iz žaroizgub. Zavedati pa se je potrebno, da je pričakovana napaka take določitve relativno velika. Nasičena magnetizacija po normalizaciji na Fe_2O_3 je bila relativno nizka, le 58,3 Am^2kg^{-1}. Nanodelci so bili povsem superparamagnetni.

a) 

b) 

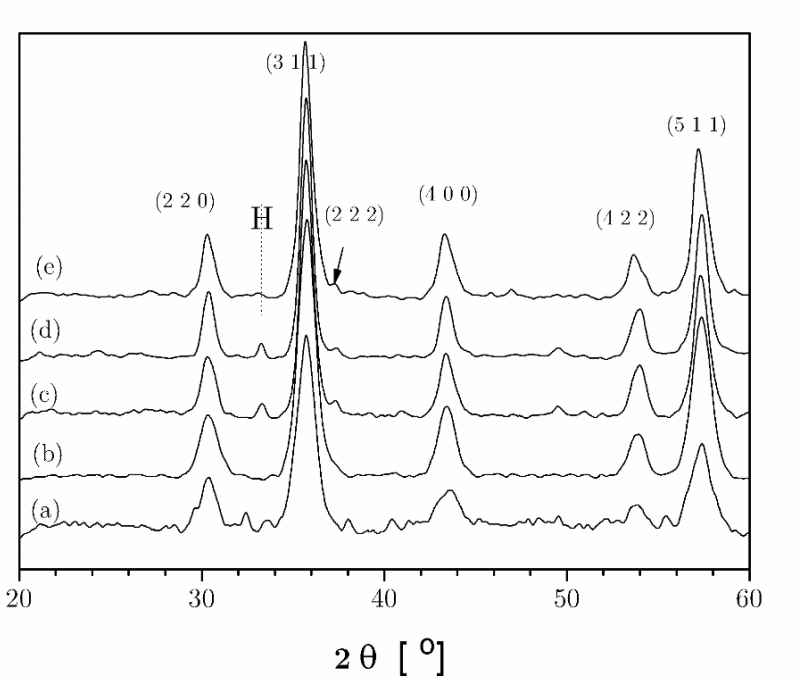
Slika 4.19: (a) TEM posnetek nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT, sintetiziranih z obarjanjem v prisotnosti ASP (ASP/Fe^{3+} = 1,5) pri sobni temperaturi, (b) primerjava porazdelitve velikosti nanodelcev, oborjenih pri sobni temperaturi v prisotnosti ASP (NDŽO-ASP1.5-RT) in brez ASP (NDŽO-RT).

Nanodelce, sintetizirane v prisotnosti manjših količin ASP (ASP/Fe^{3+} = 1,5), smo lahko uporabili za pripravo stabilnih suspenzij, saj se je ASP uspešno adsorbirala na njihove površine (lastnosti tako pripravljenih suspenzij bom podrobneje obravnavala v poglavju 4.6.3). Slaba stran takega načina sinteze nanodelcev pa so relativno slabe magnetne lastnosti.

Da bi izboljšala magnetne lastnosti nanodelcev, sintetiziranih v prisotnosti ASP, sem skušala povečati njihovo velikost s pristopi, ki jih običajno uporabljamo pri sintezi nanodelcev s soobarjanjem. Izkazalo se je, da dodatek ASP v reakcijsko mešanico spremeni potek procesa nastanka nanodelcev do te mere, da ne moremo uporabiti enakih pristopov za povečanje nanodelcev kot brez ASP. Ko sem nanodelce, oborjene pri sobni temperaturi, starala pri povišani temperaturi, da bi omogočila Ostwaldovo pogrobitev delcev, so se v produktu pojavile nemagnetne sekundarne faze, ki so dodatno znižale magnetizacijo. Nanodelci železovega oksida so sicer s povišano temperaturo zrasli (tabela 4.5), vendar pa so bili v primerjavi z nanodelci, sintetiziranimi brez ASP, nekoliko manjši. Ko sem sintetizirala nanodelce z obarjanjem pri sobni temperaturi in staranjem pri 80 °C (vzorec NDŽO-ASP1,5-RT-80), so se v spektru XRD pojavili karakteristični ukloni hematita (α-Fe_2O_3)(slika 4.20 e; H-hematit). TEM analiza nanodelcev (slika 4.18 b) je pokazala prisotnost ploščatih delcev hematita velikosti več sto nm. Tudi po hidrotermalni obdelavi oborjene reakcijske zmesi pri 160 °C (vzorec NDŽO-ASP1,5- RT-HT160) in 200 °C (NDŽO-ASP1,5-RT-HT200, slika 4.18 c) so bili v produktu prisotni večji nemagnetni delci hematita. Zaradi prisotnosti nemagnetnega hematita so imeli nanodelci nizke magnetizacije (Tabela 4.5).

Po obarjanju železovih ionov v prisotnosti ASP pri povišani temperaturi (vzorec NDŽO-ASP1,5-80) so nastali samo nanodelci spinelnega železovega oksida, vendar pa so bili mnogo manjši in so izkazovali nižje magnetizacije (d_{TEM} = 11,7±1,4 nm, d_{XRD} = 12,3 nm, M_S = 58,7 Am^2kg^{-1}) kot nanodelci, sintetizirani pri enakih pogojih brez dodatka ASP.

Tudi dodajanje hidroksida v dveh stopnjah, ki ga pogosto uporabljamo za povečanje nanodelcev med obarjanjem železovih ionov pri sobni temperaturi, ni imelo znanega vpliva na velikost nanodelcev, oborjenih v prisotnosti ASP. Nanodelci NDŽO-ASP1,5-RT-2step so bili mnogo manjši (d_{TEM} = 7,3±1,3 nm, d_{XRD} = 9,4 nm) in so izkazovali mnogo nižjo nasičeno magnetizacijo (M_S = 54,5 Am^2kg^{-1}) od nanodelcev NDŽO-RT-2step, sintetiziranih pod enakimi pogoji brez ASP (tabela 4.5).



Slika 4.20: Difraktogrami izbranih nanodelcev, oborjenih iz raztopin Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov v prisotnosti ASP ((a) NDŽO-ASP12-RT, (b) NDŽO-ASP1.5-RT, (c) NDŽO-ASP1.5-RT-80, (d) NDŽO-ASP1.5-RT-HT160 in (e) NDŽO-ASP1.5-80).

.

Tabela 4.5: Eksperimentalni pogoji, uporabljeni pri sintezi nanodelcev v prisotnosti ASP.

Vzorec	**ASP/Fe^{3+}** [/]	**Fe_{tot}** [mmol/L]	**Dodatek amonijaka**	T_{prec} [°C]	T_{age} [°C]	**Prisotne faze**[b]	d_{XRD} [nm]	D_{TEM} [nm]	M_S[a] [Am^2/kg]	M_R[a] [Am^2/kg],
NDŽO-ASP1.5-RT	1,5	50	One-step	25	25	S	8,8	7,7±1,8	58,3	>0,1
NDŽO-ASP1.5-RT-80	1,5	50	One-step	25	80	S+H	12,8	10,2±1,2	56,0	1,4

NDŽO-ASP1.5-RT-HT160	1,5	50	One-step	25	160	S+H	16,0	14,4±3,6	58,4	1,6
NDŽO-ASP1.5-RT-HT200	1,5	50	One-step	25	200	S+H	17,0	15,2±3,1	61,8	3,2
NDŽO-ASP1.5-80	1,5	50	One-step	80	73	S	12,3	11,7±1,4	56,0	1,4
NDŽO-ASP1.5-RT-2step	1,5	50	Two-step	25	25	S	9,4	7,3±1,3	54,5	>0,1

Legenda:

ASP/ Fe^{3+} – molsko razmerje med ASP in Fe^{3+}

Fe_{tot} – celokupna koncentracija železovih (Fe^{3+}+ Fe^{2+})

One-step/ Two step – dodatek amonijaka v eni ali dveh stopnjah, T_{prec} – temperatura obarjanja

T_{age} – temperatura staranja

d_{XRD} – velikost kristalita, določena iz XRD

D_{TEM} – velikost, določena s TEM posnetkov

M_S – nasičena magnetizacija

M_R – remanentna magnetizacija

[b]S-spinel ferite, G-goethit (α-FeOOH), H-hematit (α-Fe_2O_3)

[a] vrednost nasičene magnetizacije Ms nanodelcev, sintetiziranih v prisotnosti ASP, je bila normalizirana na delež Fe_2O_3, določen s termogravimetrično metodo

4.6.2 Analiza procesa nastanka nanodelcev železovega oksida z obarjanjem v prisotnosti aspartanske kisline

S sintezo nanodelcev železovega oksida v prisotnosti ASP lahko na enostaven način pripravimo stabilne vodne magnetne tekočine. Izkazalo pa se je, da dodatek ASP v raztopino železovih ionov pred obarjanjem precej spremeni lastnosti nanodelcev. V tem poglavju so opisane raziskave, ki naj bi odgovorile, kako dodana ASP vpliva na nastanek nanodelcev. Znanje o vplivu AK na nastanek nanodelcev je posebno pomembno za prenos sinteznega postopka z laboratorijskega nivoja v masovno proizvodnjo.

Z namenom, da bi raziskala vpliv dodatka AK med procesom soobarjanja ionov Fe^{3+}/Fe^{2+}, sem spremljala celoten potek sinteze nanodelcev v prisotnosti AK vizualno in z uporabo *in-situ* spektroskopije FT-IR. Za razumevanje spektrov FTIR produktov kemijskih reakcij v reakcijski mešanici je potrebno razumeti spekter FT-IR same ASP pri različnih pH vrednostih. Slika 4.22 a in b prikazuje spektra FT-IR za raztopini ASP pri pH vrednostih 2,2 in 11. Spektra FT-IR kažeta absorpcijski vrh pri 1644 cm^{-1}, ki je karakterističen za asimetrične vibracije COO- vezi. Pri višjih

vrednostih pH (pH = 11) pa kaže spekter Asp dodaten vrh pri 1110 cm^{-1}, ki pa je značilen za vibracije C-O(H) skupin [76].

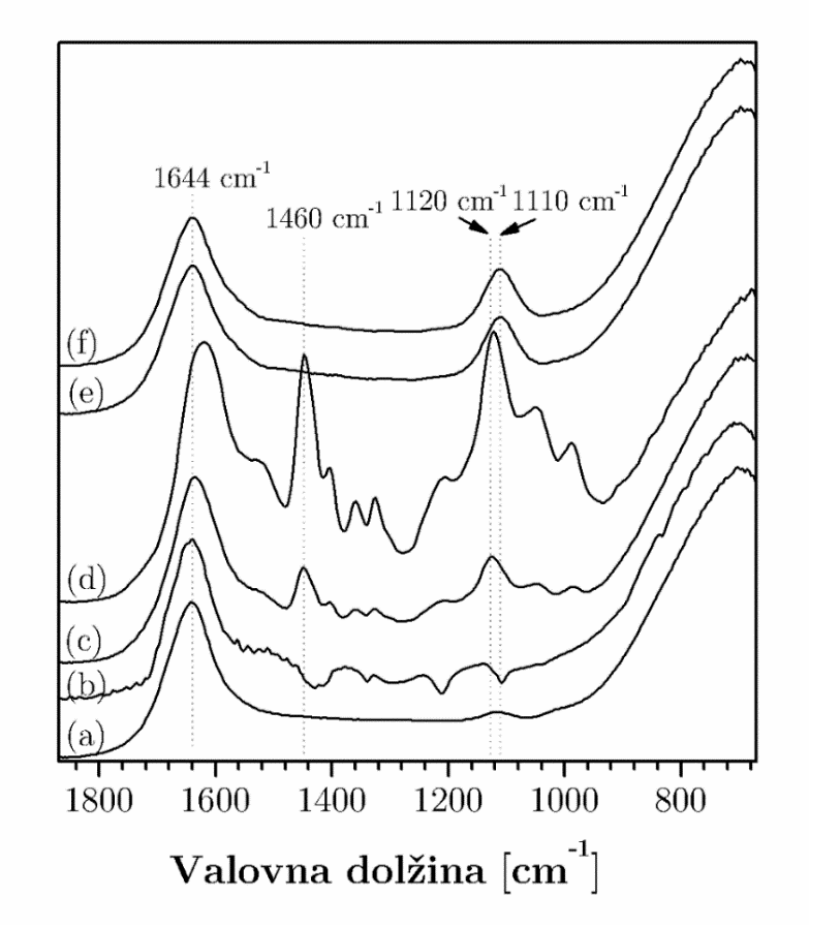
Takoj ko zmešamo prozorno raztopino ASP v svetlo rjavkasto raztopino Fe^{2+}/Fe^{3+} sulfatov, se ji spremeni barva v rdečkasto.

a)  b) 

Slika 4.21: a) Raztopina Fe^{2+}/Fe^{3+} sulfatov pred dodatkom ASP in b) po dodatku ASP.

Po približno 5 minutah se začnejo izločati oranžni precipitati (slika 4.21 b) in pH vrednost raztopine pade z 2,2 na 2,03. Obarjanje trdne faze je očitno posledica reakcije med ASP in železovimi ioni, saj se Fe^{3+} brez ASP obarja šele pri pH vrednosti nad 2,8. Znano je, da so AK dobri kompleksanti in v prisotnosti Fe ionov tvorijo polinuklearne komplekse, ki so odvisni od vrednosti pH reakcijske mešanice [17],[66].
Eno minuto po mešanju obeh raztopin sem posnela prvi spekter FT-IR. Spekter FT-IR, ki je prikazan na sliki 4.22 c, prikazuje dva dodatna karakteristična vrhova, in sicer pri 1120 cm^{-1} in pri 1460 cm^{-1}. Intenziteta teh vrhov s časom po mešanju obeh raztopin narašča (slika 4.22 d prikazuje spekter FT-IR, posnet 28 minut po mešanju obeh raztopin). Glede na prejšnje objave v literaturi lahko trdimo, da gre za karakteristične vrhove, značilne za simetrične vibracije karboksilatov, ki jih običajno najdemo v območju od 1400 do 1480 cm^{-1}.[76]. Vrh pri 1460 cm^{-1} označuje simetrično nihanje [COO^-], ki je povezano z nastankom koordinativne vezi med ASP in Fe ioni. Takšen tip vezi je tipičen za komplekse, kjer karboksilatne skupine nastopajo kot ligandi. Karakterističen vrh pri 1120 cm^{-1} označuje vibracije C-O(H) vezi [76]. V raztopini ASP pri pH = 11 je omenjeni vrh zaznati pri 1110 cm^{-1} (slika 4.22 a). Tako lahko premik omenjenega karakterističnega vrha v reakcijski mešanici pripišemo interakciji karboksilne skupine z železovimi ioni v kompleksu.

Po dodatku amonijaka v raztopino vrednost pH naraste na 11 in reakcijska mešanica se spremeni iz oranžne v črno. Spektra FT-IR e in f na sliki 4.22 sta bila posneta takoj po dodatku amonijaka in na koncu procesa obarjanja. V obeh spektrih vidimo, da karakterističen vrh pri 1460 cm^{-1}, ki je povezan z nastankom ASP-Fe kompleksa, izgine, medtem ko se vrh pri 1120 cm^{-1} premakne k 1110 cm^{-1}. Vrh pri 1110 cm^{-1} je bil izmerjen v raztopini ASP pri pH = 11 (spekter na sliki 4.242 a) in ga lahko pripišemo C-O(H) skupinam. Sklepamo lahko, da se je ASP sprostila iz kompleksa in ostaja večinoma raztopljena v reakcijski mešanici, del pa je adsorbiran na nanodelcih.

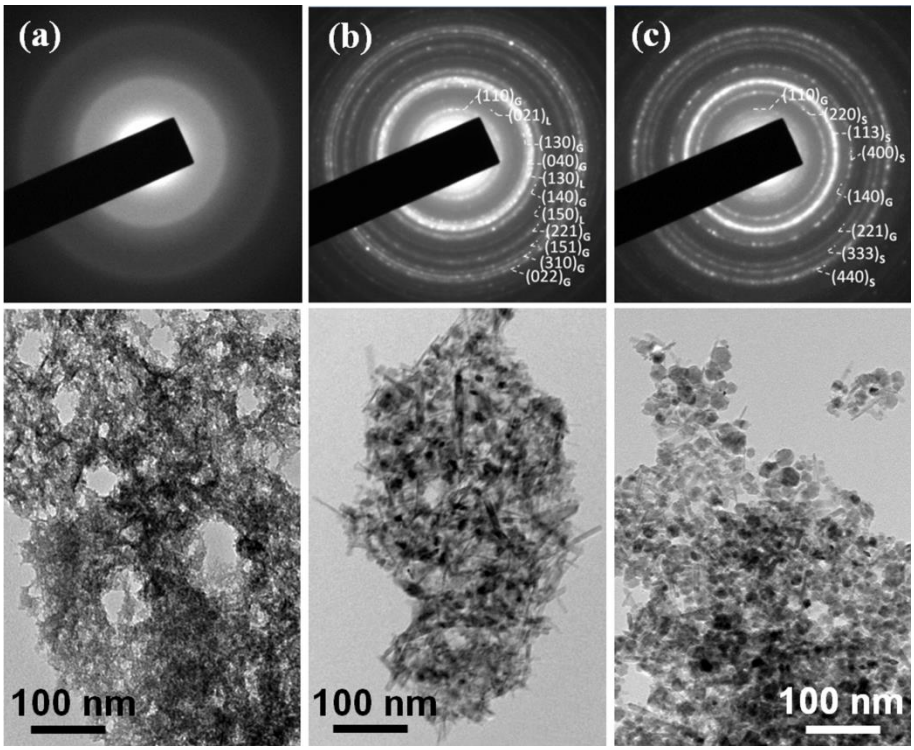


Slika 4.22: Spektra FT-IR vodnih raztopin ASP pri pH = 11 (a) in pH = 2,2 (b) ter in-situ FT-IR spektri, posneti v različnih stopnjah procesa obarjanja: 1 minuto po dodatku raztopine ASP v raztopino železovih ionov pri pH = 2,2 (c), 28 minut po dodatku raztopine ASP v raztopino železovih ionov pri pH = 2,08 (d), 2 minuti po dodatku amonijaka (pH = 11) (e) in ob koncu sinteze 32 minut po dodatku amonijaka (pH = 11) (f).

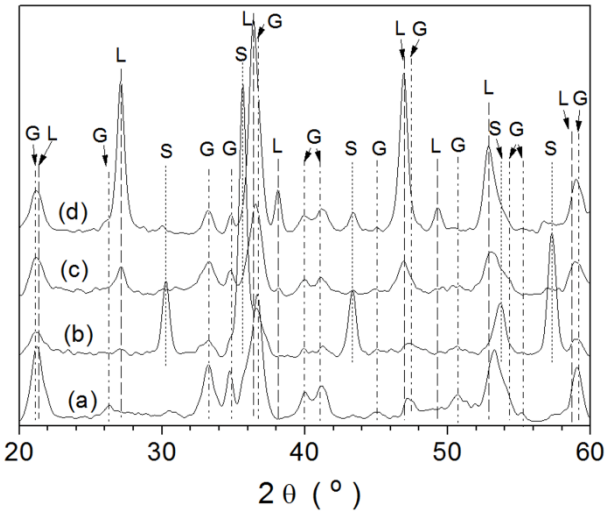
Pri sintezi nanodelcev dodamo hidroksid raztopini železovih ionov v enkratnem dodatku med intenzivnim mešanjem. Ker so ionske kemijske reakcije v vodi zelo hitre, je praktično nemogoče podrobneje določiti, na katero reakcijo oziroma proces dejansko vpliva dodana ASP. Da bi razjasnila vpliv ASP na mehanizme in reakcije nastanka nanodelcev železovega oksida, sem zato postopek obarjanja prilagodila tako, da je bilo možno vmesne produkte analizirati s TEM in XRD. V raztopino železovih ionov z in brez dodatka ASP, sem po kapljicah dodajala raztopino amonijaka pri različnih pH vrednostih in odvzemala produkte obarjanja.

Najprej smo analizirali potek obarjanja brez dodane ASP. V raztopini železovih ionov brez dodatka ASP poteče najprej obarjanje Fe^{3+} ionov pH = 2,8. Trden produkt, ki se obori pri pH 5,1, je sestavljen večinoma iz majhnih nanodelcev, ki imajo ploščato in nitasto obliko, kot prikazuje slika 4.23 a. Taka oblika nastalih delcev je tipična za železove oksi hidrokside (FeOOH). Pripadajoča uklonska slika omenjenih nanodelcev sicer kaže le zelo difuzne difrakcijske obroče. Zaradi slabe

kristaliničnosti narave produkta nismo uspeli določiti. Nad pH 6 se začne obarjati še Fe^{2+}. Pri pH 7,4 je bil oborjeni material sestavljen iz anizotropnih, večinoma ploščatih in nitkastih kristaliničnih nanodelcev (slika 4.23 b). Elektronska difrakcija je pokazala dve nanokristalinični fazi z ortorombsko strukturo. Obroče v uklonski sliki z veliko intenziteto lahko pripišemo getitu (α-FeOOH), prisotni pa so tudi šibkejši refleksi, pripadajoči lepidokrocitu (γ-FeOOH). Analiza uklonske slike se sklada z analizo XRD (slika 4.24 a). Prisotnost obeh modifikacij FeOOH je pričakovana. Termodinamsko stabilna faza FeOOH je α-FeOOH [16]. Znano je, da pri obarjanju najprej nastane termodinamsko manj stabilna faza, to je v našem primeru γ-FeOOH. Po določenem času po nastanku pa se γ-FeOOH pretvori v termodinamsko stabilen α-FeOOH. Pri pH okrog 8 začnejo nastajati prvi nanodelci spinelnega ferita. Material, oborjen pri pH 8,4, tako vsebuje okrogle nanodelce spinelnega železovega oksida kot glavno fazo in nekaj nanodelcev getita, ki so v obliki ploščic (slika 4.23 c in 4.24 b).



Slika 4.23: TEM posnetki in pripadajoče elektronske difrakcije produktov obarjanja s postopnim dodajanjem amonijaka raztopini železovih ionov brez dodane ASP. Vzorci so bili odvzeti pri različnih vrednostih pH: (a) pH = 5,1 (b) pH = 7,4 in (c) pH = 8,4. Pripadajoče elektronske difrakcije so indeksirane glede na strukture getita (G), lepidokrocita (L) in spinela (S).



Slika 4.24: Primerjava difraktogramov produktov obarjanja s postopnim dodajanjem amonijaka raztopini železovih ionov: (a) pH = 7,4 brez dodane ASP, (b) pH = 8,4 brez dodane ASP, (c) pH = 7,4 z ASP in (d) pH = 8,4 z ASP. Difraktogrami so indeksirani glede na strukture getita (G), lepidokrocita (L) in spinela (S).

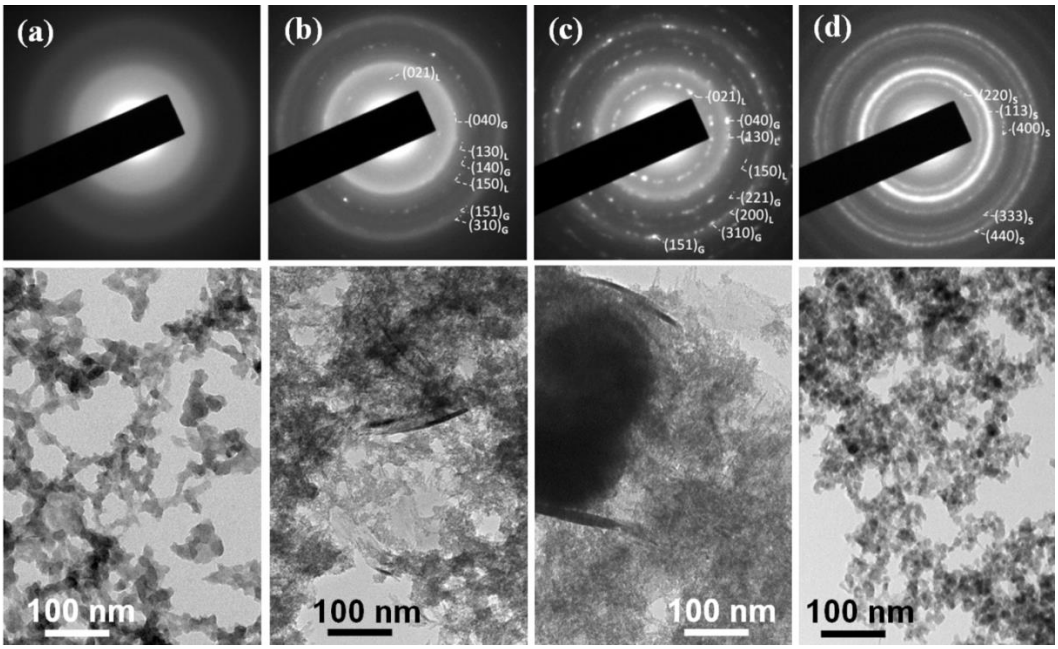
Potek obarjanja in fazna sestava oborjenega materiala pa je bila drugačna, če je bila v raztopini železovih ionov prisotna ASP.

Z dodatkom ASP v raztopino železovih sulfatov pri pH = 2,2 nastane oranžna oborina kot posledica nastanka koordinacijske spojine (kompleksa) Fe-ASP, pH vrednost pa pade na okoli 2. Oborjeni material sem izločila iz suspenzije in stehtala. Masna bilanca procesa je pokazala, da večina nastalega kompleksa pri pH = 2 ostane raztopljena. TEM posnetek na sliki 4.25 a prikazuje oborjeni kompleks kot aglomerirane nanodelce z velikostjo okrog 20 nm. Elektronska difrakcija (slika 4.25 a) je pokazala, da so nanodelci kompleksa amorfni, medtem ko je analiza EDXS pokazala prisotnost Fe, O, C, N in S. Kombinacija termogravimetrične analize in CHNS analize v vakuumu posušenega oborjenega kompleksa Fe-ASP (ASP/Fe^{3+} = 1,5) je pokazala sledečo elementno sestavo: 20,9 ut% Fe; 14,4 ut% C, 3,0 ut% H, 4,2 ut% N in 13,4 ut% S (preostanek do 100 ut% je O). Oborina je najverjetneje koordinacijski kompleks ASP s Fe^{3+} ioni. V posebnih eksperimentih sem zmešala ASP posebej s Fe^{3+} in posebej s Fe^{2+}. Kompleks se je oboril iz raztopine Fe^{3+} in ASP, medtem ko v raztopini ASP in Fe^{2+} ni nastal. Sestava oborjenega kompleksa, ločenega iz Fe^{3+}-ASP mešanice pri pH = 2, je bila enaka sestavi oborine iz mešanice Fe^{3+}/Fe^{2+}-ASP.

Fe^{3+}-ASP kompleks je stabilen tudi še pri pH = 4. TEM analiza oborine pri pH = 4 je pokazala enake amorfne nanodelce kot pri pH□2, medtem ko je elementna analiza TGA/CHNS pokazala spremembo v njegovi sestavi. Kompleks, oborjen pri pH = 4, je vseboval večji delež železa in manj žvepla: 30,9 ut% Fe; 12,3 ut% C, 2,7 ut% H, 3,7 ut% N in 4,7ut% S.

Tudi pri pH 5,4 s TEM analizo nismo opazili vidnih sprememb amorfnega precipitata. Prvi nanokristalinični delci nastanejo nad pH 7, kjer se začne obarjati Fe^{2+}. TEM analiza oborine pri pH 7,4 je pokazala zelo majhne nanodelce in posamezne večje ploščate nanodelce (slika 4.25 b). Pripadajoča uklonska slika je pokazala, da je oborina večinoma amorfna, zasledimo pa lahko šibke reflekse, ki bi jih lahko pripisali lepidokrocitu in getitu. Pri pH 8,4, kjer brez dodane ASP že nastanejo nanodelci spinelnega železovega oksida, ostaja material, oborjen v prisotnosti ASP, še vedno

sestavljen iz manjših nanodelcev lepidokrocita in večjih nanodelcev getita, kot prikazuje TEM posnetek na sliki 4.25 c. Na koncu obarjanja pri pH 11 je bila oborina večinoma sestavljena iz okroglih nanodelcev spinelnega železovega oksida, v manjši vsebnosti pa so se pojavljali tudi večji delci getita (slika 4.25 d). Slednje s TEM opazimo po tipični anizotropni obliki.



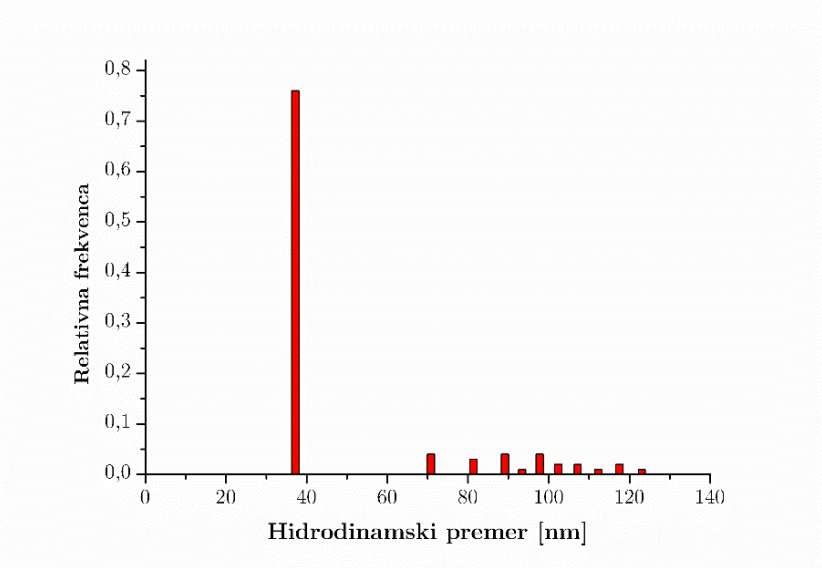
Slika 4.25: TEM posnetki in elektronske difrakcije materiala, oborjenega iz raztopine železovih ionov v prisotnosti ASP s postopnim dodajanjem raztopine amonijaka: (a) pH = 2,07 (pred dodatkom amonijaka), (b) pH = 7,4, (c) pH = 8,4 in (d) pH = 11.

4.6.3 Lastnosti suspenzije nanodelcev železovega oksida v prisotnosti aminokislin, pripravljene z obarjanjem železovih ionov iz raztopine

Stabilno suspenzijo nanodelcev z adsorbirano ASP sem pripravila v eni stopnji s soobarjanjem Fe^{3+}/Fe^{2+} ionov iz raztopine, v kateri je bila raztopljena AK. Po sintezi sem nastale nanodelce sprala z ultrafiltracijo in dispergirala v raztopini amonijaka pri pH = 11. Z ultrafiltracijo suspenzijo očistimo nevezane aminokisline. Kot rezultat dobimo relativno koncentrirano stabilno vodno suspenzijo nanodelcev z ASP (NDŽO-ASP1.5-RT).

Magnetne meritve kažejo, da koncentrirana suspenzija izkazuje nasičeno magnetizacijo 5,1 Am^2kg^{-1}, kar ustreza vsebnosti okoli 9 ut.% magnetnih nanodelcev. Stabilnost suspenzije nanodelcev z adsorbirano ASP v odvisnosti od vrednosti pH sem zasledovala vizualno (spremljanje posedanja zaradi aglomeracije) in z meritvami DLS. Suspenzija nanodelcev z ASP (NDŽO-ASP1.5-RT) je stabilna pri pH nad 7,5, medtem ko sama flokulacija poteka pri pH okrog 6. DLS meritve kažejo, da je povprečen hidrodinamski premer nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT stabilne suspenzije pri pH = 11 (5mg/mL) okrog 40 nm, kljub temu da je bilo zaznati še večje delce s

hidrodinamskim premerom med 70 in 130 nm (slika 4.26). Hidrodinamski premer se s časom ni spreminjal. Prav tako se hidrodinamska velikost delcev v suspenziji ni bistveno spreminjala z zmernim redčenjem suspenzije. Če pa sem suspenzijo razredčila za več kot 100-krat, pa sem opazila počasno flokulacijo.



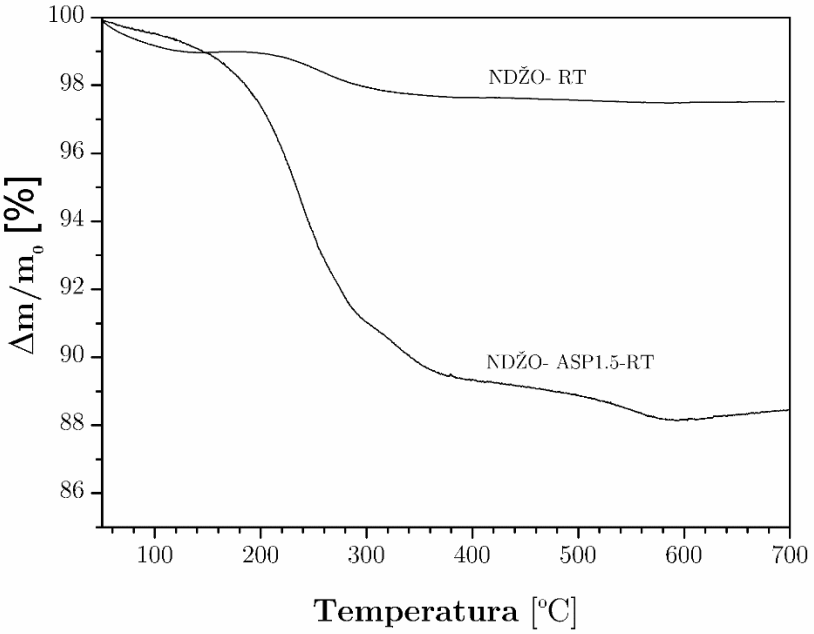
Slika 4.26: Povprečen hidrodinamski premer nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT.

Lastnosti suspenzije NDŽO-ASP-1.5-RT so predstavljene v tabeli 4.4. Za podrobnejšo razlago lastnosti suspenzij nanodelcev je potrebno poznati koncentracijo ASP na površini nanodelcev in koncentracijo ASP, raztopljene v mediju. Koncentracija ASP v suspenziji je določena z intenzivnostjo spiranja nanodelcev po sintezi suspenzije. Obe koncentraciji ASP v suspenziji smo določili z analizo HPLC. Iz stabilne suspenzije sem izločila nanodelce z ultracentrifugiranjem. HPLC analiza supernatanta predstavlja koncentracijo ASP, raztopljene v mediju. Za določitev koncentracije adsorbirane ASP sem posedene nanodelce raztopila in izločila železove ione. Iz rezultatov HPLC analize raztopine sem izračunala površinsko koncentracijo AK, ki je bila adsorbirana na nanodelcih. Pri tem sem upoštevala površino, izračunano iz povprečne velikosti nanodelcev, določene s TEM. Kot pri suspenzijah, pripravljenih z naknadno adsorpcijo ASP na predhodno sintetizirane nanodelce, je bila tudi v primeru enostopenjske sinteze koncentracija raztopljene ASP v suspenziji (16 mg/mL, pH = 11) majhna, le 24 mg/L. Nasprotno je koncentracija ASP, adsorbirana na nanodelcih NDŽO-ASP1.5-RT, relativno zelo velika; 0,24 g ASP je adsorbirano na g nanodelcev. Izračunana površinska koncentracija ASP na površini je tako 14,2 µmol/m^2, kar ustreza adsorbiranim 9 molekulam ASP na nm^2. Iz koncentracij ASP v supernatantu in na nanodelcih, izmerjenih s HPLC analizo, lahko sklepam, da so na nanodelcih NDŽO-ASP1.5-RT molekule ASP vezane v več slojih oziroma kot molekulski asociati (slika 4.9).

Tudi termogravimetrična analiza (TGA) nanodelcev NDŽO-ASP1.5-RT, izločenih iz stabilne suspenzije z ultracentrifugiranjem, je pokazala relativno visoko koncentracijo adsorbirane ASP. Slika 4.27 prikazuje krivuljo TGA nanodelcev brez prisotnosti AK NDŽO-RT in nanodelcev z adsorbiranimi AK, dobljenimi z

ultracentrifugiranjem suspenzije NDŽO-ASP1.5-RT. V primeru nanodelcev NDŽO-RT opazimo izgubo mase v območju pod 100 °C, ki jo lahko pripišemo izhajanju nevezane vode in med 200 °C in 340 °C. Slednja izguba na masi znaša 1,3 % in jo najverjetneje lahko pripišemo izgubi kemijsko vezane vode in organskih nečistoč. TGA krivulja nanodelcev z ASP kaže izgubo mase v območju med 200 in 590 °C. Celokupna izguba mase nad 120 °C znaša 11,2 %. Če pripišem celotno izgubo na masi popolnemu razpadu ASP, lahko izračunam, da je na nanodelcih adsorbirana ASP v površinski koncentraciji 6,5 $\mu mol/m^2$ oziroma okoli 4 molekule ASP na nm^2 površine nanodelcev. To je precej manjša površinska koncentracija od določene z analizo HPLC. V posebni sistematski študiji vzorcev z znanimi sestavami smo eksperimentalno pokazali, da so vrednosti adsorbirane ASP na površino nanodelcev, izmerjene s TGA, vedno bistveno prenizke. Čeprav so bile meritve izvedene na zraku, verjetno ASP ni popolnoma razpadla in ni povsem zapustila vzorcev. Enak problem je bil tudi pri meritvah v zaščitni atmosferi dušika. Tudi če smo upoštevali razpad do ogljika, so bile vrednosti izgub na masi vedno bistveno prenizke.

Nad 590 °C se v TGA krivulji vzorca NDŽO-ASP1.5-RT opazi ponovno naraščanje mase, kar bi lahko pripisali oksidaciji ionov Fe^{2+}, ki so prisotni v strukturi nanodelcev. Pri nadaljnjem segrevanju vzorca dalj časa pri 800 °C (krivulja TGA na sliki 4.27 tega ne prikazuje) smo opazili še dodatno naraščanje mase za okrog 1,9 %. Omenjeno naraščanje mase kaže na prisotnost magnetita v vzorcu z ASP, ki ga v vzorcu brez ASP nismo zaznali. Rezultati nakazujejo na možnost, da ASP delno zaščiti nanodelce pred oksidacijo.



Slika 4.27: TGA krivulja nanodelcev železovega oksida brez prisotnosti AK(NDŽO-RT) in nanodelcev z adsorbiranimi AK (NDŽO-ASP1.5-RT).

Tabela 4.4: Lastnosti suspenzije, sintetizirane v enostopenjskem postopku z obarjanjem nanodelcev železovega oksida v prisotnosti ASP (ξ-potencial, hidrodinamski premer d_{DLS} in koncentracije aminokislin v supernatantu in na nanodelcih, izmerjene z metodo HPLC).

AK	pH □/□	ξ-potencial □mV□	d_{DLS} □nm□	Koncentracija AK	
				Supernatant □mg/L□	Na nanodelcih NDŽO □μmol/m²□
ASP	11	-34	40	24	14,2

Opravili smo študijo dveh sinteznih poti priprave stabilne vodne suspenzije nanodelcev z AK. V prvi dodamo ASP v reakcijsko zmes med soobarjanjem nanodelcev iz vodne raztopine ionov Fe^{2+}/Fe^{3+}, medtem ko druga sintezna pot vključuje adsorpcijo AK na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida. Obe suspenziji sta izkazovali zelo podobne lastnosti.

4.6.4 Komentar sinteze nanodelcev z obarjanjem železovih ionov v prisotnosti aspartanske kisline

Stabilne suspenzije nanodelcev železovega oksida lahko pripravimo v preprostem enostopenjskem postopku s soobarjanjem železovih ionov v prisotnosti aminokisline, vendar pa se izkaže, da dodatek aminokisline pomembno vpliva na procese nastanka nanodelcev in s tem na njihove uporabne lastnosti. Vpliv dodane aminokisline na proces nastanka nanodelcev in njihove lastnosti sem podrobneje preučila na primeru dodatka ASP.

Izkazalo se je, da večje količine dodatka ASP v raztopino železovih ionov pred obarjanjem do te mere spremenijo proces nastanka nanodelcev, da niti ni možno dobiti čistih nanodelcev. Pri manjših dodatkih ASP, ki pa so bili vseeno dovolj veliki, da so omogočili kasnejšo pripravo stabilnih suspenzij nanodelcev, pa je bil vpliv ASP na lastnosti nanodelcev manjši. Izkazalo se je, da v splošnem dobimo pri obarjanju v prisotnosti ASP manjše nanodelce, ki posledično izkazujejo nižje nasičene magnetizacije. Pri razvoju postopka sinteze stabilnih suspenzij nanodelcev z obarjanjem v prisotnosti aminokisline je sicer pomembnejši vpliv, ki ga ima ASP na proces nastanka nanodelcev med obarjanjem. Spremenjen proces nastanka pomeni, da ne moremo uporabljati enakih pristopov za povečanje velikosti nanodelcev kot v primeru običajnega obarjanja brez dodatka aminokisline. Poznavanje vpliva dodane aminokisline na procese med obarjanjem je posebno pomembno pri prenosu sinteznega postopka z laboratorijskega nivoja v masovno proizvodnjo.

Mehanizem nastanka nanodelcev med soobarjanjem železovih ionov je že brez dodatka aminokisline zelo kompleksen in močno odvisen od eksperimentalnih pogojev (vpliv zračne atmosfere, razmerja med Fe^{3+}/Fe^{2+}, koncentracije reaktantov, prisotnosti drugih ionov, dodane baze, itd) [16], [77], [78]. Analiza vzorcev, odvzetih med počasnim dodajanjem amonijaka v raztopino železovih ionov pri naraščajočih vrednostih pH, je pokazala, da nastanejo magnetni nanodelci železovega oksida preko intermediatov. Obarjanje Fe^{3+} pri pH, manjšem od 6, vodi do nastanka lepidokrocita (γ-FeOOH). Če je reakcijska mešanica dalj časa pri pH ≤ 6, nanodelci γ-FeOOH

nadalje rastejo in se preoblikujejo v getit (α-FeOOH) [79] . Če se pH hitro dvigne, γ-FeOOH nanodelci reagirajo s Fe^{2+}, ki se obori pri pH □6 in nastanejo nanodelci spinelnega železovega oksida. Če pride do pretvorbe FeOOH v termodinamsko stabilni getit, pa spinelni železov oksid ne nastane. Getit v tem primeru ostane prisoten kot sekundarna faza ali pa se (pri povišani temperaturi) spremeni v hematit (α-Fe_2O_3) [16].

Pri obarjanju nanodelcev v prisotnosti ASP se proces nastanka nanodelcev pomembno spremeni. V končnem produktu obarjanja opazimo sekundarne faze in končna velikost nanodelcev železovega oksida je manjša kot v primeru brez dodane ASP. Obarjanje različnih kationov v prisotnosti aminokislin in polipeptidov so raziskovali različni raziskovalci, predvsem v smislu pojasnitve procesov, ki potekajo pri biomineralizaciji v živih organizmih ali pa pri biomimetski sintezi različnih oksidov [16],[17], [19]–[21], [59]. Mantion in sodelavci [19] so pokazali, da prisotnost različnih AK spremeni potek nastanka kristalne faze tekom soobarjanja Fe^{2+} iz vodne raztopine. Ker je potekalo obarjanje na zraku, lahko pričakujemo, da se je Fe^{2+} med obarjanjem vsaj delno oksidiral in so bili zato pogoji med obarjanjem podobni kot v mojem delu. Učinek AK je bil odvisen od tipa in koncentracije AK. Mešanica magnetita in getita nastane, kadar je dodana relativno nizka koncentracija AK (masno razmerje med AK/Fe = 3). S povečevanjem razmerja med AK/Fe pa je nastal lepidokrocit kot sekundarna faza in koncentracija sekundarne faze narašča. Vpliv AK so Mention in sodelavci razložili z adsorpcijo AK na rastočih nanodelcih z različno močnimi interakcijami s površino, odvisnimi od stranske funkcionalne skupine AK. Podobno so vpliv na velikost delcev in fazno sestavo nastalih produktov pojasnjevali drugi avtorji pri preučevanju biomimetske sinteze nanodelcev s soobarjanjem železa v prisotnosti polipeptidov [23], [24].

Naše raziskave pa v nasprotju z omenjenimi raziskavami kažejo na to, da lahko vpliv AK na nastanek nanodelcev med soobarjanjem železovih ionov pripišemo v prvi vrsti nastanku stabilnega kompleksa med Fe^{3+} in ASP. Nastanek kompleksa spremeni pH vrednosti, pri katerih potekajo reakcije obarjanja in predvsem njihovo kinetiko. Da se tvorijo vmesni produkti soobarjanja (FeOOH), mora najprej razpasti kompleks Fe-ASP. S počasnim razpadom kompleksa se počasi sproščajo ioni Fe^{3+}, zato se bistveno zmanjša prenasičenje produktov vpletenih reakcij, s tem pa hitrost nukleacije in rasti produktov. Zaradi počasne tvorbe lepidokrocita se ta delno pretvori v getit, še preden povsem zreagira v spinelni železov oksid. Ker je getit termodinamsko stabilna faza, se ne pretvori v spinelni ferit. Po počasnem obarjanju pri sobni temperaturi ostane v končnem produktu, pri povišani temperaturi pa se spremeni v nemagnetni hematit. Seveda pa ne moremo izključiti, da na nastanek nanodelcev vpliva tudi adsorpcija AK na površino nastalih nanodelcev.

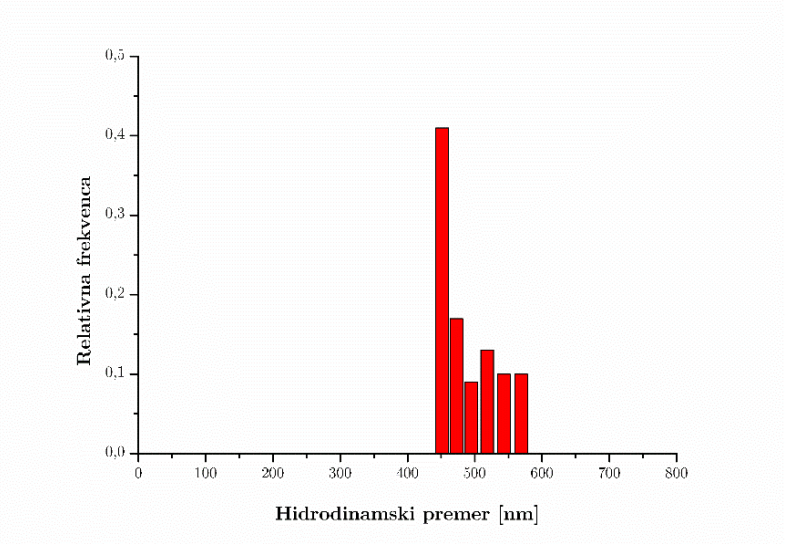
4.7 Kovalentno zamreženje aminokislin na površini nanodelcev

Adsorpcija AK v obliki molekulskih asociatov, ki so povezani z relativno šibkimi vezmi in odvisni od pH, lahko predstavlja oviro pri določenih uporabah suspenzij nanodelcev, predvsem v biomedicini. Zaradi prisotnosti aminokisline v obliki asociatov na površini nanodelci ne izkazujejo površinskega naboja, kot bi ga pričakovali pri adsorpciji v obliki monosloja. Nanodelce z adsorbiranimi AK bi lahko uporabili kot vmesno plast za nadaljnjo konjugacijo molekul, kot so npr. zdravilne učinkovine. Glede na rezultate, objavljene v poglavju 4.4.3, lahko pričakujemo, da bo asociat po vezavi molekule razpadel in konjugirana molekula se bo sprostila s površine. Asociati lahko tudi razpadejo v prisotnosti drugih (nabitih) molekul. To seveda zmanjšuje možnost, da bi AK uporabljali za uravnavanje površinskih lastnosti nanodelcev.

Da bi povečali možnost uporabe stabilnih vodnih suspenzij nanodelcev železovega oksida z adsorbiranimi AK, je potrebno zagotoviti močne kemijske vezi med molekulami v asociatih s kovalentnim zamreženjem. Z zamreženjem AK, adsorbirane v obliki molekulskih asociatov na površini nanodelcev, smo želeli doseči, da bi ostala površinska plast na delcih stabilna in ne bi razpadla v prisotnosti drugih molekul oziroma dopustila izmenjave ligandov. Eksperiment zamreženja je potekal z uporabo EDC (1-etil-3-(dimetil aminopropil karboimide hidroklorid), ki aktivira karboksilne skupine aminokislin, adsorbiranih na prehodno sintetizirane nanodelce železovega oksida in jih poveže z aminsko skupino. Pričakovali smo, da bomo dobili asociate aminokislin, povezane s kovalentno amidno (peptidno) vezjo. Karboksilne skupine aminokislin se aktivirajo z dodatkom EDC v suspenzijo nanodelcev z adsorbiranimi AK pri pH = 5,5. Uporabila sem 5-kratni prebitek EDC glede na množino karboksilnih skupin AK v suspenziji. Po krajšem času se pH zviša na 7,5, da potečejo reakcije polipeptizacije.
V podpoglavju 4.7.1 bom predstavila rezultate, kjer sem izvedla kovalentno zamreženje ASP, adsorbirane na površini nanodelcev, v podpoglavju 4.7.2 pa rezultate, kjer sem kovalentno zamrežila molekule ASP in LYS, adsorbirane na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida.

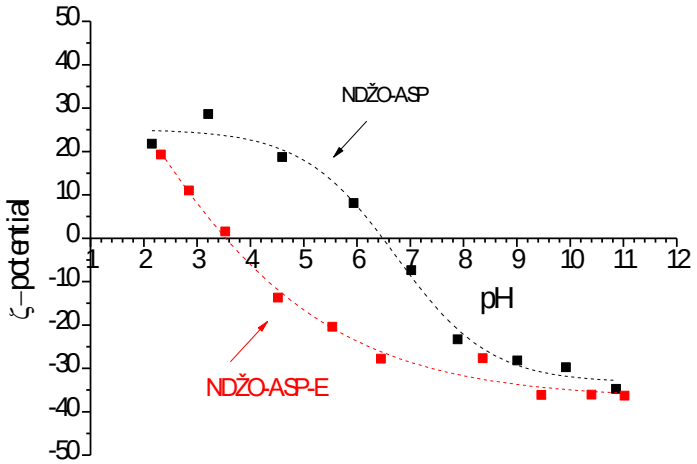
4.7.1 Kovalentno zamreženje aspartanske kisline na površini nanodelcev železovega oksida

Na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida (0,9 g/L) sem adsorbirala ASP pri pH = 2 (masno razmerje ASP / NDŽO = 0,405). Karboksilne skupine ASP v suspenziji nanodelcev sem aktivirala z EDC pri pH 5,5 in pH zvišala na 7,5, da je potekla reakcija med aktiviranimi karboksilnimi skupinami in amino skupinami.
Hidrodinamski premer nanodelcev z ASP, zamreženo s kemijsko vezjo v suspenziji NDŽO-ASP-E (koncentracija 1 mg/mL), sem spremljala z metodo DLS. Suspenzija nanodelcev NDŽO-ASP-E se ni posedla več dni. Številska porazdelitev hidrodinamskega premera suspenzije nanodelcev NDŽO-ASP-E pri pH 7,5 je prikazana na sliki 4.28. Delci v suspenziji so izkazovali velik hidrodinamski premer, nad okoli 450 nm. Predvidevam, da je prišlo pri zamreženju do povezovanja molekul ASP, adsorbiranih na različne nanodelce, kar je privedlo do aglomeracije.



Slika 4.28: Številska porazdelitev hidrodinamskih premerov nanodelcev NDŽO-ASP-E.

Edini dokaz, ki potrjuje, da je med molekulami ASP res prišlo do kovalentnega povezovanja, so meritve zeta potenciala. Nanodelci NDŽO-ASP izkazujejo izoelektrično točko (IEP) okrog pH = 6,5, po zamreženju pa se jim IEP premakne k pH okoli 3,5 (slika 4.29). Premik izoelektrične točke pri zamreženju ASP na površini nanodelcev v kislo lahko pojasnimo s povečanjem negativnega naboja na površini nanodelcev. V povprečju reagira po ena amino skupina z eno od karboksilnih skupin, medtem ko ostane druga karboksilna skupina prosta. Prosta karboksilna skupina poveča negativni naboj na površini nanodelcev in premakne izoelektrično točko v kislo.



Slika 4.29: Primerjava meritev zeta potenciala v odvisnosti od pH vodne suspenzije za nanodelce železovega oksida z adsorbiranimi AK pred (NDŽO-ASP) in po zamreženju (NDŽO-ASP-E).

4.7.2 Kovalentno zamreženje aspartanske kisline in lizina na površini nanodelcev železovega oksida

Rezultati meritev zeta potenciala suspenzije nanodelcev z zamreženimi ASP so se skladali z nastankom peptidnih vezi med molekulami ASP na površini nanodelcev. V nadaljnjem delu sem izvedla tudi medsebojno zamreženje ASP in LYS (molsko razmerje ASP:LYS = 1:1).

Da bi potrdila, da res pride do reakcije polipeptizacije, sem naredila reakcijo med ASP in LYS najprej brez prisotnosti nanodelcev (6,39 g AK/L, molsko razmerje ASP:LYS = 1:1). Če raztopino po polipeptizaciji posušimo, ostane gosta, zelo viskozna snov. Snov po polipeptizaciji je povsem drugačna od snovi, ki nastane, če posušimo raztopino mešanice AK.

Produkte reakcije polipeptizacije v raztopini smo analizirali na osnovi analize HPLC. Analiza HPLC pokaže le nezreagirano, prosto aminokislino, polipeptidov pa ne. Koliko AK je vezane v polipeptidih, smo določili s ponovno meritvijo HPLC po tem, ko sem polipeptide hidrolizirala. Uporabila sem klasično kislinsko hidrolizo raztopine po reakciji v 6 M HCl pri 80 °C, 24 h. Rezultati analize HPLC, prikazani v tabeli 4.6, kažejo, da se je po reakciji zamreženja koncentracija obeh prostih molekul znižala. To potrjuje, da so z reakcijo aktiviranih karboksilnih skupin z amino skupinami AK res nastali (poli)peptidi. Med kislinsko hidrolizo peptidne vezi prekinemo. Ponovna meritev koncentracije prostih AK po hidrolizi se vrnejo na izhodne vrednosti, kar potrjuje, da sta bili AK res vezani v (poli)peptide. Iz koncentracij obeh AK po zamreženju lahko izračunamo, da je bila konverzija AK v peptid okoli 83 %. Seveda pa na osnovi teh rezultatov ne moremo zaključiti, kako velike molekule peptida so nastale pri zamreženju.

Tabela 4.6: Koncentracije ASP in LYS, izmerjene z metodo HPLC po njunem zamreženju in naknadni hidrolizi dobljenega peptida.

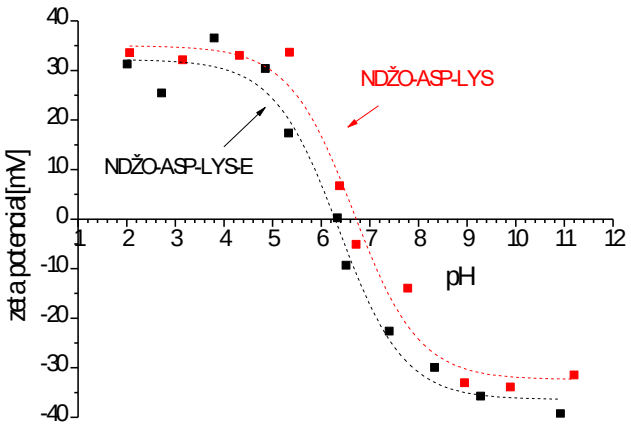
Koncentracija AK		**Koncentracija AK po zamreženju**		**Koncentracija AK po hidrolizi**	
ASP mmol/L	LYS mmol/L	ASP mmol/L	LYS mmol/L	ASP mmol/L	LYS mmol/L
23	23	4,2	3,8	23	22

Rezultati HPLC kažejo, da aminokislini ASP in LYS v raztopini po aktivaciji karboksilnih skupin z EDC tvorita peptidno vez. V nadaljevanju sem z EDC zamrežila tudi obe AK po adsorpciji na nanodelcih železovega oksida. Na predhodno sintetizirane nanodelce železovega oksida v suspenziji (2,2 mg/mL) sem adsorbirala ASP in LYS (molsko razmerje ASP:LYS = 1:1, masno razmerje AK/NDŽO = 1,54) pri pH 2. Po adsorpciji sem dvignila pH na 5,5, dodala EDC za aktivacijo in pH dvignila na 7,4, da je potekla reakcija polipeptizacije. Po zamreženju sem suspenzijo NDŽO-ASP-LYS-E ultracentrifugirala in analizirala supernatant z metodo HPLC. Rezultati so zbrani v tabeli 4.7. Koncentracija AK v supernatantu po adsorpciji je bila bistveno manjša (2,35 g/L ASP in 2,62 g/L LYS) od celokupne koncentracije obeh AK v suspenziji (3,13 g/L ASP in 3,26 g/L LYS). Dobršen del AK je torej ostalo adsorbirano na površini nanodelcev: ASP se je adsorbirala v površinski koncentraciji 19,2 mol/m^2 (12 molekul/nm^2), LYS pa v površinski koncentraciji 14,3 mol/m^2 (9 molekul/nm^2).
Po zamreženju ostane v supernatantu le še del prostih AK; 0,32 g/L ASP in 0,48 g/L LYS, kar kaže na uspešen nastanek polipeptida. Naknadna hidroliza supernatanta je pokazala, da je peptid prisoten v supernatantu, saj je po hidrolizi koncentracija proste AK močno narasla. Vseeno pa je bila koncentracija celokupne AK v supernatantu, torej seštevek koncentracije nezreagirane AK in AK, nastale s hidrolizo prisotnih peptidov (1,97 g/L ASP in 2,03 g/L LYS), znatno nižja od koncentracije v suspenatantu po adsorpciji (2,35 g/L ASP in 2,62 g/L LYS). Rezultat kaže na to, da se je med zamreženjem na površino nanodelcev vezala še dodatna AK, verjetno s kovalentno vezavo na AK, zamreženo na površini nanodelcev. Po zamreženju je ostalo na površini več AK kot po sami adsorpciji: ASP je ostala na nanodelcih v površinski koncentraciji 28,5 mol/m^2 (17 molekul/nm^2) in LYS v površinski koncentraciji 27,5 mol/m^2 (17 molekul/nm^2).

Tabela 4.7: Izmerjene koncentracije ASP in LYS v supernatantu suspenzije po zamreženju in po hidrolizi.

Koncentracija AK		**Koncentracija AK v supernatantu po adsorpciji**		**Koncentracija AK v supernatantu po zamreženju**		**Koncentracija AK v supernatantu po hidrolizi**	
ASP [g/L]	LYS [g/L]	ASP [g/L]	LYS [g/L]	ASP [g/L]	LYS [g/L]	ASP [g/L]	LYS [g/L]
3,13	3,26	2,35	2,62	0,32	0,48	1,97	2,03

Po adsorpciji in zamreženju se je suspenzija nanodelcev NDŽO-ASP-LYS-E hitro posedla, zato meritev velikosti delcev z metodo DLS ni bila možna. Slika 4.30 prikazuje meritve zeta potenciala od pH za suspenzijo nanodelcev po adsorpciji (NDŽO-ASP-LYS) in po zamreženju z EDC (NDŽO-ASP-LYS-E). Nanodelci po adsorpciji izkazujejo izoelektrično točko okoli pH = 6,7. Po zamreženju ostane izoelektrična točka skoraj nespremenjena.



Slika 4.30: Primerjava meritev zeta potenciala nanodelcev železovega oksida v odvisnosti od pH vodne suspenzije za nanodelce z adsorbiranimi AK pred (NDŽO-ASP-LYS) in po zamreženju (NDŽO-ASP-LYS-E).

Poglavje 5

Zaključki

Z adsorpcijo aminokislin aspartanske kisline (ASP) in lizina (LYS) na predhodno sintetizirane magnetne nanodelce lahko pripravimo stabilne koloidne vodne suspenzije magnetnih nanodelcev železovih oksidov, t. i. vodne magnetne tekočine. Njihova podrobnejša karakterizacija je pokazala lastnosti, ki jih nismo mogli pojasniti na osnovi v literaturi navedenega mehanizma adsorpcije z vezavo AK v monosloju, s tvorbo kelatne vezi med karboksilnimi skupinami in površinskimi železovimi atomi. Meritve zeta potenciala so pokazale, da se suspenziji nanodelcev z adsorpcijo AK (LYS , ASP) izoelektrična točka (IEP) skorajda ne spremeni. Suspenzije so bile stabilne v določenem območju pH kljub relativno nizki absolutni vrednosti zeta potenciala. Meritve z dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS) pa so pokazale hidrodinamski premer delcev, ki je bil mnogo večji od premera njihovega anorganskega jedra, izmerjenega iz slik s presevnega elektronskega mikroskopa (TEM). Analize HPLC so pokazale, da je koncentracija AK, prisotne v supernatantu suspenzij, zelo nizka, medtem ko je površinska koncentracija aminokisline na nanodelcih relativno zelo velika, mnogo večja, kot bi jo lahko pričakovali na osnovi adsorpcije molekul v monosloju. Rezultati kažejo na to, da se AK ASP in LYS adsorbirata na površino nanodelcev železovega oksida v obliki večjih molekulskih asociatov, ki dodatno sterično stabilizirajo suspenzije nanodelcev.

Podrobna študija adsorpcije obeh AK na nanodelce železovega oksida, temelječa predvsem na določanju koncentracij AK z metodo HPLC, je pokazala, da se obe AK adsorbirata na nanodelce v zelo visokih površinskih koncentracijah, ki potrjujejo predpostavko o adsorpciji v obliki molekulskih asociatov. Površinska koncentracija AK na nanodelcih narašča linearno s koncentracijo AK v suspenziji. Površina ne kaže nasičenja z adsorbatom niti pri najvišjih koncentracijah. Količina adsorbirane ASP se pri nizkih pH vrednostih skorajda ni spreminjala s pH, medtem ko je v bazičnem nekoliko padla. Količina adsorbirane LYS je bila največja v kislem pri pH = 2, že pri pH = 4 pa se je bistveno zmanjšala in se nadalje s pH ni več pomembneje spreminjala.

Molekulski asociati se tvorijo že v vodni raztopini obeh AK, kar sem dokazala z meritvami znižanja zmrzišča.

Adsorpcija AK na nanodelce železovega oksida v obliki molekularnih asociatov je lahko moteča za uporabe suspenzij, predvsem v medicini. Molekule v asociatu so namreč relativno šibko povezane in se zato lahko s površine nanodelcev nekontrolirano sprostijo ob spremembi medija, na primer v prisotnosti drugih nabitih molekul. Izpostavitev suspenzij nanodelcev, pripravljenih z AK ASP in LYS, fosfatnemu pufru PBS spremeni IEP suspenzije v skladu z zamenjavo AK na površini s fosfatnimi ioni. Da bi izboljšala stabilnost plasti aminokislin na površini nanodelcev, sem molekule aminokislin v plasti med seboj povezala s kovalentnimi peptidnimi vezmi. V ta namen sem aktivirala

karboksilne skupine AK s karbodiimidom (EDC) in s tem omogočila njihovo reakcijo z amino skupinami sosednjih molekul.

Razen z adsorpcijo AK na predhodno sintetizirane nanodelce lahko vodne magnetne tekočine pripravimo tudi z obarjanjem nanodelcev železovega oksida v prisotnosti AK. Postopek priprave je zelo preprost in zato posebej primeren za masovno proizvodnjo. Vendar pa v tem primeru AK sodeluje v reakcijah nastanka nanodelcev in jih pomembno spremeni. Vpliv AK na nastanek nanodelcev železovih oksidov so pokazali že drugi raziskovalci in ga pripisali kinetičnemu učinku adsorpcije AK na nastale nanodelce. Moji rezultati nasprotno kažejo, da pride v primeru ASP do spremembe v nastanku nanodelcev predvsem zaradi tvorbe koordinacijske spojine med ASP in Fe^{3+} ioni. Spojina se izloči iz mešanice ASP in železovih ionov v vodni raztopini že pri nizkem pH okoli 2. Nastanek koordinacijske spojine premakne pH izločanja železovih oksihidroksidov k višjim vrednostim v primerjavi z obarjanjem železovih ionov brez ASP. Reakcije koprecipitacije potekajo v prisotnosti ASP tudi mnogo počasneje kot brez ASP in lahko privedejo do neželenih stranskih produktov. Tudi nastali nanodelci železovega oksida maghemita so manjši kot v primeru obarjanja brez AK.

Literatura

[1] G. C. D. Cullity B.D., *Introduction to magnetic materials*, Second edi. Hoboken: John Wiley and Sons, 2009.

[2] D. Jiles, *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*. London, 1998.

[3] C. D. Culity, B.D. Graham, *Introduction to Magnetic Materials*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2009.

[4] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. 167–181, 2003.

[5] D. L. Huber, "Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles," *Small*, vol. 1, no. 5, pp. 482–501, 2005.

[6] R. . R. . Leslie-Pelecky, L.D, Rieke, "Magnetic properties of nanostructured materials," *Chem. Mater.*, vol. 1770, no. 8, 1996.

[7] A. Chen, J.P.; Soresen, C.M.; Klabunde, K.J.;Hadjipanayis, G. C.; Devlin E.; Kostikas, "Size-dependent magnetic properties of MnFe2O4 fine particles synthesized by coprecipitation," *Phys. Rew. B*, vol. 54, 1996.

[8] H. P. J. Smit, J. Wijn, "Ferrites," *Philips' Tech. Libr.*, 1959.

[9] J.-P. Jolivet, C. Chanéac, and E. Tronc, "Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks.," *Chem. Commun. (Camb).*, no. 5, pp. 481–487, 2004.

[10] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, and N. Li, "Toxic potential of materials at the nanolevel.," *Science*, vol. 311, no. February 2006, pp. 622–627, 2006.

[11] K. Maier-Hauff, F. Ulrich, D. Nestler, H. Niehoff, P. Wust, B. Thiesen, H. Orawa, V. Budach, and A. Jordan, "Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme," *J. Neurooncol.*, vol. 103, no. 2, pp. 317–324, 2011.

[12] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, and S. Jin, "Magnetic nanoparticles for theragnostics," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 6, pp. 467–477, 2009.

[13] T.K.N. Thanh (Ed.), "Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications," *CRC Press*, 2012.

[14] J. P. Jolivet, *Metal oxide chemistry and synthesis: from solution to solid state*. Chichester: John Wiley and Sons, 1994.

[15] H.-C. Roth, S. P. Schwaminger, M. Schindler, F. E. Wagner, and S. Berensmeier, "Influencing factors in the CO-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nano particles: A model based study," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 377, pp. 81–89, 2015.

[16] U. Cornell, R.M, Schwertmann, *The iron oxides; structure, properties, reactions, occurrences and uses*. Weinheim, 2003.

[17] D. C. Culita, G. Marinescu, L. Patron, O. Carp, C. B. Cizmas, and L. Diamandescu, "Superparamagnetic nanomagnetites modified with histidine and tyrosine," *Mater. Chem. Phys.*,

vol. 111, no. 2–3, pp. 381–385, 2008.
[18] A. Ebrahiminezhad, Y. Ghasemi, S. Rasoul-Amini, J. Barar, and S. Davaran, "Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 102, pp. 534–539, 2013.
[19] A. Mantion, F. Gozzo, B. Schmitt, W. B. Stern, Y. Gerber, A. Y. Robin, K. M. Fromm, M. Painsi, and A. Taubert, "Amino acids in iron oxide mineralization: (Incomplete) crystal phase selection is achieved even with single amino acids," *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 32, pp. 12104–12110, 2008.
[20] T. Prozorov, D. A. Bazylinski, S. K. Mallapragada, and R. Prozorov, "Novel magnetic nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: Topical review," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 74, no. 5, pp. 133–172, 2013.
[21] Y. Amemiya, A. Arakaki, S. S. Staniland, T. Tanaka, and T. Matsunaga, "Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6," *Biomaterials*, vol. 28, no. 35, pp. 5381–5389, 2007.
[22] F. Nudelman and N. A. J. M. Sommerdijk, "Biomineralization as an inspiration for materials chemistry," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 27, pp. 6582–6596, 2012.
[23] J. J. M. Lenders, H. R. Zope, A. Yamagishi, P. H. H. Bomans, A. Arakaki, A. Kros, G. de With, and N. A. J. M. Sommerdijk, "Bioinspired magnetite crystallization directed by random copolypeptides," *Adv. Funct. Mater.*, pp. 711–719, 2014.
[24] J. Baumgartner, M. Antonietta Carillo, K. M. Eckes, P. Werner, and D. Faivre, "Biomimetic magnetite formation: From biocombinatorial approaches to mineralization effects," *Langmuir*, vol. 30, no. 8, pp. 2129–2136, 2014.
[25] D. Faivre and D. Schuler, "Magnetotactic Bacteria and," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. September, pp. 4875–4898, 2008.
[26] J. S. Duncan, *Introduction to colloid&surface chemistry*. 1991.
[27] Israelachvili.J., *Intramolecular and surface forces*. London: Academic press, 1991.
[28] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surfaces forces: With applications to colloidal and biological systems*. London: Academic Press Inc., 1985.
[29] K. Pušnik, M. Peterlin, I. K. Cigić, G. Marolt, K. Kogej, A. Mertelj, S. Gyergyek, and D. Makovec, "Adsorption of Amino Acids, Aspartic Acid, and Lysine onto Iron-Oxide Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, p. acs.jpcc.6b03180, 2016.
[30] J. F. Lambert, "Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review," *Orig. Life Evol. Biosph.*, vol. 38, no. 3, pp. 211–242, 2008.
[31] D. T. E. G. C. Barrett, *Aminoacids and peptides*. Cambridge, United Kingdom: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2008.
[32] "Amino Acid," *Nobelprize*, 2016. [Online]. Available: https://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/index.html.
[33] F. O. Okeola and E. O. Odebunmi, "Comparison of Freundlich and Langmuir isotherms for adsorption of methylene blue by agrowaste derived activated carbon," *Adv. Environ. Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 329–335, 2010.

[34] L. V. E. Tombácz, I.Y. Tóth, D. Nesztor, E. Illés, A. Hajdú, M. Szekeres, "Adsorption of organic acids on magnetite nanoparticles, pH-dependent colloidal stability and salt tolerance," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 435, pp. 91–96, 2013.
[35] S. M. M. Nelwamondo, M. J. Moloto, R. W. M. Krause, and N. Moloto, "Synthesis and characterization of alanine-capped water soluble copper sulphide quantum dots," *Mater. Lett.*, vol. 75, pp. 161–164, 2012.
[36] A. Majzik, L. Fulop, E. Csapo, F. Bogar, T. Martinek, B. Penke, G. Biro, and I. Dekany, "Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, beta-amyloid peptides and fragment," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 81, no. 1, pp. 235–241, 2010.
[37] A. P. Vieira, G. Berndt, I. G. De Souza Junior, E. Di Mauro, A. Paesano, H. De Santana, A. C. S. Da Costa, C. T. B. V Zaia, and D. A. M. Zaia, "Adsorption of cysteine on hematite, magnetite and ferrihydrite: FT-IR, Mossbauer, EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies," *Amino Acids*, vol. 40, no. 1, pp. 205–214, 2011.
[38] M. G. Ghodratollah Absalan, "Investigating the parameters affecting the adsorption of amino acids onto AgCl nanoparticles with different surface charges," *Amino Acids*, vol. 43, no. 5, pp. 1955–1967.
[39] O. H. and L. G. Z Pászti, T Keszthelyi and P. Ltd, "Adsorption of amino acids on hydrophilic surfaces," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 20, 2008.
[40] S. N. Norio Kitadai, , Tadashi Yokoyama, "In situ ATR-IR investigation of L-lysine adsorption on montmorillonite," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 2, pp. 395–401, 2009.
[41] H. J. C. R. M. H. Caroline M. Jonsson, Christopher L. Jonsson, Dimitri A. Sverjensky, "Attachment of l-Glutamate to Rutile (α-TiO2): A Potentiometric, Adsorption, and Surface Complexation Study," *Langmuir*, vol. 25, no. 20, pp. 12127–12135, 2009.
[42] R. M. H. Caroline M. Jonssona, Christopher L. Jonssona, Charlene Estradaa, Dimitri A. Sverjenskya, H. James Cleaves, "Adsorption of l-aspartate to rutile (α-TiO2): Experimental and theoretical surface complexation studies," *Geochim. Cosmochim. Acta*, pp. 2356–2367, 2010.
[43] N. S. Edward Greinera, Kartik Kumarc, Madhuresh Sumitd, Anthony Giuffrea, Weilong Zhaoh, Joel Pedersenc, "Adsorption of l-glutamic acid and l-aspartic acid to γ-Al2O3," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 133, pp. 142–155, 2014.
[44] S. G. Mandel K, Hutter F, Gellermann C, "Synthesis and stabilisation of superparamagnetic iron oxide nano-particle dispersions," *Colloids Surf A*, vol. 390, pp. 173–178, 2011.
[45] K. C. Barick and P. a. Hassan, "Glycine passivated Fe3O4 nanoparticles for thermal therapy," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 369, no. 1, pp. 96–102, 2012.
[46] H.-M. Yang, B. C. Oh, J. H. Kim, T. Ahn, H.-S. Nam, C. W. Park, and J.-D. Kim, "Multifunctional poly(aspartic acid) nanoparticles containing iron oxide nanocrystals and doxorubicin for simultaneous cancer diagnosis and therapy," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 391, no. 1–

3, pp. 208–215, 2011.
[47] S. Y. Lee, C. Y. Ahn, J. Lee, and J. H. Chang, "Amino acid side chain-like surface modification on magnetic nanoparticles for highly efficient separation of mixed proteins," *Talanta*, vol. 93, pp. 160–165, 2012.
[48] S. Peng, W. Yan, and L. Wang, "High T2-relaxation and biocompatible magnetic nanofluids with poly(amino acid) coating," *Mater. Res. Bull.*, vol. 48, no. 11, pp. 4693–4698, 2013.
[49] D. Perego, N. Masciocchi, A. Guagliardi, J. Manuel Domínguez-Vera, and N. Gálvez, "Poly(amino acid) functionalized maghemite and gold nanoparticles.," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 7, p. 75102, 2013.
[50] S. L. Tie, Y. Q. Lin, H. C. Lee, Y. S. Bae, and C. H. Lee, "Amino acid-coated nano-sized magnetite particles prepared by two-step transformation," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 273, no. 1–3, pp. 75–83, 2006.
[51] F. Zamani and S. M. Hosseini, "Palladium nanoparticles supported on Fe3O4/amino acid nanocomposite: Highly active magnetic catalyst for solvent-free aerobic oxidation of alcohols," *Catal. Commun.*, vol. 43, pp. 164–168, 2014.
[52] M. H. Sousa, J. C. Rubim, P. G. Sobrinho, and F. A. Tourinho, "Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 225, no. 1–2, pp. 67–72, 2001.
[53] M. Mikhaylova, D. K. Kim, C. C. Berry, A. Zagorodni, M. Toprak, A. S. G. Curtis, and M. Muhammed, "BSA immobilization on amine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 12, pp. 2344–2354, 2004.
[54] S. P. Schwaminger, P. F. Garcia, G. K. Merck, F. A. Bodensteiner, S. Heissler, S. Gunther, and S. Berensmeier, "Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, no. 40, pp. 23032–23041, 2015.
[55] J. Y. Park, E. S. Choi, M. J. Baek, and G. H. Lee, "Colloidal stability of amino acid coated magnetite nanoparticles in physiological fluid," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 3–4, pp. 379–381, 2009.
[56] D. Patel, Y. Chang, and G. H. Lee, "Amino acid functionalized magnetite nanoparticles in saline solution," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 9, no. 1 SUPPL., pp. S32–S34, 2009.
[57] A. B. Elisa Boanini, Paola Torricelli, Massimo Gazzano, Roberto Giardino, "Nanocomposites of hydroxyapatite with aspartic acid and glutamic acid and their interaction with osteoblast-like cells," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4428–4433, 2006.
[58] J. Viota, J. L.; Arroyo, F. J.; Delgado, A. V.; Horno, "Electrokinetic Characterization of Magnetite Nanoparticles Functionalized with Amino Acids," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 344, pp. 144–149, 2010.
[59] M. Kralj Cigic, I.; Vrsčaj Vodosek, T.; Kosmerl, T.; Strlic, "Amino ˇ Acid Quantification in the Presence of Sugars using HPLC and Precolumn Derivatization with 3-MPA/OPA and FMOC-Cl," *Acta Chim. Slov.*, vol. 55, p. 660, 2008.

[60] B. A. Gu, B.; Brown, G. M.; Maya, L.; Lance, M. J.; Moyer, "Regeneration of Perchlorate (ClO4-)-Loaded Anion Exchange Resins by a Novel Tetrachloroferrate (FeCl4-) Displacement Technique," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, p. 3363–3368., 2001.
[61] Makovec, D.; Čampelj, S.; Bele, M.; Maver, U.; Zorko, M.; Drofenik, M.; Jamnik, J.; Gaberšček, "Nanocomposites containing embedded superparamagnetic iron oxide nanoparticles and rhodamine 6G," *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 334, pp. 74–79, 2009.
[62] S.P.Gubin, *Magnetic Nanoparticles*. Hoboken: John Wiley and Sons, 2009.
[63] C. D. G. B.D. Cullity, *Introduction to magnetic materials*, Second ed. Hoboken: Wiley-IEEE Press, 2011.
[64] J. Tkac, I. Vostiar, L. Gorton, P. Gemeiner, and E. Sturdik, "Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 9, pp. 1125–1134, 2003.
[65] Z. Durmus, H. Kavas, M. S. Toprak, A. Baykal, T. G. Altinçekiç, A. Aslan, A. Bozkurt, and S. Coşgun, "l-lysine coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, structural and conductivity characterization," *J. Alloys Compd.*, vol. 484, no. 1–2, pp. 371–376, 2009.
[66] G. Marinescu, L. Patron, D. C. Culita, C. Neagoe, C. I. Lepadatu, I. Balint, L. Bessais, and C. B. Cizmas, "Synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of aminoacids," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 1045–1051, 2006.
[67] H. Qu, H. Ma, W. Zhou, and C. J. O'Connor, "In situ surface functionalization of magnetic nanoparticles with hydrophilic natural amino acids," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 389, pp. 60–65, 2012.
[68] J. P. Q. F.J. Hingston, A.M. Posner, "Specific adsorption of anions," *Nat. 215*, vol. 215, p. 1459, 1967.
[69] T. F. Tadros, *Solid/Liquid Dispersions*. London: Academic Press Inc., 1987.
[70] H. C. Amend, J. P.; Helgeson, "Solubilities of the Common L-α- Amino Acids as a Function of Temperature and Solution pH," *Pure Appl. Chem.*, vol. 69, p. 935–942, 1997.
[71] M. R, "Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media," *IEEE Trans Magn*, vol. 17, pp. 1247–1248.
[72] Dušak, Peter; Benčina, Mojca, Turk, Martina, Bavčar, Dejan, Košmerl ,Tatjana, Berovič, Marin, Makovec,Darko "Application of magneto-responsive Oenococcus oeni for the malolactic fermentation in wine," *Biochem. Eng. J.*, vol. 110, pp. 134–142, 2016.
[73] Makovec, Darko, Sajko, Marjan, Selišnik, Aljaž, Drofenik, "Low-temperature synthesis of magnetically recoverable, superparamagnetic, photocatalytic, nanocomposite particles," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 136, pp. 230–240, 2012.
[74] Makovec, Darko, Sajko, Marjan, Selišnik, Aljaž, Drofenik, "Magnetically recoverable photocatalytic nanocomposite particles for water treatment," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 129, pp. 83–89, 2011.
[75] S. Čampelj, "Funkcionalizacija magnetnih nanodelcev,"

Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, 2010.
[76] B. L.j., *The infrared spectra of complex molecules*. London: Chapman and Hall, 1980.
[77] E. T. J.-P. Jolivet, C. Chaneac, "J.-P. Jolivet, C. Chaneac, E. Tronc, Chem. Commun. (2004) 481.," *Chem. Commun*, vol. 481, 2004.
[78] J. D. K. T. Ahn, J.H. Kim, H.M. Yang, J.W. Lee, "T. Ahn, J.H. Kim, H.M. Yang, J.W. Lee, J.D. Kim, J. Phys. Chem. C 116 (2012) 6069," *J. Phys. Chem.*, vol. 116, 2012.
[79] C. J. W. D. Fu, P.G. Keech, X. Sun, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, p. 18523, 2011.
[80] J. M. A. Nevrosky, L. Mazeina, "Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6.," *Sci. 319*, vol. 1635, 2008.
[81] T. M. Y. Amemiya, A. Arakaki, S.S. Staniland, T. Tanaka, *Biomaterials*, vol. 28, 2007.

Bibliografija

Članki v revijah

PUŠNIK, Klementina, GORŠAK, Tanja, DROFENIK, Mihael, MAKOVEC, Darko; „Synthesis of aqueous suspensions of magnetic nanoparticles with the co-precipitation of iron ions in the presence of aspartic acid," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* , Izv. 413, 66-75, 2016.

PUŠNIK, Klementina, PETERLIN, Mojca, KRALJ CIGIĆ, Irena, MAROLT, Gregor, KOGEJ, Ksenija, MERTELJ, Alenka, GYERGYEK, Sašo, MAKOVEC, Darko., „Adsorption of amino acids, aspartic acid, and lysine onto iron-oxide nanoparticles,"*The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces ;* Izv. 120, 14372-14381, 2016.

Prispevek na konferenci

Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

PUŠNIK, Klementina, MAROLT, Gregor, GYERGYEK, Sašo, MAKOVEC, Darko; „Amino-acid-iron-oxide-nanoparticles: adsorption studies and colloidal properties", v *7. študentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana*, Ljubljana. Slovenija 2015.

PUŠNIK, Klementina, DROFENIK, Mihael, MAKOVEC, Darko.; „Preparation of stable colloidal aqueous suspensions of magnetic iron-oxide nanoparticles using aspartic acid as surfactant" v *5. študentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana* , Ljubljana. Slovenija 2013.

Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

PUŠNIK, Klementina, MAROLT, Gregor, GYERGYEK, Sašo, ARRIGLER, Vesna, KOGEJ, Ksenija, MAKOVEC, Darko; „Adsorption of aspartic acid onto superparamagnetic iorn-oxide nanoparticles : colligative properties and high-performance ion chromatography studies", v. *9th Young researchers' day*, , Ljubljana. Slovenija 2015.

PUŠNIK, Klementina, MAROLT, Gregor, GYERGYEK, Sašo, DROFENIK, Mihael, MAKOVEC, Darko;. „Uporaba aminokislin za pripravo stabilnih vodnih suspenzij nanodelcev železovega oksida" (predavanje), v Slovenski kemijski dnevi, Maribor, Slovenija, 2014.

PUŠNIK, Klementina, DROFENIK, Mihael, MAKOVEC, Darko; „Study of iron-oxide nanoparticles stabilized with amino acids in aqueous

suspensions" v *7th Young researchers' day*, , Ljubljana. Slovenija 2013.

PUŠNIK, Klementina, DROFENIK, Mihael, MAKOVEC, Darko; „Preparation of stable colloidal aqueous suspensions of magnetic iron-oxide nanoparticles using aspartic acid as surfactant. " v SLONANO, Ljubljana. Slovenija 2012.

Elaborat, predštudija, študija

MAKOVEC, Darko, GYERGYEK, Sašo, PRIMC, Darinka, ANŽELAK, Bernarda, PUŠNIK, Klementina; „Vpliv sinteznih parametrov na velikost nanodelcev : sinteza večjih količin nanodelcev, " (IJS delovno poročilo). 2012.

Prispevek na konferenci brez natisa

PUŠNIK, Klementina, MAROLT, Gregor, GYERGYEK, Sašo, ARRIGLER, Vesna, KOGEJ, Ksenija, MAKOVEC, Darko; „Adsorption of amino acids onto superparamagnetic iron-oxide nanoparticles and the colloidal properties of their aqueous suspensions, "*v 5th International Colloids Conference, Amsterdam, Nizozemska, 2015.*