

“Iron oxide magnetic nanoparticles synthesized by laser target evaporation:
focus on biomedical applications”

Abstract

The Master Thesis entitled “Iron oxide magnetic nanoparticles synthesized by laser target evaporation: focus on biomedical applications” shows the following results:

1. Characterization of 7 nanoparticles batches, produced using different synthesis parameters like gas pressure in a chamber, laser impulse duration, average power, gas type etc.
2. Different stoichiometry was confirmed and some batches were chosen for the subsequent water-based ferrofluid preparation.
3. Ferrofluids were stabilized using electrostatic stabilators (sodium citrate) and steric stabilators (chitosan).
4. The growth and morphology of healthy human blood and fat cells in the presence of ferrofluid were investigated. Preliminary biocompatibility experiments of ferrofluids showed low cytotoxicity of healthy human blood and fat cells.
5. Different nanoparticle's accumulation mechanisms were revealed in the case of ferrofluids stabilized by electrostatic and steric stabilators. Nanoparticles from ferrofluid with electrostatic stabilator were able to move into the cell volume and were accumulated inside some organelles, although the nanoparticles from ferrofluid with steric stabilator were visible outside the cell.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина
ИНСТИТУТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Департамент «ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ»

**МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА,
ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОГО ИСПАРЕНИЯ:
ФОКУС НА БИОПРИЛОЖЕНИЯ**

Направление подготовки «Физика»

Программа «Физика магнитных явлений»

Допустить к защите:
Зав. кафедрой магнетизма и магнитных
наноматериалов
д.ф.-м.н., проф. В.О. Васьковский

Магистерская диссертация

Новоселовой Юлии Павловны

Нормоконтролер:
к.ф.-м.н., Е.А. Степанова

Научный руководитель:
д.ф.-м.н., проф. Г. В. Курляндская

Екатеринбург
2016

РЕФЕРАТ

В ходе выполнения выпускной квалификационной работы были аттестованы 7 партий магнитных наночастиц (МНЧ) оксидов железа, полученные методом лазерного испарения. Данный электрофизический метод позволяет получать порошки с узким распределением по размерам и большими партиями, что обуславливает перспективность их применения в разработке биотехнологических и медицинских приложений на промышленном уровне.

Варьирование давления газа в рабочей камере, длительности импульса лазерного излучения, средней мощности и типа рабочего газа позволило получить материалы с различной стехиометрией в интервале от $\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$ до $\text{Fe}_{2.84}\text{O}_4$, при средних размерах от 10 до 23 нм. Например, партия О2 при меньших параметрах синтеза имеет среднечисленный размер 10 нм, удельная поверхность 108 м²/г, а партия О3 при больших параметрах имеет среднечисленный размер 23 нм, удельная поверхность 45 м²/г. На основе синтезированных нанопорошков были приготовлены электростатически и стерически стабилизированные феррожидкости (ФЖ). Оработана методика получения стерически стабилизированной ФЖ_2, концентрация до 2 г/л. Исследована динамика диспергирования ФЖ_1, в общем случае достаточная длительность обработки не превышает 15-30 минут.

МНЧ и ФЖ прошли аттестацию с помощью различных методов. В большинстве случаев распределения по размерам НЧ с высокой степенью точности подчиняются логнормальному закону. Их средние размеры были рассчитаны как с использованием данных рентгенофазового анализа, так и с использованием данных просвечивающей электронной микроскопии, согласующихся друг с другом в пределах погрешности используемых методов. Рентгенофазовый анализ (РФА) и химические методы анализа позволили установить, что МНЧ обладают структурой обратной шпинели, близкой к маггемиту.

НЧ в составе стабилизированных ФЖ представляют собой ансамбль суперпарамагнитных и ферромагнитных частиц. Сферичность и существование только одной магнитной фазы подтверждены данными ферромагнитного резонанса. ФЖ на основе НЧ оксида железа обладают свойством магнитоиндукционного нагрева в слабых полях 1,8 кА/м и частотах 214 кГц до 2 Вт/г. Достаточно высокая намагниченность насыщения, 130-325 кА/м для НЧ и 110-227 кА/м для ФЖ, и небольшой размер МНЧ партий до 30 нм обуславливают перспективность материала для разработки на его основе биотехнологических приложений.

Для определения степени воздействия на клетки живых культур некоторые из ФЖ исследовали для оценки токсичности в отношении клеток крови и жировой ткани человека. Наряду с контрольной группой, исследовались рост и морфология клеток, выращенных в присутствии МНЧ в питательной среде. Поскольку сравнение контрольной и опытных

групп не выявило существенных изменений, было выдвинуто предположение о достаточно низкой цитотоксичности данных суспензий в случае рассматриваемых биообъектов. Клетки крови и жировой ткани человека слабо реагируют на повышенное содержание железа в виде МНЧ оксида железа в питательной среде. Выявлены различия в процессе аккумуляции НЧ из ФЖ, стабилизированной с добавлением (ФЖ_2) и без полимера хитозана (ФЖ_1). Знание механизмов взаимодействия между клеткой и МНЧ позволит создать более эффективные биотехнологические приложения.

Вышеперечисленные свойства в сочетании с хорошей биосовместимостью свидетельствуют о положительной оценке перспектив биотехнологического применения стабилизированных ФЖ на основе МНЧ оксида железа, полученных методом лазерного испарения.

Материалы магистерской диссертации были представлены на всероссийских (ВНКСФ, СПФКС) и международных (INTERMAG14, IBCM-15) конференциях и Школе магнетизма (Миннеаполис, США, 2015), доклады были отмечены дипломами и грамотами. Результаты работы опубликованы в трех статьях в журналах, входящих в список ВАК:

1. J. P. Novoselova, A. P. Safronov, O.M. Samatov, I. V. Beketov, H. Khurshid, Z. Nemati, H. Srikanth, T. P. Denisova, R. Andrade, and G.V. Kurlyandskaya. Laser target evaporation Fe₂O₃ nanoparticles for water based ferrofluids: focus on biomedical applications. IEEE Trans. Magn., Vol. 50, Issue 11, 4600504 (2014);

2. I. P. Novoselova, A. P. Safronov, O.M. Samatov, A. I. Medvedev, and G. V. Kurlyandskaya. Biocompatible Ferrofluids with Iron Oxide Nanoparticles Fabricated by Laser Target Evaporation. IEEE Magnetic Letters, Vol. 6, 6700204 (2015);

3. I. P. Novoselova, A.P. Safronov, O.M. Samatov, I.V. Beketov, A.I. Medvedev, G.V. Kurlyandskaya. Water based suspensions of iron oxide obtained by laser target evaporation for biomedical applications. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, Vol. 415, P. 35-38 (2016).

Статья – Ю.П. Новоселова, О.М. Саматов, Г.С. Куприянова, А.М. Мурзакаев, А.П. Сафронов, Г.В. Курляндская. Магнитные свойства наночастиц оксида железа, полученных методом лазерного испарения. Известия высших учебных заведений. Физика (2016) – находится на рецензировании.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих литературный обзор, постановку задачи, методику наблюдений и измерений, результаты и их обсуждение, а также из заключения и списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации составляет 84 страницы, включая 46 рисунков и 21 таблицу.

МЕСТО ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

Работа над магистерской диссертацией была выполнена на кафедре магнетизма и магнитных наноматериалов ИЕН при сотрудничестве с кафедрой высокомолекулярных соединений ИЕН, Институтом электрофизики УрО РАН (г. Екатеринбург, Россия), Институтом Страны Басков (г. Бильбао, Испания), Балтийским федеральным университетом им. И. Канта (г. Калининград, Россия) в рамках гранта РФФИ мол_нр № 15-32-50369 «Исследование НЧ оксида железа, полученных с помощью метода лазерного испарения, и феррожидкостей на их основе» и Восточно-Сибирской государственной академией образования (г. Иркутск, Россия).

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
МЕСТО ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	9
1 Обзор литературы.....	9
1.1 Магнитные наночастицы в биомедицинских приложениях.....	9
1.2 Методы получения магнитных наночастиц оксида железа.....	15
1.3 Магнитно-жидкостная гипертермия. Теория.....	22
2 Постановка задачи работы.....	28
3 Методика проведения наблюдений и измерений.....	29
3.1 Получение объектов.....	29
3.1.1 Метод лазерного испарения.....	29
3.1.2 Получение стабилизированных феррожидкостей.....	30
3.2 Методы исследования.....	31
3.2.1 Просвечивающая электронная микроскопия.....	31
3.2.2 Исследование удельной поверхности.....	33
3.2.3 Рентгеновская дифракция.....	33
3.2.4 Магнитные измерения.....	34
3.2.4.1 СКВИД – магнитометрия.....	34
3.2.4.2 Ферромагнитный резонанс.....	35
3.2.4.3 Модифицированная изотермическая микрокалориметрия.....	36
3.2.5 Оценка острой цитотоксичности исследуемого материала.....	39
4 Результаты и их обсуждение.....	45
4.1 Структурные свойства наночастиц и феррожидкостей.....	45
4.2 Магнитные свойства наночастиц и феррожидкостей на их основе.....	57
4.3 Особенности резонанса наночастиц и феррожидкостей на их основе.....	63
4.4 Калориметрическое исследование значений тепловой мощности феррожидкости на основе наночастиц оксида железа.....	65
4.5 Эксперимент по оценке жизнеспособности живых культур в присутствии магнитных наночастиц оксида железа.....	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	81
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	82

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ГОСТ – межгосударственный стандарт

ГСО – государственный стандартный образец

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки ткани человека

МНК – моноклеарные клетки крови человека

МНЧ – магнитные наночастицы

МРТ – магнито - резонансная томография

НЧ – наночастицы

ОКР – область когерентного рассеяния

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПДК – предельно допустимая концентрация

ППС – полная питательная среда

РФА – рентгенофазовый анализ

РФФИ – российский фонд фундаментальных исследований

СанПиН – санитарные правила и нормы

СПМ – суперпарамагнетизм

ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия

УрО РАН – Уральское отделение российской академии наук

УрФУ – Уральский федеральный университет им. Б. Н. Ельцина

ФЖ – феррожидкость

ФМР – ферромагнитный резонанс

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

BET – метод адсорбции газа на поверхности Брунауэра – Эммета - Теллера

EASTMAG – Euro-Asian Symposium “Trends in Magnetism”

in vivo – проведение исследований в естественных условиях

INTERMAG – International Magnetism Conference

SPIONs – суперпарамагнитные наночастицы оксида железа

TXRF – Total reflection x-ray fluorescence - рентгенофлуоресцентный анализ на полном отражении

ZFC-FC – термомагнитные кривые типа “Zero Field Cooling-Field Cooling”

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования предполагают развитие различных дисциплин и понимание основных закономерностей на стыке наук, таких как биология, химия, физика и материаловедение. Данная квалификационная работа содержит элементы исследований, выполненных в рамках вышеперечисленных областей научного знания, включая физику магнитных наноматериалов.

Проблема разработки эффективных биомедицинских приложений НЧ носит междисциплинарный характер, и в последние годы наблюдается выраженный подъем интереса к данной области исследований со стороны научных групп, включающих специалистов из таких областей науки как физика, химия, материаловедение, биология и медицина[1]. В частности, междисциплинарная область, называемая биомagnetизмом, с недавнего времени представлена на крупнейших научных конференциях по магнетизму (EASTMAG, INTERMAG и др.), что является показателем повышенного интереса со стороны научного сообщества.

Установлено, что МНЧ играют значительную роль в процессах метаболизма и функционирования живых организмов. Ансамбли МНЧ обеспечивают ориентацию некоторых видов бактерий в магнитном поле Земли. МНЧ могут применяться в системах адресной доставки лекарственных соединений для обнаружения, выделения, иммобилизации и модификации биологических объектов. Также известно применение суспендированных МНЧ в терапии рака с использованием эффекта гипертермии, обусловленного магнитным нагревом. МНЧ различного состава активно используются как контрастные агенты в методах диагностики, таких как магниторезонансная томография (МРТ).

Используя методы управляемого синтеза, можно получать МНЧ с заданными магнитными и структурными свойствами, варьируя средний размер, форму и состав. Строгий контроль синтеза МНЧ – нетривиальная задача, поэтому важно получать большие объемы одной партии МНЧ, внутри которой отклонение свойств и параметров будут минимальны. Именно комплексное изучение таких характеристик МНЧ, как поведение в магнитном поле при разных температурах, средние размеры в виде нанопорошка и в виде суспензии, особенности поверхности, магнитоиндукционный нагрев, может стимулировать разработку новых методов синтеза или же поиск оптимальных параметров уже известных методов, а также появление новых направлений по применению МНЧ в медицине и других сферах.

Для успешного решения поставленных прикладных задач, таких как применение *«in vivo»*, НЧ должны обладать определенными физико-химическими свойствами и удовлетворять жестким требованиям, установленным международными стандартами [1]. Например,

устойчивость в жидкостях для обеспечения равномерного распределения функционального материала в суспензии достигается путем деагрегирования образца. С медицинской точки зрения важен вопрос цитотоксичности и возможного накопления используемых НЧ в органах, что накладывает определенные условия на химический состав, тип покрытия поверхности и геометрические размеры используемых НЧ.

В рамках магистерской диссертации были получены МНЧ оксида железа разной стехиометрии с использованием высокопродуктивного электрофизического метода лазерного испарения. Данный электрофизический метод позволяет получать порошки с узким распределением по размерам и большими партиями, что обуславливает перспективность для широкого круга биотехнологических приложений. Исследуемые МНЧ прошли аттестацию с помощью структурных и магнитных методов. На их основе были получены самостабилизирующиеся и стабилизированные с помощью цитрата натрия водные суспензии, приготовленные на основе данных нанопорошков, обладающие интересными магнитными свойствами, обуславливающие возможность их применения в таких методах терапии как гипертермия. МНЧ оксида железа активно используются в медицинских исследованиях и очень интересны для биоприложений. Понимание деталей механизмов взаимодействия НЧ и живой клетки может помочь в создании лекарственных препаратов нового поколения, разработке новых методов диагностики и лечения рака, в решении ряда экологических проблем и повышении эффективности магнитного биодетектирования.

Автор выражает благодарность О.М. Саматову, И.В. Бекетову, R. Andrade, Е.А. Степановой, В.О. Васьковскому, Н.А. Кулеш, А.И. Медведеву, А.М. Мурзакаеву, А.Н. Горьковенко, Т.П. Денисовой, Л.С. Литвиновой, В.В. Шуплецовой, Н.А. Дунец, Т.М. Деминой за всестороннюю помощь в проведении измерений и обсуждении результатов.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих литературный обзор, постановку задачи, методику наблюдений и измерений, результаты и их обсуждение, а также из заключения и списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации составляет 84 страницы, включая 46 рисунков и 21 таблицу.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Обзор литературы

1.1 Магнитные наночастицы в биомедицинских приложениях

Интерес к исследованию свойств макроскопических ансамблей НЧ обусловил возникновение в 1960-х годах нового раздела науки - физики ультрадисперсных сред. Прежде всего, научный интерес вызван особыми эффектами взаимодействия между НЧ, а не только их индивидуальными свойствами. Показательно, что количество работ, посвященных исследованию возможностей биомедицинских применений МНЧ, неуклонно растет. МНЧ особенно интересны для приложений в области медицины, в первую очередь, благодаря свойствам неинвазивного воздействия и управления внешним магнитным полем, которые открывают большое количество возможностей для создания новых применений и методов диагностики/лечения в медицине. Научные исследовательские группы предлагают все новые и новые идеи использования МНЧ. Данная тенденция свидетельствует о значительном потенциале исследований в данном направлении.

МНЧ имеют контролируемые средние размеры от десятков до сотен нм, то есть размеры меньше или сравнимые с размерами клеток (10-100 мкм), вирусов (20-450 нм), белков (5-50 нм) и генов (10-100 нм в длину и около 2 нм в ширину) [1]. Наряду с составом, средний размер НЧ при определении их свойств является критическим фактором.

С появлением новых методов современной биохимии появилась возможность заметно увеличить эффективность лечения, например, покрывая поверхность МНЧ биоконпонентами для последующей адресной доставки лекарства в требуемую область [2]. Возможность локализации комплекса «НЧ – лекарство» при помощи магнитного поля в определённом месте относят к основным преимуществам данной методологии, которая позволяет значительно уменьшить токсическое действие лекарств на органы и системы организма в целом. Для адресной доставки лекарств в качестве магнитного носителя обычно используют суперпарамагнитные частицы. Достоинством использования частиц данного типа является то, что они после воздействия магнитного поля не обладают остаточным магнитным моментом и поэтому не агрегируют. Однако, суперпарамагнитные НЧ характеризуются более низкой намагниченностью насыщения, что усложняет перенос и удержание частиц в непосредственной близости от целевого объекта, особенно при мощном воздействии кровотока [3].

Наносферы являются полимерными частицами, на поверхность которых помещается активное вещество. В отличие от них, в полимерной оболочке нанокапсул образуется полость, наполненная жидкостью. Таким образом, активное вещество может доставляться в

организм различными механизмами: наносферы – процесс высвобождения имеет экспоненциальный характер, нанокапсулы – процесс высвобождения осуществляется с определенной скоростью довольно длительное время. Полимерные материалы биосовместимы, способны к биоразложению, многофункциональны. Также в последнее время довольно часто в ключе биомедицинских приложений научные группы предлагают дендримеры, являющиеся полимерной цепочкой с необычным строением в виде разветвляющейся сетки. Исследуемые молекулы могут соединяться с дендримерами, образуя комплекс на поверхности или же «запутываясь» в отдельных цепочках полимера. Именно эти особенности взаимодействия с другими химическими соединениями привлекает внимание исследователей к данному типу полимеров.

Среди углеродных наноструктур наиболее часто упоминаются фуллерены, а также нанотрубки. Их главной особенностью является форма: молекулы имеют вид полых замкнутых оболочек, что является интересным свойством для разработки агентов доставки лекарственных препаратов.

Группа неорганических НЧ включает в себя оксид кремния и разные металлы (Au, Ag, Pt). Такие НЧ имеют ядро из кремния и металлическую оболочку. Наличие металлов на поверхности делает возможным создание управляемых НЧ, которые будут обладать уникальной способностью высвобождения лекарственного средства физическим воздействием или же изменением магнитного поля.

Уже сейчас разработаны и внедрены инновационные лекарственные препараты, активное вещество которых заключается в биоразлагаемую нетоксичную полимерную матрицу. Известно, что наноразмерные масштабы способны увеличить эффективность препарата в разы. На сегодняшний день уже ведутся клинические испытания используемых лекарств в наноразмерных матрицах. Адресная доставка может быть достигнута введением в организм терапевтического агента, связанного с магнитной НЧ, и воздействия на этот комплекс внешнего магнитного поля.

МНЧ могут применяться для точечной доставки, которая является перспективным и имеющим большой потенциал направлением. Использование градиента магнитного поля способствует фокусированию МНЧ в необходимой области в организме человека. В частности, МНЧ могут быть чрезвычайно полезны при доставке лекарственных препаратов в раковую опухоль. Химиотерапия имеет тонкую грань между эффективностью и токсичностью. Метод точечной доставки может сделать ее направленной: МНЧ, управляемые магнитным полем, поставляют необходимые дозы химиотерапевтического препарата в опухоль, ограничивая токсичность и воздействие его на организм, снижая отрицательные побочные эффекты общей химиотерапии в случае внутривенного введения.

МНЧ широко используются в системах для магнитной сепарации биокomпонентов, включая разделение клеток с различными характеристиками. Методика магнитной сепарации состоит в добавлении золя иммуномодифицированных МНЧ непосредственно к образцу биологической жидкости. После инкубации в течение определенного времени образец помещается в магнитный сепаратор, где клетки интересующего типа, связанные с МНЧ, улавливаются магнитом [4].

В сфере диагностики НЧ нашли применение в качестве контрастных веществ для визуализации частей тела человека. Один из наиболее мощных неинвазивных методов визуализации – МРТ. Так как здесь не используются рентгеновские лучи, это делает метод безопасным. Обследуемая часть тела пациента помещается в однородное импульсное магнитное поле большой интенсивности. Молекулы в организме взаимодействуют с полем, вращаясь по силовым линиям, затем оператор делает радиоволновое сканирование. Изменение состояния молекул передается на электронное устройство, в котором проводится обработка полученных данных и создается карта обследуемой части. В отличие от компьютерной томографии, метод МРТ может получать изображения в разных плоскостях [4].

Способность МНЧ повышать скорость протонной релаксации для конкретных тканей служит причиной того, что контрастные агенты на основе МНЧ являются одним из наиболее перспективных применений наномедицины. Благодаря своим уникальным физическим свойствам и способности функционировать на клеточном и молекулярном уровне взаимодействия в биологических объектах, МНЧ в настоящее время активно исследуются в качестве следующего поколения агентов МРТ-контраста. В последние годы наблюдается рост интереса к использованию МНЧ в качестве контрастного вещества, такого, например, как декстран магнетита или МНЧ в форме суперпарамагнитных НЧ оксида железа. Хотя НЧ оксида железа давно использовались в качестве магнитных контрастных средств, успехи в синтезе и покрытии МНЧ, особенно в последнее десятилетие, привели к созданию менее токсичных препаратов. МНЧ используют в диагностике распределения опухолевых и тканеспецифичных контрастных агентов в тканях, а также для контроля тока крови, движения клеток и биомолекулярных исследований.

Существуют примеры синтеза МНЧ, резонансно отвечающих на внешнее переменное магнитное поле заданной частоты и амплитуды, при этом эффективно поглощающих внешнюю электромагнитную энергию и передающих ее в виде тепла окружающим биологическим объектам. Таким образом, приложение магнитного поля может привести к разогреву МНЧ и локальному перегреву близлежащих тканей - локальной магнитной гипертермии. Гипертермия, терапевтический метод в онкологии, является перспективным подходом к ле-

чению рака. В опухолевую ткань вводится жидкость, содержащая НЧ. Данная область помещается во внешнее переменное магнитное поле, что приводит к магнитоиндукционному нагреву МНЧ до температуры, разрушающей опухолевую ткань и усиливающей эффективность химиотерапии. Следует подчеркнуть, что основой данного терапевтического воздействия является не только возможность локального перегрева зоны опухоли, но и пониженная степень выживания раковых клеток при перегреве. Это делает возможным, например, проводить лечение сложных опухолей мозга. Продолжающиеся исследования магнитно-жидкостной гипертермии сосредоточены на получении и использовании МНЧ, самостоятельно регулирующих температуру, которой они достигают при нагреве в переменных магнитных полях [5].

Следовательно, МНЧ - неотъемлемый материал для совершенствования современных медицинских приложений, использующих нанотехнологии. В научной сфере наблюдается довольно интересное явление: огромные усилия прикладываются для синтеза и изучения новых МНЧ, создания новых поверхностно-активных веществ (ПАВ) для адаптации поверхностных свойств МНЧ. В то же время практическое использование МНЧ пока весьма ограничено. Только несколько клиник в Германии используют МНЧ для лечения раковых заболеваний в комплексе с химио- и радиотерапией. Большинство из перспективных приложений требует гарантированных и управляемых взаимодействий между МНЧ и живыми клетками [4]. Мало знать размеры, магнитные свойства НЧ, распределение по размерам, необходимо определить токсичность, безопасность применения их в медицинских приложениях и гарантировать стабильность нанопрепарата в течение определенного промежутка времени. К сожалению, в настоящее время собрано недостаточно информации о безопасности НЧ, особенно это относится к долгосрочным последствиям применения препаратов, содержащих МНЧ. Эта проблема крайне актуальна, особенно в свете увеличения разработок по применению НЧ. Необходима полная аттестация свойств НЧ. Размеры НЧ сопоставимы с рядом важных размеров элементов биосистем, что позволяет им легко взаимодействовать с клетками организма и участвовать во внутриклеточных процессах. Несмотря на актуальность метрологического обеспечения наноматериалов, на сегодняшний день существует лишь несколько российских стандартов, посвященных НЧ. В процессе разработки находятся нормативные документы ГОСТ, СанПиН для МНЧ [6].

При переходе от массивных образцов магнитных материалов к МНЧ наблюдается значительное изменение физических и химических свойств упомянутых объектов. В первую очередь, это происходит из-за увеличения доли поверхностных атомов МНЧ. Если взять сферическую частицу с радиусом 15 нм с толщиной поверхностного слоя 1 нм, объем по-

верхностного слоя составит 19%. При увеличении радиуса частицы до 10 нм объем поверхностного слоя будет равен 27%. Если же взять частицу радиусом 5 нм, объем поверхностного слоя будет составлять уже 48%. Таким образом, варьируя только лишь геометрический размер частиц, можно увеличивать или уменьшать поверхностную энергию, а также химический потенциал.

В 1950-х годах были сформулированы основы теории ультрадисперсных сред. Кондорский Е. И. создал основу теории однодоменных структур и ввел термин «абсолютная однодоменность», что подразумевает перемагничивание однодоменной частицы без зародышеобразования [7]. При уменьшении геометрических размеров частицы по достижении определенного размера поверхностная энергия становится равной или превышает величину магнитостатической энергии частицы – в таком случае существование нескольких доменов становится энергетически невыгодным и на весь объем приходится один домен. При образовании доменных стенок существует конкуренция между магнитостатической энергией частицы W_m и энергией доменных стенок W_d :

$$W_m \sim M^2 \cdot D^3; \quad W_d \sim \sigma \cdot D^2, \quad \sigma \sim \left(\frac{k \cdot T_c \cdot K}{a} \right)^{1/2}, \quad (1.1)$$

где M – спонтанная намагниченность, D – размер частицы, σ – плотность энергии на единицу поверхности, k – постоянная Больцмана, T_c – температура Кюри, K – константа магнитной анизотропии, a – параметр кристаллической решетки. Если значения этих видов энергии будут равны, то выражение для критического размера однодоменности D_{cr} будет иметь вид [1]:

$$D_{cr} \sim \frac{\sigma}{M^2}. \quad (1.2)$$

Расчет с использованием уравнения (1.2) показывает, что для сферических частиц Fe критический размер однодоменности равен $D_{cr} = 14$ нм, для Fe_3O_4 $D_{cr} = 128$ нм, $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ $D_{cr} = 166$ нм [2]. Коэрцитивная сила уменьшается при увеличении числа механизмов поворота спина в направлении, противоположном первоначальному. Если брать многодоменную частицу, то в ней появляется смещение доменных стенок. Вклад этого смещения в механизм поворота тем меньше, чем меньше размер частицы. Именно из-за этого до критического размера D_{cr} коэрцитивная сила H_c возрастает. А ниже этого размера наблюдается снижение значения коэрцитивной силы из-за появления однодоменного состояния и, следовательно, увеличения вклада тепловых флуктуаций.

МНЧ изменяют характер перемагничивания при достижении однодоменного состояния. Перемагничивание становится не зависящим от особенностей доменных стенок и описывается когерентным вращением магнитных моментов атомов. Коэрцитивная сила ферромагнитного вещества обобщенно может быть описана формулой:

$$H_c = \frac{2\alpha K}{M_s} - N_{eff}M_s, \quad (1.3)$$

где M_s – намагниченность насыщения, N_{eff} – размагничивающий фактор, α – параметр микроструктуры материала, равный 1 в случае изолированной частицы. Первая часть описывает вклад от магнитокристаллической анизотропии, вторая часть обусловлена анизотропией формы. В рамках модели Стонера-Вольфарта для наибольшего значения коэрцитивной силы $H_{c\max}$ получено оценочное выражение:

$$H_{c\max} = \frac{2K}{M_s}. \quad (1.4)$$

Однако в этой модели описан идеальный случай для однодоменной сферической частицы, не имеющей дефектов и не имеющей поверхностной анизотропии. Например, для МНЧ железа расчетное значение $H_{c\max} \approx 47,75$ кА/м, тогда как при расчете с членом, отвечающим за вклад анизотропии, величина $H_c \approx 1,1$ МА/м. Таким образом, максимально возможные значения коэрцитивной силы реальных наноматериалов, обусловленные наличием сложных магнитных структур, находятся в пределах $0.2 - 0.4 \cdot H_{c\max}$. Одной из причин является то, что магнитные моменты внутри МНЧ под действием внешнего магнитного поля могут поворачиваться, образуя сложные магнитные структуры [3].

Соотношение поверхностной и магнитостатической энергии, которое определяет границу однодоменности, не является единственным фактором, определяющим процесс перемагничивания. Следует учитывать также и тепловую энергию. При определенном размере МНЧ магнитостатическая энергия уменьшается до значений ниже тепловой энергии системы. Тепловая энергия как бы «разбалтывает» суммарный магнитный момент частицы, состоящий из когерентно колеблющихся магнитных моментов атомов. Это отвечает переходу МНЧ в так называемое суперпарамагнитное (СПМ) состояние, возникающее в очень мелких однодоменных частицах из-за тепловых флуктуаций. Таким МНЧ присуща s – образная форма безгистерезисной кривой намагничивания. Вклад тепловых флуктуаций становятся тем выше, чем меньше размер частиц.

Для рассмотрения простого случая можно взять N изолированных одинаковых частиц с эффективным магнитным моментом $\mu_{\text{эфф}}$. Рассматривая случай монодисперсии частиц равновесная намагниченность системы $\langle M \rangle$ может быть описана функцией Ланжевена:

$$\langle M \rangle = N \cdot \mu_{\text{эфф}} \cdot L\left(\frac{\mu_{\text{эфф}} \cdot H}{k_B \cdot T}\right), \quad L(\alpha) = \coth \alpha - \alpha^{-1}, \quad (1.5)$$

в которой частицы предполагаются изотропными, все направления магнитного момента энергетически эквивалентны. Однако в реальных магнетиках существует вклад анизотропии, происхождение которой может быть различным. В случае МНЧ важная роль отводится поверхностной анизотропии, которая усложняет расчет намагниченности. Простейшим примером анизотропии является одноосная, выражение энергии для которой приводится в следующем выражении:

$$E(\theta) = K \cdot V \cdot \sin^2 \theta, \quad (1.6)$$

где K – константа объемной анизотропии, V – объем частицы, θ – угол между направлением вектора намагниченности частицы и осью анизотропии. В отсутствие внешнего магнитного поля минимум энергии частицы будет соответствовать ориентации вдоль оси анизотропии. Эти минимумы разделены энергетическим барьером высоты KV . Прикладывая внешнее магнитное поле под углом ψ к оси анизотропии, энергию частицы можно записать:

$$E(\theta) = K \cdot V \cdot \sin^2 \theta - H \cdot M_s \cdot V \cdot \cos(\theta - \psi). \quad (1.7)$$

1.2 Методы получения магнитных наночастиц оксида железа

Появление новых высокопроизводительных методов синтеза МНЧ открыло большие возможности для разработки на их основе биотехнологических и медицинских приложений. В последнее время отмечается появление публикаций, касающихся модификации уже известных методов, поиска эффективных способов контроля формы, размера, анизотропии, увеличения стабильности свойств. Следует отметить важное требование - методика синтеза МНЧ не должна быть дорогостоящей, однако должна создавать партии МНЧ с воспроизводимыми свойствами и не быть слишком сложной при практическом использовании.

Физическими методами получения МНЧ называют процесс образования МНЧ в газовой или твердой фазе. Часто имеет место высокоэнергетическое воздействие на исходный

материал или же наличие высоких температур. Химические методы синтеза часто проходят в растворах при средних температурах. Большее развитие на данный момент получили именно химические методы, однако некоторые физические методы кажутся не менее перспективными, особенно если учесть средний размер отдельной партии. Отметим некоторые из наиболее распространенных методов синтеза МНЧ.

Химические методы получения МНЧ

- Термическое разложение

Изначально этот метод использовался для синтеза высококачественных полупроводниковых нанокристаллов и оксидов в безводных средах. На этой основе были разработаны методы синтеза МНЧ с контролем размеров и формы [4]. Монодисперсные МНЧ могут быть синтезированы в органических растворителях с высокой температурой кипения, содержащих ПАВ (жирные, олеиновые кислоты). Соотношение исходных реагентов, включая металлоорганические соединения, ПАВ, растворитель, являются решающим параметром для контроля размеров и морфологии МНЧ. В то же время температура, время реакции и старения могут повлиять на процесс образования МНЧ.

Одноступенчатая реакция представляет собой термическое разложение металла с нулевой степенью окисления в прекурсор при последующем образовании частиц металла. Стабилизированные нанодисперсные МНЧ Fe размером около 10 нм получают при использовании в качестве металлосодержащего соединения $[\text{Fe}(\text{O}^t\text{Bu})_3]_2$ в жидкой среде при добавлении определенных ПАВ или полимерных соединений [5].

Для получения НЧ оксидов необходимо использовать двухступенчатый процесс, включающий окисление. Например, пентакарбонил железа можно разложить в смеси октилового эфира и олеиновой кислоты при 100 °С с добавлением оксида триметиламина в качестве мягкого окислителя при повышенной температуре, что приводит к образованию монодисперсных нанокристаллов $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ со средним размером 13 нм. Разложение прекурсоров с катионными металлическими центрами приводит к образованию Fe_3O_4 [6].

- Ультразвуковое разложение

Метод осуществляется за счет действия акустических волн высокой интенсивности на материал. На результат влияют такие факторы, как частота и мощность ультразвукового диспергатора, длительность обработки, первоначальное состояние материала и дисперсионной среды. Введение ПАВ помогает стабилизировать МНЧ в жидкой среде. С помощью этого метода получают суспензии с высокодиспергированными стабилизированными МНЧ. Для получения железосодержащих частиц часто используют пентакарбоксил. При ультразвуковой обработке $\text{Fe}(\text{CO})_5$ в среде поливинилпирролидона образуются аморфные МНЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Размер варьировался концентрацией и типом различных ПАВ, добавленных

в раствор [7].

- Восстановление металлосодержащих соединений

Метод предполагает использование сильных восстановителей – комплексных гидридов, щелочных металлов в эфирах или углеводородах, комплексных соединений щелочных металлов с органическими веществами. Используя водный раствор борогидрида натрия при комнатной температуре, можно получить аморфные порошки гомо- и гетерометаллических МНЧ Fe, Co, Ni, Fe-Co и другие. В качестве восстановителей могут выступать также и высококипящие спирты. Например, реакция восстановления ацетата кобальта в олеиновой кислоте с додекан-1,2-диолом и триоктифосфином при температуре 250 °С приводит к образованию кобальтсодержащих МНЧ со средним размером 5 нм [8].

- Микроэмульсия

Метод обратных мицелл, или микроэмульсии, является дисперсией двух несмешивающихся жидкостей, где микрокапли стабилизируются на границе раздела пленкой молекул ПАВ. Обратные мицеллы – маленькие капли воды в гидрофобной фазе, образующие на своей поверхности монослой ПАВ. Например, МНЧ MnFe_2O_4 с контролируемым размером 5-15 нм были получены путем образования в системе толуол – вода обратных мицелл с NaDBS в качестве стабилизатора. Соотношение вода/толуол определяет размер НЧ [9]. Из-за строгого дозирования металлосодержащих соединений в мицелле реально синтезировать НЧ с узким разбросом по размерам. МНЧ Co со средним размером 6 нм были получены смешиванием двух коллоидных растворов – CoCl_2 и тетрагидроборат натрия одинаковой концентрации. Коллоидный раствор МНЧ в гексане был устойчив в течение недели [10].

- Золь-гель метод

Наиболее интересен для получения НЧ оксидов металлов, но также может быть применим для синтеза НЧ металлов и сплавов. Например, синтезированные в силикагеле ионы Ni^{+2} и Fe^{+2} в определенном соотношении были восстановлены водородом, в результате чего внутри матрицы SiO_2 образовывались НЧ Ni_3Fe с размерами 4 - 19 нм [11].

- Технология Ленгмюра - Блоджетт

Молекулярные слои Ленгмюра-Блоджетт представляют собой нерастворимые мономолекулярные слои амфифильных молекул (жирные кислоты, их соли) на границе раздела газ-жидкость, а также пленки на твердой подложке. Гидрофобный эффект в данном случае появляется благодаря взаимному притяжению молекул воды. Процесс разложения прекурсора в монослой на границе раздела фаз часто происходит с помощью физического воздействия. Например, пентакарбонил железа в ленгмюровском монослое во время контакта с воздухом образовывал наноструктуры оксида железа $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Прикладываемое внешнее магнитное поле значительно влияло на морфологию НЧ [12].

Физические методы получения НЧ

- Термическое испарение

Определенная масса металла или сплава нагревается в вольфрамовой подложке при циклическом продуве аргоном или гелием. Атомы испаряемого металла, сталкиваясь с атомами газа, теряют кинетическую энергию. Таким образом, атомы образуют агрегаты НЧ и конденсируются в виде нанопорошка на охлаждаемую подложку. Метод позволяет варьировать желаемые размеры частиц в пределах до 100 нм, меняя такие параметры установки, как скорость испарения, тип и давление рабочего газа, температуру подложки [13].

- Испарение в плазме

Исходные вещества заносят в плазмотрон, где они перемешиваются с плазмой, нагреваясь до 2000 К. В процессе взаимодействия компонентов исходных веществ происходит образование НЧ порошка из газовой фазы. Последний процесс происходит при осаждении частиц на стенках рабочей камеры или за счет появления самопроизвольно возникающих зародышей. Чтобы не допустить укрупнения НЧ, применяют резкое охлаждение реакционной смеси, что приводит к увеличению количества зародышей и замедлению их роста.

Итак, достоинствами метода можно назвать скорость реакции, высокую производительность, чистоту получаемых НЧ, возможность синтеза твердых растворов и легирование малыми количествами примесей. Однако метод обладает высокой коррозионной активностью и высокой адсорбционной способностью НЧ. Стоит также отметить необходимость использования дорогого оборудования [14].

- Капельно-жидкий метод испарения

В качестве сырья используются чистые жидкости или водные растворы. Жидкость впрыскивают в плазму, при этом в результате распыления получаются довольно крупные капли со средним размером 1-50 мкм. Образование НЧ может происходить двумя способами. Либо в газовой фазе протекают гомогенные химические реакции при полном испарении капель жидкой фазы и при дальнейшем охлаждении реакционных газов происходит образование НЧ. Либо НЧ образуются в результате возникновения центров кристаллизации и их последующего роста внутри жидкой капли распыляемого вещества, что часто приводит к образованию крупных частиц.

Термолиз водных растворов солей или суспензий является гибким и универсальным способом получения наноксидов. Основные его достоинства – влияние на физико-химические свойства синтезируемого материала, возможность получения оксидных соединений сложного состава, высокая химическая активность продукта. В качестве исходных соединений используются карбонаты, сульфаты, нитраты, гидроксиды металлов. Присутствие в смеси соединений нескольких металлов в строгих соотношениях делает

возможным получение сложного оксида. Структурные свойства НЧ оксидов зависят от химической предыстории и концентрации сырья, процессов тепло- и массообмена с плазмой. Здесь сохраняется достоинство вышеизложенного метода – высокая производительность, однако этот метод является более доступным как в плане оборудования, так и в плане исходных компонентов, также меньшей токсичностью и возможностью получения оксидов сложного состава с высоким параметром однородности [15].

- Гидролиз в пламени

Летучие соединения – карбонилы, хлориды металлов – распыляют в кислород-водородное пламя. За счет высокотемпературного процесса гидролиза формируются очень мелкие капли оксида. Затем в результате резкого охлаждения образуются твердые НЧ [16].

- Криогенный метод

В случае криогенного метода осаждение атомов металлов и металлических соединений происходит при низких температурах в жидком инертном газе. Синтезированные НЧ получаются очень чистые химически, однородные по строению и составу.

Быстрое нагревание металлов радиочастотным импульсами приводит к испарению металла, причем создается высокое давление паров металла. Реактор соединен с камерой, в которой находится жидкий азот или аргон. В процессе конденсации осуществляется образование зародышей, рост и слияние НЧ из-за большой разницы температур от 2200 К на поверхности металла до 77 К в криогенной среде. Быстрая скорость охлаждения паров металла приводит к высокой скорости зародышеобразования и формированию частиц маленьких размеров. Таким методом были получены нанопорошки многих металлов с размером частиц порядка десятков нм: Cu – 25 нм, Al – 70 нм [16].

- Метод молекулярных пучков

Этим методом впервые были получены индивидуальные МНЧ. Сырье помещают в камеру с диафрагмой и нагревают до испарения вещества. Испарившиеся частицы, пролетая через диафрагму, образуют молекулярный пучок, который может быть направлен на подложку, где и будет происходить конденсация пара с образованием тонкого покрытия толщиной примерно 10 нм [16].

- Метод осаждения частиц с низкой кинетической энергией

Лазерное испарение и источник инертного газа используются для создания сверхзвукового пучка наноразмерных кластеров вещества, которые могут быть осаждены на различные матрицы. В этом режиме частицы не фрагментируются при ударе о подложку. Сами подложки формируются одновременно путем испарения из электронной пушки. Размеры и состав испаренных НЧ находятся под контролем до момента осаждения на подложку. Для этого на пути их движения от источника до подложки используют масс-анализаторы [17].

- Нанодиспергирование компактного материала

Метод диспергирования в мельницах используется для получения дисперсных систем. Однако из-за наличия предела механического измельчения твердых тел, нельзя достигнуть узкого распределения по размерам.

Метод электроэрозии осуществляется в диэлектрической жидкости, которая покрывает образующиеся НЧ. Разные условия, природа металла и среды диспергирования могут давать разброс размеров в диапазоне 3-20 нм, однако отдельные частицы могут достигать размеров 100 нм. Недостатком метода является значительное взаимодействие образующихся НЧ со средой диспергирования [18].

Метод электрохимического получения НЧ распространен для синтеза малых по размерам НЧ с узким распределением по размерам. В электрохимической ячейке при пропускании тока происходит растворение анода и образование НЧ в приэлектродном слое катода [19]. Средний размер НЧ находится в обратной зависимости от плотности тока. Получившаяся суспензия НЧ устойчива в течение нескольких месяцев при условии хранения в атмосфере аргона. Электрохимическим методом были синтезированы МНЧ γ -Fe₂O₃ размером 3 - 8 нм. НЧ обладают устойчивостью в органических растворителях из-за процесса адсорбции катионных ПАВ [20].

- Лазерное испарение

В то время как в методе лазерного осаждения материал испаряется с помощью лазерного луча, а затем осаждается на соответствующую подложку, в случае лазерного испарения пары материала охлаждаются в газовой фазе, что приводит к конденсации НЧ, тем самым образуя аэрозоль. Для образования однородных сферических частиц испарение проводят в импульсном режиме в циркулирующем потоке газа, который охлаждает пар и предотвращает частицы от агломерации [21–23].

Схематическое изображение экспериментального комплекса представлено на рисунке 1.1. Для обеспечения однородного расходования материала мишень вращалась со скоростью 20 см/с. Работа лазера проводилась в импульсном режиме, что благоприятно воздействует на материал и дает возможность получения НЧ с узким распределением по размерам. Рабочий газ подавали в испарительную камеру с помощью вентилятора. Расход газа при нормальном давлении составил 70 л/мин, линейная скорость потока на поверхности мишени была равна 15 м/с. В соответствии с рисунком 1.1 образующиеся НЧ оксида железа направлялись в циклон в потоке рабочего газа, где происходило осаждение крупных осколков мишени, затем в электрический фильтр тонкой очистки для удаления агломератов, который улавливал подавляющее число НЧ. Аэрозоль из конденсированных НЧ улавливался в циклоне и матерчатом фильтре установки [24].

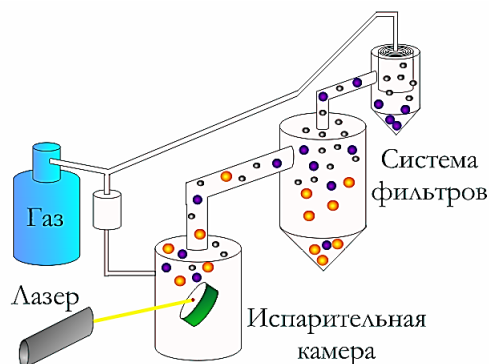


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение установки для получения наночастиц методом лазерного испарения

Также можно получить НЧ смешанного состава. Образование нового соединения происходит за счет взаимодействия «горячих» атомов металла с молекулами газа, сопровождающегося потерей энергии образовавшихся молекул при столкновении с молекулами инертного газа. Изменяя состав смеси инертного газа-носителя и газа-реагента в камере и варьируя температурный градиент и мощность лазерного импульса, можно контролировать элементный состав и размеры получаемых НЧ.

- Электровзрыв проволоки

Металлическая проволока благодаря механизму подачи протягивается через центр цилиндрического реактора через калиброванное отверстие в металлической контактной пластине верхней части реактора. Нижняя и верхняя пластины соединены с обкладками конденсатора, на которые подается высокое напряжение. Когда конец проволоки достигает нижней пластины, конденсатор разряжается и электрический ток испаряет проволоку. После конденсатор перезаряжается, устройство подачи протягивает проволоку и синтез продолжается. Значение силы тока составляет десятки - сотни кА. Взрыв проволоки приводит к переводу металла в газовое состояние. Последующее резкое охлаждение (спонтанное, температура предельно высока только в центре реактора) приводит к конденсации нанопорошка металла. Если электровзрыв проводят в слабоокислительной атмосфере, то получают нанопорошки оксидов, обладающие исключительной активностью и адгезионной способностью [25]. Состав полученных нанопорошков зависит только от химической чистоты проволоки и газовой атмосферы. Например, при синтезе МНЧ оксида железа размером 53 нм была использована проволока из железа с содержанием углерода 0,09%, диаметр 0,47 мм. Приложенное напряжение было равно 30 кВ. В процессе испарения выделилось большое количество энергии, проволока нагревалась до 10^4 К. После этого раскаленные пары железа распространялись с начальной скоростью 2 км/с, вызывая вспышку и ударную волну. Далее пары железа замедлялись и охлаждались в реакционной камере в форме МНЧ. Реакционная

камера наполнялась циркулирующей окислительной смесью 80% азота, 20% кислорода со скоростью потока 300 л/мин, обеспечивая образование оксида железа [26].

Исключительное преимущество данного метода – полное отсутствие воды на всех стадиях получения нанooksида. Поэтому материалы, получаемые данным, пусть и относительно дорогим методом, полностью лишены «водяной памяти», в результате чего снимается ряд нежелательных функциональных эффектов при их последующем применении.

Для получения магнитных наноматериалов с четко заданными параметрами нужно принимать во внимание факторы, наиболее значимо вносящие вклад в магнитные свойства, и уметь сочетать их для получения необходимого объекта. К таким факторам можно отнести тип кристаллической решетки, степень ее дефектности, химический состав, геометрические параметры МНЧ, морфологию поверхности, а также взаимодействие между МНЧ и средой, в которой они находятся.

1.3 Магнитно-жидкостная гипертермия. Теория

Очевидны перспективы использования МНЧ *in vivo* для диагностики и терапии. Известно, что биологические ткани проницаемы для магнитных полей. Тогда открывается возможность неинвазивного воздействия на соединения на основе МНЧ, накопленных в определенной области тела, а также их управления внешним электромагнитным полем. Наноразмерные суспензии на основе МНЧ могут быть введены внутривенно.

Развитие новых подходов к терапии онкологических заболеваний является одной из наиболее актуальных областей разработки биомедицинских приложений НЧ, наряду с разработкой контрастных агентов для МРТ. В 1957 году Гилкристом показал, что определенные виды раковых клеток чувствительны к температурам выше 42 °C при нормальной реакции здоровых клеток. В связи с этим фактом был разработан метод увеличения эффективности терапии опухолей — локальная гипертермия [27]. Свойство индуктивного нагревания МНЧ позволило развить идею их использования для разрушения патогенных клеток. Гипертермия уже имеет приложение совместно с химио- или радиотерапией для повышения их эффективности [28].

Для успешного использования МНЧ должны иметь высокое значение параметра SAR – удельной скорости поглощения, которая обуславливает их довольно быстрый нагрев во внешнем переменном магнитном поле. Исследование скорости поглощения электромагнитной энергии является важной задачей для аттестации суспензий на основе МНЧ – наиболее перспективных агентов для гипертермии.

Первый закон термодинамики говорит о неизменности внутренней энергии системы.

Это значит, что при протекании разных физических процессов энергия переходит из одного вида в другой. Для внутренней энергии системы U можно записать I закон термодинамики как $dU = \delta Q + \delta W$, где δQ - внесенная тепловая энергия, в случае адиабатического процесса равная нулю, W – электромагнитная работа, совершенная в системе, $\delta W = \vec{H} \cdot d\vec{B}$. Получается, для адиабатического случая внутренняя энергия системы будет равна $dU = \vec{H} \cdot d\vec{B}$, где $\vec{H}$ (А/м) – напряженность магнитного поля, $\vec{B}$ - электромагнитная индукция. Поскольку поля коллинеарны, соотношение сводится к выражению:

$$dU = H \cdot dB, \quad (1.8)$$

где H, B являются величинами. $B = \mu_0(H + M)$, где M (А/м) – намагниченность, $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$ (Тл·м/А) – магнитная проницаемость вакуума. В процессе гипертермии используются переменные магнитные поля. Введем выражение для изменения напряженности переменного магнитного поля по гармоническому закону $H = H_0 \cos \omega t$. Подстановка в уравнение (1.8), а затем интегрирование по частям дает циклическое увеличение внутренней энергии, выражение можно записать в виде:

$$\Delta U = -\mu_0 \oint M dH. \quad (1.9)$$

Когда намагниченность начинает отставать от магнитного поля, интегрирование дает положительный результат, указывающий на преобразование электромагнитной работы во внутреннюю энергию. Для обсуждения используем комплексную магнитную восприимчивость $\chi = \chi' - i\chi''$. Тогда с приложенным магнитным полем следующего типа результирующая намагниченность будет иметь вид:

$$\begin{aligned} H(t) &= H_0 \cos \omega t = \text{Re}[H_0 e^{i\omega t}], \\ M(t) &= \text{Re}[\chi H_0 e^{i\omega t}] = H_0(\chi' \cos \omega t + \chi'' \sin \omega t). \end{aligned} \quad (1.10)$$

Подставляя выражения для H и M из (1.10) в уравнение (1.9), получаем выражение для внутренней энергии системы в магнитном поле:

$$\Delta U = 2\mu_0 H_0 \chi'' \int_0^{2\pi/\omega} \sin^2 \omega t \, dt, \quad (1.11)$$

в котором остается только компонента потерь χ'' . Проинтегрировав и умножив результат

на циклическую частоту $\omega = 2\pi f$, можно получить следующее выражение для объемной мощности потерь:

$$P = f \cdot \Delta U = 2\mu_0\pi\chi'' f H_0^2. \quad (1.12)$$

Для использования уравнения (1.12) необходимо соотнести величину χ'' с параметрами исследуемого магнитного материала. Уравнение релаксации для неподвижной жидкости в колебательном поле сводится к следующей форме:

$$\frac{\partial M(t)}{\partial t} = \frac{1}{\tau} (M_0(t) - M(t)), \quad (1.13)$$

где τ – время релаксации, $M_0 = \chi_0 H_0 \cos \omega t = \text{Re}[\chi H_0 e^{i\omega t}]$ – равновесная намагниченность в приложенном магнитном поле, χ_0 – равновесная магнитная восприимчивость. Подставляя в уравнение (13) комплексные представления величин M_0 и $M(t)$, получаем выражение для магнитной восприимчивости, которая дает зависимость комплексной восприимчивости от частоты [29]:

$$\chi = \frac{\chi_0}{1+i\omega\tau}, \quad \chi' = \frac{\chi_0}{1+(\omega\tau)^2}, \quad \chi'' = \frac{\omega\tau}{1+(\omega\tau)^2} \chi_0, \quad (1.14)$$

Для достижения состояния с минимальной энергией магнитный момент разворачивается во внешнем магнитном поле с преодолением энергетического барьера E_B . Неелем было получено выражение для времени релаксации тепловых флуктуаций магнитного момента однодоменной частицы, обладающей одноосной анизотропией, при выполнении условия $E_B/k_B T \gg 1$ [29]:

$$\tau = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{E_B}{k_B T}\right). \quad (1.15)$$

Множитель τ_0 имеет зависимость многих показателей, таких как гиромагнитное отношение, величина намагниченности насыщения и констант анизотропии, температура и др. Однако для простоты τ_0 часто считают константой, имеющей значение в интервале $10^{-9} \div 10^{-13}$ с [2]. Выражение (1.15) позволяет определить время установления теплового баланса в системе невзаимодействующих однодоменных МНЧ. В случае $(E_B/k_B T \ll 1)$ время релаксации в состояние с минимальной энергией имеет очень малое значение при сравнении с

временем проведения измерения $\tau_{изм}$ и в такой системе отсутствует магнитный гистерезис. Обратный случай ($E_B/k_B T \gg 1$) говорит о переходе системы в равновесное состояние в течение длительного времени. Например, если для частицы диаметром 11 нм принять $\tau_0 = 10^{-9}$ с, $K = 10^5$ Дж/м³ и $T = 300$ К, можно получить значение $\tau = 10^{-1}$ с, если взять частицу диаметром 15 нм, величина будет значительно больше: $\tau = 10^8$ с [2].

При условии $\tau_{изм} \gg \tau$ система будет находиться в СПМ состоянии и быстро достигнет равновесной намагниченности при изменении во время измерения температуры или внешнего магнитного поля. В обратном случае система не успевает перейти в новое равновесное состояние за время $\tau_{изм} \ll \tau$, таким образом, ее намагниченность не меняется. Если в качестве $\tau_{изм}$ взять примерное время для статических магнитных измерений $t = 100$ с, то выражение (1.15), в котором задействована величина $\tau_0 = 10^{-9}$ с, и условие $\tau_{изм} = \tau$ приведут к соотношению $KV = 25k_B T$. Температуру «блокировки» T_B системы обычно вычисляют по формуле [29]:

$$T_B = \frac{K \cdot V}{25 \cdot k_B}. \quad (1.16)$$

Следует заметить, что соотношение (1.16) определяет T_B в отсутствие внешнего магнитного поля. При его наличии T_B , как правило, уменьшается. Зависимость T_B от напряженности магнитного поля H имеет степенной закон, исходя из данных работы [29]:

$$T_B = T_B(0) \cdot \left(1 - \frac{H}{H_C}\right)^k, \quad H_C = \frac{2K}{M_s}, \quad (1.17)$$

где $k = 2$ для малых полей.

В переменном магнитном поле существует два возможных механизма релаксации МНЧ – Броуна и Нееля. Релаксация Нееля имеет квантовый механизм релаксации и больше подходит для мелких частиц. Механизм релаксации Нееля заключается в переориентации магнитного момента на противоположное значение при неподвижной частице, в то время как релаксация Броуна характеризует вязкое механическое вращение целых частиц в магнитном поле (см. рисунок 1.2).

Времена релаксации Броуна τ_B и Нееля τ_N задаются следующими отношениями [29]:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT}, \quad \tau_N = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \tau_0 \frac{\exp \Gamma}{\Gamma^{1/2}}, \quad (1.18)$$

где η – коэффициент вязкости матрицы феррожидкости, $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К – константа Больцмана, V_H – гидродинамический объем НЧ, является большим, чем магнитный объем НЧ для радиуса R : $V_M = \frac{4\pi R^3}{3}$. В модели для гидродинамического объема МНЧ $V_H = \left(1 + \frac{\delta}{R}\right)^3 V_M$ предполагается наличие адсорбированного слоя поверхностно-активных веществ δ . В выражение для времени релаксации Нееля по Брауну входит функция $\Gamma = \frac{KV_M}{kT}$, в которой задается константа магнитокристаллической анизотропии K , либо анизотропии формы.

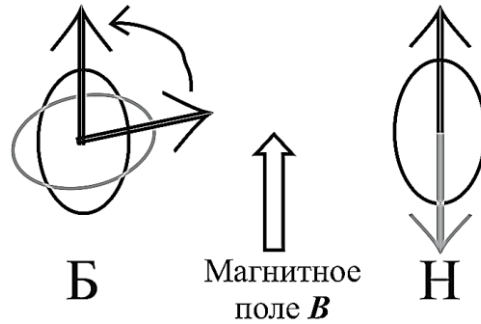


Рисунок 1.2 – Схематическое изображение релаксационных процессов Броуна и Нееля при включенном внешнем магнитном поле индукции $\vec{B}$

Так как процессы релаксации Броуна и Нееля происходят одновременно, принято вводить эффективное время релаксации [29]:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N}, \quad \tau = \frac{\tau_B \cdot \tau_N}{\tau_B + \tau_N}, \quad (1.19)$$

Меньшее время релаксации τ_B или τ_N доминирует в определении эффективного времени релаксации τ для любого заданного размера НЧ. Например, в работе [29] показана зависимость эффективного времени релаксации τ от радиуса МНЧ. До $R = 7,5$ нм доминирует процесс релаксации Нееля τ_N , далее при превышении радиуса МНЧ $R = 7,5$ нм при определении эффективного времени релаксации доминирует уже процесс Броуна τ_B . Исходя из уравнений (1.12) и (1.14), можно выразить плотность мощности потерь в случае монодисперсии НЧ:

$$P = \mu_0 \pi \chi_0 H_0^2 f \frac{2\pi f \tau}{1 + (2\pi f \tau)^2}, \quad (1.20)$$

Данное отношение является строгим для постоянного значения магнитной восприимчивости χ_0 . На самом деле, магнитная восприимчивость χ_0 зависит от внешнего магнитного поля. В качестве оценки нижней границы параметра P используют предположение, что χ_0 есть хорда, соответствующая уравнению Ланжевена:

$$L(\alpha) = \frac{M}{M_s} = \coth \alpha - \frac{1}{\alpha}, \quad (1.21)$$

где $\alpha = \frac{\mu_0 M_d H V_M}{kT}$, $M_s = \varphi M_d$ – намагниченность насыщения, M_d – намагниченность домена в суспендированных частицах, φ – объемная доля твердой фракции. Таким образом, выражение для магнитной восприимчивости будет иметь вид:

$$\chi_0 = \chi_i \frac{3}{\alpha} \left(\coth \alpha - \frac{1}{\alpha} \right), \quad (1.22)$$

где $\chi_i = \left(\frac{\partial M}{\partial H} \right)_i = \frac{\mu_0 \varphi M_d^2 V_m}{3kT}$. Возрастание температуры для монодисперсий рассчитывается как $\Delta T = \frac{P \Delta t}{c}$, где c – удельная теплоемкость феррожидкости, рассчитывается как среднее значение объемов твердых и жидких компонентов, Δt – длительность нагрева.

МНЧ в суспензии обычно имеют широкое распределение со средним размером около 10 нм. Установлено, что логнормальное распределение $g(R)$ по размерам МНЧ обеспечивает достаточно хорошее соответствие с экспериментальными измерениями распределения магнитных жидкостей [24]. Распределение $g(R)$ получается подстановкой $\ln(R)$ вместо R в гауссовом распределении функции:

$$g(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} \exp \left[-\frac{(\ln \frac{R}{R_0})^2}{2\sigma^2} \right], \quad \int_0^\infty g(R) dR = 1, \quad (1.23)$$

где $\ln R_0$ – медиана, σ – стандартное отклонение $\ln R$. С учетом функции распределения частиц уравнение (1.20.) для мощности тепловыделения преобразуется к виду:

$$\bar{P} = \int_0^\infty P g(R) dR. \quad (1.24)$$

Соответствующее возрастание температуры в случае адиабатического процесса $\Delta \bar{T} = \frac{\bar{P} \Delta t}{c}$.

Магнитоиндукционный нагрев различных магнитных жидкостей был исследован

многими научными группами, ведущими разработки в области магнитно-жидкостной гипертермии. Например, в работе [30] при исследовании МНЧ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ и покрытых липосомами использовали величины переменного магнитного поля $H = 31,83$, а также $47,75$ и $63,7$ кА/м при постоянной частоте $f = 310$ кГц на коммерческой установке Ambrell Easyheat Li3542, имеющей мощность $4,2$ кВт. Значения SAR увеличивались при повышении величины магнитного поля, слабо изменяясь при переходе от $H = 47,75$ до $H = 63,7$ кА/м – со 150 до 160 Вт/г. Для мультитядерных МНЧ на основе маггемита и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ были получены значения SAR примерно 500 Вт/г для $H = 10$ кА/м и $f = 520$ кГц, около 1450 Вт/г для $H = 30$ кА/м и $f = 520$ кГц [31]. Водорастворимые нанокубы оксида железа со средним размером ребра 9 нм показывали значения SAR $2,3$ кВт/г (железа) для $H = 24$ кА/м и $f = 700$ кГц, а также 1 кВт/г (железа) для $H = 22$ кА/м и $f = 325$ кГц [32]. При изучении магнитоиндукционного нагрева частиц $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{MnFe}_2\text{O}_4$ средний размер которых 15 нм, при параметрах переменного магнитного поля $H = 37,3$ кА/м и частоты $f = 500$ кГц было получено значение SLP (удельная потеря мощности) $= 3,9$ кВт/г [33]. МНЧ $\text{Co}_{1,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Ba}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$ при постоянной частоте $f = 5,9$ МГц имели SAR, равное 35 Вт/г при $H = 8$ кА/м, 23 Вт/г при $H = 6,4$ кА/м, 12 Вт/г при $H = 4,8$ кА/м, $2,5$ Вт/г при $H = 1,7$ кА/м [34].

2 Постановка задачи работы

В последнее время в совместных исследованиях, проводимых в Институте естественных наук УрФУ и Институте электрофизики УрО РАН, для получения МНЧ были использованы высокопроизводительные техники лазерного испарения и электровзрыва проволоки. В литературе имеется лишь ограниченное число работ, посвященных исследованию таких МНЧ. В этой связи цель квалификационной работы состояла в комплексном исследовании свойств МНЧ оксида железа различной стехиометрии, синтезированных с помощью высокопродуктивного электрофизического метода лазерного испарения, и стабилизированных водных суспензий на их основе.

Были поставлены следующие задачи:

- Провести анализ влияния различных технологических условий на структурные и магнитные свойства полученных МНЧ.
- Получить электростатически и стерически стабилизированные водные феррожидкости (ФЖ) на основе полученных МНЧ.
- Исследовать структурные и магнитные свойства полученных ФЖ.
- Провести сравнительный анализ свойств МНЧ и ФЖ на их основе.
- Изучить токсичность полученных ФЖ на основе МНЧ, используя клетки крови и

жировой ткани человека.

- Оценить перспективы и возможность применения исследуемых МНЧ в биомедицинских приложениях, в частности, в гипертермии.

3 Методика проведения наблюдений и измерений

3.1 Получение объектов

3.1.1 Метод лазерного испарения

МНЧ оксида железа были синтезированы в Институте электрофизики УрО РАН. Рабочие параметры, использованные при синтезе различных партий, представлены в таблице 3.1. Далее по тексту номера партий будут заменены на обозначения О1 - О7.

Таблица 3.1 – Параметры синтеза полученных порошков оксида железа

№	Партия	Газ	Давление, мм. рт. ст.	Длитель- ность им- пульса, мкс	Мощность, Вт	Частота им- пульсов, кГц
О1	2474	воздух	540	100	200	2
О2	2473	воздух	700	100	200	2
О3	2480	Ar	730	200	430	2
О4	2479	Ar	730	100	210	2
О5	2476	Ar	730	50	95	2
О6	2477	Ar	540	50	95	2
О7	2496	Ar	760	60	260	5

Для синтеза был использован иттербиевый волоконный лазер с длиной волны $\lambda = 1,07$ мкм. Мишени для лазерного испарения были приготовлены прессованием порошка в чашку из нержавеющей стали. В данном случае она состояла из спрессованного грубодисперсного порошка оксида железа Fe_3O_4 фирмы Alfa Aesar с удельной поверхностью 0,5-1 м²/г, средним размером частиц $D \sim 10$ мкм. Мишень была сформирована в диск диаметром 65 мм и высотой 19 мм. Перед испарением мишень подвергалась отжигу при 1000 °С в течение 1 часа на воздухе. Лазерное излучение фокусировалось на поверхность мишени при помощи оптической системы Optoscand - линзы с фокусным расстоянием 200 мм, диаметром фокус-

ного пятна 0,45 мм. Установка оснащена системой фильтров для сепарации крупных агрегатов и осколков мишени, а также имеет возможность пропускать через рабочую камеру циркулирующий поток газа. Средний размер НЧ оксидов металлов составляет 20 нм.

3.1.2 Получение стабилизированных феррожидкостей

В биомедицинских приложениях невозможно использовать ансамбли сухих частиц, требуется первоначально получить водные суспензии на основе МНЧ с выполнением ряда требований: возможность формирования устойчивой коллоидной системы в водных растворах и других средах, обладающих биосовместимостью; возможность контролируемого изменения определенных показателей раствора, таких как концентрация компонентов, уровень pH и температура раствора. Однако из-за высокой адсорбционной активности НЧ для них очень сложно подобрать инертную среду. Одной из проблем, связанных с поведением НЧ в растворе, является их склонность к агрегированию, поэтому приготовление коллоидных взвесей НЧ напрямую связано с их стабилизацией. Она может идти по разным механизмам: можно нанести покрытие на поверхность магнитного «ядра», добавить определенные стабилизаторы, подобрать удобные для каждого случая растворители и др. Покрытия можно разделить на органические, к которым относят полимеры и ПАВ, и неорганические, включающие в себя благородные металлы и углерод. Самыми распространенными органическими покрытиями МНЧ являются декстран, полиэтиленгликоль и другие [35].

Для приготовления электростатически стабилизированных водных феррожидкостей (ФЖ_1) на основе МНЧ оксида железа по методике [24] были использованы реактивы:

- нанопорошок оксида железа определенной партии, средний размер варьировался в интервале 10 – 30 нм, форма частиц близка к сферической, с поверхностью, обладающей низкой шероховатостью;

- раствор цитрата натрия (натриевая соль лимонной кислоты, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$), молярная масса $M = 357$ г/моль, плотность $1,7$ г/см³, концентрация $0,005$ моль/л.

Образцы водных феррожидкостей (ФЖ) были приготовлены диспергированием в ультразвуковой ванне мощностью 240 Вт в течение 16 часов или в ультразвуковом погружном диспергаторе Cole–Parmer CPX-750 мощностью 300 Вт, как правило, в течение 30 мин с непрерывным охлаждением стакана с полыми стенками проточной водой. Диспергирование проводилось до тех пор, пока не было достигнуто постоянное значение гидродинамического диаметра частиц. После диспергирования остаточные агрегаты МНЧ отделяли на центрифуге Hermle Z383 в течение 5 минут на скорости 10 000 об/мин. В результате получали устойчивый однородный темно-коричневый раствор с «рыжим» оттенком.

Для приготовления стерически стабилизированных феррожидкостей (ФЖ_2) были использованы следующие реактивы:

– золь МНЧ оксида железа партии 2496, средний гидродинамический НЧ $D = 56$ нм, C (оксида железа) = $5,0$ г/л, диспергирование проводилось в растворе цитрата натрия, C (цитрата натрия) = $0,01$ моль/л;

– буферный раствор, $pH = 6,86$ ($T = 25^\circ C$), состав: $C (KH_2PO_4) = 0,025$ моль/кг, $C (Na_2HPO_4) = 0,025$ моль/кг;

– раствор хитозана SK-1000, параметры $MM = 440\,000$ г/моль (440 кДа), $cD = 70,4\%$, $C (хз) = 20$ г/л, растворяли в кислоте $0,2$ моль/дм³ HCl.

Смешение компонентов происходило по следующей схеме: медленно, каплями по стенке, затем вмешивая в объем, ввели в золь $V_{\text{золь}} = 0,9$ мл раствор хитозана $V_{\text{хз}} = 0,3$ мл в соотношении 3:1, постоянно помешивая. Сначала образовывались видимые агрегаты, однако после интенсивного механического разбалтывания получался однородный темно-коричневый немутный раствор $V_{\text{золь} + \text{хз}} = 1,2$ мл. После в раствор $V_{\text{золь} + \text{хз}} = 1,2$ мл медленно, вмешивая в объем, вводили буферный раствор $V_{\text{буфер}} = 0,6$ мл в соотношении 2:1. В результате получали однородный немутный раствор, образования осадка не наблюдалось в течение первых 3-х часов после приготовления, далее, в течение 3-4 дней, происходило незначительное осаждение крупных агрегатов. В виду того, что коллоидные системы крайне чувствительны к внесению новых компонентов, скорости смешения и условий окружающей среды, приходилось делать несколько повторов для получения стерически стабилизированной водной феррожидкости типа ФЖ_2.

3.2 Методы исследования

3.2.1 Просвечивающая электронная микроскопия

Просвечивающий электронный микроскоп (ТЕМ) состоит из электронной пушки и серии электромагнитных линз, которые размещены в колонне микроскопа и нужны для формирования первичного пучка, окончательной фокусировки на образце и вывода изображения на экран. Во время работы поддерживается вакуум в интервале $10^{-2} - 10^{-3}$ Па.

В рамках данной работы были получены изображения нанопорошков оксида железа для построения распределения по размерам и расчета среднего размера частиц. Микрофотографии обрабатывались программой, позволяющей выделять отдельно взятые НЧ в виде сфер (рисунок 3.1). Для каждой партии было обчислено не менее 2000 частиц. Исследования проводились с помощью просвечивающего микроскопа JEOL JEM 2100 при ускоряю-

щем напряжении 200 кВ. Для ТЕМ капля суспензии исследуемых в изопропанолe наносилась на покрытые углеродом медные сетки и выдерживалась вне колонны микроскопа до полного высыхания.

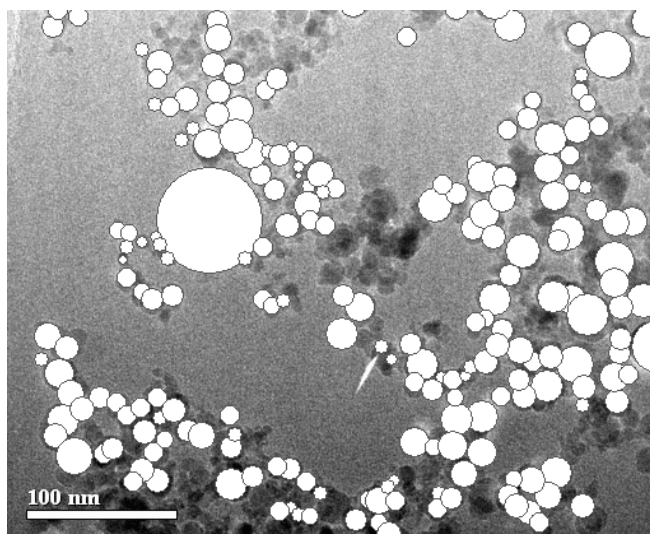


Рисунок 3.1 – Пример расчета распределений по размерам МНЧ различных партий методом выделения отдельных частиц

Также с помощью ТЕМ были исследованы биообразцы – клетки крови и жировой ткани человека. Исследование биообразцов с помощью ТЕМ требует тщательной подготовки образцов, а именно – изготовления тонких срезов обезвоженных клеток, распределенных в матрице, представляющей собой эпоксидную смолу. Образцы фиксировали в течение примерно 10 часов в 2% растворе глутероальдегида в буферном растворе Соренсона ($\text{pH} = 7.4$) концентрации 0,1М. Затем образцы промывали смесью изо-осмолярного буферного раствора Соренсона и сахарозы и окончательно закрепляли 1% четырехокисью осмия в буфере Соренсона. После повторной промывки образцы были обезвожены последовательно этанолом, пропиленоксидом и залиты эпоксидной смолой Epon Polarbed (молекулярная масса = 828 г/моль) в специальные капсулы в виде цилиндра диаметром 3 мм с коническим острым окончанием. Таким образом, биообразец жестко связывается с заготовкой из полимера. По окончании процесса полимеризации смолы микролезвием были сделаны срезы толщиной до 70 мкм. Срезы наносились на медную сетку с выдерживанием в уранилацетате и цитрате свинца для последующей визуализации в просвечивающем микроскопе Philips CM120. Цифровые изображения были получены с помощью цифрового фотоаппарата Olympus SIS Morada.

3.2.2 Исследование удельной поверхности

Для определения величины удельной поверхности МНЧ оксида железа использовали метод Брунауэра, Эммета и Теллера (ВЕТ) низкотемпературной адсорбции азота с использованием анализатора Micromeritics TriStar 3000. Теория ВЕТ основана на модели адсорбции Ленгмюра. Здесь поверхность твердого тела принимается за совокупность адсорбционных областей. По достижении динамического равновесия скорость конденсирующихся на свободных областях молекул газовой фазы становится равной скорости испарения молекул с занятых областей:

$$\frac{1}{W\left(\frac{P_0}{P}\right)^{-1}} = \frac{1}{W_m \cdot C} + \frac{C-1}{W_m \cdot C} \cdot \frac{P}{P_0}, \quad (3.1)$$

где P – давление газа, P_0 – давление насыщенных паров газа, W – масса адсорбированного при относительном давлении газа, W_m – вес адсорбированного вещества, который формирует монослой на поверхности, C – константа ВЕТ, ее значение определяет степень взаимодействия адсорбента с адсорбированным веществом.

Азот является наиболее широко распространенным газом для проведения измерений методом ВЕТ. Для определения площади поверхности использование азота оправданно, поскольку при измерениях константа ВЕТ (C) принимает среднее значение для большинства твердых поверхностей [36].

3.2.3 Рентгеновская дифракция

Дифрактометр – измерительная система, состоящая из источника рентгеновского излучения, гониометра и детектора. Лабораторный источник излучения – рентгеновская трубка. Источник электронов – катод, состоящий из вольфрамовой спирали, которая нагревается под воздействием электрического тока. Гониометр – главная составляющая прибора, на нем установлены устройства (монокроматор, щели, держатель образцов), создающие необходимую геометрию для регистрации дифракционной картины. Детектором, который улавливает излучение после взаимодействия с материалом, является сцинтилляционный счетчик с графитовым монокроматором. Сканирование проводится в широком угловом диапазоне (для $2\theta \sim 5^\circ \div 100^\circ$) с возможностью изменения скорости сканирования и шага с целью регистрации большего количества дифракционных максимумов. Дифрактограмма

представляет собой зависимость интенсивности рассеянного рентгеновского пучка от двойного Брэгговского угла 2θ рассеяния. Исходя из уравнения Брэгга – Вульфа, каждому межплоскостному расстоянию на дифрактограмме соответствует свой дифракционный максимум: $n\lambda = 2d\sin\theta$, где n – целое число, описывающее порядок дифракционного отражения, λ – длина волны, d – межплоскостное расстояние между отражающими плоскостями, θ – угол (падающий или дифрагированный луч с отражающей плоскостью) [37].

МНЧ были структурно охарактеризованы с помощью метода РФА. РФА измерения были проведены с помощью дифрактометра DISCOVER D8 с медным излучением Cu-K α , $\lambda = 0,154$ нм, рабочие параметры 40 кВ и 40 мА. Средний диаметр частиц рассчитывали несколькими методами. Размер области когерентного рассеяния (D_{XRD}) был проанализирован методом Шеррера на основании дифрактограмм РФА. В программе TOPAS была сделана подгонка полного профиля, идентифицированы индексы Миллера и определен фазовый состав исследуемого порошка.

3.2.4 Магнитные измерения

3.2.4.1 СКВИД-магнитометрия

Магнитные измерения МНЧ и высушенных ФЖ на их основе были проведены с помощью СКВИД-магнитометрии на оборудовании SQUID MPMS XL7 [38]. Зависимости намагниченности от внешнего магнитного поля были получены в полях $\pm 5,2$ МА/м для температур 5; 50; 100; 150; 300 К. Термомагнитные кривые Zero-Field Cool – Field Cool (ZFC-FC) были получены при приложении внешнего магнитного поля 0,8 - 7,9 кА/м в температурном интервале 5 – 300 К. ZFC – охлаждение образца в слабом магнитном поле (0,16 – 0,24 кА/м) с последующим измерением величины магнитного момента в магнитном поле (от 8 кА/м и выше); FC – охлаждение в поле (от 8 кА/м и выше) с последующим измерением величины магнитного момента.

Диапазон магнитных полей ± 7 Тл, однородность поля в положении ± 2 см составляет 0,01 %, стабильность характеристик магнитного поля 10^{-6} /ч. Измерительная установка позволяет проводить измерения при температурах от 1,9 до 700 К, при этом чувствительность в случае измерений магнитного момента 10^{-8} Гс·см³, диапазон частот переменного магнитного поля от 0,01 до 500 Гц, диапазон величины переменного магнитного поля варьируется от 0,01 до 5 Гс. Колебания температуры вблизи образца ± 5 мК. Погрешность стабилизации температуры менее 0,5 %. Интервал скоростей изменения температуры от 0,1 до 10 К/мин. Также в измерительном комплексе есть возможность обеспечения снижения остаточного магнитного поля до значений 0,05 Гс.

3.2.4.2 Ферромагнитный резонанс

Ферромагнитный резонанс (ФМР) является одним из типов электронного магнитного резонанса, который проявляется в выборочном поглощении ферромагнитным материалом энергии электромагнитного поля при частотах, которые совпадают с собственными частотами ω_0 поворота магнитных моментов образца во внутреннем эффективном магнитном поле $H_{\text{эф}}$. Данное явление присуще материалам, содержащим электроны, ответственные за сильное обменное взаимодействие. Впервые резонансное поглощение ферромагнетиками электромагнитных волн в сантиметровом указал В. К. Аркадьев в 1912 году [39]. Метод измерения ФМР позволяет исследовать магнитные свойства путем обнаружения прецессионного движения намагниченности в ферромагнитном образце. ФМР и электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) могут быть обнаружены при использовании методов магнитной радиоспектроскопии [40].

Ферромагнитный резонанс МНЧ, высушенных ФЖ на их основе и биообразцов был измерен с использованием стандартной методики гомодинного детектирования в прямоугольном резонаторе с рабочей частотой 9,05 ГГц. Детальное описание методики измерения с помощью микроволнового спектрометра приводится в работах [40, 41]. Известно, что существуют два типа схем детектирования микроволновых потерь: с использованием модуляции при радиочастотах и без нее. В первом случае измеряют производную от микроволновых потерь dP/dH , а во втором случае сами потери $P(H)$. В настоящих исследованиях использовалась модуляция. Ширина резонансной линии обозначалась как ΔH , а поле ФМР как H_{RES} . Все измерения проводились при комнатной температуре. Все приведенные в работе результаты соответствуют ФМР геометрии, в которой постоянное внешнее магнитное поле H_{DC} направленно перпендикулярно высокочастотному полю H_{RF} . При этом H_{DC} прикладывалось в плоскости образца в виде тонкой пластины.

Образец помещали в прямоугольную резонансную полость в соответствии с рисунком 3.2. Размер полости определялся половиной длины волны излучения, при котором с ней можно было оперировать. При резонансном поглощении магнитная компонента H_{RF} и внешнее постоянное поле H_{DC} ориентируются перпендикулярно друг другу, а при нерезонансном они сонаправлены. Внутри резонатора существует определенное распределение компонент электромагнитного поля. Так, у основания полости есть только компонента высокочастотного магнитного поля, а на половине высоты полости вклад вносит лишь высокочастотное электрическое поле. В данном исследовании образец помещали в основании полости.

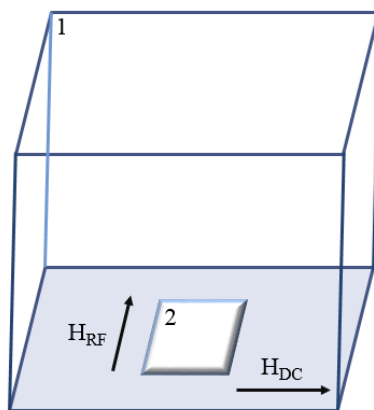


Рисунок 3.2 – Схематическое изображение 1 – полость резонатора, 2 – образец, помещенный в нижнюю часть полости, H_{RF} – радиочастотное поле, H_{DC} – постоянное магнитное поле. Перпендикулярная конфигурация полей

Биообразцы для ФМР исследований тщательно высушивались на предварительно очищенном покровном стекле при комнатной температуре. Далее, полученная пленка покрывалась криолаком GE, адаптированным для ФМР исследований. После высушивания криолака вырезались образцы 3×3 (мм²), которые, в случае необходимости, закреплялись между полос каптона – полиимидной пленки – 3.5×3.5 (мм²), также не влияющего на ФМР отклик системы.

Значение резонансного поля H_{RES} , рассчитанного для сферической частицы с очень малой константой магнитной анизотропии, можно записать как $\frac{\omega}{\gamma} = H_{RES}$, где $\gamma = 8,8 \cdot g$ Мрад/Э гиромагнитное отношение, g – фактор для сферической частицы ≈ 2 , $\omega = 2\pi f$, ω – частота микроволнового излучения. Это уравнение можно записать в другом виде, если включить в него наличие внутренних полей H_{INT} , способных несколько увеличить внешнее магнитное поле $\frac{\omega}{\gamma} = H_{RES} + H_{INT}$ [41].

3.2.4.3 Модифицированная изотермическая микрокалориметрия

Измерения с помощью метода изотермической микрокалориметрии были реализованы на установке, сконструированной на базе микрокалориметра Кальве. Калориметр представляет собой две идентичные калориметрические камеры, находящиеся в оболочке, состоящей из меди, обладающей высокой теплопроводностью. Схематическое изображение микрокалориметрической установки представлено на рисунке 3.3.

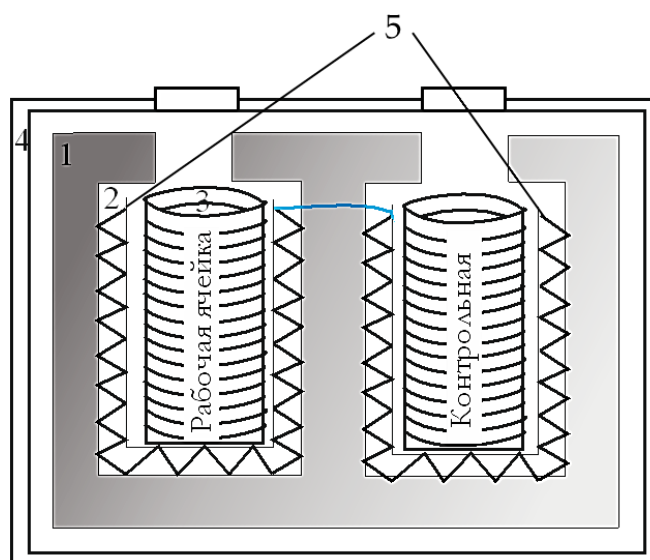


Рисунок 3.3 – Схематическое изображение модифицированного микрокалориметра Кальве, основные узлы: 1 – термостатирующая оболочка, 2 – термопары и камеры, 3 – в одну из камер помещена контрольная, а в другую рабочая ячейка с соленоидом, индуцирующим магнитное поле, 4 – внешняя термостатирующая оболочка, 5 – вольтметр, регистрирующий значение термоэдс

В камеры помещаются калориметрические ячейки, окруженные серией термопар, один спай которых расположен на поверхности камеры, а другой контактирует с массивным блоком. Термопары обеих ячеек соединены согласно дифференциальной схеме. Оболочка калориметра термостатирована и изолирована металлическими экранами от изменений окружающей среды. В результате теплообмена температура ячеек сравнивается с температурой оболочки. Таким образом, изменения температуры в калориметрическом элементе крайне малы и не оказывают влияния на результат эксперимента.

В микрокалориметре Кальве все выделившееся в ячейках тепло передается через термопары к оболочке. При этом формируется тепловой поток, максимальный в начале опыта при имеющейся разности температур между ячейкой и оболочкой, постепенно уменьшающийся до нуля в конце эксперимента, когда температуры становятся равными. Тепловой поток проходит через термопары, вызывая термоэдс, которая регистрируется вольтметром.

Для исследования калориметрических явлений в ФЖ микрокалориметр был модифицирован в лаборатории импульсных процессов Института электрофизики УрО РАН следующим образом: в рабочую и контрольную ячейки микрокалориметра были помещены стеклянные трубки, запаянные с одного конца, на которые в 3 слоя медным проводом сечения 0,3 мм были намотаны соленоиды. Соленоиды были соединены последовательно, составляя часть схемы, представленной на рисунке 3.4.

Схема включает в себя генератор синусоидального напряжения, резистор, осциллограф DS203 (MiniDSO), подключенный параллельно резистору, и два соленоида. Параметры установки: максимальная частота $f = 213$ кГц, максимальное амплитудное значение тока $I_A = 145$ мА, максимальное магнитное поле $H = 1,7$ кА/м, количество витков на катушке $n = N/l = 12000$, сопротивление, подключенное последовательно в цепь, $R = 1$ Ом.

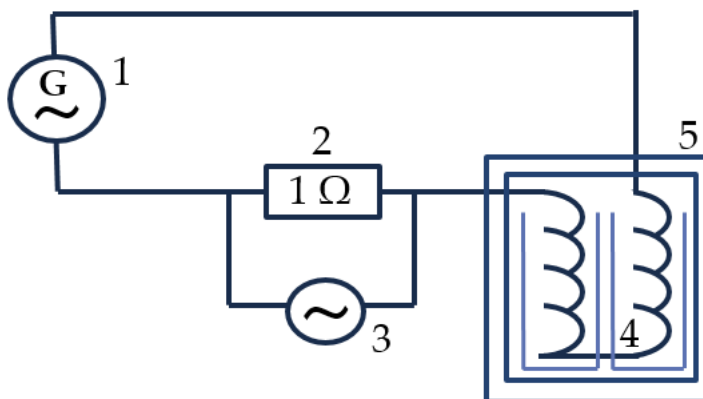


Рисунок 3.4 – Электронная схема в микрокалориметрической установке, 1 – генератор, 2 – резистор, 3 – осциллограф, регистрирующий значение термоэдс, 4 – соленоиды на рабочей и контрольной ячейках, 5 – калориметр

Полученная временная зависимость значений термоэдс – кривая тепловыделения – показана на рисунке 3.5 (а). Перед экспериментом напряжения в цепи нет, тепловой поток равен нулю, регистрирующая программа определяет базовую линию. Для получения хороших результатов необходимо термостатировать систему после загрузки образца в ячейку, выдержав работающую установку в течение по крайней мере 2000 с, убедившись в стабильности базовой линии. Далее, при включении генератора в цепи соленоида появляется напряжение, в рабочей ячейке с образцом начинается процесс тепловыделения, не компенсированный ячейкой-свидетелем, который преобразуется в значение термоэдс. При выключении генератора процесс тепловыделения прекращается, система медленно возвращается в свое первоначальное состояние, достигая на зависимости значений базовой линии.

Перед калориметрическими измерениями ФЖ была проведена калибровка установки. Среднее значение константы установки в рабочей ячейке $k_A = 26,35$ Вт/В, $k_S = 26,63$ Вт/В, среднее между этими значениями $k = 26,49$ Вт/В. Среднее значение константы установки в контрольной ячейке $k_A = 30,15$ Вт/В, $k_S = 30,18$ Вт/В, среднее между этими значениями $k = 30,17$ Вт/В. Калибровочные и экспериментальные кривые имеют похожий вид, связанный с началом процесса тепловыделения в рабочей ячейке. От измерения тепловыделения пу-

стой ячейки получаем сигнал 1, от измерения тепловыделения ячейки с ФЖ получаем сигнал 2. Далее, вычитая сигнал 1 из сигнала 2, получаем значение тепловыделения самой ФЖ, наглядно изображенное на рисунке 3.5 (б).

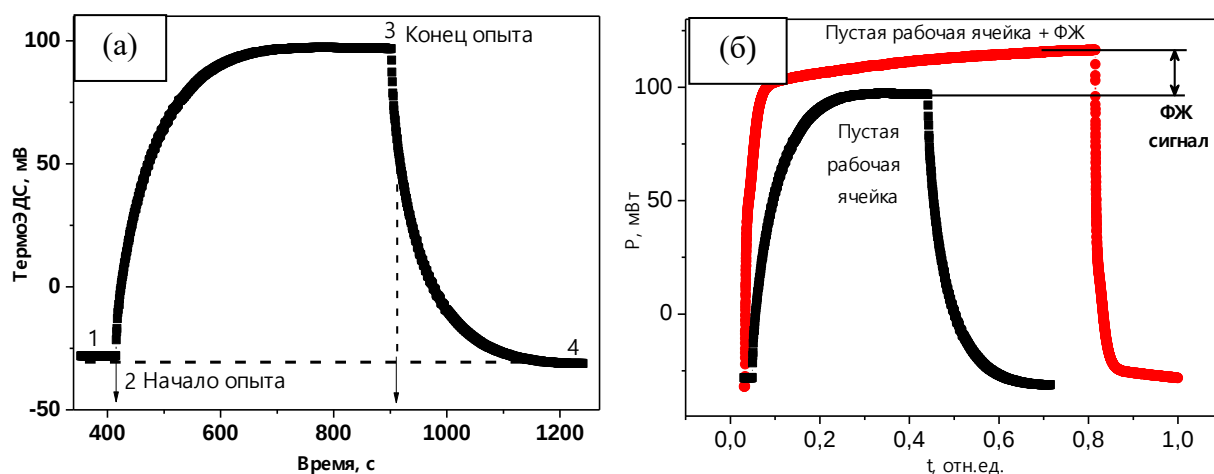


Рисунок 3.5 – а – Кривая тепловыделения, измеренная на модифицированном микрокалориметре Кальве. 1 – процесс термостатирования калориметрической системы, 2 и 3 – начало/конец опыта, сопровождаются включением/отключением генератора, 4 – релаксация системы до первоначального уровня – базовой линии, б – Различие в сигналах кривой тепловыделения от пустой ячейки и ячейки с ФЖ. Вычитая сигнал пустой ячейки, можно получить искомый сигнал от ФЖ

При проведении измерений известный объем феррожидкости ($\sim 0,6$ мл) помещали в рабочую ячейку. При включении генератора ток в катушке начинает индуцировать магнитное поле. Процесс тепловыделения происходит за счет перехода электромагнитной энергии в тепловую, вызывая нагрев в суспензии, который регистрируется изменением термоэдс.

3.2.5 Оценка острой цитотоксичности исследуемого материала

Инкубация живых культур в присутствии объекта исследования

Начнем обсуждение с культуры мононуклеарных клеток крови человека (МНК). Для получения МНК на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,08$ г/см³) (Ficoll-Paque Premium) брали лейкоцель условно здорового донора, разбавленную дистиллированной водой в соотношении 1:3. Принцип метода базируется на отличающихся значениях плотности разных типов клеток крови. Смесь вещества фиколла и рентгеноконтрастного вещества урографин позволяет создать градиент с плотностью, которая в процессе центрифугирования играет роль сетки, через которую происходит разделение клеток периферической крови

на две фракции: мононуклеарную, в которую входят лимфоциты и моноциты, и более тяжелую, которая содержит эритроциты. Таким образом, МНК после центрифугирования остаются над градиентом, образуя полупрозрачное беловатое кольцо, которое аккуратно собирается дозатором после удаления плазмы в самом верхнем слое (см. рисунок 3.7). Плотность эритроцитов больше, поэтому эта фракция спускается в область под градиентом [42]. Таким образом, было получено необходимое для проведения эксперимента количество МНК в соотношении 1млн/мл.

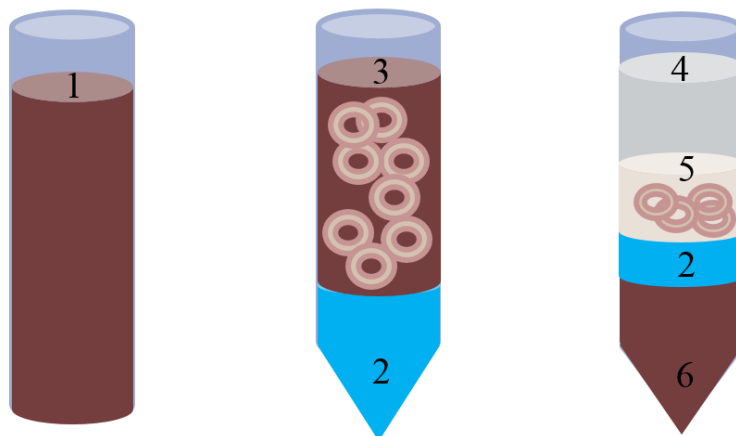


Рисунок 3.7 – Схема выделения мононуклеарных клеток из крови человека методом градиента плотности. 1 – венозная кровь условно здорового донора, 2 – фиколл – урографин, 3 – разбавленная кровь условно здорового донора, 4 – плазма, 5 – кольцо лейкоцитарной массы (лимфоциты, моноциты и бласты), 6 – эритроциты, гранулоциты

Клетки МНК были распределены в 24-луночные планшеты в объеме 2 млн./лунку, все расчеты проводились согласно соотношению 1 млн/мл. В таблице 3.2 можно увидеть схему культивирования для клеточных культур, участвовавших в эксперименте. В ходе проведения исследования был использован следующий состав полной питательной среды (ППС): среда RPMI-1640 (Sigma, США) + 10% сыворотка + L-глутамин + Антибиотики (стрептомицин + пенициллин).

В таблице 3.3 представлен протокол культивирования клеточной культуры МНК с внесенными объемами компонентов в каждую лунку. Как видно из таблицы 3.3, в лунки помещались суспензионные культуры клеток, ППС и стабилизированная ФЖ определенной концентрации, привязанной к значению предельно допустимой концентрации (ПДК) по содержанию железа в воде, исходя из данных нормативного документа СанПин, равную 0,3 мкг/мл [43]. Для первого эксперимента были выбраны величины 2,3ПДК, 10ПДК, 100ПДК, 1000ПДК.

Таблица 3.2 – Схема культивирования моноклеарных клеток МНК с инкубацией 24 часа

	Образцы клеток с ФЖ (Цитрат натрия)				Образцы клеток с ФЖ (Хитозан)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
A	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК
B	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК
C	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК
D	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК	2,3ПДК	10ПДК	100ПДК	1000ПДК
E	4 контроля				4 контроля			

Таблица 3.3 – Протокол культивирования клеток МНК с инкубацией 24 часа. ПДК – предельно допустимая концентрация железа в воде, ППС – полная питательная среда, ФЖ - феррожидкость

Контроль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК
Объем ФЖ (Цитрат натрия), мкл				
Клетки 134	Клетки 134	Клетки 134	Клетки 134	Клетки 134
	ФЖ 0,156	ФЖ 0,6	ФЖ 6,6	ФЖ 66,6
ППС 1886	ППС 1865,8	ППС 1865,4	ППС 1859,4	ППС 1799,4
Объем ФЖ (Хитозан), мкл				
Клетки 134	Клетки 134	Клетки 134	Клетки 134	Клетки 134
	ФЖ 1,04	ФЖ 4,4	ФЖ 44,8	ФЖ 357,2
ППС 1886	ППС 1864,6	ППС 1861,6	ППС 1821,2	ППС 1508,8

Культура мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ткани человека (ММСК): клетки (7 пассаж) были распределены в 12-луночные планшеты в количестве 300 000 клеток/лунку. Был использован следующий состав ППС: среда DMEM низкоглюкозная (D5546, Sigma, США) + 10% сыворотка + L-глутамин + Антибиотики (стрептомицин + пенициллин). В таблице 3.4 представлен протокол культивирования клеток МНК с внесенными объемами в каждую лунку в процессе проведения эксперимента.

Таблица 3.4 – Протокол культивирования моноклеарных клеток с инкубацией 24 часа.
ПДК – предельно допустимая концентрация железа в воде, ППС – полная питательная среда, ФЖ - феррожидкость

Контроль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК
Объем ФЖ_1 (Цитрат натрия), мкл				
Клетки 30	Клетки 30	Клетки 30	Клетки 30	Клетки 30
ППС 1970	ФЖ_1 0,156	ФЖ_1 0,6	ФЖ_1 6,6	ФЖ_1 66,6
	ППС1969,8	ППС1969,4	ППС1963,4	ППС1903,4
Объем ФЖ_2 (Хитозан), мкл				
Клетки 30	Клетки 30	Клетки 30	Клетки 30	Клетки 30
ППС 1970	ФЖ_2 1,04	ФЖ_2 4,4	ФЖ_2 44,8	ФЖ_2 357,2
	ППС 1968,9	ППС 1965,6	ППС 1925,2	ППС 1612,8

Оценка жизнеспособности клеточных культур

Определение жизнеспособности с помощью камеры Горяева позволяет адекватно оценить общее состояние культуры по отношению к контрольной. Камера представляет собой толстое стекло с желобками, между которыми нанесена микроскопическая сетка на уровне 0,1 мм ниже. К желобкам притирают тонкое покровное стекло до возникновения колец Ньютона, образуя определенный объем в камере. Сетка состоит из 225 квадратов А (0,2 мм ребро), 25 поделены на 16 квадратов В (0,05 мм ребро). Для определения количества клеток считают их в 4 квадратах А, расположенных по углам, затем умножают результат на 10^4 , поскольку объем квадрата А фиксирован и равен 0,1 м³. Таким образом, мы можем рассчитать количество клеток в суспензии объемом 1 мл.

Для качественной дифференцировки мертвых и живых клеток был использован трипановый синий – краситель, проникающий в мертвые клетки. Полученная конструкция помещается под микроскоп и производится подсчет живых и мертвых клеток. После проводится усреднение результатов и высчитывается параметр жизнеспособности V:

$$\bar{V} = \frac{\text{Живые клетки } \bar{L}}{\text{Общее количество клеток } \bar{T}} \cdot 100\% \quad (3.2)$$

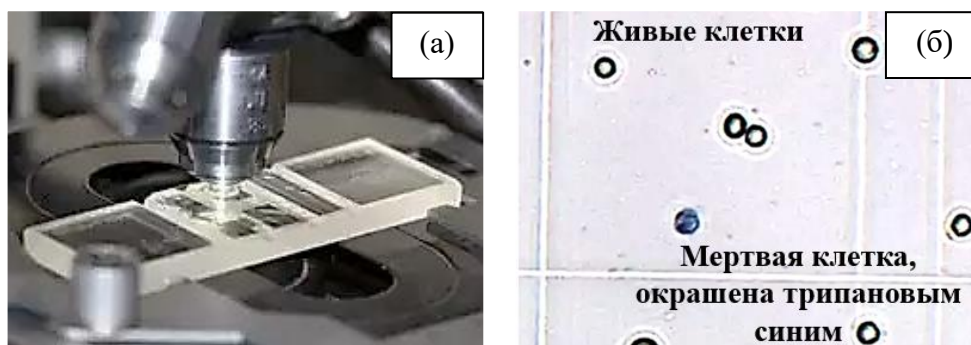


Рисунок 3.8 – а – Камера Горяева, закрепленная в держателе оптического микроскопа, и увеличение желобков камеры Горяева с расположенными внутри клетками, окрашенными трипановым синим, б – изображение микроскопической сетки с клетками

Рентгеновская флуоресцентная спектроскопия полного отражения

Измерения образцов водной суспензии НЧ оксида железа и клеток дрожжей проводились с помощью прибора Nanohunter производства Rigaku, основанного на принципе энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа с использованием медной или молибденовой рентгеновской трубки в качестве возбуждающего источника (см. рисунок 3.9). При облучении образца монохроматическим рентгеновским излучением, падающим под углом полного отражения, меньшим критической величины, возникает эффект полного внешнего отражения. В итоге большая часть возбуждающего рентгеновского излучения отражается. Таким образом, падающее возбуждающее рентгеновское излучение практически не рассеивается образцом, что обеспечивает значительное снижение уровня фона на получаемых спектрах, при этом происходит возбуждение только атомов материала, находящегося в тонком приповерхностном слое. В сочетании с толщиной образца не более 5 мкм происходит минимизация рассеяния первичного пучка и практически отсутствует фоновый шум [17].

Для регистрации рентгеновского излучения используется полупроводниковый детектор, преобразующий рентгеновское излучение в импульсы электрического напряжения. Импульсы имеют амплитуду, пропорциональную энергии рентгеновского излучения. Использование многоканального амплитудного анализатора позволяет регистрировать и оценивать количество нескольких элементов одновременно.

Пробоподготовка проводилась следующим образом: образец переводили в раствор с использованием дистиллированной воды или разбавленной кислоты, далее определенное количество раствора помещали в центр подложки, добавляли внутренний стандарт и высушивали. Толщина высушенной пленки не превышала 5 мкм. Полученный образец загружали в прибор и проводили измерения.

В данной работе прибор Nanohunter использовали для количественного анализа состава водной суспензии НЧ оксида железа, а также для анализа состава одноклеточных организмов – дрожжей, клеток крови и жировой ткани человека, выращенных на питательной среде с добавлением феррожидкости на основе МНЧ оксида железа.

В качестве подложки-отражателя были выбраны стандартные предметные стекла с геометрическими размерами 25 мм x 75 мм, покрытые полиимидной пленкой – каптоном. Каптон представляет собой сверхтонкий электроизоляционный материал, который характеризуется высокой химической стойкостью, стабильностью физико-механических свойств, термостойкостью, а также устойчивостью к радиации, растворителям, перепадам температур. Огромное достоинство промышленного каптона – малое количество случайных примесей.

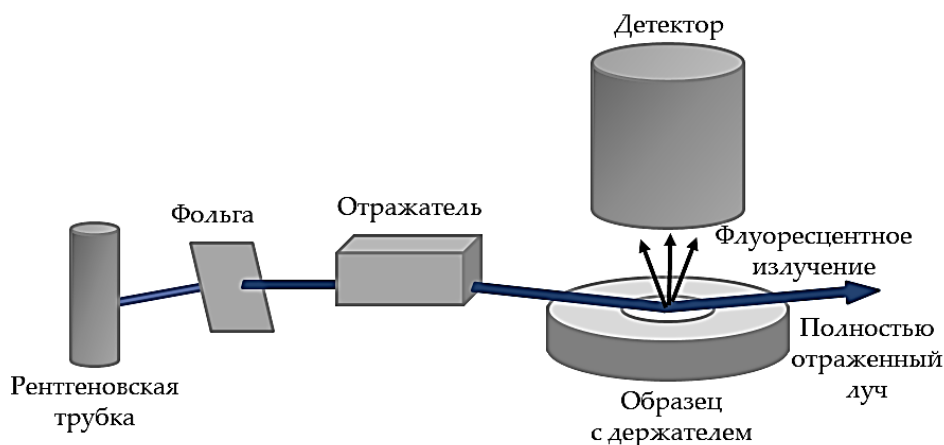


Рисунок 3.9 – Принципиальная схема спектрометра Nanohunter

Для внесения элемента – внутреннего стандарта был использован государственный стандартный образец (ГСО) ванадия V (1000 ppm). Внутренний стандарт ванадия V представляет собой раствор ионов (фон – HNO_3) концентрации $C = 1$ г/л. Единицы ppm – относительные единицы разбавления (количество частей на миллион). Перед добавлением в исследуемый образец необходимо уменьшить концентрацию внутреннего стандарта до уровня, сопоставимого с ожидаемой концентрацией Fe и прочих (примесных) элементов. Если считать плотность раствора клеток приблизительно равной плотности воды, то концентрация 0,39 ppm будет равна 0,39 мг/л.

Учитывая опыт предыдущих исследований, была выбрана концентрация стандарта $C(V) = 100$ ppm. Для проверки корректности процедуры разбавления после получения раствора с $C(V) = 100$ ppm были подготовлены 3 вспомогательные пробы, представлявшие собой смесь полученного раствора V и стандартного образца Ge (PerkinElmer), не подвергнутого разбавлению. Определенная экспериментально концентрация V в пробе отличалась от

расчетной не более чем на 2 ppm (на уровне 100 ppm). В ходе предварительного эксперимента было определено, что уровень загрязнения подложки и используемых компонентов (в частности, воды, использованной для разбавления ГСО V) пренебрежимо мал.

Для каждого образца раствора клеток было подготовлено 2 пробы, на каждой из которых проведено по 2 измерения. Для получения пробы в центр подготовленной подложки помещалась капля раствора клеток объемом $V = 30$ мкл. Каждый образец предварительно взбалтывался для повышения однородности. Затем в жидкую каплю вносился внутренний стандарт раствора ванадия V объемом $V_V = 10$ мкл ($C(V_V) = 100$ ppm). Таким образом, концентрация элемента – внутреннего стандарта V – в пробе составляла $C(V_V) = 25$ ppm, общий объем пробы составлял $V = 40$ мкл. После этого подложки с пробами помещались в сушилку Rigaku, где проводилась сушка при $T = 50^\circ \text{C}$ в закрытой камере без вакуумирования. Измерения биообразцов проводились при следующих параметрах: время набора спектра – 500 с, угол падения первичного пучка – 0,1 градуса, первичное излучение – Cu Ka.

4 Результаты и их обсуждение

4.1 Структурные свойства наночастиц и феррожидкостей

МНЧ оксида железа

НЧ оксида железа, синтезированные в различных условиях, были получены в виде воздушно-сухих порошков. Параметры синтеза представлены в таблице 4.1. Циклический поток аргона создавал инертную среду вокруг НЧ, тогда как воздух способствовал окислению НЧ. Длительность импульса иттербиевого лазера варьировалась от 50 до 200 мкс, испаряя за один импульс разное количество вещества.

Микрофотографии ТЕМ разных партий представлены на рисунках 4.1 – 4.7. Видно, что в большинстве случаев МНЧ имеют форму, близкую к сферической, и находятся в агрегированном состоянии. Некоторые НЧ партий О6, О7 имеют выраженные отклонения от сферической формы, образуя видимые гексагональные очертания на микрофотографиях. Такие частицы могут вносить изменения в магнитное поведение ансамбля, поскольку в них увеличивается вклад анизотропии формы.

Распределения частиц по размерам были определены по статистической выборке, состоящей из 2000 частиц. Все распределения имеют логнормальный вид (см. рисунки 4.1 – 4.7). Среднечисловой (D_N) и среднемассовый (D_W) размеры МНЧ были рассчитаны, используя данные графического анализа микрофотографий ТЕМ, по формулам [26]:

$$\overline{D_N} = \frac{\sum D_i N_i}{\sum N_i} \qquad \overline{D_W} = \frac{\sum D_i^4 N_i}{\sum D_i^3 N_i}, \qquad (4.1)$$

где D_i – размер частиц в i -ой фракции, N_i – число частиц i -ой фракции.

Таблица 4.1 – Параметры синтеза партий НЧ оксида железа, полученных методом лазерного испарения. Стехиометрия соединений была определена исходя из данных рентгенофазового анализа и Redox титрования

№	Состав	Газ	Давление, мм. рт. ст.	Длительность импульса, мкс	Мощность, Вт	Частота импульсов, кГц
O1	Fe _{2.70} O ₄	воздух	540	100	200	2
O2	Fe _{2.72} O ₄	воздух	700	100	200	2
O3	Fe _{2.75} O ₄	Ar	730	200	430	2
O4	Fe _{2.79} O ₄	Ar	730	100	210	2
O5	Fe _{2.79} O ₄	Ar	730	50	95	2
O6	Fe _{2.84} O ₄	Ar	540	50	95	2
O7	-	Ar	760	60	260	5

Средний размер области когерентного рассеяния D_{XRD} рассчитывается по пикам рентгеновских спектров. В данной работе были просчитаны все пики, средний размер D_{XRD} был рассчитан по самому интенсивному пику спектров с индексами Миллера (311) по формуле Дебая-Шеррера:

$$D_{XRD} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}, \quad (4.2)$$

где $k = 0,89$ - коэффициент коррекции в случае сферических частиц, λ – длина волны рентгеновского излучения, β – ширина пика на полувысоте, θ – угол падения и отражения рентгеновского пучка от кристаллических плоскостей исследуемого материала. Средний размер D_{BET} был рассчитан с использованием данных измерений удельной поверхности частиц методом BET по формуле:

$$D_{BET} = \frac{6}{\rho \cdot S_{SP}}, \quad (4.3)$$

где $\rho = 4,6 \text{ г/см}^3$ – плотность НЧ, S_{SP} – удельная поверхность НЧ.

В Таблице 4.2 приведены значения средних размеров, рассчитанных с помощью различных методик. Видно, что размеры, рассчитанные разными методами, отличаются, что связано с допущениями в каждом методе. Например, при вычислении среднечисленного размера больший вклад вносят фракции, содержащие малые частицы. При средневзвешенном размере акцент переносится на объемные частицы. Средний размер по области когерентного рассеяния D_{XRD} предполагает форму частиц сферической, таким образом, не учитывая неровности поверхности НЧ. Следует отметить хорошую корреляцию результатов, полученных с помощью ТЕМ, РФА и ВЕТ. Самый малый размер частиц и самое большое значение удельной поверхности принадлежит партии О2. Партия О3, в свою очередь, имеет самый большой размер частиц и низкое значение удельной поверхности. В общем, данные согласуются между собой, а также с теорией увеличения поверхности при уменьшении размера.

Таблица 4.2 – Структурные и магнитные характеристики МНЧ и ФЖ на их основе, D_N – среднечисленный, D_W – среднемассовый диаметры, D_{XRD} – средний диаметр из РФА, а $D_{ВЕТ}$ – на основе данных о величине удельной поверхности, S_{SP} – величина удельной поверхности

№	Средний размер МНЧ (разные методы), нм				S_{SP} , м ² /г
	D_N	D_W	D_{XRD}	$D_{ВЕТ}$	
О1	13	17	10	14	91
О2	10	14	9	12	108
О3	23	34	17	30	45
О4	16	23	17	25	51
О5	14	18	13	15	83
О6	13	19	14	15	87
О7	18	28	16	20	64

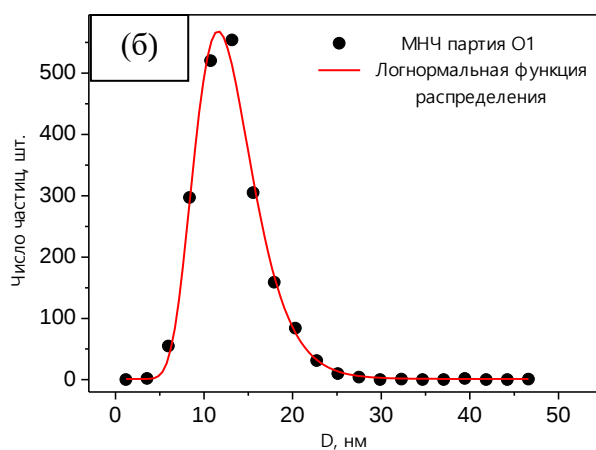
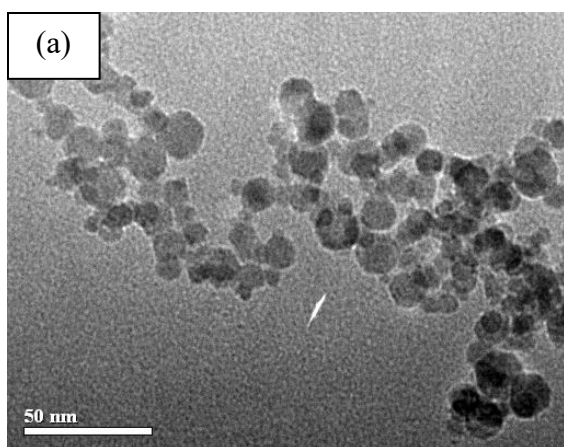


Рисунок 4.1 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О1

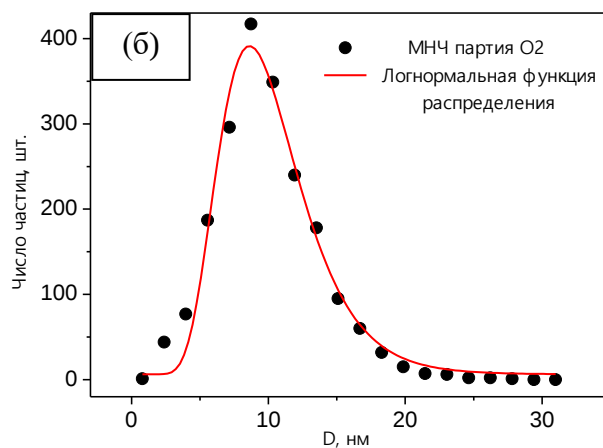
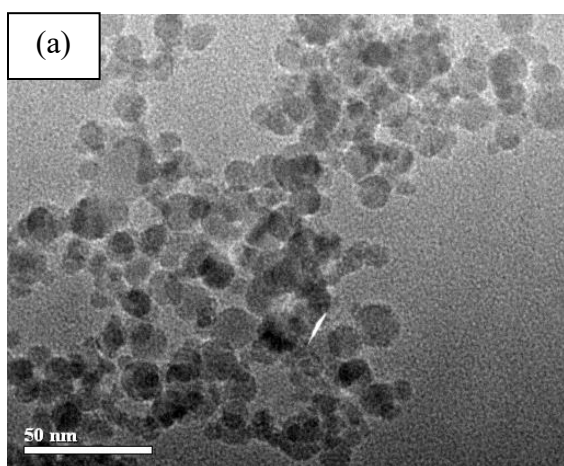


Рисунок 4.2 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О2

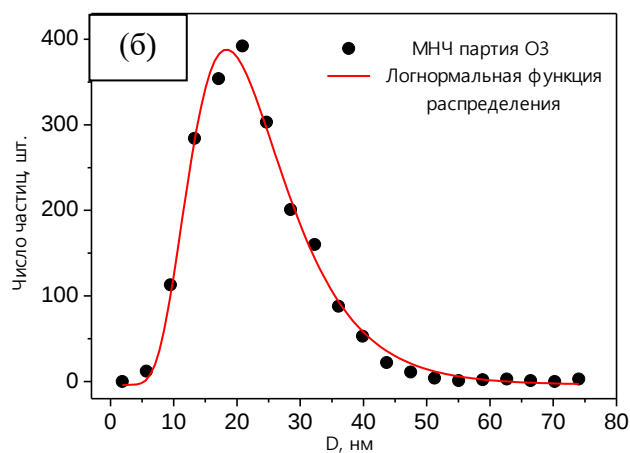
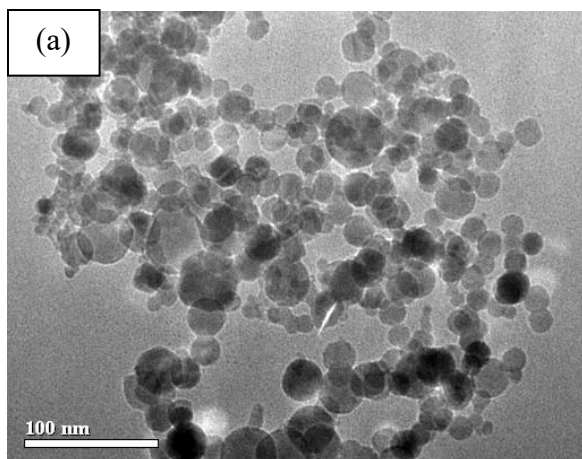


Рисунок 4.3 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О3

Данные дифрактограмм, обработанных с помощью программного обеспечения TOPAS, показали, что материал многофазен. Присутствуют как кристаллическая составля-

ющая, так и аморфная. В таблице 4.3 относительное содержание кристаллических фаз приведено без учета аморфной компоненты. При оценке среднего размера кристаллитов (ОКР) использовался коэффициент коррекции К (в формуле Шеррера) = 0,89. Стехиометрическое соотношение $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ во всех образцах МНЧ оксида железа определяли на основании комплексного анализа межплоскостных расстояний в РФА дифрактограммах, а также с помощью окислительно-восстановительного Redox потенциометрического титрования с использованием автоматического титратора TitroLine.

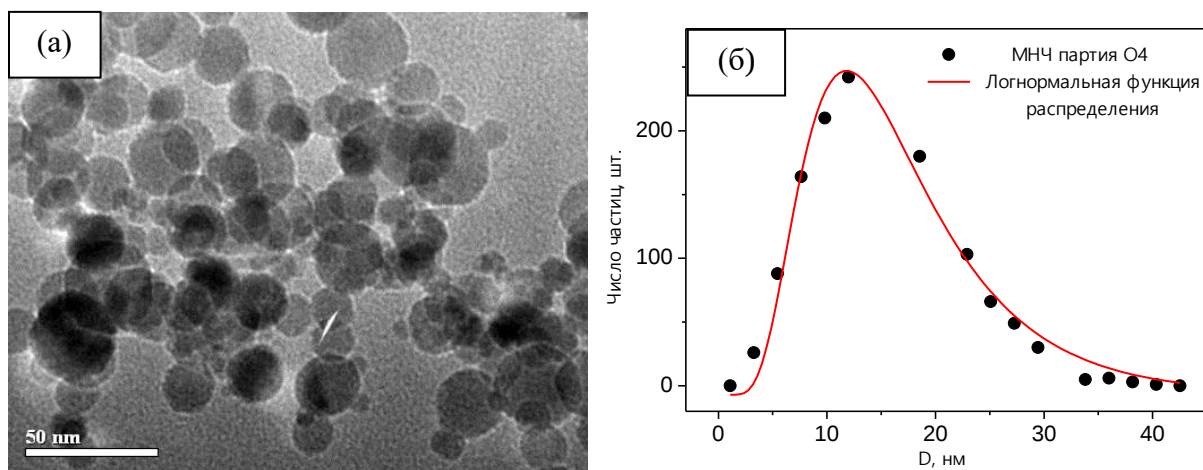


Рисунок 4.4 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О4

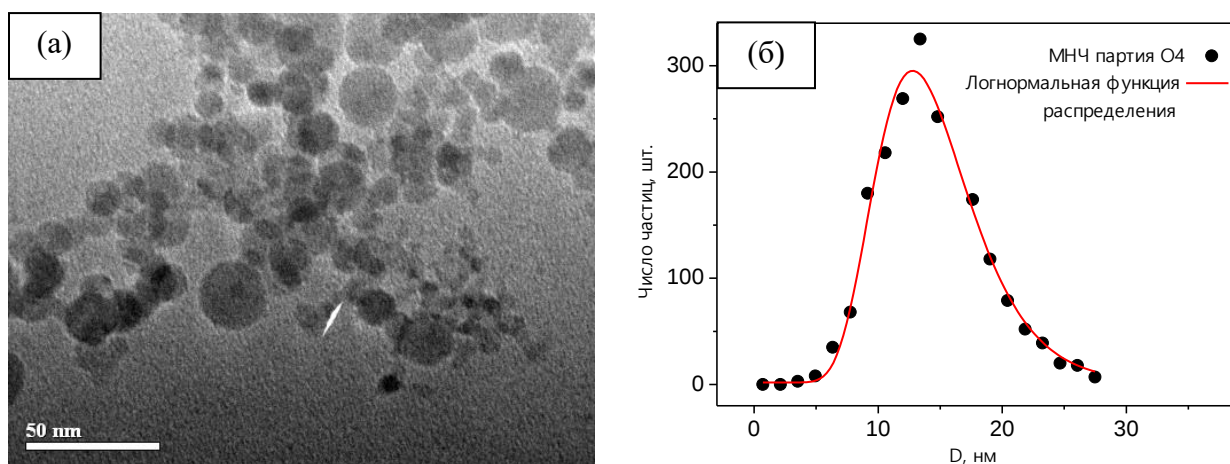


Рисунок 4.5 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О5

Хорошо видно, что путем подбора рабочих параметров синтеза можно в широком интервале варьировать соотношение $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Соотношение $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, равное 1:2, задает структуру магнетита $\text{Fe}_3\text{O}_4 \rightarrow \text{Fe}^{2+}\text{O} \cdot \text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3$, маггемит является фазой $\gamma\text{-Fe}_2^{3+}\text{O}_3$. На Рисунке 4.8 (а, б) показаны дифрактограммы РФА для партий МНЧ оксидов железа и пример расчета среднего размера частиц (ОКР) по формуле Шеррера-Дебая (4.2).

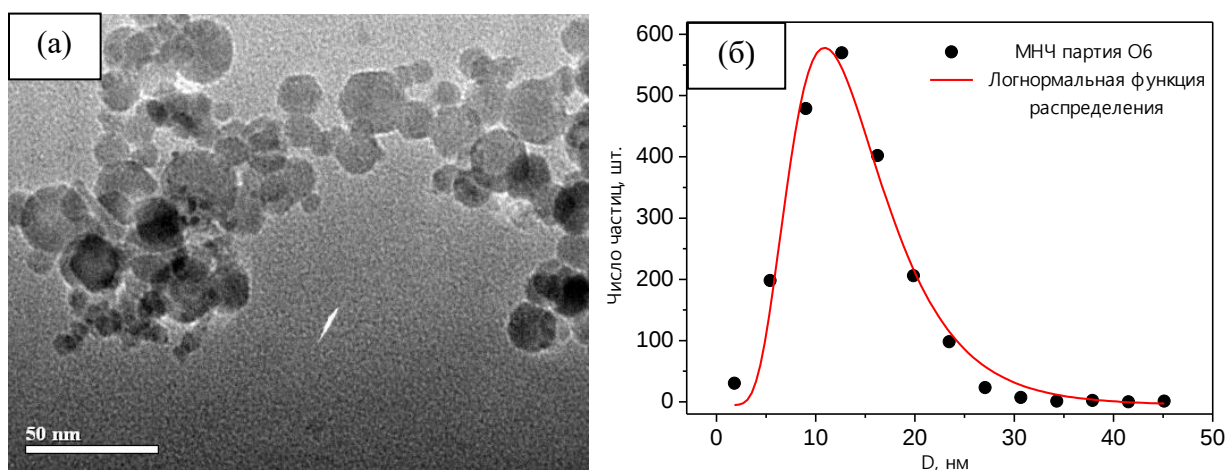


Рисунок 4.6 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О6

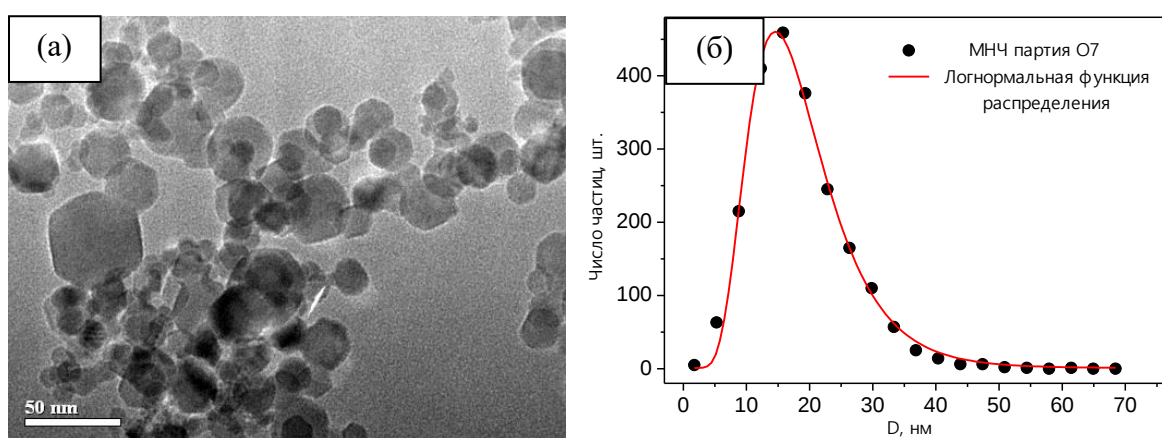


Рисунок 4.7 – а – ТЕМ микрофотография, б – распределение НЧ оксида железа партии О7

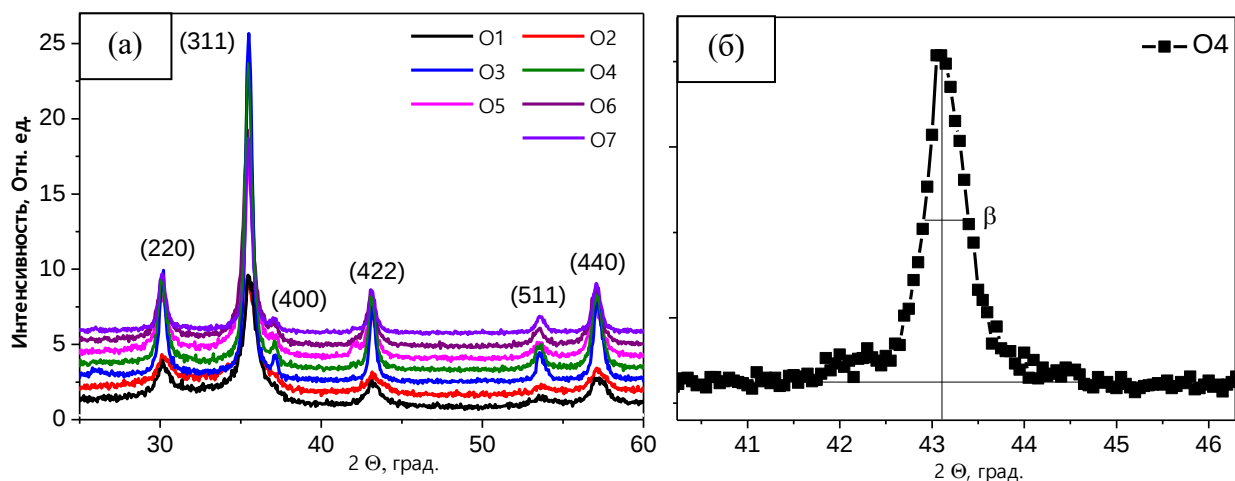


Рисунок 4.8 – Рентгенофазовый анализ, а – дифрактограммы МНЧ, кривые 1 - 6 соответствуют партиям О1 – О7. Индексы Миллера для всех образцов приведены в круглых скобках. Для идентификации образцов используйте таблицы 4.1 и 4.2, б – пример расчета среднего размера МНЧ партии О4 по формуле для области когерентного рассеяния, использованы данные пика (311) с наибольшей интенсивностью

Положения рефлексов хорошо соответствуют табличным данным для магнетита. Однако, известно, что данные РФА не позволяют различить магнетит Fe_3O_4 и маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Оба оксида характеризуются одинаковой структурой обратной шпинели пространственной группы $\text{Fd}\bar{3}m$. Схематическое изображение кристаллических решеток и положение атомов можно увидеть на рисунке 4.9. Элементарная ячейка состоит из 32 анионов O^{2-} , упакованных в кубическую решетку. Ионы Fe^{2+} распределены по двум подрешеткам: подрешетка А включает 8 тетраэдров, а подрешетка В – 16 октаэдров. В случае магнетита все позиции Fe^{2+} заняты и формула элементарной ячейки $(\text{Fe}^{3+}_8)_\text{A}[\text{Fe}^{3+}_8\text{Fe}^{2+}_8]_\text{B}\text{O}_{32}$. В кристаллической решетке маггемита некоторые позиции Fe^{2+} в подрешетке В остаются свободными, степень окисления оставшихся катионов Fe^{2+} увеличивается [24].

Таблица 4.3 – Данные рентгенофазового анализа партий НЧ оксида железа, полученных методом лазерного испарения. ОКР – область когерентного рассеяния – определяет средний размер частиц. Стехиометрия соединений была определена при дополнительном анализе Redox титрования

№	Состав	Содержание аморфной компоненты, %	Кристаллическая фаза		Период кристаллической решетки, Å
			Содержание, %	ОКР, нм	
O1	$\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$	19	Магнетит > 99	8 (1)	8,36 (2)
			Вюстит 0,2	-	-
O2	$\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$	23	Магнетит 99	7 (1)	8,37 (1)
			Вюстит 1	-	4,35 (5)
O3	$\text{Fe}_{2.75}\text{O}_4$	10	Магнетит >60	25 (2)	8,373 (7)
			Маггемит 39	20 (2)	8,346 (6)
			Вюстит 0,1	-	-
O4	$\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$	11	Магнетит > 99	18 (2)	8,376 (5)
			Вюстит 0,5	-	-
O5	$\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$	22	Магнетит 97	12 (1)	8,38 (1)
			Вюстит 3	31 (6)	4,29 (3)
O6	$\text{Fe}_{2.84}\text{O}_4$	9	Магнетит > 99	13 (1)	8,381 (8)
			Вюстит 0,7	-	-
O7	-	0	Магнетит > 99	19 (2)	8,375 (9)
			Вюстит < 1	40 (6)	4,293 (6)

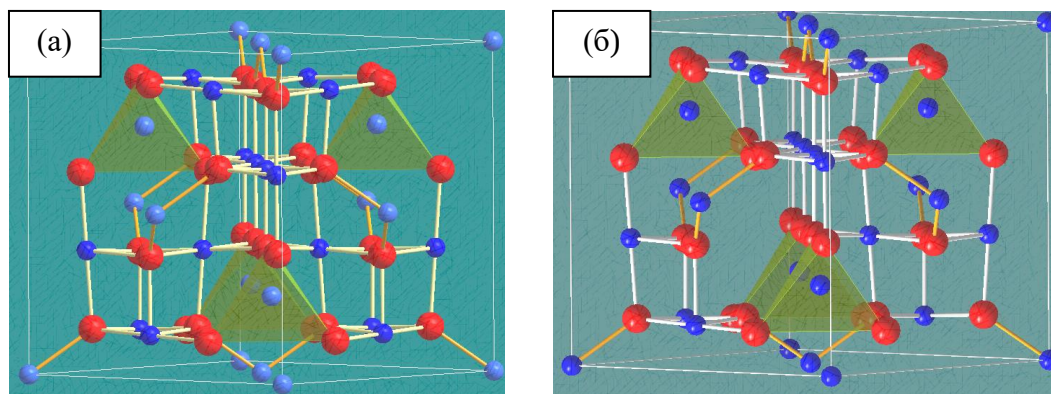


Рисунок 4.9 – Схема кристаллических решеток, а – магнетита и б – маггемита. Красные шары соответствуют атомам кислорода, синие шары – атомам Fe со степенью окисления Fe^{+3} , голубые шары – атомам Fe со степенью окисления Fe^{+2}

Феррожидкости на основе МНЧ оксида железа

Для применения МНЧ в биотехнологических приложениях они должны быть приготовлены в «инвазивной» форме – например, в виде суспензии, либо геля. Суспензии первого типа ФЖ_1 были стабилизированы раствором натриевой соли лимонной кислоты – цитратом натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (CitNa). При диспергировании сухих порошков МНЧ в растворе цитрата натрия отрицательно заряженные определяющие потенциал ионы цитрата адсорбируются на МНЧ, таким образом, формируя заряд на поверхности МНЧ. К ионам цитрата благодаря электростатическим силам притягиваются положительно заряженные ионы натрия, находящиеся в растворе. Таким образом, достигается электростатическая стабилизация МНЧ в воде. Схематическое изображение стабилизированных МНЧ представлено на рисунке 4.10.

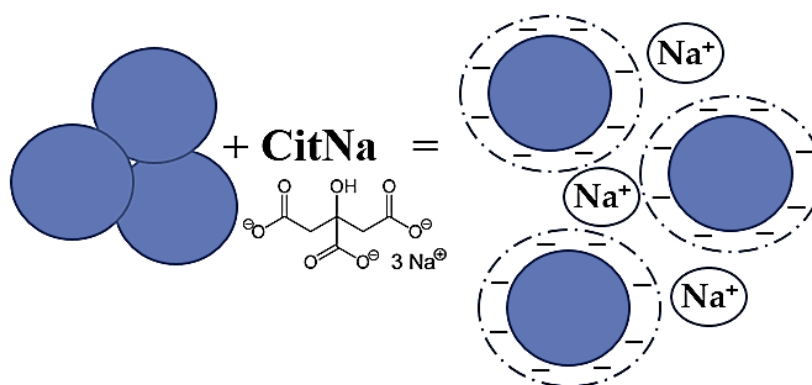


Рисунок 4.10 – Схематическое изображение механизма электростатической стабилизации НЧ при приготовлении водных суспензий ФЖ_1

Различие в распределении частиц в случае нестабилизированной ФЖ – МНЧ, диспергированные в воде без стабилизаторов – и ФЖ_1, рассчитанное методом динамического

рассеяния света по параметру интенсивности рассеяния, показано на рисунке 4.11. Видно достоинство такого метода стабилизации – распределение по размерам заметно сузилось, значение среднего размера сместилось в область меньших размеров.

В таблице 4.4 представлена динамика приготовления феррожидкости на основе МНЧ партии О7 с наибольшей возможной концентрацией. Использовали навеску МНЧ из расчета концентрации 100 г/л при условии полно перехода в суспензию всех частиц. После 5 часов ультразвуковой обработки концентрация стабилизированных частиц была равна 73 г/л. Определение гидродинамического диаметра D методом динамического рассеяния света проводилось на анализаторе Brookhaven Zeta Plus. Определение дзета-потенциала ζ полученных ФЖ проводилось на том же анализаторе методом электрофоретического рассеяния света. По результатам видно, что для образования устойчивой феррожидкости достаточно провести ультразвуковую обработку в течение 1,25 часов (5 обработок по 15 минут). Удалось получить суспензию весовой концентрации 4,4% со средним гидродинамическим размером агрегатов 65 нм, с усредненным значением дзета-потенциала (- 45,6) мВ, соответствующим устойчивому состоянию [44].

Таблица 4.4 – Динамика гидродинамического размера ансамблей частиц партии О7, а также величины дзета-потенциала ζ в ФЖ_1 в процессе ультразвукового диспергирования

№	Количество УЗО по 15 минут	ω , %	D, нм	ζ , мВ
1	5	5,9	65	- 44,3
2	10	6,6	61	- 52,2
3	15	6,9	64	- 49,6
4	20	7,3	65	- 45,6

При недостаточной ультразвуковой обработке МНЧ могут агрегировать со средним гидродинамическим размером ≤ 80 нм. Однако и при длительной обработке ультразвуком не удастся получить полную межчастичную стабилизацию с единичными МНЧ в «оболочке» цитрата. Распределения по размерам ФЖ_1, стабилизированной ионами цитрата натрия, в процессе ультразвуковой обработки на погружном диспергаторе заметно сужаются (см. рисунок 4.12). Время обработки были 15 - 45 минут, а также для отделения крупных агрегатов использовалось центрифугирование, 10 минут при 10 000 об/мин.

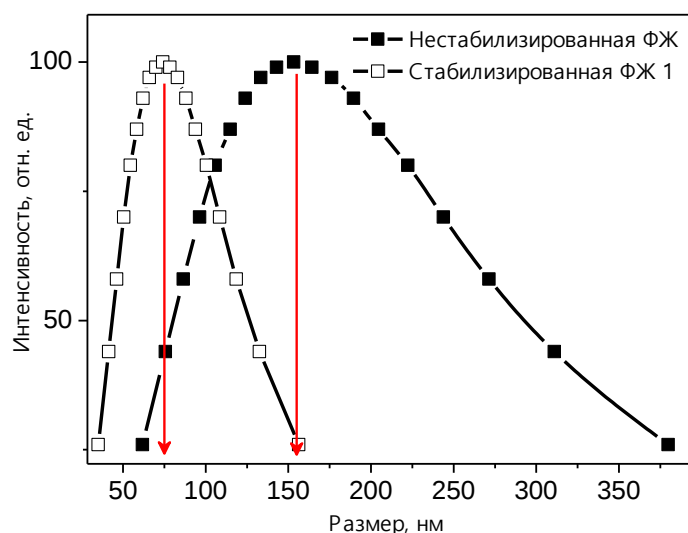


Рисунок 4.11 – Распределения по размерам ФЖ без стабилизатора и ФЖ_1, стабилизированной ионами цитрата натрия, в процессе ультразвуковой обработки

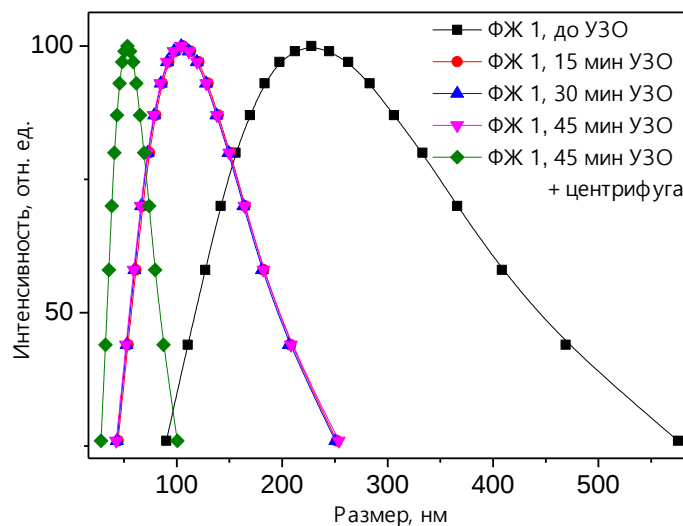
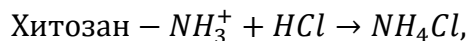
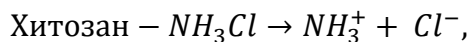


Рисунок 4.12 – Распределения по размерам электростатически стабилизированной ФЖ_1 ионами цитрата натрия в процессе ультразвуковой обработки разной длительности, для отделения крупных агрегатов использовалось центрифугирование

Стабилизацию суспензий можно проводить и при добавлении полимеров. В таком случае увеличивается устойчивость к образованию агрегатов и может замедлиться процесс осаждения из-за повышения вязкости среды. Например, в суспензии второго типа ФЖ_2 наряду с электростатическим стабилизатором был добавлен стерический – полимер хитозан, являющийся катионным полисахаридом основного характера. Молекула хитозана имеет много свободных аминогрупп, что дает возможность присоединять ионы H^+ и, таким образом, приобретать положительный заряд. Известно, что для хитозана вода не подходит

в качестве растворителя, однако он довольно хорошо растворяется, в нашем случае, в соляной кислоте при небольшом нагреве раствора до 60 градусов Цельсия:



К феррожидкости первого типа ФЖ_1 приливали смесь фосфатного буферного раствора и хитозана, растворенного в соляной кислоте концентрации 0,2Н. Таким образом, к отрицательно заряженным ионам цитрата, находящимся вокруг МНЧ, пристыковывались положительно заряженные аминогруппы хитозана. Ионы Cl^- в растворе связывались с ионами Na^+ , образуя солевой раствор натриевой соли соляной кислоты. Схематическое изображение представлено на рисунке 4.13.

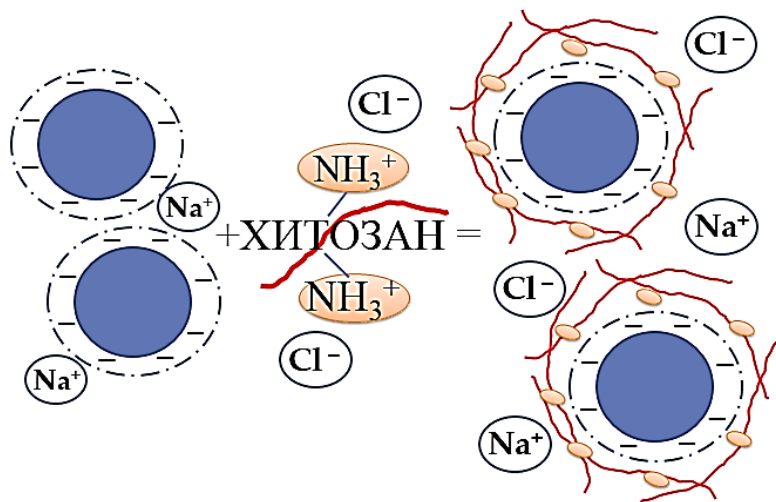


Рисунок 4.13 – Схематическое изображение механизма электростатической стабилизации МНЧ при приготовлении водных ФЖ_2

На анализаторе частиц Brookhaven Zeta Plus были измерены значения гидродинамического размера D и дзета-потенциала ξ МНЧ в ФЖ_2, стабилизированной цитратом натрия и хитозаном. Из-за наличия хитозана в растворе ансамбли частиц в целом приобретают небольшую положительную величину дзета-потенциала.

Оседание частиц в агрегативно неустойчивой феррожидкости происходит быстро, частицы слипаются, образуя рыхлые агрегаты, и осаждаются на дно кюветы под силами тяжести. Образуется большой седиментационный осадок, сохраняющий рыхлую структуру. С течением времени осадок уплотняется, однако довольно легко взбалтывается.

Седиментация частиц в агрегативно устойчивой феррожидкости происходит несколько по-другому: при столкновении частицы не слипаются, оседают значительно медленнее. В осадке частицы сохраняют изолированность, сам осадок имеет плотную структуру. Объем такого осадка небольшой и увеличивается в процессе седиментации частиц.

Таким образом, по качественному наблюдению процесса оседания частиц в феррожидкости было замечено, что феррожидкости ФЖ_1 агрегативно устойчивы и в некоторых случаях могут находиться в коллоидном состоянии практически без осадка в течение нескольких месяцев. На рисунке 4.14 представлена динамика оседания комплексов «МНЧ-хитозан» с течением времени: через час после приготовления, через 24 часа в процессе полимеризации, через 48 часов взята надосадочная фракция.

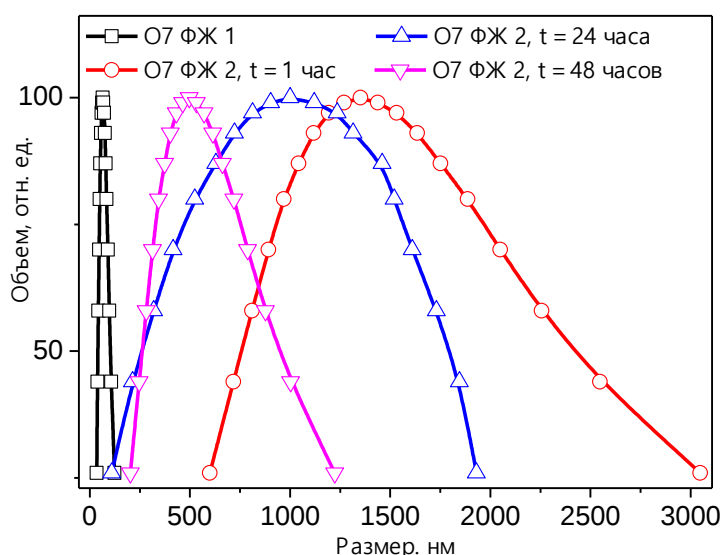


Рисунок 4.14 – Распределения по размерам электростатически стабилизированной ФЖ_1 ионами цитрата натрия в процессе ультразвуковой обработки разной длительности, а также центрифугирование для отделения крупных агрегатов

Видно, что средний размер агрегатов значительно уменьшается – это связано с образованием тяжелых «сгустков» полимера с МНЧ, которые оседают под силами тяжести. Через 2 суток размер комплексов не превышает 500 нм. Данное значение гидродинамического размера также не является оптимальным для устойчивой ФЖ_2, что подтверждается данными дзета-потенциала, приведенными в таблице 4.5. ФЖ_2 агрегативно неустойчива, однако за счет наличия буферного раствора она является более устойчивой при внесении в физиологический солевой раствор, чем ФЖ_1. Более высокая устойчивость обеспечивается стерической стабилизацией ФЖ_2.

Таблица 4.5 – Значения гидродинамического диаметра частиц в ФЖ_2 после диспергирования, а также величины дзета-потенциала полученной ФЖ_2

№	Время стабилизации, ч	D, нм	ξ , мВ
1	5	1216	+ 10,38
2	24	1170	+ 2,97
3	48	523	+ 1,88

4.2 Магнитные свойства наночастиц и феррожидкостей на их основе

Величины среднего диаметра частиц для всех исследованных партий позволяют ожидать, что полученные МНЧ могут вести себя как ансамбли суперпарамагнитных и ферромагнитных НЧ. Для проверки данного предположения была проведена аппроксимация кривых намагничивания с использованием функции Ланжевена (L) в предположении когерентного вращения магнитных моментов внутри каждой МНЧ в процессе релаксации.

$$L(\alpha) = \frac{M}{M_s} = \coth \alpha - \frac{1}{\alpha}, \quad (4.5)$$

где $\alpha = \frac{\mu_0 M_d H V_M}{kT}$, $M_s = \varphi M_d$ – намагниченность насыщения, M_d – намагниченность домена частиц суспензии, φ – объемная доля твердой фракции. На рисунках 4.15 – 4.18 представлены петли гистерезиса при температуре $T = 300$ К для образцов всех партий О1 – О7, соответствующие каждому случаю модельных расчетов с использованием функции Ланжевена. Коэрцитивная сила H_c для петель магнитного гистерезиса при температуре 300 К оказалась небольшой, как и следовало ожидать для ансамбля, содержащего суперпарамагнитные МНЧ (см. таблицу 4.6).

Можно увидеть и другие признаки СПМ: хотя для удобства модельных расчетов значение намагниченности во внешнем магнитном поле 5,2 МА/м считали величиной намагниченности насыщения, следует подчеркнуть, что полное насыщение кривой намагничивания в данном поле не достигается. Модельные и экспериментальные кривые намагничивания совпадают не полностью, есть отклонения в области малых полей. Возможные причины этого – допущения, сделанные в процессе моделирования: форма МНЧ предполагается сферической, сам ансамбль считается монодисперсным и НЧ не взаимодействуют друг с другом. Различия между модельными и экспериментальными кривыми намагничивания

могут говорить о том, что в ансамбле есть крупные частицы, которые вносят существенный ферромагнитный вклад – например, в партиях О3, О4 (см. рисунок 4.16).

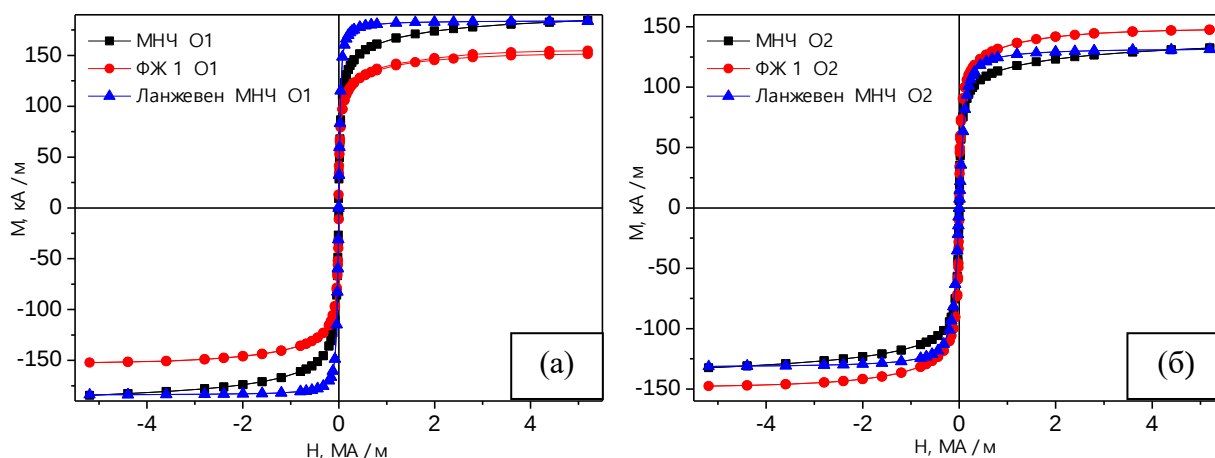


Рисунок 4.15 – Результаты магнитных измерений петель гистерезиса МНЧ и ФЖ_1 партий а – О1, б – О2 при температуре $T = 300$ К, а также подгонка кривой намагничивания, построенная с помощью функции Ланжевена L

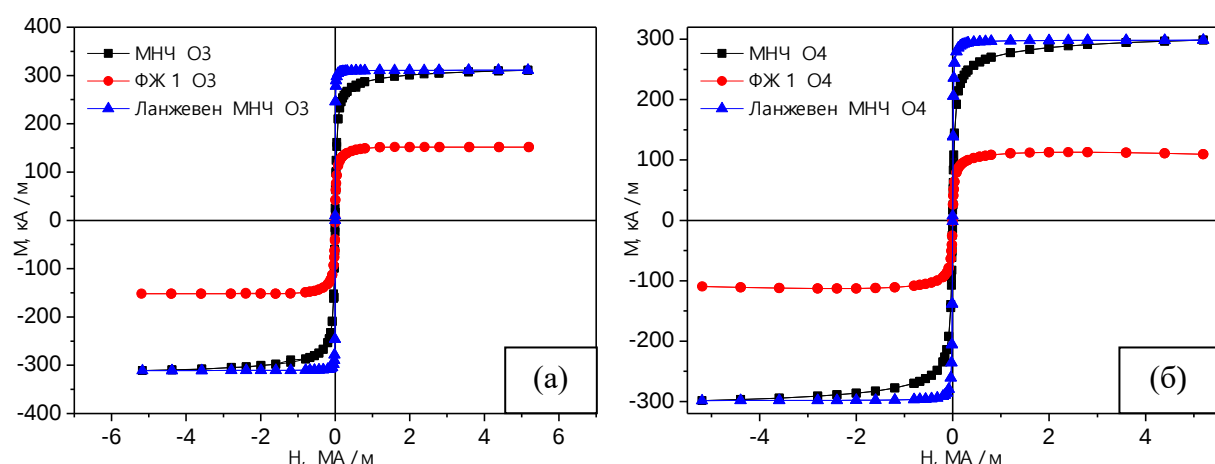


Рисунок 4.16 – Результаты магнитных измерений, кривые намагничивания образцов МНЧ и ФЖ_1 партий а – О3, б – О4 при температуре $T = 300$ К, а также подгонка кривой намагничивания, построенная с помощью функции Ланжевена L

При увеличении области малых полей петель гистерезиса партии О7 на рисунке 4.18 мы видим кривые, соответствующие МНЧ, ФЖ_1 и ФЖ_2. Величина намагниченности насыщения указывает на то, что в образце порошка удельный магнитный момент наибольший, среднее значение принадлежит ФЖ_1, концентрация которой была около 40 г/л, а самое малое значение принадлежит ФЖ_2, стабилизированной полимером-хитозаном. ФЖ_2 способна удерживать в полимерной сетке агрегаты размером до 1000 нм, однако на корот-

кий промежуток времени, поскольку они оседают под силой тяжести. Также, в виду сложности состава дисперсионной среды и чувствительности компонентов к кислотности среды, максимальная концентрация ФЖ_2 составила не более 2 г/л.

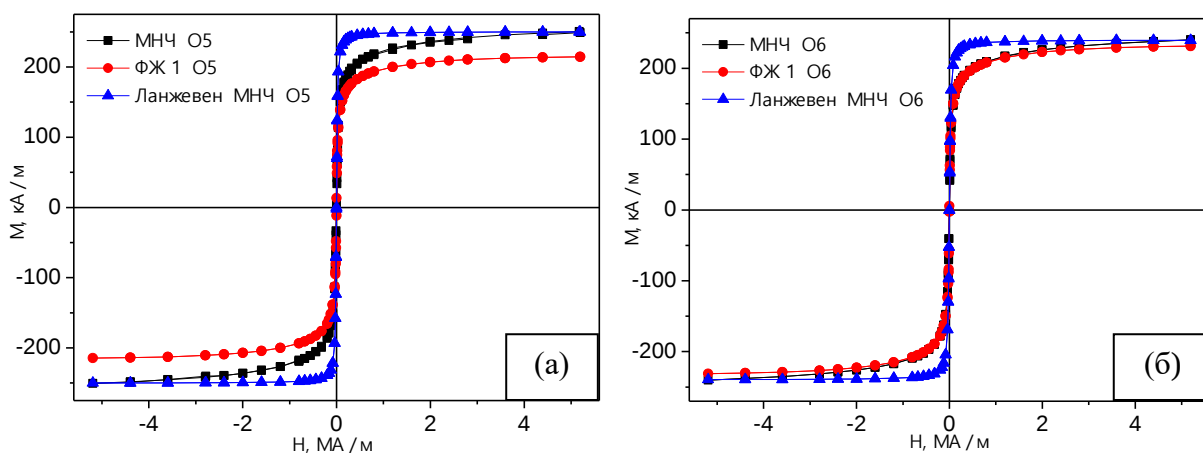


Рисунок 4.17 – Результаты магнитных измерений, кривые намагничивания образцов МНЧ и ФЖ_1 партий а – О5, б – О6 при температуре $T = 300$ К, а также подгонка кривой намагничивания, построенная с помощью функции Ланжевена L

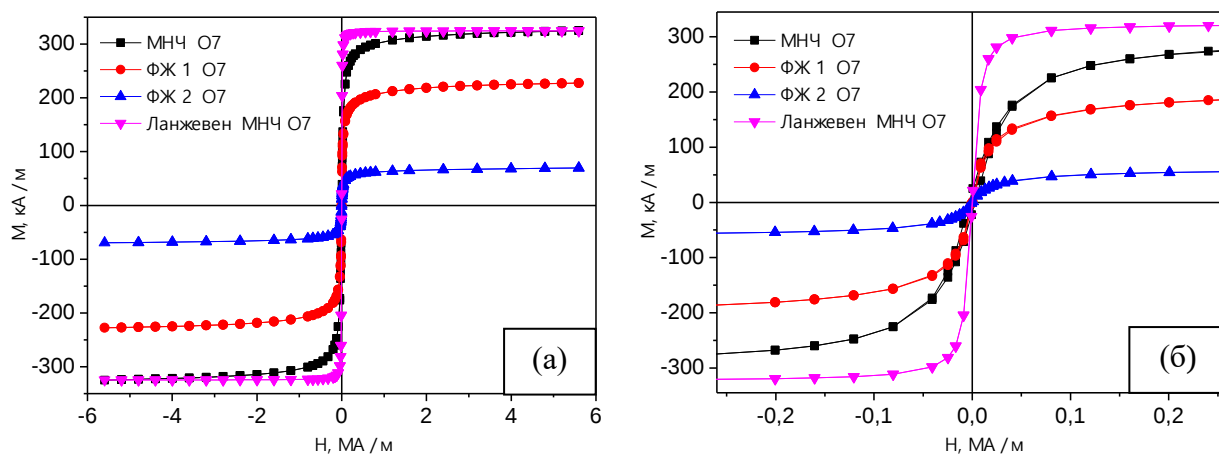


Рисунок 4.18 – Результаты магнитных измерений, а – кривые намагничивания образцов МНЧ и ФЖ_1 партии О7 при температуре $T = 300$ К, а также подгонка кривой намагничивания, построенная с помощью функции Ланжевена L , б – область малых полей

В качестве примера на рисунке 4.19 приведены петли магнитного гистерезиса МНЧ партий О2 и О3 с самыми малыми и самыми большими средними размерами частиц (см. таблицу 4.2). Видно, что в образце О3, имеющим в составе крупные частицы, в случае ФЖ_1 сильно уменьшилось значение намагниченности насыщения – это связано с разбивкой агрегатов ультразвуковой обработкой при приготовлении ФЖ, а также с процессом се-

парации при центрифугировании. Однако основные тенденции сохранились – при увеличении температуры измерений намагниченность насыщения уменьшается. В случае партии О2 с малым средним размером намагниченность насыщения практически не изменилась, что говорит о достаточно низкой агрегированности нанопорошка как в виде ФЖ_1, так и в виде МНЧ. В таблице 4.6 представлены выделенные из петель гистерезиса основные магнитные характеристики партий МНЧ О1 – О7.

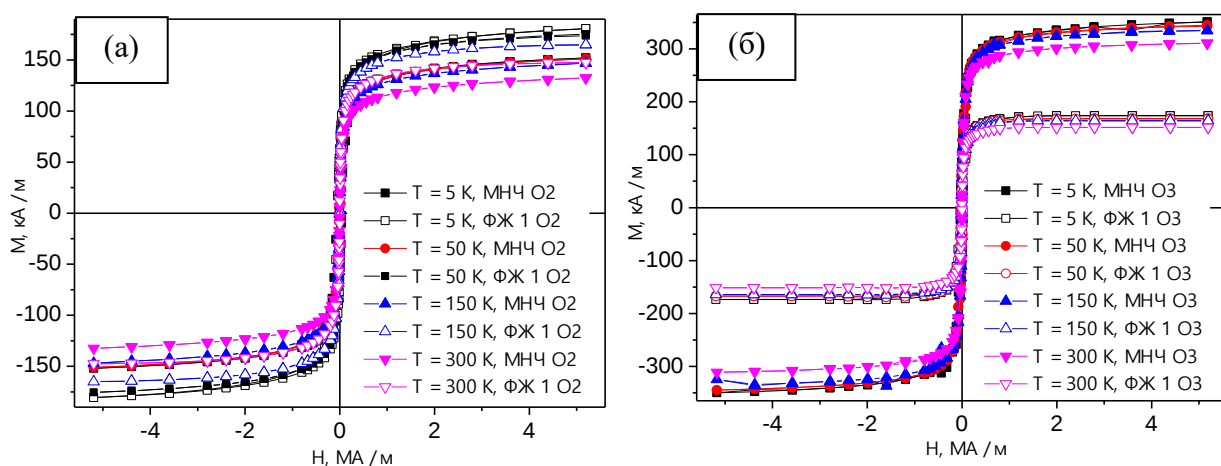


Рисунок 4.19 – Результаты магнитных измерений МНЧ, кривые намагничивания образцов МНЧ и ФЖ_1 партий а – О2 и б – О3 для температур 5, 50, 150 и 300 К

Косвенным подтверждением предположения о наличии суперпарамагнитных частиц в ансамбле МНЧ в некоторых случаях служит выпуклая форма FC-частей на термомагнитных кривых ZFC-FC (см. рисунок 4.20). При этом, термомагнитные кривые (см. рисунки 4.20 – 4.23) позволяют определить дополнительные характеристики. Так, для МНЧ партии О2 по ZFC-части – ее наибольшей точке перед спадом – можно определить температуру блокировки (около 100 К), наличие которой характерно для суперпарамагнетиков. Примечательно, что кривые ZFC-FC МНЧ партии О2 из высушенных водных суспензий ФЖ_1 партии О2 по всем характеристикам очень близки к кривым ZFC-FC МНЧ О2 партии. Последнее хорошо объясняется изначально малым средним размером О2 МНЧ: сепарирование в процессе приготовления магнитных суспензий незначительно влияет на параметры распределения по размерам.

Образцы партий О3, О4 имеют другой вид кривых ZFC-FC, представленный на рисунке 4.21. Кривая ZFC не имеет максимума с дальнейшим спадом при увеличении температуры, а кривая FC имеет описывается монотонно возрастающей функцией во всем интервале от низких до высоких температур. Такое поведение что может быть связано с наличием

крупных частиц или сильным взаимодействием между частицами. Также у партии ОЗ, имеющей наибольший средний размер частиц, наблюдается значительное уменьшение величины магнитного момента в случае ФЖ_1 по отношению к МНЧ.

Таблица 4.6 – Магнитные параметры исследуемых МНЧ оксида железа, M_S – намагниченность насыщения в поле 5,2 МА/м, H_C – коэрцитивная сила, МНЧ – магнитные наночастицы, ФЖ_1 – феррожидкость, стабилизированная цитратом натрия, ФЖ_2 – феррожидкость, стабилизированная молекулами хитозана

№	M_S , кА/м ($T = 300K$)			H_C , кА/м ($T = 300K$)		
	МНЧ	ФЖ_1	ФЖ_2	МНЧ	ФЖ_1	ФЖ_2
О1	184	155	-	1,8	0,5	-
О2	133	147	-	2,4	2,9	-
О3	313	152	-	4,8	0,4	-
О4	299	113	-	3,0	0,2	-
О5	253	214	-	1,4	2,2	-
О6	239	231	-	0,8	0,7	-
О7	325	227	35	2,7	0,4	0,37

Это может быть связано с сепарацией в процессе центрифугирования и ультразвуковой обработки. МНЧ партии О5, О6 в области комнатной температуры показывают тенденцию к образованию температуры блокировки, однако экспериментально доступные величины температуры недостаточны для обоснованного подтверждения перехода в суперпарамагнитное состояние. Примечательно, что кривые ZFC у МНЧ и ФЖ_1 в области низких температур очень похожи на кривые ZFC у партии О5, так и у О6 (см. рисунок 4.22).

На рисунке 4.23 (а) представлены зависимости МНЧ, ФЖ_1 и ФЖ_2 партии О7 имеют вид, схожий с ферромагнитным ансамблем НЧ, поскольку не видно появления температуры блокировки. Интересно, что в данном случае сигнал от ФЖ_1 гораздо выше, чем от МНЧ. Общая форма кривых согласуется друг с другом. На рисунке 4.23 (б) представлены зависимости ZFC-FC для ФЖ_1 партии О7 в жидком и высушенном виде. Резкий скачок магнитного момента на кривой с жидкой ФЖ_1 соответствует температуре размораживания жидкости, после этого идет довольно резкое уменьшение величины магнитного момента.

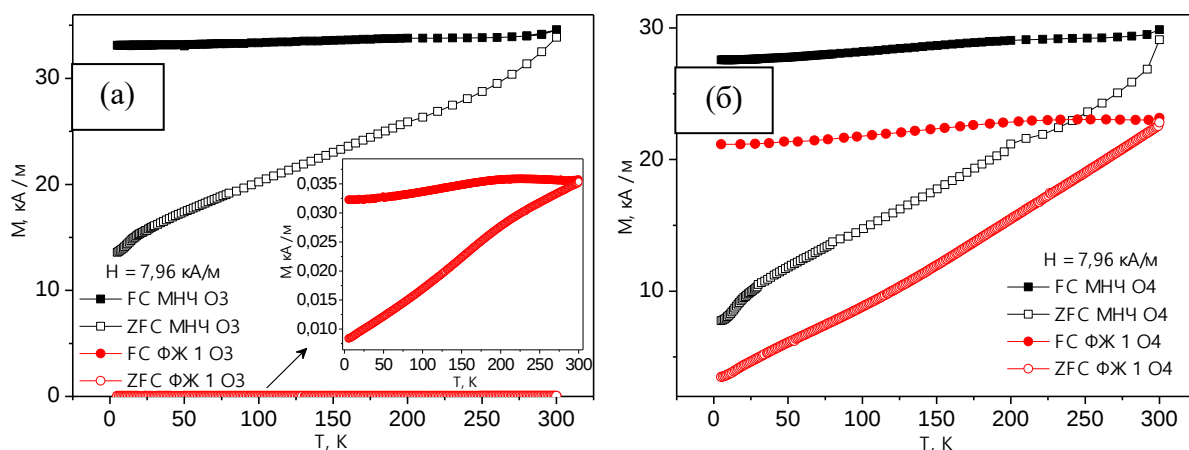


Рисунок 4.21 – Результаты измерений терромагнитных кривых ZFC-FC образцов в виде МНЧ после синтеза и МНЧ из высушенных ФЖ_1, а – партия О3, б – партия О4

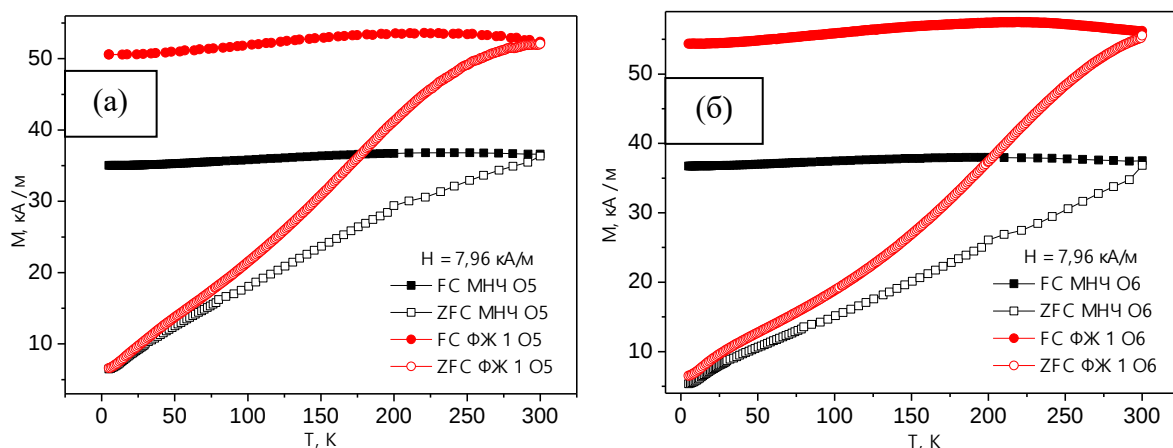


Рисунок 4.22 – Результаты измерений терромагнитных кривых ZFC-FC образцов в виде МНЧ после синтеза и МНЧ из высушенных ФЖ_1, а – партия О5, б – партия О6

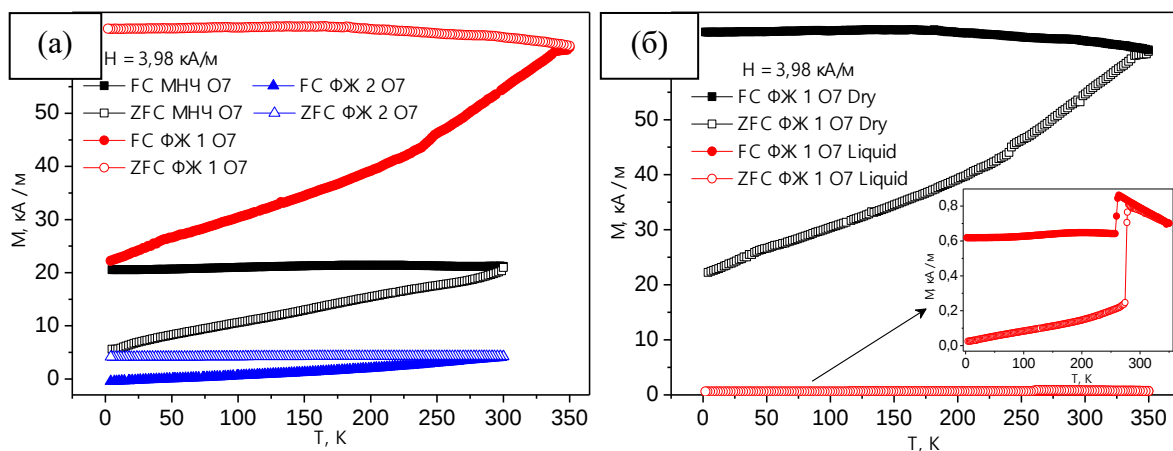


Рисунок 4.23 – Результаты магнитных измерений терромагнитных кривых ZFC-FC образцов партии О7, а – в виде МНЧ после синтеза и МНЧ из высушенных ФЖ_1, ФЖ_2, б – в виде МНЧ из высушенной ФЖ_1 и МНЧ из жидкой ФЖ_1

4.3 Особенности резонанса наночастиц и феррожидкостей на их основе

В качестве примера на рисунке 4.24 приведены спектры микроволнового поглощения для образцов О2_МНЧ и О3_МНЧ, а также для О2_ФЖ_1 и О3_ФЖ_1 из высушенных суспензий. Первое, что следует отметить, это отсутствие нерезонансного микроволнового поглощения в небольших полях, что неудивительно для МНЧ магнетита, обладающих низкой проводимостью. Во всех случаях спектр представлен единственной резонансной линией, подтверждающая структурные данные об однофазности синтезированных материалов.

В ходе эксперимента были получены значения резонансных полей различных партий МНЧ, меняющиеся от 130 до 310 кА/м (Таблица 4.7). Эти значения в большинстве случаев несколько ниже, чем значение H_{RES} для идеально сферической парамагнитной частицы магнетита $H_{\text{RES}} \approx 246$ кА/м, которое можно оценить для данной частоты спектрометра при использовании g -фактора для объемного магнетита равного $g = 2,12$. Расчет для частоты $f = 9,05$ ГГц и величины $g = 2,12$ для оксида железа Fe_3O_4 [44] дает значение $H_{\text{RES}} = 257 \pm 0,05$ кА/м.

Таблица 4.7 – ФМР параметры образцов МНЧ и МНЧ из высушенных водных суспензий ФЖ_1, частота $f = 9,05$ ГГц, H_r – величина резонансного поля, ΔH – ширина линии ФМР

№	$H_r (\pm 5)$, кА/м		$\Delta H (\pm 5)$, кА/м	
	МНЧ	ФЖ_1	МНЧ	ФЖ_1
О1	230	220	95	90
О2	235	225	90	85
О3	220	225	95	95
О4	210	220	105	95
О5	220	210	110	105
О6	210	210	110	105

Этот факт может быть объяснен наличием внутреннего магнитного поля, вызванного как наличием эффективной магнитной анизотропии НЧ (анизотропией формы, поверхностной и объемной анизотропией), так и вкладом, обусловленным диполь-дипольным взаимодей-

ствием между МНЧ. В случае $H_{\text{RES}} = 210$ кА/м сдвиг величины резонансного поля в сторону меньших полей может объясняться как отклонениями от сферической формы, так и напряжениями, возникающими при синтезе НЧ методом лазерного испарения. Существенно меньший разброс величины резонансного поля от партии к партии может быть объяснен сближением характеристик различных партий в процессе сепарации, используемой при получении магнитных ФЖ_1.

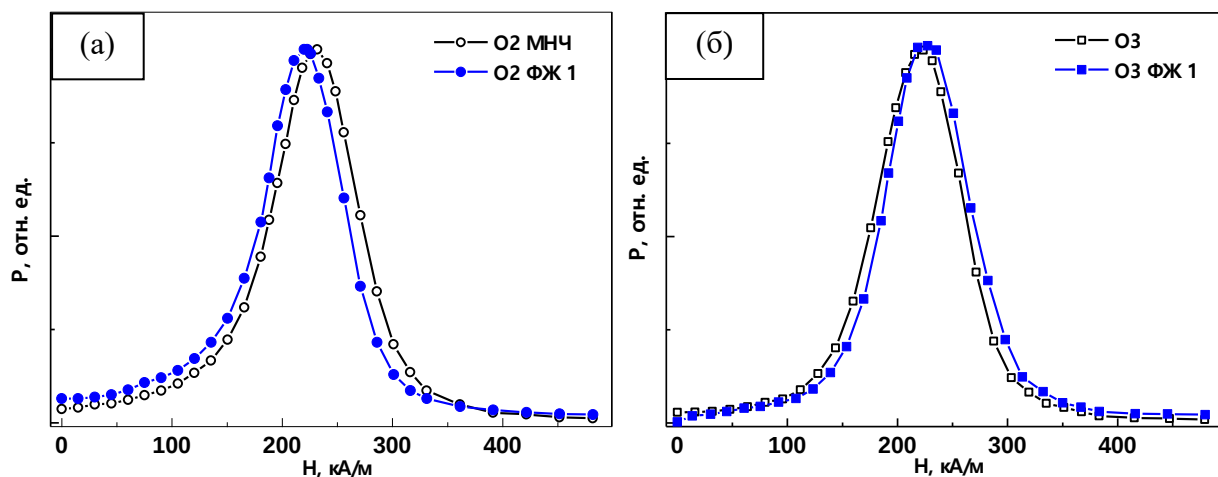


Рисунок 4.24 – Спектры микроволнового поглощения МНЧ партий О2, О3 и высушенных ФЖ_1 на основе МНЧ тех же партий О2, О3

В то же самое время несколько удивительно то, что резонансные поля НЧ после сепарации (см. рисунок 4.24) оказываются в среднем несколько ниже, хоть и очень незначительно, чем $H_{\text{г}}$ ансамблей НЧ до сепарации. Данное различие (около 10 кА/м) разумно объясняется привлечением в качестве аргумента добавочного члена H_d , появление которого связано с диполь-дипольным взаимодействием в ансамбле более близко расположенных сепарированных МНЧ. Наиболее близки к значению H_{RES} для сферических частиц магнетита оказались резонансные поля О2 и О2 ФЖ_1 МНЧ, полученных при рабочем давлении воздуха около 700 мм.рт.ст., длительности импульса 100 микросекунд и мощности 200 Вт. Для всех партий в исходном состоянии ширина линий ФМР не отличалась от сообщаемых в литературе характеристик для сферических МНЧ магнетита, а после сепарации, как и следовало ожидать, ширина линии ФМР несколько уменьшалась. Самую узкую линию ФМР снова наблюдали в случаях О2_МНЧ и О2_ФЖ_1.

4.4 Калориметрическое исследование значений тепловой мощности феррожидкостей на основе наночастиц оксида железа

Первым этапом была калибровка калориметрической установки. Константа калориметрической установки была определена следующим образом: в ячейку помещали нагреватель, на который подавали ток и частоту заданной величины (см. таблицу 4.8). Тепловыделение регистрировалось в виде изменения значения термоЭДС Δ . Константа установки по смещению экспериментальной кривой тепловыделения k_{Δ} и по площади под экспериментальной кривой тепловыделения k_s рассчитывалась по формуле:

$$k_{\Delta} = \frac{W}{\Delta}, \quad k_s = \frac{W \cdot t}{S}, \quad (4.6)$$

где $W = \frac{U^2}{R}$ – тепловая мощность, Вт, U – напряжение, мВ, R – сопротивление, Ом, Δ – изменение напряжения в системе, мВ, t – длительность эксперимента, с, S – площадь под экспериментальной зависимостью $\Delta(t)$. При расчетах было использовано среднее значение сопротивления нагревателя $R = 527$ Ом.

Таким образом, среднее значение константы установки в рабочей ячейке $k_{\Delta} = 26,35$ Вт/В, $k_s = 26,63$ Вт/В, среднее между этими значениями $k = 26,49$ Вт/В. Среднее значение константы установки в контрольной ячейке $k_{\Delta} = 30,15$ Вт/В, $k_s = 30,18$ Вт/В, среднее между этими значениями $k = 30,17$ Вт/В. Несмотря на то, что соленоиды были изготовлены с максимально одинаковыми параметрами, все же различия между ними присутствовали, что отражалось в ненулевом тепловыделении в установке в отсутствии феррожидкости.

Величина магнитного поля, индуцированного катушкой, вычислялась по формуле:

$$H = \frac{N \cdot I}{l}, \quad (4.7)$$

где N – количество витков в соленоиде на метр, I – величина тока, l – длина медного провода. $N/l = 12\,000$, максимальная величина тока для установки – 145 мА.

На втором этапе работы была проведена оценка магнитоиндукционного нагрева ФЖ_1 на основе партий О2, О5, О6 при частоте 214 кГц и силе тока 145 мА. Были определены значения тепловой мощности, выделенной при определенных величинах магнитного поля и частоты (Таблица 4.9). На всех трех образцах ФЖ_1 был зарегистрирован магнитоиндукционный нагрев, значения лежали в диапазоне 1,2 – 1,5 Вт/г. Практическое значение выделяемой тепловой мощности W_{exp} вычислялось по формуле:

$$W_{exp} = \frac{W_{FeOx}}{m_{FeOx}} = \frac{W_{FeOx}}{\omega_{Fe} \cdot m_{FF}}, \quad (4.8)$$

где $W_{FeOx} = k \cdot \Delta$, k – константа калориметра, в нашем случае равна 27,75 Вт/Дж, Δ – изменение значения термоЭДС в процессе проведения опыта, ω_{Fe} – массовая концентрация оксида железа в феррожидкости, m_{FF} – масса феррожидкости в измерительной ячейке. Полученные значения тепловой мощности указаны в таблице 4.9.

Таблица 4.8 – Результаты измерения калориметрического эффекта нагревателя, помещенного в рабочую ячейку для определения константы установки

№	t, с	U, В	Δ , мВ	S, мВ·с	W, Вт	k_{Δ} , Вт/В	k_s , Вт/В
Рабочая ячейка							
1	1332	5,00	2,21	2895	0,047	21,47	21,83
2	1200	5,00	2,25	2721	0,047	21,08	20,92
3	2000	4,99	2,17	4341	0,047	21,77	21,77
4	1510	3,90	0,99	1501	0,029	29,15	29,04
5	2700	3,75	1,04	2802	0,027	25,66	25,71
6	2000	3,70	1,08	2140	0,026	24,05	24,28
7	1500	1,2	0,080	117	0,0027	34,16	35,03
8	700	1,15	0,075	51	0,0025	33,46	34,44
Контрольная ячейка							
1	1300	4,99	1,51	1982	0,047	31,29	30,99
2	2000	5,00	1,52	3053	0,047	31,21	31,08
3	2200	4,04	1,065	2270	0,031	29,08	30,02
4	2000	4,03	1,025	2063	0,031	30,07	29,88
5	1500	3,70	0,84	1262	0,026	30,93	30,88
6	3000	3,17	0,645	1947	0,0191	29,56	29,38
7	1700	3,10	0,63	1068	0,0182	28,95	29,03

Таблица 4.9 – Параметры некоторых ФЖ_1, использованных в калориметрическом исследовании. ω – весовая концентрация оксида железа в ФЖ_1, m – масса образца ФЖ_1, M_s – намагниченность насыщения высушенной ФЖ_1, D – средний гидродинамический диаметр агрегатов в ФЖ_1, $W_{\text{эксп}}$ – экспериментальное значение тепловой мощности ФЖ_1, полученное в эксперименте

№	f, кГц	I, мА	ω (Fe), %	m (ФЖ_1), г	M_s , кА/м	D (ФЖ_1), нм	$W_{\text{эксп}}$, Вт/г
O1	214	145	2,0	0,61	184	52	1,18
O5	214	145	2,3	0,65	253	53	1,21
O6	214	145	2,0	0,61	239	66	1,50

Видно, что значения очень близки, однако при увеличении среднего гидродинамического размера ансамблей частиц в ФЖ_1 партии O6 увеличивается и значение тепловой мощности. На данном этапе были использованы ФЖ_1 с концентрацией около 20 г/л. Предположительно, при увеличении концентрации МНЧ в объеме калориметрической ячейки 0,6 мл будет увеличиваться и магнитоиндукционный нагрев ФЖ_1, который будет происходить быстрее и интенсивнее. Из данных литературы [29] известно, что магнитоиндукционный эффект зависит от величины тока, частоты и параметров материала. Также имеется теоретическое рассмотрение магнитоиндукционного нагрева магнитных жидкостей. Поэтому было проведено подробное исследование МНЧ партии O7. ФЖ_1 на основе МНЧ партии O7 кроме калориметрических экспериментов была исследована в биологических экспериментах по оценке токсичности.

Третий этап исследования включал в себя определение частотных и полевых зависимостей значений тепловой мощности W ФЖ_1 на основе партии O7. Результаты представлены в таблице 4.10, построенные полевые и частотные зависимости показаны на рисунках 4.25. Весовая концентрация оксида железа в исследуемой ФЖ_1 превышала концентрации ФЖ_1 в оценочном эксперименте и была равна $\omega = 7,3\%$, средний гидродинамический размер агрегатов был равен примерно 65 нм.

Отталкиваясь от базовой формулы для расчета значения тепловой мощности W , можно выявить следующие полевые и частотные соотношения:

$$W = \frac{\mu_0 \cdot H^2 \cdot M_s^2 \cdot V}{6 \cdot \rho \cdot k_B \cdot T} \cdot \frac{\omega^2 \cdot \tau}{1 + \omega^2 \cdot \tau^2}, \quad (4.9)$$

$$W \sim H^2, \quad W \sim \frac{f^2}{1+f^2},$$

где μ_0 – магнитная проницаемость вакуума, H – величина приложенного переменного магнитного поля, M_s – намагниченность насыщения материала, V – объем частицы, ρ – плотность частиц, k_B – константа Больцмана, T – абсолютная температура, $\omega = 2\pi f$ – круговая частота, τ – эффективное время релаксации.

Таблица 4.10 – Параметры эксперимента магнитоиндукционного нагрева ФЖ_1 на основе МНЧ партии О7 и полученные результаты. m – масса образца ФЖ_1 (О7), M_s – намагниченность насыщения высушенной ФЖ_1, W – значение тепловой мощности ФЖ_1 (О7), полученное в эксперименте, $W_{уд}$ – удельная тепловая мощность ФЖ_1 (О7)

№	I, мА	H, А/м	f, кГц	m, г	W, мВт	W _{уд} , Вт/г
1	146	1752	214	0,56	79,1	2,00
2	146	1752	150	0,62	37,2	0,85
3	146	1752	100	0,56	23,9	0,57
4	146	1752	50	0,67	20,4	0,48
5	100	1200	214	0,62	20,1	0,46
6	100	1200	150	0,62	13,7	0,31
7	100	1200	100	0,66	11,4	0,24
8	100	1200	50	0,7	8,2	0,17
9	50	600	214	0,66	4,5	0,096
10	50	600	150	0,59	1,8	0,043
11	50	600	100	0,59	2,3	0,055
12	50	600	50	0,68	1,1	0,023

На рисунке 4.25 представлена экспериментальная зависимость значений тепловой мощности W ФЖ_1 партии О7 от величины магнитного поля H при нескольких частотах. При всех значениях наблюдалось увеличение теплового эффекта. Наибольшее увеличение соответствовало большим параметрам установки.

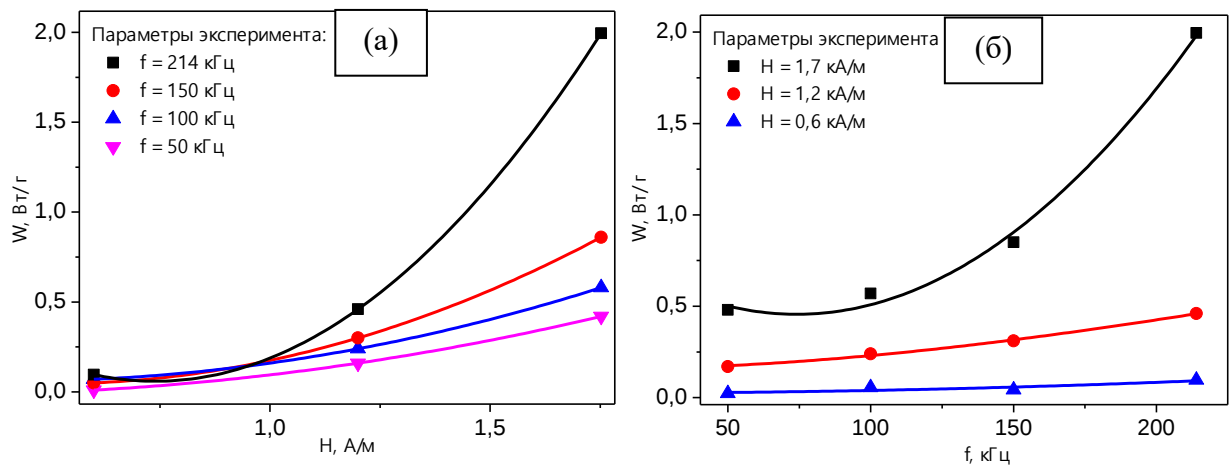


Рисунок 4.25 – а – представлена экспериментальная зависимость значений тепловой мощности W ФЖ_1 (О7) от величины магнитного поля H , б – экспериментальная зависимость значений тепловой мощности W ФЖ_1 (О7) от генерируемой частоты f

Для того, чтобы понять, укладываются ли полученные зависимости в теоретические концепции, можно воспользоваться вышеуказанными соотношениями и аппроксимировать наши результаты в область больших значений магнитного поля и частоты. Таким образом будет возможно сопоставить наши экспериментальные значения в области слабых полей с данными литературных источников.

Аппроксимация экспериментальных результатов согласно теории (4.9) при величине частоты 150 кГц согласуются с экспериментальными данными (см. рисунки 4.26, 4.27). Отклонения могут быть связаны с тем, что процесс поглощения при более высоких частотах идет по более сложным механизмам, и в таких случаях мы уже не можем описать нашу зависимость обычной аппроксимацией функции из (4.9). Полевые зависимости в обоих случаях – 1,8 и 1,2 кА/м – согласуются с экспериментальными данными, что представлено на рисунках 4.26, 4.27. Максимальные параметры установки все же соответствуют слабым полям и частотам, поэтому сильных эффектов наблюдаться не должно, однако видимый магнитоиндукционный нагрев говорит о перспективности исследований ФЖ на основе МНЧ оксида железа, полученных методом лазерного испарения.

Для более детального понимания экспериментальных результатов был проведен расчет теоретического значения тепловой мощности при максимальных для экспериментальной установки параметрах поля 1,8 кА/м и частоты 214 кГц по формуле (4.8). Получено значение $W_{\text{теория}} = 3,05$ Вт/г, что немногим больше значения, полученного в эксперименте для МНЧ партии О7 $W_{\text{эксперимент}} = 2,00$ Вт/г. Также были рассчитаны времена релаксации Броуна $\tau_B = 8,33 \cdot 10^{-6}$ с, Нееля $\tau_N = 6,92 \cdot 10^{-8}$ с и эффективное время релаксации $\tau = 6,86 \cdot 10^{-7}$ с.

⁸ с, которое является суммарным для первых двух. При расчете значения тепловой мощности ФЖ_1 учитывались такие параметры, как: магнитная проницаемость вакуума $\mu_0 = 1,57 \cdot 10^{-6}$ Гн/м, плотность МНЧ оксида железа $\rho = 4600$ кг/м³, $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К, $T = 300$ К, вязкость среды (дистиллированная вода) $\eta = 1 \cdot 10^{-3}$ Па·с, константа анизотропии $K_a = 1 \cdot 10^4$ Дж/м³, время релаксации $\tau_0 = 10^{-9}$ с. $\rho = 4600$ кг/м³, $\eta = 1$ мПа·с.

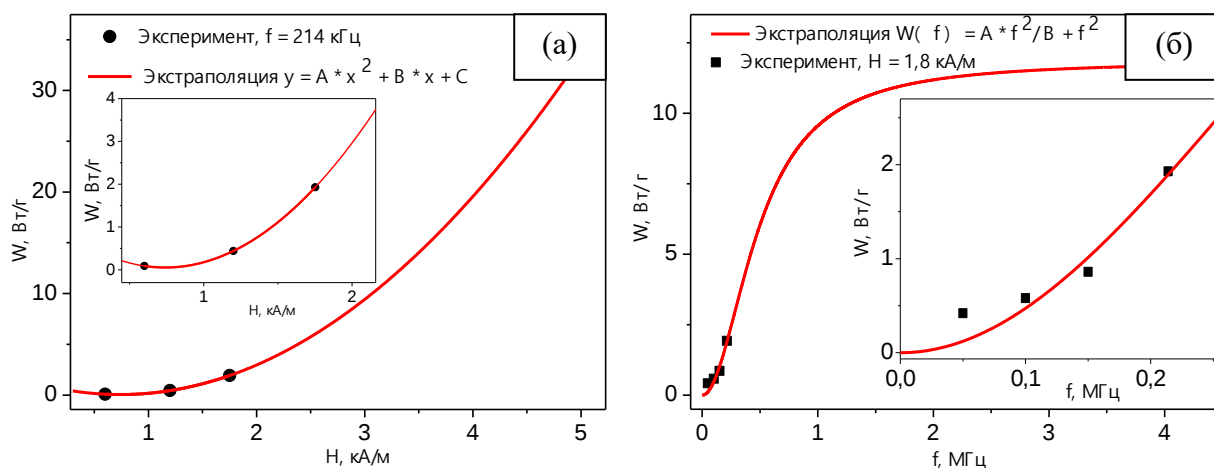


Рисунок 4.26 – а – экстраполяция подгоночной кривой для полевой зависимости тепловой мощности, б - экстраполяция подгоночной кривой для частотной зависимости тепловой мощности при максимальных параметрах установки: $f = 214$ кГц, $H = 1,8$ кА/м

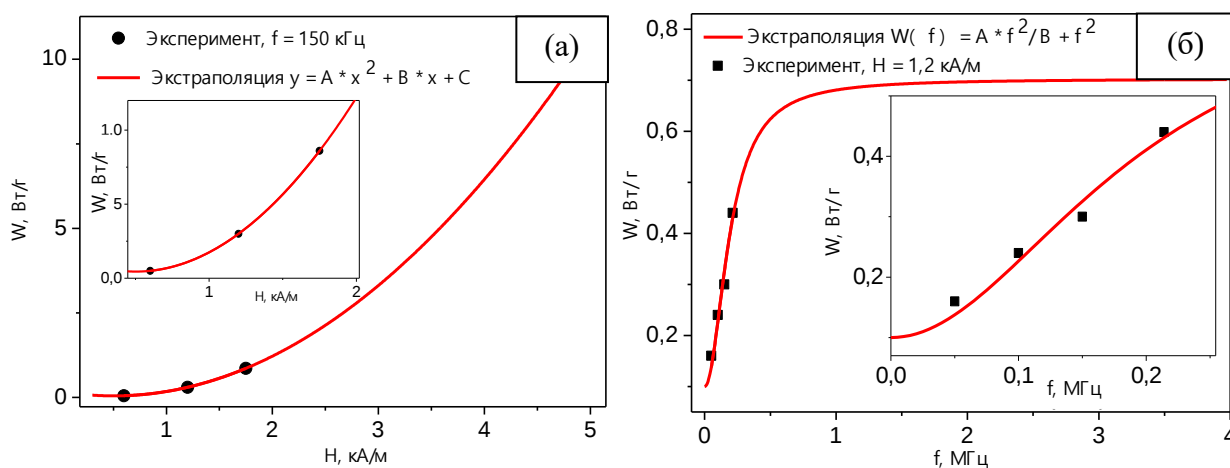


Рисунок 4.27 – а – экстраполяция подгоночной кривой для полевой зависимости тепловой мощности, б – экстраполяция подгоночной кривой для частотной зависимости тепловой мощности при параметрах установки: $f = 150$ кГц, $H = 1,2$ кА/м

4.5 Эксперимент по оценке жизнеспособности живых культур в присутствии заданного количества магнитных наночастиц оксида железа

Для оценки токсичности полученных ФЖ_1, ФЖ_2 была использована партия МНЧ О7. В качестве модельных культур выступали клетки крови МНК и стволовые клетки ткани человека ММСК.

Мононуклеарные клетки крови человека (лейкоцитарная взвесь)

Клетки МНК представляют собой суспензионную культуру, выделенную из крови методом градиента плотности на фиколл-урографине. Схема посадки в культуральные планшеты на срок инкубации 24 часа представлена в таблице 3.2. В ячейку помещалось определенное количество клеток в питательной среде, после добавляли ФЖ_1, ФЖ_2 с концентрацией, превышающей норму ПДК до 1000 раз, выдерживалась экспозиция при комнатной температуре в лабораторном боксе чистой комнаты. Микрофотографии ТЕМ клеточной культуры МНК, а также образцов клеток МНК, выращенных в присутствии ФЖ_1, ФЖ_2 представлены на рисунках 4.28 – 4.30.

На рисунке 4.29 МНЧ из ФЖ_1 практически не видно, только единичные агрегаты, что подтверждается данными магнитных измерений кривой намагничивания (см. рисунок 4.31). Однако, на рисунке 4.28 наблюдается интересное явление: отчетливо видна полимерная сетка хитозана, что неожиданно при такой пробоподготовке. По-видимому, на хитозанную сетку прикрепляются клеточные белковые структуры, которые и обеспечивают ее «утяжеление» и возникновение контраста после обработки образца солями осмия. Таким образом, хорошо видна сеть с прикрепленными на нее не только белковыми структурами, но и МНЧ оксида железа, которых довольно много в поле зрения. МНЧ собираются в агрегаты с размером около 80 – 300 нм, но агрегаты имеют очень пористую структуру, некоторые МНЧ находятся на расстоянии друг от друга.

В таблицах 4.11 для клеток МНК и 4.12 для клеток ММСК представлены первичные результаты измерений по определению содержания железа в биообразцах клеточных культур МНК и ММСК с помощью спектрометра Nanohunter. Концентрация заметно варьируется от пробы к пробе, что указывает на сложность приготовления образцов и необходимость статистических исследований. Значения, полученные для контрольных образцов, находятся на уровне фона и пределе разрешающей способности рентгенофлуоресцентного спектрометра на полном внешнем отражении Nanohunter.

Если считать количество железа примерно равным 1 пг/клетку, то показания прибора должны находиться на уровне 1 ppm (30 000 клеток на 30 мкл раствора). Данные элемент-

ного анализа имеют некоторые отклонения при сравнении с результатами магнитных и микроскопических исследований. Это связано с особенностями проведения пробоподготовки. Так как рентгенофлуоресцентный спектрометр работает на полном внешнем отражении, образец должен иметь вид тонкой однородной пленки. В случае клеток этого достичь не удастся, по большей части, из-за довольно больших размеров и возникновения плотных агрегатов, что и приводит к искажению результатов.

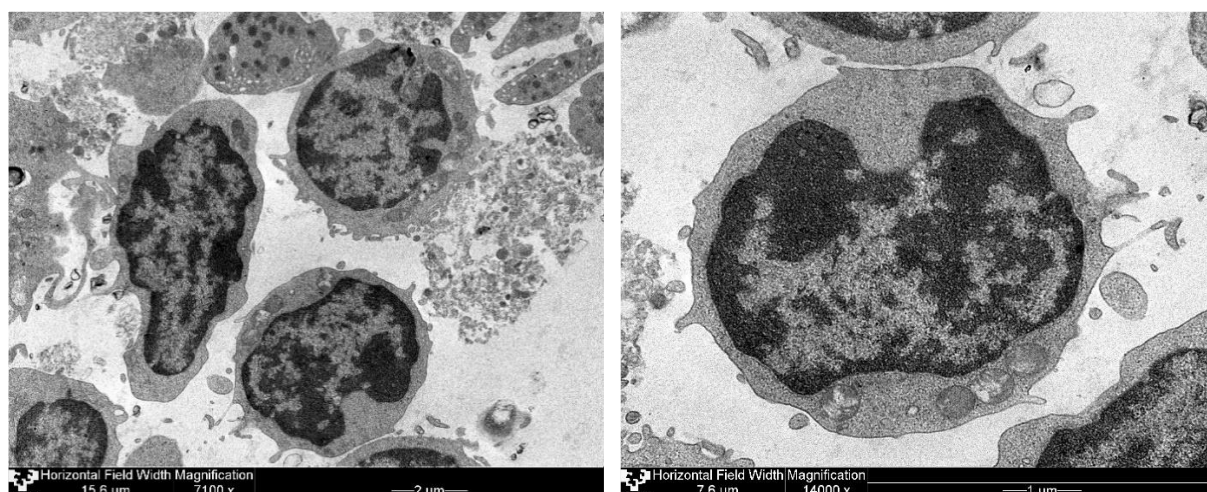


Рисунок 4.28 – Микрофотографии ТЕМ культуры клеток МНК, контроль

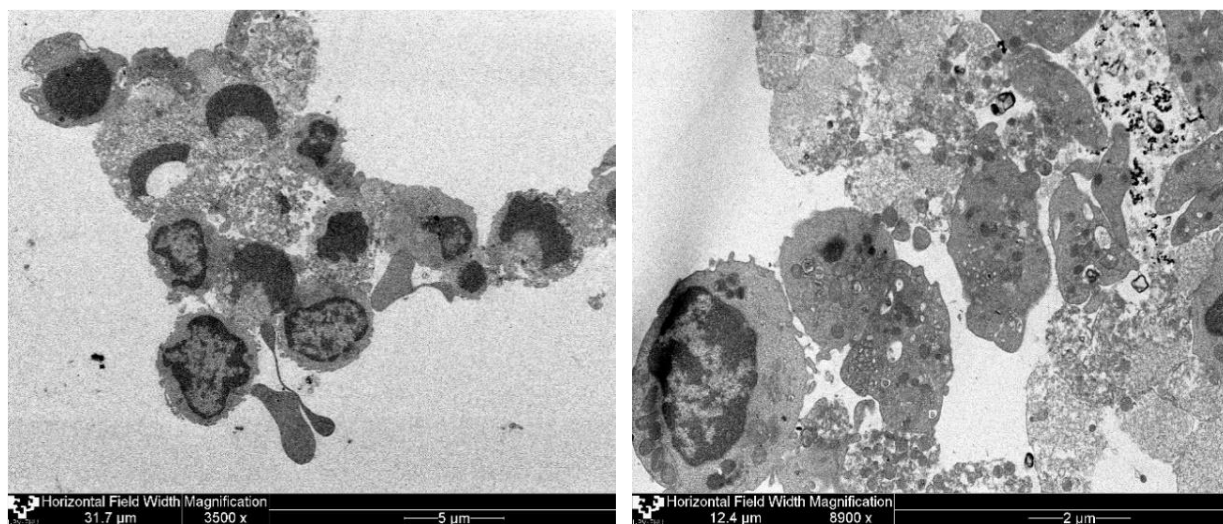


Рисунок 4.29 – Микрофотографии ТЕМ культуры клеток МНК в присутствии ФЖ_1 после 24 часов инкубации

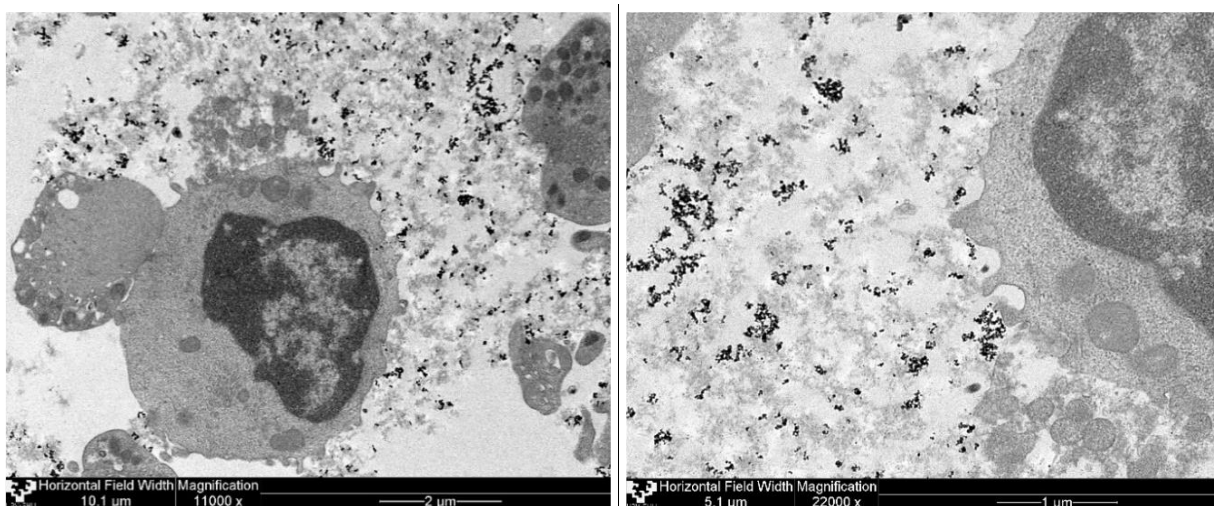


Рисунок 4.30 – Микрофотографии ТЕМ культуры клеток МНК в присутствии ФЖ_2 после 24 часов инкубации

Таблица 4.11 – Результаты измерения элементного состава контрольных клеток культуры МНК и клеток, выращенных в присутствии ФЖ_1, ФЖ_2, супернатанты – питательная среда, отмытая от клеточных биообразцов после инкубации в присутствии ФЖ, ПДК – предельно допустимая концентрация железа в воде

№	Образец	Биообразцы	Супернатанты
Содержание Fe в МНК культуре, ppm			
1	Контроль	1	2
2	100ПДК ФЖ_1	65	18
3	100ПДК ФЖ_2	27	95

Однако, в целом, результаты элементного анализа имеют общие тенденции и вполне соответствуют ожиданиям. Видно, что в контрольных биообразцах и супернатантах железа практически нет. Это свидетельствует о том, что мы работаем с чистыми материалами, ведь если в лейкоцитарную взвесь попадет хотя бы один эритроцит, содержание железа резко возрастет. Значит, сепарирование лейкоцитарной взвеси методом градиента плотности было сделано качественно.

Сигнал клеток, выращенных в присутствии ФЖ, существенно выше, чем образцы контроля. Для ФЖ_1 в супернатантах железа меньше, чем в самих биообразцах МНК. Это означает, что по какой-то причине НЧ задерживаются в биообразце. Так как клетки МНК, выращенные на питательной среде с ФЖ, в процессе пробоподготовки были тщательно от-

мыты от супернатанта, появляется вопрос о механизмах прикрепления НЧ к клеткам. Предположительно, они могут проникать внутрь клеток либо оседать на клеточной мембране. При этом, совершенно четко видно, что и в супернатантах остается железо – если привести общее содержание железа к 100%, то на супернатант будет приходиться 1:3 всего железа.

Обращаясь к биообразцам с ФЖ_2, можно сказать, что здесь ситуация обратная. Железа в биообразцах тоже достаточно много, но в супернатантах гораздо больше. Приводя общее содержание железа к 100%, опять получим примерное соотношение 1:3. Становится ясно, что в случае ФЖ_2 большая часть железа уходит в супернатант в процессе отмывки. То, что суммарные величины содержания железа «биообразец + супернатант» не равны, еще раз говорит о сложности пробоподготовки биообразца из-за неоднородности высыхания. Однако, приводя сумму полученных значений к 100%, можно выявить соотношения 3:1 и 1:3 для ФЖ_1 и ФЖ_2.

Таблица 4.12 – Результаты измерения элементного состава контрольных клеток культуры ММСК и клеток, выращенных в присутствии ФЖ_1, ФЖ_2, супернатанты – питательная среда, отмываемая от клеточных биообразцов после инкубации в присутствии ФЖ, ПДК – предельно допустимая концентрация железа в воде

№	Образец	Биообразцы	Супернатанты
	Содержание Fe в ММСК культуре, ppm		
1	Контроль	2	2
2	100ПДК ФЖ_1	2	95
3	100ПДК ФЖ_2	27	9

Результаты элементного состава для клеточной культуры ММСК вызывают вопросы. Хотя в процессе обработки клеток трипсином для перевода их в суспензию разрушаются межклеточные мостики, адгезионная структура клеток все же накладывает дополнительные сложности для однородного высыхания пленки образца для измерений. Для окончательного заключения необходимо провести дополнительные измерения, поскольку каждая клеточная культура имеет свои особенности процесса жизнедеятельности и взаимодействия с исследуемым наноматериалом и все измерения требуют статистического подхода.

Был подготовлен анализ полученных петель гистерезиса на биообразцах – культурах клеток крови (МНК) человека, выращенных в присутствии феррожидкостей типа ФЖ_1 и ФЖ_2. На рисунке 4.31 представлены полевые зависимости намагниченности биообразцов

культуры МНК. Видно, что контрольные образцы клеток без внесения ФЖ, выращенные в нормальных условиях, имеют самые низкие показатели. Далее по увеличению значения намагниченности расположены клетки с ФЖ_1, данные микроскопии подтверждают тот факт, что МНЧ из ФЖ_1 в образцах клеток очень мало. Образцы с ФЖ_2 имеют самые высокие показатели. Это связано, в первую очередь, с образованием полимерной сетки, на которую адсорбируются белковые соединения и к которой прикрепляются МНЧ. Данные подтверждены микрофотографиями просвечивающей электронной микроскопии (см. рисунок 4.28 – 4.30). Значение коэрцитивной силы мало, форма кривой намагниченности имеет S – образный вид, что может говорить о наличии суперпарамагнитных частиц в ансамбле, находящемся в биообразцах. О насыщении кривой намагниченности говорить сложно, поскольку мы имеем сильный диамагнитный сигнал от клеток, оказывающий влияние на угол кривой намагниченности в больших полях.

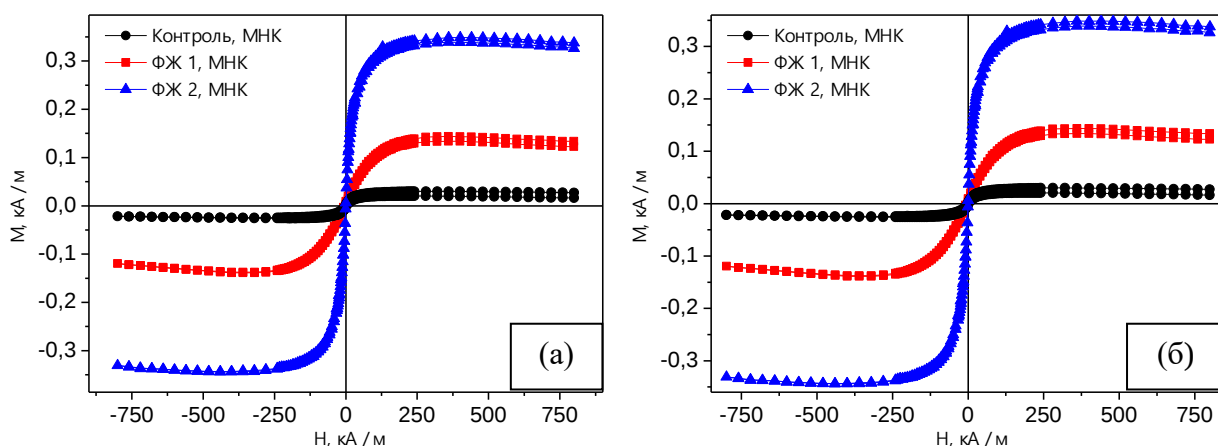


Рисунок 4.31 – а – Измерения петель гистерезиса $M(H)$ клеточной культуры МНК, выращенной в присутствии феррожидкостей типа ФЖ_1 и ФЖ_2, б – область малых полей

В таблицах 4.13 для клеток МНЧ и 4.14 для клеток ММСК представлены результаты оценки жизнеспособности при инкубации 24 часа. Культура МНК не сформировала биологического отклика на присутствие МНЧ оксида железа как в составе ФЖ_1, так и в составе ФЖ_2. Острая цитотоксичность не наблюдалась.

Результаты исследований токсичности партии О7 с помощью клеточной культуры МНК представлены в таблице 4.13. Видно, что клетки в присутствии МНЧ оксида железа не ингибируют, процесс жизнедеятельности не снизился, в некоторых случаях стал немного выше. По отношению к контролю видно, что результаты на том же уровне или чуть выше. В образцах с ФЖ_1 параметр жизнедеятельности несколько выше, чем у образцов с ФЖ_2. Однако при данном методе подсчета клеток данный разброс можно считать очень малым и им можно пренебречь. Таким образом, вплоть до концентрации оксида железа 1000ПДК

ФЖ_1, ФЖ_2 не оказывают значительного влияния на процессы жизнедеятельности клеточной культуры МНК.

Таблица 4.13 – Определение жизнеспособности МНК в течение 24 часов в присутствии МНЧ оксида железа. Т – общее количество клеток, L – живые, D – мертвые, V – жизнеспособность культуры

ФЖ_1 (Цитрат натрия)						ФЖ_2 (Хитозан)				
Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК		Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК
СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ										
2,38	2,25	2,34	2,68	2,45	T·10 ⁶	2,38	2,01	1,58	2,10	2,04
2,21	2,24	2,20	2,55	2,33	L·10 ⁶	2,21	1,90	1,45	2,03	1,95
17	10	12	13	12	D·10 ⁴	17	11	13	12	11
93%	96%	95%	95%	95%	V	93%	95%	92%	94%	95%

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки ткани человека

Клетки ММСК представляют собой адгезионную культуру, которая выращивается на подложках. Для исследования культуру переводят в суспензию, обрабатывая веществом трипсином, который разрушает углеводные мостики между клетками и подложкой. Микрофотографии ТЕМ клеточной культуры ММСК, а также образцов клеток ММСК, выращенных в присутствии ФЖ_1, ФЖ_2 представлены на рисунках 4.32 – 4.34.

На рисунке 4.33 мы видим очень интересное явление: МНЧ из ФЖ_1 аккумулируются в определенных органеллах, их наличие в биообразце подтверждается данными магнитных измерений кривой намагничивания (см. рисунок 4.35). Удивительно, что в данном случае не видно отдельных агрегатов МНЧ – все ансамбли, находящиеся в видимом поле микрофотографий, находятся внутри клеток, межклеточное пространство довольно чистое. На рисунке 4.34 полимерная сетка хитозана, имеющая такой же вид, как и сетка на рисунке 4.30, застилает межклеточное пространство, единичных МНЧ или их агрегатов внутри клетки не наблюдалось.

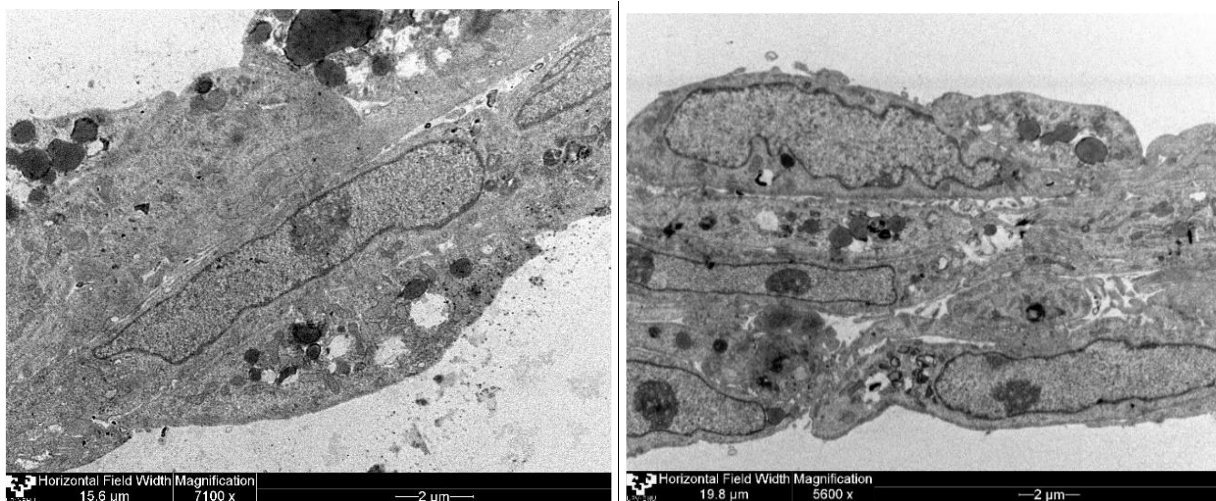


Рисунок 4.32 – Микрофотографии ТЕМ культуры клеток ММСК, контроль

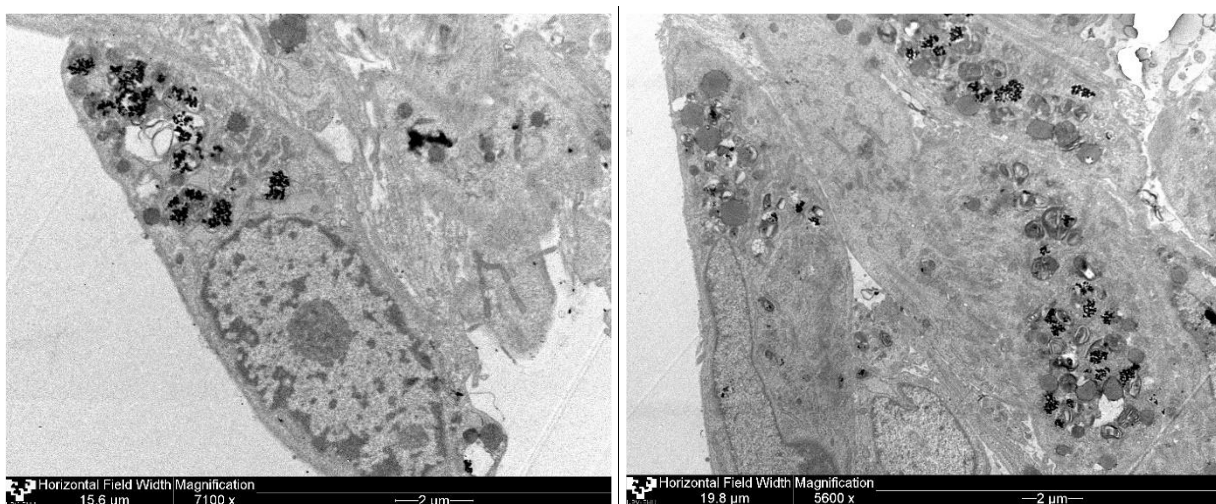


Рисунок 4.33 – Микрофотографии ТЕМ клеток ММСК в присутствии ФЖ_1, 24 часа

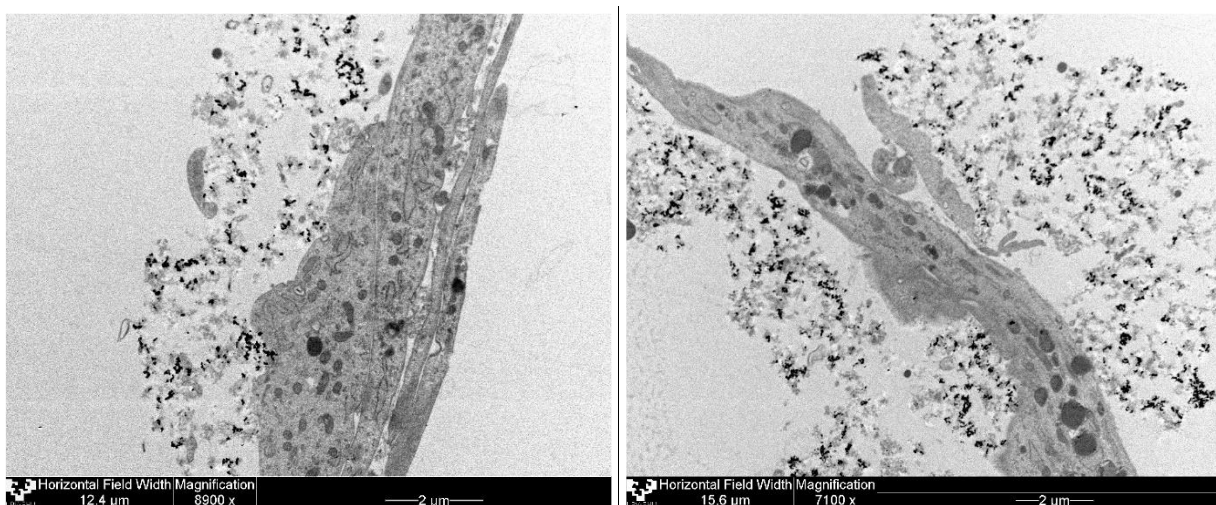


Рисунок 4.34 – Микрофотографии ТЕМ клеток ММСК в присутствии ФЖ_2, 24 часа

Был подготовлен анализ полученных петель гистерезиса на биообразцах – культувах клеток жировой ткани (ММСК) человека, выращенных в присутствии феррожидкостей типа ФЖ_1 и ФЖ_2. На рисунке 4.35 представлены полевые зависимости намагниченности биообразцов культуры ММСК. Тенденции поведения кривых намагниченности соответствуют поведению кривых на культуре МНК. Контрольный образец имеет слабый диамагнитный сигнал. Образцы с ФЖ_1 имеют сигнал, гораздо меньший, чем с ФЖ_2.

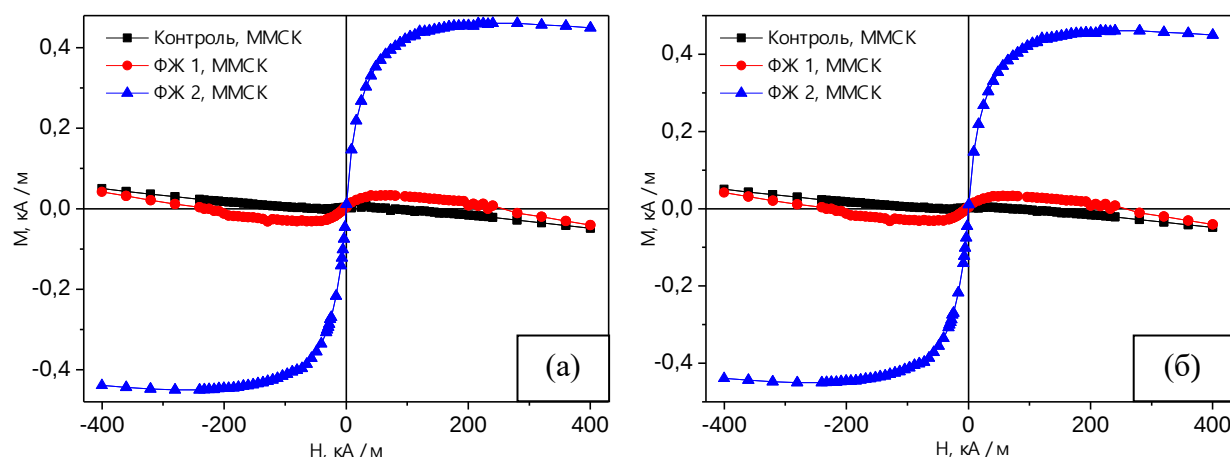


Рисунок 4.35 – а – Измерения петель гистерезиса клеточной культуры ММСК, выращенной в присутствии феррожидкостей типа ФЖ_1 и ФЖ_2, б – область малых полей

На первый взгляд это удивительно, поскольку по микрофотографиям ТЕМ ясно виден процесс накопления МНЧ из ФЖ_1 в определенных органеллах (см. рисунок 4.33). Но не стоит забывать и о том, что количество МНЧ из ФЖ_2, находящихся в полимерной сетке вокруг клеток ММСК, значительно превышает аккумулированные МНЧ из ФЖ_1, что видно на рисунках 4.33, 4.34. Значение коэрцитивной силы очень мало, форма кривой имеет s-образный вид, что может говорить о наличии очень мелких суперпарамагнитных частиц в ансамбле, находящемся в биообразцах.

В таблицах 4.14 - 4.16 представлены результаты нескольких инкубаций: в течение 24, 72 и 144 часов. В случае 24 часов не обнаружено заметное снижение жизнедеятельности у образцов обеих линий с ФЖ_1, ФЖ_2 1000ПДК. После 72 часов инкубации не наблюдается снижение параметра жизнеспособности по мере увеличения дозы внесенной ФЖ, клеточная культура восстановилась практически во всех случаях, кроме образца линии ФЖ_2 100ПДК, где параметр $V = 89\%$ (см. таблицу 4.15). Однако при сравнении с контролем значение удовлетворительное. Контрольная группа после 144 часов инкубации показывает значительное снижение жизнедеятельности на фоне абсолютно здоровых показателей культур, выращенных в присутствии МНЧ оксида железа. Образец линии ФЖ_2 10 ПДК

один имеет пониженное значение на уровне контрольной группы в 88 % жизнеспособности V после 144 часов инкубации (см. таблицу 4.16).

Таблица 4.14 – Определение жизнеспособности ММСК в течение 24 ч в присутствии МНЧ оксида железа. Т – общее количество клеток, L – живые, D – мертвые, V – жизнеспособность культуры

ФЖ_1 (Цитрат натрия)						ФЖ_2 (Хитозан)				
Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК		Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК
СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ										
0,434	0,359	0,376	0,453	0,358	$T \cdot 10^6$	0,434	0,361	0,348	0,316	0,330
0,433	0,356	0,373	0,450	0,356	$L \cdot 10^6$	0,433	0,360	0,346	0,313	0,326
1,3	2,3	2,3	3	2	$D \cdot 10^4$	1,3	1	2	3	3
97%	95%	94%	93%	89%	V	99,7%	96%	94%	91%	90%

Таблица 4.15 – Определение жизнеспособности ММСК в течение 72 ч в присутствии МНЧ оксида железа. Т – общее количество клеток, L – живые, D – мертвые, V – жизнеспособность культуры

ФЖ_1 (Цитрат натрия)						ФЖ_2 (Хитозан)				
Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК		Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК
СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ										
0,43	0,43	0,53	0,35	0,51	T·10 ⁶	0,43	0,40	0,49	0,48	0,45
0,40	0,39	0,50	0,32	0,48	L·10 ⁶	0,40	0,37	0,45	0,42	0,41
3	4	3	3	3	D·10 ⁴	3	3	4	6	4
93%	91%	94%	92%	94%	V	93%	92%	92%	89%	92%

Таблица 4.16 – Определение жизнеспособности ММСК в течение 144 ч в присутствии МНЧ оксида железа. Т – общее количество клеток, L – живые, D – мертвые, V – жизнеспособность культуры

ФЖ_1 (Цитрат натрия)						ФЖ_2 (Хитозан)				
Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК		Кон- троль	2,3 ПДК	10 ПДК	100 ПДК	1000 ПДК
СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ										
0,59	0,53	0,35	0,62	0,31	T·10 ⁶	0,59	0,46	0,41	0,51	0,40
0,52	0,45	0,33	0,58	0,29	L·10 ⁶	0,52	0,43	0,36	0,47	0,37
7	4	3	4	2	D·10 ⁴	7	3	5	4	3
88%	93%	91%	94%	94%	V	88%	93%	88%	92%	93%

В целом, результаты проведенного исследования говорят о том, что при внесении в питательную среду суспензионных и адгезионных клеток острая токсичность не наблюдается, несколько сниженное значение жизнедеятельности восстанавливается практически полностью через 144 часа. Данные ТЕМ подтвердили нормальное состояние и морфологию клеточной культуры, а также выявили интересные моменты в изучении механизмов аккумуляции МНЧ в определенных органеллах в случае ММСК и ФЖ_1 и механизма защиты от МНЧ в случае культуры МНК при внесении ФЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения выпускной квалификационной работы были аттестованы 7 партий МНЧ оксидов железа, полученные методом лазерного испарения. Варьирование давления газа в рабочей камере, длительности импульса лазерного излучения, средней мощности и типа рабочего газа позволило получить материалы с различной стехиометрией в интервале от $\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$ до $\text{Fe}_{2.84}\text{O}_4$, при средних размерах от 10 до 23 нм. Например, партия О2 при меньших параметрах синтеза имеет среднечисленный размер 10 нм, удельная поверхность 108 $\text{м}^2/\text{г}$, а партия О3 при больших параметрах имеет среднечисленный размер 23 нм, удельная поверхность 45 $\text{м}^2/\text{г}$. На основе синтезированных нанопорошков были приготовлены электростатически и стерически стабилизированные ФЖ. Отработана методика получения стерически стабилизированной феррожидкости ФЖ_2, концентрация до 2 г/л. Исследована динамика диспергирования ФЖ_1, в общем случае достаточная длительность обработки не превышает 15-30 минут.

МНЧ и ФЖ прошли аттестацию с помощью различных методов. Методом РФА была определена кристаллическая структура порошков - обратная шпинель. НЧ в составе стабилизированных ФЖ представляют собой ансамбль суперпарамагнитных и ферромагнитных частиц. Сферичность и существование только одной магнитной фазы подтверждены данными ферромагнитного резонанса. ФЖ на основе НЧ оксида железа обладают свойством магнитоиндукционного нагрева в слабых полях 1,8 кА/м и частотах 214 кГц до 2 Вт/г. Достаточно высокая намагниченность насыщения, 130-325 кА/м для НЧ и 110-227 кА/м для ФЖ, и небольшой размер МНЧ партий до 30 нм обуславливают перспективность материала для разработки на его основе биотехнологических приложений. Клетки крови и жировой ткани человека слабо реагируют на повышенное содержание железа в виде МНЧ оксида железа в питательной среде. Выявлены различия в процессе аккумуляции НЧ из ФЖ, стабилизированной с добавлением (ФЖ_2) и без полимера хитозана (ФЖ_1). Знание механизмов взаимодействия между клеткой и МНЧ позволит создать более эффективные биотехнологические приложения.

Вышеперечисленные свойства в сочетании с хорошей биосовместимостью свидетельствуют о положительной оценке перспектив применения стабилизированных ФЖ на основе МНЧ оксида железа, полученных методом лазерного испарения. Результаты позволяют предложить способы синтеза и составы ФЖ, удобных для использования в разработке современных эффективных препаратов, применяемых в локальной магнитно-жидкостной гипертермии, термоабляции, адресной доставке лекарств и магнитном биодетектировании, магниторезонансной и ультразвуковой диагностике.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Старчиков С. С. Магнитные, структурные и электронные свойства наночастиц сульфидов и оксидов железа с различной кристаллической структурой : дисс... кандидата физико-математических наук / ФГБУ НИК им. А. В. Шубникова. - Москва, 2015. - 159 с.
- 2 Leslie-pelecky D. L., Rieke R. D. Magnetic Properties of Nanostructured Materials. - 1996. - Vol. 4756, № 96. - P. 1770-1783.
- 3 Skomski R. Nanomagnetism // J. Phys. Condens. Matter. - 2003. - Vol. 15. - P. 841-896.
- 4 Ruiz A. et al. Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents // Acta Biomater. - 2013. - № 9. - P. 6421-6430.
- 5 Mathur B. S. et al. Phase Selective Deposition and Microstructure Control in Iron Oxide Films Obtained by Single-Source // Chem.Vap. Deposition. - 2002. - P. 277-283.
- 6 Hyeon T. et al. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process // J. Am. Chem. Soc. - 2001. - № 8. - P. 12798-12801.
- 7 Prozorov T. et al. Effect of surfactant concentration on the size of coated ferromagnetic nanoparticles // Thin Solid Films - 1999. - Vol. 340. - P. 189-193.
- 8 Murray C. B. et al. Monodisperse 3d (Co, Ni, Fe) Nanoparticles and Their Assembly into Nanoparticle // MRS Bulletin. - 2001. - December. - P. 985-991.
- 9 Liu C. et al. Reverse Micelle Synthesis and Characterization of Superparamagnetic MnFe_2O_4 Spinel Ferrite Nanocrystallites // J. Phys. Chem. B. - 2000. - Vol. 104, № 6. - P. 5-9.
- 10 Petit C., Pileni M. P. Physical properties of self-assembled nanosized cobalt particles // Applied Surface Science. - 2000. Vol. 162-163. - P. 519-528.
- 11 Bose P. et al. X -ray characterization of nanocrystalline Ni_3Fe // Journal of Alloys and Compounds. - 2002. - Vol. 343. - P. 192-198.
- 12 Khomutov G. B. et al. Formation and organization of planar polymeric and nanocomposite nanostructures on liquid and solid surfaces // Surface Science. - 2004. - Vol. 566-568. P. 396-401.
- 13 Li X. G., Chiba A., Takahashp S. Preparation, oxidation and magnetic properties of Fe-Cr ultrafine powders by hydrogen plasma-metal reaction // J. Magn. Magn. Mater. - 1997. - Vol. 173. - P. 101-108.
- 14 Fendrych F., Kraus L., Chayka O. Preparation of Nanostructured Magnetic Films by the Plasma Jet Technique // Nanostructured Materials. - Wien, 2002. - P. 37-48.
- 15 Пархоменко В. Д., Сорока П. И., и др. Плазмохимическая технология. - Новосибирск : Наука. Сибирское отделение. - 1991. - 392 с.
- 16 Толбанова Л. О. Методы получения наноматериалов, их структура и свойства // Л. О. Толбанова. - Курс лекций "Методы получения наноматериалов". НИТПУ, 2010. - 79 с.

- 17 Jamet M. et al. Magnetic Anisotropy of a Single Cobalt Nanocluster // Physical Review Letters. - 2001. - № 111. - P. 2-5.
- 18 Berkowitz A. E., Walter J. L. Ferrofluids prepared by spark erosion // J. Magn. Magn. Mater. - 1983. - Vol. 39. - P. 75-78.
- 19 Becker J. A., Schafer R., Festag J. R. et al. Magnetic properties of Cobalt-cluster dispersions generated in an electrochemical cell // Surf. Rev. Lett. - 1996. - Vol. 3, № 1. - P. 1121-1126.
- 20 Pascal C., Pascal J. L., Favier F. Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior // Chem. Mater. - 1999. - Vol. 11. - P. 141-147.
- 21 Kurland H. et al. Magnetic Iron Oxide Nanopowders Produced by CO₂ Laser Evaporation // J. Magn. Magn. Mater. - 2007. - Vol. 311. - P. 73-77.
- 22 Lanotte L., Ausanio G., Barone A. C. et al. Peculiarities and potentialities of ultra-short pulsed laser deposition for the production of magnetic nanogranular films // J. Optoelectron. Adv. Mater. - 2006. - Vol. 8, № 5. - P. 1672-1678.
- 23 Осипов В.В. et al. Лазерный синтез нанопорошков магнитных оксидов железа // Журнал технической физики. - 2012. - Вып. 4. - P. 1-7.
- 24 Safronov A.P. et al. Spherical magnetic nanoparticles fabricated by laser target evaporation // AIP Adv. - 2013. - Vol. 3. - P. 052135.
- 25 Kurlyandskaya G. V et al. Spherical magnetic nanoparticles fabricated by electric explosion of wire // AIP Adv. - 2011. - Vol. 1. - P. 042122.
- 26 Beketov I. V. et al. Iron oxide nanoparticles fabricated by electric explosion of wire: Focus on magnetic nanofluids // AIP Adv. - 2012. - Vol. 2, № 2. - P. 1-24.
- 27 Laurent S. et al. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles // Adv. Colloid Interface Sci. Elsevier B.V. - 2011. - Vol. 166, № 1-2. - P. 8-23.
- 28 Reddy L.H. et al. Magnetic Nanoparticles : Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications // Chem. Rev. - 2012. - Vol. 112. - P. 5818-5878.
- 29 Rosensweig R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field // J. Magn. Magn. Mater. - 2002. - Vol. 252. - P. 370-374.
- 30 Alonso J. et al. Superparamagnetic nanoparticles encapsulated in lipid vesicles for advanced magnetic hyperthermia and biodetection // J. Applied Physics. - 2016. - Vol. 119. - P. 083904
- 31 Lartigue L. et al. Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents // ASC Nano. - Vol 2012. - Vol. 6, №12. - P. 10935-10949.
- 32 Guardia P. et al. Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption

- Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment // ASC Nano. - 2012. - Vol. 6, № 4. - P. 3080-3091.
- 33 Lee J. et al. Exchange-Coupled Magnetic Nanoparticles for Efficient Heat Induction // Macmillan Publishers Limited. - 2011. - 16 p.
- 34 Zhang Y., Zhai Y. Magnetic Induction Heating of Nano-Sized Ferrite Particle // Adv. Induction Microw. Heat. Miner. Org. Mater. - 2011. - № 1. - P. 483-500.
- 35 Berry C. C., Curtis A. S. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys. - 2003. - Vol. 36. - P. 198-206.
- 36 Вячеславов А. С. Померанцева Е. А. Измерение площади поверхности и пористости методом капиллярной конденсации азота / А. С. Вячеславов, Е. А. Померанцева Методическая разработка МГУ им. М.В. Ломоносова. - Москва, 2006. - 55 с.
- 37 Сивухин Д.В. Общий курс физики. Т. IV. Оптика / Д. В. Сивухин. - 3-е изд., стереот. - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2005. - 792 с.
- 38 Magnetic Property Measurement System : Hardware Reference Manual / Quantum Design - San Diego, 1996. - 82 p.
- 39 Vonsovskii S. V. Ferromagnetic resonance. The phenomenon of resonant absorption of a high-frequency magnetic field in ferromagnetic substances ; [Translator H.S.H. Massey, Translation edited by D. TER Haar]. - Oxford : Pergamon Press, 1966. - 326 p.
- 40 Bhagat S. M. Ferromagnetic Resonance // ACM Handb. - 1986. - Vol. 10. - 267-276.
- 41 Kurlyandskaya G. V et al. Microwave resonant and zero-field absorption study of pure and doped ferrite nanoparticles // J. Phys. Chem. Solids. - Elsevier, 2011. - Vol. 72, № 4. - P. 276-285.
- 42 Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. - 1968. - Vol. 97. - P. 1-7.
- 43 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. СанПиН 2.1.4.1074-01 : Постановление от 26 сентября 2001 г №24 "О введении в действие санитарных правил" / Министерство здравоохранения российской федерации. - Москва, 2001. - 125 с.
- 44 Kale S., Bhagat S. M., Lofland S. E. et al. Film thickness and temperature dependence of the magnetic properties of pulsed-laser-deposited Fe_3O_4 films on different substrates // Phys. Rev. B. - 2001. - Vol. 64. - P. 1-9.