

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Филиал Московского государственного университета
имени М.В.Ломоносова в г. Душанбе

Химический факультет

*Кафедра высокомолекулярных соединений
Лаборатория нанобиоструктур*

Естественнонаучный факультет
Направление подготовки 04.03.02 - *Химия, физика и механика материалов*

Выпускная квалификационная работа бакалавра

**Тема: «Магнитные композиты на основе гиалуроновой
кислоты и наночастиц маггемита, наполненные
доксорубицином»**

Выпускная квалификационная
работа по химии ВМС
студентки 4^{го} курса направления
«Химия, физика и механика
материалов» филиала МГУ в городе
Душанбе Зоирова З.
Научный руководитель к.х.н., доцент
Спиридонов В.В.

Москва – Душанбе 2020 г.

Оглавление

Список условных обозначений.....	2
Введение	3
Глава 1. Литературный обзор.....	7
1.1 Магнитные наночастицы	7
1.1.1 Маггемит	9
1.1.2 Методы получения маггемита	10
1.2 Соль Мора.....	12
1.2.1 Способы получения соли Мора.....	12
1.3 Полианион: гиалуроновая кислота.....	13
1.3.1 Взаимодействие гиалуроновой кислоты с лекарственными препаратами.....	14
1.4 Доксорубин	16
1.4.1 Фармакологическое действие - противоопухолевое.....	16
Глава 2. Экспериментальная часть.....	19
2.1 Получение нанокомпозитов.....	19
2.2. Получение трёхкомпонентных композитов Na- гиалуронат–маггемит–DOX	19
2.3 Основные методы исследования.....	20
Глава 3. Обсуждение результатов.....	26
3.1 Получение композитов	26
3.2 Основные методы исследования нанокомпозита.....	27
3.2.1 Определение содержания железа	28
3.2.3 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	31
3.2.4 Рентгенофазовый анализ.....	33
3.2.5 Мёссбауэровская спектроскопия.....	34
3.2.6 Исследование магнитных композитов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).....	35
3.2.7 Динамическое рассеяние света	37
Глава 4. Изучение взаимодействия нанокомпозита с доксорубином.....	39
4.1 Флуориметрия	39
Выводы.....	46
Список литературы	47

Список условных обозначений

Докс - Доксорубицин

СЭМ - сканирующий электронный микроскоп

ПЭМ - просвечивающий электронный микроскоп

ДРС - динамическое рассеяние света

РФА - рентгенофазовый анализ

РСМА – рентгеноспектральный микроанализ

ЭФП – электрофоретическая подвижность

Введение

В настоящее время адресная доставка лекарственных препаратов— это один из наиболее эффективных способов терапии различных заболеваний, например, болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда, а также онкологии различных типов. Главным достоинством адресной доставки является концентрирование лекарственного препарата в необходимом органе или живой ткани. В результате может быть достигнут эффект уменьшения дозы, отсутствие рассеивания лекарства по организму, устранение побочных явлений от воздействия терапевтических средств на здоровые клетки.

Предварительным шагом адресной доставки лекарственного препарата является его иммобилизация. В настоящей работе для иммобилизации терапевтического противоопухолевого средства использовался композит на основе гиалуроновой кислоты, содержащий магнитные наночастицы. Преимуществом данного композита является высокая коллоидная стабильность, а также магниточувствительность.

Модификация полимерных носителей магнитными наночастицами оксида железа представляет большой интерес для медицины и биотехнологии. Полимерные композиты, функционализированные таким образом, находят применение в качестве контрастирующих агентов для исследований методом магниторезонансной томографии; препаратов для гипертермической обработки патологических очагов в организме; магнитной составляющей композиций для целенаправленной доставки лекарств. Особое место среди полимерных композитов, модифицированных магнитными наночастицами, занимают системы на основе магнетита и маггемита. Материалы, содержащие подобные магнитные наночастицы, демонстрируют высокую магнитную восприимчивость. Кроме того, существенным преимуществом указанных магнитных наночастиц является низкая токсичность, что делает их привлекательными для использования в биомедицинских приложениях.

Цель и задачи.

Целью настоящей работы является получение наноконтейнеров на основе природного полимера гиалуроновой кислоты и магнитных наночастиц, а также разработка способа иммобилизации противоопухолевого препарата, доксорубицина, в магниточувствительные нанокомпозиты.

Задачами научного исследования являются:

- синтез нанокомпозитов на основе гиалуроновой кислоты (натриевой соли) с различным содержанием магнитной фазы;
- определение содержания, природы образующихся наночастиц, а также морфологии формирующихся нанокомпозитов;
- изучение магнитных свойств синтезированных нанокомпозитов в зависимости от содержания магнитной фазы;
- определение агрегативной стабильности синтезированных магнитных нанокомпозитов посредством изучения их гидродинамических и электрокинетических характеристик в водном растворе;
- получение и характеристика тройных систем на основе гиалуроновой кислоты (натриевой соли), магнитных наночастиц, а также иммобилизованного доксорубицина;

Теоретическая и практическая значимость работы. В настоящей бакалаврской работе предложен способ синтеза нанокомпозитов на основе биосовместимого природного полисахарида, гиалуроновой кислоты, обладающих уникальными магнитными и физико-химическими свойствами. Также продемонстрирована возможность иммобилизации противоопухолевого препарата доксорубицина в полученные магнитные композиты. Полученные тройные системы могут найти применение для адресной противоопухолевой терапии.

Степень достоверности результатов подтверждается современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам, достаточным количеством наблюдений и сходимостью полученных различными методами результатов, их соответствие известным теоретическим представлениям о подобных соединениях. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в работе, подкреплены убедительными экспериментальными и литературными данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках.

Личный вклад автора. В данной работе представлены результаты исследований, выполненных лично автором под руководством к.х.н., доц. В.В. Спиридонова.

Объём и структура работы. Работа изложена на 49 страницах. Работа состоит из списка условных обозначений, введения, четырёх глав, выводов и списка литературы.

Во введении обоснована актуальность темы работы, сформулированы цели и основные задачи исследования.

В первой главе даются основные понятия о гиалуроновой кислоте. Приводятся основные структуры молекул, получение и их основные свойства.

Вторая глава посвящена описанию методы синтеза и подтверждению строения объектов исследования, описанию методов исследования, обработке данных физико-химических экспериментов, оценке их достоверности.

Третья глава посвящена обсуждению полученных результатов. Приведенные все результаты в виде таблицы, а также в виде графиков.

Четвёртая глава посвящена взаимодействию нанокompозита с лекарственным препаратом доксорубицином. Приведены все результаты в виде рисунков, графиков и таблиц.

Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н., доценту В. В. Спиридонову, под руководством которого выполнялась данная работа. Автор благодарен всем сотрудникам кафедры высокомолекулярных соединений, а также д.х.н. А.В. Кнотько оказавших практическую помощь и давших ценные советы в ходе выполнения данной работы.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Магнитные наночастицы

Магнитные полимерные нанокомпозиты представляют собой материалы на основе полимерной матрицы, в которую включены неорганические магнитные частицы, волокна или слоистые частицы, имеющие нанометровые размеры (1–100 нм) как минимум в одном измерении. Основной целью создания таких нанокомпозитов является совмещение нескольких компонентов с их особыми свойствами в одном материале. Благодаря синергическому эффекту входящих в них органических и неорганических компонентов, магнитные полимерные нанокомпозиты обладают уникальными характеристиками, которых невозможно достигнуть в только органическом либо только неорганическом материале. Частицы магнитного компонента имеют нанометровые размеры, поэтому их свойства качественно отличаются от основного материала и зависят от размера частиц. Полимерное связующее обеспечивает хорошую обрабатываемость данных материалов, а также хорошие механические, оптические и электрические свойства. Межфазовые взаимодействия полимера с магнитным наполнителем обеспечивают материалу уникальные магнитные свойства, а способность полимера к структурированию позволяет контролировать магнитные взаимодействия между частицами наполнителя. Таким образом, магнитные полимерные нанокомпозиты являются весьма перспективными материалами для направленного регулирования магнитных характеристик: создания многофункциональных материалов, а также для получения материалов с уникальным комплексом свойств. Для получения магнитного нанокомпозита необходима стабилизация магнитных наночастиц маггемита. Оптимальным материалом для стабилизации должна быть немагнитная диэлектрическая матрица с регулярно распределенными в ней стабилизируемыми частицами.

В магнитных нанокомпозитах полимер может выполнять несколько функций:

- матрицы для контроля размера, формы и распределения магнитных частиц;
- защитного покрытия от воздействий окружающей среды, изолятора, сепаратора или связующего, увеличивающего компактность;
- для придания магнитному материалу механических свойств и пригодности к механической обработке;

– функционального компонента благодаря своим оптическим, электрическим или химическим свойствам, увеличивающим характеристики магнитного компонента либо создающего новые свойства в результате взаимодействий с магнитным компонентом.

Кроме того, присутствие полимеров позволяет осуществлять литье, формование и структурирование неорганических магнитных материалов. Таким образом, область применения магнитных нанокомпозитов охватывает множество областей, связанных: с наномagnetизмом. Структурированные носители информации, магниторезистивная память с произвольной выборкой (МППВ) и магнитные сенсоры производятся, как правило, с использованием полимеров (как на промежуточных стадиях, так и в конечном продукте). Магнитные нанокомпозиты являются одним из основных кандидатов для изготовления структурированных носителей информации ультравысокой плотности записи. В биомедицине наблюдается наиболее активная реализация результатов исследований, и на практике оправдываются ожидания, возлагаемые на магнитные нанокомпозитные материалы. Первоначально в биомедицине магнитные нанокомпозиты использовались для изготовления контрастных веществ для использования в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Это позволило увеличить эффективность диагностики, например, для лимфатического метастазирования с 60% до 94% (благодаря использованию наночастиц). Сегодня магнитные нанокомпозиты применяются во многих областях: как наноносители для точной направленной доставки лекарственных средств в организме, в диагностике, иммуноанализе, молекулярной биологии, очищении ДНК, для отделения и очистки клеток, а также для гипертермической терапии. Другими сферами использования магнитных феррожидкостей являются: магнитные чернила, уплотнительные магнитные сальники вращающихся валов механизмов, микрофоны, жидкостные системы энергопоглощения, магнитные сенсоры и т. д. Развивается их применение в радиоэлектронике, микроэлектро-механических системах (МЭМС) и фотосистемах нового поколения. Также большой интерес представляют технологии, позволяющие производить магнитное охлаждение и рентгеновские переключатели. Помимо этого, полимерные нанокомпозиты используются как промежуточные материалы для производства наноструктурированных неорганических магнитных материалов, таких как структурированные магнитные носители информации, мезопористые магнитные керамические материалы и магнитные полые сферы. Кроме того, магнитные полимерные нанокомпозиты представляют интерес в плане изучения магнетизма и для других научных областей, таких как изучение

возникновения и развития жизни на Земле, космической и геологической истории планеты. Оксиды железа в природе встречаются обычно именно в форме наночастиц. Изучение их магнитных свойств является важным инструментом для изучения геологической эволюции. Например, одним из подтверждений возможности существования жизни на других планетах становится нахождение в метеорите с Марса наночастиц магнетита, очень схожих с теми, что производятся магнитотаксисными бактериями. Изучение магнитных свойств породы дает информацию о процессах формирования осадочных пород, дна океана, почво- и горообразования. Также магнитные наночастицы оксида железа производятся животными, которые используют их для ориентации в пространстве по магнитному полю Земли (бактерии, морские угри, форель, голуби, дельфины, морские черепахи и др.). Они также служат для создания запаса железа в организме млекопитающих, и их формирование может нарушаться вследствие заболеваний (болезнь Альцгеймера).

Магнитные оксиды железа могут быть использованы в качестве магнитных детекторов, наполнителей, покрытий и магнитной среды в различных композитах. Также они находят применение как магнитные носители в электронной промышленности для создания магнитных сопротивлений, триггерных и запоминающих устройств, как звуконосители в малошумных магнитных лентах, в качестве компонентов в магнитных чернилах, тонерах, пигментах и красках для принтеров, в типографской промышленности, для изготовления красящих плёнок на банковских магнитных картах и других отраслях производства, где требуется вещества с магнитной упорядоченностью и высокой дисперсностью [1,2].

1.1.1 Маггемит

Маггемит, или $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – ферримагнитный, который обладает сильным магнетизмом и высокой остаточной намагниченностью. Маггемит неустойчив: при повышении температуры он теряет свои магнитные свойства и превращается в гематит $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (при нагревании они образуют метастабильный магнитный твердый раствор).

Известно, что железо образует несколько оксидов, среди которых Fe_3O_4 (магнетит) и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (маггемит) обладают магнитными свойствами. Магнетит легко образуется и даже существует в природе, в то время как для получения маггемита требуются специальные условия. Окисление железа на воздухе, как правило, сопровождается формированием немагнитной фазы $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$,

устойчив в широком температурном интервале, и оксо/гидроксо-форм, также не проявляющих ферромагнитных свойств [3].

1.1.2 Методы получения маггемита

Существует целый ряд методов получения маггемита. Так, известен способ получения $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ методом окисления порошка металлического железа при в температурном интервале 200–400°C в атмосфере, содержащей 5–20% кислорода. Общим недостатком этого метода является многостадийность синтеза, включающего необходимость получения промежуточного высокодисперсного карбонильного порошка металлического железа из токсичного $\text{Fe}(\text{CO})_5$.

Описано получение магнитного оксида железа (III) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ окислением стеарата железа метилморфолин-N-оксидом в присутствии ПАВ при выдерживании в растворителе в течение нескольких часов при температуре 280–320°C [4]. Указанным метод чрезвычайно сложен, требует предварительного получения стеарата железа и использования специальных органических веществ. Кроме того, к недостаткам можно отнести необходимость высокотемпературной обработки и значительную продолжительность синтеза [5].

Известен метод получения магнитной $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ из солей железа (III) в растворе, содержащем органические амиды или гидразиды. Недостатком метода является использование микроволнового излучения и повышенной температуры, необходимых для получения устойчивой пены.

Магнитный порошок на основе $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ получали также дегидратацией FeOON при 250–350°C. Метод, однако, требует специальных условий, ограничивающих его использование. Так, например, осаждение FeOON проводят в атмосфере азота в среде органического растворителя (метилового спирта). Кроме того, дегидратация оксогидроксида железа происходит при повышенной температуре (250–350°C), в результате чего образуется примесь магнетита, что требует дополнительной стадии доокисления продукта.

Известен способ получения $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ из водных растворов FeCl_3 путём осаждения едким натром гидроксида железа (III) в присутствии полиэтиленгликоля как стабилизатора. Существенным недостатком этого способа является необходимость проведения многочисленных процедур, включающих фильтрование, высушивание осадка, прокаливание в течение

нескольких часов при температуре 300–400°C, последующее промывание водой и т.п.

Известен способ получения тонкодисперсного порошка $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ из водных растворов путём осаждения гидроксидов железа едким натром в присутствии NH_4OH с последующим формированием геля в среде метанола и нагреванием в автоклаве [6,7]. Недостатком этого способа является использование высокотоксичного органического растворителя и аппаратуры высокого давления.

Известен способ получения магнитной $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ из водного щелочного раствора путём обработки солей двухвалентного железа едким натром в присутствии гидразингидрата с последующим выдерживанием смеси в автоклаве при 100–200°C в течении 5 часов и обработкой интермедиата (Fe_3O_4) пероксидом водорода [8, 9]. Существенными недостатками данного способа является его многостадийность, проведение гидротермической реакции в автоклаве при повышенной температуре (100–200°C), а также неколичественный выход целевого продукта за счёт образования примесной фазы магнетита, что требует дополнительной обработки сильным окислителем.

Также предложен способ получения магнитоупорядоченного оксида железа (III), маггемита, в высокодисперсном состоянии отличающийся тем, что осаждения магнитной фазы $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ проводят в присутствии воздуха при комнатной температуре и атмосферном давлении из щелочных (pH 9–10) водных растворов солей железа (II), циклодекстринов и солей фосфорноватистой кислоты в молярном отношении $\beta\text{-ЦД:Fe(II):NaH}_2\text{PO}_2 = 1:100:100$ в течении 24 часов. В качестве источника ионов железа (II) в рамках способа взята соль Мора [10].

Лиганд-защищенные наночастицы металлов и их оксидов– интенсивно развиваемая в последние годы область физикохимии и материаловедения наноразмерного состояния. Структурная организация таких наноразмерных частиц– серьёзнейшая проблема, без решения которой трудно определить и оптимизировать область их практического использования. Стерическая стабилизация наночастиц полимерами рассматривается как экранирование защитным коллоидом. Она создается благодаря тому, что пространственные размеры даже сравнительно низкомолекулярных полимеров сопоставимы с радиусом действия сил притяжения или превышает его. Необходимость повышения устойчивости нанокомпозитов и контроля за обратимыми переходами в таких системах привлекает все более пристальное внимание к

поиску путей уравнивания их морфологией, структурной организацией и архитектурой [11].

Взаимодействие защитного полимера с наночастицами осуществляется двумя принципиально различными способами: путём физической (процессы, обусловленные силами Ван-дер-Ваальса, дипольными взаимодействиями или слабыми, легко разрушающимися водородными силами) или химической адсорбции. Нековалентное взаимодействие наночастиц с макромолекулой весьма слабо (порядка 10^{-4} Дж/м²); в случае хемосорбции эффективность такого взаимодействия определяется числом полярных групп адсорбированного полимера на единице поверхности независимо от формы макромолекул – развернутой или глобулярной. Разумеется, при этом важно не только присутствие в полимере определенных функциональных групп, но и их интенсивное взаимодействие с поверхностными атомами наночастицы, например, в качестве доноров электронов. Исходя из видимых преимуществ, таких как доступность исходных материалов и технологическая легкость синтеза, с целью получения нанокomпозиционного материала за основу взяли эту методику [12].

1.2 Соль Мора

Соль Мора, или $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – это двойной сернокислой солью закиси железа и аммония; данное соединение представляет собой искусственный аналог минерала морита.

Кристаллическая структура соли Мора– характеризуется решёткой моноклинной сингонии. Также следует отметить высокую растворимость соли Мора в воде. В кислой среде способна растворяться практически в любых соотношениях. При нагревании кристаллы обезвоживаются, цвет постепенно тускнеет, и они превращаются в бледно-зеленый порошок [13, 14]. Соль Мора применяется в медицине, а также используется в аналитической химии как восстановитель. Существенно, что в ряде методик для синтеза магнитоупорядоченного маггемита в высокодисперсном состоянии соль Мора является единственным источником ионов железа (II).

1.2.1 Способы получения соли Мора

Известно несколько способов получения соли Мора. Сущность одного из них заключается в том, что при поляризации электронов железо-титан в сернокислом растворе промышленным переменным током в анодном периоде переменного тока железо окисляется с образованием двухвалентных ионов, которые в приэлектродном пространстве соединяются с сульфат-ионами с последующим образованием сульфата железа (II). При этом титановый

электрод находится в катодном полупериоде и на нем происходит разряд ионов водорода. В том случае, когда железный электрод находится в катодном полупериоде переменного тока, титановый электрод находится в анодном и на его поверхности сразу же образуется оксидная пленка, обладающая вентильными свойствами. В этой связи в электрохимической цепи протекание тока прекращается. После электролиза в электролит сразу же добавляют раствор сульфата аммония, при этом в растворе формируется соль Мора [15].

Есть и другой способ получения соли Мора, больше подходящий для воспроизведения в лабораторных условиях. Соль получают прямым синтезом из компонентов сульфата железа и сульфата аммония. Сущность способа заключается в следующем: растворяют отдельно сульфат железа и сульфат аммония в воде. Оба раствора нагревают до 60–70°C, сливают вместе в фарфоровую чашку и, подкислив концентрированной серной кислотой, охлаждают при непрерывном перемешивании. Выпавшие кристаллы соли Мора отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают 50% раствором этилового спирта, отжимают между листами фильтровальной бумаги и сушат [16]. Основным недостатком данного способа является использование в качестве исходного железосодержащего реагента неустойчивого на воздухе (в связи с чем требующего особых условий хранения), дорогостоящего и дефицитного сульфата железа (II). К недостаткам можно отнести и высокую температуру проведения синтеза 60–70°C, что в целом удорожает процесс синтеза соли Мора.

1.3 Полианион: гиалуроновая кислота

Гиалуроновая кислота - линейный полисахарид, состоящий из чередующихся частей β-1,4-D-глюкуроновой кислоты-β-1,3-N-ацетил-D-глюкозамин

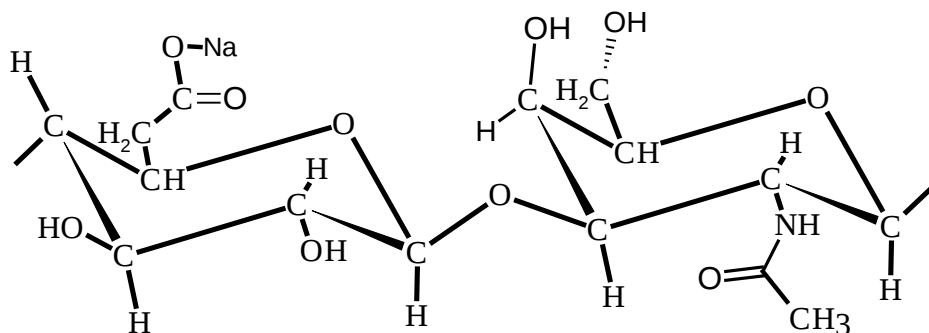


Рисунок 1. Фрагмент макромолекулы гиалуроновой кислоты (натриевая соль).

Молекула гиалуроновой кислоты может содержать до 25000 таких дисахаридных звеньев. Природная гиалуроновая кислота имеет молекулярную массу от 5000 до 20 000 000 Да [17].

Благодаря наличию в молекуле гидрофобных и гидрофильных участков, высокомолекулярная гиалуроновая кислота в растворе приобретает пространственную структуру в виде закрученной ленты. Цепи, находясь в постоянном движении, образуют в трехмерном пространстве рыхлый клубок, состоящий из петель (доменов) разной величины. Являясь по строению полианионом, молекула гиалуроновой кислоты способна связывать и удерживать большое количество молекул воды за счёт образования водородных связей.

В организме человека гиалуроновая кислота встречается повсеместно, являясь одним из основных компонентов межклеточного вещества. В наибольшей концентрации она содержится в коже, стекловидном теле глаза, синовиальной жидкости, хрящевой ткани и пупочном канатике.

В коже находится более чем 50% гиалуроновой кислоты, содержащейся в теле человека. Учитывая, что кожа на 70% состоит из воды и быстро обновляется, гиалуроновая кислота жизненно важна для ее структуры и ежедневного обслуживания. Она постоянно вовлекается в клеточное возобновление и восстановление. Поэтому живые ткани, содержащие значительное количество ГК, насыщены водой, что обеспечивает упругость и устойчивость к внешнему воздействию, например, кожных покровов. По сравнению с другими распространенными увлажнителями гиалуроновая кислота имеет ряд преимуществ. Гиалуроновая кислота имеет самую высокую гигроскопичность (способность связывать воду) по сравнению с другими распространенными увлажняющими агентами, такими, как глицерин и сорбитол. При этом, в отличие от глицерина, она сохраняет свою активность в сухой атмосфере [18].

Из-за универсальных биологических свойств и удивительных вязкоупругих свойств гиалуроновая кислота и высоко-, и умеренно-, и низкомолекулярной массы нашла многочисленное применение в медицине.

1.3.1 Взаимодействие гиалуроновой кислоты с лекарственными препаратами

Роль гиалуроновой кислоты проявляется не только в качестве самостоятельного лекарственного средства, а также как контейнера для

транспортировки других лекарственных веществ к органам и тканям и их контролируемого высвобождения.

Лекарственные препараты могут быть ковалентно или нековалентно связаны со звеньями гиалуроновой кислоты для создания новых возможностей их доставки. Гиалуронат создает депо препарата в месте инъекции и, постепенно разрушаясь, а затем высвобождает лекарство, улучшая его фармакологический профиль и предупреждая развитие возможных побочных реакций. В результате нанесенная, например, на кожный покров гиалуроновая кислота проникает в него, увлекая за собой вещества, ковалентно связанные с ней или просто включенные в ее сетчатую структуру. При этом ГК не только повышает терапевтическую эффективность лекарств, но и уменьшает их побочные эффекты и токсичность.

Описывается увеличение проникновения в кожу примерно в 3 раза больше лекарственного препарата при смешивании с гелем гиалуроновой кислоты уже через 15 минут после нанесения. Более того, лекарственное средство и ГК накапливались и оставались в месте аппликации в течение более длительного периода времени, что так необходимо для лечения [19-22].

В отличие от медицинских препаратов, в которых особый интерес вызывают противовоспалительное, ранозаживляющее и иммуномодулирующее действие гиалуроновой кислоты, в косметических композициях акцент сделан на улучшение пластических свойств кожи.

Что касается стимулирующего и иммуномодулирующего эффектов, то они особенно заметны при использовании гиалуроновой кислоты в специальных ранозаживляющих и восстановительных средствах. Такие средства широко используются в косметологической практике после травмирующих процедур, таких, как шлифовка (механическая, химическая, лазерная) или пластическая операция. Использование содержащих гиалуроновую кислоту композиций ускоряет восстановление кожного покрова и существенно снижает риск возникновения осложнений, среди которых наиболее неприятными являются присоединение инфекции и развитие рубцов.

В последние годы все шире практикуются инъекции гиалуроновой кислоты, с помощью которых в глубокие слои кожи доставляются большие количества гиалуроновой кислоты. Популярный метод обкалывания морщин и определенных зон лица действительно придает коже упругость и эластичность, причем эффект довольно стойкий и держится несколько месяцев.

В зависимости от предназначения препарата в нем предпочтительнее использовать комплексы гиалуроновой кислоты с весьма высокой или довольно низкой молекулярной массой. Так, в ранозаживляющих и защитных композициях лучше использовать высокомолекулярную гиалуроновую кислоту, образующую на поверхности влагоудерживающие пленку. Гиалуроновая кислота с небольшой молекулярной массой подходит для косметических композиций, в составе которых она обеспечит не только увлажняющий и стимулирующий эффекты, но и будет служить переносчиком для других активных ингредиентов. Проникновение высокомолекулярной гиалуроновой кислоты можно улучшить воздействием электромагнитного поля. Такой способ депонирования гиалуроновой кислоты оказывает более продолжительное гидратирующее действие.

1.4 Доксорубицин

Доксорубицин – один из антрациклиновых антибиотиков (рис. 2), представляет собой цитостатический препарат, известный с конца 1960-х годов. Производится полусинтетически с использованием даунорубина в качестве исходного соединения. Химическая формула $C_{27}H_{29}NO_{11}$.

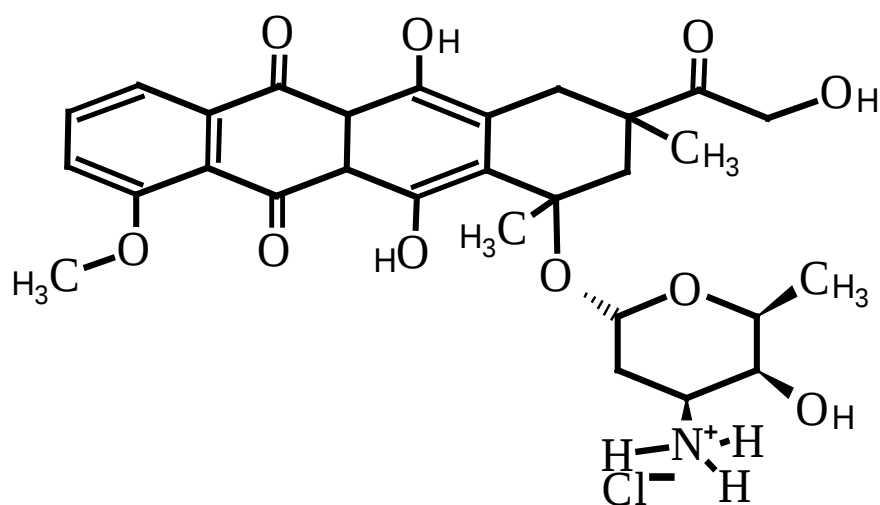


Рисунок 2. Молекулярная структура доксорубина (гидрохлорида).

Доксорубицин представляет собой красный кристаллический порошок. Умеренно растворим в воде, нерастворим в спирте. Склонен к агрегации в растворах со значением pH менее 3 и более 8.

1.4.1 Фармакологическое действие - противоопухолевое

Подавляет синтез ДНК и РНК: интеркалирует в двойную спираль ДНК между парами азотистых оснований (нарушается матрица и изменяется

пространственная структура) и вызывает расщепление ДНК вследствие образования свободных радикалов. Помимо этого, противоопухолевое действие возможно обусловлено изменением клеточных функций в результате связывания с липидами клеточных мембран и взаимодействием с топоизомеразой II.

Обладает высокой противоопухолевой и противолейкозной активностью при низкой избирательности действия. Угнетает кроветворение, оказывает иммуносупрессивное и кардиотоксическое действие. Может вызывать отдаленные эффекты в виде развития вторичных злокачественных опухолей (риск повышается при длительном применении). Оказывает канцерогенное действие у животных и потенциально канцерогенен для человека. Влияет на половую функцию, но у человека это действие слабее, чем действие, выявляемое в опытах на мышах. В экспериментах на животных проявляет эмбриотоксический и тератогенный эффект, вызывает выкидыши.

Все химиопрепараты уничтожают раковые клетки или подавляют их размножение, но делают это разными способами. Доксорубин относится к противоопухолевым антибиотикам с антипролиферативным и антимитотическим действием. Противоопухолевые эффекты Докс связаны со следующими механизмами:

- препарат внедряется в молекулу ДНК блокирует ее репликацию и синтез белка.
- доксорубин ингибирует фермент ДНК-топоизомеразу II, которая влияет на пространственную структуру ДНК и играет важную роль в процессе роста и деления клетки
- молекулы химиопрепарата способны окисляться с образованием свободных радикалов, которые повреждают раковую клетку.

Все эти эффекты распространяются не только на опухолевые, но и на здоровые клетки. Доксорубин может вызывать серьезные побочные эффекты.

Докс применяют при раке молочной железы, желудка, матки, головы и шеи, почек, печени, яичников, щитовидной железы. Также его используют для лечения острых лимфобластных и миелобластных лейкозов, костных сарком, ходжкинских и неходжкинских лимфом, множественной миеломы, нейробластомы, саркомы мягких тканей. Обычно Докс назначают в сочетании с другими химиопрепаратами, которые обладают иными механизмами действия. Благодаря этому повышается эффективность лечения.

При применении Докс снижается уровень лейкоцитов в крови, повышается риск инфекции. В качестве нежелательных, побочных симптомов вызывает

повышение температуры тела более 37,5 °С, боль в горле, кашель. Одним из наиболее серьёзных побочных действий доксорубицина является кардиотоксичность [24].

Глава 2. Экспериментальная часть

Материалы

В работе использовались следующие реагенты: соль Мора $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч., РЕАХИМ, Россия), гиалуронат натрия $M_w = 300.000$ Da (Riedel-deHaen, Чехия), гипофосфит натрия моногидрат $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а., VKLaborundFeinchemikalien, Германия), гидроксид натрия NaOH (ч.д.а., Riedel-deHaen, Чехия), доксорубин гидрохлорид $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}\text{HCl}$ (Teva, Израиль). Гиалуронат натрия дополнительно очищали методом проточного диализа, который проводили в течение трёх дней. Твёрдое вещество выделяли с помощью лиофильной сушки.

2.1 Получение нанокомпозитов

Синтез композиционного материала на основе натриевой соли ГК и наночастиц оксида железа проводился при комнатной температуре следующим образом: к 5 мл 0,5 %-ого раствора альгината натрия в конической колбе приливали 1 мл раствора, содержащий от 12,9 до 50 мг соли Мора, затем – 1 мл раствора, содержащего от 1,5 до 10,5 мг гидроксида натрия, после этого по каплям прикапывали 1 мл раствора, содержащего от 5,28 до 30,3 мг гипофосфита натрия. Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 часов. Окончание реакции определяли по изменению окраски раствора. Далее полученный раствор диализовали против бидистиллированной воды (в диализных мешках «Sigma», пропускающих вещество с $MWCO \sim 14$ кДа) для очистки полимерного композита от растворённых низкомолекулярных соединений. Для выделения продукта использовали лиофильную сушку.

2.2. Получение трёхкомпонентных композитов Na-гиалуронат–маггемит–DOX

К 50 мг композита Na-гиалуронат–маггемит растворяли в 50 мл бидистиллированной воды. Затем к раствору при интенсивном перемешивании

медленно, по каплям, прибавляли 10 мл раствора, содержащего от 5 до 15 мг доксорубина. Реакционные смеси интенсивно перемешивали в течение 24 часов. Очистку высокомолекулярных продуктов от непрореагировавших веществ проводили методом проточного диализа. Для выделения трёхкомпонентных композитов использовали лиофильную сушку.

2.3 Основные методы исследования

Флуоресцентный анализ трёхкомпонентных композитов Na-гиалуронат–маггемит–Докс

Доказательство формирования комплекса Na-гиалуронат–маггемит с доксорубином проводили флуориметрически на спектрофлуориметре Панорама (Россия). Также проводили УФ-спектрофотометрическое исследование, измеряя оптическую плотность растворов на приборе Shimadzu UV-1700 PC (Япония). Для этого к $1,8 \times 10^{-5}$ М раствору доксорубина последовательно добавляли водный раствор двухкомпонентного композита Na-гиалуронат–маггемит. Спектры флуоресценции регистрировали с использованием кварцевой кюветы с оптической длиной пути $l = 1$ см при длине волны возбуждающего излучения $\lambda = 490$ нм в диапазоне длин волн от 500 до 750 нм.

УФ-спектры регистрировали с использованием кварцевой кюветы с оптической длиной пути $l = 1$ см в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм.

Каждый из растворов измеряли по три раза для исключения случайных результатов и усреднения данных. В качестве сравнения использовали растворитель. Из интенсивности флуоресценции проб вычитали интенсивность флуоресценции «холостого опыта».

РЭМ (растровый электронный микроскоп)

Универсальность растрового электронного микроскопа при исследовании твердых тел в большой мере вытекает из обширного множества взаимодействий, которые претерпевают электроны пучка внутри образца. Взаимодействие можно в основном разделить на два класса:

- упругие процессы, которые взаимодействуют на траектории электронов пучка внутри образца без существенного изменения их энергии;
- неупругие процессы, при которых происходит передача энергии твердому телу, приводящий к рождению вторичных электронов, оже-электронов, характеристического и непрерывного рентгеновского излучений, длинноволнового электромагнитного излучений в видимой,

ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра, электронно-дырочных пар, колебаний решетки (фононы) и электронных колебаний (плазмоны). В принципе все эти взаимодействия могут быть использованы для получения информации о природе объекта – формы, состава, кристаллической структуры, электронной структуры, внутренних электрическом или магнитном полях и т.д.

Электронно-оптическая колонна, находящаяся перед образцом, служит для формирования электронного пучка и управления его параметрами: диаметром, током и расходимостью. Типичные пучки состоят из электронов, траектории которых почти параллельны, с расходимостью порядка 10^{-2} рад ($0,5^\circ$) или менее, и которые фокусируются в малый кружок диаметром от 5 нм до 1 мкм. Так как изображение в РЭМ строится по информации, получаемой из точек матрицы положений пучка на образце, по которому он сканирует то, очевидно, для получения растровых изображений с высоким пространственным разрешением первым требованием является малый диаметр пучка. В идеальном случае диаметр области считывания информации пучком на образце должен равняться диаметру пучка.

В действительности, однако, это не реализуется из-за явления рассеяния электронов. В общем случае рассеяние просто означает взаимодействие между электроном пучка и атомами, и электронами образца, которое проявляется в изменении траектории и энергии электрона [25].

Химический анализ в растровом электронном микроскопе и рентгеновском микроанализе осуществляется путём измерения энергии и интенсивности рентгеновского излучения, генерируемого при бомбардировке образца сфокусированным электронным пучком (рис.3).

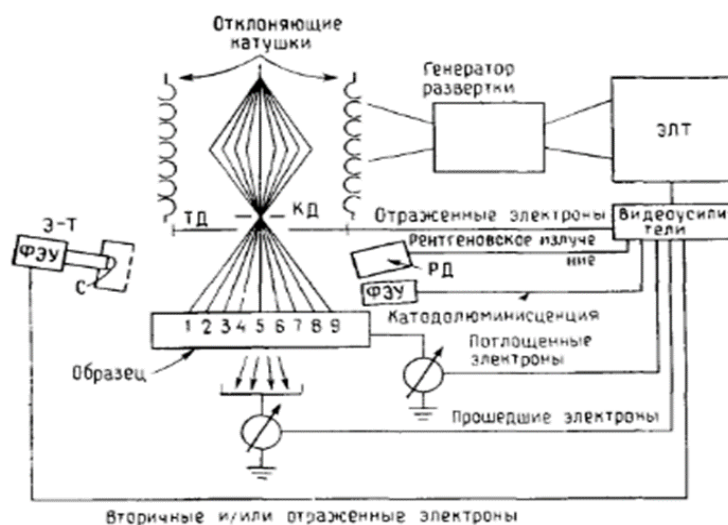


Рисунок 3. Схема сканирующего электронного микроскопа.

До 1968 г., когда в микроанализаторах впервые были применены полупроводниковые детекторы, рентгеноспектральные измерения проводились лишь с помощью спектрометра с дисперсией по длинам волн. Небольшая часть рентгеновского излучения, генерируемого образцом, выходит из электронно-оптической камеры, падает на поверхность кристалла-анализатора (рис.4), дифрагирует в соответствии с законом Брэгга:

$$n\lambda = 2d \sin \Theta$$

(n – целое число (1,2,3...), λ -длина волн рентгеновского излучения, d -межплоскостное расстояние в кристалле, Θ -угол падения).

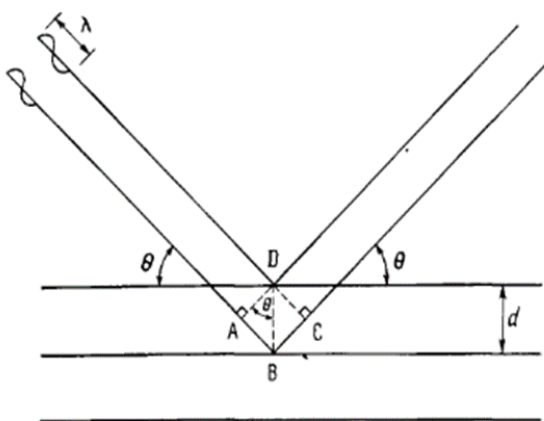


Рисунок 4. Схема дифракции рентгеновского излучения по закону Брэгга.

Обычно качественный анализ заключается в непрерывной записи на ленте самописца распределения интенсивности рентгеновского излучения в зависимости от угла поворота кристалла-анализатора с последующим преобразованием положений пиков в длины волн в соответствии с законом Брэгга и использованием закона Мозли для связи длин волн максимумов рентгеновского излучения с наличием определенных элементов в образце.

Типичные спектрограммы (рис.5), показывающие зависимость интенсивности рентгеновского излучения от длины волны, полученные при анализе сплава на основе никеля [26].

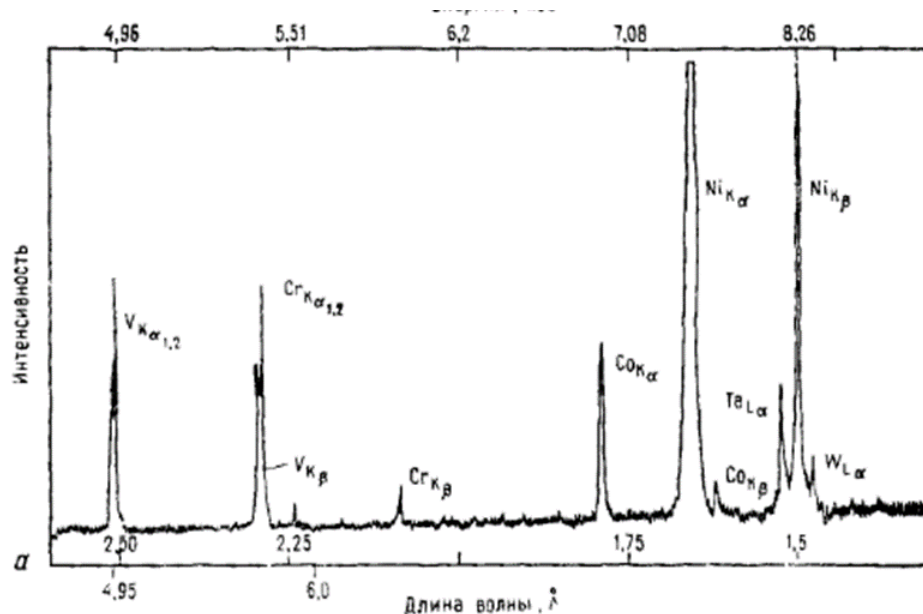


Рисунок 5. Схема рентгеновского излучения специального сплава на основе никеля, полученный с помощью кристалл-дифракционного спектрометра.

Рентгеновская дифракция проводилась на рентгеновском дифрактометре (рис.6) РИГАКУ D/Max 2500 с вращающимся медным анодом, Cu-K α ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) среднее излучение, режим работы генератора 50 кВ, 250 мА, непрерывная съемка с шагом регистрации 0,02 град.

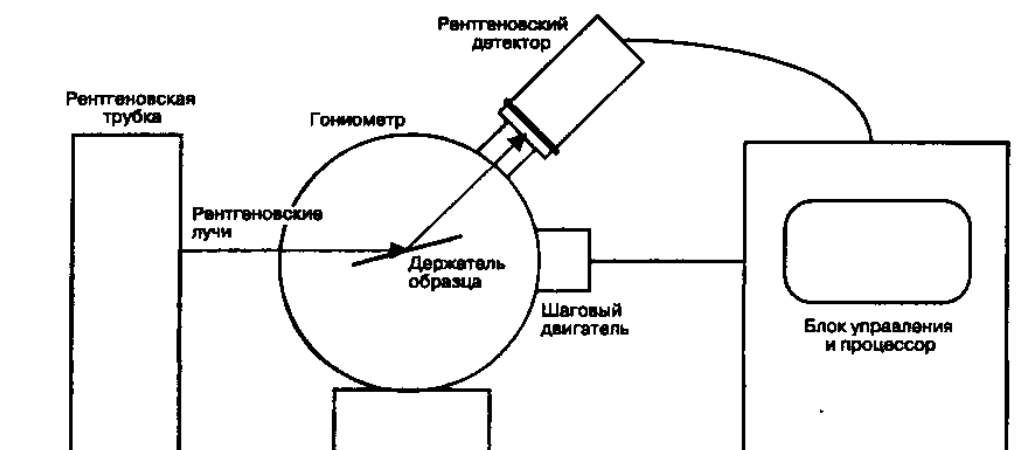


Рисунок 6. Схема рентгеновского дифрактометра.

Мессбауэровские спектры получены на спектрометре электродинамического типа MS-1104ЕМ с источником $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$. Толщина поглотителя 0,12 мг/см 2 (^{57}Fe). Значения изомерных сдвигов приведены относительно α -Fe.

Исследования методом растровой электронной микроскопии проводилось в растровом электронном микроскопе LEO SUPRA 50VP (регистрация

изображений во вторичных или отраженных (квадрупольный детектор, химический контраст) электронах в режиме низкого (40 Па азота) вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ).

Рентгеноспектральный микроанализ проводили на спектрометре INCA Energy 350 X-MAX 80 с энергетическим разрешением, установленный на упомянутом выше растровом электронном микроскопе (рис. 7).

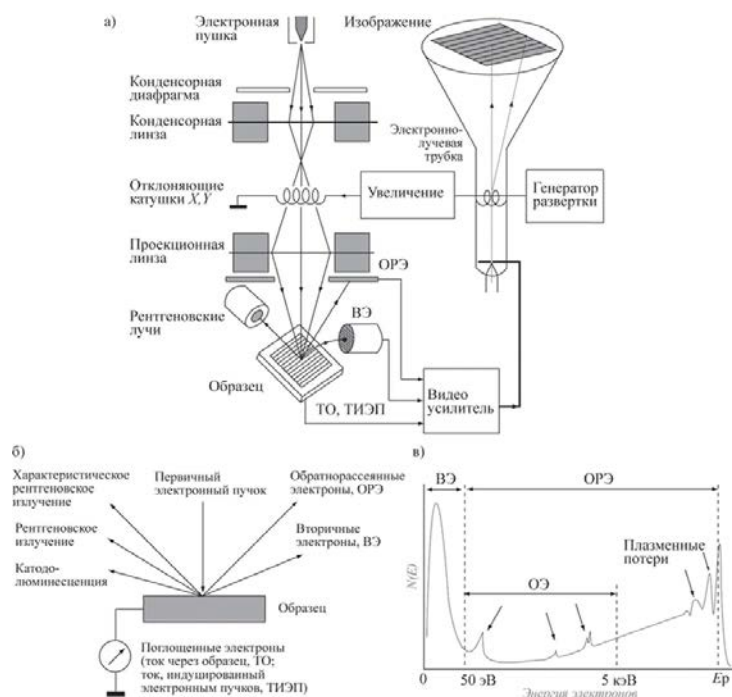


Рисунок 7. Схема рентгеноспектрального спектрометра.

Содержание железа определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 4050 (LKB, Швеция) с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. Для этого 5 мг полученного композита растворяли в 20 мкл концентрированной серной кислоте, добавляли 1 мг 2% раствора сульфосалициловой кислоты. Полученный раствор доводили до pH~2 до объёма 2 мл. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=510$ нм (коэффициент экстинкции $\epsilon=1900$ л/(моль*см)). Количества железа определяли по градуированному графику (D от C , где D -оптическое поглощение раствора, C -концентрация $FeCl_3$). Процентное содержание железа определяли по формуле:

$$\eta = \frac{m}{p} \cdot 100\%$$

где m – масса железа в образце, p – масса композита.

Магнитные измерения проводились на радиоспектрометре VARIAN E4 в X-диапазоне (рабочая частота = 9,15 ГГц) с азотной термоприставкой E-257 при температуре 300 К.

Исследование методом просвечивающей (туннельной) электронной микроскопии (ПЭМ) проводилось на установке JEM-100В фирмы JEM. Образцы готовили путём нанесения капли водного раствора, содержащего исследуемое вещество на медную сетку.

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на фотометре ALV (ALV, Германия), снабженном He-Ne – лазером мощностью 25 мВт, $\lambda=632,8$ нм, при угле рассеяния 90° . Автокорреляционные функции флуктуаций интенсивности рассеянного света измеряли с помощью 280-канального логического «ФотоКорр-М». Перед измерениями образцы обеспыливали 2-3-кратным пропусканием через мембранные фильтры «Millipore» со средним размером пор 1.2 мкм. Результаты измерений обрабатывали методом регуляризации по Тихонову. Радиусы эквивалентных гидродинамических сфер рассчитывали по уравнению Стокса. Определение электрокинетических характеристик полученных композитов в растворах проводили на приборе Brookhaven Instruments (США). Для получения величины электрофоретической подвижности композитов готовили водные и физиологические растворы исследуемых образцов.

Определение электрокинетических характеристик полученных композитов в растворах проводили на приборе Brookhaven Instruments (США). Для определения величины электрофоретической подвижности композитов готовили водные и физиологические растворы исследуемых образцов.

Глава 3. Обсуждение результатов

3.1 Получение композитов

Синтез магнитной модификации оксида железа (III) – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ проводили восстановлением гипофосфитом натрия при комнатной температуре ионов двухвалентного железа (в виде соли Мора) в присутствии Na-гиалуроната в качестве стабилизирующей матрицы, а также кислорода воздуха в щелочной среде. Необходимость восстановителя в системе обусловлена химической спецификой данного процесса, который протекает через образование металлического железа в качестве интермедиата. Без восстановителя образуются гидроксоформы железа (III), не обладающие магнитными свойствами.

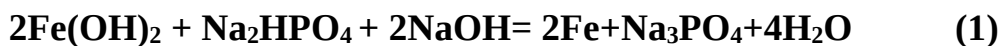
Выбор гипофосфита в качестве восстановителя обусловлен высоким окислительно-восстановительным потенциалом пары $\text{H}_2\text{PO}_2/\text{PO}_4^{3-}$.

Получение магнитных наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, включённых в матрицу гиалуроновой кислоты, проводят в щелочном растворе с pH в интервале 10–12.



Осаждение магнитной $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ проводят в щелочном растворе с pH в интервале 9–10. Нижняя граница интервала pH определяется условием существования гидроксида железа $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Верхняя граница зависит от устойчивости продукта взаимодействия частиц металла, образующихся при восстановлении гипофосфитом в щелочном растворе, и олигосахарида, специфически адсорбирующегося на поверхности металлического или оксидного зародыша.

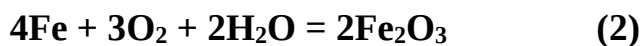
Механизм образования фазы оксида железа включает стадию восстановления гипофосфитом в щелочной среде согласно реакции:



Следует отметить, что выбор исходных концентраций солей железа (II) и гипофосфита обусловлен индивидуальной растворимостью ингредиентов и в принципе неограничен при соблюдении условия оптимального соотношения $\text{Fe}(\text{OH})_2 \div \text{NaH}_2\text{PO}_2$ в реакционной смеси.

Образование магнитной $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в водном щелочном растворе происходит в присутствии Na-гиалуроната. Роль полисахарида при образовании магнитной $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в водном растворе состоит в стабилизации

зародышей фазы металлического железа, образующейся в результате реакции (1), за счет торможения процессов агломерации и сращивания кристаллитов, с одной стороны, и ингибирования спонтанного окисления металлического железа в водной среде в присутствии растворенного кислорода в соответствии с уравнением реакции.



Синтез был осуществлен в пяти экспериментах, в каждом из которых варьировалась количество взятой соли Мора в зависимости от заданного соотношения звеньев полимера к ионам Fe^{2+} . Данные о количественных характеристиках приведены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание исходных компонентов в реакционной смеси и содержание железа в продуктах.

Образец	Количество Na-Гиалур, 10^{-3} моль-экв	Количество $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10^{-3} моль	Отношение моль Na-Гиалуронат/ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Содержание железа, вес. %
I	0,033	0,0083	4:1	3,1
II	0,033	0,0165	2:1	5,7
III	0,033	0,033	1:1	9,8
IV	0,033	0,066	1:2	17,6
V	0,033	0,1	1:3	23,1

О направлении прохождения реакции судили по окрашиванию реакционного раствора в красно-коричневый цвет. При использовании таких концентраций были получены только водорастворимые продукты. С помощью проточного диализа из растворов были удалены низкомолекулярные соединения. После лиофильной сушки были получены красно-коричневые порошки железосодержащих композиционных материалов.

Представляло интерес выяснить содержание железа в полученных наноконпозиционных материалах на основе гиалуроновой кислоты.

3.2 Основные методы исследования наноконпозита

1) Определение содержание железа;

- 2) Магнитные свойства нанокомпозитов;
- 3) Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ);
- 4) Рентгенофазовый анализ;
- 5) Мёссбауэровская спектроскопия;
- 6) Сканирующий электронный микроскоп;
- 7) Светорассеяние.

3.2.1 Определение содержания железа

Содержание железа в полученных образцах определяли спектрофотометрически с использованием сульфосалициловой кислоты, образующей окрашенные комплексы с ионами железа (III). Результаты определения представлены в таблице 2. В ионизированную форму металлосодержащие частицы переводили путём обработки композитов концентрированной серной кислотой (pH~2.1). В результате, в исследуемых растворах находилась феррилсульфосалицилатная соль следующего строения (рис.8). Полученные при этом растворы имели красно-фиолетовый цвет разной интенсивности окраски, которая зависит от содержания железа в исследуемом растворе.

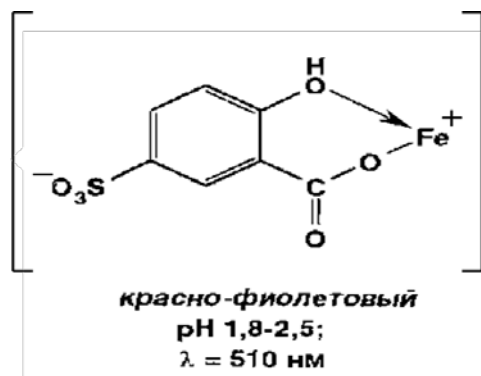


Рисунок 8. Структура комплекса иона железа (III) с сульфосалициловой кислотой при pH= 2,1.

Интенсивность окраски комплекса ионов железа с сульфосалициловой кислотой в интервале pH 1,8–2,5 зависит от содержания ионов железа в растворе. Определение содержания железа в синтезированных магнитных микрогелях проводили с использованием метода внешнего стандарта. Для построения градуировочного (калибровочного) графика (рис.9) приготовили серию растворов хлорида железа (III) в соляной кислоте с различной концентрацией Fe^{3+} (pH=2,1), приливали 2% раствор сульфосалициловой

кислоты. Растворы фотометрировали относительно воды и строили градуировочный график. Каждый из калибровочных растворов измеряли по три раза для исключения случайных результатов и усреднения данных (Табл.2). Затем построили градуировочный график в координатах А от С, где А – оптическая плотность раствора комплекса железа с сульфосалициловой кислотой в интервале рН 1,8–2,5 при длине волны 510 нм, С (моль/л) – концентрация ионов Fe^{3+} в растворе.

Таблица 2. Данные для построения градуировочного графика.

№	С (Fe^{3+}) 10^4 М	А ($\lambda=510$ нм) сред.	Доверительный интервал
1	0,5	0,076	$\pm 0,015$
2	1,0	0,190	$\pm 0,017$
3	1,5	0,270	$\pm 0,014$
4	2,0	0,348	$\pm 0,016$
5	3,0	0,555	$\pm 0,015$
6	4,0	0,715	$\pm 0,016$

Для определения железа по 2 мг каждого композита растворяли в 20 мкл концентрированной серной кислоты, добавляли 1 мл 2% раствора сульфосалициловой кислоты. Полученные растворы доводили до рН=2. Фиксировали спектры растворов и находили значение оптической плотности при длине волны 510 нм. Концентрацию железа в образцах определяли по градуировочному графику.

Для расчёта содержания железа в исходном образце использовали следующую формулу:

$$m = C * V * n$$

где С– концентрация ионов Fe^{3+} (М), V– объем исходного раствора (мл), n– коэффициент разбавления при пробоподготовке.

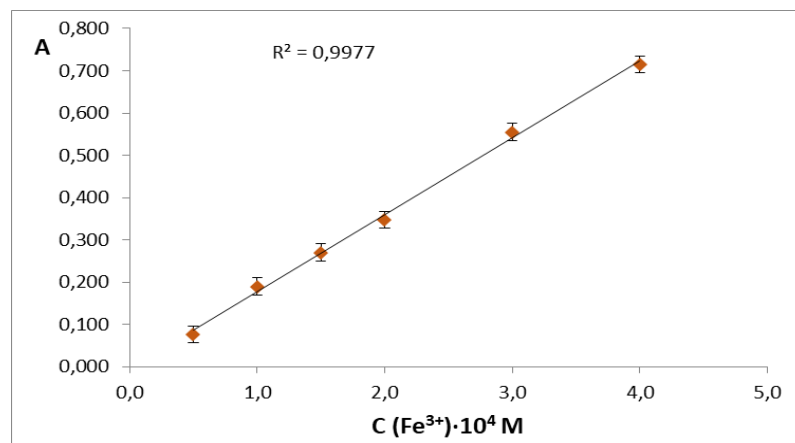


Рисунок 9. Зависимость оптической плотности растворов комплекса железа (III) с сульфосалициловой кислотой в интервале pH= 2,1 (при длине волны 510 нм) от концентрации ионов железа (III).

Из данных, представленных в таблице 2 следует, что массовая доля железа в синтезированных микрогелях закономерно увеличивается с увеличением содержания ионов железа (II) в реакционной смеси.

3.2.2 Магнитные свойства нанокомпозитов

Для определения магнитных свойств были выбраны образцы 2–5, характеризующиеся содержанием магнитной фазы от 5,7 до 21,7 % вес. Для измерений магнитных свойств из каждого образца вырезался плоский диск с диаметром 3–4 мм и закреплялся на кварцевом держателе таким образом, чтобы плоскость образца была сонаправлена с направлением внешнего магнитного поля. Графики зависимости намагниченности образцов с различным содержанием железа представлены на рис. 10.

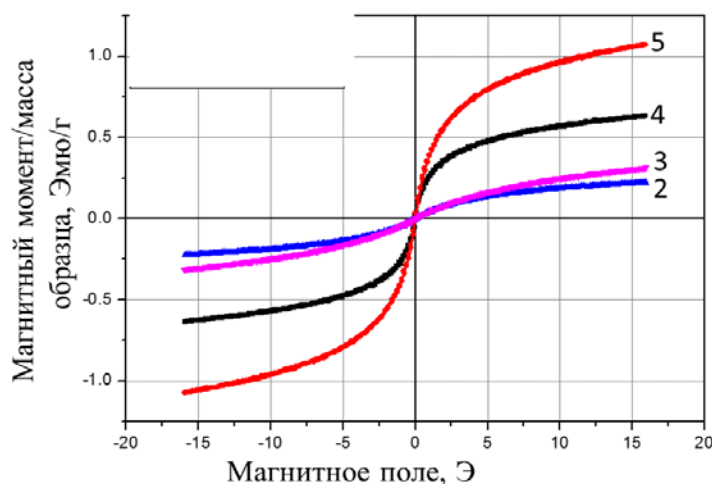


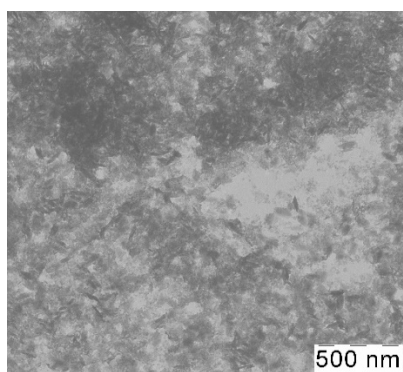
Рис. 10 Удельная намагниченность композиционных материалов Na-гиалуронат–маггемит с различным содержанием неорганической фазы:

2) 3,1 % вес.; 3) 9,8 % вес.; 4) 17,6 % вес.; 5) 23,1 % вес. $T=300\text{K}$.

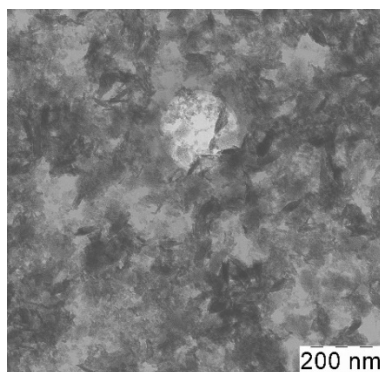
Из рис. 10 видно, что композитные материалы Na-КМЦ–маггемит проявляют ферромагнитное поведение с различными магнитостатическими характеристиками (коэрцитивная сила, остаточная намагниченность, намагниченность насыщения, коэффициент прямоугольности) при изменении концентрации железа. Петли гистерезиса композитных образцов являются насыщенными.

3.2.3 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

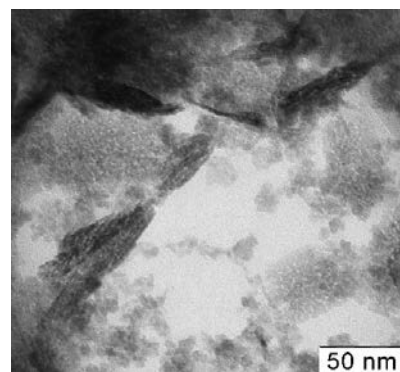
Для визуализации полученных композитов был использован метод ПЭМ. Для сравнения были взяты растворы нанокompозитов с минимальным и максимальным содержанием магнитной фазы (рис.11).



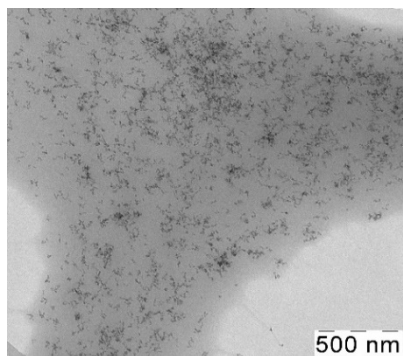
a)



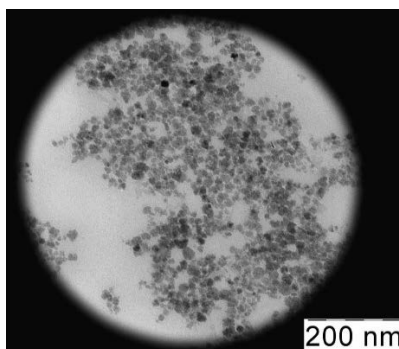
b)



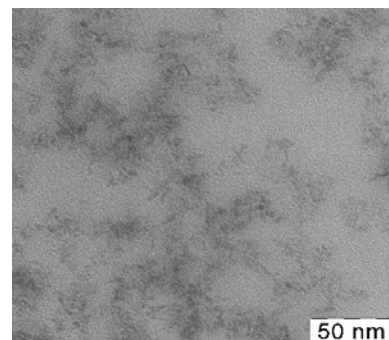
c)



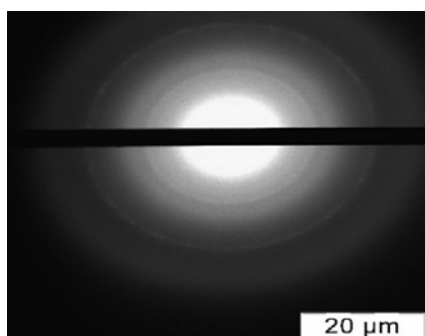
d)



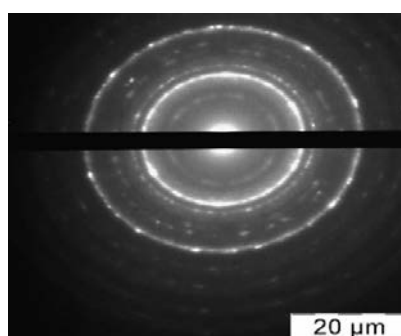
e)



f)



g)



h)

Рисунок 11. ПЭМ-изображения в различных масштабах (a, b, c) нанокompозита с содержанием железа 3,1 % вес.; (d, e, f) нанокompозита с содержанием железа 21,7 % вес электронограммы: g) нанокompозита с содержанием железа 3,1 % вес.; h) нанокompозита с содержанием железа 23,1 % вес.

Размер обнаруженных тёмных контрастных наночастиц варьируется в диапазоне от 3 до 20 нм в диаметре. При этом средний размер исследуемых наночастиц составляет 10 нм. Следует отметить, что в зависимости от условий синтеза композиционного материала изображения наночастиц, полученные методом просвечивающего электронного микроскопа принципиально не отличаются друг от друга. Установлено также, что размер наночастиц остаётся постоянным при изменении соотношения компонентов реакционной смеси.

Для определения структурных характеристик наночастиц в составе магнитных микрогелей использовали электронограммы. Полученные дифрактограммы представляют собой совокупность ярких относительно тонких концентрических колец. Подобные дифрактограммы свидетельствуют о наличии кристаллической фазы, которую образуют полученные контрастные наночастицы. Полученные электронограммы позволили рассчитать межплоскостные расстояния кристаллических решеток неорганических наночастиц, представленные в таблице 3.

Таблица 3. Межплоскостные расстояния для наночастиц в композитах: экспериментальные данные и эталонный образец.

Hkl	$d_{\text{exp}}, \text{\AA}$	$d(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3), \text{\AA}$
111	4.834	4.822
220	2.955	2.953
311	2.519	2.517
400	2.090	2.088
422	1.705	1.704
440	1.474	1.475

Сравнение полученных данных с табличными значениями для эталонного образца железосодержащих соединений показало, что экспериментальные значения могут соответствовать кристаллической структуре маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

3.2.4 Рентгенофазовый анализ

Для получения дополнительной информации о кристаллической решётке, которая характеризует неорганическую фазу использовали метод РФА. Для исследований были взяты порошки исследуемых композитов и помещали в специальный монокристаллический держатель так, чтобы наружная поверхность слоя порошка оказалась на уровне плоскости держателя. Для этой цели использовать кварцевую пластинку для уплотнения порошка, все время подсыпая образец в центр кюветы. Затем установили образец в специализированный держатель образцов на гониометре дифрактометра. Дифрактограммы, полученные для трёх образцов (с минимальным, максимальным и средним содержанием магнитной фазы в композитах) представлены на рис. 12.

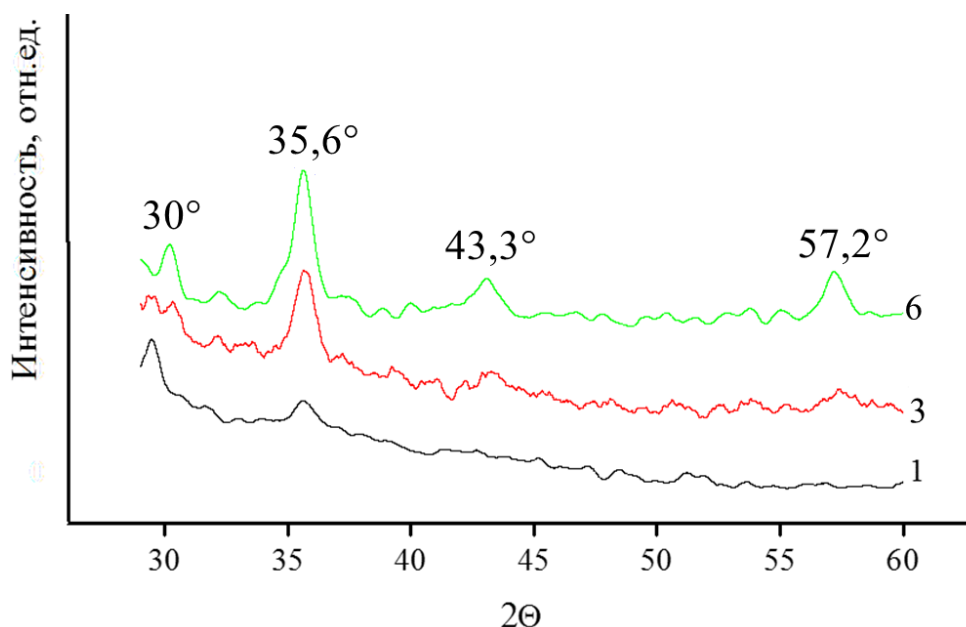


Рисунок 12. Дифрактограммы композиционных материалов на основе На-гиалуроната с различным содержанием неорганической фазы: 1) 3,1 % вес.; 3) 9,8 % вес.; 6) 23,1 % вес.

Сопоставление полученных данных с литературными источниками позволяет заключить, что в результате проведенного нами синтеза получены наночастицы оксидов железа со структурой шпинели. При этом следует отметить, что на основе данных только рентгеноструктурного анализа достаточно сложно отличить магнетит (FeO–Fe₂O₃) от маггемита (γ-Fe₂O₃). Это связано с тем, что положения их дифракционных пиков занимают очень близкие позиции. Для уточнения формы оксида железа в составе полученных композиционных материалов был использован метод мёссбауэровской спектроскопии.

3.2.5 Мёссбауэровская спектроскопия

Мёссбауэровский спектр железосодержащего образца на основе На-Гиалуроната (рис.13) представляет собой суперпозицию двух секстетов магнитной сверхтонкой структуры и квадрупольного дублета. Параметры секстетов характеризуются изомерным сдвигом $\delta_A = 0,41 \pm 0,01$ мм/с. В свою очередь, значение магнитного поля на ядре ^{57}Fe $H_A = 497 \pm 3$ кЭ, ширина линии на полувысоте $W_A = 0,75 \pm 0,03$ мм/с, спектральный вклад $S_A = 38$ %; $\delta_B = 0,46 \pm 0,01$ мм/с, $H_B = 522 \pm 3$ кЭ, $W_B = 0,54 \pm 0,03$ мм/с, $S_B = 55$ %) и дублета ($\delta = 0,41 \pm 0,01$ мм/с, квадрупольное расщепление $\Delta E = 0,72 \pm 0,02$ мм/с, $W_A = 0,54 \pm 0,02$ мм/с, $S = 7$ %).

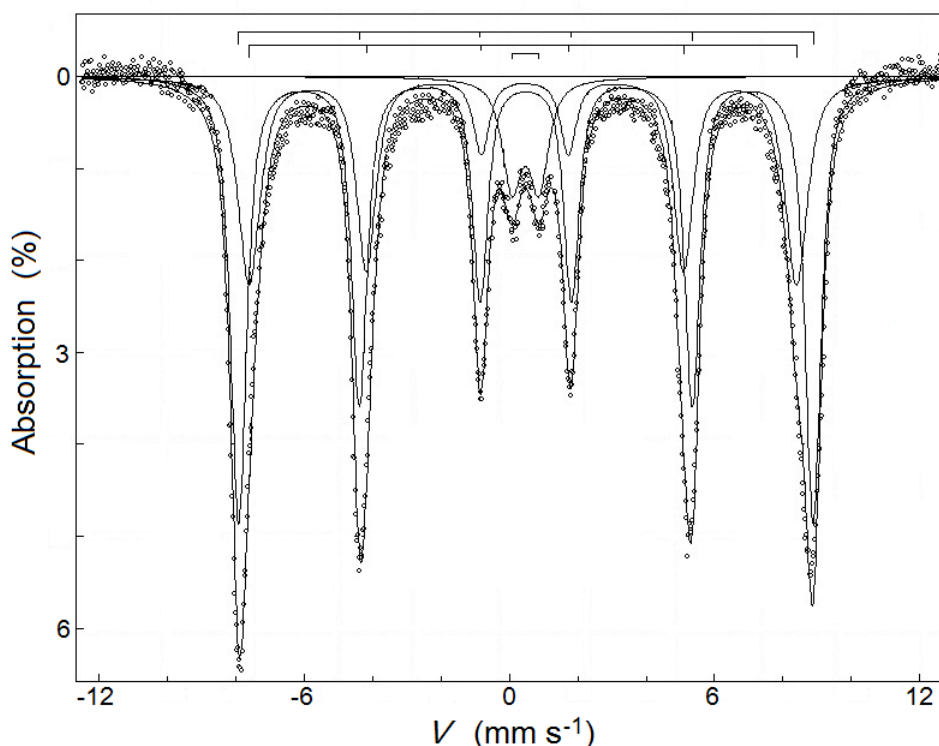


Рисунок 13. Мёссбауэровский спектр магнитного образца на основе На-Гиалуроната, содержащего 23,1 % вес.

Следует отметить, что указанные характеристики спектра являются характеристическими для наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, проявляющих суперпарамагнитные свойства [27, 28]. Известно, что в высокодисперсных образцах оксидов железа магнитное поле, H , на ядрах ^{57}Fe отличается в меньшую сторону от значения H , установленного для «стандартных» крупнокристаллических веществ при данной температуре. При этом отклонение от стандартного значения тем больше, чем меньше размер частиц [29].

Кроме того, обнаруженное существенное увеличение ширины линий (W) секстетов определяется также неоднородностью гранулометрического состава исследуемого образца и отражает распределение значений H для катионов Fe^{3+} в тетраэдрической (А) и октаэдрической (В) позициях.

Присутствие в спектре квадрупольного дублета означает, что исследуемый образец содержит фракцию очень мелких частиц (предположительно $d \sim 4$ нм), для которых частота суперпарамагнитной релаксация магнитных моментов катионов выше частоты ларморовой прецессии ядерного спина.

Следует отметить, что в полученном мессбауэровском спектре исследуемого образца не наблюдается присутствия секстета, который характеризует «промежуточную» степень окисления $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ($\delta > 0,6$ мм/с) и отчётливо проявляется спектре Fe_3O_4 .

Полученный результат свидетельствует о том, что в исследуемом образце не обнаружено примеси фазы Fe_3O_4 . На основании совокупности данных РФА и Мессбауэровской спектроскопии установлено, что неорганическая компонента, входящая в состав композитов на основе Na/Гиалуроната представляет собой маггемит.

3.2.6 Исследование магнитных композитов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Основными преимуществами электронного микроскопа являются: образцов для анализа (по сравнению, микроскопией), экспрессность (малое время, необходимое от момента загрузки образца в камеру до получения изображения), а также широкий спектр анализируемых твердых тел: от металлов и полупроводников, до диэлектриков, порошкообразных и биологических объектов. Из-за очень узкого электронного луча сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) обладает большой глубиной резкости, примерно на два порядка выше, чем у оптического микроскопа, что позволяет получать четкие микрофотографии с характерным трехмерным эффектом для объектов со сложным рельефом, а также чёткие контуры частиц, расположенных на разной высоте.

Принцип сканирующей электронной сканировании участка исследуемого образца узким электронным пучком и детектировании возникающих при этом сигналов. Полученным сигналом модулируется синхронная развёртка на мониторе микроскопа так, что каждой точке монитора соответствует характеристика сигнала от положения пучка в точке на поверхности образца. В результате на экране создаётся изображение поверхности объекта (рис. 14).

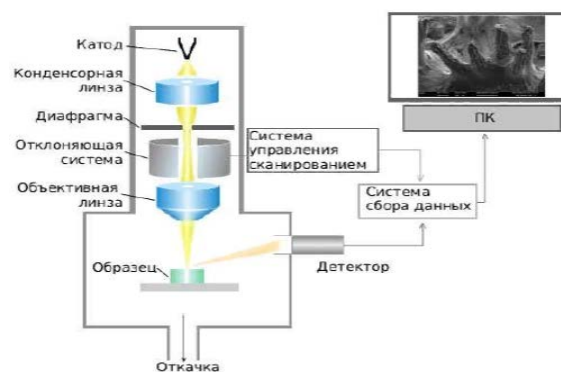
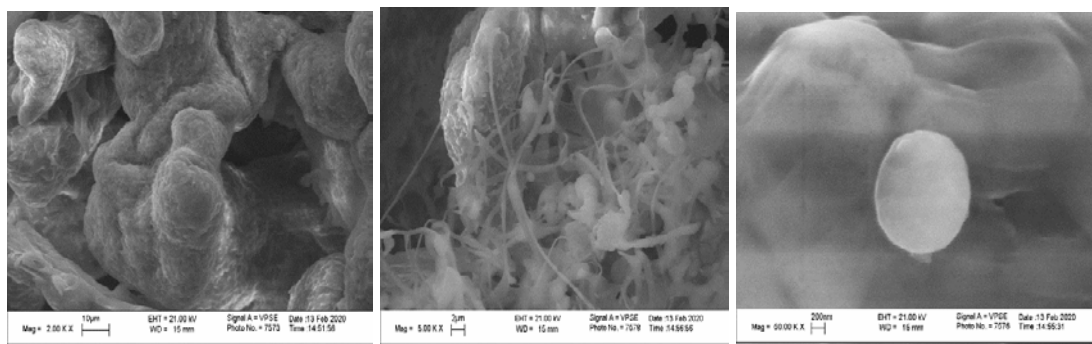


Рисунок 14. Принципиальная схема регистрации и визуализации сигнала со сканирующего электронного микроскопа.

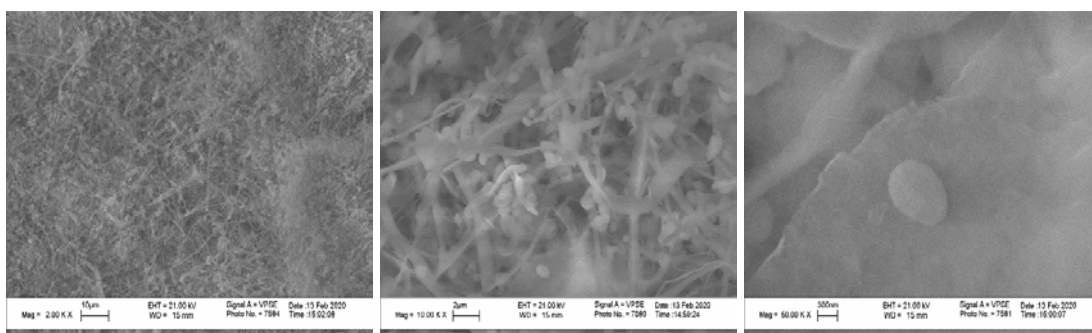
С помощью сканирующего электронного микроскопа были получены сведения о морфологии и надмолекулярной структуре композитов на основе Na-гиалуроната, содержащих 9,8 и 17,6 % вес. магнитной фазы (рис. 15).



a)

b)

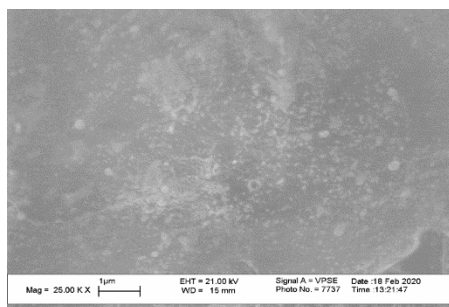
c)



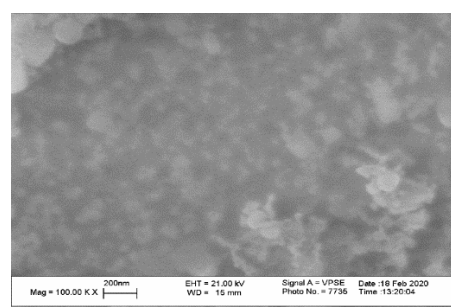
d)

e)

f)



g)



h)

Рисунок 15. СЭМ-изображения в различных масштабах (a, b, c) нанокompозита с содержанием железа 9,8 % вес.; (d, e, f) нанокompозита с содержанием железа 17,6 % вес.; исходного Na-гиалуроната (g, h).

Установлено, что в процессе синтеза нанокompозитов, содержащих наночастицы маггемита, стабилизированных Na-гиалуронатом, происходит формирование надмолекулярной микропористой структуры. В свою очередь, микропористая структура, обусловлена появлением индивидуальных частиц композитов Na-гиалуронат–маггемит, которые препятствуют формированию сплошной плёнки, характеризующей морфологию и надмолекулярную структуру исходного Na-гиалуроната. Формирование плёнки обусловлено реализацией системы внутри- и межмолекулярных водородных связей между макромолекулами Na-гиалуроната. Индивидуальные частицы полисахарида характеризуются сферической морфологией, их диаметр составляет ~ 150 нм. Индивидуальные частицы композитов, содержащих наночастицы затрудняют или делают полностью невозможной реализацию комплекса системы внутри- и межмолекулярных водородных связей. В результате только отдельные фрагменты макромолекул Na-гиалуроната могут формировать межмолекулярные водородные связи, остальные фрагменты задействуются на стабилизацию наночастиц маггемита. При этом в морфологической структуре нанокompозитов образуются как области контактов между фрагментами макромолекул, так и пустоты в виде пор преимущественно микрометрового размера.

Обнаружено также, что исследуемые образцы магнитных нанокompозитов, предположительно, содержат как отдельные частицы композитов в виде сферических частиц диаметром 200 нм, так и их ассоциаты в виде сферических частиц, с диаметром 500 нм.

3.2.7 Динамическое рассеяние света

Для получения дополнительной информации о размере индивидуальных частиц композитов Na-гиалуронат–маггемит были изучены их гидродинамические свойства. С этой целью был использован метод динамического светорассеяния. На рис. 8 представлена типичная функция распределение частиц по размерам в 0,005 М растворе нанокompозита с содержанием неорганической фазы 9,8 % вес.

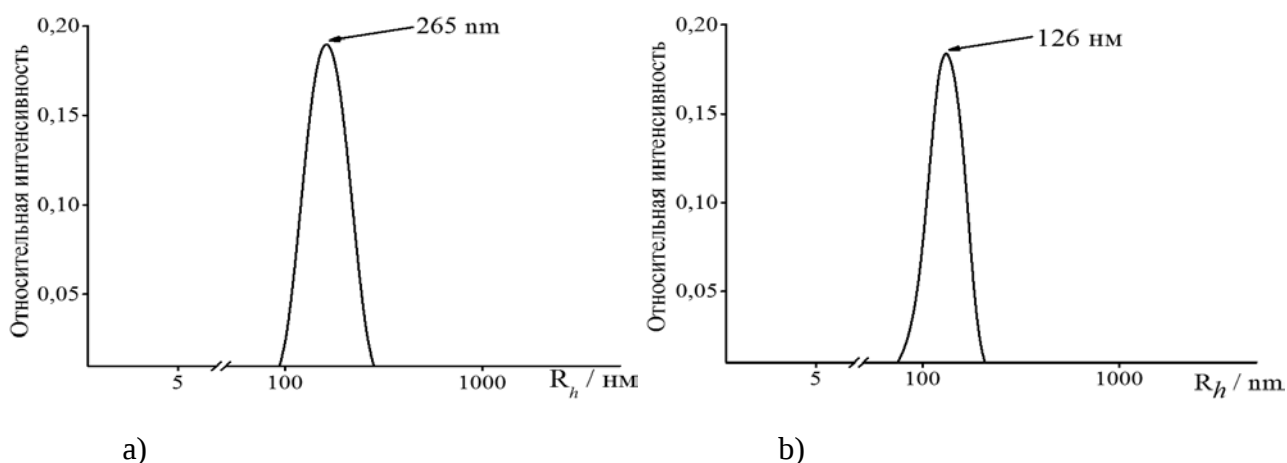


Рисунок 16. Распределение частиц по размерам (а) в 0,005 М водном растворе композита Na-гиалуронат–маггемит с содержанием железа 9,8 % вес.; (б) в 0,005 М изотоническом (0,15 М NaCl) растворе.

Из представленных на рис. 16 функций распределения частиц магнитных композитов по размерам видно, что в водном растворе присутствует один тип частиц, средний радиус которых около 265 нм. Для сравнения на этом же рисунке представлено распределение частиц по размерам в изотоническом растворе. Установлено, что в солевом растворе радиус частиц уменьшается до 126 нм. Гидродинамические, а также электрокинетические характеристики полученных нанокомпозитов Na-гиалуронат–маггемит с различным содержанием магнитной фазы представлены в табл. 4.

Таблица 4. Гидродинамические и электрокинетические характеристики магнитных нанокомпозитов Na-гиалуронат–маггемит.

Содержание железа, % вес.	R_h , нм (в водном растворе)	R_h , нм (в изотоническом растворе)	ЭФП, мкм/с/В/см
0	200	160	-2,70
3	275	126	-3,21
9,8	265	130	-3,21
17	225	111	-2,85
21	150	110	-1,68

По электрофоретической подвижности (ЭФП) молекул композитов в водном растворе можно сделать заключение о знаке поверхностного заряда на частицах полученных композитов. Установлено, что всех случаях частицы характеризуются отрицательными значениями ЭФП.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при увеличении содержания железа в составе нанокомпозитов происходит уменьшение размеров образующихся частиц как в водном, так и в изотоническом растворе. По-видимому, это объясняется формированием микрогелевой структуры за счет образования мостиковых связей между участками макромолекул полисахарида через поверхность наночастиц оксида железа (рис.17).

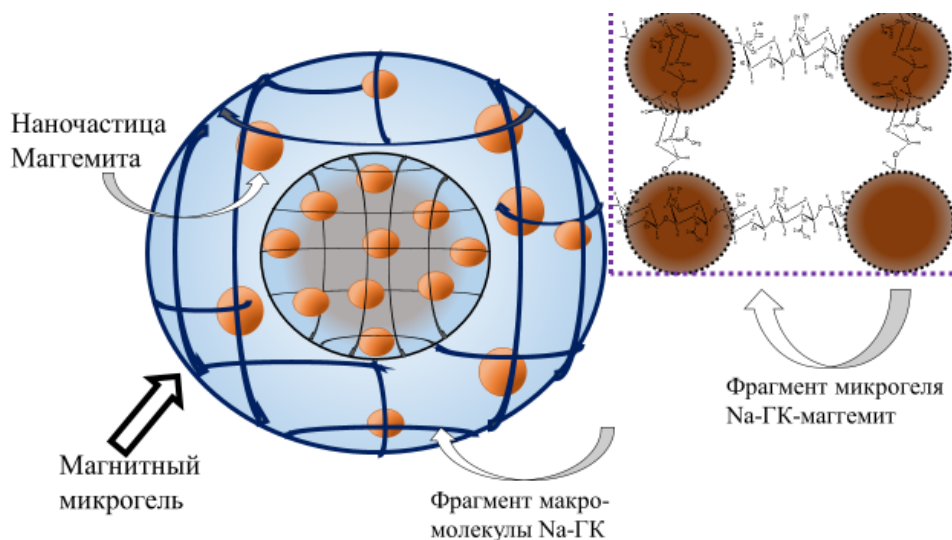


Рисунок 17. Схематическое изображение частицы нанокомпозита Na-гиалуронат–маггемит.

Образование водорастворимого нанокомпозитов Na-гиалуронат–маггемит происходит, вероятно, вследствие формирования пространственной трёхмерной структуры, в которой наночастицы, экранированы фрагментами макромолекул полисахарида. При этом функциональные группы полисахарида, не участвующие в стабилизации наночастиц, экспонированы наружу и обеспечивают растворимость полученных нанокомпозитов.

Глава 4. Изучение взаимодействия нанокомпозита с доксорубицином

Для изучения взаимодействия нанокомпозитов с доксорубицином был выбран нанокомпозит Na-гиалуронат–маггемит с содержанием магнитной фазы 9,7 % вес. Тройные системы Na-гиалуронат–маггемит– Докс были получены варьированием соотношения звено Na-гиалуронат/Докс в интервале от 10:1 до 1:7.

4.1 Флуориметрия

Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия) является методом анализа, основанным на измерении флуоресценции. Флуоресценция

(один из видов люминесценции) - испускание света химическим веществом, находящимся в возбуждённом состоянии, при переходе в основное состояние. Первоначальный переход вещества из основного в возбуждённое состояние происходит при этом виде люминесценции за счёт поглощения им световой энергии при облучении ультрафиолетовым, видимым или иным электромагнитным излучением (рис. 18). Флуоресценция органических соединений охватывает спектральную область от 200 до 830 нм.

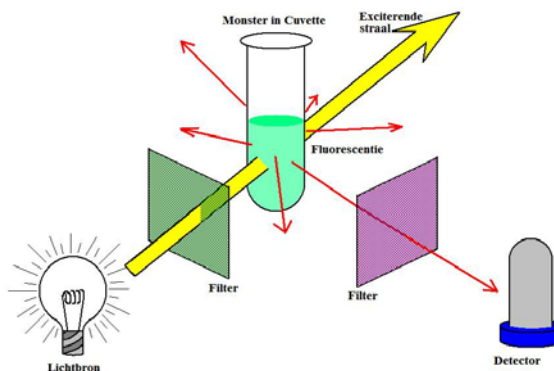


Рисунок 18. Принципиальная схема флуориметра.

Флуоресцентные методы основаны на способности веществ флуоресцировать в УФ-свете. Эта способность обусловлена структурой либо самих органических соединений, либо продуктов их диссоциации, сольволиза и других превращений, вызванных воздействием различных реактивов. Флуориметрия может быть использована как для качественного, так и для количественного анализа. Количественный анализ выполняют на спектрофлуориметрах. Принцип их работы состоит в том, что свет от ртутно-кварцевой лампы через первичный светофильтр и конденсор падает на кювету с раствором испытуемого вещества. Интенсивность флуоресценции измеряется в условных единицах, пропорциональных отклику детектора.

Для подтверждения формирования тройного комплекса На-Гиалуронат–Маггемит–Докс использовали методы флуориметрии и УФ-спектроскопии.

Типичные спектры флуоресценции Докс, системы На-Гиалуронат–Маггемит–Докс, а также Докс в присутствии исходного На-Гиалуроната представлены на рис. 19.

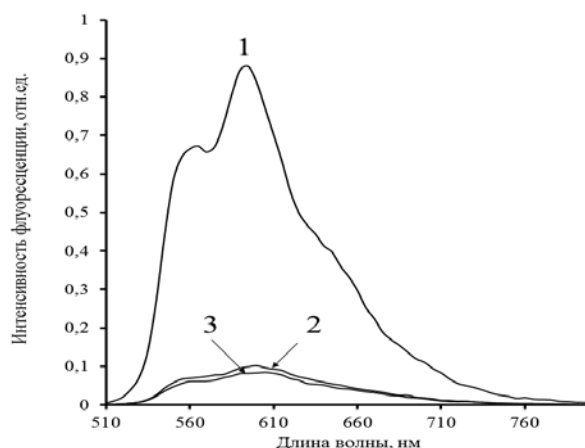


Рисунок 19. Спектры флуоресценции водных растворов Докс (1); Докс в присутствии композита Na/Гиалуронат–Маггемит (2); Докс в присутствии Na/Гиалуроната (3). Концентрация Докс $1,8 \times 10^{-5}$ М. Концентрация звеньев Na/Гиалуроната в растворе композита $1,8 \times 10^{-4}$ М. Концентрация звеньев Na/Гиалуроната $1,8 \times 10^{-4}$ М.

Спектр флуоресценции Докс содержит широкие интенсивные полосы с максимумами при $\lambda = 540$ и 590 нм.

Как следует из рис.19, в спектре флуоресценции Докс в присутствии композита Na-Гиалуронат–Маггемит наблюдается практически полное тушение флуоресценции. Следует отметить, что значительное тушение флуоресценции Докс характерно в присутствии всех полученных композитов Na-Гиалуронат–Маггемит, характеризующихся различным содержанием неорганической фазы.

Практически полное тушение наблюдается также в спектре флуоресценции Докс в присутствии исходного Na-Гиалуроната (рис.19).

Дополнительная информация о связывании Докс магнитными композитами Na-Гиалуронат–Маггемит с различным содержанием неорганической фазы была получена методом УФ-спектроскопии.

Типичные УФ-спектры исходного Докс, системы Na/Гиалуронат–Маггемит–Докс, а также Докс в присутствии исходного Na/Гиалуроната представлены на рис. 20.

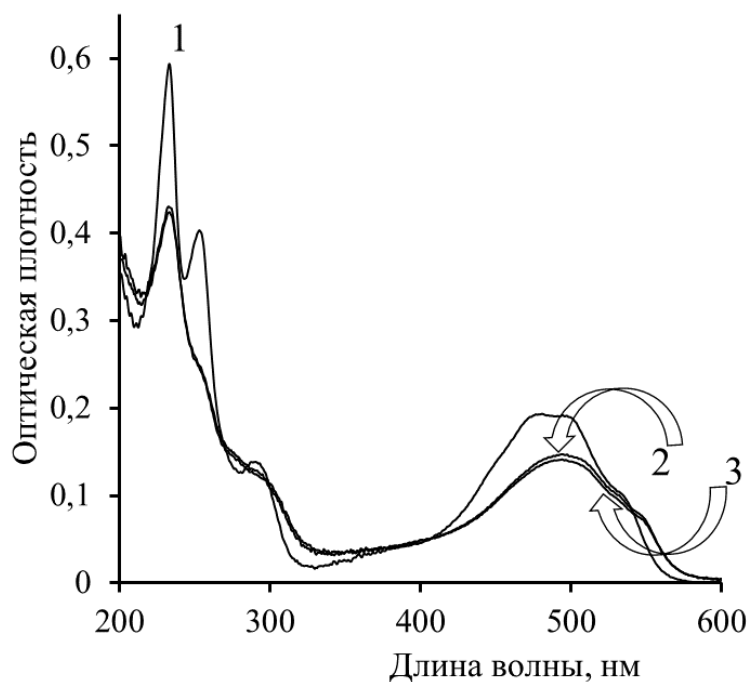


Рис.20 УФ-спектры водных растворов Докс (1); Докс в присутствии композита Na/Гиалуронат–Маггемит (2); Докс в присутствии Na/Гиалуроната (3). Концентрация Докс $1,8 \times 10^{-5}$ М. Концентрация звеньев Na/Гиалуроната в растворе композита $1,8 \times 10^{-4}$ М. Концентрация звеньев Na-Гиалуроната $1,8 \times 10^{-4}$ М.

УФ-спектр Докс содержит полосы поглощения с максимумами при $\lambda = 215, 240, 290$ и 470 нм.

Как следует из рис. 20, в УФ-спектре Докс в присутствии композита Na/Гиалуронат–Маггемит присутствуют полосы поглощения с максимумами $\lambda = 215, 290$ и 470 нм. При этом в УФ-спектре Докс в присутствии композита Na/Гиалуронат–Маггемит наблюдается резкое уменьшение интенсивности полосы при $\lambda = 240$ нм. Следует отметить, что значительное уменьшение полосы поглощения Докс при $\lambda = 240$ нм имеет место в присутствии всех полученных композитов Na-Гиалуронат–Маггемит, характеризующихся различным содержанием неорганической фазы.

Значительное уменьшение полосы поглощения ДОКС при $\lambda = 240$ нм наблюдается также в УФ-спектре Докс в присутствии Na-Гиалуроната.

На основании полученных результатов показано, что при смешении водных растворов Докс и композитов Na-Гиалуронат–Маггемит с различным содержанием неорганической фазы имеет место существенное тушение флуоресценции, а также резкое уменьшение интенсивности полосы поглощения при $\lambda = 240$ нм в УФ-спектре лекарства. При этом характеристики

полос поглощения в УФ-спектрах трёхкомпонентных систем Na-Гиалуронат–Маггемит–ДОКС, содержащих различное количество магнитной фазы при $\lambda = 215, 290$ и 470 нм практически не изменяются. Обнаруженные результаты свидетельствуют о формировании тройных композитов Na/Гиалуронат–Маггемит–Докс, сопровождающимся статическим тушением флуоресценции лекарства. Движущей силой комплексообразования является, с электростатическое взаимодействие COO^- -групп в составе композита Na/Гиалуронат–Маггемит, а также исходного Na-Гиалуроната, с заряженными NH_2^+ -группами в составе Докс.

Схема формирования тройного композита Na/Гиалуронат–Маггемит–Докс представлена на рис. 21.

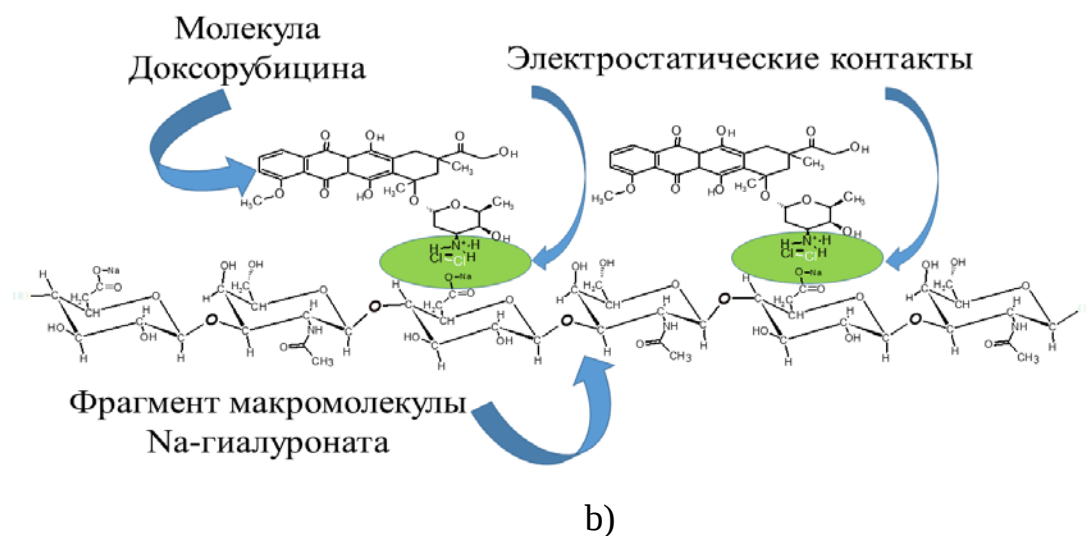
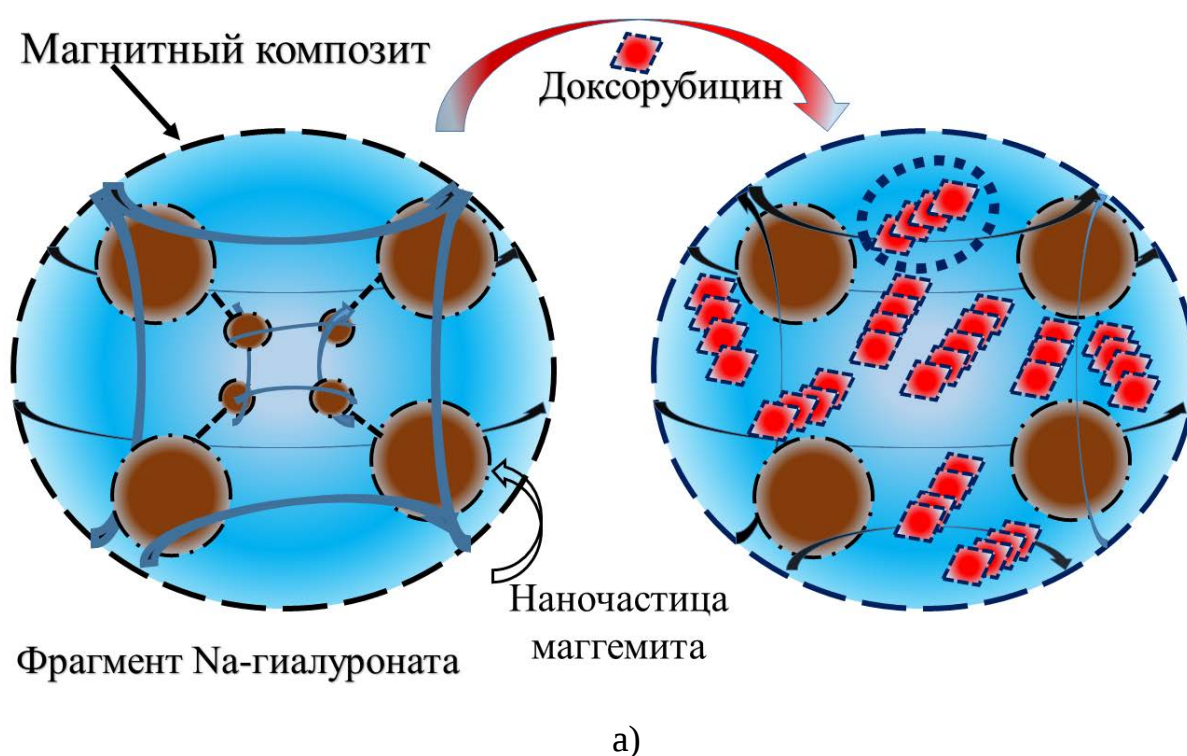


Рисунок 21. Схема формирования тройного композита На-Гиалуронат–Маггемит–Докс. (а) Иммобилизация молекул Докс частицей композита На/Гиалуронат–Маггемит; (b) Электростатические контакты между карбоксильными группами фрагмента полисахарида в составе композита На-Гиалуронат–Маггемит и протонированной амино-группой в составе молекулы Докс.

Дополнительная информация о морфологии тройной системы На-гиалуронат–маггемит–Докс была получена методом СЭМ (рис. 22). Для исследования был выбран композит На-гиалуронат–маггемит–Докс (9,7 % вес. магнитной фазы), соотношение звено На-гиалуронат/Докс составило 1/1.

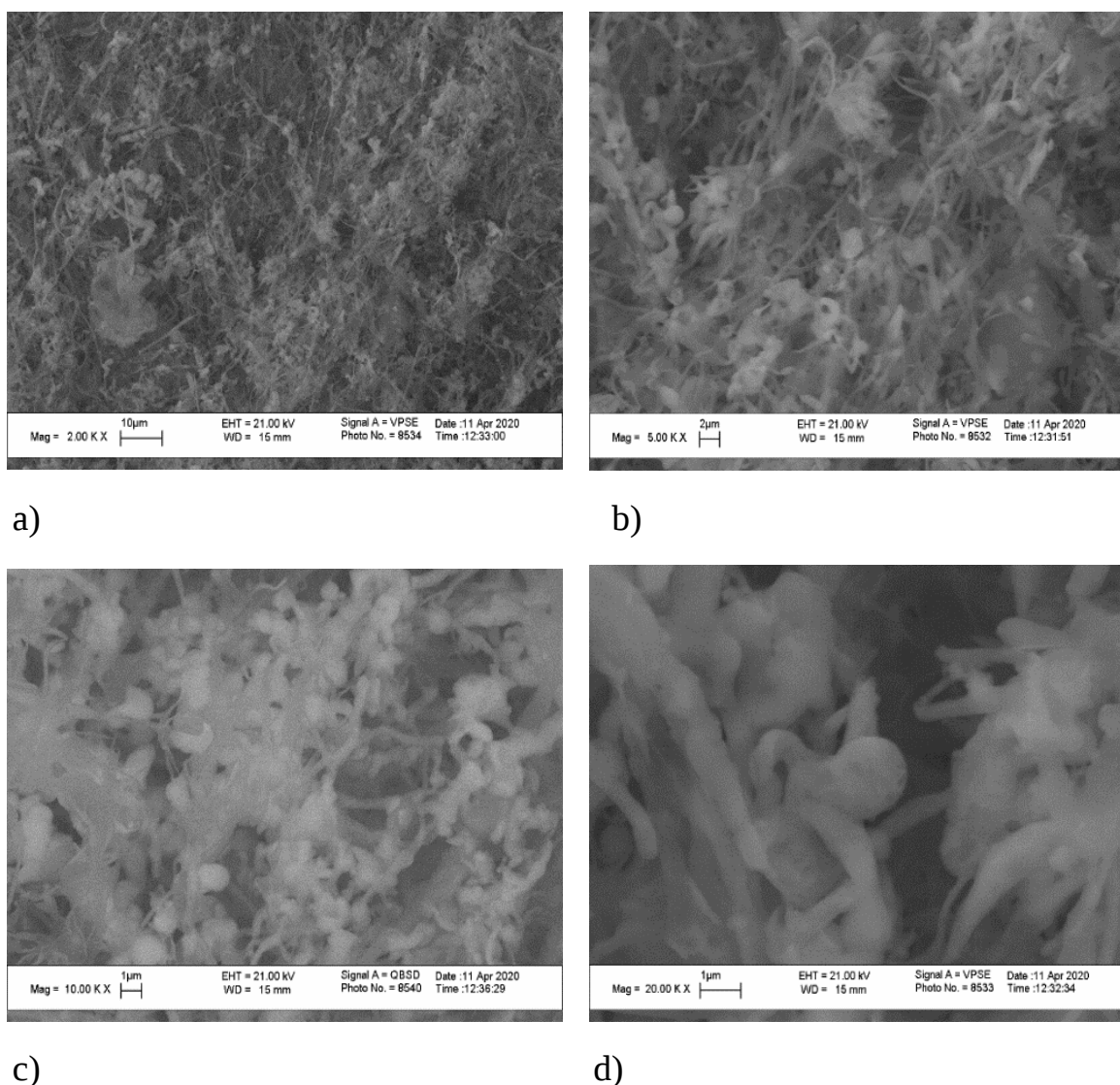


Рисунок 22. СЭМ-изображения в различных масштабах (a, b, c, d) нанокompозита На-гиалуронат–маггемит–Докс (9,7 % вес. магнитной фазы), соотношение звено На-гиалуронат/Докс 1/1.

Установлено, что в процессе синтеза тройной системы На-гиалуронат–маггемит–Докс происходит формирование надмолекулярной

микропористой структуры. В свою очередь, микропористая структура, обусловлена появлением индивидуальных частиц композитов Na-гиалуронат–маггемит–Докс. Показано, что диаметр индивидуальных частиц Na-гиалуронат–маггемит–Докс составляет ~250 нм.

Выводы

1. Разработан одностадийный способ получения полимерных нанокомпозитов на основе натриевой соли гиалуроновой кислоты и наночастиц маггемита. Получены нанокомпозиты с различным содержанием магнитной неорганической фазы.

2. Методом просвечивающей электронной микроскопии показано, что во всех полученных композитах размер неорганических наночастиц не зависит от условий получения и составляет около 10 нм.

3. Методом магнитометрии продемонстрирован рост намагниченности насыщения полимерного нанокомпозитов Na-гиалуронат–маггемит с увеличением массового содержания железа в них.

4. При растворении в солевом растворе нанокомпозиты формируют коллоидные дисперсии микрогелевых частиц со средним гидродинамическим радиусом 100–200 нм и отрицательно заряженной поверхностью.

5. Показано, что магнитные нанокомпозиты способны иммобилизовать доксорубицин, использующийся в качестве противоопухолевого лекарственного препарата.

Список литературы

1. G. Bate "Recording materials". In ferromagnetic materials. vol.2, Chap.7, E.P. Wohlfarth (ed), North-Holland, 1980
2. M.P. Sharrock. Particulated recording media. MRS Bulletin March, 53-61 Fine particle science and technology: From micro to nanoparticles. NATO ASI Series Pelezzetti (ed), vol.12, Kluwer Academic Publisher, 1995
3. C.J. Serna and M.P. Morales. Maghemite (γ -Fe₂O₃): A versatile magnetic colloidal material. Surface and colloid science, 2004
4. Topchieva I.N. Spiridonov V.V., Zakharov A.N., Afanasov M.I., Mironov A.V., Perov N.S., Semisalova A.S. // Mendeleev Communications. 2015. V. 25. № 2. P. 145.
5. Михайлов В.И. «Получение и физико-химические свойства материалов на основе нанодисперсных оксидов алюминия и железа (III)», 2016
6. Практикум по неорганической химии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / В.А. Алешин, К.М. Дунаева, А.И. Жиров и др.; под ред. Ю.Д. Третьякова. М.: Академия, 2004, 384 с.
7. Неорганическая химия: в 3 т. / под ред. Ю.Д. Третьякова. Т. 2: Химия непереходных элементов: учеб. для студ. высш. учеб. заведений / А.А. Дроздов, В.П. Зломанов, Г.Н. Мазо, Ф.М. Спиридонов. М.: Академия, 2004, 368 с.
8. S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller// Chemical reviews. 2008. V.108. №6. P.2064.
9. Vlasova I. M., Kuleshova A. A., Saletsky A. M. // Moscow University Physics Bulletin. 2011. V.66. №5. P.453-457.
10. L.H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur// Chemical reviews. 2012. V.112. №11. P.5818.
11. M. Taylor, G. Mpourmpakis // Thermodynamic stability of ligand-protected metal nanoclusters., 2017, Nature Communications, 8, 15988.
12. Лапшин М.А. «Получение высокодисперсного оксида железа и катализатора среднетемпературной конверсии монооксида углерода на его основе», на правах рукописи, 2019
13. Raphael Janot, Daniel Guerard // Journal of Alloys and Compounds. 2002. V. 303. P.302
14. Ю.В. Карякин, И.И. Ангелов «Чистые химические вещества», М. Химия, стр. 95-101, 1974
15. J.K. Vassiliou, V. Mehrotra, M.W. Russell and E.P. Giannelis. Red Shift in Optical Absorption Tall and Superparamagnetism of gamma-Fe₂O₃ Nanoparticles in a Polymer Matrix, page 20-30, 1993

16. В.А. Герасин, Е.М. Антипов «Новые подходы к созданию гибридных полимерных нанокомпозитов», Успехи химии, стр. 303-332, 2013
17. В.Н. Хабаров, П.Я. Бойков, М.А. Селянин «Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине». М.: Практическая медицина, стр. 224, 2012
18. Spiridonov V.V., Panova I.G., Makarova L.A., Zezin S.B., Novakova A.A., Baluyan T.G., Sybachin A.V., Kuznetsov V.V., Yaroslavov A.A.: Magneto-sensitive hybrid nanocomposites of water-soluble sodium alginate cross-linked with calcium ions and maghemite, Express polymer Letters, 12, 452-461, 2018
19. S. Inamdar, H.-S. Choi, M.-S. Kim, K. Chaudhari and J.-S. Yu, CrystEngComm, 257, 2012
20. D. Li, W.Y. Teoh, C. Selomulya, R.C. Woodward, P. Munroe and R. Amal, J. Mater. Chem., 126, 2007
21. M. Filippousi, T. Altantzis, G. Stefanou, M. Betsiou, D.N. Bikiaris, M. Angelakeris, E. Pavlidou, D. Zamboulis and G. Van Tendeloo, RSC Adv., 2013
22. В.Н. Никифоров, Медицинские применения магнитных наночастиц, Известия академии Инженерных Наук им. А.М. Прохорова (1), 23-34, 2013
23. В.Н. Хабаров «Гиалуроновая кислота в инъекционной косметологии», М.: ГЭОТАР-Медиа, стр. 11-30, 2017
24. M.V. Kitaeva, N.S. Melik-Nubarov, F.M. Menger, A.A. Yaroslavov// Langmuir. 2004. V.20. №16. P.6575-6579.
25. Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, David C. Joy, Charles Fiori, Eric Lifshin, «Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis», New York and London, page 21-95, 1981
26. Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, David C. Joy, Charles Fiori, Eric Lifshin, «Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis», New York and London, page 190-296, 1981
27. E. Tronc, P. Prene, J.P. Jolivet, F. d'Orazio, F. Lucari, D. Fiorani et al. // Hyperfine Interactions. 1995. V. 95. P. 129-148
28. J. A. H. Coaquira A. F. R. Rodriguez J. G. Santos L. B. Silveira A. C. Oliveira V. K. et al. // Hyperfine Interact. 2007. V 176. P.113
29. S.Mørup, H.Topsøe. // Appl. Phys. 1976. V. 11. P. 63