



Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer



Institut »Jožef Stefan«

# **SINTEZA NANODELCEV SILICIJEVEGA DIOKSIDA Z VGRAJENIMI FLUORESCENČNIMI BARVILI**

---

Raziskovalna naloga na področju kemije in kemijske tehnologije

Avtorici: Lani Habjanič, Petra Ouček

Razred: 4. c

Mentorica: Mateja Godec, prof. kem.

Zunanji mentor: dr. Sebastjan Nemec

Ljutomer, februar 2024

## **Zahvala**

*Iskreno se zahvaljujeva šolski mentorici Mateji Godec, prof. kem., za usmerjanje, pomoč in svetovanje ob ustvarjanju raziskovalne naloge.*

*Hvala tudi zunanjemu mentorju dr. Sebastjanu Nemcu in doc. dr. Slavku Kralju z Instituta »Jožef Stefan« prav tako za usmerjanje, razlago in pomoč pri izdelavi raziskovalne naloge.*

*Hvala tudi Institutu »Jožef Stefan« za dostop do opreme in laboratorijev za izvedbo eksperimentalnega dela raziskovalne naloge.*

*Posebna zahvala gre tudi lektorju, mag. Saši Pergarju, ki je pregledal in izpolnil najino raziskovalno nalogu.*

*Zahvala gre seveda tudi staršem, ki so nama omogočili vse prevoze, ter prijateljem, ki so naju spodbujali in verjeli v naju.*

## **POVZETEK**

Nanotehnologija danes predstavlja eno izmed najpomembnejših tehnologij na svetu. Nanodelci pa so seveda njena glavna sestavina. V nalogi smo julija 2023 z uporabo Stöberjeve metode sintetizirali nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenimi tremi različnimi barvili, in sicer fluoresceinom, rodaminom in Eu-kompleksom. Pri tem smo na nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom ali Eu-kompleksom vezali na površino PEG-silan. Na posameznih vrstah nanodelcev, ki smo jih pripravili, smo opravili različne analize, določili smo koncentracijo delcev v suspenziji, izmerili hidrodinamsko velikost, izmerili elektrokinetični oziroma zeta potencial ter preverili fluorescenco.

**Ključne besede:** **nanodelci, silicijev dioksid, fluorescein, rodamin, Eu-kompleks**

## **ABSTRACT**

Nanotechnology is one of the most important technologies in the world today. And nanoparticles are its main component. In July 2023, using the Stöber method, we synthesized silicon dioxide nanoparticles with incorporated three different dyes, namely fluorescein, rhodamine and Eu-complex. We also bound PEG-silane to the surface of the nanoparticles with incorporated rhodamine or Eu-complex. We performed various analyses on individual types of nanoparticles, determined the concentration of particles in the suspension, measured the hydrodynamic size, measured the electrokinetic or zeta potential and checked the fluorescence.

**Key words:** **nanoparticles, silicon dioxide, fluorescein, rhodamine, Eu-complex**

# KAZALO VSEBINE

1.	UVOD .....	6
2.	TEORETIČNI DEL.....	7
2.1.	Nanotehnologija .....	7
2.2.	Nanodelci .....	7
2.3.	Silicijev dioksid .....	10
2.4.	Nanodelci silicijevega dioksida .....	12
2.4.1.	Sinteza .....	12
2.4.2.	Zgodovina.....	13
2.4.3.	Prilaganje lastnosti površine nanodelcev silicijevega dioksida .....	13
2.4.4.	Uporaba .....	14
2.5.	Fluorescenčna barvila.....	14
2.5.1.	Fluorescein .....	16
2.5.2.	Rodamin B .....	17
2.5.3.	Barvila z Eu-kompleksom .....	17
2.6.	Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenimi fluorescenčnimi barvili .....	18
3.	METODE DELA .....	20
3.1.	Material in pripomočki .....	20
3.2.	Sinteza nanodelcev silicijevega dioksida in vgradnja fluorescenčnih barvil.....	20
3.3.	Vezava PEG-silana na površino nanodelcev .....	23
3.4.	Analiza vzorcev .....	23
3.4.1.	Določanje koncentracije delcev v suspenziji .....	23
3.4.2.	Meritve hidrodinamske velikosti delcev .....	24
3.4.3.	Meritve elektrokinetičnega (zeta) potenciala .....	25
4.	REZULTATI DELA IN RAZPRAVA.....	26
4.1.	REZULTATI .....	26
4.1.1.	Koncentracija delcev v suspenziji.....	26
4.1.2.	Hidrodinamska velikost nanodelcev.....	26
4.1.3.	Elektrokinetični (zeta) potencial .....	30

4.2. Razprava .....	31
4.2.1. Predpriprava fluoresceina in rodamina v obliki, primerni za vgradnjo v nanodelce silicijevega dioksida .....	31
4.2.2. Koncentracija delcev v suspenziji.....	31
4.2.3. Hidrodinamska velikost nanodelcev.....	32
4.2.4. Elektrokinetični (zeta) potencial .....	32
4.2.5. Vgradnja fluorescenčnih barvil .....	33
5. ZAKLJUČEK.....	36
6. VIRI IN LITERATURA.....	37
6.1. VIRI SLIK .....	39

## SEZNAM SLIK

Slika 1: TEM slika nanodelcev silicijevega dioksida (vir: lasten arhiv; avtor posnetka doc. dr. Slavko Kralj) .....	9
Slika 2: SEM slika nanodelcev silicijevega dioksida (vir: lasten arhiv; avtor posnetka dr. Sebastjan Nemec) .....	10
Slika 3: Shematski prikaz tetraedrske enote silicijevega dioksida (vir: Shamiryan idr., 2004) .....	10
Slika 4: Silikagel paketki (vir: Amazon, b. d.) .....	11
Slika 5: Shema nastanka silicijevega dioksida iz TEOS (vir: lastni arhiv) .....	12
Slika 6: Barvni spekter fluoresceina (črtkana črta – absorbirana svetloba, polna črta – emitirana svetloba) (vir: ThermoFischer Scientific) .....	16
Slika 7: Kemijska struktura fluorescein-izotiocianata (vir: »Fluorescein«, 2022) .....	16
Slika 8: Formula rodamin-izotiocianata (vir: Merck, b. d.) .....	17
Slika 9: Kemijska struktura Eu-kompleksa, ki smo ga vgradili v nanodelce silicijevega dioksida. Na zgornjem delu strukture lahko opazimo silanski del, ki omogoča vgradnjo v strukturo silicijevega dioksida (vir: lastni arhiv) .....	18
Slika 10: Priprava prve raztopine za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida z Eu-kompleksom - dodajanje amonijaka (vir: Petra Ouček) .....	21
Slika 11: Priprava druge raztopine za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida z EU-kompleksom - dodajanje Eu-kompleksa v DMSO (vir: Petra Ouček) .....	21
Slika 12: Posedanje nanodelcev v centrifugiji (vir: Petra Ouček) .....	21
Slika 13: Posedeni nanodelci silicijevega dioksida z rodaminom v centrifugirkah (vir: Petra Ouček) ....	22

Slika 14: Nanodelci silicijevega dioksida z rodaminom v označeni centrifugirki (vir: Petra Ouček).....	22
Slika 15: Posedeni nanodelci silicijevega dioksida s fluoresceinom v centrifugirki (vir: Petra Ouček) ...	23
Slika 16: Nanodelci silicijevega dioksida s fluoresceinom v označeni centrifugirki (vir: Petra Ouček) ...	23
Slika 17: Tehtanje aluminijastih vsebnikov pred dodajanjem vzorcev nanodelcev (vir: Petra Ouček) ...	24
Slika 18: Vzorci na nodelcev v aluminijastih vsebnikih pred odparitvijo vode (vir: Petra Ouček) .....	24
Slika 19: Pripromočki za pripravo vzorcev za analizo hidrodinamske velikosti delcev na aparaturi Litesizer 500 (Anton Paar) - Omega kiveta, čepki in brizga (vir: Petra Ouček) .....	25
Slika 20: Aparatura Litesizer 500 (Anton Paar) (vir: Anton Paar, b. d.) .....	25
Slika 21: Merjenje pH vrednosti vzorca nanodelcev na aparaturi pH meter 913 (Metrohm) (vir: Petra Ouček) .....	25
Slika 22: Vzorca nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil (levo) in SiND6-F (desno) pod UV lučko (vir: Petra Ouček).....	34
Slika 23: Vzorci nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil (levo), SiND6-Eu (na sredini) in SiND6-Eu-PEG (desno) pod UV lučko (vir: Petra Ouček).....	34
Slika 24: Vzorci nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil (levo), majhna centrifugirka z Eu-kompleksom, SiND6-R (velika centrifugirka na sredini) in SiND6-R-PEG (desno) pod lučko (vir: Petra Ouček).....	35

## SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Porazdelitev velikosti na nodelcev SiND6-F po intenziteti .....	27
Graf 2: Porazdelitev velikosti na nodelcev SiND6-R po intenziteti.....	28
Graf 3: Porazdelitev velikosti na nodelcev SiND6-R-PEG po intenziteti.....	28
Graf 4: Porazdelitev velikosti na nodelcev SiND6-Eu po intenziteti .....	29
Graf 5: Porazdelitev velikosti na nodelcev SiND6-Eu-PEG po intenziteti .....	29

## SEZNAM TABEL

Tabela 1: Izračunana povprečja mas in masnih koncentracij posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida .....	26
Tabela 2: Povprečja podatkov hidrodinamske velikosti posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida.....	27
Tabela 3: Povprečja podatkov elektrokinetičnega (zeta) potenciala posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida .....	30

## 1. UVOD

Nanotehnologija je dandanes vedno pomembnejša tudi v našem vsakdanjem življenju, četudi se tega ne zavedamo. Omogoča nam raziskovanje delcev na nanometrski ravni, posledično tudi njihovo manipulacijo. Tako lahko nanomateriale preoblikujemo in spremenimo do oblik, ki jih lahko uporabimo v praktičnih aplikacijah. Nanodelci pri tem opravljajo glavno vlogo in so hkrati prav tisti, katerih lastnosti in obliko lahko spremojamo. Tako smo se odločili sintetizirati nanodelce, natančneje nanodelce silicijevega dioksida. Silicijev dioksid je kot material v veliki meri zastopan povsod okoli nas, in sicer v kamninah, steklu in prav vsem poznanih silikagel paketkih za odstranjevanje vlage.

Odločili smo se sintetizirati nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenimi tremi različnimi fluorescenčnimi barvili, in sicer fluoresceinom, rodaminom in Eu-kompleksom. Slednje smo vgradili z namenom, da omogočimo njihovo lažje opazovanje v bioloških sistemih, predvsem za diagnosticiranje na podlagi tkiv, torej za medicinsko slikanje (ang. medical imaging). Tem nanodelcem smo za vpliv na naboj na površini in za dodatno koloidno stabilizacijo nato na površino vezali še PEG-silan. Pri tem smo raziskovali koncentracijo sintetiziranih nanodelcev v suspenziji, njihovo hidrodinamsko velikost, zeta potencial ter fluorescenco.

Cilj naloge je bil sintetizirati nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenim posameznim fluorescenčnim barvilm, na površino vezati PEG-silan ter nato sintetizirane nanodelce ovrednotiti in jih med seboj primerjati. Pri tem smo definirali tri hipoteze, ki so naštete v nadaljevanju.

### HIPOTEZE:

1. Sintetiziramo lahko nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenimi različnimi fluorescenčnimi barvili.
2. Vgradnja fluorescenčnega Eu-kompleksa poveča velikost nanodelcev silicijevega dioksida v večji meri kot vgradnja preostalih dveh fluorescenčnih barvil.
3. Vezava PEG-silana na površino nanodelcev silicijevega dioksida poveča hidrodinamsko velikost nanodelcev silicijevega dioksida za 10 ali več odstotkov ne glede na vgrajeno fluorescenčno barvilo.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1. NANOTEHNOLOGIJA

Pojem nanotehnologija je v *Slovarju slovenskega knjižnega jezika*<sup>2</sup> definiran takole:

»NÁNOTEHNOLOGÍJA – tehnologija, ki se ukvarja z raziskovanjem, ustvarjanjem miniaturnih predmetov v razsežnostih milijardink metra« (Fran, 2014).

V drugih virih je nanotehnologija definirana tudi kot veja znanosti in vrsta tehnologije, ki raziskuje sisteme in materiale na nanometrskem nivoju (Bhushan, 2017). Nanotehnologija je interdisciplinarna panoga, ki zajema več različnih področij, kot so fizika, kemija in biologija (Britannica, b. d.).

Materiali nanometrskih dimenzij imajo zaradi svoje majhnosti edinstvene lastnosti, ki se lahko bistveno razlikujejo od lastnosti večjih delcev kljub enaki kemijski sestavi. Te edinstvene lastnosti omogočajo razvoj novih inovativnih aplikacij, ki ne bi bile mogoče z uporabo večjih delcev (Adya in Canetta, 2014).

Področje nanotehnologije je v zadnjih desetletjih doživelo hiter razvoj, pri čemer so številni materiali in procesi, ki so se izvajali oz. se izvajajo na nanometrskem merilu, prešli iz laboratorijev v vsakodnevne izdelke. Hiter razvoj so omogočile tudi nove tehnike priprave nanodelcev in navsezadnje zmožnost opazovanja nanodelcev, ki so zaradi svoje majhne velikosti našim očem skriti. Tako dandanes nanotehnologija veliko obeta na vsakodnevnih komercialnih področjih, kot so elektronika, energetika, okolje in prehrana, pa tudi na zdravstvenih področjih, kot je biomedicina (Moore, 2023).

### 2.2. NANODELCI

Nanodelci so po definiciji delci z velikostjo običajno med 1 in 100 nm. Človeško oko jih ne more opazovati. Nanodelci so razvrščeni v različne kategorije, najpogosteje glede na velikost, obliko in fizikalno-kemijske lastnosti materiala, iz katerega so sestavljeni. Nekatere razvrstitev nanodelcev ločujejo na organske in anorganske. Med organske nanodelce spadajo nanodelci iz organskih materialov, najpogosteje iz različnih polimerov, maščob in fosfolipidov. Podobno, med anorganske nanodelce spadajo nanodelci iz anorganskih materialov, kot so različne kovine, kovinski oksidi, ogljik idr. Nanodelce lahko razvrstimo tudi na trdne (npr. delci titanovega oksida in delci silicijevega oksida) ali mehke (liposomi, vezikli in nanokapljice).

Nanodelce odlikujeta velika mobilnost v prostem stanju in zelo velika specifična površina glede na prostornino. Prav slednja je njihova najpomembnejša fizikalna lastnost. Zelo velika specifična površina v primerjavi s prostornino je ključna lastnost, ki prvenstveno razlikuje nanodelce od delcev z večjo velikostjo (kljub enaki kemijski sestavi) in nanodelcem daje njihove edinstvene lastnosti. Velika večina procesov (v naravi, v našem telesu in drugod) namreč poteka na površinah, zato z uporabo materiala, ki imajo veliko površino v primerjavi s prostornino, lahko izboljšamo obstoječe aplikacije, pri katerih se uporabljajo sicer večji delci (in posledično z manjšo površino glede na prostornino delcev) oziroma razvijemo nove aplikacije, ki niso bile učinkovite zaradi uporabe večjih delcev s premajhno površino glede na njihovo prostornino (Dobson idr., 2024).

Kot smo omenili že zgoraj, nanodelcev zaradi njihove majhne dimenzije ne moremo opazovati s prostim očesom. Zato so za preučevanje njihove fizične dimenzije in morfologije njihove površine potrebne zmogljive analitske aparature, ki omogočajo opazovanje tako majhnih delcev. Primarni tehniki za

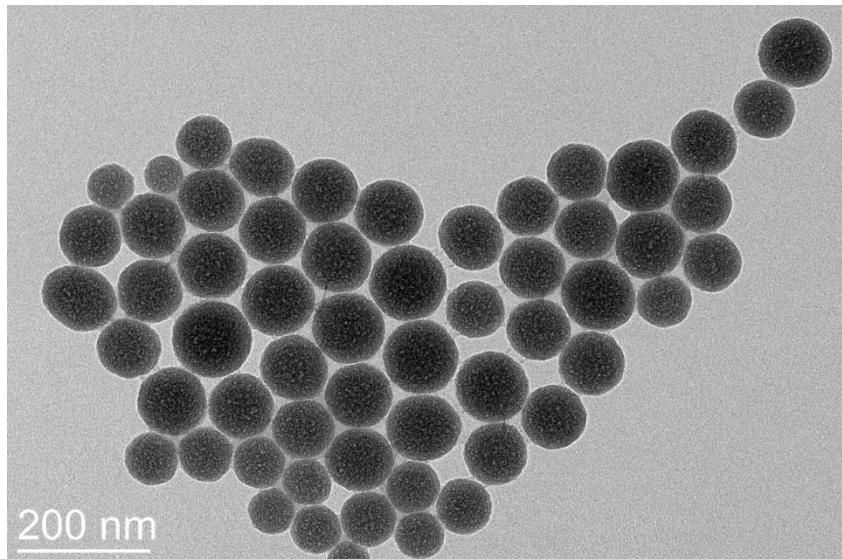
opazovanje nanodelcev sta presevna in vrstična elektronska mikroskopija. »Klasična« svetlobna mikroskopija, ki za opazovanje vzorcev uporablja snop vidne svetlobe, ne omogoča zadostne povečave in ločljivosti za natančno opazovanje struktur z velikostjo pod enim mikrometrom. Metode elektronske mikroskopije za opazovanje vzorcev uporabljajo snop elektronov, kar omogoča doseganje večjih povečav in ločljivosti ter tako omogoča opazovanje nanometrskih struktur. Presevna elektronska mikroskopija (TEM; ang. Transmission Electron Microscopy) temelji na opazovanju vzorcev, pri katerem snop elektronov preseva čez vzorec. Nasprotno, vrstična elektronska mikroskopija (SEM; ang. Scanning Electron Microscopy) s snopom elektronov obseva površino vzorca. S tehniko TEM pridobimo informacije iz notranjosti opazovanega vzorca, s tehniko SEM pa pridobimo informacije s površine vzorca. Ker TEM temelji na presevanju vzorca s snopom elektronov, je tehnika primerna za nanodelce in vzorce v obliki tankih plasti. Pri tehniki SEM, pri kateri opazujemo površino vzorcev, dimenzija vzorcev ne igra tako pomembne vloge. TEM omogoča večjo povečavo in večjo ločljivost kot SEM, SEM pa odlikuje visoka globinska ostrina in natančno opazovanje površine vzorcev. Tako pri TEM kot pri SEM lahko z uporabo t. i. metode spektroskopije s sisanjem rentgenskih žarkov (EDS) določamo kemijsko sestavo opazovanih vzorcev. Pri obsevanju vzorcev s snopom elektronov se del elektronov odbije od vzorca v obliki rentgenskih žarkov z valovnimi dolžinami značilnimi za elemente, ki se nahajajo v vzorcu (Eurolab, b. d.; Jeran M. idr., 2019).

Nanodelce pogosto uporabljamo oziroma shranjujemo v obliki suspenzij. Suspenzija je dvofazni sistem, v katerem so nanodelci dispergirana faza, topilo (najpogosteje voda) pa je disperzni medij. Med posameznimi delci v suspenziji se tvorijo različne interakcije, kot so privlačne in odbojne sile. Obe vrsti sil sta odvisni od kemijskih lastnosti površine nanodelcev oziroma od površinske nabitosti nanodelcev. V primeru nezadostnega odboja med posameznimi nanodelci se ti združijo v večje skupke (nanodelci agregirajo v aggregate), ki hitreje sedimentirajo. Taki nanodelci tvorijo koloidno nestabilno suspenzijo. Večji agregati prav tako izgubijo atraktivne lastnosti nanodelcev, zato je zaželeno, da nanodelci med seboj tvorijo odbojne sile in je tako preprečeno njihovo združevanje v aggregate. Sile med nanodelci izvirajo (med drugim tudi) iz elektrostatskega naboja na površini nanodelcev in tam se enoznačni naboji med seboj odbijajo. Elektrostatske lastnosti površine nanodelcev, tj. vrsta in moč naboja na površini nanodelcev, se preučujejo z določanjem elektrokinetičnega oziroma zeta potenciala nanodelcev. Zeta potencial pa je merilo za velikost elektrostatičnega ali nabojnega odboja oz. privlaka med delci. Pozitiven zeta potencial nakazuje na prisotnost oziroma prevlado pozitivnega naboja na površini nanodelcev. Enako velja za negativen zeta potencial, ki nakazuje na prisotnost oziroma prevladovanje negativnega zeta potenciala. Večja kot je absolutna vrednost zeta potenciala, močnejše odboje sile so prisotne med nanodelci in boljša je koloidna stabilnost nanodelcev. Na zeta potencial primarno vplivajo: kemijska sestava površine nanodelcev, pH-vrednost in ionska jakost medija, v katerem so nanodelci dispergirani. Drugi način za povečanje odbojnih sil med nanodelci, ki ne vključuje elektrostatičnega naboja, je uporaba t. i. sterične stabilizacije. V tem primeru se na površino veže velike in pogosto voluminozne ter razvejane molekule, ki s svojo veliko strukturo povzročijo, da posamezni nanodelci med seboj ne morejo priti v stik in tvoriti agregatov. Kadar želimo imeti nanodelce v vodi v obliki vodne suspenzije, se na površino veže hidrofilne molekule, kot je PEG (polietilen glikol). Kadar želimo imeti nevodne suspenzije, pa se veže hidrofobne molekule, kot so razne maščobne kislina (Malvern Panalytical, b. d.).

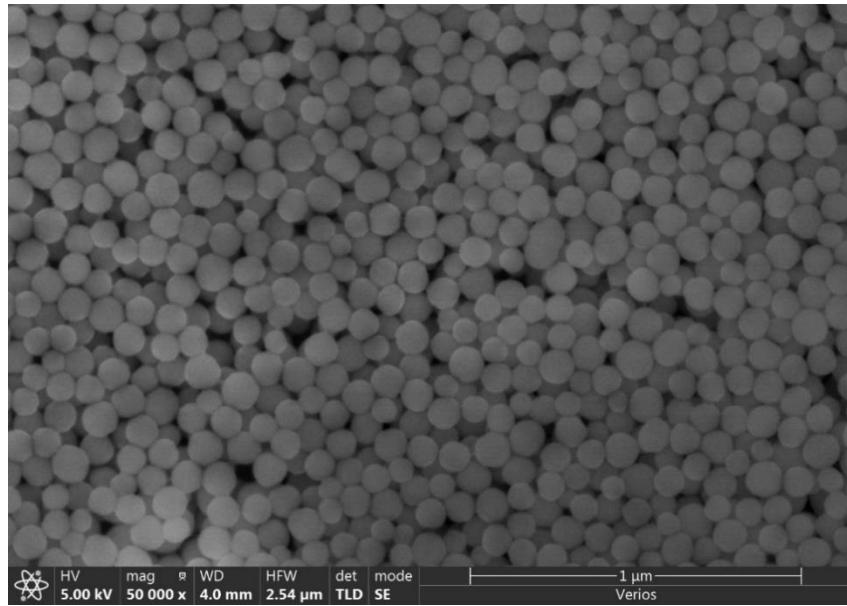
Za določevanje velikosti nanodelcev obstaja več različnih metod analize. Poleg že omenjenih tehnik elektronske mikroskopije (TEM in SEM) se za določanje velikosti nanodelcev pogosto uporablja t. i. dinamično sisanje svetlobe (DLS). Metoda DLS deluje tako, da laserski žarek osvetli vzorec in nato

detektor zazna nihanje razpršene svetlobe pri znanem kotu sipanja svetlobe. Z računalniško obdelavo podatkov se izračuna t. i. hidrodinamsko velikost delcev. Hidrodinamska velikost nanodelcev je običajno nekoliko večja od dejanske velikosti nanodelcev, ki jo določimo z uporabo elektronske mikroskopije. Ko se delci nahajajo v tekočini v obliki suspenzije, se na njihovi površini tvori plast vode (ter drugih molekul in ionov, ki se nahajajo v disperznem mediju) in ta plast vode se premika z nanodelcem. Metoda DLS tako določi velikost delcev vključno s plastjo, ki se nahaja na površini nanodelcev. Zato je hidrodinamska velikost delcev nekoliko večja od dejanske (LS Instruments, b. d.).

*Sliki 1 in 2* prikazujeta nanodelce silicijevega dioksida. *Slika 1* je bila pridobljena s TEM, *Slika 2* pa s SEM. Na *Sliki 1* lahko opazimo tudi nekaj podrobnosti iz notranjosti nanodelcev, ker pri tehniki TEM snop elektronov preseva čez vzorec. Na *Sliki 2*, ki je bila pridobljena s tehniko SEM, pri kateri snop elektronov obseva površino nanodelcev, lahko podrobno opazujemo površino nanodelcev. Obe sliki sta bili posneti na Centru za mikroskopijo in mikroanalizo na Institutu »Jožef Stefan«. *Slika 1* je bila posnetna na presevnem elektronskem mikroskopu JEM-2100 (JEOL, Japonska), posnel pa jo je doc. dr. Slavko Kralj. *Slika 2* je bila posnetna na vrstičnem elektronskem mikroskopu VERIOS 4G HP (Thermo Fischer, ZDA), posnel pa jo je dr. Sebastjan Nemec.



*Slika 1: TEM-slika nanodelcev silicijevega dioksida (vir: lasten arhiv; avtor posnetka doc. dr. Slavko Kralj)*

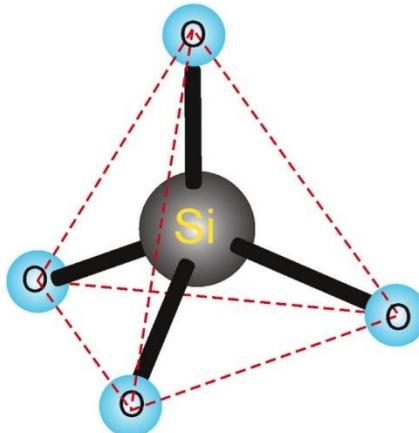


Slika 2: SEM-slika nanodelcev silicijevega dioksida (vir: lasten arhiv; avtor posnetka dr. Sebastjan Nemec)

### 2.3. SILICIJEV DIOKSID

Silicijev dioksid oziroma silika (iz ang. silica) je sestavljen iz silicija in kisika ter je glavna sestavina zemeljske skorje. Splošna kemijska formula za silicijev dioksid je  $\text{SiO}_2$  in predstavlja razmerje med silicijem in kisikom v silicijevem dioksidu. Skupaj z oksidi magnezija, aluminija, kalcija in železa silicijev dioksid tvori številne silikatne minerale, ki sestavljajo kamnine. Čisti silicijev dioksid se lahko nahaja v različnih oblikah, ki obsegajo tako kristalne kot amorfne oblike. Skupna vsem oblikam silicijevega dioksida je kemijska struktura, v kateri je en atom silicija obdan s štirimi atomi kisika z enojnimi kovalentnimi vezmi.

Glavni gradnik silikatnih struktur je tetraeder  $\text{SiO}_4$ , v katerem je v središču silicijev ion, okoli njega pa so razporejeni štirje kisikovi atomi. V vseh oblikah silicijevega dioksida se pojavlja vez Si-O, ki je druga najmočnejša kemijska vez med atomom silicija in atomom drugega elementa (najmočnejša je Si-F) (Horacio E. Bergna idr., 1994).



Slika 3: Shematski prikaz tetraedrske enote silicijevega dioksida (vir: Shamiryan idr., 2004)

Silicijev dioksid je v vodi in raztopinah kislin slabo topen z izjemo fluorovodikove kisline. Silicijev dioksid reagira s fluorovodikovo kislino (in elementarnim fluorom), pri čemer nastaja plinasti silicijev tetrafluorid. Zato kot zanimivost velja navesti, da fluorovodikove kisline ne shranujemo v steklenicah. Silicijev dioksid se bolje razaplja v koncentriranih raztopinah močnih baz, kot sta natrijev in kalijev hidroksid, kjer poteka poleg razapljanja tudi hidroliza silicijevega dioksida v silicijevo kislino. Sam silicijev dioksid je kisel, ker vsebuje na svoji površini kisle silanolne skupine (Si-OH).

V osnovi obstaja silicijev dioksid v dveh oblikah, kristalni in amorfni. Silicijev dioksid v kristalni obliki predstavljajo predvsem minerali, kot so kremen, kristobalit in tridimit, v amorfni obliki pa kvarčno steklo, diatomejska prst in silikagel (Planinšek, 2006). Glede na ti obliki se silicijev dioksid deli še na naravno ali sintetično pridobljenega.

Silicijev dioksid izkazuje zelo nizko toksičnost, zato se uporablja na številnih področjih. Človek je pričel uporabljati silicijev dioksid oziroma kremen že v pradavnini za izdelavo prvih orodij in orožij. Do današnjega dne se je uporaba silicijevega dioksida močno razširila. Tako se v današnjem času silicijev dioksid v daleč največji meri uporablja v obliki kremenčevega peska v gradbeništvu za izdelavo betona in v steklarstvu za izdelavo stekla. Poleg tega se amorfne oblike silicijevega dioksida pogosto uporabljajo v številnih aplikacijah na področju prehrambne industrije za bistrenje pijač ter na področju kozmetične in farmacevtske industrije kot polnila, za vezavo vode ter kot pomožne snovi pri izdelavi različnih kozmetičnih pripravkov in zdravil. Za vezavo vode se uporablja t. i. silikagel (*Slika 4*), ki je oblika silicijevega dioksida z visoko stopnjo poroznosti. Silicijev dioksid se uporablja še na številnih drugih področjih. Omenimo lahko njegovo uporabo v obliku izjemno lahkega in visoko izolativnega aerogela, ki se uporablja v vesoljski industriji. Med drugim se silicijev dioksid uporablja še za izdelavo vlaknaste keramike, poliranje silicijevih ploščic, za izdelavo silikonske gume, posebnih premazov, za separatorje v baterijah, pesticidih, katalizatorjih itd. (Horacio E. Bergna idr., 1994).



*Slika 4: Paketki silikagela (vir: Amazon, b. d.)*

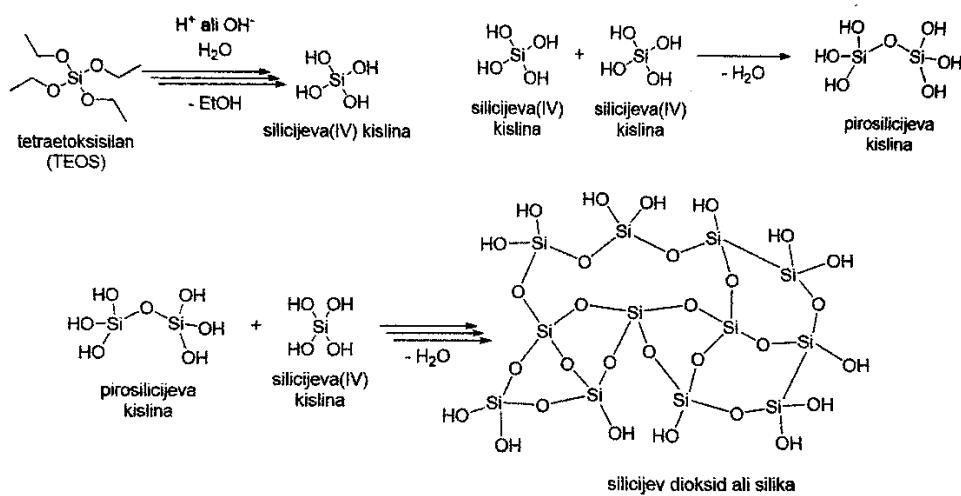
Biološka vloga silicijevega diokside oziroma natančneje silicija pri višje razvitih organizmih, kot je človek, še ni popolnoma razjasnjena (Farooq, 2015) . Vloga silicija v drugih organizmih, kot so rastline, določene vrste praživali, morske spužve in diatomeje, je natančno dokazana in pojasnjena. Rastline silicijev dioksid uporabljajo za utrditev stebel in oblikovanje trnov, diatomeje in morske spužve pa iz silicijevega dioksida oblikujejo ogrodne strukture (Horacio E. Bergna idr., 1994).

## 2.4. NANODELCI SILICIJEVEGA DIOKSIDA

Nanodelci silicijevega dioksida so najpogosteje sferični delci z enotno velikostjo do 100 nm oziroma 1000 nm premera. Z natančnim prilagajanjem postopkov sinteze lahko spremojamo njihovo velikost in pripravimo tudi nanodelce z različno stopnjo poroznosti, ki sega od oblik z zelo nizko poroznostjo oziroma kompaktno strukturo do oblik z visoko stopnjo poroznosti, to so t. i. mezoporozni nanodelci silicijevega dioksida (Li idr., 2022).

### 2.4.1. Sinteza

Obstaja več različnih postopkov s katerimi lahko sintetiziramo nanodelce silicijevega dioksida. Najpogosteje uporabljene metode so: sol-gel metoda, h kateri spada tudi t. i. Stöberjeva sinteza nanodelcev silicijevega dioksida, plamenska sinteza nanodelcev in sinteza nanodelcev z uporabo mikroemulzij. Stöberjeva metoda je najpogosteje uporabljena metoda sinteze nanodelcev silicijevega dioksida zaradi svoje relativne enostavnosti, neuporabe strupenih in nevarnih kemikalij ter zaradi možnosti uvajanja enostavnih sprememb, kar omogoča pripravo nanodelcev različnih velikost. Stöberjeva metoda sinteze temelji na sintezi nanodelcev silicijevega dioksida iz tetraetoksisilana (TEOS), ki je izhodna snov, iz katere silicijev dioksid nastane. Reakcija poteka v zmesi etanola in vode. Dodan je še bazični katalizator, običajno amoniak ali natrijev hidroksid, ki sproži nastanek trdnega silicijevega dioksida iz TEOS. Bazični katalizator pospeši hidrolizo etoksi skupin iz TEOS in nastanek silicijeve kisline  $\text{Si}(\text{OH})_4$ . Molekule silicijeve kisline se nato povežejo med seboj (kondenzirajo) v oligomere silicijevega dioksida. Nastali oligomeri nadaljujejo s povezovanjem in tvorijo končno strukturo silicijevega dioksida. S spremjanjem razmerja med etanolom in vodo ter s spremjanjem količine dodanega bazičnega katalizatorja in spremjanjem količine uporabljenega TEOS lahko uravnavamo hitrost nastanka silicijevega dioksida in tako spremojamo velikost nastalih nanodelcev silicijevega dioksida (Lberman, 2014).



Slika 5: Shema nastanka silicijevega dioksida iz TEOS (vir: lastni arhiv)

Plamenska sinteza nanodelcev silicijevega dioksida temelji na plamenski reakciji med silicijevim tetrakloridom in kisikom (Barthel H. idr., 2005).

Sinteza nanodelcev v mikroemulziji temelji na nastanku silicijevega dioksida znotraj kapljic v mikroemulzijskem sistemu. Mikroemulzijski sistem je dvofazni sistem, ki ga sestavljajo vodna faza, oljna faza in površinsko aktivna snov. Površinsko aktivna snov omogoča nastanek majhnih kapljic. Sam nastanek silicijevega dioksida poteka podobno kot v primeru Stöberjeve sinteze, pri kateri silicijev dioksid nastane iz TEOS s pomočjo bazičnega katalizatorja. Glavna razlika s Stöberjevo sintezo je ta, da pri sintezi s pomočjo mikroemulzije nastanejo nanodelci silicijevega dioksida v mikrokapljicah in tako lahko pripravimo nanodelce z zelo poenoteno velikostjo. Podobno lahko z uporabo površinsko aktivnih snovi pripravljamo nanodelce silicijevega dioksida z različnimi stopnjami poroznosti (Finnie S. K. idr., 2007).

Obstajajo tudi t. i. imenovane biogene metode sinteze nanodelcev silicijevega dioksida, ki vključujejo uporabo mikroorganizmov in naravnih substratov, kot so bakterije, glice, alge in rastlinski izvlečki/metaboliti. Znanih je že nekaj različnih biomas za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida, kot so riževa lupina, sladkorni trs ter riževa slama. Za sintezo se biomasa spere z destilirano vodo za odstranitev nečistoč, čemur sledi obdelava s sredstvi za izpiranje, ki je namenjena odstranitvi kovinskih nečistoč, ki jih vsebuje biomasa. Pri biogenih metodah na proces sinteze vplivajo temperatura, pH in čas, ki jih je treba prilagoditi (Akhter, 2022).

#### 2.4.2. Zgodovina

Monodisperzni nanodelci silicijevega dioksida so se pojavili v sredini 20. stoletja, leta 1968 je bila prvič predstavljena Stöberjeva metoda. Stöberjevi delci so trdni in monodisperzni s prilagodljivimi premeri med 20 in 2000 nm (Liberman idr., 2014).

Leta 1983 je o sintezi amorfnega koloidnega in porognega silicijevega dioksida poročal Klaus Unger v Nemčiji. Takrat so bili nanodelci porognega silicijevega dioksida prepoznani kot primerni za dostavo zdravil v telesu. V zgodnjih 90. letih se je pojavila nova skupina poroznih materialov, imenovanih urejeni mezoporozni silicijev dioksid. Sem spadajo leta 1992 v podjetju Mobil Oil Corporation razvite porozne oblike silicijevega dioksida z oznako MCM (Mobil Composition of Matter) z enakomero razporejenimi cilindričnimi porami v šestkotni (MCM-41) ali kubični (MCM-48) razporeditvi (Glantreo, b. d.), leta 1998 na Univerzi v Kaliforniji v Santa Barbari razviti amorfni mezoporozni silicijev dioksid SBA (Santa Barbara Amorphous) ter leta 1999 razvita periodično mezoporozna organosilika. Prav tako leta 1999 so mezoporozni silicijev dioksid z velikimi porami (SBA-15) prvič uporabili za prikaz sposobnosti adsorpcije in sproščanja proteinov iz porozne strukture (Janjua idr., 2023).

#### 2.4.3. Prilagajanje lastnosti površine nanodelcev silicijevega dioksida

Da bi lahko izboljšali ali spremenili kemične in fizikalne lastnosti, lahko nanodelce silicijevega dioksida funkcionaliziramo z uporabo t. i. kemije funkcionalnih silanov. Funkcionalni silani so molekule, ki v svoji strukturi vsebujejo silicijev atom, na katerega so vezane ena ali več alkoxi skupin in stranska veriga z določeno funkcionalno skupino. Ta je lahko aminska, karboksilna ali azidna, različni ligandi, polimeri itd. Z vezavo funkcionalnih silanov na površino nanodelcev silicijevega dioksida na površino uredemo nove funkcionalne skupine, ki spremenijo lastnosti površine nanodelcev. Tako se lahko uravnavajo lastnosti nanodelcev za uporabo v specifičnih aplikacijah, se izboljša njihova koloidna stabilnost, poveča biokompatibilnost ipd.

Obstajata dva najpogosteje uporabljana načina funkcionalizacije nanodelcev silicijevega dioksida, in sicer vezava funkcionalnih silanov na površino že pripravljenih nanodelcev in način funkcionalizacije, pri kateri je funkcionalni silan prisoten v reakciji nastanka nanodelcev silicijevega dioksida. Funkcionalne silane se veže na površino nanodelcev silicijevega dioksida z uporabo podobnih postopkov, kot se uporablja za sintezo samih nanodelcev, in sicer postopek vezave temelji na hidrolizi alkoksi skupin v molekuli funkcionalnega silana z bazičnim katalizatorjem. Hidrolizirani funkcionalni silan se nato poveže (kondenzira) s silanolnimi skupinami Si-OH na površini nanodelcev silicijevega dioksida.

Pri drugem načinu funkcionalizacije je funkcionalni silan prisoten med samo sintezo nanodelcev silicijevega dioksida. Med nastankom silicijevega dioksida se med molekule silicijeve kisline, ki kondenzirajo v silicijev dioksid, povežejo tudi molekule funkcionalnega silana. Na ta način nastanejo nanodelci silicijevega dioksida s prisotnimi molekulami funkcionalnega silana v svoji strukturi in na površini. Prednost tega načina funkcionalizacije je, da sta sinteza nanodelcev in njihova funkcionalizacija združeni v en korak (t. i. metoda one-pot), kar postopek pohitri in poceni. Ampak prisotnost funkcionalnega silana med sintezo lahko vpliva na velikost nastalih nanodelcev silicijevega dioksida, zato se za funkcionalizacijo površine nanodelcev silicijevega dioksida pogosteje uporablja vezava funkcionalnih silanov na površino že pripravljenih nanodelcev (Li idr., 2021).

#### 2.4.4. Uporaba

Nanodelce lahko, zahvaljujoč njihovim lastnostim, uporabljamo na veliko različnih načinov. Nanodelci silicijevega dioksida so pokazali velik aplikativni potencial na različnih področjih, kot so kemija, biomedicina, biotehnologija, kmetijstvo in sanacija okolja. Zaradi svojih lastnosti, kot so porozna struktura, površina, nastavljava velikost in premer por, biokompatibilnost in možnost spreminjanja površine, so privlačni za uporabo v različnih aplikacijah.

Predvsem zaradi njihove biokompatibilnosti in nizke toksičnosti so nanodelci silicijevega dioksida primerni za uporabo kot nosilci zdravil, saj lahko v njihovo porozno nanostrukturo vgradimo različne zdravilne učinkovine. Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajeno učinkovino nato ciljajo določene organe in tkiva v telesu ter selektivno dostavijo učinkovino v obolela tkiva ali organe. Zaradi velike površine nanodelcev v primerjavi s prostornino se nanodelci silicijevega dioksida uporabljajo tudi kot biološki označevalci za zaznavo določenih biomolekul.

Na področju sanacije okolja se nanodelci silicijevega dioksida uporabljajo za čiščenje odpadnih voda. Nanodelci silicijevega dioksida so bili uspešni pri odstranjevanju težkih kovin iz odpadnih voda, ki jih proizvajajo industrijski obrati. Nanodelci silicijevega dioksida so bili prav tako sposobni iz odpadnih industrijskih voda odstranjevati in uničevati viruse ter odstranjevati barvila in olja, kar bi lahko uporabljali pri čiščenju morja ob razlitju nafte (Akhter, 2022).

### 2.5. FLUORESCENČNA BARVILA

Fluorescenza je svetlobni pojav pri fluorescenčnih snoveh, ki ob osvetlitvi s svetlobo določene valovne dolžine emitirajo praviloma svetlobo daljše valovne dolžine oziroma nižje energije glede na svetlobo, s katero je bila snov prvotno osvetljena (Hamler, 2011). V *Slovarju slovenskega knjižnega jezika*<sup>2</sup> je fluorescensa v fizikalnem pomenu definirana kot:

»FLUORESCÉNCA – sevanje za snovi značilne svetlobe zaradi zunanjih vplivov, dokler ti trajajo« (Fran, 2014).

Fluorescenčna barvila oziroma fluorofori so običajno organske molekule, za katere je značilno, da v svoji strukturi vsebujejo izmenjujoče se enojne in dvojne vezi med atomi ogljika oziroma aromatske obroče (t. i. sistemi konjugiranih dvojnih vezi). Elektroni v konjugiranih sistemih se ob osvetlitvi s svetlobo določene valovne dolžine vzbudijo in preidejo v višje energijsko stanje. Vzbujanje je možno, ker so ti elektroni šibkeje vezani na jedra atomov. Ker pa je višje energijsko stanje manj stabilno, se vzbujeni elektroni povrnejo v osnovno energijsko stanje in del viška energije oddajo v obliki svetlobe daljše valovne dolžine. Dandanes obstajajo številni razviti fluorofori, ki oddajajo svetobo točno določene valovne dolžine ob osvetlitvi s svetlobo točno določene valovne dolžine, so stabilnejši z vidika fotobledenja in se vežejo v različne materiale, kot so različne vrste tekstila in polimeri (plastika), ter se vežejo v točno določena tkiva in celice. Fotobledenje je pojav pri fluoroforih, pri katerem se intenziteta oddane svetlobe s časom manjša. To je posledica kemijskih sprememb v molekulah fluorofora, ki se pojavi, ko je fluorofor med osvetlitvijo vzbujenem stanju (Urbančič, 2013).

Na lastnosti fluorescenčnih barvil, primarno na intenzitetu oddane svetlobe, poleg kemijske strukture fluorofora pomembno vplivajo še pH topila, polarnost topila, temperatura raztopine in viskoznost raztopine.

Učinkovitost oddajanja svetlobe ob osvetlitvi določenega fluorofora definiramo s t. i. kvantnim izkoristkom. To je razmerje med številom fotonov, ki jih molekula fluorofora sprejme, in številom fotonov, ki jih molekula fluorofora odda. Preprosteje povedano, je to razmerje med intenziteto svetlobe, s katero osvetljujemo fluorofor, in intenzitetu svetlobe, ki jo fluorofor oddaja med osvetlitvijo.

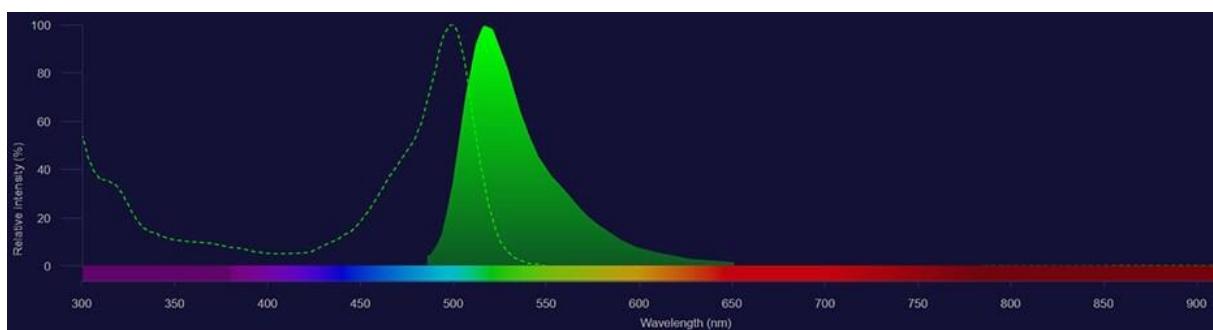
V splošnem fluorofore delimo na intrinzične (endogene) in ekstrinzične (eksogene). V tej raziskovalni nalogi se bomo bolj posvetili slednjim, tj. ekstrinzičnim fluoroforom. Primer intrinzičnih fluoroforov so molekule oz. strukture, ki fluorescirajo in se že nahajajo v celicah oziroma v vzorcu, ki ga opazujemo. Ekstrinzični fluorofori so barvila, ki jih dodajamo vzorcem za zagotovitev fluorescence vzorca med opazovanjem. Primera takih fluoroforov so različni fluoresceini in rodamini, ki se pogosto uporabljajo za opazovanje celic. Fluoresceini in rodamini, ki so ustrezno kemijsko modificirani (v svoji strukturi vsebujejo na primer izotiocianatno skupino), se uporabljajo za označevanje tiolnih skupin in aminov v celičnih strukturah in beljakovinah (Stojanovski, 2019, Urbančič, 2013). Obstaja cela množica fluoresceinov in rodaminov, ki pokrivajo širok emisijski spekter (Hazdovac, 2021).

Za dokazovanje oziroma zaznavanje fluorescence se v največji meri uporabljata fluorescenčna spektroskopija in fluorescenčna mikroskopija, ki je pogosta optična tehnika za opazovanje predvsem bioloških vzorcev. Fluorescenčna mikroskopija omogoča velik kontrast, visoko ločljivost ter zaradi neinvazivnosti tudi opazovanje celičnih struktur v živih celicah (Ramšak, 2023). Pri fluorescenčni spektroskopiji se določata valovna dolžina in intenziteta emitirane svetlobe ob osvetlitvi vzorca s fluoroforom s svetobo določene valovne dolžine.

V nadaljevanju so opisana 3 fluorescenčna barvila, ki smo jih uporabljali med izdelavo raziskovalne naloge. To so: fluorescein, rodamin in Eu-kompleks. Za vgradnjo v nanodelce silicijevega dioksida smo uporabili fluorescein v obliki fluorescein-izotiocianata in rodamin v obliki rodamin-izotiocianata. Eu-kompleks smo dobili že v obliki, ki omogoča vgradnjo v nanodelce silicijevega dioksida.

### 2.5.1. Fluorescein

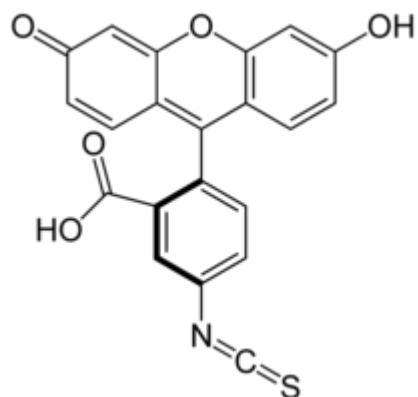
Fluorescenčno barvilo fluorescein oddaja vidno rumeno zeleno svetlobo ob osvetlitvi z ultravijolično ali modro svetlobo. Najintenzivnejše vzbujanje fluoresceina dosežemo s svetlobo valovne dolžine 495 nm, valovna dolžina emitirane svetlobe je 525 nm, kar lahko razberemo tudi iz Slike 6. Fluorescein je eno najpogosteje uporabljenih fluorescenčnih barvil, je cenovno ugoden in izkazuje visok kvantni izkoristek (Blaznik, 2023). Omejitev pri uporabi fluoresceina sta njegova hitro fotobleedenje ter občutljivost, in sicer predvsem na nizek pH (Bogataj idr., 2016).



Slika 6: Barvni spekter fluoresceina (črtkana črta – absorbitana svetloba, polna črta – emitirana svetloba) (vir: ThermoFischer Scientific)

Različni kemijski derivati fluoresceina, kot je fluorescein-izotiocianat (*Slika 7*), se uporablajo v biokemijskih raziskavah. Običajna skupna lastnost derivatov fluoresceina je ta, da v svoji strukturi vsebujejo reaktivno kemijsko skupino (kot je npr. izotiocianatna), ki reagira s specifičnimi komponentami v celicah (proteini, nukleinske kisline idr.). Na ta način se molekule fluoresceina lahko pripne na določene celične komponente in se jih tako opazuje in preučuje znotraj celic. V našem primeru smo izkoristili reaktivnost izocianata v fluorescein-izotiocianatu za pripravo fluoresceina v obliki, ki omogoča vezavo v silicijev dioksid (na izotiocianatno skupino v fluoresceinu smo pred vgradnjo v nanodelce vezali amino-silan).

Za uporabo v biokemiji so ugodne lastnosti fluoresceina tudi visoka absorpcija svetlobe (visok kvantni izkoristek), intenzivna fluorescensa in dobra topnost v vodi (Thermo Fischer Scientific, b. d.).

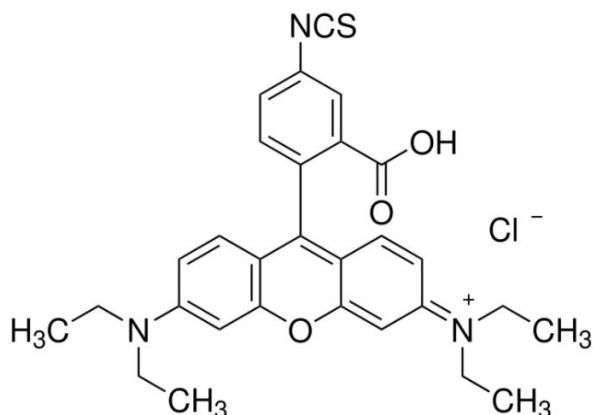


Slika 7: Kemijska struktura fluorescein-izotiocianata (vir: »Fluorescein«, 2022)

## 2.5.2. Barvila na osnovi rodamina

Barvila na osnovi rodamina se že dolgo uporablja v biotehnologiji kot fluorescenčni označevalci. Tak primer je tudi barvilo rodamin B, ki je pogosto uporabljeno vodotopno barvilo v tekstilni in papirni industriji ter v biomedicini (Yusuf idr., 2022). Oddaja svetlobo oranžne barve, absorbira pa svetlobo zelene barve. V primerjavi s fluoresceinom ni odvisen od pH-vrednosti (Bogataj idr., 2016). Vzbujanje barvila rodamin B poteka s svetlobo valovne dolžine 550 nm, valovna dolžina emitirane svetlobe pa je 570 nm (Kristoffersen idr., 2014). Podobno kot pri fluoresceinu, se tudi rodamin uporablja v oblikah, ki vsebujejo reaktivno funkcionalno skupino (kot je izotiocianatna) za vezavo na določene celične komponente (*Slika 8*).

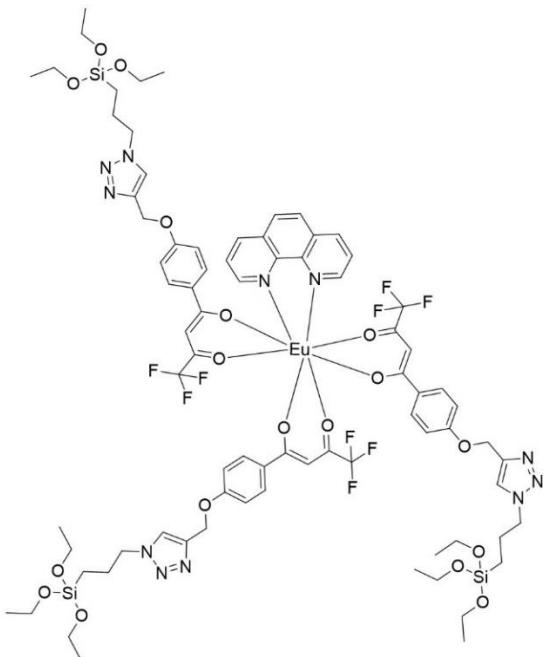
V našem primeru smo izkoristili reaktivnost izotiocianata v rodami-izotiocianatu za pripravo rodamina v obliki, ki omogoča vezavo v silicijev dioksid (na izotiocianatno skupino v rodaminu smo pred vgradnjo v nanodelce vezali amino-silan).



*Slika 8: Formula rodamin-izotiocianata (vir: Merck, b. d.)*

## 2.5.3. Barvila z Eu-kompleksom

Barvila, ki v svoji strukturi vsebujejo centralni lantanoidni ion, koordiniran s stranskimi organskimi ligandi, odlikujejo izjemno ozki emisijski spektri v primerjavi z drugimi organskimi fluorofori, kar pomeni, da po vzbujanju oddajajo svetlobo točno določene valovne dolžine. Primer takega barvila je evropijev kompleks (Eu-kompleks; *Slika 9*). Oddajanje svetlobe točno določene valovne dolžine nam omogoča, da se ta svetloba lahko z uporabo ustreznih svetlobnih filterov loči od svetlobe drugih valovnih dolžin. Tako lahko natančno vrednotimo oddano svetlobo v primeru analize vzorcev, ki vsebujejo še druga barvila ali fluorescirajo že sami po sebi. Barvila z lantanoidnimi ioni obetajo veliko aplikativnih možnosti za uporabo na različnih tehnoloških področjih. Mednje sodijo primeri uporabe pri senzorskih sistemih ali laserjih ter na medicinskem področju, v diagnostiki in terapiji. Najbolj poznani Eu-kompleksi so kompleksi z  $\beta$ -diketonati kot ligandi. Ti oddajajo svetlobo rdeče barve (Hazdovac, 2021).



Slika 9: Kemijska struktura Eu-kompleksa, ki smo ga vgradili v nanodelce silicijevega dioksida. Na zgornjem delu strukture lahko opazimo silanski del, ki omogoča vgradnjo v strukturo silicijevega dioksida (vir: lastni arhiv)

## 2.6. NANODELCI SILICIJEVEGA DIOKSIDA Z VGRAJENIMI FLUORESCENČNIMI BARVILI

Fluorescenčni nanodelci silicijevega dioksida se uporabljajo na številnih področjih, zlasti pa na področju biologije zaradi možnosti prilagajanja lastnosti njihove površine, vgradnje različnih fluoroforov in visoke stopnje biokompatibilnosti. Možnost vgradnje fluorescenčnih barvil v nanodelce oziroma njihovo vezavo na površino nanodelcev omogoča pripravo nanomaterialov s specifičnimi optičnimi lastnostmi in zmogljivostmi za uporabo v najrazličnejšem biološkem eksperimentiranju, ki med drugim obsega imunodiagnostiko, dostavo zdravil in preučevanje bolezni, kot so rakasta obolenja.

Privlačnost uporabe nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenimi fluorescenčnimi barvili temelji tudi na preprosti in prilagodljivi sintezi nanodelcev, pri kateri lahko z uravnavanjem sinteznih pogojev natančno nadzorujemo velikost in obliko nanodelcev in hkrati med samo sintezo vgradimo fluorescenčno barvilo oziroma ga vežemo na površino že sintetiziranih nanodelcev. Sam silicijev dioksid izkazuje zelo nizko stopnjo fluorescence, zato je primeren material za pripravo nanodelcev, katerih fluorescensa ne moti fluorescence vgrajenega fluorescenčnega barvila.

Za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenimi fluorescenčnimi barvili se uporabljajo enake metode kot za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida brez barvil. Pri tem je edina razlika ta, da so med sintezo že prisotna barvila, in sicer v taki obliki, da se lahko vgradijo v nanodelce med njihovo samo sintezo. Tudi v primeru vezave barvil na površino sinteza nanodelcev silicijevega dioksida poteka po enakem postopku, pri vezavi na površino pa se uporabljajo enaki postopki kot za prilagajanje površine nanodelcev silicijevega dioksida. Le barvila so tukaj v taki obliki, da omogočajo vezavo na površino sintetiziranih nanodelcev.

Nanodelci silicijevega dioksida imajo po sintezi na površini negativen naboj, tega pa lahko spreminja mo z vezavo različnih spojin na površino nanodelcev. Primer tega je tudi vezava PEG-silana, ki se kovalentno veže na površino (Gubala idr., 2020).

### 3. METODE DELA

#### 3.1. MATERIAL IN PRIPOMOČKI

Pri sintezi nanodelcev silicijevega dioksida s posameznimi barvili in vezavi PEG-silana na površino nanodelcev smo uporabili naslednje kemikalije ter pripomočke in aparature:

- etanol;
- 25-odstotna vodna raztopina amonijaka (Merck, ZDA);
- destilirana voda (pripravljeno v laboratoriju s sistemom za čiščenje vode Adrona A30 (Adrona, Latvija);
- tetraetoksilan (TEOS) (Sigma-Aldrich, ZDA);
- 10 mg/ml Eu-kompleks v dimetil sulfoksidu (DMSO) (Eu-kompleks je sintetiziral izr. prof. dr. Stane Pajk s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani);
- rodamin-izotiocianat (Sigma-Aldrich, ZDA);
- fluorescein-izotiocianat (Sigma-Aldrich, ZDA);
- diklorometan (DCM) (Merck, ZDA);
- (3-amino)propiltriethoxilansilan (APS) (Sigma-Aldrich, ZDA);
- 3-[metoksiplielenoksi]<sub>6-9</sub>]propiltrimetoksilan (PEG-silan) (Gelest, Nemčija);
  
- 250-mililitrske stekleničke;
- mehanski stresalnik;
- centrifuga 5430 z rotorjem F-35-6-30 (Eppendorf, Nemčija);
- viale;
- aluminijasta folija;
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra PIO, Slovenija);
- avtomatske pipete (Brand, Nemčija);
- centrifugirke;
- Litesizer 500 (Anton Paar, Avstrija);
- kivete Omega (Anton Paar, Avstrija);
- aluminijasti vsebniki;
- sušilnik (Kambič, Slovenija);
- analizna tehtnica ABP-5M (Kern, Nemčija);
- UV-luč
- pH-meter 913 (Metrohm, Švica).

#### 3.2. SINTEZA NANODELCEV SILICIJEVEGA DIOKSIDA IN VGRADNJA FLUORESCENČNIH BARVIL

Za sintezo nanodelcev smo uporabili Stöberjevo metodo.

Nanodelce silicijevega dioksida smo sintetizirali s tremi izbranimi barvili, ki so:

- Eu-kompleks,
- rodamin-izotiocianat,
- fluorescein-izotiocianat.

## Sinteza nanodelcev silicijevega dioksida z Eu-kompleksom



V 250-mililitrsko stekleničko smo odmerili 50 ml vode, 40 ml etanola in 6 ml 25-odstotne vodne raztopine amonijaka.

*Slika 10: Priprava prve raztopine za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida z Eu-kompleksom - dodajanje amonijaka (vir: Petra Ouček)*

Ob tem smo pripravili raztopino 10 ml etanola, 3 ml TEOS-a in 100  $\mu\text{l}$  10 mg/ml Eu-kompleksa v

DMSO ter dodali v stekleničko.



*Slika 11: Priprava druge raztopine za sintezo nanodelcev silicijevega dioksida z EU-kompleksom – dodajanje Eu-kompleksa v DMSO (vir: Petra Ouček)*

Stekleničko smo nato postavili na mehanski stresalnik pri približno 200 rpm in pustili mešati čez noč.



Naslednji dan smo nastale nanodelce v steklenički posedli s centrifugiranjem, jih nato dvakrat sprali z etanolom in dvakrat z vodo ter jih na koncu redispergirali v 10 ml vode.

*Slika 12: Posedanje nanodelcev v centrifugi (vir: Petra Ouček)*

Nanodelce smo poimenovali SiND6-Eu.

## Sinteza nanodelcev silicijevega dioksida z rodaminom

Eno uro pred sintezo smo v vialo natehtali 1 mg rodamin-izotiocianata ter dodali 400  $\mu\text{l}$  diklorometana (DCM) in 10  $\mu\text{l}$  APS. Vialo smo nato zaprli, zavili v aluminijasto folijo in jo pustili

na sobni temperaturi ter občasno premešali. Po eni uri smo nato dodali 3 ml etanola ter 30 s sonicirali.

Potem smo za začetek v 250-mililitrski steklenički pripravili 50 ml vode, 40 ml etanola in 6 ml 25-odstotne vodne raztopine amonijaka.

K temu smo dodatno pripravili še raztopino iz 7 ml etanola, 3 ml TEOS-a in vsebine iz viale, ki smo jo pripravili eno uro prej.

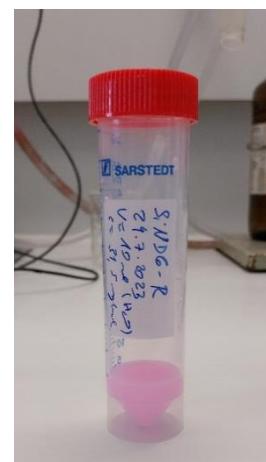
Stekleničko smo nato postavili na mehanski stresalnik pri približno 200 rpm in pustili mešati čez noč.



Naslednji dan smo nanodelce v steklenički posedli s centrifugiranjem, jih dvakrat sprali z etanolom in dvakrat z vodo ter jih na koncu redispergirali v 10 ml vode.

*Slika 13: Posedeni nanodelci silicijevega dioksida z rodaminom v centrifugirkah (vir: Petra Ouček)*

Nanodelce smo poimenovali SiND6-R.



*Slika 14: Nanodelci silicijevega dioksida z rodaminom v označeni centrifugirki (vir: Petra Ouček)*

#### **Sinteza nanodelcev silicijevega dioksida s fluoresceinom:**

Eno uro samo sintezo smo v vialo natehtali 1 mg fluorescein-izotiocianata ter dodali 400 µl diklorometana (DCM) in 10 µl APS. Vialo smo nato zaprli, zavili v aluminijasto folijo in jo pustili eno uro na sobni temperaturi ter občasno premešali. Po eni uri smo nato dodali 3 ml etanola ter 30 s sonicirali.

Potem smo za začetek v 250-mililitrski steklenički pripravili raztopino iz 50 ml vode, 40 ml etanola in 6 ml 25-odstotne vodne raztopine amonijaka.

Ob tem smo pripravili še raztopino iz 7 ml etanola, 3 ml TEOS-a in vsebine viale, ki smo jo pripravili eno uro pred sintezo.

Stekleničko smo nato postavili na mehanski stresalnik pri približno 200 rpm in pustili mešati čez noč.

Naslednji dan smo nanodelce v steklenički posedli s centrifugiranjem, dvakrat sprali z etanolom in dvakrat z vodo. Na koncu smo sprane nanodelce redispergirali v 10 ml vode.

*Slika 15: Posedeni nanodelci silicijevega dioksida s fluoresceinom v centrifugirki (vir: Petra Ouček)*



Pripravljene nanodelce smo poimenovali SiND-F.

*Slika 16: Nanodelci silicijevega dioksida s fluoresceinom v označeni centrifugirki (vir: Petra Ouček)*

### 3.3. VEZAVA PEG-SILANA NA POVRŠINO NANODELCEV

PEG-silan smo na posamezne nanodelce vezali po spodnjem postopku.

V steklene bučko smo odmerili 100 mg nanodelcev silicijevega dioksida z Eu-kompleksom oziroma rodaminom, redispergiranih v 15 ml vode.

Nato smo dodali 15 ml etanola, 2,1 ml 25-odstotnega amonijaka in 0,7 ml PEG-silana.

Bučko smo postavili na oljno kopel ter pri 50 °C in 300 rpm mešali tri ure.

Po končani reakciji smo nanodelce posedli s centrifugiranjem, sprali enkrat z etanolom in enkrat z vodo ter redispergirali v 10 ml vode.

Delce smo nato poimenovali SiND6-Eu-PEG in SiND6-R-PEG.

### 3.4. ANALIZA VZORCEV

#### 3.4.1. Določanje koncentracije delcev v suspenziji

Nanodelcem silicijevega dioksida z vgrajenimi fluorescenčnimi barvili in vezanim PEG-silanom na površini smo določili masno koncentracijo. Masno koncentracijo nanodelcev smo določili

termogravimetrično, in sicer smo določeno prostornino suspenzije odmerili v predhodno natančno stehtane aluminijaste vsebnike. Vodo iz vzorcev smo nato odparjevali v sušilniku pri 100 °C vsaj 3 ure. Nato smo določili maso preostalih suhih nanodelcev in iz povprečja mas suhih nanodelcev in prostornine suspenzije izračunali masno koncentracijo nanodelcev po naslednji enačbi:  $\gamma_{nanodelcev} = \frac{\bar{m}}{V_{suspenzije}}$



*Slika 17: Tehtanje aluminijastih vsebnikov pred dodajanjem vzorcev nanodelcev (vir: Petra Ouček)*



*Slika 18: Vzorci nanodelcev v aluminijastih vsebnikih pred odparitvijo vode (vir: Petra Ouček)*

### 3.4.2. Meritve hidrodinamske velikosti delcev

Hidrodinamsko velikost sintetiziranih nanodelcev silicijevega dioksida smo določali z metodo dinamično sipane svetlobe (DLS) z uporabo aparature Litesizer 500 (Anton Paar) (Slika 20) v kivetah Omega (Anton Paar). Posamezen vzorec smo v kivete Omega prenesli s pomočjo brizge. Meritev na posameznem vzorcu smo ponovili trikrat in rezultate podali kot povprečje teh treh meritev s standardno deviacijo. Pri tem smo gledali tudi na polidisperzni indeks, pri čemer vrednost 100 % pomeni, da so delci nehomogeno razporejeni, vrednost bližje 0 % pa nakazujejo monodisperzni sistem.



Slika 19: Pripromočki za pripravo vzorcev za analizo hidrodinamske velikosti delcev na aparaturi Litesizer 500 (Anton Paar) – kiveta Omega, čepki in brizga (vir: Petra Ouček)



Slika 20: Aparatura Litesizer 500 (Anton Paar) (vir: Anton Paar, b. d.)

### 3.4.3. Meritve elektrokinetičnega (zeta) potenciala

Elektrokinetični oziroma zeta potencial smo določili z meritvami elektroforetske mobilnosti nanodelcev na aparaturi Litesizer 500 (Anton Paar) (Slika 20) v kivetah Omega. Meritev na posameznem vzorcu nanodelcev smo ponovili trikrat in rezultate podali kot povprečje teh treh meritev s standardno deviacijo. Ker je zeta potencial odvisen tudi od vrednosti pH posameznega vzorca, smo vsakemu izmed analiziranih vzorcev izmerili še pH z uporabo pH-metra 913 (Metrohm). Tega smo pred meritvami umerili z uporabo standardnih pufrov (Slika 21).



Slika 21: Merjenje pH vrednosti vzorca nanodelcev na aparaturi pH-meter 913 (Metrohm) (vir: Petra Ouček)

## 4. REZULTATI DELA IN RAZPRAVA

### 4.1. REZULTATI

#### 4.1.1. Koncentracija delcev v suspenziji

Masno koncentracijo sintetiziranih nanodelcev smo izračunali z uporabo sledeče enačbe:  $\gamma_{nanodelcev} = \frac{\bar{m}}{V_{suspenzije}}$ .

$V_{suspenzije}$  je pri vseh vzorcih znašal 0,5 ml.

V Tabeli 1 so prikazane povprečne vrednosti mase v mg in izračunane masne koncentracije v mg/ml za posamezne vzorce nanodelcev, ki so bile izračunane iz meritev, izvedenih v dveh paralelah za posamezni vzorec.

Tabela 1: Izračunana povprečja mas in masnih koncentracij posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida

Vzorec	Masa v mg	Koncentracija nanodelcev ( $\gamma_{nanodelcev}$ ) v mg/ml
SiND6-F	0,55	1,1
SiND6-R	15,75	31,6
SiND6-R-PEG	1,25	2,5
SiND6-Eu	16	32
SiND6-Eu-PEG	1,45	2,9

Najmanjša koncentracija delcev je bila izračunana pri vzorcu nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) in ta je znašala le 1,1 mg nanodelcev na ml. Pri vzorcih nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) in vzorcih z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu) je ta vrednost znašala 31,6 mg/ml in 32 mg/ml, kar je precej več kot pri vzorcu nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom. Vzorca nanodelcev z vgrajenim rodaminom in Eu-kompleksom, ki smo jima na površino vezali PEG-silan, sta po vezavi PEG-silana na površino ponovno prikazali podobni masni koncentraciji, ki sta znašali 2,5 mg/ml pri vzorcu z rodaminom (SiND6-R-PEG) in 2,9 mg/ml pri vzorcu z Eu-kompleksom (SiND6-Eu-PEG).

#### 4.1.2. Hidrodinamska velikost nanodelcev

Rezultati meritev za določitev hidrodinamske velikosti posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida so prikazani v spodnjih tabeli in grafihi.

V Tabeli 2 so prikazane povprečne vrednosti hidrodinamskega premera v nm in polidisperznega indeksa v % za posamezne vzorce nanodelcev, ki so bile izračunane iz meritev, opravljenih z aparaturo Litesizer 500 v treh ponovitvah za posamezni vzorec.

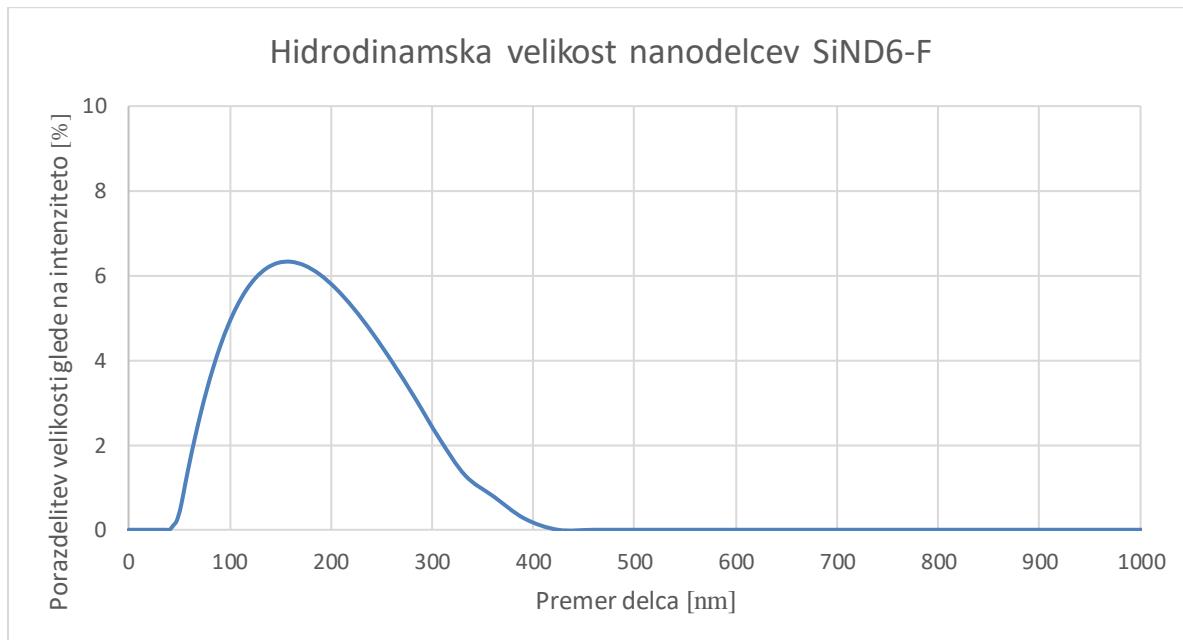
*Tabela 2: Povprečja podatkov hidrodinamske velikosti posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida*

Vzorec	Hidrodinamski premer v nm	Polidisperzni indeks v %
<b>SiND6-F</b>	147	24
<b>SiND6-R</b>	118	10
<b>SiND6-R-PEG</b>	130	11
<b>SiND6-Eu</b>	128	8
<b>SiND6-Eu-PEG</b>	136	10

#### **Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F)**

Rezultati meritev hidrodinamske velikosti vzorca nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F), ki so prikazani v *Tabeli 2*, kažejo, da je bil povprečni hidrodinamski premer teh nanodelcev 147 nm, polidisperzni indeks pa je v povprečju znašal 24 %.

*Graf 1: Porazdelitev velikosti nanodelcev SiND6-F po intenziteti*

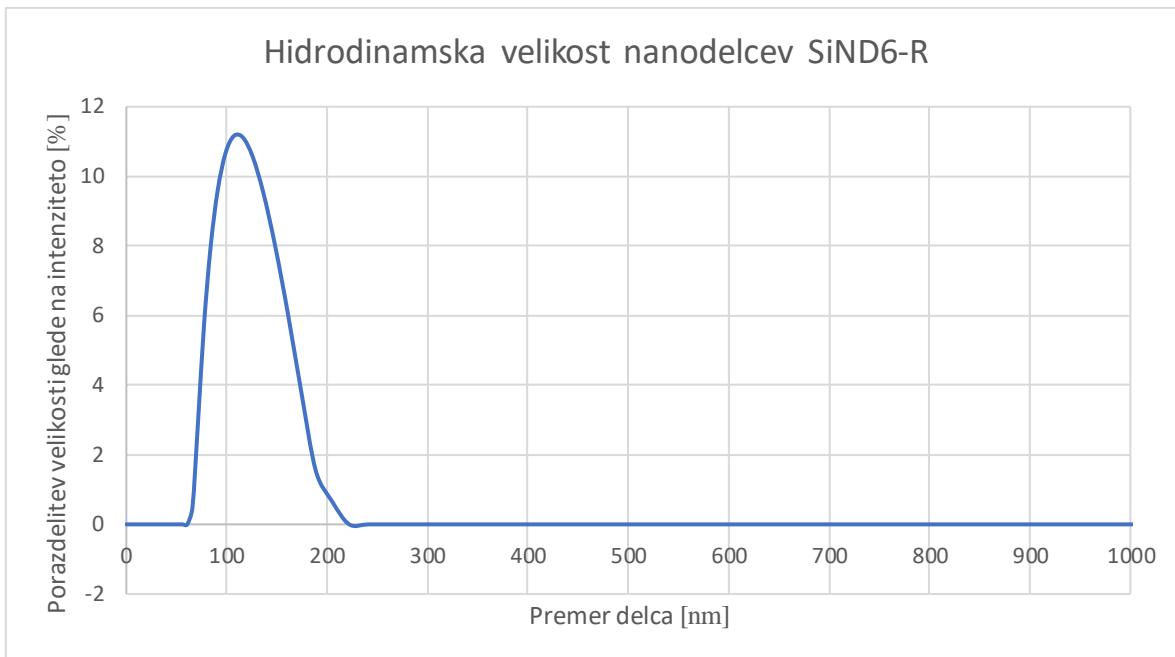


*Graf 1* prikazuje premer nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) v nm glede na porazdelitev velikosti po intenziteti v odstotkih.

#### **Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom (SiND6-R)**

Rezultati meritev hidrodinamske velikosti vzorca nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom (SiND6-R), ki so prikazani v *Tabeli 2*, kažejo, da je bil povprečni hidrodinamski premer nanodelcev 118 nm, polidisperzni indeks pa je pri tem znašal 10 %.

Graf 2: Porazdelitev velikosti nanodelcev SiND6-R po intenziteti

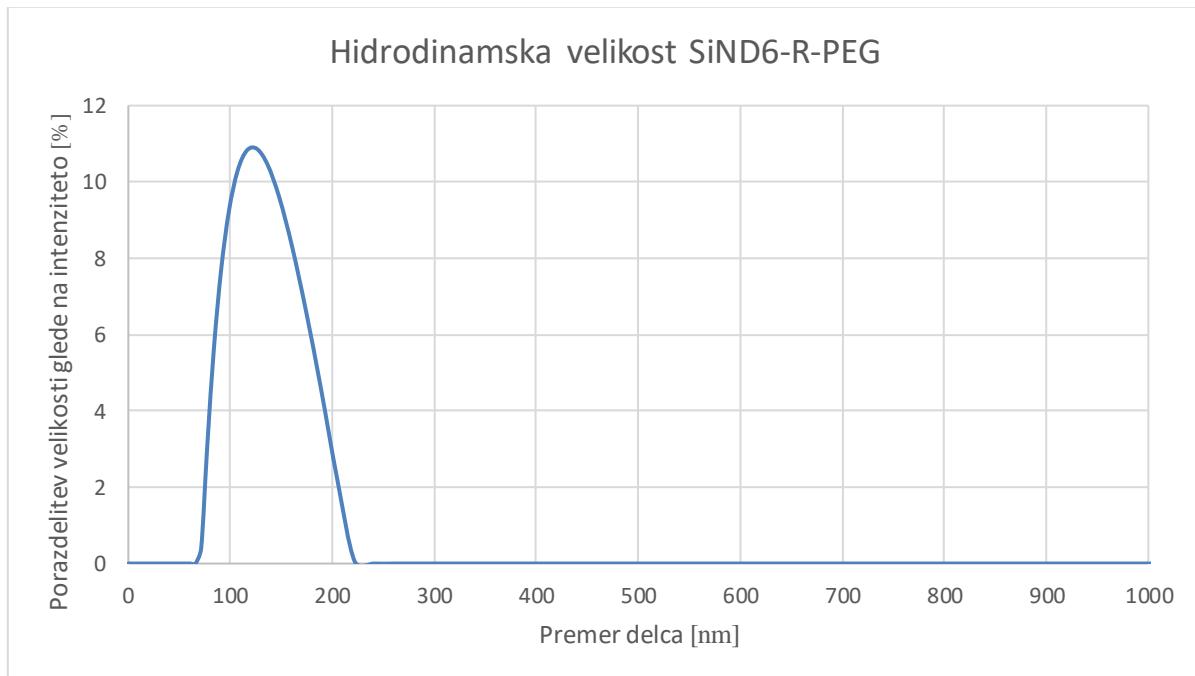


Graf 2 prikazuje hidrodinamski premer nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) v nm glede na porazdelitev velikosti po intenziteti v odstotkih.

#### Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom in vezanim PEG-silanom na površini (SiND6-R-PEG)

Rezultati meritev hidrodinamske velikosti vzorca nanodelcev z vgrajenim rodaminom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-R-PEG), ki so prikazani v Tabeli 2, kažejo, da je povprečni hidrodinamski premer nanodelcev znašal 130 nm, polidisperzni indeks pa 11 %.

Graf 3: Porazdelitev velikosti nanodelcev SiND6-R-PEG po intenziteti

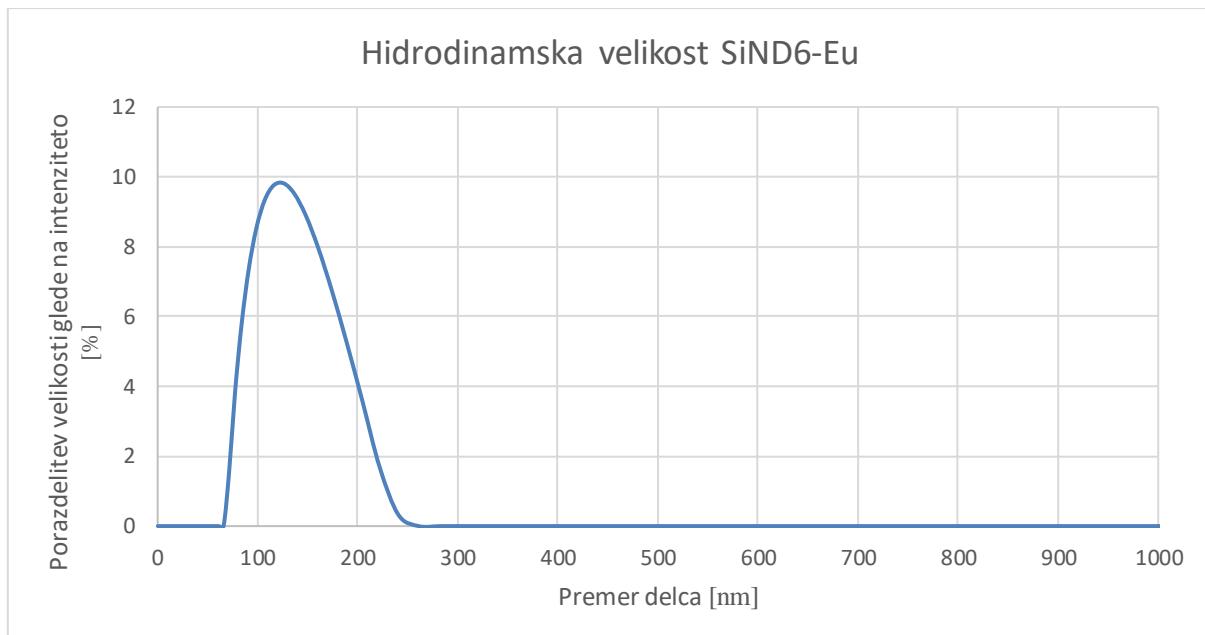


Graf 3 prikazuje hidrodinamski premer nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-R-PEG) v nm glede na porazdelitev velikosti po intenziteti v odstotkih.

#### Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu)

Rezultati meritev hidrodinamske velikosti vzorca nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu), ki so prikazani v Tabeli 2, kažejo, da povprečni hidrodinamski premer nanodelcev znaša 128 nm, polidisperzni indeks pa 8 %.

Graf 4: Porazdelitev velikosti nanodelcev SiND6-Eu po intenziteti

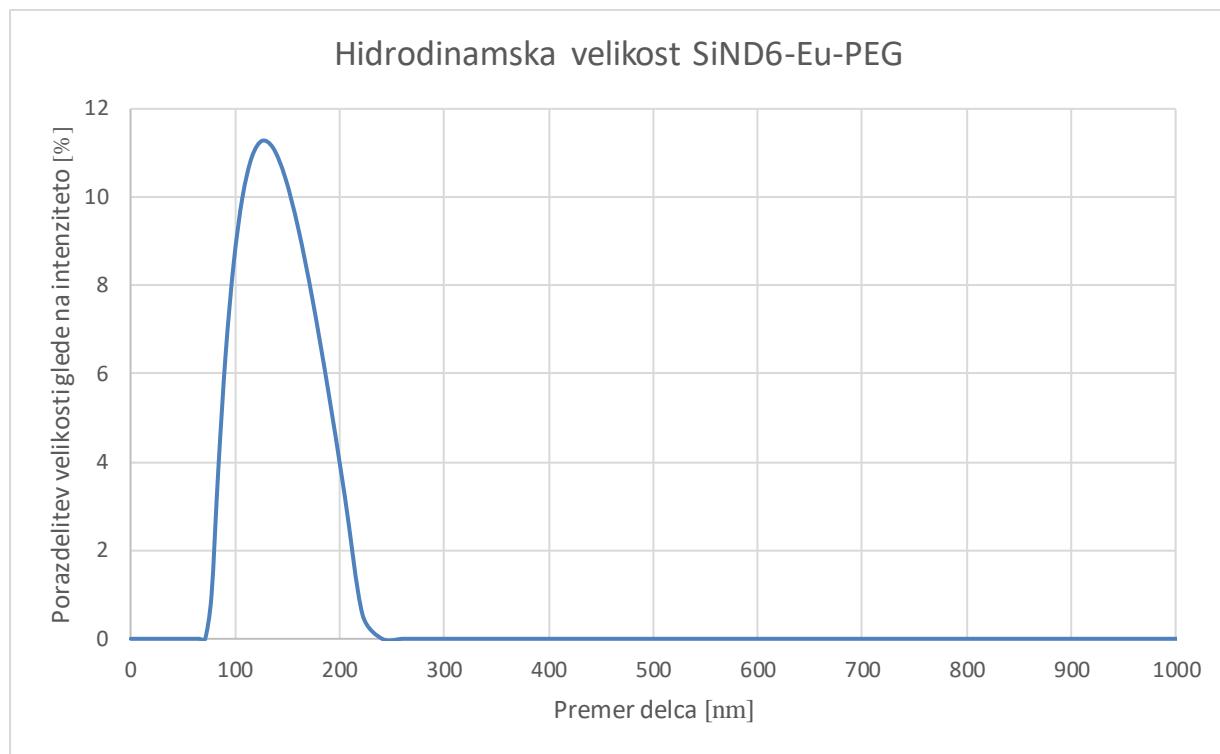


Graf 4 prikazuje hidrodinamski premer nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu) v nm glede na porazdelitev velikosti po intenziteti v odstotkih.

#### Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim Eu kompleksom in vezanim PEG-silanom na površini (SiND6-Eu-PEG)

Rezultati meritev hidrodinamske velikosti vzorca nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-Eu-PEG), ki so prikazani v Tabeli 2, prikazujejo da je povprečni hidrodinamski premer nanodelcev 136 nm, polidisperzni indeks pa 10 %.

Graf 5: Porazdelitev velikosti nanodelcev SiND6-Eu-PEG po intenziteti



Graf 5 prikazuje hidrodinamski premer nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-Eu-PEG) v nm glede na porazdelitev velikosti po intenziteti v odstotkih.

#### 4.1.3. Elektrokinetični (zeta) potencial

V Tabeli 3 so prikazane povprečne vrednosti elektrokinetičnega (zeta) potenciala v mV, ki so bile izračunane na podlagi meritev, opravljenih na aparaturi Litesizer 500 v treh ponovitvah za posamezni vzorec. V drugem stolpcu pa so podane še izmerjene vrednosti pH vzorcev.

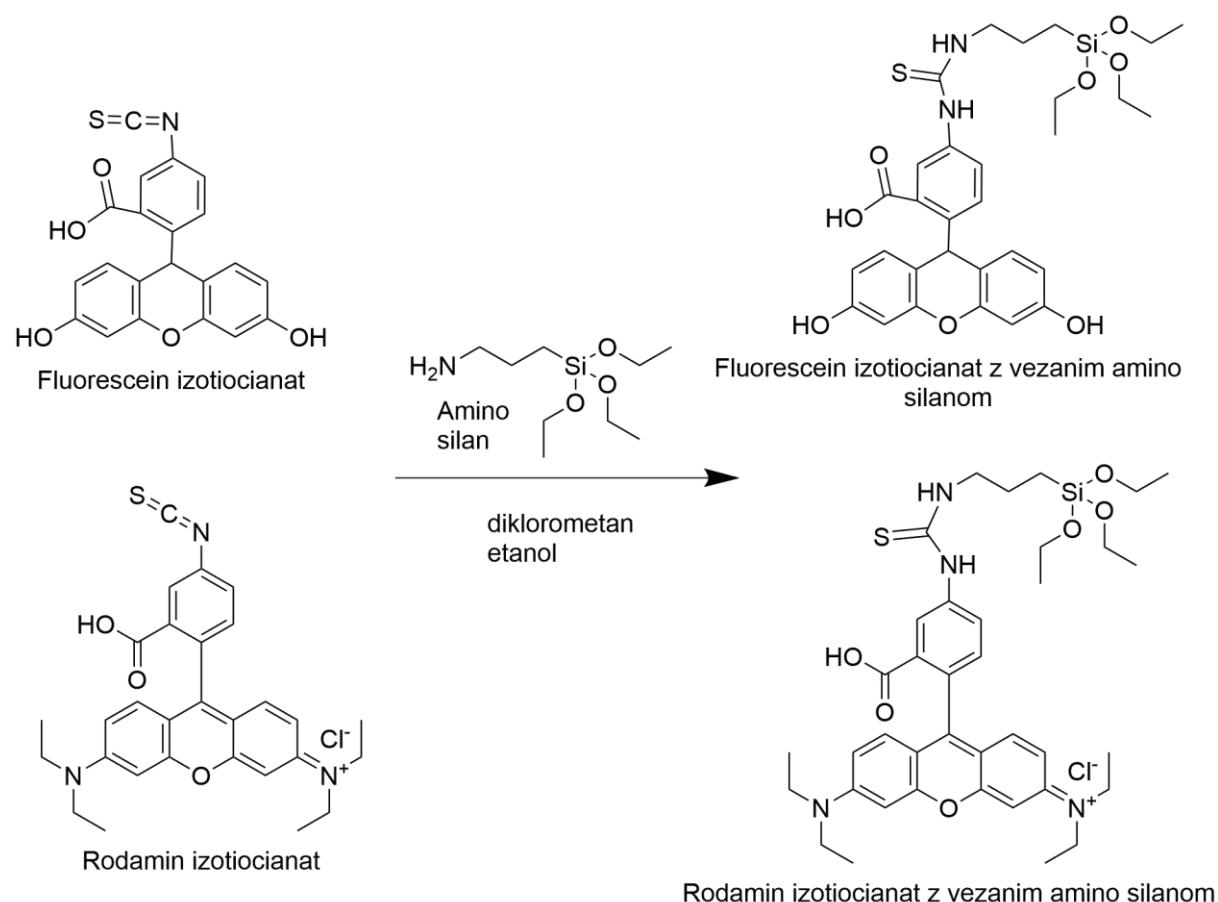
Tabela 3: Povprečja podatkov elektrokinetičnega (zeta) potenciala posameznih vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida

Vzorec	Povprečni zeta potencial v mV	pH-vrednost
<b>SiND6-F</b>	-31	7,3
<b>SiND6-R</b>	-45	9,7
<b>SiND6-R-PEG</b>	-46	9,4
<b>SiND6-Eu</b>	-32	9,5
<b>SiND6-Eu-PEG</b>	-42	9,1

## 4.2. RAZPRAVA

### 4.2.1. Predpriprava fluoresceina in rodamina v obliki, primerni za vgradnjo v nanodelce silicijevega dioksida

Fluorescein in rodamin smo pred izvedbo sinteze in hkratne vgradnje barvil v nanodelce silicijevega dioksida predhodno kemijsko spremenili v tako kemijsko obliko, da so se ta lahko vgradila v nastajajočo siliko. Na reaktivno izotiocianatno skupino v obeh barvilih smo vezali amino silan (APS). Tako sta obe barvili v svoji strukturi vsebovali silanski del, ki se lahko veže v silicijev dioksid med sintezo nanodelcev silicijevega dioksida. Reakcija vezave amino silana na molekule barvil je potekala po spodnji reakcijski shemi.



### 4.2.2. Koncentracija delcev v suspenziji

Koncentracija nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) je bila relativno nizka, in sicer je znašala 1 mg/ml v prvi paraleli in 1,2 mg/ml v drugi paraleli, torej v povprečju 1,1 mg/ml. Zaradi nizke koncentracije in posledično premajhne količine nanodelcev SiND6-F nismo izvedli vezave PEG-silana na površino teh nanodelcev. Vzrok za tako nizko koncentracijo in posledično majhno količino sintetiziranih nanodelcev SiND6-F je bila najverjetnejše premajhna količina amonijaka, ki smo jo uporabili za sintezo SiND6-F. Med postopkom sinteze nanodelcev smo amonijak namreč hrаниli v odprtih čašah. Med delom je amonijak zaradi hlapnosti hlapel in njegova koncentracija se je nižala. Ko smo odmerili potrebno prostornino amonijaka v reakcijsko zmes za sintezo nanodelcev SiND6-F, je bila

koncentracija amonijaka najverjetneje že tako zmanjšana, da reakcija ni potekla učinkovito in je bila zato posledično koncentracija nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom tako nizka. To težavo smo popravili med sintezo nanodelcev z vgrajenim rodaminom in Eu-kompleksom.

Medtem sta si vrednosti koncentracij nanodelcev silicijevega dioksida v vzorcih z vgrajenim rodaminom in Eu-kompleksom precej podobni.

Pri nanodelcih silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom ali Eu-kompleksom ter vezanim PEG-silanom na površino sta bili koncentraciji nanodelcev podobni, pri prvih je ta znašala 2,5 mg/ml pri drugih pa 2,9 mg/ml.

#### 4.2.3. Hidrodinamska velikost nanodelcev

Hidrodinamske velikosti nanodelcev z vgrajenim posameznim barvilom brez vezanega PEG-silana na površino so se v povprečju gibale okoli 131 nm. Pri tem je imel največji hidrodinamski premer vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) in je znašal 147 nm. Naslednji po velikosti hidrodinamskega premera sledi vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu), pri katerem je bil hidrodinamski premer 128 nm, kar je 12,9-odstotna razlika v primerjavi z nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom. Kot najmanjši pa so se izkazali nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom (SiND6-R), katerih premer je znašal 118 nm, kar je 19,7-odstotna razlika v primerjavi z nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom. Pri tem je smiselnopozorniti tudi polidisperzni indeks, ki je bil največji ravno pri nanodelcih silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) in je znašal 24 %, medtem ko se je polidisperzni indeks pri vzorcih nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) ali Eu-kompleksom (SiND6-Eu) gibal okoli 9 % (pri SiND6-R je znašal 10 %, pri SiND6-Eu pa 8 %). To pomeni, da se v vzorcu nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom nahajajo delci z različno velikostjo. Nanodelci z vgrajenim rodaminom oziroma Eu-kompleksom pa so po velikosti bolj monodisperzni.

Hidrodinamski premer se je pri nanodelcih z vezanim PEG-silanom v primerjavi z nanodelci brez vezanega PEG-silana na površino povečal. Pri nanodelcih silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-R-PEG) v primerjavi s tistimi z vgrajenim rodaminom, a brez vezanega PEG-silana na površino (SiND6-R), se je hidrodinamski premer povečal za 12 nm, kar predstavlja 10-odstotno povečanje. Pri nanodelcih silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-Eu-PEG) v primerjavi z nanodelci z vgrajenim Eu-kompleksom, a brez vezanega PEG-silana na površino (SiND6-Eu), se je hidrodinamski premer povečal za 8 nm, kar predstavlja 6-odstotno povečanje. Polidisperzni indeks se je v obeh primerih povečal le za 1–2 %. Povečanje hidrodinamskega premera v primeru vezanega PEG-silana na površini nanodelcev nam potrjuje njegovo uspešno vezavo na površini nanodelcev silicijevega dioksida. Vezava hidrofilnega polimera, kot je PEG, na površino nanodelcev namreč povzroči, da se okoli delcev nahaja debelejša plast molekul vode in ionov. Ta plast je zajeta v izmerjeno hidrodinamski premer delcev, zato se je v primeru vezave PEG-silana na površino nanodelcev njihov hidrodinamski premer v primerjavi s hidrodinamskim premerom nanodelcev brez vezanega PEG-silana na površini povečal.

#### 4.2.4. Elektrokinetični (zeta) potencial

Vzorca nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) ali Eu-kompleksom (SiND6-Eu) sta imela podoben elektrokinetični (zeta) potencial, –31 mV pri vzorcu z vgrajenim

fluoresceinom in  $-32$  mV pri vzorcu z vgrajenim Eu-kompleksom. Elektrokinetični (zeta) potencial pri vzorcu nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) pa je odstopal od ostalih dveh, in sicer je znašal  $-45$  mV. Pri teh treh vzorcih je opazna tudi razlika v pH-vrednosti. Pri vzorcu nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) je pH-vrednost znašala  $7,3$ , medtem ko je pri vzorcih nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) znašala  $9,7$  in pri vzorcu nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu)  $9,5$ . Tudi pri vzorcih nanodelcev z vezanim PEG-silanom na površini odstopanj pri pH-vrednosti ni, tako je edini vzorec, ki odstopa, vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom. Vsi trije vzorci so bili pripravljeni z enako deionizirano vodo, torej z vodo z enako pH-vrednostjo. Odstopanje v pH-vrednosti je torej odvisno od nanodelcev, ki smo jih v tej vodi redispersirali. Fluorescein ima v svoji strukturi kislo karboksilno funkcionalno kislino, ki lahko povzroči nižji pH suspenzije nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom, kar lahko razloži nižjo pH-vrednost v primerjavi z ostalima dvema vzorcema. Nasprotno rodamin v svoji strukturi vsebuje bazično aromatsko aaminsko funkcionalno skupino, Eu-kompleks pa vsebuje bazično triazolno skupino, kar lahko povzroči višji pH vzorcev nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom oziroma Eu-kompleksom.

Pri vzorcih nanodelcev z vezanim PEG-silanom na površino so odstopanja v vrednosti elektrokinetičnega (zeta) potenciala majhna. PEG v PEG-silanu je namreč nenabiti hidrofilni polimer, kar pomeni, da praviloma ne spremeni elektrostatskih lastnosti površine nanodelcev kljub vezavi na površino. To lahko potrdimo v primeru nanodelcev silicijevega dioksida z vezanim rodaminom. Ob primerjavi nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom ni večjega odstopanja v vrednosti elektrokinetičnega (zeta) potenciala med vzorcema brez vezanega PEG-silana ali z vezanim PEG-silanom, saj je vrednost elektrokinetičnega (zeta) potenciala pri vzorcu brez vezanega PEG-silana na površino znašala  $-45$  mV, pri vzorcu z vezanim PEG-silanom na površino pa  $-46$  mV.

Drugače pa je bilo v primeru nanodelcev z vgrajnim Eu-kompleksom, pri katerih je bila opazna razlika v zeta potencialu med nanodelci z vezanim PEG-silanom oziroma brez njega. Pri vzorcu nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu) vrednost elektrokinetičnega (zeta) potenciala znaša  $-32$  mV. Pri tem pa je opazna večja razlika, če to primerjamo z vzorcem nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom in vezanim PEG-silanom na površino (SiND6-Eu-PEG), pri katerih je vrednost elektrokinetičnega (zeta) potenciala znašala  $-42$  mV, kar je kar  $23,8$ -odstotna razlika. To lahko pripišemo razlike v pH-vrednosti med nanodelci z vgrajenim Eu-kompleksom brez vezanega PEG-silana (pH  $9,5$ ) in z vezanim PEG-silanom (pH  $9,1$ ). Kot lahko vidimo, razlika znaša skoraj pol enote pH-vrednoti ( $0,4$ ), kar ni zanemarljivo. Mogoče pa je, da je se je v primeru nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom PEG-silan vezal učinkoviteje in je prekril del površine z elektrostaticnim nabojem, kar bi lahko privedlo do znižanja vrednosti zeta potenciala.

#### 4.2.5. Vgradnja fluorescenčnih barvil

Za dokaz vgradnje fluorescenčnih barvil smo si različne sintetizirane vzorce nanodelcev silicijevega dioksida s posameznimi barvili ogledali pod UV-lučjo pri valovni dolžini  $366$  nm oziroma  $254$  nm.

Najprej smo primerjali vzorec nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil, ki je na *Sliki 22* prikazan na levi, in vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F), ki je na *Sliki 22* prikazan na desni. Kot vidimo, vzorec nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil ne emitira svetlobe, medtem ko vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim fluoresceinom emitira rahlo svetlobo zelenkaste barve.



Slika 22: Vzorca nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil (levo) in SiND6-F (desno) pod UV-lučjo (vir: Petra Ouček)

Sledi primerjava nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil, ki je na *Sliki 23* prikazan na levi, vzorca nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu), ki je na *Sliki 23* postavljen na sredino, ter vzorca nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom in na površino vezanim PEG-silanom (SiND6-Eu-PEG ), ki je na *Sliki 23* na skrajni desni. S slike lahko razberemo, da vzorec nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil ne emitira svetlobe, medtem ko vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom emitira svetlobo rožnate barve, vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim Eu-kompleksom in na površino vezanim PEG-silanom prav tako emitira svetlobo rožnate barve, vendar je ta v primerjavi z vzorcem brez na površino vezanega PEG-silana nekoliko šibkejša. Emitirana svetloba je najverjetneje šibkejša zaradi nižje koncentracije delcev z vgrajenim EU-kompleksom in vezanim PEG-silanom na površini v primerjavi nanodelci z vgrajenim Eu-silanom brez vezanega PEG-silana na površini.



Slika 23: Vzorci nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil (levo), SiND6-Eu (na sredini) in SiND6-Eu-PEG (desno) pod UV-lučjo (vir: Petra Ouček)

Nazadnje sledi še primerjava med nanodelci silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil, ki je na *Sliki 24* na skrajni levi, raztopine samega Eu-kompleksa, ki se je nahajal v mali centrifugirki, vzorci nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom (SiND6-R), ki je na *Sliki 24* v sredinski veliki centrifugirki, in vzorci nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom in na površino vezanim PEG-silanom (SiND6-R-PEG), ki se na *Sliki 24* nahaja na skrajni desni. Na sliki vidimo, da vzorec nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil ne emitira svetlobe. Ob tem opazimo, da vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom in vezanim PEG-silanom na površini emitira šibkejšo svetlubo kot vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom, a brez PEG-silana na površini. Razlog je najverjetneje enak kot v prejšnjem primeru z Eu-kompleksom. Koncentracija nanodelcev z vgrajenim rodaminom in vezanim PEG-silanom na površini je namreč precej manjša kot pri nanodelcih z vgrajenim rodaminom in brez vezanega PEG-silana. Opazimo pa tudi, da vzorec nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom emitira svetlubo podobne jakosti kot raztopina Eu-kompleksa, ki je na *Sliki 24* v mali centrifugirki.



*Slika 24: Vzorci nanodelcev silicijevega dioksida brez vgrajenih fluorescenčnih barvil (levo), mala centrifugirka z Eu-kompleksom, SiND6-R (velika centrifugirka na sredini) in SiND6-R-PEG (desno) pod UV-lučjo (vir: Petra Ouček)*

## 5. ZAKLJUČEK

Med raziskovanjem smo sintetizirali nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenimi različnimi fluorescenčnimi barvili. Nato smo na njihovo površino vezali še PEG-silan. Končne rezultate svojega raziskovanja tako lahko opredelimo glede na hipoteze, ki smo si jih zastavili na začetku.

1. Sintetiziramo lahko nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenimi različnimi fluorescenčnimi barvili. **HIPOTEZA JE POTRJENA.**

Uspešno smo sintetizirali nanodelce silicijevega dioksida z vgrajenimi tremi različnimi fluorescenčnimi barvili, in sicer smo sintetizirali nanodelce z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F), rodaminom (SiND6-R) in Eu-kompleksom (SiND6-Eu). To smo dokazali kvalitativno, tako da smo si posamezne vzorce nanodelcev silicijevega dioksida z vgrajenimi fluorescenčnimi barvili ogledali in jih primerjali pod UV-lučjo.

2. Vgradnja fluorescenčnega Eu-kompleksa poveča velikost nanodelcev silicijevega dioksida v večji meri kot vgradnja preostalih dveh fluorescenčnih barvil. **HIPOTEZA JE OVRŽENA.**

Glede na dobljene rezultate meritev hidrodinamske velikosti nanodelcev silicijevega dioksida lahko opazimo, da je velikost nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F) večja od velikosti nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu). Nasprotno je opazno ob primerjavi velikosti nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) in nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu). Nanodelci silicijevega dioksida z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) so manjši kot tisti z vgrajenim Eu-kompleksom (SiND6-Eu). Ker hipoteza drži le ob primerjavi velikosti nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R), ne drži pa ob primerjavi velikosti nanodelcev z vgrajenim fluoresceinom (SiND6-F), jo ovržemo.

3. Vezava PEG-silana na površino nanodelcev silicijevega dioksida poveča hidrodinamsko velikost nanodelcev silicijevega dioksida za 10 ali več odstotkov ne glede na vgrajeno fluorescenčno barvilo. **HIPOTEZA JE DELNO POTRJENA.**

Na podlagi analize meritev hidrodinamske velikosti nanodelcev z vgrajenim rodaminom (SiND6-R) in Eu-kompleksom (SiND6-Eu) pred vezavo PEG-silana in po njej (SiND6-R-PEG in SiND6-Eu-PEG) opazimo, da se je hidrodinamska velikost v primeru nanodelcev z vgrajenim rodaminom po vezavi PEG-silana povečala za 10 %. V primeru nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom se je hidrodinamska velikost po vezavi PEG-silana povečala za 6 %.

Iz tega sledi, da je v primeru nanodelcev z vgrajenim rodaminom hipoteza potrjena, v primeru nanodelcev z vgrajenim Eu-kompleksom pa je hipoteza ovržena. V splošnem pa opazimo, da vezava PEG-silana sicer poveča hidrodinamsko velikost nanodelcev, je pa to povečanje lahko majhno oziroma nepomembno.

## 6. VIRI IN LITERATURA

- Adya, A. K. in Canetta, E. (2014). Chapter 14 – Nanotechnology and Its Applications to Animal Biotechnology. Academic Press, 247–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00014-6>
- Akhter, F., Rao, A. A., Abbasi, M. N., Wahocho, S. A., Mallah, M. A., Anees-ur-Rehman, H. in Chandro, Z. A. (2022). A comprehensive Review of Synthesis, Applications and Future Prospects for Silica Nanoparticles (SNPs). Silicon, 14, 8295-8310. <https://doi.org/10.1007/s12633-021-01611-5>
- Barthel H., Rösch L. in Weis J. (26. 7. 2005). *Fumed Silica - Production, Properties, and Applications*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527620777.ch91a>
- Bhushan, B. (2017). Introduction to Nanotechnology. *Springer Handbook of Nanotechnology*, 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_1)
- Blaznik, Š. (2023). *Spremljanje vpliva srebrovih nanoploščic na bakterije bakteriofage ter fluorescentno barvanje bakteriofagov* [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=149523>
- Bogataj, U., Štrus, J., Žnidaršič, N. in Kreft, M. (2016). Fluorescenčni označevalci v mikroskopiji: fotofizikalne značilnosti in uporaba v celični biologiji. Acta Biologica Slovenica, 59(2), 27–46. [http://bjjh-s.zrc-sazu.si/ABS/SI/ABS/Cont/59\\_2/27\\_pdfsam\\_ABS\\_2\\_2016.pdf](http://bjjh-s.zrc-sazu.si/ABS/SI/ABS/Cont/59_2/27_pdfsam_ABS_2_2016.pdf)
- Britannica. (b. d.). *Overview of nanotechnology*. <https://www.britannica.com/technology/nanotechnology/Overview-of-nanotechnology>
- Dobson P., Jarvie H. in King S. (8. 1. 2024). *Nanoparticle*. Britannica.com <https://www.britannica.com/science/nanoparticle>
- Eurolab. (b. d.). *Analiza transmisijске elektronske mikroskopije TEM*. <https://www.eurolab.net/sl/testler/urun-guvenlik-testleri/tem-gecirimli-elektron-mikroskobu-analizi/>
- Farooq, M. A., Dietz, K-J. (2015). Silicon as Versatile Player in Plant and Human Biology: Overlooked and Poorly Understood. Front Plant Sci, 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00994>
- Finnie S. K., Bartlett R. J., Barbé A. J. C. in Kong L. (15. 2. 2007). *Formation of Silica Nanoparticles in Microemulsions*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la0624283>
- Fran. (2014). Fluorescénca. V Slovar slovenskega knjižnega jezika. [https://www.fran.si/130/sskj-slovar-slovenskega-knjiznega-jezika/3542052/fluorescenza?FilteredDictionaryIds=130&View=1&Query=\\*fluorescenza](https://www.fran.si/130/sskj-slovar-slovenskega-knjiznega-jezika/3542052/fluorescenza?FilteredDictionaryIds=130&View=1&Query=*fluorescenza)
- Glantreo. (b. d.). <https://glantreo.com/products/mesoporous-silica/mesoporous-silica-mcm/>
- Gubala, V., Giovannini, G., Kunc, F., Monopol, M. P. in Moore, C. J. (2020). Dye-doped silica nanoparticles: synthesis, surface, chemistry and bioapplications. *Cancer Nanotechnology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0056-x>

- Hamler, S. (2011). *Fluorescenza z rentgenskimi žarki: zaključni seminar pri predmetu diplomske seminar*. Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.
- Hazdovac, K. (2021). *Sinteza evropijevih in terbijevih kompleksov kot fluorescentnih termosenzorjev* [Magistrska naloga]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=134123&lang=slv>
- Horacio E. Bergna, DuPont, Wilmington (1994). Colloid Chemistry of Silica: An Overview. *Advances in Chemistry*, 234, 1–47. <https://doi.org/10.1021/ba-1994-0234.ch001>
- Janjua, T. I., Cao, Y., Kleitz, F., Linden, M., Yu, C. in Popat, A. (2023). Silica nanoparticles: A review of their safety and current strategies to overcome biological barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.115115>
- Jeran M., Drab M., Veršnjak B. in Košir S. (2019.) Lastnosti vrstične elektronske mikroskopije (SEM) kot metode za preučevanje in karakterizacijo vzorcev  
[http://www.lkbf.si/uploads/biofiz\\_pdf/Jeran\\_etAll.pdf](http://www.lkbf.si/uploads/biofiz_pdf/Jeran_etAll.pdf)
- Jocić, G. (2020). *Magnetni nanodelci na osnovi lizina kot potencialni dostavni sistem amoksicilina*. (Raziskovalna naloga).
- Kolar, M. (2010). *Izdelava in karakterizacija hitozanskih nanodelcev za medicinsko uporabo* [Diplomsko delo]. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- Kovač Hace, S. (2011). *Nanodelci*. Konzorcij šolskih centrov.
- Kristoffersen, A. S., Erga, S. R., Hamre, B. in Frette, O. (2014). Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain Instrumentation: Rhodamine B, Coumarine and Lucifer Yellow. *Journal of Fluorescence*, 24, 1015-1024. <https://doi.org/10.1007/s10895-014-1368-1>
- Li, H., Chen, X., Shen, D., Wu, F., Pleixats, R. in Pan, J. (2021). Functionalized silica nanoparticles: classification, synthetic approaches and recent advances in adsorption applications. *Nanoscale*, 38, 15998–16016. <https://doi.org/10.1039/D1NR04048K>
- Lberman A., Mendez N., Trogler C. W., Kummel C. A. (2014) *Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212223/>
- Lberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C. in Kummel, A. C. (2014). Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surf Sci Rep*, 69, 132-158. [10.1016/j.surfre.2014.07.001](https://doi.org/10.1016/j.surfre.2014.07.001)
- LS Instruments. (b. d.). *Dynamic Light Scattering DLS* <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/introduction>
- Malvern Panalytical. (b. d.) *Zeta potencial*.  
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>
- Moore, S. (5. 5. 2023). *What is Nanotechnology and What Can It Do?*. Azonano.com.  
[https://wwwazonano.com/article.aspx?ArticleID=1134#\\_What\\_Can\\_Nanotechnology\\_Do](https://wwwazonano.com/article.aspx?ArticleID=1134#_What_Can_Nanotechnology_Do)

Fran. (2014). Nánotehnologíja. V *Slovar slovenskega knjižnega jezika*. <https://www.fran.si/133/sskj2-slovar-slovenskega-knjiznega-jezika-2/4497613/nanotehnologija?View=1&Query=nanotehnologija#>

Planinšek, O. (2006). *Koloidni silicijev dioksid kot nosilec učinkovin*. Farmacevtski vestnik, 57, 155–161.

Ramšak, H. (2023). *Sinteza okoljsko občutljivih fluorescenčnih sond na osnovi stirila, primernih za označevanje bioloških membran* [Magistrska naloga]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=144352>

Stojanovski, M. (2019). *Sinteza fluorescentnih sond na osnovi barvil nilsko rdečega in nilsko modrega, primernih za fluorescenčno mikroskopijo s stimulirano emisijo* [Magistrska naloga]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=111158>

Thermo Fischer Scientific. (b. d.). *Fluorescein (FITC)*. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html?SID=fr-fitc-main>

Urbančič, I. (2013). *Odziv biomembranskih domen na zunanje dražljaje* [Doktorska disertacija]. Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=43302>

Yusuf, T. L., Orimolade, B. O., Masekela, D., Mamba, B. in Mabuba, N. (2022). The application of photoelectrocatalysis in the degradation of rhodamine B in aqueous solutions: a review. RCS Advances, 40, 26176–26191. <https://doi.org/10.1039/D2RA04236C>

Zeta potencial. (2020). V *Farmacevtski terminološki slovar* (Druga, dopolnjena in pregledana izdaja). <https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski/iskalnik?iztocnica=z%C3%A9ta%20potenci%C3%A1l>

## 6.1. VIRI SLIK

Slika 3: Shamiryan, D., Abell, T., Iacopi, F. in Maex, K. (2004). Low-k dielectric materials. *Materials Today*, 7, 34–39. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00053-7](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00053-7)

Slika 4: Amazon. (b. d.). DFS's original SILICA GEL PACKETS (100 Packs 5 gms Each (500gms)) - Silica Gel Desiccant Packets for moisture absorb - Protects Cameras, Lenses, Mobile Phones, Electronics, Jewellery. Rust & Fungus free environment (100 Packs 5 gms Each). <https://www.amazon.in/original-SILICA-PACKETS-Packs-500gms/dp/B01KR1LQEK>

Slika 6: Fluorescein. (10. 10. 2022). V *Wikipedija: prosta enciklopedija*. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>

Slika 7: Thermo Fischer Scientific. (b. d.). *Fluorescein (FITC)*. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html?SID=fr-fitc-main>

Slika 8: Merck. (b. d.).

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/structures/357/132/5c9badd9-ceed-4c78-8d9d-fc94d9ad705e/800/5c9badd9-ceed-4c78-8d9d-fc94d9ad705e.png>

Slika 20: Anton Paar. (b. d.). *Dynamic Light Scattering Instrument: Litesizer DLS.*

<https://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/litesizer/?sku=155761>