



Magnetni nanodelci na osnovi lizina kot potencialni dostavni sistem amoksicilina

Raziskovalna naloga na področju kemije

Avtor: Goran Jocić

Mentorica: Mateja Godec, prof.

Somentorica: dr. Olivija Plohl

Ljutomer, 2020

Kazalo vsebine

1. Uvod.....	6
2. Teoretične osnove.....	7
2.1 Amoksicilin.....	7
2.2 L-lizin.....	8
2.3 Antibakterijska rezistenca.....	10
2.4 Nanodelci in nanokompoziti.....	11
3. Metode dela.....	13
3.1 Transmisijska elektronska mikroskopija.....	13
3.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo.....	14
3.3 Elektrokinetične meritve.....	16
3.4 Termogravimetrična analiza.....	18
3.5 UV-VIS.....	19
3.6 Sinteza funkcionaliziranih nanodelcev.....	20
3.7 Vezava derivatiziranega lizina na magnetno-silikatne nanokompozite.....	22
3.8 Adsorpcija amoksicilina na MNPs@SiO ₂ @GOPTS-Lys.....	26
4. Rezultati in diskusija.....	27
4.1 Transmisijska elektronska mikroskopija.....	27
4.2 IR-spektroskopija (FTIR).....	28
4.3 Elektrokinetične meritve.....	30
4.4 Termogravimetrična analiza.....	31
4.5 UV-VIS in sproščanje amoksicilina.....	32
5. Sklepi in zaključek.....	35
6. Uporabljeni viri in literatura.....	37

Zahvala

Velika zahvala gre mentorici Mateji Godec za vse spodbude in ves porabljen čas ter konstantno razpoložljivost, pa če je bilo to zgodaj zjutraj ali pozno zvečer. Lepa hvala tudi somentorici dr. Oliviji Plohl, ki nam je omogočila dostop do opreme Fakultete za strojništvo Maribor, do svojega kabineta in realizacijo praktičnega dela raziskovalne naloge, hvala pa tudi za vse njene popravke in predloge ob pisanju naloge. Zahvala gre tudi profesorici Klaudiji Tivadar za lektoriranje.

Povzetek

Amoksicilin se kot antibiotik na veliko uporablja za zdravljenje bakterijskih vnetij. Kljub njegovi oralni uporabi v obliki tablet so dostavni sistemi za tarčno dostavo antibiotika na ciljno mesto s pomočjo magnetnega suporta redko znani, vendar s stališča hitre, tarčne in kontrolirane dostave na obolelo mesto izrednega pomena. Zato smo v tem delu razvili magnetni nanokompozit, sestavljen iz magnetnega jedra, prevlečen s tanko silikatno prevleko ter funkcionaliziran z derivatom na osnovi lizina, ki nam služi kot dostavni sistem zdravila amoksicilin, ki ga ujamemo oziroma se preko različnih interakcij pripne na magnetni nosilec.

Silikatna prevleka, ki smo jo nanесли na magnetni nanokompozit, s svojo poroznostjo signifikatno poveča specifično površino, kar omogoča še večjo kapaciteto vezave liganda.

Lizin, ena izmed aminokislin, spada med osnovne gradnike našega telesa. Zaradi svojih prednosti se lahko uporablja v namene bioaplikacij. Ker pa je vezava lizina na površino silikatno-magnetnih nanodelcev težavna, smo lizin najprej kemijsko povezali z organosilanom glicidoksisilanom, kjer se aminoskupina lizina pri specifičnih reakcijskih pogojih poveže z epoksi skupino organosilana, nato pa se derivate lizina kovalentno veže s silanizacijo na magnetno-silikatni kompozit. Uspešnost vezave lizina na nanomagnetni kompozit smo preverili s FTIR-analizo, elektrokinetičnimi meritvami (zeta potencial) ter s termogravimetričnimi analizami, medtem ko pa smo morfologijo vzorcev opazovali s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Da bi spremljali kinetiko sproščanja amoksicilina na tarčnem mestu, smo antibiotik najprej ujeli v pripravljene nanodelce ter spremljali kinetiko sproščanja le-tega preko UV-VIS-spektroskopije v različnih časovnih obdobjih. Kinetiko sproščanja bomo skušali razložiti s kinetičnimi modeli sproščanja ter poskusili razložiti mehanizem vezave. Sproščanje bo potekalo v simuliranih bioloških pogojih, tj. PBS s pH 7.4.

Abstract

Amoxicillin is commonly used as an antibiotic for treating different bacterial infections. Although it is used orally in form of capsules, target delivering systems are rarely known, but in means of fast, precise and controlled delivery of medicine, of tremendous meaning. Because of that we developed a magnetic nanocomposite with magnetic core, thin layer of silica and functionalised with a derivate of lysine. It represents a potential delivery system of amoxicillin, which is attached to magnetic nanocomposites by several intermolecular interactions.

We layered them with thin silicate layer to prevent agglomeration and also making the surface applicable for further ligand reactions.

Lysine, amino acid that we used, is also a building block in our body. Because of its advantages it is used for bioapplications. Because the direct bonding of lysine to silicate surface is difficult, we derivated lysine with organosilane glycidoxysilane, that binds lysine with covalent bond to surface of the nanocomposite. We will try to confirm the success of bonding by FTIR analysis, electro-kinetic measurements or zeta potential and with thermogravimetric analysis. We will check the morphology of the sample with TEM analysis. To track the desorption of amoxicillin, we primarily adsorbed the antibiotic to nanocomposites and then tracked the release by UV-VIS analysis in different time intervals. The release of amoxicillin will happen in slightly basic circumstances at pH of 7,4.

1. Uvod

Vse bolj pereča tema v farmakološki industriji, ki se je pojavila oziroma rodila z odkritjem antibiotikov, je antibakterijska rezistenca. Ta pojav se zaradi nepravilne uporabe antibiotikov širi kot kuga in lahko doleti vsakogar, ki nepravilno uporablja antibiotike. Ker so bakterije zelo prilagodljive, zaradi takšne uporabe pride do omenjenega stranskega učinka, ki pa je smrtonosen kot bolezen sama. Ko se antibiotiki nepravilno vnašajo v organizem, pride do takšne prilagoditve bakterij, da postanejo odporne na antibiotike, kar povzroči številne neprijetnosti, kot so na primer: stranski učinki antibiotikov in zdravljenje z novimi in agresivnejšimi ter hkrati za organizem bolj ogrožajočimi antibiotiki, ki pa se lahko izkažejo kot pogubni ali pa ne učinkujejo in se bolezensko stanje konča s smrtjo.

Te tegobe se lahko na preprost način zaobidejo z uporabo sistemov za tarčno dostavo zdravil s točno znano količino antibiotika.

Odločili smo se raziskati ali bi lahko kot sistem za tarčno dostavo antibiotikov uporabili magnetne nanodelce oplaščene z silikatno prevleko in funkcionalizirane z derivatiziranim lizinom.

Hipoteze:

H 1: Uspešno sintetizirani magnetno-silikatni nanodelci, s kovalentno vezanim derivatiziranim lizinom, bodo stabilni in možni nosilci za tarčno dostavo antibiotika.

H 2: Magnetni modificirani nanodelci bodo služili kot dostavni sistem amoksicilina, ki se bo preko mešanih interakcij vezal na površino magnetnih nanodelcev na osnovi lizina.

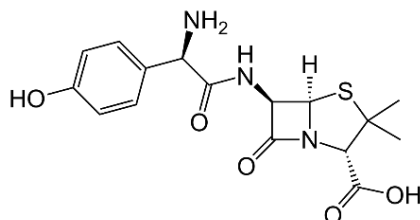
H 3: Sproščanje amoksicilina bo v simuliranih bioloških pogojih doseglo po določenem času sproščanja svoj maksimum, kjer bo sproščen amoksicilin v ravnotežju z amoksicilinom na magnetnih nanodelcih na osnovi lizina.

2. Teoretične osnove

2.1 Amoksicilin

Amoksicilin ali α -amino-p-hidroksibenzil penicilin ($C_{16}H_{19}N_3O_5S$) je antibiotik, ki spada v družino β -laktamov in se uporablja za zdravljenje bakterijskih vnetij, kot so vnetje srednjega ušesa, vnetje kože, vnetje grla in podobnih bakterijskih vnetij in okužb.

Na amoksicilinu najdemo več polarnih skupin, to so primarna aminska ($-NH_2$), sekundarna aminska ($-NH-$), ki pa pripada amino acilni skupini ($-CONH-$), ki je na skelet vezana z 08($-COOH$), hidroksilna ($-OH$) in ketonska ($-CO-$) ter tionilna skupina ($-S-$). Tiazolidinski obroč vezan na β -laktamski obroč skupaj tvorita biciklično strukturo, ki predstavlja, skupaj z aminoacilno skupino in karboksilno skupino, skelet penicilinov. Amoksicilin pa ima na mestu radikala benzenov obroč s hidroksilno skupino, vezano na ortopoziciji, prikazano na sliki 1, ki zaradi svojega oblaka delokaliziranih π -elektronskih parov poseduje zmožnost tvorbe van der Waalsovih interakcij, kot tudi, zaradi vseh funkcionalnih skupin, vodikovih vezi.



Slika 1: Skeletna formula amoksicilina; prikazane so vse omenjene funkcionalne skupine[1.]

Je eden izmed polysintetičnih penicilinov, ki se sintetizirajo na principu vgrajevanja, mešanici gliv, *Penicillium chrysogenum*, in organske hrane, se torej doda (p-hidroksibenzil) amin, ki ga gliva v procesu proizvodnje priključi 6-aminopenicilanski kislini.[2]

Zaradi svojih lastnosti, da je njegova absorpcija v prebavnem traktu torej zelo visoka in da so hujši stranski učinki zelo redki, je izjemno pomemben v farmacijski industriji. Običajno je dostopen v obliki kapsul, ki vsebujejo 500 mg amoksicilina in imajo dodatek klavunske kisline.

Običajno se v organizem vnaša peroralno, kar pa se izkaže za problematično, saj nima natančno predpisane terapevtske količine, kar pa predstavlja problematiko in neposredno

vpliva na razvoj antimikrobne rezistence. To se najpogosteje odraža v nezaželenih stranskih učinkih, kot so kožni ekcem, glavobol in bolečine v trebuhu pa seveda tudi antibakterijska rezistenca, ki trajno prepreči uporabo antibiotika za zdravljenje obolenj.

Kot antibiotik vpliva na bakterije tako, da poškoduje celično steno bakterij in ustavi proces transpeptidaze, kar pa onemogoči bakteriji, da preživi, saj je tako izpostavljena pogojem okolja, ki jih celična membrana bakterije ni zmožna prenesti.[3]

Delovanje antibiotika na mikrob se začne v fazi cepitve, torej ko pride do kopičenja membranskih beljakovin, povečane sinteze membranskih lipidov in celične stene, ki jo antibiotik ustavi in tako prepreči njeno cepitev, zaustavi jo torej pri razmnoževanju, zaradi poškodb na steni pa pride do plazmolize, kar povzroči celično smrt.

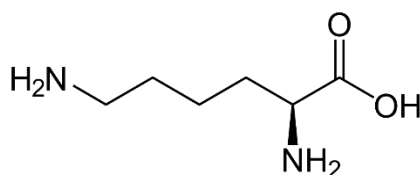
Bakterije, na katere vpliva amoksicilin, so bakterije rodov *Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Enterococcus* ter vrste *Listeria monocytogens*, *Haemophilus influenzae* in *Helicobacter pylori*, ima pa tudi učinek na *Escherichia coli*, *Actinomyces* in *Clostridial* ter na bakterije *Salmonella*, *Shigella* in *Corynebacteria*. [4]

Kot potencialni dostavni sistem z manjšimi terapevtskimi količinami lahko uporabimo funkcionalizirane nanostrukture z namenom, da bi zmanjšali možnost za prekomerno vnseno količino antibiotika, kar pa bi pripomoglo tudi k učinkovitosti antibiotika in zmanjšalo možnost za antibakterijsko rezistenco in ostale stranske učinke.

Funkcionalizirani nanodelci bi se injektirali intravenozno, pacientu v žilo, ki je neposredno v bližini obolelega mesta, in bi se s krvnim tokom po žili s pomočjo permanentnega magneta prenesli do obolelega mesta.

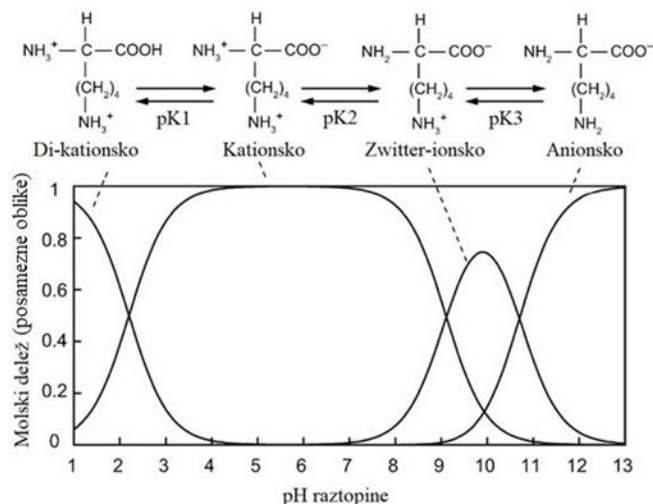
2.2 L-lizin

L-lizin ($C_6H_{12}N_2O_2$) je esencialna L- α -aminokislina, z linearno stransko verigo iz štirih $-CH_2-$ skupin, ki se zaključijo z aminske skupino. Stranski radikal je zaradi amino skupine polaren in tako hidrofilen. Molekula ima tri funkcionalne skupine, od katerih sta dve vezani na α -ogljikov atom; α -aminska ($-NH_2$) in α -karboksilna ($-COOH$) skupina, druga amino skupina pa je na ϵ -poziciji glede na α -ogljikov atom, to je prikazano na sliki 2.



Slika 2: Skeletna formula L-lizina; prikazane so vse omenjene funkcionalne skupine[2.]

L-lizin se odvisno od pH, podobno kot ostale aminokisliline, v raztopinah nahaja v različnih oblikah.[8] Te različne oblike so posledica karboksilne in aminske skupine, ki lahko reagirata med sabo na isti molekuli, kot tudi protonacija in deprotonacija aaminskih skupin in karboksilne skupine. Nas sliki 3 je prikazano prehajanje med oblikami v odvisnosti od pH in molskega deleža posamezne oblike. Strategijo pH odvisnosti obnašanja funkcionalnih skupin lizina smo uporabili tudi pri sami derivatizaciji lizina, ki je potekala pri pH 10. Pri tej pH-vrednosti je primarna aminska skupina lizina v večini deprotonirana in tako reagira z epoksi skupino organosilana, preko katerega jo potem vežemo na magnetno-silikatne nanostrukture.



Slika 3: Kislinsko-bazna karakterizacija L-lizina v odvisnosti od pH vrednosti, podano na podlagi pK_a ; $pK_{a1} = 2,2$, $pK_{a2} = 9,1$, $pK_{a3} = 10,7$ [8]

Ker *in vivo* pogoji ustrezajo pH 7,4, lahko iz grafa razberemo, da je derivatiziran L-lizin v našem primeru pri tem pH večinoma v stanju aniona, aminska skupina kakor tudi karboksilna skupina sta deprotonirani, če upoštevamo dejstvo, da je primarna aminska skupina zamrežena z organosilanom.

Ker je esencialna aminokislina, pomeni, da je telo ne more proizvesti same, zato jo je potrebno vnesti s prehranjevanjem. Pomembna je za izgradnjo več beljakovin, ki so pomembne za delovanje organizma, na primer: veže molekule kolagena, pomemben je za

izgradnjo karnitina, pomembnega za razgradnjo pri sesalcih in gradi encime, kot sta inzulin in tripsin, ki sta pomembna faktorja v uravnavanju krvnega sladkorja in prebave beljakovin.

Ta lastnost mu omogoča to, da se lahko uporablja v sistemih za tarčno dostavo, saj ga telo ne zazna kot grožnjo ali toksin, temveč kot gradnik oziroma aminokislino in ga ne poizkuša izločiti. Poleg bioaplikativnih sistemov je lizin, vezan na nanodelce, možno uporabiti še za odstranjevanje težkih kovin iz vode in mulja ter drugih okoljskih voda. To mu omogočata dve amino skupini, ki sta dobri reakcijski mesti za tvorbo koordinacijskih spojin z ioni težkih kovin oziroma kovin prehoda. Tako na nek način ujame ion in ga ne izpusti, dokler se ne doda močnejša baza ali kislina in tako je možno iste nanodelce na osnovi lizina uporabiti ponovno. [5]

Pri uporabi v magnetnih nanostrukturah se amino kislina pokaže kot uporabna, saj ima poleg ene zamrežene aminske skupine še eno prosto aaminsko skupino in eno karboksilno, ki je zmožna van der Waalsovih interakcij in tvorbe vodikove vezi, zato se lahko preko ene izmed interakcij poveže z molekulo amoksicilina.

2.3 Antibakterijska rezistenca

Rezistenca ali odpornost bakterij na antibiotike. Do tega pride po navadi zaradi nepravilnega vnosa antibiotikov, torej če predčasno prekinemo zdravljenje z njimi, ga po nepotrebnem podaljšujemo ali namenoma vnesemo v organizem, brez predhodno potrjene diagnoze. Temu sledi prilagoditev bakterij na to vrsto antibiotika, saj je bakterijski genski zapis zelo prilagodljiv na razmere v okolju.

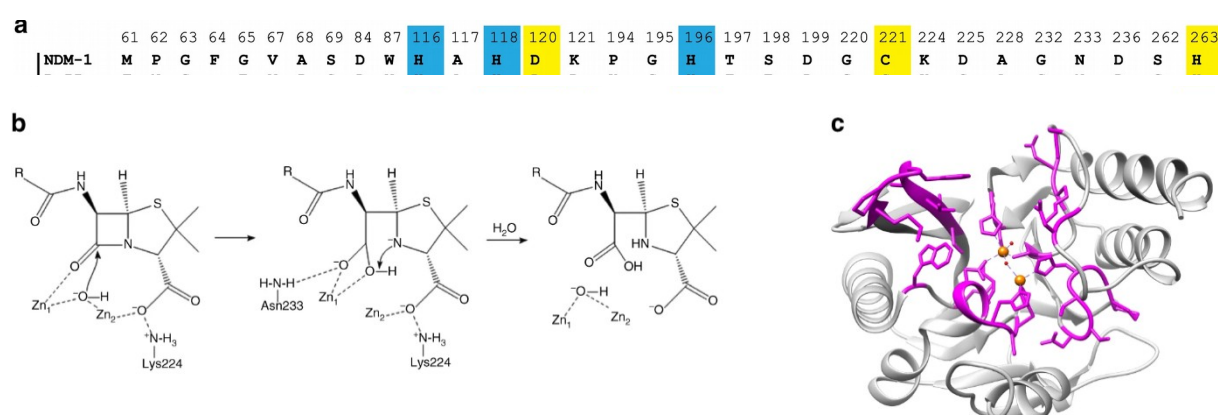
Bakterije so različne, pa čeprav je njihova oblika razmnoževanja cepitev, torej podvojevanje genskega zapisa in delitev plazmaleme, se od bakterije do bakterije genski material razlikuje, saj so zaradi zelo nestabilne molekule RNK nagnjene k pogostejšim mutacijam, ki pa pogosto vplivajo tudi na DNK, v primeru, da jo bakterije imajo.

Drugi razlog za razlike v bakterijah pa je horizontalni prenos genov, torej transformacija, konjugacija in transdukcija, pri katerih pa bakterija dobi tuj genski zapis in ga vpelje v svojega.

Te razlike med bakterijami so vzrok za oblikovanje antibakterijske rezistence, saj do nje pride, ker bolj prilagojene bakterije preživijo. In le te, zaradi pogostih mutacij, razvijejo sistem, ki jih naredijo odporne na antibiotike. Primeri teh sistemov so: tvorba membranske beljakovine, ki antibiotik izčrpa iz celice, sinteza encima, ki antibiotik razgradi, in sprememba

aktivnega mesta za antibiotik, torej da mesto, na katerega bi antibiotik deloval, zamenjajo z drugim ali pa ga prilagodijo, tako da postane odporne.[4]

Za amoksicilin specifično in ostale β -laktamske antibiotike v bakterijah pride do mutacije gena za izgradnjo karbapenamaz, torej encimov, ki lahko razgradijo β -laktamski obroč in tako naredijo antibiotik neučinkovit. Ta gen so poimenovali po kraju odkritja, po New Delhiju, imenuje pa se NDM-1, zapis za njegovo izgradnjo ali aminokislinski zapis in za princip delovanja ter struktura so prikazani na sliki 4. Ta isti gen lahko preživele bakterije s pomočjo horizontalnega prenosa genov predajo drugim bakterijam in tako postanejo tudi ostale bakterije odporne na antibiotik.[16][4]



Slika 4: a – sekvenca aminokislin v NDM-1, b – princip delovanja aktivnega mesta, razpenjanje β -laktamskega obroča, c – struktura encima metalo- β -laktamaze, vijolični del predstavlja aktivno mesto, oranžni sferi na sliki predstavljata cinkova iona v koordinacijskem kompleksu $Zn^{2+}(Cys)_3 Zn^{2+}CysHisAsp$ [16]

2.4 Nanodelci in nanokompoziti

Nanodelci so definirani kot delci v velikosti od 10 do 100 nm in so raznih oblik, ki se osredotočijo na tri osnovne strukture: sfere ali kubusi, torej koloidni nanodelci, tube ali cevi, torej nitkasti nanodelci in ravne površine. So iz različnih materialov, prevodnih, polprevodnih ali izolatorskih, in iz različnih delcev, molekul, kristalov, mrež ali atomov.

Največja uporabnost se je pokazala pri nanodelcih iz ogljika, kot je na primer grafen (tubasti nanodelci), zelo učinkoviti in uporabni v širokem spektru pa so tudi magnetni nanodelci iz različnih kovin in kovinskih oksidov.[19]

Nanokompoziti, pa so nanodelcem podobni v večini lastnosti, vendar ja razlika v tem, da so pogosto iz več materialov, torej so nehomogene zmesi različnih atomov molekul in snovi.

Pogosto so jedra nanokompozitov opláščena z molekulami ali s kristali ali pa je na njihovo površino neposredno vezana ali adsorbirana snov.

V bioaplikativnih raziskavah se oboji izkažejo kot uporabni, saj jih zaradi majhne velikosti in ekskrecije preko telesnih tekočin ter seveda učinka, ki naredi antibiotike bolj učinkovite.[17]

Magnetni nanodelci, ki smo jih uporabili za osnovo nanokompozita so bili iz maghemita. Za sintezo MNP-maghemita je na voljo veliko različnih metod: »koprecipitacija, koprecipitacija v reverzih mikro emulzijah, hidrotermalna sinteza, sol-gel, citratni prekurzor, mehansko mletje in sonokemijska sinteza« [9] itd. Magnetni nanodelci, ki smo jih uporabili pri našem raziskovalnem delu, so bili sintetizirani z metodo soobarjanja oziroma koprecipitacije ionov ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) iz vodne raztopine. Obarjanje oziroma precipitacija se sproži s kemijsko reakcijo, ki povzroči prenasičenje netopnega produkta. Sproži se lahko na primer z dodajanjem hidroksida, kjer je rezultat kemijske reakcije nastanek netopnih železovih hidroksidov. Pri obarjanju najprej nastane magnetit, ki pa v prisotnosti kisika oksidira v maghemit.

3. Metode dela

3.1 Transmisijska elektronska mikroskopija

Transmisijska ali presečna elektronska mikroskopija je v mnogih pogledih podobna svetlobni mikroskopiji, le da so namesto fotonov elektroni.

Zaradi te zamenjave so teoretično in praktično zmogljivejši od svetlobnih, saj je pri svetlobnem mikroskopu ovira najmanjša valovna dolžina vidne svetlobe, ki znaša 380 nm. Pri elektronskem mikroskopu pa je zmogljivost večja, saj se z elektronskimi topovi dosežejo visoke energije elektronov, tako da se njihova valovna dolžina zmanjša, na okoli 50 pm, kar pa je premer vodikovega atoma.

Sestavljeni so iz elektronskega topa, elektromagnetnih leč in fluorescentnega zaslona, vse skupaj pa je v kovinskem ohišju.

Elektronski top omogoča, da elektroni dosežejo visoke energije, s katerimi imajo zelo kratko valovno dolžino, ki je premo sorazmerna z največjo možno povečavo. Ker elektroni ob trku z drugimi molekulami hitro izgubijo energijo in s tem se zveča tudi valovna dolžina, je za operativnost elektronskega mikroskopa potreben vakuum s tlakom okrog 10^{-4} mmHg. Elektronski izvor je sestavljen iz tankega volframovega filameta v obliki konice, ki usmeri elektrone iz anode v uniformen žarek, usmerjen proti naboru leč. Filament je umerjen in stabiliziran na negativnih 50 do 100 kV, odvisno od preostanka naprave.

Leče so sestavljene iz obročastih železnih elektromagnetov, s prilagodljivo napetostjo, ki predstavlja faktor prilagodljivosti lečine povečave. V elektronskem mikroskopu najdemo tri vrste leč: kondenzator, objektiv in projekcijske leče. Leče kondenzatorja usmerijo elektronski žarek proti vzorcu, ki se nahaja tik nad objektivom, ki žarek lomi in ga usmeri proti projekcijski leči, na kateri se ustvari vmesna slika. Ta se še enkrat lomi v projekcijski leči in se na koncu projicira na fluorescentni zaslon. Ostrina slike se uravnava s spreminjanjem toka v

objektivu in povečava s spreminjanjem toka v projekcijski leči. Da slika doseže visoko ločljivost, je potrebno pravilno nastaviti toka v obeh lečah.

Žarek elektronov konča svojo pot, ko zadene ob fluorescentni zaslon. Ta na mestih trka z elektroni zaradi kemiluminiscence materiala, iz katerega je, odda foton z valovno dolžino v vidnem spektru, kar pa se vizualno kaže kot slika s sivimi in belimi mesti. Bela mesta so tista, ki so bila izpostavljena elektronom, siva oziroma včasih tudi črna pa tista, ki niso bila oziroma so bila le delno osvetljena z elektroni. Do različne osvetlitve pride zaradi različne debeline ali gostote opazovanega vzorca, saj gostejši materiali in debelejši ali večji delci ter več delcev v aksialni legi povzroči več razpršitve elektronov, torej jih manj prispe do fluorescentnega zaslona in zato je na tistem mestu slika temnejša.[1]

Naša vzorca smo poslali na Inštitut Jožef Štefan, kjer je bila opravljena analiza delcev z elektronsko mikroskopijo. Naprava, s katero so izvedli meritve, je bila Jeol JEM-2100 (200kV).

3.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo

FTIR ali Fourier-transform infrared spectroscopy deluje na principu infrardeče svetlobe (v nadaljevanju IR), ki ga odda žareče črno telo v obliki žarka. Žarek je usmerjen skozi interferometer, kjer poteče tako imenovano spektralno kodiranje. Žarek se razcepi, dva žarka pa se po tem usmerita tako, da pred ponovno združitvijo ali rekombinacijo prepotujeta različne razdalje. Pri tem se upošteva, da je pri združitvi dveh valovanj enake frekvence nastali vzorec določen s fazno razliko med njima. Če sta valovanji v enaki fazi, se bosta ojačali, torej poteče konstruktivna interferenca, če sta zunaj faze, pa se bosta oslabili in je potekla destruktivna interferenca. Rekombiniran (kodiran) žarek je nato usmerjen skozi vzorec, pri čemer ta absorbira specifične frekvence energije iz elektromagnetnega valovanja (interferograma), ki so za dan vzorec unikatne [14]. Unikatnost je posledica tega, da lahko absorbiran foton (iz IR- spektra) vzbudi specifično vibracijo molekule le, če je razlika energije med vibracijskima stanjema enaka energiji fotona. Energija fotona pa je odvisna od njegove frekvence ($E = h \cdot \nu$; pri čemer je »h« Planckova konstanta in »ν« frekvenca fotona). Tako različne vibracije absorbirajo specifične fotone iz določenih delov spektra, kar pusti v spektru unikaten vzorec. Detektor nato izmeri signal interferograma v obliki odvisnosti energije od časa za vse frekvence hkrati. Pri tem se pri izrisu spektra upošteva referenca oziroma tako imenovan »background« ali ozadje. Tega predstavlja spekter žarka, ki ni bil v stiku z vzorcem, zato je ozadje potrebno izmeriti pred vzorcem. Rezultat meritve je tako spekter, ki ga dobimo, ko interferogram avtomatsko odšteje spekter reference od spektra

vzorca z Fourierjevo transformacijo. IR- spekter, ki ga dobimo iz FTIR-spektrometra, leži v srednjem IR-področju (valovna dolžina λ : 2,5-15 μm) oziroma med valovnimi števili 4000 in 400 cm^{-1} . S to metodo se v praksi določuje predvsem prisotnost različnih funkcionalnih skupin. Energije prehoda, ki ustrezajo spremembam vibracijskih energetskih stanj mnogih funkcionalnih skupin, so namreč locirane v srednjem IR-področju. Tako lahko vidne absorpcijske pasove v dobljenem FTIR-spektrom povežemo oziroma uporabimo za identifikacijo specifičnih funkcionalnih skupin v molekuli oziroma vzorcu. Tipično imamo štiri področja tipov vezi, ki jih lahko analiziramo s pomočjo FTIR-spektra [14]. Enojne vezi (O–H, C–H in N–H) se nahajajo v območju višjih valovnih števil (2500–4000 cm^{-1}), dvojne in trojne vezi pa detektiramo v srednjem območju valovnih števil (dvojne: 1500–2000 cm^{-1} in trojne: 2000–2500 cm^{-1}). Pri nizkih valovnih številih med približno 650 in 1500 cm^{-1} opazujemo valovna števila kompleksnih vzorcev, ki izvirajo iz vibracij samih struktur in niso specifična glede na vez, so pa unikatni za celotne molekule in strukture. Tako jih lahko uporabimo za njihovo identifikacijo. Zaradi možnosti identifikacije molekul to območje FTIR-spektra v literaturi velikokrat poimenujejo »fingerprint« območje. Glavna omejitev te analize metode je predvsem ta, da lahko analiziramo le spojine, ki izkazujejo dipolni moment, torej da imajo v sebi vezane molekule z različno elektronegativnostjo, saj molekule brez dipolnega momenta ne absorbirajo infrardečega spektra in jih tako ni možno analizirati. Dodatek ATR (Attenuated total reflectance oziroma oslabljen totalni odboj) omogoča izvajanje meritev vzorcev v obliki trdnin ali kapljev in brez predhodnih priprav. ATR sestavlja element z visokim lomnim količnikom, običajno je to diamant, skozi katerega se pod kritičnim kotom usmeri IR-žarek. Na zgornjo stran tega elementa stisnemo vzorec, v katerega žarek kljub odboju delno penetrira in oslabi zaradi absorpcije energije. Ta tehnika je zaradi majhne penetracijske globine primerna za merjenje površinskih lastnosti oziroma vzorcev z zelo majhni volumni. Na sliki 5. je prikazana naprava za analizo FTIR, s pomočjo katere smo izvedli meritve. Analize infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo oziroma FTIR (Fourier- transform infrared spectroscopy) smo izvedli na merilni napravi PerkinElmer Spectrum GX z dodatkom ATR (attenuated total reflectance – oslabljen popoln odboj) z diamantnim kristalom v merilnem območju 4000–400 cm^{-1} in resoluciji 2 cm^{-1} . Rezultat oziroma izrisan spekter je povprečje 16 meritev. Vse vzorce smo analizirali v obliki prahu oziroma osušene. Te smo pred meritvijo razporedili po površini kristala in rahlo stisnili z vijakom.



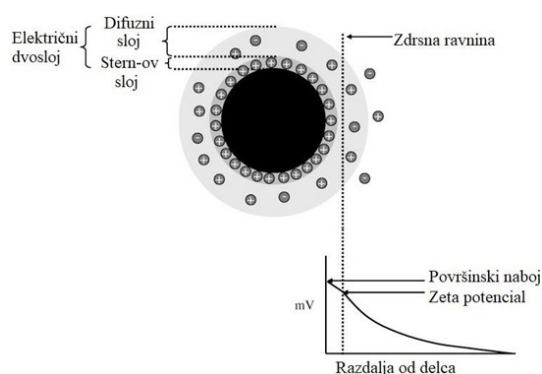
Slika 5: PerkinElmer Spectrum

GX z dodatkom ATR

3.3 Elektrokinetične meritve

Pojav, povezan s premikanjem ali kinetiko nabitih delcev v mediju ali kinetiki v mediju na nabiti površini, je povezan s štirimi glavnimi interakcijami. To so elektroforeza, elektroosmoza, strujni potencial in sedimentacijski potencial ali Dornov efekt. Vsi skupaj so povezani preko potenciala ζ , ki nastane zaradi električnega dvosloja v mediju okoli nabitih delcev ali površine.

Potencial je definiran kot električni potencial na zdrsni ravnini, ta pa se nahaja v drugem sloju, torej v difuznem ali Gouyovem sloju, slika 6.1. Znotraj zdrsne ravnine se nahaja še Sternov sloj, ki pa je po definiciji sloj ionov s koloidnim delcem povezanim preko van der Waaslovih interakcij in elektrostatične privlačnosti.[1]



Slika 6.1: Prikaz interpretacije zeta potenciala[13]

Najpomembnejši

faktor, ki vpliva na zeta potencial, je pH-medija. Drugi vplivajoči dejavniki so še ionska jakost, koncentracija dodatkov v raztopini in temperatura.

Na podlagi zeta potenciala lahko sklepamo o stabilnosti disperzij ali emulzij. Stabilnost je odvisna od razmerja dveh vrst nasprotujočih si sil, to so van der Waalsove interakcijske sile in elektrostatične privlačne sile. Visok zeta potencial, pozitiven ali negativen, pomeni, da je takšna raztopina stabilna, saj je razmerje med silami pomaknjeno v elektrostatično skrajnost, kar pa zagotavlja, da se delci zaradi enake nabitosti ne bodo privlačili, temveč odbijali in tako tvorili idealno disperzijo ali emulzijo. Bliže je zeta potencial ničli, bolj je raztopina nestabilna, saj prevladujejo van der Waalsove interakcijske sile, ki delce povezujejo v koagulate in flokule.

Meritev običajno temelji na elektroforetični mobilnosti delcev, ki se premikajo med elektrodama z znanim potencialom, zaradi katerih se vzpostavi tok. Delci se med elektrodama premikajo glede na naboj na površini. S spreminjanjem napetosti se delci začnejo premikati in med premikanjem se izmeri njihova hitrost oziroma elektroforetska mobilnost. Ta se izmeri z Dopplerjevim merilnikom hitrosti. Na podlagi meritev računalnik preko enačb izračuna zeta potencial. Na sliki 6.2 je prikazana aparatura, s katero smo izvedli meritve zeta potenciala, na sliki 6.3. pa električna celica, v kateri potekajo meritve. Meritve zeta potenciala delcev smo izvedli z napravo ZetaSizer Nanoseries. Vzorcem (v obliki disperzije) smo pred meritvijo uravnali pH-vrednost na 10,5 in jih prelili v plastično epruveto z mešalnim magnetom. Epruveto z vzorcem smo pritrdili na avtomatski titrator in skozi odprtino na vrhu vstavili pH-elektrodo. Naprava je dodajala 0,1 M HCl (po cevkah) za potrebe nižanja pH-vrednosti med izvajanjem meritev. Meritve so se izvajale avtomatsko preko računalniškega programa. Pred izvedbo meritve smo morali v programu izbrati vrsto analizne metode in vnesti potrebne podatke. Potrebni podatki za začetek meritve so bili: ime vzorca, material (Fe_3O_4), disperzijski medij (voda pri 298,16 K), model Henryjeve funkcije, ki jo program upošteva pri izračunu zeta potenciala po enačbi Smoluchowskega, temperatura (25 s; čas vzpostavitve ravnotežja 120 s), tip celice (prepognjena kapilarna celica za enkratno uporabo DTS1070), trajanje meritve (avtomatsko, minimum runs: 10, maximum runs: 100), meritev (število meritev: 3, zamik med meritvami: 0 s), nastavitve meritve (avtomatska izbira slabljenja, avtomatska izbira napetosti), analizni model (avtomatski), titranti (0,1 M HCl), volumen vzorca (10 mL), dispenzer (avtomatski), pH-zaporedje (začni pri danem pH, končen 2,0, povečevanje/padanje: 0,5, natančnost: 0,2).



Slika 6.2 (levo): ZetaSizer Nanoseries

Slika 6.3 (desno): Prepognjena kapilarna celica za enkratno uporabo DTS1070

Meritve površinskega naboja so uporabne, ko pride do dokazovanja novih funkcionalnih skupin ali molekul, vezanih na magnetne nanokompozite, saj je v primeru, da je bila adsorpcija uspešna, zaradi spremembe količine in vrste dostopnih funkcionalnih skupin nabojev na površini delcev drugačen in tako se v odvisnost od pH spremeni tudi zeta potencial in premakne izoelektrična točka.

3.4 Termogravimetrična analiza

Aparatura za TGA je v bistvu analizna tehtnica, ki beleži spremembo mase in ima zmožnost delovati tudi pri visokih temperaturah.

Gre za napravo, ki na podlagi vnesenih podatkov postopoma viša temperaturo, med tem pa beleži spremembo mase vzorca. Vzorec je trdna snov, ki je običajno osušena in praškasta, in se v majhni količini, ki znaša cca. 5 mg, nanese v majhno posodico iz aluminijevega oksida in se postavi na predhodno tarirano tehtnico. S to metodo se določata prisotnost in delež organskih spojin v vzorcu. Te med termičnim razpadom v popolnem scenariju oksidirajo do vode in ogljikovega dioksida, to pa je seveda odvisno od atmosfere, v kateri se analiza opravlja. Temperaturno območje meritev običajno ne presega 1273,16 K. Slika 7.1. prikazuje napravo za termogravimetrično analizo, ki smo jo mi uporabili pri naših analizah, slika 7.2. pa prikazuje jeziček tehtnice, na katerega se položi korundno posodico z vzorcem. Termogravimetrične analize oziroma TGA (Thermogravimetric analysis) smo izvedli na aparatu Mettler Toledo (model: TGA/SDTA 851). Vzorce (≥ 5 mg) smo prenesli v posodico iz aluminijevega oksida. To smo postavili na predhodno tarirano tehtnico v odprto komoro aparata in jo zaprli. V računalniški program smo vnesli potrebne parametre: hitrost segrevanja (10 K /min), začetno (298,16 K) in maksimalno temperaturo (873,16 K), vrsto atmosfere (kisikova atmosfera), njen pretok (10 ml/min) in pretok kisika in

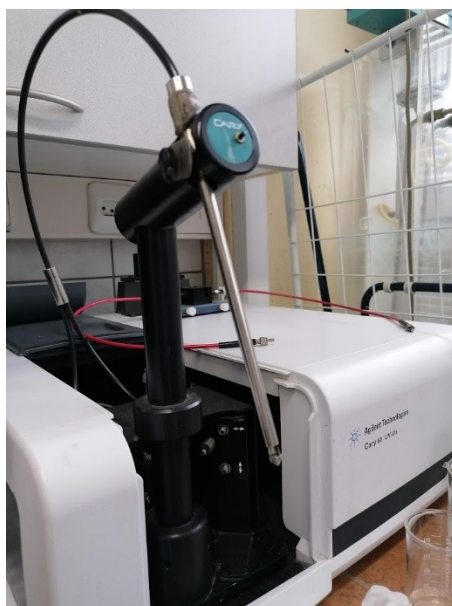


zagnali meritev, pri čemer program avtomatsko beleži izgubo teže vzorca. S to metodo smo določevali prisotnost in delež organskih MNK.

3.5 UV-VIS

Ta metoda analize je podobna FTIR-analizi, s tem da se pri njej namesto infrardeče svetlobe uporablja spekter vidne in ultravijolične svetlobe, torej svetloba z valovno dolžino od okoli 190 nm pa do 1100 nm. Razlika je tudi v tem, da se ne uporabi celoten spekter, temveč le določen izbran odsek spektra. Tako lahko tudi določimo količino snovi, ki je v vzorcu, ki ga analiziramo. Zaradi presevnosti mora biti vzorec raztopina ali plin, saj bi trdnina preprečila prehod žarkov, razen v primeru, da bi bila dovolj prosojna. Koncentracije snovi v vzorcu se preračunajo po umeritveni krivulji, torej po enačbi za trendno črto grafa, ki temelji na analizi znanih količin snovi v raztopini ali plinu.

Podobno kot pri FTIR-analizi je tudi tukaj potrebno posneti oziroma izmeriti ozadje, s tem da to ozadje predstavlja medij, v katerem se nahaja snov, ki jo preučujemo. Na sliki 8. je prikazan aparat s katerim smo opravljali meritve UV-VIS. Meritve analize UV-VIS smo opravili na aparaturi Cary 60. Najprej smo pri valovni dolžini 273 nm izmerili ozadje, torej PBS-pufer, potem pa izmerili še naš vzorec. Da smo vzorec lahko pravilno izmerili in analizirali, je zaradi koloidnih delcev najprej bilo potrebno opraviti ultra filtracijo. To smo opravili z inertnim plinom dušikom (N_2) in s 5kDa (kilodalton) filtrirnim papirjem. Filtrat smo nato analizirali in iz serije meritev izbrali prve tri ter poračunali njihovo povprečno vrednost. Na podlagi predhodno narejenih umeritvenih krivulj smo tako lahko izračunali količino sproščenega amoksicilina.



Slika 8.: Cary 60

3.6 Sinteza funkcionaliziranih nanodelcev

Ker magnetni nanodelci niso homogena zmes različnih spojin, jih je bilo potrebno sintetizirati v več stopnjah oziroma z več postopki, da je bil dosežen željen produkt. Najprej je bila izvedena sinteza magnetne osnove, potem oplaščevanje s siliko, nato derivatizacija lizina in na koncu vezanje derivata na površino nanokompozita.

3.6.1 Sinteza magnetnega nanokompozita

Magnetni nanokompozit je bil sintetiziran po podobnem principu, kot so ga uporabili predhodni raziskovalci te vrste nanokompozitov [7, 10].

Natančen postopek priprave je opisan v nadaljevanju, navedeni so tudi materiali in kemikalije, ki so se uporabile pri procesu.

Uporabljene kemikalije:

- filtrirana voda – sistem MilliQ
- železov (II) sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), $\geq 99,0$ %, mol. m.: 278,01 g/mol, Honeywell
- železov (III) sulfat hidrat ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), 97 %, mol. m.: 399,88 g/mol, Honeywell
- amonijev hidroksid (NH_4OH), 25 % vodna raztopina, Honeywell.

Delo je potekalo po naslednjem postopku:

- Pripravili smo 0,7 L razredčene vodne raztopine amonijaka s pH 11.
- Stehtani količini: $m(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 3,752$ g in $m(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}) = 3,024$ g smo z 0,5 L miliQ vode sprali v 1 L čašo na magnetnem mešalu.
- Z dodajanjem pripravljene razredčene raztopine amonijaka (po kapljicah 1/s – ob mešanju) smo zvišali pH-vrednost raztopine na 3. Pri tem pH smo mešali še 30 min.
- V raztopino smo med mešanjem prelili 250 mL NH_4OH (25 %), izmerili pH in ga s postopnim dodajanjem NH_4OH (25 %) zvišali do 11,6. Pri tem pH smo mešali še 30 min.
- Čašo smo odstranili iz mešala in pod njo postavili večji magnet. Po 3 min posedanja delcev z magnetom smo pazljivo odlili tekočino in nato delce 3-krat sprali ter posedli s pripravljeno razredčeno raztopino amonijaka. Med odlivanjem tekočine smo magnet vedno držali pod čašo.

- Nanodelce smo ponovno (3-krat) sprali z MilliQ vodo in jih v njej tudi shranili.

Sintetizirani magnetni nanodelci maghemita so bili označili s kratico: MNPs.

3.6.2 Oplaščevanje magnetnih nanodelcev s siliko

Stabilizacija vodne disperzije MNPs z adsorpcijo CK

Uporabljene kemikalije:

- filtrirana voda – sistem MilliQ
- amonijev hidroksid (NH₄OH), 25 % vodna raztopina, Honeywell
- citronska kislina, ≥99.5 % (brez vode), Roth.

Delo je potekalo po naslednjem postopku:

- Pripravili smo 50 mL amonijeve raztopine s pH 12.
- 1 g MNPs smo dispergirali v 60 mL vode (16,7 mg/mL) in temu med mešanjem dodali 5 mL CK s koncentracijo 0,5 g/mL.
- Z dodajanjem pripravljene razredčene raztopine amonijaka (po kapljicah 1/s – ob mešanju) smo dvignili pH disperzije na 5,2 (298,16 K).
- Sledilo je 90 min mešanja na refluxu pri 353,16 K.
- Po ohladitvi pod 298,16 K smo pH zvišali na 10,1 z uporabo NH₄OH (25%).
- Pod bučko smo postavili magnet, počakali 30 s, odlili suspenzijo s stabiliziranimi MNPs@CK in jo shranili. Nestabiliziran ostanek, ki se je posedel, smo zavrgli.

MNPs, na katere smo adsorbirali citronsko kislino, smo označili s kratico: MNPs@CK.

Oplaščanje stabiliziranih MNPs s siliko

Pri preračunu potrebne količine TEOS-a in etanola smo pri delu upoštevali naslednje predpostavke:

- $m(TEOS) = \frac{m(MNPs@CK)}{0.6}$; gostota TEOS-a: 940 mg/mL.
- $m(etanola) = \frac{m(TEOS)}{0.1}$; gostota etanola: 790 mg/mL.

Uporabljene kemikalije:

- filtrirana voda – sistem MilliQ
- amonijev hidroksid (NH_4OH), 25 % vodna raztopina, Honeywell
- aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), 99 %+, Honeywell
- TEOS (Tetraetil ortosilikat $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$), $\geq 99.0\%$, mol. m.: 208,33 g/mol, SigmaAldrich.

Delo je potekalo po naslednjem postopku:

- Disperziji stabiliziranih MNPs@CK smo dodali enak volumen acetona in mešali 30s.
- MNPs smo posedli s pomočjo magneta, odlili tekočino in jih dispergirali v vodi v koncentraciji 15 mg/mL.
- Disperzijo smo za 10 min postavili v sušilnik pri 353,16 K.
- Z uporabo NH_4OH (25 %) smo dvignili pH na 10,6.
- Na drugem mešalu smo k preračunani količini etanola odpipetirali TEOS.
- Disperzijo iz prvega mešala smo prelili k pripravljene raztopini na drugem. V kolikor je bilo to potrebno smo vrednost pH z NH_4OH (25 %) dvignili nazaj na 10,6 in pustili mešati 2 uri.
- Po mešanju MNPs@ SiO_2 posedemo z magnetom. Če je posedanje zelo neučinkovito, po kapljicah dodajamo nasičeno raztopino NaCl.
- Posedle MNPs@ SiO_2 smo sprali (3-krat) in dispergirali v vodi. Disperzijo smo za 10 min postavili v sušilnik pri 353,16 K in nato shranili.

MNPs@CK, ki smo jih oplastili s silikatno prevleko, smo označili s kratico: MNPs@ SiO_2 .

3.7 Vezava derivatiziranega lizina na magnetno-silikatne nanokompozite

Da bi lahko L-lizin vezali posredno na silikatno prevleko nanokompozita, ga je bilo potrebno vezati oziroma derivatizirati z molekulo GOPTS. Za tem je sledila vezava molekule GOPTS-Lys na silikatno prevleko nanokompozita.

3.7.1 Derivatizacija L-lizina z GOPTS in vezava na silikatno prevleko nanokompozita

Za spajanje biomolekul z anorganskimi substrati se lahko uporabi funkcionalne silanske spojine [12]. Zelo razširjeno silansko modifikacijsko sredstvo je glicidoksi spojina GOPTS (3-Glicidiloksi propiltrimetoksisilan), ki ima v svoji strukturi reaktivno epoksi

skupino in tri metoksi R–O–CH₃ skupine (R=Si). Uporablja se za povezovanje anorganskih površin, ki imajo prisotne –OH skupine, z biomolekulami, ki imajo prisotno vsaj eno od naštetih funkcionalnih skupin; tiolno (R–SH), aminsko ali hidroksilno. Pri tem načinu vezave se molekule med seboj povežejo s kemijsko kovalentno vezjo.

Potrebna količina L-lizina za posredno vezavo na MNPs@SiO₂ z uporabo zamreževalca GOPTS

V tem primeru gre za specifično vezavo vsake molekule L-lizina (preko njene primarne aminske skupine) z epoksi skupino molekule GOPTS, ki se na drugi strani preko metoksi funkcionalne skupine veže s silanolno skupino na površini silikatne prevleke. Gostota silanolnih funkcionalnih skupin (Si–OH) na površini silike, na podlagi podatkov iz literature, znaša 5 silanolnih funkcionalnih skupin na 1 nm² [18]. To pomeni, da lahko posredno in specifično vežemo 5 molekul L-lizina na 1 nm² MNK.

Koncentracija L-lizina pri neposredni vezavi z uporabo GOPTS-ja

Uporabljena koncentracija L-lizina pri neposredni vezavi bo nižja, kot so jo za rezultat vezave 3 molekul L-lizina na 1 nm² uporabili v delu [7]. S tem se želimo izogniti stalnim stikom med molekulami L-lizina, ki tako tvorijo skupke že pred vezavo. Pri dodajanju 23 mg L-lizina v 90,1 ml vode je začetna koncentracija L-lizina 0,26 mg/mL.

Preračun potrebne količine L-lizina za vezavo na MNPs@SiO₂

Na podlagi podatkov iz prejšnjih odstavkov in podatkom o molski masi L-lizina (146,19 g/mol) ter z upoštevanjem enačb lahko izračunamo, da je za vezavo L-lizina na GOPTS in posledično na MNPs@SiO₂ (z upoštevanjem izgub oziroma da bomo vezali 1 molekul/1 nm²) na 100 mg MNPs@SiO₂ potrebnih 11,5 mg L-lizina.

Formuli za preračun količin:

$$n = \frac{N}{N_A}$$

Kjer je:

n množina snovi, podana v mol

N število atomov, molekul

N_A Avogadrovo število ($6.022\ 140\ 760 \times 10^{23}$).

$$m = n \times M$$

Kjer je:

m masa snovi, podana v g

n množina snovi, podana v mol

M molska masa snovi, podana v g mol^{-1}

3.7.2 Vezava GOPTS-Lys na površino MNPs@SiO₂

Pri preračunu količine potrebnega GOPTS-ja smo upoštevali naslednje podatke in razmerja:

- $N(\text{Si} - \text{OH}) = N(\text{GOPTS}) = N(\text{lizin})$
- $M(\text{lizin}) = 146,19 \text{ g/mol}$; $M(\text{GOPTS}) = 236,34 \text{ g/mol}$

Po formuli:

$$m = n \times M$$

Kjer je:

m masa snovi, podana v g

n množina snovi, podana v mol

M molska masa snovi, podana v g mol^{-1}

Po izračunih je bilo potrebno uporabiti: $m(\text{GOPTS}) = 37,2 \text{ mg}$ in $m(\text{lizin}) = 23 \text{ mg}$.

Uporabili smo naslednje kemikalije:

- filtrirana voda - sistem MilliQ
- natrijev hidroksid (NaOH), Honeywell
- etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), $\geq 98 \%$, mol. m.: 46 g/mol , Honeywell

- 3-Glicidiloksi-propiltrimetoksisilan (GOPTS; $C_9H_{20}O_5Si$), ≥ 98 %, mol. m.: 236,34 g/mol, SigmaAldrich
- L-lizin ($C_6H_{14}N_2O_2$), $\geq 98.0\%$ (NT), mol. m.: 146,19 g/mol, SigmaAldrich,

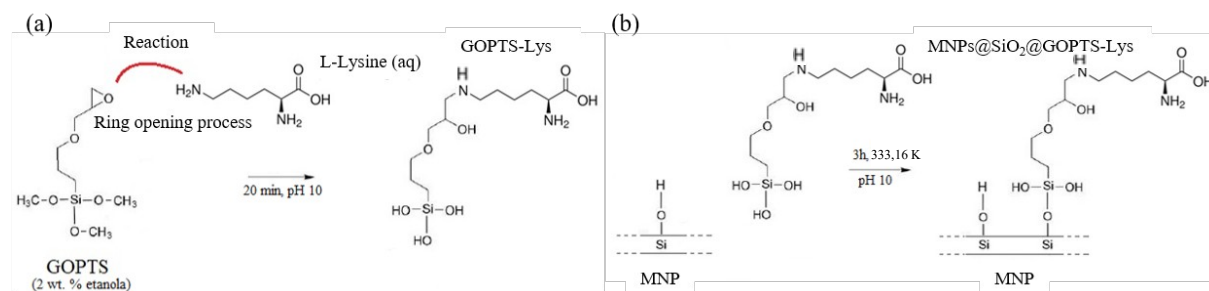
Delo je potekalo po naslednjem postopku:

- Pripravili smo disperzijo 200 mg $MNPs@SiO_2$ s koncentracijo 4 mg/mL.
- Z 1 M NaOH smo uravnali pH disperzije na 10 in mešali 10 min.
- Izračunano količino GOPTS-ja smo z iglo dodali k 2 mL etanola.
- 23 mg L-lizina smo raztopili v 40 mL vode in uravnali pH na 10.
- K raztopini L-lizina smo dodali zmes etanola in GOPTS ter mešali še 20 min.
- K zmesi L-lizina z GOPTS-jem smo med mešanjem po kapljicah (1/s) dodali disperzijo $MNPs@SiO_2$. Končen pH je moral biti med 9,5 in 10.
- Disperzija z vsemi dodatki se je 3 h mešala na refluxu pri 333,16 K.
- Produkt smo 3-krat sprali z vodo s pH 4. Na koncu smo $MNPs@SiO_2@GOPTS-Lys$ shranili v MilliQ vodi.

$MNPs@SiO_2$, na katere se je z uporabo GOPTS-ja vezal L-lizin, so bili označeni s kratico:

$MNPs@SiO_2@GOPTS-Lys$.

Pri uporabi te metode, za vezavo L-lizina na površino $MNPs@SiO_2$, se L-lizin z GOPTS-jem poveže na podlagi reakcije aminske skupine L-lizina z epoksi skupino GOPTS-ja (odprtje obroča epoksi skupine). L-lizinu ostaneta po vezavi navzven orientirani karboksilna in druga aminska skupina. Nadaljnjo vezavo GOPTS-ja, na sloj silike, dosežemo s hidrolizo metoksi skupin GOPTS-ja, pri čemer mu ostanejo navzven orientirane R-OH skupine. Te se lahko nato kondenzirajo z R-OH (R=Si) skupinami s površine silikatne prevleke. Rezultat te reakcije je nastanek stabilne Si-O-Si vezi med molekulo GOPTS-ja in površino silikatne prevleke. Ostali dve R-OH skupini molekule GOPTS-ja pa se lahko kondenzirata z enakimi skupinami sosednjih molekul GOPTS-ja. Vse skupaj je ponazorjeno na sliki 10.



Slika 10: prikaz reakcijskega modela za vezavo lizina z GOPTS in nadaljnjo vezavo na silikatno površino na oplasčenem nanodelcu.

3.8 Adsorpcija amoksicilina na MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys

Adsorpcija je proces, pri katerem se molekule adsorbata iz tekočine ali plina vežejo na površino adsorbenta (adhezija). V splošnem jo lahko delimo na fizikalno adsorpcijo (fizisorpcijo), kjer se molekule adsorbata na površino adsorbenta vežejo z van der Waalsovimi in vodikovimi vezmi, ter na kemijsko adsorpcijo (kemisorpcijo), kjer molekule adsorbata reagirajo s površino adsorbenta in z njim tvorijo kemijsko vez (kovalentno, ionsko). Adsorpcija na podlagi elektrostatskih interakcij tako spada pod kemijsko adsorpcijo. Adsorpcijo lahko opišemo z adsorpcijskimi izotermami oziroma krivuljami naraščanja površinske koncentracije molekul adsorbata na površini adsorbenta v odvisnosti od njegove koncentracije pri konstantnih temperaturah. Poznamo več teoretičnih modelov, ki opisujejo potek adsorpcije: Langmuirjeva izoterma, Freundlichova izoterma in Temkinova izoterma.

Pri našem delu smo se odločili za izpostavitvev praktične plati, torej samega eksperimentalnega dela, adsorpcije amoksicilina.

Uporabili smo naslednje kemikalije:

- filtrirana voda – sistem MilliQ
- amoksicilin.

Delo je potekalo po naslednjem postopku:

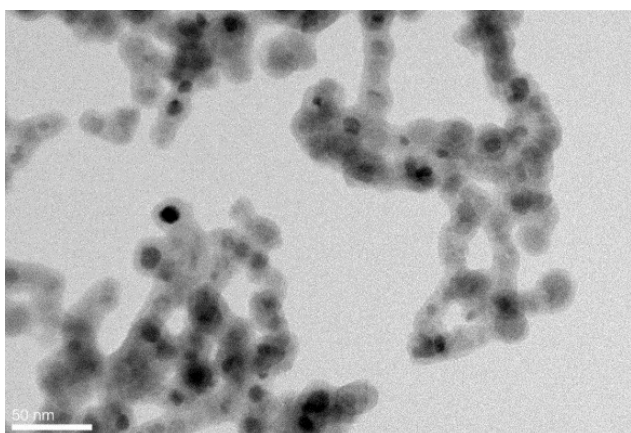
- Zatehtali smo 100 mg amoksicilina in ga nad magnetnim mešalom raztopili v 200 mL MilliQ vode, tako da je koncentracija znašala 0,5 mg/mL.
- Zatehtali smo 100 mg MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys in jih dodali predhodno pripravljene raztopine amoksicilina.
- Disperzijo smo mešali na magnetnem mešalu še 1 uro.
- Po končani adsorpciji amoksicilina smo MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys@Amoxicillin posušili.

MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys, na katere smo adsorbirali amoksicilin, smo označili s kratico MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys@Amoxicillin.

4. Rezultati in diskusija

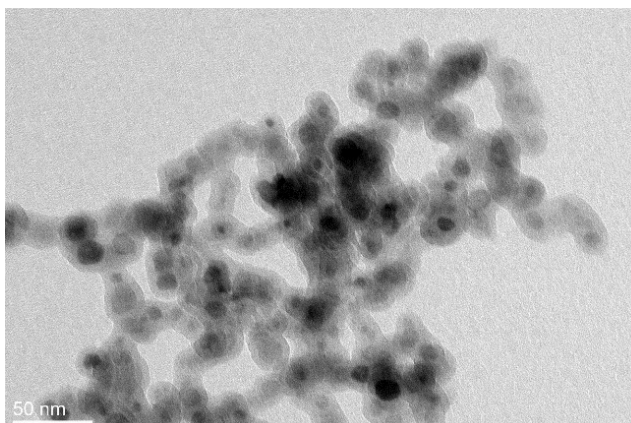
4.1 Transmisijska elektronska mikroskopija

S TEM-analizo smo poskušali ugotoviti, ali se površina magnetnih nanokompozitov po vezavi GOPTS-Lys spremeni.



Slika 11.1: TEM

slika MNPs@SiO₂



Slika 11.2: TEM

slika

MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys

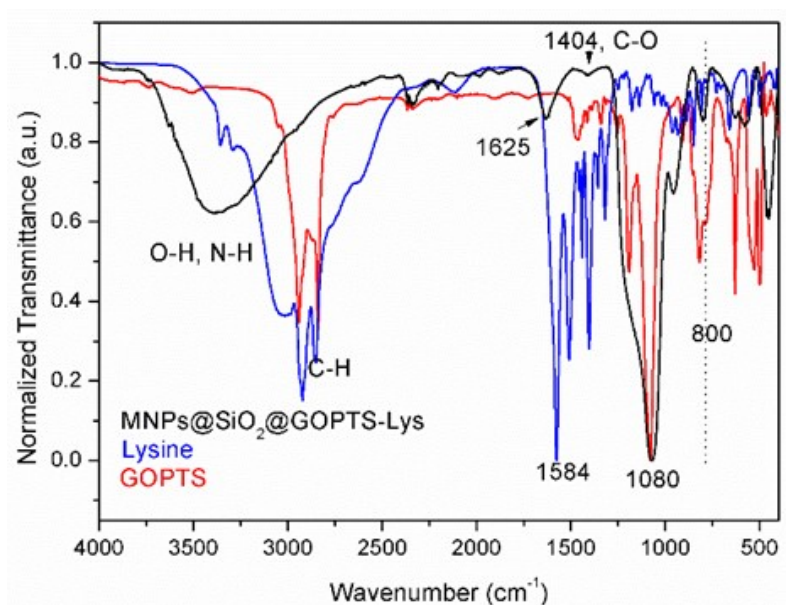
Slika 11.1 TEM-vzorca MNPs@SiO₂ lepo prikazuje tipično obliko in sestavo nanodelcev. Temnejša območja predstavljajo maghemitna jedra, svetlejša, siva območja pa silikatno prevleko. Ta amorfen homogen sloj silike (anorganski del) okoli jedra potrjuje uspešno oplaščanje MND. Velikost delcev smo ocenili na približno 20 nm (± 3 nm). Debelina silikatne

prevleke je bila debelejša, kot smo pričakovali (2 nm) in je v povprečju znašala 5 nm. Homogeno nukleiranih nanodelcev iz SiO₂ nismo opazili, kar smo pripisali optimalnim pogojem oplasčanja.

Velikost delcev MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys smo, kot primeru pred vezavo (slika 11.1 in 11.2, po vezavi), ponovno ocenili na približno 20 nm (±3 nm). Tudi oblika je bila pravilna. Razviden sloj okoli jedra delcev smo ponovno ocenili na približno 5 nm (pripada amorfni plasti silike). Ker zaradi narave dela s TEM-analizo molekul GOPTS-Lys ni bilo mogoče opazovati, na podlagi TEM- analize lahko sklepamo, da postopek kemijske vezave L-lizina preko zamreževalca GOPTS na amorfno plast silike ni imel (opaznega) vpliva niti na obliko niti na debelino silikatne prevleke.

4.2 IR-spektroskopija (FTIR)

S to metodo smo določevali predvsem prisotnost specifičnih funkcionalnih skupin amoksicilina na površini MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys@Amoxicillin, da bi lahko potrdili uspešno vezavo amoksicilina.



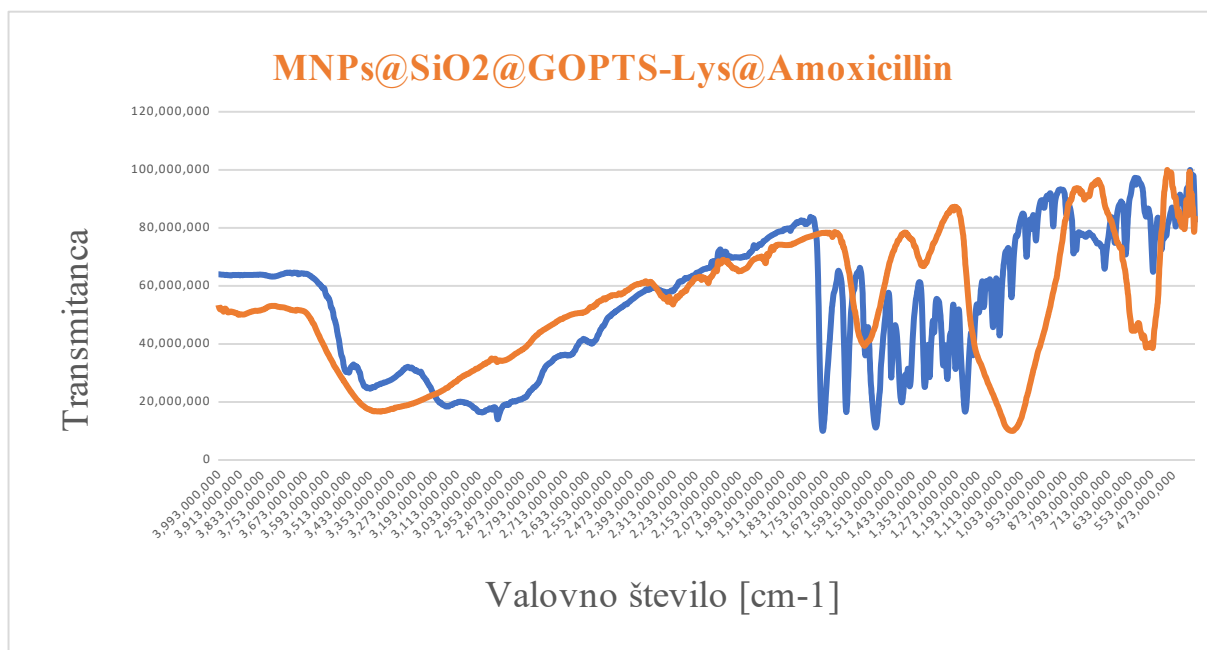
Slika 12.1: FTIR-analiza MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys, L-lizina in GOPTS z označenimi vrhovi ter navedenimi pripadajočimi funkcionalnimi skupinami

Na spektru L-lizina smo opazili odsotnost vibracije C=O vezi (iz karboksilne skupine),

ki smo jo pričakovali v področju $1760\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ [15]. Odsotnost te vibracije je nakazala, da je bil analiziran (praškast) vzorec L-lizina v obliki notranjih soli [11]. Pri tvorbi soli njeno dvojno C=O vez, z vidika interpretacije FTIR-spektra, zamenjata dve ekvivalentni oziroma skoraj ekvivalentni C[≡]O vezi in pol[11]. Interakcije CO⁻ vezi so zunaj in znotraj faze, kar ima za posledico dva karakteristična absorpcijska pasova, ki smo ju, za primer aminokislina v obliki ionov dvojčkov[15], potrdili tudi na našem spektru: močan vrh med $1605\text{--}1555\text{ cm}^{-1}$ (antisimetrični CO₂ razteg) in vrh med $1424\text{--}1393\text{ cm}^{-1}$ (simetričen CO₂ razteg). Stanje ionov dvojčkov L-lizina smo potrdili tudi z drugimi vrhovi v značilnih pasovih NH₃ vibracij (raztegovanje: med 3100 in 2600 cm^{-1} – prekriva s CH-vibracijami; antisimetrična deformacija: $1665\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$ – prikrit s CO₂; simetrična deformacija: $1530\text{--}1490\text{ cm}^{-1}$). Označili smo tudi področje C–H vibracij (raztegovanje: $3300\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$). Vrhova 3358 in 3288 cm^{-1} sovpadata s podatki iz literature za potrditev prisotnosti vezi N – H primarnih aminov in sta tako potrdila pristnost druge aminske funkcionalne skupine, ki ne izkazuje naboja.

Na spektru GOPTS so enako kot pri spektru lizina vidni vrhovi za vez C–H, je pa pri nižjih vibracijah, $500\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$, z izrazitim vrhom pri 1080 , razvidno tipično raztegovanje vezi Si–O, ki potrjuje zgradbo molekule oziroma ključnega dela, ki omogoča vezavo na silikatno prevleko.

Spekter MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys v primerjavi s preostalima dvema prikazuje močan razteg na območju vezi O–H in N–H, med 2750 in 3750 cm^{-1} , kar nakazuje na prisotnost hidroksilnih in aminskih skupin molekule GOPTS-Lys in tako potrjuje uspešno vezavo. Vrh pri 1080 cm^{-1} , ki je izrazitejši kot pri spektru GOPTS, nakazuje na vez Si–O in Si–OH, ki nastaneta tekom vezave GOPTS-Lys na površino silikatne prevleke, kar je še dodaten dokaz za uspešno vezavo. Vibracije v območju med 500 in 800 cm^{-1} pa nakazujejo na vez Fe–O, ki pa se nahaja v jedru magnetnega nanokompozita.



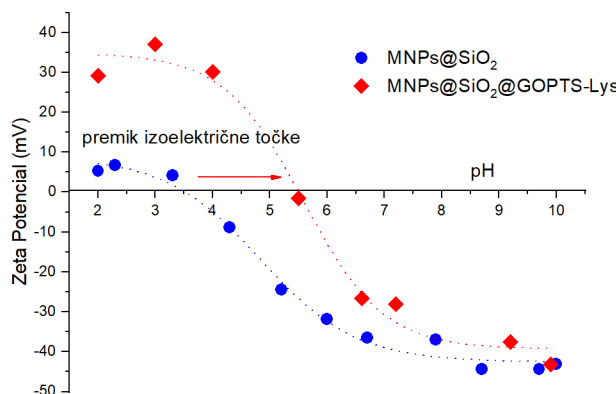
Slika 12.2: FTIR-analiza MNP@SiO₂@GOPTS-Lys@Amoxicillin in amoksicilina

Spekter amoksicilina prikazuje izrazite asimetrične raztege in vrhove, ki se prekrivajo na območju med 2750 in 3750 cm⁻¹ pomeni prisotnost vezi O–H in N–H ter sekundarneaminske skupine. Frekvenca v območju med 510 in 630 cm⁻¹ nakazuje na vez C–S, ki je prav tako prisotna v molekuli amoksicilina. Vrhovi na območju med 1350 in 1450 cm⁻¹ potrjujejo prisotnost vezi C=O, ki je značilna za β-laktamski obroč amoksicilina in pa polovičnih C[≡]O 'vez in pol', ki nastane zaradi reakcije med –COOH in –NH₃. Vrh na območju 1550 in 1650 cm⁻¹ pa je značilen za aminske skupine oziroma za vez N–H.

Na spektru MNP@SiO₂@GOPTS-Lys@Amoxicillin pa se značilne skupine amoksicilina, GOPTS in L-lizina kažejo kot skupek frekvenc med 2500 in 3750 cm⁻¹, ki sta značilna za vezi: N–H in O–H ter sekundarneaminske skupine, ki sta obe prisotni na amoksicilinu, kar kaže na uspešno adsorpcijo. Vrhovi, ki so značilni za Si–O in Si–OH, pa so manjše intenzitete, vendar so še vedno prisotni. Frekvence v območju nižjih valovnih števil, pa predstavljajo vez Fe–O.

4.3 Elektrokinetične meritve

Z meritvami zeta potenciala smo skušali dokazati prisotnost novih funkcionalnih skupin na površini magnetnih nanokompozitov, ki bi potrjevale uspešno vezavo L-lizina in GOPTS na površino silikatne prevleke.



Slika 13.: Meritve zeta potenciala MNPs@SiO₂ in MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys

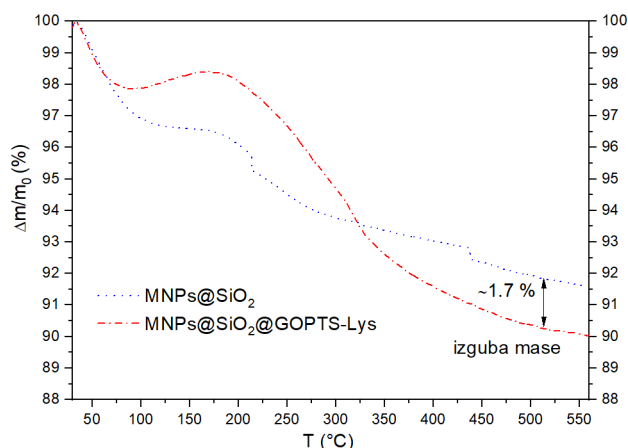
Krivulja zeta potenciala MNPs@SiO₂ v odvisnosti od pH-vrednosti kaže na izoelektrično točko nekje pri pH-vrednosti 3.5 in izkazuje v alkalnem področju negativen zeta potencial zaradi negativno nabitih silanolnih skupin na silikatni prevleki.

Krivulja MNPs@SiO₂@GOPTS-Lys pa se začne z zelo pozitivnim zeta potencialom, kar nakazuje na nove funkcionalne skupine, ki so pri nizkih pH-vrednostih protonirane in izkazujejo pozitivnejši naboj kot protonirane silanolne skupine. Vidimo tudi premik izoelektrične točke, torej točke, kjer je zeta potencial ničeln, kar pomeni, da se število pozitivnih in negativnih nabojev izenači.

Premik izoelektrične točke, kakor tudi razlike v višini platojev zeta potenciala potrjujejo prisotnost novih funkcionalnih skupin, kar pomeni, da je bila vezava derivatiziranega lizina uspešna.

4.4 Termogravimetrična analiza

Termogravimetrična analiza je uporabna, ko pride do dokazovanja organske snovi v nekem anorganskem kompozitu.



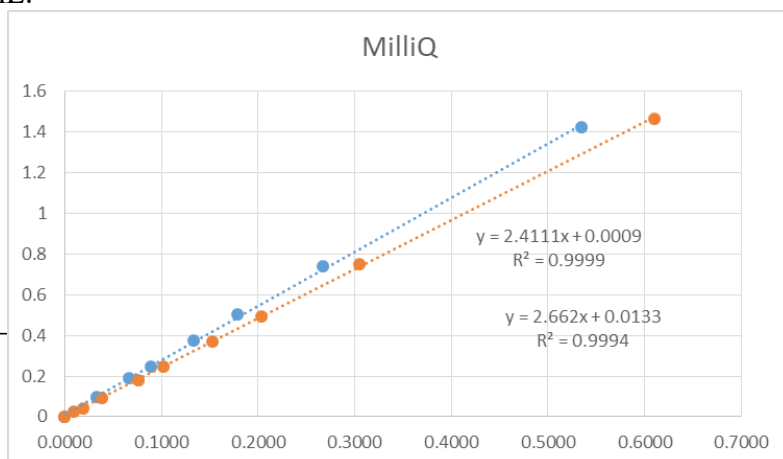
Slika 14.: Grafični prikaz izgube mase v odvisnosti od temperature za MNP@SiO₂ in MNP@SiO₂@GOPTS-Lys

Razlika v masi med nanodelci (slika 14.) je bila približno 1.7 %. To pomeni, da se je masa MNP@SiO₂@GOPTS-Lys zmanjšala. Pri interpretaciji tega rezultata je potrebno upoštevati, da so bile izgubljene količine mase relativno majhne, kar lahko pripišemo relativno majhni velikosti molekul L-lizina. Smo pa kljub temu potrdili uspešno vezavo molekul GOPTS-Lys na nanodelce.

4.5 UV-VIS in sproščanje amoksicilina Količina amoksicilina v supernatantu

Supernatant, ki je ostal po odstranitvi magnetih nanokompozitov (torej, smo najprej ultra filtrirali in nato analizirali z UV-VIS. Dobljeni rezultati absorbcije so bili: 1.1115, 1.1013 in 1.1054.

Po formuli za aritmetrično sredino smo izračunali povprečno vrednost meritev in s pomočjo umeritvene krivulje, slika 15, dobili masno koncentracijo amoksicilina v supernatantu, ki je znašala 0,4 mg/mL.



Slika 15.: Umeritvena krivulja za amoksicilin v MilliQ vodi

Po formuli:

$$w = \frac{\gamma - \gamma(\text{supernatant})}{\gamma}$$

Kjer je:

w masni delež

γ masna koncentracija začetne raztopine, podana v mg/mL

γ (supernatant), masna koncentracija v supernatantu, podana v mg/mL.

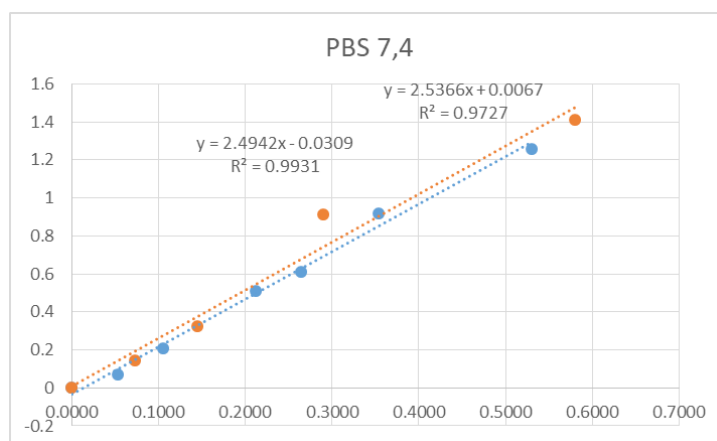
Smo izračunali, da se je adsorbiralo 0,1mg/mL oziroma 10 mg amoksicilina, kar pa predstavlja 20 % vsega amoksicilina

Sproščanje amoksicilina v PBS-pufri

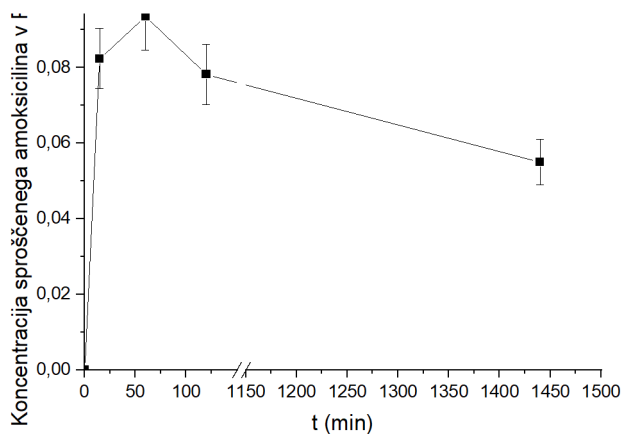
Delo je potekalo po naslednjem postopku:

- 20 mg nanodelcev smo dispergirali v 10 mL PBS-pufra.
- Na magnetnem mešalu smo čašo pustili za določen čas.
- Po končanem sproščanju smo super filtrirali in analizirali z UV-VIS.

Časovni intervali, na katerih smo merili sproščanje, so bili: 5 min, 1 h, 2 h in 24 h. Rezultate smo po podobnem načinu preračunali kot pri koncentraciji v supernatantu, in dobljene vrednosti s pomočjo umeritvene krivulje, slika 16, preračunali v naslednje vrednosti, na podlagi katerih smo narisali krivuljo sproščanja, slika 17.



Slika 16.: Umeritvena krivulja za amoksicilin v PBS-pufu



Slika 17.:

Potek krivulje

sproščanja amoksicilina v PBS-pufu

Na krivulji je razvidno, da se večina amoksicilina sprosti v prvi uri sproščanja. To lahko pripišemo amoksicilinski relativno dobri topnosti v vodi in šibkim elektrostatskim silam, ki povezujejo amoksicilin z molekulo lizina. Kasnejše manjše vrednosti pripišemo dvema razlogoma, prvi: readsorpcija in drugi: napaka. Do readsorpcije amoksicilina na nanodelce bi lahko prišlo zaradi daljšega časa sproščanja, kar bi omogočilo ponovno adsorpcijo amoksicilina. Do napake pa bi lahko prišlo tekom analize UV-VIS ali pa že v sami pripravi nanodelcev, saj je velika verjetnost, da so bili nekateri nanodelci brez amoksicilina in so se zato pojavila odstopanja.

5. Sklepi in zaključek

Po vseh opravljenih analizah in raziskovalnem delu smo prišli do naslednjih sklepov:

- Derivatiziran L-lizin se da uspešno vezati s kovalentno vezjo na površino magnetnih nanokompozitov, to smo potrdili s termogravimetrično analizo, meritvami zeta potenciala in infrardečo spektroskopijo.
- Amoksicilin se uspešno adsorbira na magnetne nanodelce funkcionalizirane z lizinom, to smo potrdili z infrardečo spektroskopijo in analizo UV-VIS.
- Sproščanje amoksicilina doseže svoj vrh v prvih urah sproščanja.

Na podlagi teh ugotovitev lahko ovrednotimo naše hipoteze:

H 1: Uspešno sintetizirani magnetno-silikatni nanodelci, s kovalentno vezanim derivatiziranim lizinom, bodo stabilni in možni nosilci za tarčno dostavo antibiotika.

To hipotezo lahko potrdimo na podlagi rezultatov termogravimetrične analize, rezultatov meritev zeta potenciala in rezultatov infrardeče spektroskopije.

H 2: Magnetni modificirani nanodelci bodo služili kot dostavni sistem amoksicilina, ki se bo preko mešanih interakcij vezal na površino magnetnih nanodelcev na osnovi lizina.

To hipotezo smo potrdili z infrardečo spektroskopijo in z analizo UV-VIS.

H 3: Sproščanje amoksicilina bo v simuliranih bioloških pogojih po določenem času sproščanja doseglo svoj maksimum, kjer bo sproščen amoksicilin v ravnotežju z amoksicilinom na magnetnih nanodelcih na osnovi lizina.

To hipotezo smo potrdili z UV-VIS in dodali podatek za čas v katerem se sprosti večina amoksicilina, in sicer v 60 minutah.

Zaključek

Magnetni nanodelci, funkcionalizirani z lizinom, so stabilni in zmožni prenosa antibiotika. Z molekulo amoksicilina se povežejo preko različnih elektrostatskih in van der Waalsovih interakcij in so tako primerni kot nosilci v sistemu za tarčno dostavo zdravila. V simuliranih bioloških pogojih oziroma v PBS-pufri s pH-vednostjo 7.4 se amoksicilin sprosti v prvih 60 minutah sproščanja.

Rezultati raziskav so zelo vzpodbudni in kažejo veliko možnosti za tarčno dostavo zdravil. Vsekakor bi bilo potrebno izvesti še več raziskav, ki bi jim sledili in vitro poskusi.

Možnosti za dodatne raziskave je še veliko, tovrstne nanokompozite bi lahko uporabili za raziskave tarčne dostave drugih antibiotikov ali pa drugih zdravil. Lahko bi tudi poskušali izboljšati magnetne nanokompozite in doseči boljše pogoje za vezavo ligandov na silikatno prevleko ali pa uporabiti drugo aminokisino.

6. Uporabljeni viri in literatura

- [1] Parker, S. P. et al: McGraw-Hill encyclopedia of Chemistry. Druga izdaja. 1993, Združene Države Amerike. ISBN 0-07-045455-8.
- [2] Bohinc, P.: Farmakognozija I. 1981, Ljubljana.
- [3] https://www.rxlist.com/antibiotic_resistance/drugs-condition.htm Dostopano: 29. 1. 2020.
- [4] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/> Dostopano: 5. 2. 2020.
- [5] Kolar, K.: Oplaščanje magnetnih nanodelcev z lizinom: vpliv na odstranjevanje težkih kovin iz gošče mulja. 2019, Maribor.
- [6] N. Kitadai, T. Yokoyama in S. Nakashima, »ATR-IR spectroscopic study of L-lysine adsorption on amorphous silica,« *Journal of Colloid and Interface Science*, str. 31–37, 2009.
- [7] K. Pušnik, Uravnavanje lastnosti vodnih suspenzij nanodelcev železovega oksida z aminokislinami, doktorska disertacija. Ljubljana, COBISS.SI-ID: 287126016, 2016.
- [8] N. Kitadai, T. Yokoyama in S. Nakashima, »ATR-IR spectroscopic study of L-lysine

adsorption on amorphous silica,« *Journal of Colloid and Interface Science*, str. 31-37, 2009.

[9]S. Gyergyek, Superparamagnetni nanokompoziti na osnovi nanodelcev superparamagnetnega železovega oksida in polimetil metakrilata, doktorska disertacija. Maribor, COBISS.SI-ID: 13989142, 2010.

[10]S. Campelj, D. Makovec in M. Drofenik, »Preparation and properties of water-based magnetic fluids,« *Journal of physics: condensed matter*, maj 2008.

[11]D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley in J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, United Kingdom: academic press limited, 1991.

[12]G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques - 2nd Edition*, San Francisco: Elsevier Inc., 2008.

[13]M. Kaszuba, J. Corbett, F. M. Watson in A. Jones, »High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques,« *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, str. 4439–4451, 2010.

[14]N. Hilal, A. Fauzi Ismail, T. Matsuura in D. Oatley-Radcliffe, *Membrane Characterization*, Amsterdam: Elsevier, 2017, str. 3-29.

[15]Orgchemboulder (University of Colorado at Boulder), [Splet]. Dosegljivo: <https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/carbacidsir.shtml>. Dostopano: 2. 2. 2020

[16] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6207675/> Dostopano: 5. 2. 2020

[17] Grumezescu, A. M., et al: Biocompatible Fe₃O₄ Increases the Efficacy of Amoxicillin Delivery against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Molecules* 2014, 19, 5013-5027; doi:10.3390/molecules19045013. ISSN 1420-3049.

[18] R. K. Iler, *The chemistry - Solubility, Polymerisation, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, New York: John Wiley & Sons, 1979.

[19]Hozjan, M.: *Nanotechnology*. Investiga R+D+i, 2019.

Viri slik:

[1.] <https://en.wikipedia.org/wiki/Amoxicillin#/media/File:Amoxicillin.svg> Dostopano: 24. 1. 2020

[2.] https://en.wikipedia.org/wiki/Lysine#/media/File:L-Lysin_-_L-Lysine.svg Dostopano: 3. 3. 2020

Ostale slike so iz ostalih virov, ki so že navedeni. Viri so zapisani ob opisih slik.