

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Füüsika Instituut

Peep Uudeküll

**NIKLI MESOOSAKESTE SÜNTEES JA
KARAKTERISEERIMINE BIOMEDITSIINI RAKENDUSTE
TARBEKS**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Tanel Tätte, PhD

Aile Tamm, PhD

Kaitmisele lubatud

Juhendajad

.....

allkiri, kuupäev

Tartu 2016

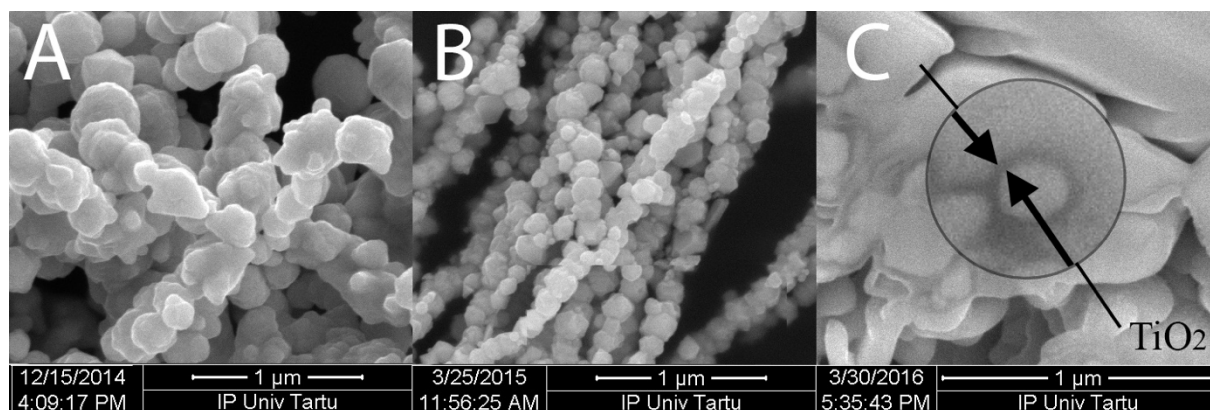
Nikli mesosakeste süntees ja karakteriseerimine biomeditsiini rakenduste tarbeks

Magnetmaterjale on meditsiinarakendustes kasutatud juba aastakümneid, edasimineku sünteesi ning karakteriseerimise valdkondades on aidanud kaasa magnetilisi nähtusi kasutavate biomaterjalide laialdasemale kasutuselevõtule ning rakenduste (nt magnetiline rakueraldu, ravimite transport kehasse, magnetiline hüpertermia jm) arengule.

Biorakendusteks sobiva magnetmaterjali saamine nõuab vastavaid lähteaineid ning täpset ja kontrollitavat sünteesimeetodit. Bensüülalkoholmeetod on veevabas orgaanilises keskkonnas (bensüülalkoholis) läbi viidav pindaktiivse aine vaba sünteesiprotsess, mis eristub paljudest analoogidest oma lihtsuse, puhtuse, kiiruse, skaleeritavuse ning rohketest saadustest tõttu.

Käesolevas uurimustöös sünteesiti bensüülalkoholmeetodil sfäärilise kujuga nikli mesosakesi primaarsuurusega 300 nm (Joonis A) ja fiibritena (Joonis B). Ajendatuna magnetismil põhinevatest biomeditsiini rakendustest kaeti sünteesitud sfäärilise kujuga nikkel aatomkihtsadestamise meetodil biosobiva õhukese (10 nm) TiO₂ kihiga (Joonis C).

Sünteesitud nikli mesosakesed näitavad nanoosakestele omast superparamagnetismi (kitsast hüstereesi ning küllastusmagneetuvuse platood), kusjuures TiO₂-kaetud nikli mesosakesed omasid natuke paremaid magnetilisi omadusi kõrgema küllastusmagneetuvuse (51 A×m²/kg vs 53 A×m²/kg) ning madalama koertsitiivsuse näol. Osakesi testiti ka (öko)toksikoloogia aspektist. Kaetud ega katmata nikli osakesed ei olnud kahjulikud ühelegi testitud ökoloogilisele objektile, viidates osakeste mittetoksilisele iseloomule ning potentsiaalile tulevastes bio-uuringutes ja -rakendustes.



Joonis. Sfäärilise kujuga nikli osakesed (A), mis on fiiberjas korrapäras (B) ning kaetud TiO₂ kihiga (C).

Märksõnad: nikkel; meso-osakesed; bensüülalkohol; aatomkihtsadestamine; ökotoksikoloogia

CERCS kood: P390 Orgaaniline keemia

Synthesis and characterization of nickel mesoparticles for biomedical applications

Magnetic materials have already been used in medical applications for decades. Progress in the fields of particle synthesis and characterization has enabled a wider use of these materials in bioapplications such as magnetic cell therapy, magnetic drug delivery, magnetic hyperthermia, etc. The synthesis of a biosuitable magnetic material requires a precise and controlled synthesis process and the suitable precursors. The benzyl alcohol method is a nonaqueous solvent-controlled and surfactant free synthesis method that provides over 50 different metal oxide products, yet only one metallic product – nickel.

Nickel particles were synthesized via benzyl alcohol method. The reaction resulted in spherical shape particles, predominantly in the size range of 300 nm (Fig. A). However, the use of an external magnetic field during the synthesis produced nickel fibers (Fig. B) Being developed for magnetically guided biomedical applications, the Ni particles were coated by conformal and antimicrobial thin TiO₂ film grown by atomic layer deposition (Fig. C). Magnetic measurements indicated weak hysteresis and a strong saturation plateau, both of which suggest superparamagnetic behavior of the synthesized particles. Uncoated and TiO₂-coated Ni particles showed no harmful effect to any used test species in the test conditions applied, pointing to the non-toxic nature of the synthesized particles, therefore indicating a promising base for future medical research.

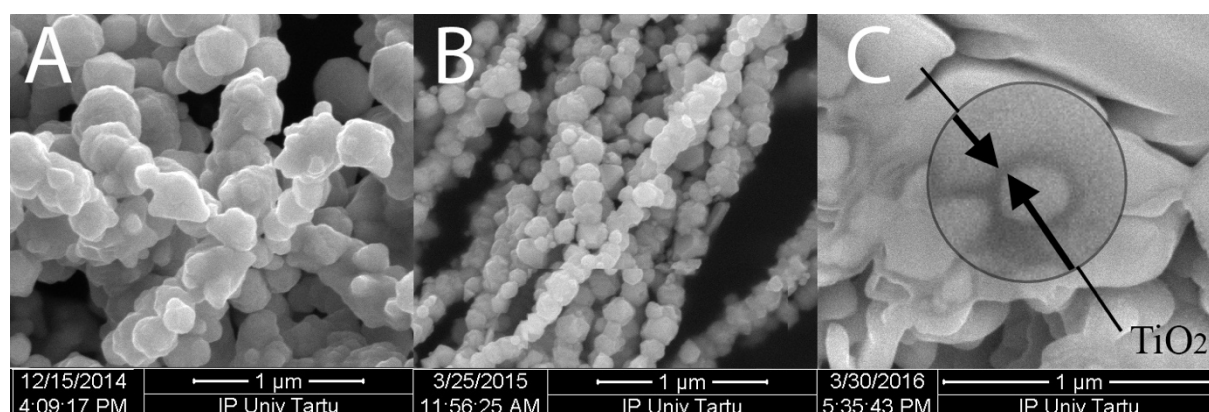


Figure. Spherically shaped nickel particles (A), in fibrous order (B) and coated with a layer of TiO₂ (C).

Keywords: nickel; mesoparticles; benzyl alcohol; atomic layer deposition; ecotoxicity

CERCS code: P390 Organic chemistry

SISUKORD

SISSEJUHATUS	6
1.1 Magnetiliste osakeste rakendused biomeditsiinis	8
1.2 Sünteesimeetod	12
1.3 Magnetism	13
1.3.1 Sissejuhatus magnetismi.....	13
1.3.2 Magnetismi liigid.....	13
1.3.3 Vibreeriva prooviga magnetomeeter	14
1.4 Aatomkihtsadestamine	17
2. TÖÖ EESMÄRK	20
3. EKSPERIMENDI METOODIKA	21
3.1 Nikli osakeste süntees.....	21
3.2 Aatomkihtsadestamine.....	23
3.3 Magnetmõõtmised seadmel Quantum Design PPMS-VSM.....	23
3.4 (Öko)toksilisuse uuringud	26
3.4.1 Osakeste ettevalmistamine toksilisuse uuringuteks.....	26
3.4.2 30-min kineetiline bioluminestsentsi inhibitsiooni test fotobakteriga <i>Vibrio fischeri</i>	26
3.4.3 24-h elulemuse test pärmiga <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.4.4 24-h suremuse test kirpvähilisega <i>Thamnocephalus platyurus</i>	27
3.5 Analüüsimetodid.....	27
4. ANALÜÜS JA TULEMUSED	30
4.1 Osakeste kuju ja koostis	30
4.2 Kaetud ja katmata osakeste koostis	32
4.3 Röntgendifraktsioonanalüüs	33
4.4 Mikro-Raman spektroskoopia	34
4.5 Magnetomadused	35
4.6 (Öko)toksilisuse uuringud	37
4.6.1 Mõju fotobakterile <i>Vibrio fischeri</i>	38
4.6.2 Mõju pärmile <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
4.6.3 Mõju kirpvähilisele <i>Thamnocephalus platyurus</i>	38
4.7 Tulemused	39

4.8 Järeldused	39
5. KOKKUVÕTE.....	40
Synthesis and characterization of nickel mesoparticles for biomedical applications ...	40
Tänuavaldused.....	41
KASUTATUD KIRJANDUS.....	42

1. SISSEJUHATUS

Magnetilised osakesed on biomeditsiinilistes rakendustes kasutust leidnud viimasel paaril aastakümnel. Seda arengut on suuresti vedanud nanotehnoloogiate kiire areng, mis on võimaldanud alustada nanoosakeste manipulatsioonidega, sünteesi ning karakteriseerimisega. Samas on suurusjärgu võrra suuremate osakeste klass ehk nn mesoskaalas osakesed (100 nm – 1000 nm) pälvinud teenimatult vähem tähelepanu, mis aga ei tähenda, et selles mõõtmete klassis oleks areng pidama jäänud. Üks varajasemaid uurimisgrupe, Widder et al. kasutas juba 1970. aastatel mesoskaalas magnetilisi osakesi, et transportida kemoterapia ravimeid kindlasse *in vivo* asukohta [1]. 1990. Aastal pakkus Miltenyi et al., välja magnetilise rakueraldusprotsessi, mis kasutas fluorestseeruvalt märgistatud osakesi, et isoleerida konkreetne rakkude populatsioon heterogeensest proovist [2]. Kümne hiljem näitas Mah et al., kuidas viraalsete vektoritega ühendatud magnetiliste osakeste abil transportida gene rakkudesse [3].

Teemakeskse teadustöö maht on sellest ajast saati ainult kasvanud. Rakendused, mis kasutavad magnetismi kõige põhilisemat printsiipi – magnetilist interaktsiooni distantsilt, loovad innovatsiooni sellistes valdkondades nagu vähi- ning geeniravi. Näiteks on siirdemetallide mesoosakesed kasutusel üha enamates biotehnoloogilistes rakendustes – magnetilises rakueralduses, ravimite transpordis kehasse, magnetilises hüpertermias jm magnetismil baseeruvates rakendustes [4].

Ferromagneetilistest materjalidest (siirdemetallid: raud, koobalt, nikkel) on enim kasutust leidnud nii metalsel kui ka oksiidsel kujul raud. Nende ühendite populaarsust kinnitab spetsiaalselt välja töötatud termin USPIO (*ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle*) ehk ultraväikesed superparamagnetilised raudoksiidi nanoosakesed, mis on laialdaselt kasutusel näiteks kemoterapias või magnetresonantstomograafias [5]. Raud oksiidide populaarsus biovaldkondades tuleneb tema biosobivusest - neid leidub ka inimorganismis ning inimene talub neid üldiselt hästi [4]. Kuid nende toksilistest omadustest on vähe teada. Mitmed tööd on juhtinud tähelepanu, et hoolimata raua oksiidide funktsionaalsetest omadustest, on nende mõju inimorganismile või ümbritsevale keskkonnale kas teadmata või kahjulik [6], [7]. Seega raua ühendite ferromagnetilised “kaaslased” koobalt ja nikkel võiksid olla samaväärselt atraktiivsed kandidaadid biorakenduste tarbeks. Enamgi veel, tänapäevaste meetoditega nende pinda funktsionaliseerides on võimalik nende biosobivust märgatavalt tõsta. Sealjuures tuleb tähelepanu juhtida asjaolule, et osakeste ohtlikkus ei peitu mitte ainult toksilisuses vaid ka teistes faktorites, näiteks osakeste suuruses

ja nende aglomeratsioonis [8], [9]. Kattes osakesi biosobivate katetega, on võimalik aglomereerumist vähendada ning leevendada ka toksilisi mõjusid. Osakeste katmiseks kasutatavad enamlevinud meetodid on keemiliste vedelas faasis toimuvate reaktsioonide põhised (nt. SiO_2 -ga või silaaniga katmine [10], sünteetiliste polümeeride lisamine [11]). Samas on võimalusi oluliselt enam – kuna välja on pakutud ka suurel hulgal sadestusmeetodikaid. Näiteks aatomkihtsadestamine (AKS) on metalloksiidsete kilede sadestamise meetod, mis on biomeditsiini vallas küllaltki vähe kasutatust leidnud. AKS on keemilisest aurufaasist sadestamise klassi kuuluv meetod, mille abil on võimalik sadestada küllalt madalatel temperatuuridel ($25\text{ °C} - 300\text{ °C}$) ruumilistele objektidele ühtlaseid ainekihte ehk kilesid. AKS võimaldab aluse pinda katta konformaalselt, homogeenelt ning täpselt kontrollitava aatomkihipaksuse kilega [12], [13]. AKS abil sadestatavate materjalide valik on väga lai. Biosobivuse seisukohast võib esile tõsta TiO_2 -e, mis on funktsionaalne oma keemilise ja mehaanilise stabiilsuse tõttu. TiO_2 kile kaitseb osakesi oksüdeerumise eest ning omab ka fotokatalüütilisi omadusi, tänu millele ta omab ka antimikroobset mõju [14], [15].

Kuigi raud on enimuuritud siirdemetall, pakuvad huvitavaid omaduste komplekte ka teised. Biomeditsiini rakendustes on olulised magnetilised ja toksikoloogilised omadused ning osakeste suurusjaotus. Selliste osakeste sünteesiks kasutatavaid protsesse on palju – keemiline redutseerimine [16], sool-geel meetodid [17], mikroemulsioon, kaassadestus jne. Nende seast tõusevad esile lihtsuse, paindlikkuse ja osakese suuruse kontrolli tõttu vedelfaasi põhised meetodid. Bensüülalkoholmeetod on vee- ja pindaktiivse aine vaba vedelal faasil baseeruv sünteesimeetod kristalliliste metallide või metalloksiidsete osakeste sünteesiks madalatel temperatuuridel ($50\text{ °C} - 250\text{ °C}$) [18]. Meetodi eelisteks on saadavate osakeste kõrge kristallilisus, saaduste suuruse ja kuju kontrollitavus. Mitmed neist eelistest tulenevad solvendi kahetisest funktsioonist, mis seisneb tema käitumises samaaegselt solvendi ja ligandina [19], [20]. Bensüülalkoholmeetodil on võimalik sünteesida rohkem kui 50ne erineva metalli põhiseid oksiidseid osakesi ning hetkel teadaolevalt ühte metallilist saadust – niklit [21], [22].

Käesolevas töös sünteesiti nikli osakesed bensüülalkoholmeetodil. Seejärel kaeti saadud osakesed AKS abil õhukese TiO_2 kihiga. Osakeste suurus, morfoloogia ning magnetomadused määrati skaneeriva elektronmikroskoopia (SEM), röntgendifraktsioonanalüüsi (XRD), magnetomeetria ja mikro-Raman spektromeetria abil. Lisaks uuriti osakeste ökotoksikoloogiat, võrreldes kaetud ning katmata Ni osakeste kahjulikkust kolmel *in vivo*

objektid – fotobakter *Vibrio Fischeri*, pärm *Saccharomyces cerevisiae*, kirpvähiline *Thamnocephalus platyurus*.

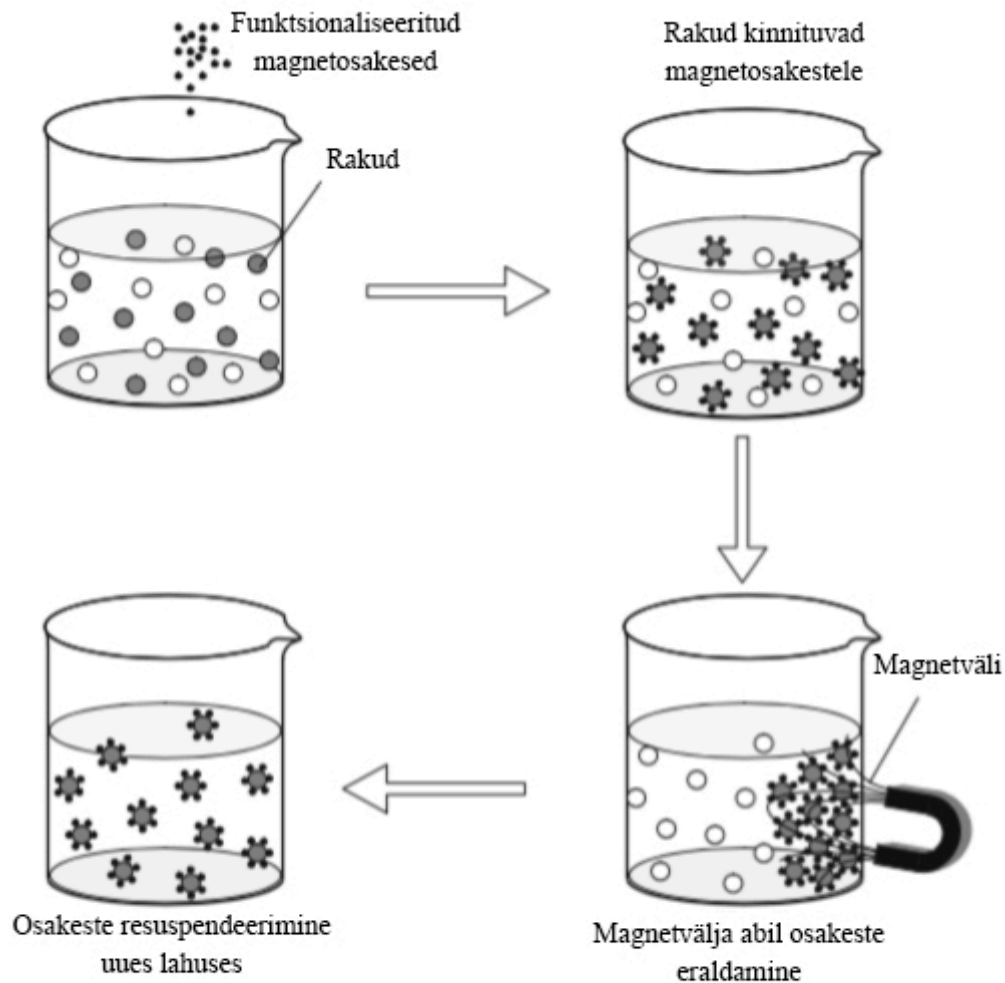
Käesolev uurimustöö on valminud Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi ning Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi koostöös.

1.1 Magnetiliste osakeste rakendused biomeditsiinis

Magnetismi põhitõdesid ja magnetmaterjale on meditsiinarakendustes kasutatud juba aastakümneid ning mitmeid uusi rakendusi arendatakse välja tänu tugevamate elektromagnetite, ülijuhtivate magnetite ja püsिमagnetite üha paremale kättesaadavusele [23]. Edasiminekuks sünteesi ning karakteriseerimise valdkondades on aidanud kaasa magnetiliste biomaterjalide laialdasemale kasutuselevõtule ning rakenduste arengule.

Magnetiline eraldamine

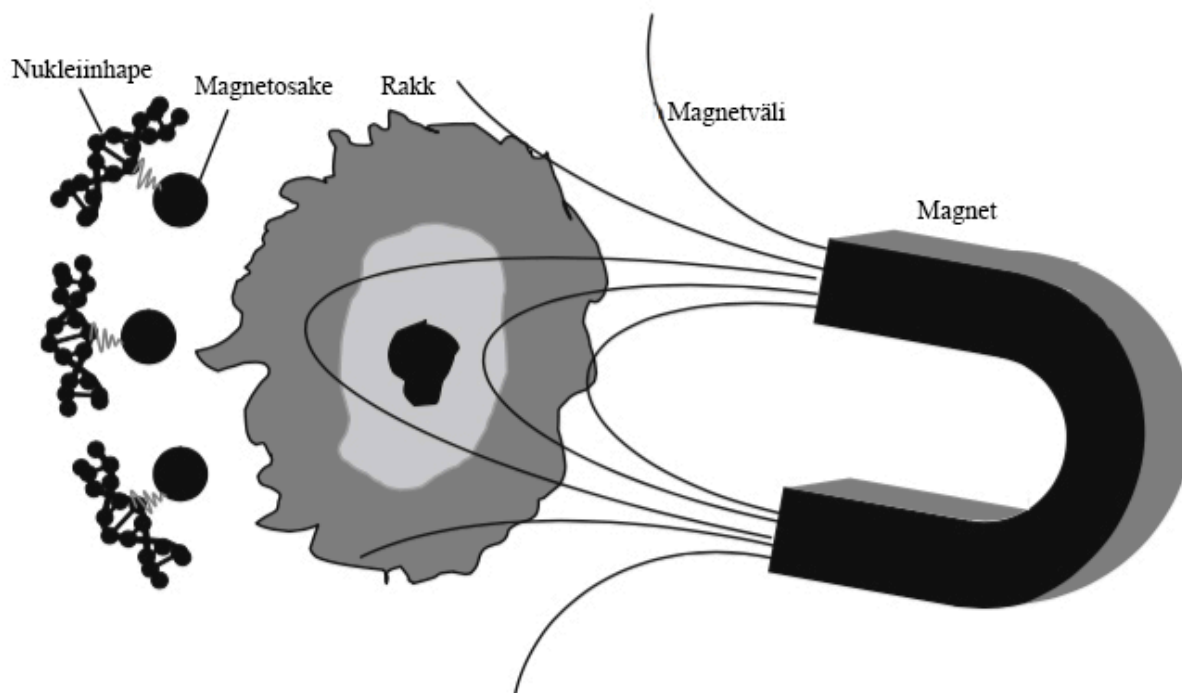
Magnetilisi osakesi saab kasutada objektide ümbritsevast keskkonnast eraldamiseks, eesmärgiga puhastada keskkonda või kontsentreerida objektid edasisteks uuringuteks [24]. See meetod põhineb magnetiliselt märgistatud objekti ja ümbritseva keskkonna erinevatel magnetilistel vastuvõtlikkustel. Heaks näiteks on rakuteraapia, sh magnetiline rakkude eraldamine. Näideteks mõningaist objektidest, mida sel teel märgistada saab, on rakud, bakterid ja vesiikulid. Aga näiteid protsessi kohta on ka hoopis teistest rakendusvaldkondadest nagu näiteks aktiniidide ja lantanoidide kontsentreerimine [25]. Tehnoloogilise protsessi esimeseks astmeks on objektide magnetiliste osakestega märgistamine, sellele järgneb keskkonnast eemaldamine magnetvälja toimel. Tavaliselt kasutatakse spetsiaalsete funktsionaalsete katetega (nt polüetüleenglükool kate [26]) osakesi, sest need aitavad siduda paremini huvipakkuvaid objekte, näiteks rakke [27]. Eraldamiseks kasutatakse magnetvälja, mille abil saab objekte liigutada ning hoida soovitud kohas ning seejärel keskkonnast eemaldada (Joonis 1). Sel meetodil on veel võimalik selekteerida kasvajakasvurakke verest ja isoleerida ensüüme, DNA-d, RNA-d mitmetest keskkondadest, sh kehavedelikest.



Joonis 1. Magnetilise eraldamise põhimõtteskeem. Allikas [28].

Ravimite ja geenide kandja

On teada, et enamik kemoterapia meetodeid on mittespetsiifilised - ühest küljest ravimeid “raisatakse” piirkondades, kus neid ei ole vaja ning teisalt omavad osakesed kahjulikku mõju organismile tervikuna. Probleemi lahenduseks on ravimite transport ning rakendamine soovitud ja kindlas asukohas. Enamus senisest uurimustööst keskendub just konkreetsete kasvajate lokaliseerimisele ja selekteerimisele. Üldiselt on ravim kas lahustatud või kinnitatud transportosakese pinnakattesse. Pärast osakese kandmist vereringesse, kasutatakse magnetvälja funktsionaalsena nende kindlasse kohta kontsentreerimisel. Ravimi võib seejärel valla päästa näiteks ensümaatilise reaktsiooniga. Füüsiliselt sõltub selle meetodi edukus osakeste liikumiskiirusest vereringes, nende tsirkulatsiooniajast ning magnetvälja tugevusest. Lisaks ravimitele on võimalik magnetilise osakese pinnale kinnitada DNAd, kanda seda magnetvälja abil soovitud piirkonda ning seeläbi suurendada tõenäosust, et DNA kandub üle soovitud sihtrakku [28].

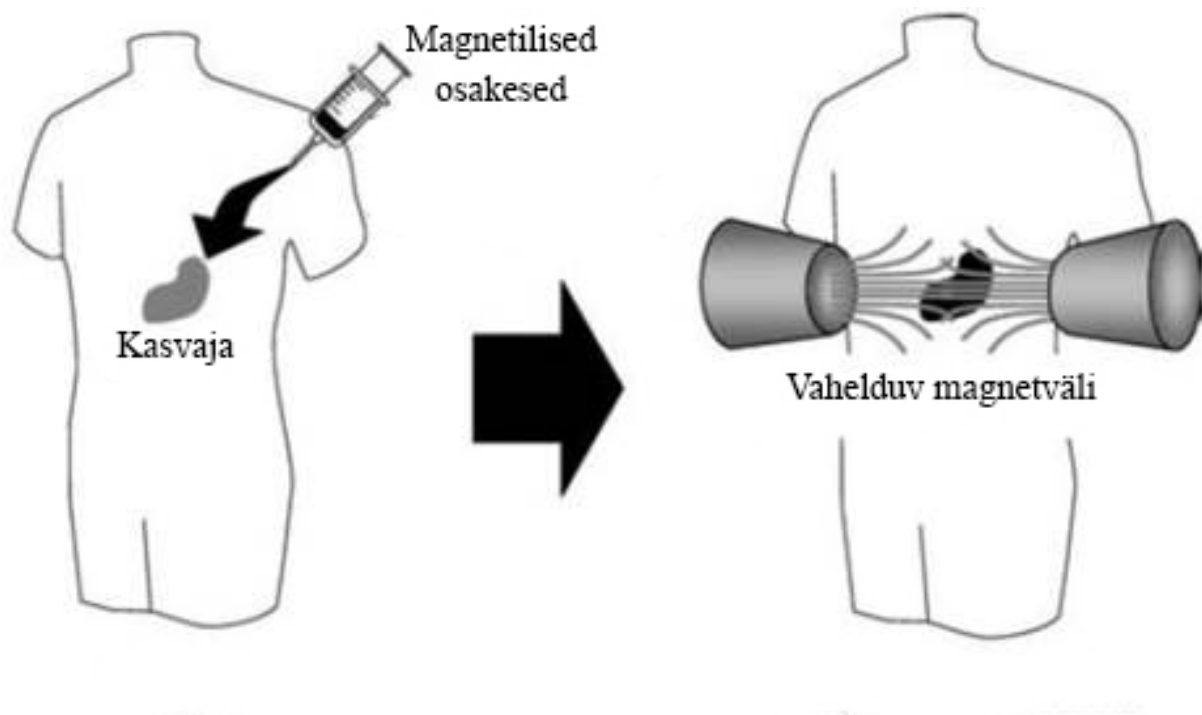


Joonis 2. Geenitranspordi põhimõtte kasutades magnetilisi osakesi. Transfekteeritavad rakud paigutuvad magnetvälja ja magnetosakeste külge kinnitatud nukleiinhapete vahele. Magnetvälja tulemusena liiguvad osakesed raku suunas ning nukleiinhappe üleminek toimub nt endotsütoosi tulemusena [29]. Allikas [28].

Magnetiline hüpertermia

Hüpertermiat kasutatakse pahaloomuliste kasvajate kiiritusonkoloogilisel ravil. Meetod põhineb lokaalsel temperatuurikasvul, mis saavutatakse magnetvälja mõjuga (ostsilleeriv väli) magnetilistele osakestele ja mis võimaldab kahjulikke rakke hävitada. Meetodi teostamiseks transporditakse osakesed esmalt magnetvälja abil õigesse piirkonda. Seejärel hakatakse nende temperatuuri tõstma, milleks tuleb rakendada osakestele ajas muutuva tugevusega magnetvälja, mille tulemusel osakesed “läbivad” hüstereesisilmust üha uuesti ja uuesti. Seetõttu toimuvad mitmed energieetilised kaod (sh hüstereesisikadu), mis väljenduvad soojusena ning toovad kaasa temperatuuri tõusu [30]. See soojus kandub kudesse osakeste ümber. Eesmärk on saavutada temperatuur vähemalt 42 °C ning hoida seda 30 minuti vältel, mis hävitaks kasvaja koe [27]. Protsessi teostamisel on kõige keerulisem ülesanne osakeste kandmine õigesse kohta ja nende seal hoidmine. Ebaõnnestumine võib tingida ka tervisliku koe hävimise. Teine mure on kasutatava magnetvälja tugevusega, mis peab olema kliiniliselt aktsepteeritav. Meetod on iseäranis huvipakkuv oma lokaalse funktsionaalse tõttu.

Kui mitmete bio-rakenduste jaoks on oluline, et kasutatavate osakeste dimensioonid jääksid nanomõõtmeteresse (<100 nm), siis hüpertermia puhul on see vastupidi. Hüpertermia jaoks on tähtis, et osakeste liiga väiksed mõõtmed ei põhjustaks segavaid interaktsioone rakkudega. Lisaks on suurematel osakestel reeglina suurem küllastusmagneetuvus (vt. 1.3.2), mis antud rakenduse puhul tähendab seda, et nende magnetiseerimiseks läheb tarvis kas nõrgemat indutseerivat välist välja või vähem ainet ennast. Need nüansid on olulised kui töötatakse välja *in vivo* perspektiiviga rakendusi, millel on kasutuse seisukohast väga ranged piirangud.



Joonis 3. Magnetilise hüpertermia põhimõtteskeem. Allikas [31].

Magnetresonantstomograafia kontrastaine

Kui senised rakendused on kasutanud ära magnetiliste osakeste elektronidega seotud omadusi, siis magnetresonantstomograafia (MRT) on seotud prootonite magnetmomentidega [27].

MRT peamine ülesanne on luu- ja lihaskonna pehme kostruktuuri kujutamine. MRT seadmes tekitatakse tugev magnetväli, mis mõjutab koe veemolekulide vesinikutuumade spinnide orientatsioonide tasakaaluolekut – vastavate aatomite magnetväljad orienteerivad end välise väljaga samasse sihti. Sellele järgnevad magnetväljaga risti rakendatavad raadiosageduslikud impulsid, mis “ergastavad” prootonite spinnid ehk muudavad nende orientatsiooni. Pärast ergastuse lõppu toimub relakseerumine, mille käigus tuumade magnetmomentide suunad

naasevad algsesse tasakaaluolekusse ning kiirgavad raadiosageduslikku energiat. See registreeritakse poolides ning signaal töödeldakse arvuti poolt kujutiseks. Relakseerumise kestvus on erinevate aatomite jaoks erinev ning sellest tuleneb MRT kontrast. Magnetilised osakesed on võimelised mõjutama enda ümbruses olevate aatomite relakseerumise kestvust ja seega saadava kujutise kontrasti. Seetõttu manustataksegi patsientidele parema kujutise saamiseks magnetiliste osakestega rikastatud kontrastainet [32]. Standardse MRT mõõtmise korral liigub kontrastaine läbi patsiendi vereringe ning kudede, suurendades kontrasti üle terve keha. Enamus praegu kasutusel olevatest kontrastainetest baseeruvad gadoliiniumi (Gd) kelaatidel, millele magnetilised omadused ei ole enam piisaval tasemel. Üha rohkem kasutatakse tänapäeval kontrastainena superparamagnetilist rauaoksiidi [33].

Iga eelpool toodud rakenduse jaoks on tarvis konkreetsete omadustega osakesi. Ei saa väita, et aine või materjali teatud tüüpi omaduste komplekt on üldjoontes parem kui teine, küll saavad need omadused olla sobivamad teatud konkreetse rakenduse tarbeks. Mainitud rakenduste osas on kõige olulisemateks magnetilised ja toksikoloogilised omadused ning suurusparameetrid. Sobiva omaduste komplekti paika saamine nõuab vastavaid lähteaineid ning täpset ja kontrollitavat sünteesimeetodit.

1.2 Sünteesimeetod

Käesoleva töö sünteesi osa käsitleb vedelas faasis läbi viidavat bensüülalkoholmeetodit. Bensüülalkoholmeetod on veevabas orgaanilises keskkonnas (bensüülalkoholis) läbi viidav pindaktiivse aine vaba sünteesiprotsess, mis eristub paljudest analoogidest oma lihtsuse, puhtuse ning rohkete ja mitmekesiste saaduste tõttu. Lisaks iseloomustab meetodit protseduuri kiirus, skaleeritavus ning energiasäästlikkus ja osakeste suuruse täpse kontrolli võimalus. Bensüülalkoholmeetod on olnud senini kasutusel peamiselt metalloksiidsete osakeste sünteesil. Vastavad sünteesikäigud on suuresti kaardistanud Niederberger et al., tuues välja enam kui 50 metalloksiidset saadust, mida bensüülalkoholmeetodil on võimalik valmistada [22]. Metalliliste produktide osas on bensüülalkoholmeetodit esile tõstvaid publikatsioone väga vähe, autorile teada olevalt ainult üks [21].

Antud töös kasutatud osakesed sünteesiti metallatsetüülratsetonaadist bensüülalkoholmeetodil. Osakeste tekkimine põhineb kirjandusele tuginedes aldoolreaktsioonil ehk nn. aldool-kondensatsioonil [34].

Bensüülalkoholmeetodit ja selle reaktsioonimehhanismi, vesikeskkonnas ja veevabas keskkonnas toimuvaid reaktsioone, pindaktiivse aine meetodit ning lahusti meetodit käsitleb põhjalikumalt autori bakalaureuseastme lõputöö “Metalloksiidsete nanoosakeste süntees ja karakteriseerimine” [35].

1.3 Magnetism

1.3.1 Sissejuhatus magnetismi

Käesolev töö käsitleb osakesi mille dimensioonid on oluliselt väiksemad kui vastavatel makro-suuruses osakestel. Ainete või materjalide suuruste vähenedes toimuvad olulised muutused nende sisestruktuurides, mis mõjutavad nii elektrilisi, optilisi kui ka magnetilisi omadusi. Nanomagnetism on füüsika suund, mis uurib osakeste, mille vähemalt üks dimensioon jääb alla 100 nm, magnetilisi omadusi. Nende osakeste hulka kuuluvad nanoosakesed, nanotraadid, õhukesed kiled ja makro-materjalid, mis sisaldavad nanosuuruses komponente. Viimaseid nimetatakse nanostruktuurseteks materjalideks. Osakesed, mille suurused jäävad vahemikku 100-1000 nm nimetatakse mesoskoopseteks või meso-osakesteks. Ka neis võib esineda nanoosakestele omaseid magnetilisi omadusi.

1.3.2 Magnetismi liigid

Materjalide magnetilisi omadusi kirjeldavad erinevad magnetismi liigid. Põhiliikideks on ferromagnetism, paramagnetism ja diamagnetism, eristatakse veel ferrimagnetismi, antiferromagnetismi, superparamagnetismi jm spetsiifilisemaid magnetismi harusid. Käesoleva töö raames on huvipakkuvateks eelkõige ferromagnetism ning (super)paramagnetism, mistõttu neid kahte vaadeldakse lähemalt.

Ferromagneetilised (nt Fe, Co, Ni) *bulk*-materjalid koosnevad mikroskoopilistest piirkondadest, mida kutsutakse magnetdomeenideks. Need domeenid käituvad nagu miniatuursed püsिमagnetid, mis saavad oma orientatsiooni muuta. Enne välise magnetvälja rakendamist on materjali siseenergia minimaalsel tasemel, domeenid on orienteeritud suvaliselt, mistõttu on materjalil praktiliselt olematu magnetväli. Piisavalt tugeva välise välja rakendamisel domeeniseinad liiguvad, domeenid orienteeruvad välise välja suunas ning moodustavad tugevama välja, mis ulatub materjali seest ka väljapoole. Välise välja eemaldamisel domeenid ei naase oma algsesse olekusse, sest domeeniseinad jäävad „kinni“ materjalis olevatele defektidele (nt dislokatsioonid ja vakantsid). Nii tekib püsिमagnet. Kuigi

selline domeenide asetus ja suund ei pruugi vastata materjali siseenergia miinimumile, on see pikaajaliselt stabiilne olek, mis muutub vaid väliste jõudude rakendamisel, olgu selleks väline magnetväli, kuumutamine (üle nn Curie temperatuur) või mõni muu füüsiline mõjutamine.

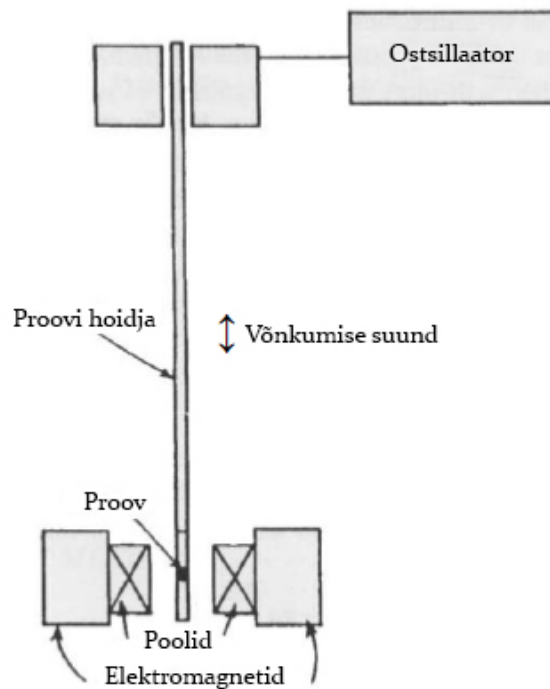
Välise välja tugevnedes muudavad üha rohkemad domeenid oma orientatsiooni selle väljaga samasuunaliseks kuni lõpuks pole enam teisiti orienteeritud domeene. See olukord, kui materjali kõik magnetmomendid on välise väljaga samasuunalised, on küllastunud olek ja seda nimetatakse **küllastusmagneetuvuseks** (vt (3) Joonis 5). Välise välja edasisel tugevnemisel küllastusmagneetuvus ei suurene, sest rohkem orienteerimata domeene ei ole. Küllastusmagneetuvus on oluline, sest see määrab kui tugevat magnetvälja suudab materjal välise välja toimel tekitada. Kui välise magnetvälja tugevust vähendada nullini, siis nähtub, et hoolimata indutseeriva välja puudumisest on ainel endiselt teatav magnetmoment (vt (4) Joonis 5). Seda nimetatakse **jääkmagneetuvuseks** ja see iseloomustab materjali kui püsimagnetit. Selleks, et materjali magnetmoment naaseks pärast küllastust nulli, tuleb talle rakendada vastassuunalist magnetvälja, mille tugevust nimetatakse **koertsitiivsuseks** (vt (5) Joonis 5).

Kui vaadelda nano- või mesoosakesi, siis suuruse vähenedes väheneb ka võimalik domeenide arv aine ruumalas ning piisava väiksuse korral muutub osake ühedomeenseks (*single-domain*). Sellisel juhul võib osakese lugeda ühtemoodi magnetiseerituks ning seda iseloomustab üks nn superspinn. Kui aga suurus väheneb veelgi, siis teatud väiksuse juures jõutakse kriitilise suuruseni, kus osakese soojusenergia ületab magnetilise anisotroopia barjääri, mistõttu magneetuvus muutub kiiresti ja pidevalt ühest suunast teise. Seda olukorda nimetatakse superparamagnetiliseks ning selline osake käitub tavaolekus kui paramagnet, kuid välises indutseerivas magnetväljas on tema magnetmoment mitu suurusjärku tavalise paramagneti omast kõrgem. Hüstereesi silmas pidades, superparamagneetilisel materjalil on koertsitiivsus null või selle lähedane ning praktiliselt puudub jääkmagneetuvus. Need omadused võimaldavad superparamagnetilisel nanoosakesel püsida kolloidses lahuses ning vältida agregeerumist (kokku kleepumist). See on väga tähtis rakendustes, kus pärast välise magnetvälja eemaldamist võib agregeerumine olla äärmiselt ebasoovitav (nt veresooni blokeerivad magnetiliste nanoosakeste klombid).

1.3.3 Vibreeriva prooviga magnetomeeter

Vibreeriva prooviga magnetomeeter (*Vibrating Sample Magnetometer* -VSM) on 1955. aastal leiutatud magnetomaduste mõõtmise seade, mille abil on võimalik väga täpselt määrata

proovi magnetmoment. Seade baseerub Faraday seadusel, mille kohaselt elektromagnetilise induktsiooni elektromotoorjõud on võrdeline magnetvoo muutumise kiirusega. Ehk kinnise kontuuriga piiratud pinda läbiva magnetvoo muutumisel indutseeritakse kontuuris elektromotoorjõud [36].



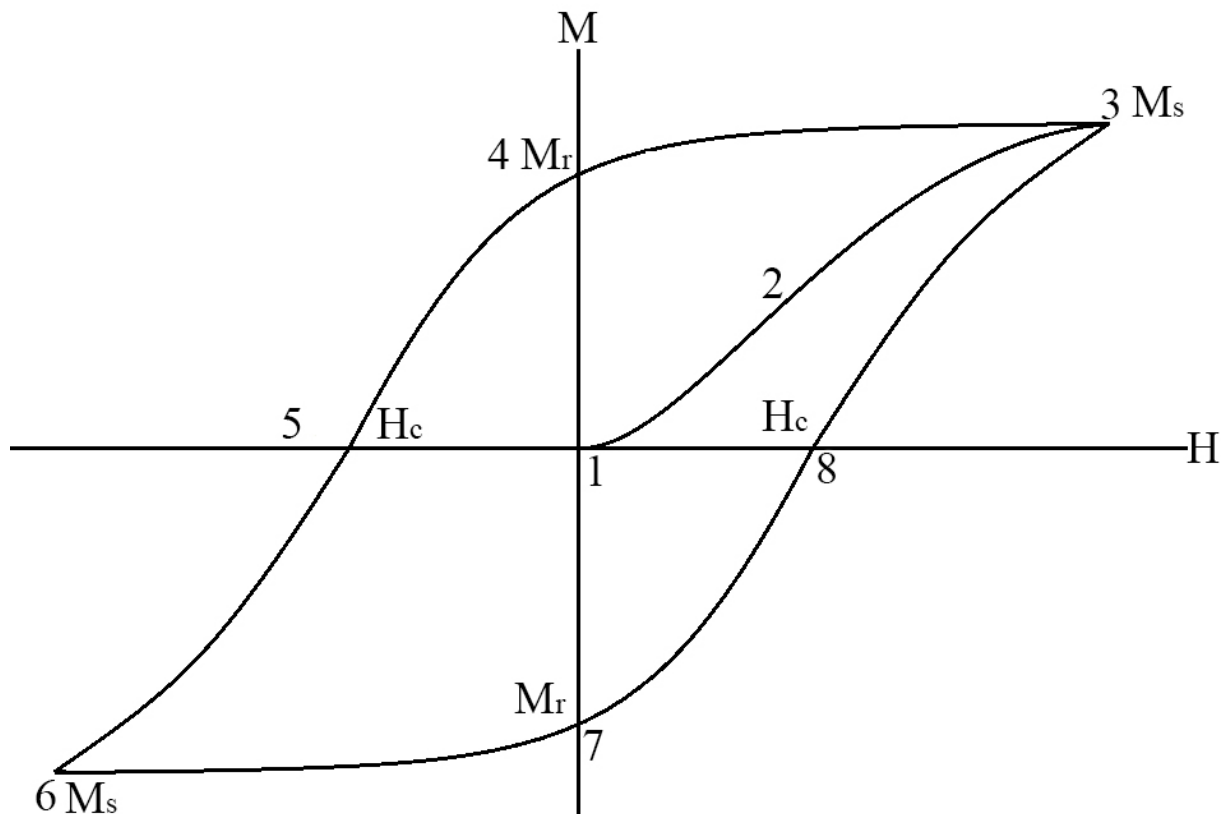
Joonis 4. Vibreeriva prooviga magnetomeetri tööpõhimõtte skeem. Proov paikneb proovi hoidja peal poolide ning elektromagnetite vahel sümmeetriatsentris. Ostsillaatori abil toimub proovi “vibreerimine” z-telje sihis mõnekümne hertsise sagedusega 1-2 mm ulatuses. Vastavalt Faraday seadusele tekitab magnetiline proov poolides pinget, mis on võrdeline proovi magnetmomendiga.

Mõõteseadmes on kaks pooli, mille vahele asetatakse varda otsas olev proov (Joonis 4). Varras on ühendatud ostillaatori külge, mis tekitab z-telje suunalist võnkumist (nn vibratsiooni). Proov võngub kindla sageduse (40-80 Hz) ja amplituudiga (u 1-2 mm) ning on tsentreeritud kahe elektromagneti vahele, mis tekitavad homogeenset magnetvälja. Kuna poolide sümmeetriatsenter kattub elektromagnetite magnettsentriga, siis vertikaalselt võnkuva proovi poolt tekitatud magnetvoo muutus indutseerib poolides pinget U , mis on võrdeline proovi magnetmomendiga. Elektromagnetites indutseeritud magnetväli H on konstantne ja vajalik ainult proovi magnetiseerimiseks, see ei mõjuta pinget U . Tüüpilised VSM seadmed

suudavad indutseerida magnetvälja suurusjärgus 10-20 T, mis on suurem kui tundlikuma SQUID-magnetomeetri küllastumisväli (tüüpiliselt 7-8 T). VSM on väga tundlik - võimalik on tuvastada magnetmomente $\mu\text{A}/\text{m}$ skaalal, mis vastab umbes 10^{-9} g raua kogusele. See tähendab, et VSM abil saab mõõta ka väga väikseid koguseid, mistõttu on see sobiv meetod erinevate meso- ja nanoosakeste analüüsiks. Mõõtes erinevatel magnetvälja H tugevustel, saadakse graafik telgedes magnetvälja tugevus H (x-telg) ning proovi magnetmoment M (y-telg) ehk hüsterees (hüstereesisilmus).

Hüstereesisilmuselt saab välja lugeda mitmeid olulisi magnetparameetreid:

- Küllastusmagneetuvus M_s - olukord kui proovi kõik magnetmomendid on välise magnetväljaga samasuunalised. Magnetvälja tugevuse suurendamisel küllastusmagneetuvus ei suurene. See on ühtlasi ka hüstereesisilmuse kõrgeim väärtus y-teljel.
- Jääkmagneetuvus M_r - väljatugevuse vähendamisel ei taastu materjali mittemagnetiline seisund. Materjal jääb magnetiseerituks. Jääkmagneetuvus iseloomustab seda magnetmomendi suurust, kui indutseeriv väli on eemaldatud. Jääkmagneetuvus on hüstereesisilmuse ja y-telje lõikepunkt.
- Koertsitiivsus H_c - väli, mille rakendamisel proov demagnetiseeritakse ehk taastub aine algne mittemagnetiline seisund. See on väga oluline parameeter rakendustes, kus on vaja materjali mittemagnetiline seisund taastada. Koertsitiivsus on hüstereesisilmuse poollaius ja ühtlasi silmuse ning x-telje lõikepunkt.

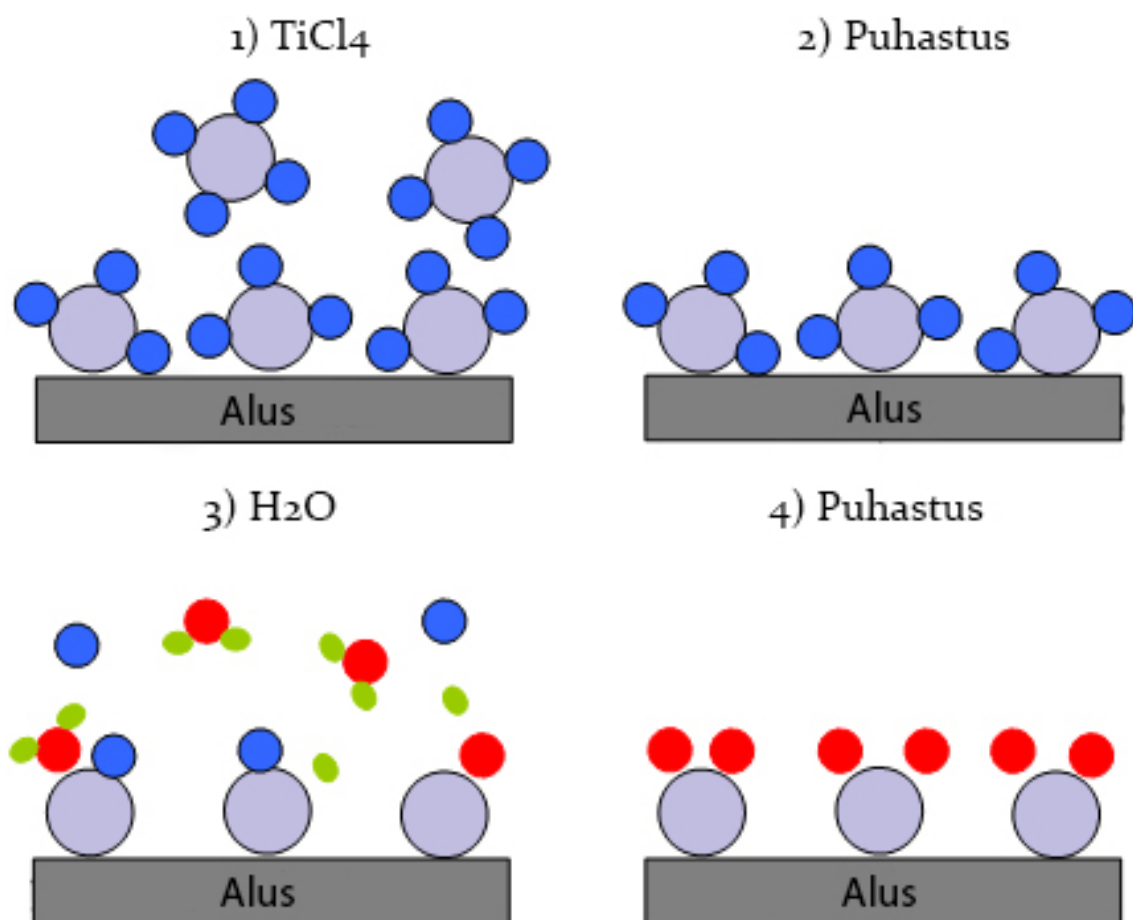


Joonis 5. Hüstereesisilmus näitab materjali magnetmomendi muutust sõltuvalt indutseerivast magnetväljast. Joonisel M_s – küllastusmagneetuvus, H_c – koertsitiivsus, M_r – jääkmagneetuvus.

1.4 Aatomkihtsadestamine

Aatomkihtsadestamine (AKS) on õhukese ainekihi (kile) sadestamise meetod, mis baseerub gaas-tahkis reaktsioonidel ning milles kasutatakse asjaolu, et lähteainete adsorptsioon pinnale on iseküllastuv. AKS kuulub keemiliste aurufaassadestusmeetodite klassi.

AKS protsessi käigus toimub tahkise pinnal kemosorptsioon ehk gaas-tahkis piirpinnal tekib keemiline side, mille tõttu toimub elektronide tiheduse ümberjaotumine adsorbaadi ja pinna vahel, kusjuures sideme tüüp võib olla ükskõik milline (iooniline, kovalentne või nende variatsioonid).



Joonis 6. Neljast pulsist koosnev kahekomponentne sadestusprotsess TiCl_4 ja H_2O näitel.

Enamus AKS reaktsioonidest on kahekomponentsed, st kasutatakse kahte lähteainet, kuid üha rohkem levivad ka keerukamad kolme- ning enamakomponentsed protsessid. Erinevalt keemilise aurufaasi sadestamise meetodist, ei ole lähteained kunagi reaktsioonikambris ühel ja samal ajal. Selle asemel suunatakse neid sinna korda mööda üksteisele järgnevate pulsside abil. Iga sellise lähteaine pulsi käigus toimub pinnareaktsioon, mille iseloom sõltub reageerivatest funktsionaalrühmadest, lähteaine molekulid reageerivad alusega iseküllastavalt, st lähteaine reageerib täielikult alusega, kattes aluse ühtlase ainekihiga. Seega määrab ühe pulsi käigus maksimaalse sadestatava ainehulga koguse aluse ja lähteaine vaheline interaktsioon. Esimesele pulsile järgneb inertgaasi puhastuspulss, mis eemaldab reaktsioonikambrist ning aluselt esimese lähteaine jäägi. Järgneb analoogne teise lähteaine pulss, pärast mida toimub taaskord puhastuspulss. Selline on tüüpiline neljast pulsist koosnev kahekomponentne sadestusprotsess (vt Joonis 6), mida kutsutakse üheks AKS-tsükliks. Tsükli pikkused varieeruvad, kuid reeglina jäävad mõne sekundi kuni mõne minuti piirimaile. Üldiselt on ühe kasvatus käigus sellised tsikleid kümneid või sadu, seega terve kile kasvatamise protsess kestab tunde. Tsüklite arvu varieerides on võimalik kasvatada ainekihte

ülitäpselt ning ühesuguse koostisega küllaltki suurtele ja keeruka kujuga pindadele. Võimalik on sadestada oksiid, metalle, nitriide, sulfiide, halogeniide, fluoriide jm aineid [37], [38].

AKS-l on rakendusi mitmetes valdkondades, eelkõige on ta ülioluline protsess pooljuhtseadmete tööstuses aga ka meditsiinis. Näiteks on AKS abil loodud biosobivaid katteid implantaatidele [39]. 2015. aastal kaitses Füüsika instituudis bakalaureusetöö Elyne Aaviksoo, kes kasutas AKS meetodit, et katta titaanist hambaimplantaate biosobiva TiO_2 kihiga [40]. Need katted on olulised, sest materjal interakteerub ümbritseva keskkonnaga just läbi pinna, seega määrab kate pinna keemilised omadused. Kuna AKS abil on võimalik katta konformaalselt nii suuri kui ka väikseid pindu, siis on sel meetodil potentsiaali biosobivate mesosakeste loomiseks. AKS eeliseks selliste osakeste katmisel on nanosuuruses olevate ebataasuste või õõnsuste ühtlane katmine.

2. TÖÖ EESMÄRK

Käesoleva uurimustöö eesmärk on uurida nikli mesosakeste sünteesi võimalusi bensüülalkoholmeetodil, iseloomustada sünteesisaaduseid, katta osakesed bio-funktsionaalse ainekihiga ning analüüsida osakeste füüsikalisi ning toksilisi omadusi enne ja pärast katmist. Käesoleva uurimuse tööhüpoteesiks on, et bensüülalkoholmeetodil on võimalik sünteesida ning funktsionaalse ainekihi abil katta nikli osakesi, mis on oluliselt parema bio-ühilduvusega kui katmata nikli osakesed.

3. EKSPERIMENDI METOODIKA

3.1 Nikli osakeste süntees

Ümarkolvi kaaluti 0,5 g nikkel(II)atsetüülatssetonaati ($\text{Ni}(\text{acac})_2$ 95%, Alfa-Aesar), millele lisati 100 g bensüülalkoholi ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ 99%, Sigma-Aldrich). Kolb suleti ning asetati ööpäevaks magnetsegajale, et saada homogeenelt lahustunud ainete segu. Seejärel asetati kolb õlivanni 205 °C juurde 24-ks tunniks (Joonis 7). Õlivann ning kolb vooderdati fooliumiga soojuslikuks isoleerimiseks väliskeskkonnast, et vältida temperatuurigradiendi. Püsiv temperatuur saavutati magnetsegajaga varustatud pliidi IKA C-MAG HS7 abil. Reaktsioonisegu temperatuurimuutuse jälgimiseks oli kolbi lisatud termomeeter. Lisaks oli kolvile kinnitatud niiskuselukuna kasutatud CaH_2 toru. Reaktsioon viidi läbi atmosfääri rõhul (st mittehermeetiliselt suletud konteineris).

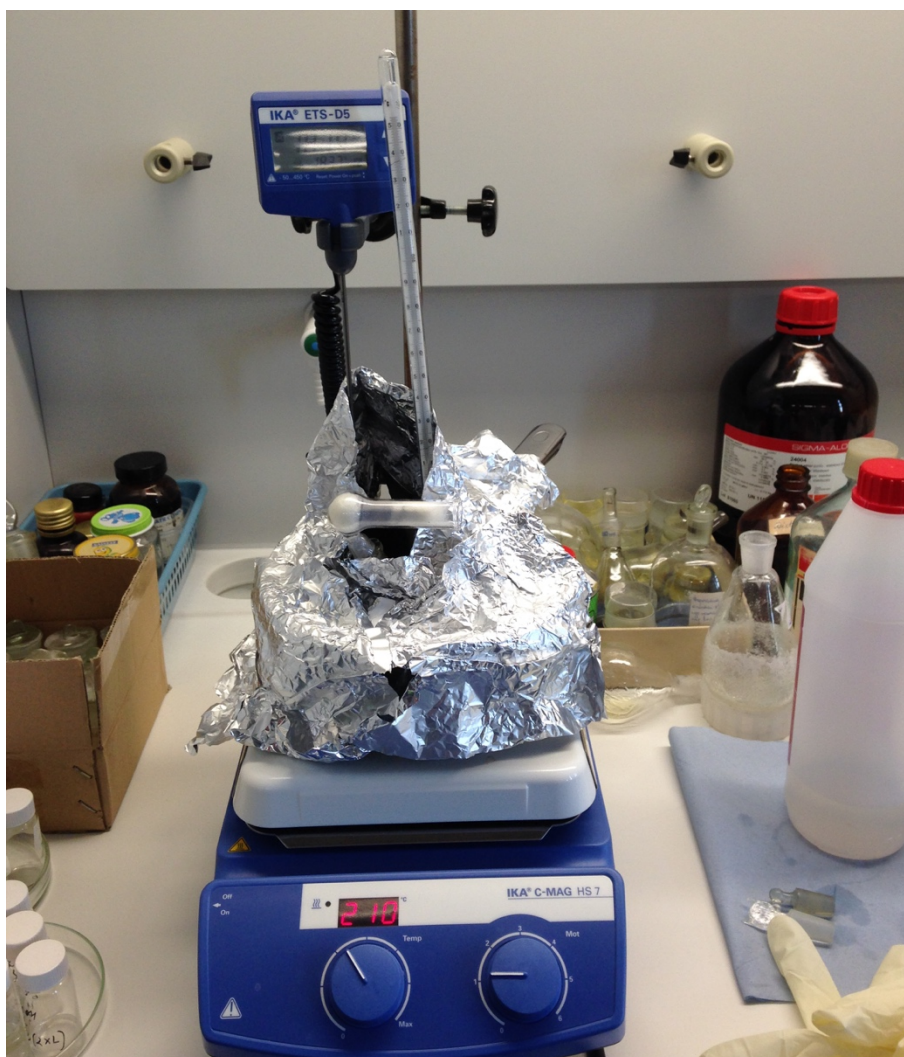
24 h möödudes oli tekkinud lahusesse must sade, mis pesti lahusest välja kasutades nii atsetooniga ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 99%, Sigma-Aldrich) tsentrifuugimist kui ka magnetpesu.

Tsentrifuugimine on meetod, mis võimaldab mittehomoogeenseid süsteeme, milleks antud juhul on vedelik-tahkis, lahutada komponentideks. See protsess toimub tsentrifuugis, mille keskne osa on reguleeritava kiirusega rootor (Heraeus Multifuge X3). Proovid asetati rootorisse ning pöörlemise käigus suurema tihedusega komponendid liiguvad tsentrifuugi teljest eemale. Antud katsete käigus kasutati vedelikust tahkise eemaldamiseks pöörlemiskiirust 10000 pöört/ minutis ning seda 10 minutit ja kaks korda järjest. Korduste vahel eemaldati proovilt vedeliku osa, see asendati atsetooniga. Must sade jäeti õhu kätte toatemperatuurile kuivama. Seejärel koguti see pulbrina kokku.

Reaktsiooniparameetrite valikul toetuti kümnetele katsetele, mis viidi läbi nii antud töö raames kui ka varasemalt autori bakalaureuse astme lõputöös. Kõige olulisemad parameetrid on reaktsioonitemperatuur ning -kestvus. Katsete tulemusena oli võimalik välja selgitada parameetrivahemikud, kus reaktsioonid olid täielikult aset leidnud. Selgus, et parimaid tulemusi andsid temperatuurid alates 200 °C -st. See vastab ka kirjanduses viidatule [21]. Kestvuse osas esines erinevusi eelkõige kontsentratsioonide varieeruvuse tõttu. On loogiline eeldada, et suurema kontsentratsiooniga lahuse täielikuks ära reageerimiseks kulub rohkem aega ja energiat. Katsete käigus selgus, et reaktsiooni kestvuse muutmine ei mõjuta saaduse suurust ega dispergeeritavust, küll aga mõjutab aglomeratsiooni määra. See on ka loogiline järeldus, sest osakestele on antud vastavalt rohkem või vähem energiat.

Antud katsete käigus leiti, et 0,5% kontsentratsiooniga lahuse lõplikuks reageerimiseks on optimaalne kestvus 205 °C temperatuuri juures 24 h.

Kogutud kuiv pulber jagati kaheks prooviks. Üks neist kaeti TiO₂ kilega. Seejärel uuriti mõlemaid proove, osakeste morfoloogiat iseloomustati skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM), faasikoostist röntgendifraktsioonanalüüsiga (XRD), magnetilisi omadusi VSM-ga, TiO₂ faasikoostist mikro-Raman spektromeetriga ja kile paksust spektroskoopilise ellipsomeetriga.



Joonis 7. Sünteesiaparatuur. IKA magnetsegajaga ning automaatse temperatuurikontrolleriga pliidil on fooliumiga vooderdatud õlivannis klaaskolb reaktsiooniseuga, mille temperatuuri on võimalik jälgida eraldi termomeetriga. Kolvile on kinnitatud CaH₂ toru, et vältida õhuniiskuse sattumist reaktsiooniprotsessi.

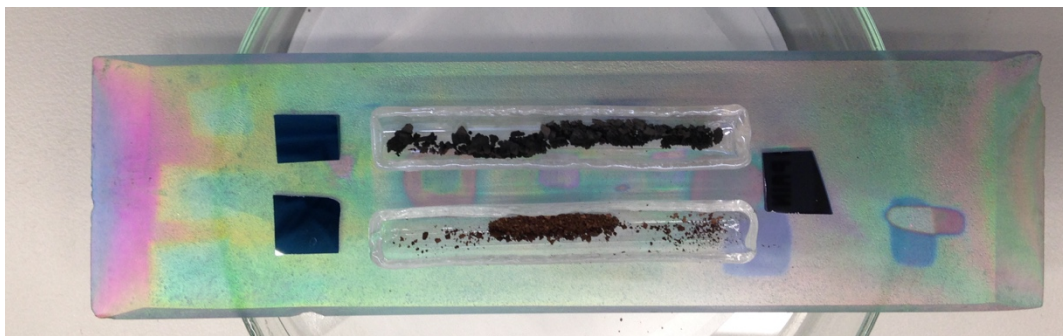
3.2 Aatomkihtsadestamine

Nikli osakeste pinnale sadestati TiO₂ kile AKS meetodil. TiO₂ sadestamisreaktsiooni lähteaineteks on TiCl₄ ja H₂O. Kandegaasina oli kasutusel N₂. Protsess viidi läbi Füüsika Instituudi kiletehnoloogia labori AKS-reaktoris [41]. Sünteesiprotsessi käigus saadud Ni proov kanti spetsiaalsesse kvartslaevukesse, mille ümber asetati Si referentsalused. Referentsalused on olulised sadestatava kile paksuse ning selle ühtlase jaotuse kindlaks tegemisel. Alus koos laevukeste ja referentsalustega (Joonis 8) asetati reaktorisse ning reaktor suleti.

Pulberkujul Ni kaeti kahekomponentse protsessi käigus. Esmalt kanti 150 °C temperatuuri ja 10 tsükli käigus Ni pinnale õhuke ja amorfne TiO₂ nukleatsioonitsentrite kiht. Sellele järgnesid 300 tsükli temperatuuril 300 °C. Protsess koosneb neljast pulsist – TiCl₄, puhastus, H₂O, puhastus (vt Joonis 6), nende ajad olid vastavalt 30-30-0-0 sek (150 °C) ja 10-20-2-10 sek (300 °C). Protsessi käigus varieerus rõhk 195-260 Pa.

Kahetemperatuurse protsessi kasutamise eesmärk oli alustada sadestamist madalal temperatuuril, et vähem kahjustada Ni osakesi ning saavutada paremat nukleatsioonitsentrite tihedust. Ning seejärel viia sadestus läbi kõrgemal temperatuuril, mis pakub intensiivsemat kristallikasvu ja kõrgemat keemilist puhtust [42].

Sadestamised viis läbi Peep Uudeküll Taivo Jõgiaasa juhendamisel.



Joonis 8. Kaks proovi koos räni (Si) referents alustega valmis AKS protsessiks. (Pildil lisaks Ni proovile (ülemine) ka Fe proov (alumine)).

3.3 Magnetmõõtmised seadmel Quantum Design PPMS-VSM

Quantum Design (QD) PPMS (*physical property measurement system*) on ainete ja materjalide füüsikaliste omaduste mõõtmise seade. Keemilise Bioloogia ja Füüsika Instituudis asuv QD PPMS seade on avatud arhitektuuriga modulaarne süsteem, mis võimaldab

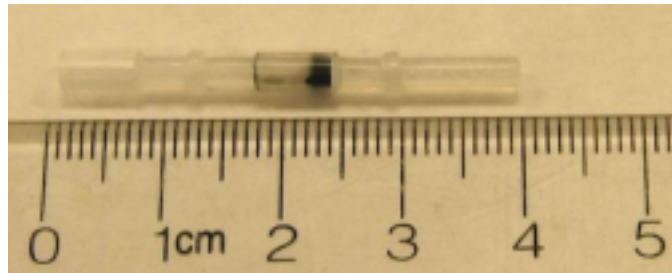
automatiseeritud mõõtmisi temperatuuridel 1,9 K – 400 K ja magnetväljal tugevustega kuni ± 14 T. PPMS abil saab mõõta mitmeid olulisi karakteristikuid – magnetilisi, termilisi ja elektrilisi omadusi, samuti viia läbi mikroskoopia ja spektroskoopia uuringuid. Süsteemi modulaarsus tähendab seda, et kasutaja saab seadet lisamoodulite abil kujundada vastavalt oma kasutusvajadustele. Täpselt sellisena eksisteerib ka magnetomaduste mõõtmise moodul ehk vibreeriva prooviga magnetomeeter (VSM). PPMS seadmele asetatud VSM moodul peidab endas täpset lineaarmootorit ning elektroonikat, mis panevad proovi vertikaalselt võnkuma 40 Hz sageduse juures. PPMS seadmes paiknevad teised olulised komponendid – temperatuuri kontrollsüsteem, detektorpoolid ja 14 T ülijuhtiv magnet, mille ülijuhtivuse säilitamiseks kasutatakse veeldatud heeliumit.



Joonis 9. QD PPMS seade koos VSM mooduliga. Arvuti ja kontrollersüsteem (vasakul) ning PPMS seade (keskel), millele on paigaldatud lineaarmootoriga VSM moodul. PPMS ülijuhtmagnet paikneb vedelas heeliumis, mida ümbritseb vedela lämmastiku (vN_2) ekraan.

QD PPMS-VSM abil on võimalik mõõta pulbreid, tahkiseid ja kilesid, kuid mitte vedelikke ega gaase. Antud töö raames uuriti pulbrilisi materjale. Nende jaoks on QD loonud spetsiaalsed kaheosalised polüpropüleenist proovihoidjad (vt Joonis 10). Proovihoidja koosneb kahest identsest osast. Hoidja avasse asetatakse pulberproov (mass 1-10 mg või rohkem) ning seejärel pressitakse proov teise hoidjaga kinni. Selline kaheosaline hoidja

asetatakse omakorda suuremasse messingist proovialusesse (vt Joonis 11), mis kinnitub pika (süsinik)fiiber varda külge. Kuna magneetuvust uuritakse proovi massiühiku kohta on äärmiselt tähtis proovi täpne kaalumine.



Joonis 10. Pulbermaterjalide proovihoidja VSM seadmele.



Joonis 11. Messingist proovialus. Kinnitub keermega (süsinik)fiibrile varda külge, mis sisestatakse PPMS seadmesse.

Oluline on ka plastikhoidja asukoht messingialuses, selle paigutamiseks on spetsiaalne mõõteseade. Täpse asukoha (nn 0-punkti) teada saamiseks toimub enne mõõtmise algust seadmes kalibratsioon. Pulberproovi uurimine on ilmselt antud meetodil kõige lihtsama ettevalmistusprotsessiga. QD poolt välja töötatud protokollid näevad ette mitmeid võimalusi erinevate proovide uurimiseks, kasutatakse nii spetsiaalseid teipe, liime, proovialuseid ning muud atribuutikat [43].

Pärast proovivarda seadmesse asetamist vakumeeritakse proovikeskkond, arvutis oleva kontrolleri programmi abil seatakse paika mõõteparameetrid (temperatuuri ja magnetvälja tugevuse muutuse ulatus) ning alustatakse mõõtmist [44]. Mõõtmise käigus võngub proov 40 Hz sageduse juures ning 1-3 mm ulatuses. Erineva magnetvälja tugevuste juures registreeritakse poolides voolugevuse muutus, see võimendatakse ning teisendatakse digitaalseks signaaliks, mida saab juba arvutiekraanilt jälgida tõlgituna mõõdetud magnetmomendiks ja selle mõõteveaks.

3.4 (Öko)toksilisuse uuringud

Sünteesitud nikli osakeste potentsiaalse kahjuliku toime hindamiseks kasutati lühiajalisi toksilisuse teste levinud selgrootute mudelorganismidega (bakter – ainurakne prokariot, pärm – ainurakne eukariot ja kirpvähiline – veeorganism).

Koostati järgmine testpatarei:

- 1) 30-min bioluminestsentsi inhibitsiooni test fotobakteriga *Vibrio fischeri*,
- 2) 24-h elulemuse test pärmiga *Saccharomyces cerevisiae*,
- 3) 24-h suremuse test kirpvähilisega *Thamnocephalus platyurus*.

Selliseid *in vitro* uuringuid kasutatakse tihti eelkatsetena, et sõeluda välja edasiseks analüüsiks olulised kemikaalid.

Toksilisuse uuringud viidi läbi Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis, Keskkonnatoksikoloogia labori (grupijuht Dr. A. Kahru) teadurite poolt (I. Blinova, M. Sihtmäe, S. Käosaar).

3.4.1 Osakeste ettevalmistamine toksilisuse uuringuteks

Kaetud ning katmata Ni osakesed dispergeeriti 20 ml-s deioniseeritud vees kontsentratsiooniga 5 g Ni/l. Suspensiooni homogeniseerimiseks kasutati veel täiendavalt ultrahelisondi (Branson Digital Sonifier, USA) 4 min vältel võimsusega 40 W. Toksilisuse uuringute positiivsete kontrollidena kasutati CuSO₄ (95%, Alfa Aesar) lahust kontsentratsiooniga 5 g Cu/l ning Ni osakeste lahustuvuse kontrolliks nikli lahustuvat soola NiCl₂•6H₂O (analüütiline standard, Reachim) samuti kontsentratsiooniga 5 g Ni/l. Olenevalt mudelorganismist testiti Ni ühendeid kontsentratsioonides 0,01-1000 mg Ni/l.

3.4.2 30-min kineetiline bioluminestsentsi inhibitsiooni test fotobakteriga *Vibrio fischeri*

30-min kineetiline bioluminestsentsi inhibitsiooni test looduslikult luminesceeruva fotobakteri *V. fischeri* ga (kasutati kommertsiaalset lüofiliseeritud bakterit: *Vibrio fischeri* Reagent, Aboatox, Soome) viidi läbi toatemperatuuril 96-auguga mikroplaadil järgides ISO standardit (ISO 21338:2010) ja nagu on kirjeldanud Mortimer et al. 2008 [45]. Kuna *V. fischeri* puhul on tegemist merebakteriga, siis testiti uuritavaid proove 2% NaCl lahuses. Testimised teostati kahes paralleelis kaks korda. Uuritavate ühendite toksilisust väljendati

EC₅₀ väärtusena (*half-effective concentration*: proovi kontsentratsioon, mille juures bioluminestsents väheneb 50%), mis arvutati programmi REGTOX abil [46].

3.4.3 24-h elulemuse test pärmiga *Saccharomyces cerevisiae*

24 h elulemuse testi pärmiga *S. cerevisiae* kasutati, et uurida Ni osakeste mõju pärmirakkude elulemusele ehk pärmikolooniate moodustumise võimele. *S. cerevisiae* (Euroscarf, Frankfurdi Ülikooli Mikrobioloogia Instituut, Saksamaa) pärmirakke eksponeeriti deioniseeritud vees (ca 10⁷ elusrakku/ml) suhtes 1:1 uuritavate proovidega. Test viidi läbi 96-auguga mikroplaadil, kus pärmirakke inkubeeriti testitavatele proovidele 25 °C juures 24 h. Pärast 24 h võeti igast mikroplaadi august 5 µl proovikogust, pipeteeriti see “täpina” agarsöötmel ning inkubeeriti 30 °C juures järgnevas 72 h-ks. Uuritavate ühendite toksilisust väljendati MBC väärtusena (*minimum biocidal concentration*: minimaalne biotsiidne kontsentratsioon ehk madalaim testitud kontsentratsioon, mis täielikult inhibeeris pärmirakkude kolooniate tekke agarsöötmele pärast 24 h ekspositsiooni testitavatele ühenditele). Detailne testi kirjeldus on toodud Suppi et al. 2015 [47].

3.4.4 24-h suremuse test kirpvähilisega *Thamnocephalus platyurus*

24 h suremuse test kirpvähilisega *T. platyurus*’ga (kasutati kommertsiaalseid tsüste: Micro-Bio-Tests Inc., Belgia) viidi läbi 25 °C juures vastavalt Thamnotoxkit FTM (1995) standardsele katseprotokollile. Test viidi läbi kolmes korduses. Detailne testi kirjeldus on toodud Blinova et al. 2013 [48]. Uuritavate ühendite toksilisust väljendati LC₅₀ väärtusena (*half-lethal concentration*: proovi kontsentratsioon, mis näitas 50% vesikirpude suremust), mis arvutati programmi REGTOX abil [46].

3.5 Analüüsimeetodid

1. Skaneeriv elektronmikroskoop

Skaneeriv elektronmikroskoop (SEM) on seade, mis skaneerib uuritavat proovi elektronkiirte abil. Need elektronkiired läbivad proovi pinda ning on vastasmõjus aatomitega. Seade kogub peegeldunud või hajunud elektrone. Selle tulemusena saadakse signaalid, mis iseloomustavad uuritava pulbri proovi suurust, reljeefsust ja kuju. Lisaks on võimalik saada infot proovi koostise kohta. SEM’i abil on võimalik näha kümnete nanomeetrite suuruseid objekte.

SEM on väga väärtuslik meetod, sest see võimaldab anda proovile visuaalse hinnangu.

Antud SEM seadme lisavarustusse kuulub elementanalüüs energiadispersiivse röntgenspektroskoopia (EDS) elektronsondi uuringu näol. Selle abil on võimalik määrata uuritava proovi konkreetses punktis olevat elemendilist koostist. Meetod põhineb proovist eralduva röntgenkiirguse analüüsil.

Niklile kantud TiO₂ kihi läbilõike visuaalseks hindamiseks kasutati SEM'i fokuseeritud ionkiire (*FIB – focused ion beam*) lisaseadet, mille abil kanti esmalt osakestele õhuke kiht plaatina ning seejärel lõigati neist ionkiire abil läbilõige. Proovi ettevalmistamiseks kasutati kas puhastatud räni aluseid, millele kanti tilk kolloidset nikli proovi ja jäeti see õhu kätte kuivama või spetsiaalselt süsinikteipi, millele pulberkujul proov vajutati. Kuivanud ja ettevalmistatud proovid viidi SEM uuringule.

Uuringuteks kasutati Tartu Ülikooli Füüsika Instituudis asuvat *FEI Helios Nanolab 600* skaneerivat elektronmikroskoopi, mille resolutsioon ulatub kõrglahutuse korral 0,9 nm-ni.

SEM uuringud viis läbi TÜ FI kiletehnoloogia labori insener Helina Seemen.

2. Spektroskoopiline ellipsomeetria

Spektroskoopiline ellipsomeetria (SE) on optiline meetod õhukeste kilede paksuse ja murdumisnäitaja määramiseks. Uuritava kile paksus võib olla isegi vähem kui 1 nanomeeter. SE mõõdab proovilt peegelduva kiirguse polarisatsiooni muutust. Mõõtmistulemuste interpreteerimiseks kasutatakse andmeanalüüsi ning erinevaid lähendusmudeleid (nt Cauchy).

Mõõtmisteks kasutati Tartu Ülikooli Füüsika Instituudis asuvat SE Semilab Sopra GES-5E. SE kasutati, et hinnata AKS protsessi käigus sadestatud TiO₂ kile paksust ja seda mõõdeti räni alustelt, mida kasutati referentsalustena.

SE mõõtmise ja modelleerimise viis läbi kiletehnoloogia labori bakalaureuse tudeng Robert Krautmann.

3. Röntgendifraktsioonanalüüs

Röntgendifraktsioonanalüüs (XRD) baseerub röntgenkiirguse difraktsioonil aine aatomtasanditelt. Meetodi toimimiseks peab eksisteerima aines korrapära, seega saab mõõdetavaid tulemusi vaid kristallstruktuuriga ainetelt. Igale aatomtasandile kristallis vastab kindel difraktsioonimaksimum, neid on seda rohkem, mida keerukam on kristall. Difraktsioonimaksimumide komplektide ehk difraktogrammide abil tuvastatakse uuritava aine faasikoostis.

XRD analüüs sünteesitud Ni pulbritele viidi läbi Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis (KBFI) röntgendifraktsiooni seadmel PanAnalytical X'Pert³ Powder. Mõõtmisel oli CuK α röntgentoru pinge 45 kV, voolutugevus 40 mA ning mõõdetav difraktsiooninurga (2Θ) vahemik 20°-80°. Difraktogrammi analüüsiks kasutati tarkvarapaketti PanAnalytical Highscore Plus ja kristallograafia andmebaasi PAN-ICSD.

Röntgendifraktsiooni mõõtmise ja analüüsi sooritas töö autor Peep Uudeküll.

4. Mikro-Raman spektroskoopia

Mikro-Raman spektroskoopiat kasutati selleks, et teha kindlaks nikli osakestele sadestatud TiO₂ olemasolu ning faas. Meetod põhineb mitteelastsel ehk Ramani hajumisel. Kui ainele lasta peale kindla lainepikkusega valgust, siis võib eeldada, et hajuv valgus on sama lainepikkusega. Elastse ehk Rayleigh hajumise puhul see ongi nii, kuid hajunud valguses on ka üks väga nõrk komponent – Raman-hajunud valgus, mille lainepikkus on igale ainele iseloomulik. Raman spektroskoopia põhinebki selle valguse mõõtmisel. Vastavalt võre võnkumise teooriale (*lattice vibration theory*) on aine kristallstruktuuri ja võre võnkumiste vahel suur seos. Seda seost Mikro-Raman spektroskoopia kasutabki.

Raman hajumise spektri mõõtmiseks kasutati Tartu Ülikooli Füüsika Instituudis asuvat mikro-Raman spektromeetrit *Renishaw inVia micro-Raman*. Spektromeetri spektraalne lahutusvõime on 1,5 cm⁻¹. Kasutati argoon-ioon laserit lainepikkusega 514 nm, mõõtmisi sooritati laseri 100% võimsuse astmel 30 sekundi jooksul läbi 20x suurendusega objektiivi.

Raman-hajumise mõõtmine viidi läbi nikli pulbermaterjalil, proov oli paigutatud räni alusele.

Mikro-Raman spektroskoopilised mõõtmised ja analüüsi sooritas töö autor Peep Uudeküll

5. Magneetuvuse mõõtmised

Magnetmõõtmised viidi läbi Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis (KBFI) seadmel Quantum Design PPMS-VSM (*Physical Property Measurement System - Vibrating Sample Magnetometer*). Pulbriline Ni kanti selleks spetsiaalsesse plastikust proovihoidjasse. Magneetuvust mõõdeti toatemperatuuril magnetväljas -2×10^6 A/m kuni $+2 \times 10^6$ A/m. Magnetomeetri tööpõhimõtet kirjeldab punkt 1.3.3.

Mõõtmisi aitas läbi viia KBFI insener Joosep Link. Analüüsi teostas töö autor Peep Uudeküll.

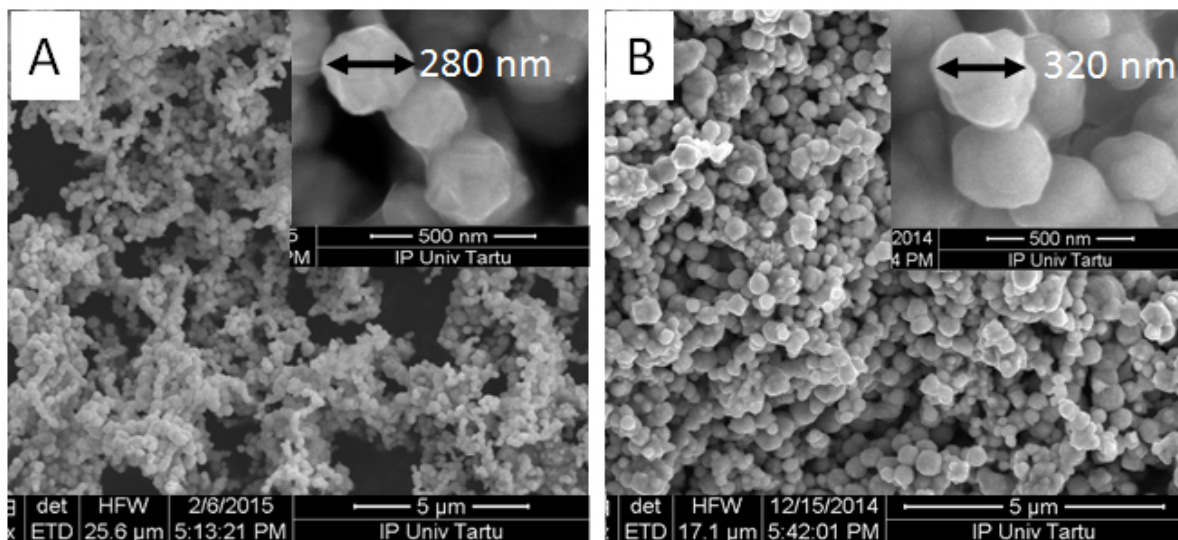
4. ANALÜÜS JA TULEMUSED

4.1 Osakeste kuju ja koostis

Joonisel 12 on SEM'i kujutised katmata Ni (A) ja TiO₂-kaetud Ni (B) osakestest. Osakeste suurus pulbris jääb 100-400 nm vahemikku, enamus osakesi on läbimõõduga 300 nm.

Osakeste laia suurusjaotust võivad põhjustada mitmed faktorid: lähteainete segu mittehomoogeensus, lähteainete kontsentratsioon ja selle varieeruvus, sünteesiprotsessi temperatuuri kõikumised, lahuse segamine reaktsiooni käigus jms. Kõigi nende parameetrite varieerivat mõju on püütud minimeerida, kuid täielikult pole see võimalik.

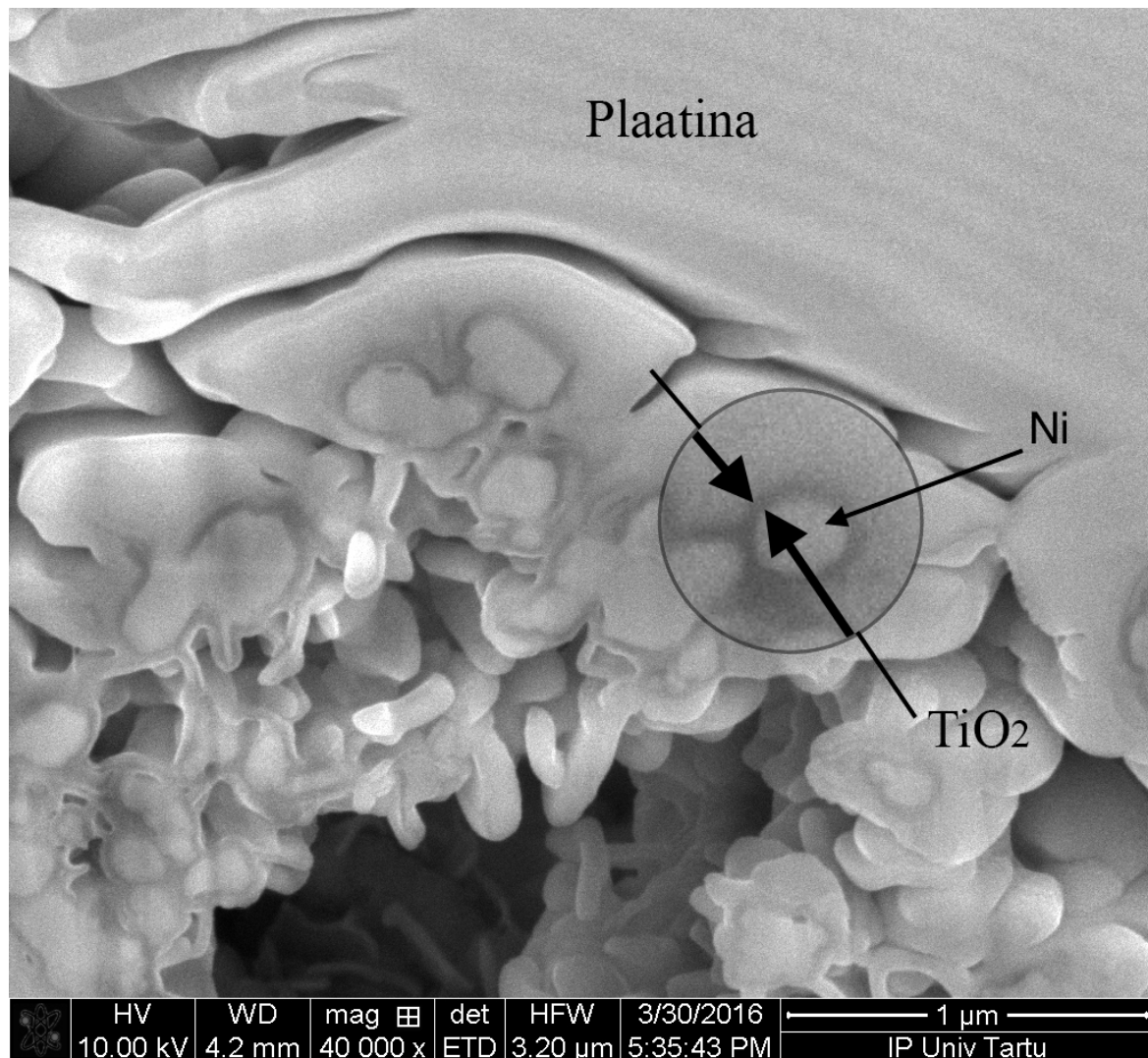
On näha, et mesosakesed on kokku kleepunud, mille põhjuseks võib osaliselt pidada nikli magnetilisi omadusi [49]. Kaetud Ni osakeste suurus ja kuju on praktiliselt identne katmata osakestega, sest AKS on pinnatundlik sadestusmeetod, mis võimaldab osakesed katta konformaalselt ja ühtlaselt TiO₂ kihiga ilma, et osakesed selle tagajärjel kokku kleepuksid.



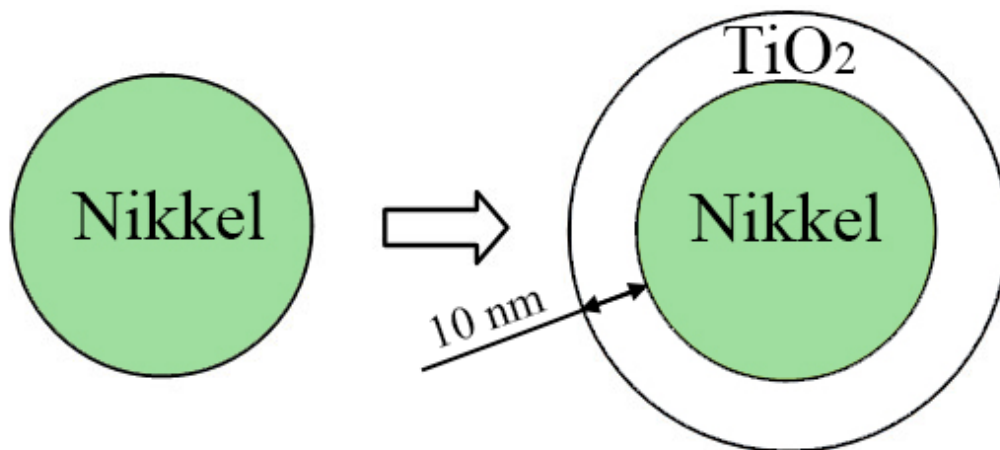
Joonis 12. Katmata Ni (A) ja TiO₂-kaetud Ni (B).

Selleks, et veenduda, kas Ni osakesi ümbritsev TiO₂ kiht on tõesti ühtlaselt sadestatud, tuli kasutada FIB-SEMi. Esmalt võeti proov kaetud niklit, mis vajutati spetsiaalsele süsinikebile ning sisestati SEMi kambrisse. Seejärel sadestati kaetud Ni osakestele plaatina kiht (hele mass Joonisel 13). Sellele järgnes skaneeriva elektronmikroskoobi fokuseeritud ionkiire abil tehtud läbilõige, millest järgnevalt tehti SEM pilt (Joonis 13). Siin avaldub TiO₂ dielektriline

olemus õhukese musta kihina hästi juhtivate nikli ja plaatina vahel. On selgelt näha, et TiO_2 kiht ümbritseb täielikult nikli osakesi. Kihi paksus mõõdetuna SE abil on 10 nm, seega lisab kiht osakeste diameetrile umbes 20 nm (vt Joonis 14).

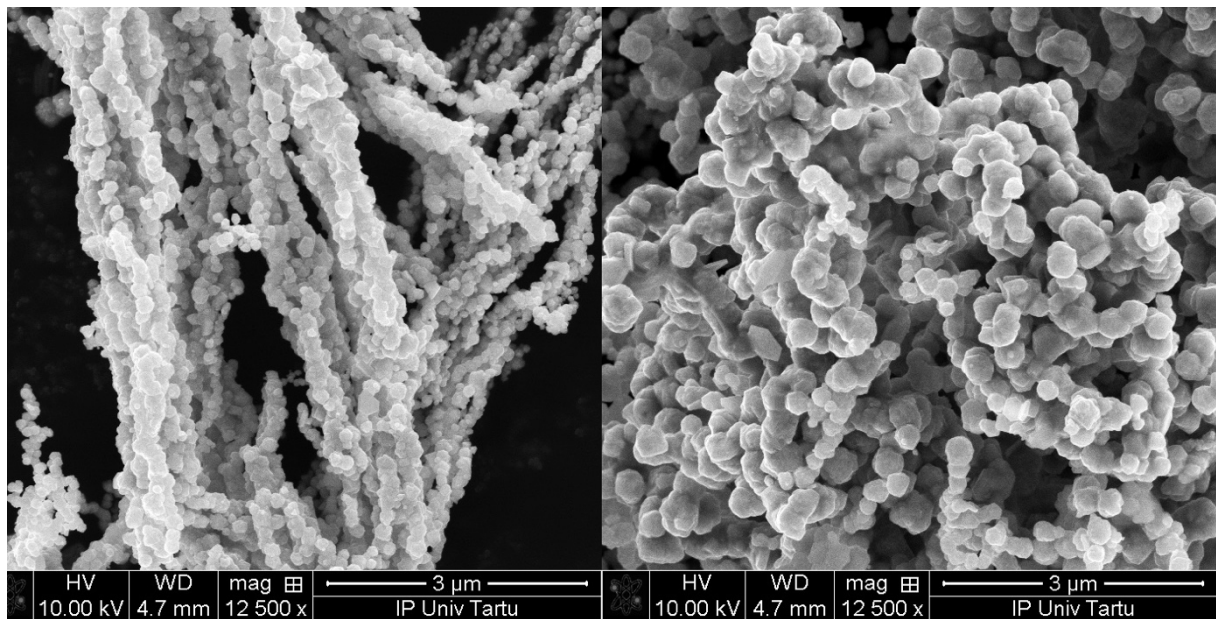


Joonis 13. FIB-SEM läbilõige TiO_2 -kaetud nikli osakestest.



Joonis 14. Skemaatiline näide TiO_2 kihist nikli osakesel.

On teada, et bensüülalkoholil põhinevad meetodid annavad saadusteks sfäärilise morfoloogiaga osakesi [21]. Huvitavaid tulemusi andis aga reaktsiooni käigus magnetsegaja pulga kasutamine. Magnetsegaja pulk on sisuliselt püsomagnet, mis omab teatud tugevusega magnetvälja. Kuna reaktsiooni käigus tekkiv nikkel on magnetiline, siis tänu reaktsiooninõus olevale magnetsegajale joonduvad need tekkivad nikli osakesed välise magnetväljaga samasuunaliselt. See tähendab, et tekivad nikli fiibrid, mis on küll sfäärilise kujuga, kuid on kogunenud fiibriteks. Võrdlusena, ilma magnetsegaja pulgata, neid fiibreid ei teki (vt Joonis 15).



Joonis 15. Nikli fiiberja paigutusega (vasakul) ja sfäärilise kujuga (paremal) osakesed.

4.2 Kaetud ja katmata osakeste koostis

Tabelis 1 on esitatud EDS abil teostatud elementanalüüsi tulemused, mis näitavad, et katmata nikkel on suures osas puhas (72,33%), kõigest 0,71% hapnikku ja 3,37% süsinikku. Kaetud nikli puhul on näha, et oluliselt on muutunud hapniku osakaal (0,71% → 6,68%) ning lisandunud on ka titaan (9,02%), mis iseloomustavad TiO₂ olemasolu. Analüüs indikeerib ka väikest kloori kogust, mis pärineb AKS protsessis kasutatud TiO₂ metallilisest lähteainest TiCl₄.

Käesoleva uuringu puhul tuleb tähele panna, et elektronsondelementanalüüs ei anna proovist “täielikku pilti”. Analüüsi käigus kiiritatakse kitsa elektronkiirte kimbuga konkreetset proovi punkti, mistõttu on saadav info just sellele punktile omane. Tulemusi ei saa mugandada proovi

teistele osadele kus koostis võib olla teistsugune. Tervet proovi mõõtva analüüsi teostamine on võimalik näiteks röntgendifraktsiooni meetodi abil (vt 4.4).

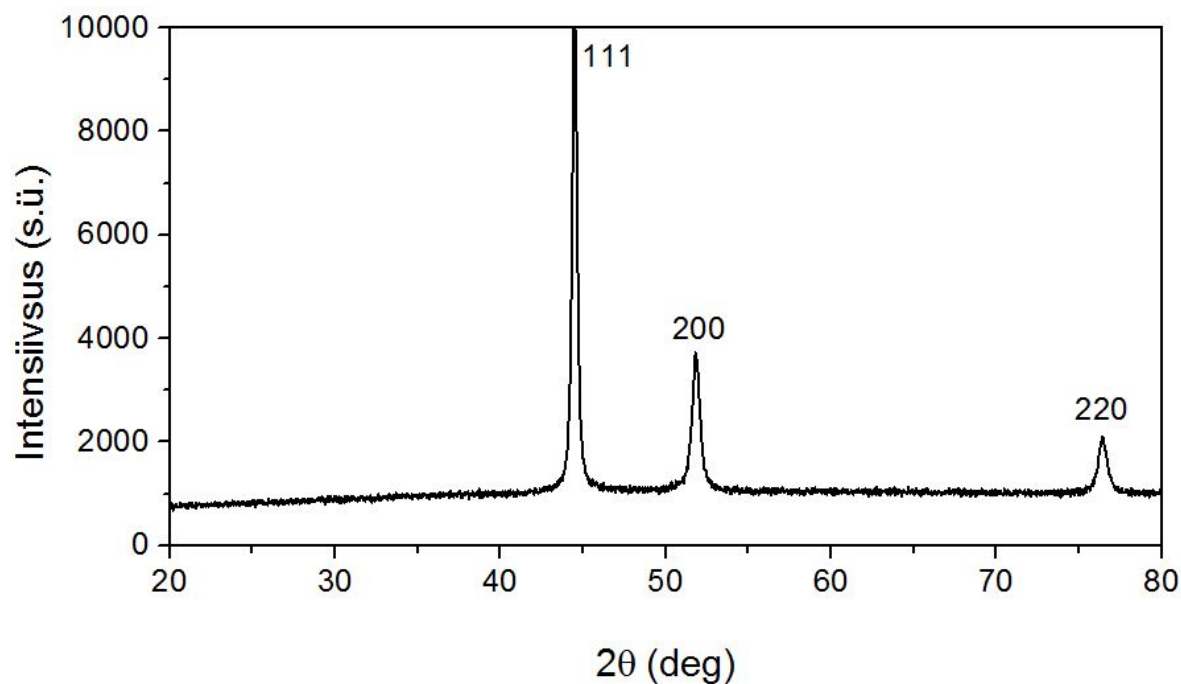
Tabel 1. Uuritavate Ni proovide elementanalüüsi tulemused.
Rakendatud pinge 15 kV.

Element	C	O	Si*	Ni	Ti	Cl	Kokku
Ni	3,37%	0,71%	23,59%	72,33%	0%	0%	100%
Ni + TiO ₂	2,23%	6,68%	0%	78,39%	9,02%	3,68%	100%

* - 23,59% Si viitab ränialusele, millel proov paiknes. Räni osakaal kaetud osakestel puudub, sest parema tulemuse saamiseks oli pulber uurimise ajaks vajutatud süsnikeibile.

4.3 Röntgendifraktsioonanalüüs

Nikli röntgendifraktsioonanalüüsi difraktogramm on esitatud joonisel 16. Difraktogrammil on kolm tugevat piiki 2θ väärtustel $44,4^\circ$, $51,8^\circ$ ja $76,4^\circ$, mis vastavad tahkkeskendatud kuupvõre (fcc) nikli võretasanditele (111), (200) ja (220) vastavalt andmebaasi JCDPS kaardile 65-5714. TiO₂-kaetud nikli difraktogramm on identne puhta nikli omaga, mistõttu pole seda siin eraldi välja toodud. Identsuse põhjuseks on TiO₂ liialt väike kogus märgatava signaali saamiseks, mistõttu kasutati TiO₂ identifitseerimiseks mikro-Raman spektroskoopiat.



Joonis 16. Ni proovi röntgendifraktogramm.

Kristalliidi suurust hinnati Scherreri võrrandi abil (111) piigist. Võrrandist arvatuna on see 29,9 nm.

Scherreri võrrand avaldub:

$$\tau = \frac{\kappa\lambda}{\beta \cos \theta},$$

kus τ - kristalliidi keskmine suurus

κ - kujufaktor

λ - röntgenkiirguse lainepikkus

β - piigi laius poolkõrgusel (*full width at half maximum – FWHM*)

θ - difraktsiooninurk ehk piigi asukoht [50]

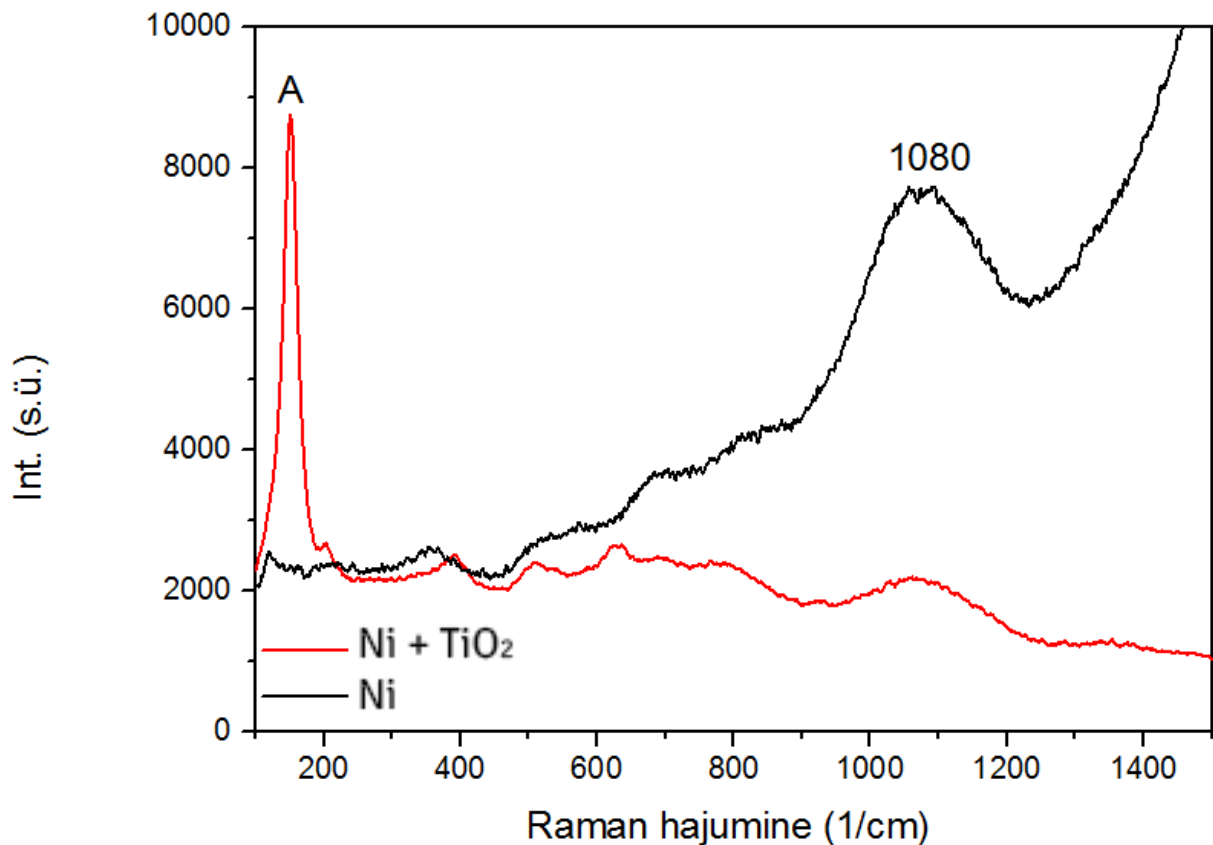
Tähelepanu tuleb juhtida asjaolule, et Scherreri võrrandi abil hinnatakse kristalliidi, mitte osakese suurust.

4.4 Mikro-Raman spektroskoopia

Raman spektroskoopia kasutamise eesmärk on veenduda TiO₂ olemsaolus kaetud nikli proovil. Sünteesitud TiO₂-kaetud Ni pulber asetati Si plaadile ja uuriti Raman-hajumise meetodil. Joonisel 17 on mikro-Raman spetrid Ni osakestest (must joon) ja TiO₂ kaetud osakestest (punane joon).

Puhast niklit mikro-Raman spektroskoopia abil meil identifitseerida ei õnnestunud. Juhul kui nikli pind on kergelt oksüdeerunud, võib olla võimalik identifitseerida nikli oksiide. Nikli enim levinud oksiidid on NiO (nikkel(II)oksiid) ja Ni₂O₃ (nikkel(III)oksiid). Spektrogrammil on kõige intensiivsem nikli piik 1080 cm⁻¹ (Joonis 17). Kirjanduses leiduvate nikli oksiidide Raman-uuringute tulemuste seas sellele otseselt vastet ei leidu [51], [52]. Ainukene meie poolt leitud vaste on Mironova-Ulmane et al. poolt teostatud Raman-hajumise uuring 100 nm suurusega NiO pulbrile, kus kattuvus on 1080 cm⁻¹ ja 1500 cm⁻¹ piikide osas [53]. Kuigi ergastamiseks kasutati laserit lainepikkusega 442 nm ja meie uuringus kasutatava laseri lainepikkus oli 514 nm, võib öelda, et sünteesitud nikli pinnal on ilmselt ka õhuke NiO kiht.

TiO₂ kilega kaetud Ni proovist võetud spektrogramm näitab selgelt TiO₂ kile anataasi faasi olemasolu, anataasile iseloomuliku tugevaima piigi asukoht on 151 cm⁻¹ [50].



Joonis 17. Kaetud ning katmata Ni pulbrite Raman-hajumise spekter.

4.5 Magnetomadused

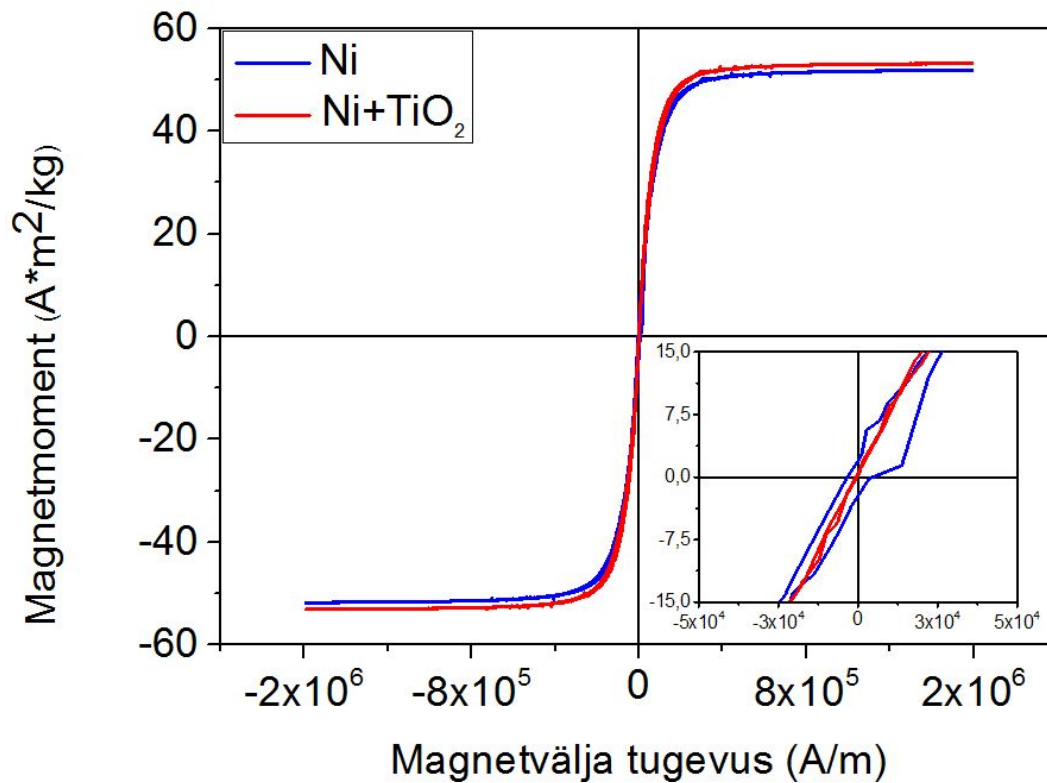
Materjali magnetilised omadused on tihedalt seotud ainetüki suuruse, morfoloogia, kristallilisuse ning koostisega [49]. Samuti põhjustab erinevusi see, kas materjal on nanopulbri või purustatud nn *bulk* materjali pulbri kujul.

Nii katmata kui TiO₂ kaetud nikli puhul on hüstereesisilmus äärmiselt kitsas. See tähendab, et jääkmagneetuvus on praktiliselt olematu – välise välja eemaldamisel kaob ka proovide magnetmoment. Huvitava erisuse lõi katmata ning kaetud nikli vahel küllastusmagneetuvus. Katmata nikli osakeste puhul on küllastusmagneetuvus 51 A×m²/kg ning kaetud nikli puhul natuke kõrgem - 53 A×m²/kg, mis näitab, et TiO₂ kate suurendas küllastusmagneetuvust 4% võrra. Võrdluseks, *bulk* nikli vastav näitaja on 55 A×m²/kg [54]. Erinevus oli ka koertsitiivsuses, katmata nikli puhul oli see 3580 A/m ning kaetud nikli puhul ligi suurusjärgu võrra väiksem – 238 A/m.

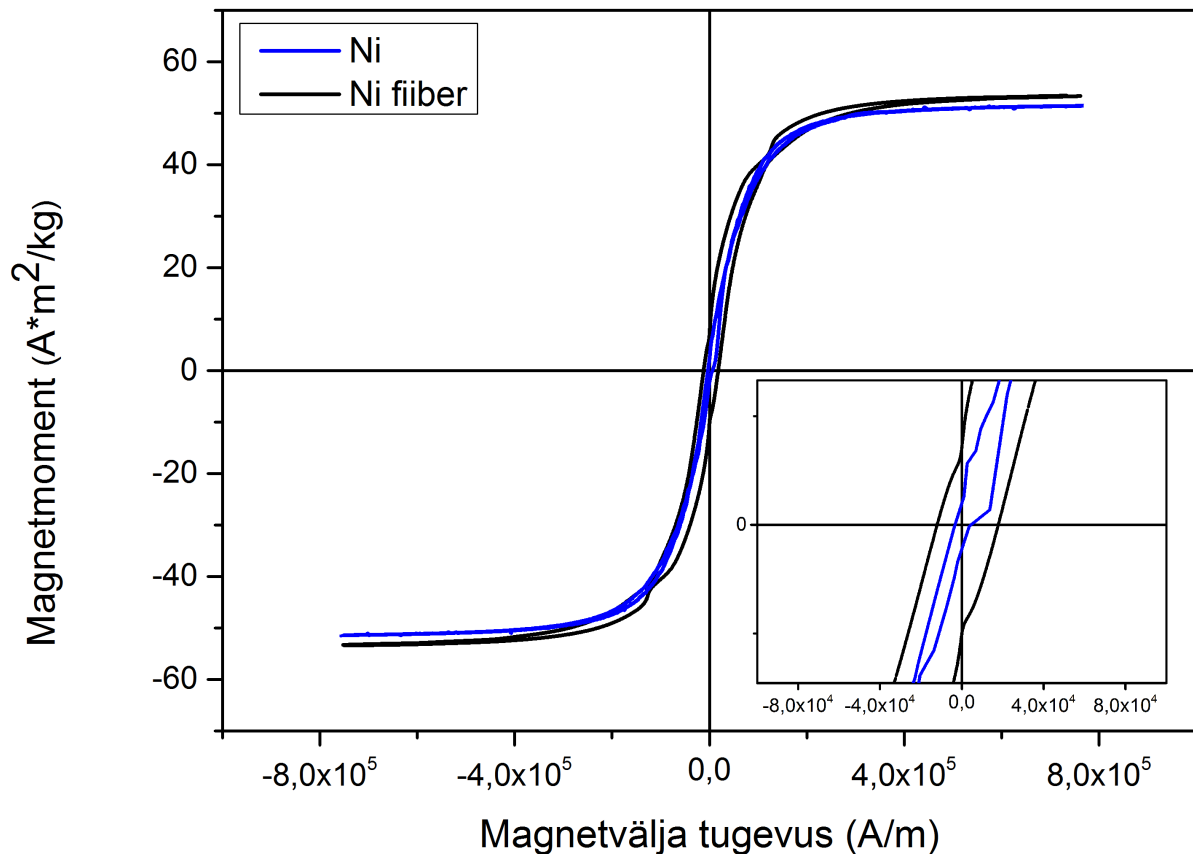
Sellist kombinatsiooni väga väga väiksest koertsitiivsusest ehk kitsast hüstereesisilmusest ja kindlast küllastusmagneetuvuse platoost iseloomustatakse nanoosakesete puhul mõistega

superparamagnetism. Kuigi sünteesitud nikli osakesed on nanoosakestest ligi suurusjärgu võrra suuremad, siis nende magnetilised omadused sarnanevad vägagi superparamagnetiliste nanoosakeste omadele.

Kaetud nikli magnetilised omadused on natuke paremad tänu kõrgemale küllastusmagneetuvusele, mis on üks olulisemaid faktoreid magnetiliste osakeste rakendustes. Kõrgema küllastusmagneetuvuse tingib osakesi kaitsev kiht, mis ei lase niklil õhu käes oksüdeeruda.



Joonis 18. Kaetud ning katmata nikli magneetuvuskõverad.



Joonis 19. Nikli fiibrite ning osakeste magneetuvuskõverad.

Kui võrrelda nikli osakesi ja fiibreid (vt Joonised 15&19), võib välja tuua, et fiibrid näitavad kõrgemat küllastusmagneetuvust ($53 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ vs $51 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$) ning ka kõrgemat koertsitiivsust (12000 A/m vs 3580 A/m). Neid kõrgemaid näitajaid põhjustab ilmselt fiibrite struktuur, mis koosneb suurest hulgast osakestest.

Vaadeldes kaks suurusjärku väiksemad 3-5 nm suurused nikli nanoosakesi, siis nende küllastusmagneetuvus on sünteesitud Ni mesoosakestest oluliselt väiksem - $36 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$. Seda põhjustab osakese väiksus ning suur eripind [55]. Eripind iseloomustab seda kui suur osa osakese aatomitest paikneb tema pinnal. Näiteks 1 μm suurusel osakesel on pinnal u 0,15% aatomitest, kuid 6 nm osakesel ligi 20% aatomitest. Väiksem küllastusmagneetuvus tuleneb seega asjaolust, et nendel pinnal paiknevatel aatomitel on vähem vabasid spinne, mis saaksid magnetväljale vastavalt orienteeruda ja seega ongi osakese summaarne magnetmoment väiksem [56].

4.6 (Öko)toksilisuse uuringud

Lühiajalise toksilisuse testide tulemused on esitatud tabelis 2. Kokkuvõtvalt võib öelda, et uuritavad Ni osakesed antud testsüsteemides ja testorganismidele toksilised ei olnud.

Tabel 2. Kaetud ja katmata Ni osakeste toksilisus mudelorganismide suhtes.

Mudelorganism	Fotobakter <i>Vibrio fischeri</i>	Pärm <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kirpvähiline <i>Thamnocephalus platyurus</i>
Testi tüüp	Bioluminestsentsi inhibeerimine	Elulemus	Suremus
Indikaator	EC ₅₀ ¹	MBC ²	LC ₅₀ ³
Proovide kontsentratsioonid			
NiCl ₂ x6H ₂ O (Ni)	400 mg/l	>1000 mg/l	5 mg/l
Ni	>500 mg/l	>1000 mg/l	650 mg/l
Ni + TiO ₂	>500 mg/l	>1000 mg/l	500 mg/l
CuSO ₄ (Cu, positiivne kontroll)	0,16 mg/l	10 mg/l	0,01 mg/l

¹ - proovi kontsentratsioon, mille juures bioluminestsents väheneb 50%; ² – madalaim kontsentratsioon, mis täielikult inhibeeris 24 h möödudes pärmirakkude kolooniate tekke agarsöötmele; ³ - proovi kontsentratsioon, mis näitas 50% vesikirpude suremust.

4.6.1 Mõju fotobakterile *Vibrio fischeri*

Bakterid on looduslikes toiduahelates ja ainerings äärmiselt olulised organismid (surnud loomse ja taimse orgaanilise aine lagundajad). *V. fischeri* on ISO-standard testorganism, mida on toksilisuse testimiseks kasutatud juba rohkem kui 30 aastat. *V. fischeri* test näitas, et uuritavad Ni osakesed antud bakteritestis toksilised ei olnud (30-min EC₅₀ >500 mg Ni/l). Positiivsete kontrollidena kasutatud CuSO₄ ja NiCl₂ EC₅₀ väärtused olid vastavalt 0,16 mg Cu/l ja 400 mg Ni/l.

4.6.2 Mõju pärmile *Saccharomyces cerevisiae*

On näidatud, et orgaanilised söötmekomponendid võivad vähendada Ni ühendite kasvu inhibeerivat toimet ja akumulatsiooni pärmirakkudes *S. cerevisiae* [47], [57]. Välistamiseks söötmekomponentide mõju, valiti testkeskkonnaks deioniseeritud vesi. Testitulemused näitasid, et erinevalt vasest (24-h MBC=10 mg Cu/l) kui teadaolevale biotsiidsete omadustega kemikaalile, uuritavad Ni osakesed (24-h MBC >1000 mg Ni/l) pärmirakkude *S. cerevisiae* elulemusele toksilist toimet ei avaldanud.

4.6.3 Mõju kirpvähilisele *Thamnocephalus platyurus*

Kirpvähilised ja vetikad on reeglina kõige tundlikumad veeorganismid, eriti nanomaterjalidega kokkupuutel [58]. Sarnaselt bakterile ja pärmile ei omanud uuritavad Ni osakesed toksilist toimet ka kirpvähilisele *T. Platyurus* (24-h LC₅₀ > 500 mg Ni/L). Küll aga omas toksilist toimet Ni lahustuv sool (24-h LC₅₀=5 mg Ni/L), mis viitab sellele, et paremates lahustuvuse tingimustes võivad nikli osakesed siiski kirpvähilistele toksilist mõju avaldada.

4.7 Tulemused

- Sünteesiti bensüülalkoholmeetodil sfäärilise kujuga nikli mesoosakesed primaarsuurusega 300 nm (suuruse vahemik 100-400 nm).
- Sünteesitud osakesed kaeti 10 nm paksuse TiO₂ kihiga aatomkihtsadestamise meetodil.
- Koostisanalüüs (EDS) kinnitab Ni olemasolu sünteesiproduktis ning Ni, Ti ja O olemasolu kaetud sünteesiproduktis.
- Röntgenstruktuuranalüüsi (XRD) andmetel on sünteesiprodukt tahkkeskendatud kuupvõrega nikkel.
- Mikro-Raman analüüs indikeeris TiO₂ kui anataasi olemasolu kaetud nikli proovi puhul.
- Magnetmõõtmised näitasid nii kaetud kui katmata nikli puhul väga nõrka hüstereesi ning TiO₂-kaetud nikkel kergelt paremaid magnetilisi omadusi kõrgema küllastusmagneetuvuse näol (51 A×m²/kg vs 53 A×m²/kg). Kitsas hüstereesisilmus ja kindel küllastusmagneetuvuse platoo viitavad osakeste superparamagnetilisele iseloomule.
- Kaetud ning katmata nikli osakesed ei olnud kahjulikud ühelegi testitud ökoloogilisele objektile, viidates osakeste mittetoksilisele iseloomule antud kontsentratsioonide juures testitud organismidele.

4.8 Järeldused

- Bensüülalkoholmeetodil on võimalik sünteesida puhtaid nikli mesoosakesi.
- Aatomkihtsadestamise teel on võimalik katta mesoosakesi konformaalselt TiO₂ ainekihiga.
- Nikli mesoosakeste katmine TiO₂ kihiga suurendab küllastusmagneetuvust (+ 4%) ja vähendab koertsitiivsust ligi suurusjärgu võrra.
- Kirjeldatud meetoditel sünteesitud ning kaetud osakesi on võimalik kasutada biomeditsiiniliste rakenduste arendamiseks.

5. KOKKUVÕTE

Antud uurimustöös sünteesiti nikli mesoosakesi bensüülalkoholmeetodil. Sünteesireaktsiooni tulemuseks olid sfäärilise kujuga osakesed, primaarsuurusega 300 nm (suurusvahemik 100-400 nm). Pärast sünteesi jagati produktid kaheks, millest üks kaeti 10 nm paksuse TiO₂ kilega aatomkihtsadestamise meetodil. Saadud materjalide röntgenstruktuuranalüüs viitas kuubilise (fcc) nikli olemasolule materjalides. TiO₂ anataasi faas kaetud Ni osakestel tehti kindlaks mikro-Raman spektroskoopia abil. Magnetmõõtmised näitasid mõlemate proovide puhul väga nõrka hüstereesi ning TiO₂-kaetud nikkel kergelt paremaid magnetilisi omadusi kõrgema küllastusmagneetuvuse (51 A×m²/kg vs 53 A×m²/kg) näol. Superparamagnetilistele omadustele viitasid sünteesitud osakeste kitsas hüstereesisilmus ja kindel küllastusmagneetuvuse platoo. Kaetud ning katmata nikli osakesed ei olnud kahjulikud ühelegi testitud ökoloogilisele objektile, viidates osakeste mittetoksilisele iseloomule antud kontsentratsioonide juures kasutatud eluvormide korral.

Uurimuse järgmiseks sammuks on edasised bio-analüüsid (sh rakukatsed) ning täiendavad magnetomaduste uuringud konkreetsete rakendusvaldkondade täpsustamiseks.

Synthesis and characterization of nickel mesoparticles for biomedical applications

Nickel particles were synthesized via benzyl alcohol method. The reaction resulted in spherical shape particles, predominantly in the size range of 300 nm. The surface of obtained particles was successfully coated with 10 nm thick TiO₂ film by ALD method. XRD confirmed the presence of face centered cubic (fcc) nickel. The amorphous TiO₂ (anatase) coating was identified by micro-Raman studies. Magnetic measurements indicated a very weak hysteresis in the case of uncoated Ni particles compared to the even smaller coercivity in their coated counterpart. Weak hysteresis and a strong saturation plateau both suggest superparamagnetic behavior of the synthesized particles. Uncoated and TiO₂-coated Ni particles showed no harmful effect to any used test species in the test conditions applied, pointing to the non-toxic nature of the synthesized particles, therefore indicating a promising base for future medical research. It is necessary to further analyze biocompatibility, surface

functionalization and magnetic properties, which are the biggest challenges in complex biological environments.

Tänuavaldused

Autor tänab eelkõige uurimustöö juhendajaid püsiva toetuse ning praktiliste näpunäidete eest. Lisaks kuulub autori tänu ka Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi teadlastele, kes olid suureks abiks magnetuuringute teostamisel (Dr. Liis Steinberg, Dr. Raivo Stern, Joosep Link) ja toksikoloogiliste uuringute läbi viimisel - Keskkonnatoksikoloogia labor eesotsas Dr. Anne Kahru ning teadurite Irina Blinova, Mariliis Sihtmäe, Sandra Käosaarega.

Autor tänab kõiki, kes on antud töö valmimisel abiks olnud.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] K. J. Widder, A. E. Senyei, and D. G. Scarpelli, "Magnetic microspheres: a model system of site specific drug delivery in vivo.," *Exp. Biol. Med.*, vol. 158, no. 2, pp. 141–146, 1978.
- [2] S. Miltenyi, W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch, "High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS," *Cytometry*, vol. 11, pp. 231–238, 1990.
- [3] C. Mah, T. J. Fraitas, I. Zolotukhin, S. Song, T. R. Flotte, J. Dobson, C. Batich, and B. J. Byrne, "Improved Method of Recombinant AAV2 Delivery for Systemic Targeted Gene Therapy," *Mol. Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 106–112, 2002.
- [4] B. Kozissnik and J. Dobson, "Biomedical applications of mesoscale magnetic particles," *MRS Bull.*, vol. 38, pp. 927–932, 2013.
- [5] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, and T. Sen, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 24–46, 2011.
- [6] V. Valdiglesias, G. Kilic, C. Costa, N. Fernandez-Bertolez, E. Pasaro, J. P. Teixeira, and B. Laffon, "Effects of Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Genotoxicity, Developmental Toxicity, and Neurotoxicity," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 56, pp. 125–148, 2015.
- [7] X. Zhu, S. Tian, and Z. Cai, "Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stages," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, pp. 1–6, 2012.
- [8] K. K. Das, S. N. Das, and S. A. Dhundasi, "Nickel, its adverse health effects & oxidative stress," *Indian J. Med. Resarch*, vol. 128, pp. 412–425, 2008.
- [9] A. P. Romio, H. H. Rodrigues, A. Peres, A. Da Cas Viegas, E. Kobitskaya, U. Ziener, K. Landfester, C. Sayer, and P. H. H. Araujo, "Encapsulation of Magnetic Nickel Nanoparticles via Inverse Miniemulsion Polymerization," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 129, no. 3, pp. 1426–1433, 2013.
- [10] K. Kohara, S. Yamamoto, L. Seinberg, T. Murakami, M. Tsujimoto, T. Ogawa, H. Kurata, H. Kageyamaa, and M. Takanoa, "Carboxylated SiO₂-coated a-Fe

- nanoparticles: towards a versatile platform for biomedical applications,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 25, pp. 2563–2565, 2013.
- [11] S. Kango, S. Kalia, A. Celli, J. Njuguna, Y. Habibi, and R. Kumar, “Progress in Polymer Science Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic – inorganic nanocomposites — A review,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, no. 8, pp. 1232–1261, 2013.
- [12] M. Smietana, M. Koba, E. Brzozowska, K. Krogulski, J. Nakonieczny, L. Wachnicki, P. Mikulic, M. Godlewski, and W. J. Bock, “Label-free sensitivity of long-period gratings enhanced by atomic layer deposited TiO₂ nanooverlays,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 7, pp. 3530–3536, 2015.
- [13] S. Xie, B. Zhang, L. Wang, J. Wang, X. Li, and G. Yang, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with different polymers and their MRI contrast effects in the mouse brains,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 326, pp. 32–38, 2015.
- [14] S. D. Standridge, G. C. Schatz, J. T. Hupp, S. D. Standridge, G. C. Schatz, and J. T. Hupp, “Toward Plasmonic Solar Cells: Protection of Silver Nanoparticles via Atomic Layer Deposition of TiO₂,” *Langmuir*, vol. 25, no. 5, pp. 2596–2600, 2009.
- [15] M. Vähä-nissi, M. Pitkänen, E. Salo, E. Kenttä, A. Tanskanen, T. Sajavaara, M. Putkonen, J. Sievänen, A. Sneek, M. Rättö, M. Karppinen, and A. Harlin, “Antibacterial and barrier properties of oriented polymer films with ZnO thin films applied with atomic layer deposition at low temperatures,” *Thin Solid Films*, vol. 562, pp. 331–337, 2014.
- [16] Y. Hou, H. Kondoh, T. Ohta, and S. Gao, “Size-controlled synthesis of nickel nanoparticles,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 241, pp. 218–222, 2005.
- [17] J. Gong, L. L. Wang, Y. Liu, J. H. Yang, and Z. G. Zong, “Structural and magnetic properties of hcp and fcc Ni nanoparticles,” *J. Alloys Compd.*, vol. 457, pp. 6–9, 2008.
- [18] N. Pinna, M. Karmaoui, and M. Willinger, “The ‘benzyl alcohol route’: An elegant approach towards doped and multimetal oxide nanocrystals,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 57, pp. 323–329, 2011.
- [19] I. Bilecka, I. Djerdj, and M. Niederberger, “One-minute synthesis of crystalline binary and ternary metal oxide nanoparticles,” *Chem. Commun.*, pp. 886–888, 2008.

- [20] N. Pinna and M. Niederberger, “Surfactant-Free Nonaqueous Synthesis of Metal Oxide Nanostructures,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 47, pp. 5292–5304, 2008.
- [21] Y. B. Mollamahaleh, D. Hosseini, M. Mazaheri, and S. K. Sadrnezhad, “Surfactant-Free Production of Ni-Based Nanostructures,” *Mater. Sci. Appl.*, vol. 2, pp. 444–452, 2011.
- [22] I. Bilecka and M. Niederberger, “New developments in the nonaqueous and/or non-hydrolytic sol–gel synthesis of inorganic nanoparticles,” *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 26, pp. 7717–7725, 2010.
- [23] U. Häfeli, “The History of Magnetism in Medicine,” in *Magnetism in Medicine: A Handbook, 2nd, Completely Revised and Enlarged Edition*, W. Andrä and H. Nowak, Eds. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [24] I. Šafařík and M. Šafaříková, “Magnetic nanoparticles and biosciences.,” *Monatshefte für Chemie*, vol. 133, no. 6, pp. 737–759, 2002.
- [25] E. Polido Legaria, S. Demirel Topel, V. G Kessler, and G. A Seisenbaeva, “Molecular insights into the selective action of a magnetically removable complexone-grafted adsorbent,” *Dalt. Trans.*, vol. 44, no. 3, pp. 1273–1282, 2014.
- [26] Y. Zhang, N. Kohler, and M. Zhang, “Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 7, pp. 1553–1561, 2002.
- [27] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. R167–R181, 2003.
- [28] R. V. Ramanujan, “Magnetic Particles for Biomedical Applications,” in *Biomedical Materials*, Springer US, 2009, pp. 477–491.
- [29] C. Plank, M. Anton, C. Rudolph, J. Rosenecker, and F. Krötz, “Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 3, no. 5, pp. 745–758, 2003.
- [30] P. Tartaj, M. del P. Morales, S. Veintemillas-verdaguer, T. Gonzalez-Carreno, and C. J. Serna, “The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. R182–R197, 2003.

- [31] S. K. Yen, P. Padmanabhan, and S. T. Selvan, “Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Diagnostics, Therapy and Macromolecule Delivery,” *Theranostics*, vol. 3, no. 12, pp. 986–1003, 2013.
- [32] D. W. McRobbie, E. A. Moore, M. J. Graves, and M. R. Prince, *MRI from picture to proton*, 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2007.
- [33] B. Blasiak, F. C. J. M. Van Veggel, and B. Tomanek, “Applications of Nanoparticles for MRI Cancer Diagnosis and Therapy,” *J. Nanomater.*, vol. 2013, no. ID 148578, 2013.
- [34] M. Niederberger and N. Pinna, *Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents*. London: Springer-Verlag, 2009.
- [35] P. Uudeküll, “Metalloksiidsete nanoosakeste süntees ja karakteriseerimine.” University of Tartu, 2014.
- [36] “Vibrating Sample Magnetometry.” Christian Albrechts Universität zu Kiel, 2015.
- [37] L. Aarik, “Aatomkihtsadestamine – kvartsresonantskaalumine. Praktikumi juhend.” University of Tartu, 2013.
- [38] C. Guerra-nuñez, Y. Zhang, M. Li, V. Chawla, R. Erni, J. Michler, H. G. Park, and I. Utke, “Morphology and crystallinity control of ultrathin TiO₂ layers deposited on carbon nanotubes by temperature-step atomic layer deposition,” *Nanoscale*, vol. 7, pp. 10622–10633, 2015.
- [39] M. Knez, “Application of ALD to Biomaterials and Biocompatible Coatings,” in *Atomic Layer Deposition of Nanostructured Materials*, N. Pinna and M. Knez, Eds. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [40] E. Aaviksoo, “Meditiinilise titaani funktsionaliseerimine aatomkihtsadestatud kiledega,” University of Tartu, 2015.
- [41] T. Arroval, L. Aarik, R. Rammula, V. Kruusla, and J. Aarik, “Effect of substrate-enhanced and inhibited growth on atomic layer deposition and properties of aluminum–titanium oxide films,” *Thin Solid Films*, vol. 600, pp. 119–125, 2016.
- [42] A. Tamm, A. Peikolainen, J. Kozlova, H. Mändar, A. Aidla, R. Rammula, L. Aarik, K. Roosalu, J. Lu, L. Hultman, M. Koel, K. Kukli, and J. Aarik, “Atomic layer deposition

- of high-k dielectrics on carbon nanoparticles,” *Thin Solid Films*, vol. 538, pp. 16–20, 2013.
- [43] “VSM Sample Mounting Techniques.” Quantum Design, pp. 1–11, 2016.
- [44] “VSM Operation manual.” The Chinese University of Hong Kong.
- [45] M. Mortimer, K. Kasemets, M. Heinlaan, I. Kurvet, and A. Kahru, “High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 22, pp. 1412–1417, 2008.
- [46] E. Vindimian, “REGTOX,” 2009. [Online]. Available: http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html.
- [47] S. Suppi, K. Kasemets, A. Ivask, K. Künis-beres, M. Sihtmäe, I. Kurvet, V. Aruoja, and A. Kahru, “A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 286, pp. 75–84, 2015.
- [48] I. Blinova, J. Niskanen, P. Kajankari, L. Kanarbik, A. Käkinen, H. Tenhu, O.-P. Penttinen, and A. Kahru, “Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 20, pp. 3456–3463, 2013.
- [49] K. S. Rao, T. Balajia, Y. Lingappa, R. M.R.Prakash, and T. L. Prakash, “Chemical synthesis and magnetic properties of HCP and FCC nickel nanoparticles,” *Phase Transitions*, vol. 85, no. 3, pp. 235–243, 2012.
- [50] W. F. Zhang, Y. L. He, M. S. Zhang, Z. Yin, and Q. Chen, “Raman scattering study on anatase TiO₂ nanocrystals,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 33, no. 8, pp. 912–916, 2000.
- [51] N. Dharmaraj, P. Prabu, S. Nagarajan, C. H. Kim, J. H. Park, and H. Y. Kim, “Synthesis of nickel oxide nanoparticles using nickel acetate and poly(vinyl acetate) precursor,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 128, pp. 111–114, 2006.
- [52] M. Tadic, M. Panjan, D. Markovic, B. Stanojevic, D. Jovanovic, I. Milosevic, and V. Spasojevic, “NiO core – shell nanostructure with ferromagnetic-like behavior at room temperature,” *J. Alloys Compd.*, vol. 586, pp. S322–S325, 2014.
- [53] N. Mironova-Ulmane, A. Kuzmin, I. Sildos, and M. Pärs, “Polarisation dependent Raman study of single-crystal nickel oxide,” *Cent. Eur. J. Phys.*, vol. 9, no. 4, pp.

1096–1099, 2011.

- [54] J. Hwang, V. P. Dravid, M. H. Teng, J. J. Host, B. R. Elliott, D. L. Johnson, and T. O. Mason, “Magnetic properties of graphitically encapsulated nickel nanocrystals,” *J. Mater. Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 1076–1082, 1997.
- [55] M. Vaseem, N. Tripathy, G. Khang, and Y. Hahn, “Green chemistry of glucose-capped ferromagnetic hcp-nickel nanoparticles and their reduced toxicity,” *RSC Adv.*, no. 3, pp. 9698–9704, 2013.
- [56] B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss, and Y. Haik, “Magnetic Nanoparticles : Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, pp. 21266–21305, 2013.
- [57] M. Joho, M. Inouhe, M. Tohyama, and T. Murayama, “Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 164–168, 1995.
- [58] A. Kahru and H. Dubourguier, “From ecotoxicology to nanoecotoxicology,” *Toxicology*, vol. 269, no. 2–3, pp. 105–119, 2010.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina Peep Uudeküll

(sünnikuupäev: 1.10.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Nikli mesoosakeste süntees ja karakteriseerimine biomeditsiini rakenduste tarbeks“

mille juhendajad on Tanel Tätte, PhD ja Aile Tamm, PhD

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

2. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 01.06.2016