Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
"СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ КРАТАСЮК В.А.
подпись инициалы, фамилия

" 17 " июня 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – Физика

Синтез и изучение свойств наночастиц биогенного гидроксида железа

Руководитель _____ 20.06.2016г. д.ф.-м.н., г.н.с. Гуревич Ю.Л.
подпись, дата

Выпускник _____ 20.06.2016 г. Марков С.В.
подпись, дата

Красноярск 2016

Содержание

Введение 3

1 Обзор литературы 5

1.1 Ферригидрит, его свойства и получение 5

1.2 Методы дезагрегации осадков и гелей наночастиц 5

1.2 Динамическое рассеяние света 7

1.3 Цитотоксичность наноматериалов 9

1.4 Хемилюминесцентный анализ 12

2 Объекты и методы 15

2.1 Методика получения коллоидных растворов наночастиц 15

2.2 Ультразвуковое диспергирование и гидродинамическая кавитация 16

2.3 Определение дисперсной структуры ферригидрита методом ДРС 17

2.4 Тестирование каталитической и биологической активности 18

3 Результаты 20

3.1 Определение дисперсной структуры золей ферригидрита, влияния лазерного излучения и магнитного поля на дисперсную структуру 20

3.2 Тестирование каталитической активности 27

3.3 Тестирование биологической активности 31

Выводы 33

Список используемой литературы: 34

Введение

Исследование свойств наноразмерных материалов – одно из наиболее активно развиваемых направлений современной науки. На протяжении последних 15 – 20 лет все большее внимание исследователей в различных областях физики, химии, биологии и медицины направленно на магнитные нанокристаллы и наноматериалы на их основе. Признано, что наноразмерные материалы представляют интерес для фундаментальных исследований и имеют большой потенциал использования в различных технологиях.

Физико-химические методы синтеза и исследования наночастиц еще недостаточно развиты, поэтому нередко затруднительно получить достаточно полную характеристику полученных объектов и их свойств. Отмечается, что свойства наночастиц очень чувствительны к нестабильности параметров технологии получения. В связи с этим представляют интерес новые методы синтеза наночастиц с магнитными свойствами. К числу новых относятся биотехнологические методы получения наночастиц. При всех известных способах получения исходно они находятся в агрегированном состоянии. Для получения их в виде изолированных наночастиц используются различные носители или стабилизаторы и методы дезагрегирования. Интенсивность диспергирования и кавитации наночастиц должна рассматриваться как один из важнейших параметров синтеза наночастиц и получения на их основе функциональных материалов.

Наноразмерные магнитные частицы имеют множество применений в различных областях физики, химической технологии, экологии и др. Наночастицы оксида железа имеют большой потенциал в биомедицине. Например, для разделения клеток, в магнитно-резонансной томографии, в терапии рака [1], а также в доставке лекарственных средств в естественных условиях. Тем не менее, железо известно как один из важных активных

переходных металлов, которое участвует в реакции Фентона с образованием свободных радикалов (OH • и O_2 • -)[2].

Ферригидрит отличается минимальными размерами в сравнении с другими гидроксидами и оксидами железа и в силу этого обладает повышенной удельной площадью поверхности и реакционной способностью.

Широко распространеный в природе ферригидрит представляет собой гидроксид железа. Он принимает активное участие во многих природных процессах (в почвах, различных осадках и др.). В тканях теплокровных животных (в том числе человека), растениях и бактериях ферригидрит входит в состав ферритина. Ферритин представляет собой сферическую молекулу с диаметром ~ 12 нм, ядро которой представлено гидратированным железом ($5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$). Ядро диаметром 7,5 нм окружено белковыми субъединицами. Предполагается, что ферритин играет роль депо для ионов железа, которые могут быть токсичны для клеток. Показано, что в начальной стадии формирования в ядрах ферритина образуется не только ферригидрит. Обнаружено изменение фазового состава гидроксида железа в ядре ферритина в зависимости от размеров наночастиц.

Цель данной работы – освоение технологии синтеза и исследование дисперсных характеристик, биологической и каталитической активности биогенного ферригидрита. Для достижения данной цели решались следующие задачи:

1. Освоить методику получения коллоидных растворов гидроксида железа с помощью бактерий.
2. Определить размер наночастиц и дисперсную структуру коллоидных растворов биогенного ферригидрита.
3. Оценить влияние магнитного поля и излучения лазера на дисперсную структуру золей биогенного ферригидрита.
4. Получить оценки химической и биологической активности наночастиц биогенного ферригидрита на примере разложения перекиси водорода и клетках экспериментальных животных (крыс).

1 Обзор литературы

1.1 Ферригидрит, его свойства и получение

Ферригидрит - это наноразмерный кристалл с плохо упорядоченной структурой. Он характеризуется высокими сорбционными, каталитическими и магнитными свойствами, перспективными для биомедицинских и других приложений. Для получения ферригидрита часто используют методы основанные на гидролизе солей трехвалентного железа (хлоридов, нитратов или сульфатов). Недавние исследования показали, что изменения параметров процесса синтеза ферригидрита (pH и концентрация раствора предшественников, порядок смешивания реагентов, интенсивность перемешивания, способ сушки и др.) оказывают существенное влияние на свойства частиц [3]. В связи с этим, несмотря на широко известные способы синтеза гидроксидов и оксидов железа, совершенствованию и разработке новых методов получения их, том числе ферригидрита, уделяется повышенное внимание.

1.2 Методы дезагрегации осадков и гелей наночастиц

При получении наноразмерных гидроксидов и оксидов железа, алюминия, кобальта и других элементов используются различные методы дезагрегации осадков и гелей наночастиц, чтобы выделить их в виде монодисперсных порошков или коллоидных систем. Исследование влияния интенсивности диспергирования порошков гематита на магнитные свойства агрегатов наночастиц проводились группой Morup [4] на примере гематита и его композитов с оксидом никеля. Основным показателем влияния дезагрегации были параметры спектра Мессбауэра. Наблюдаемые изменения параметров спектра обусловлены изменением межчастичных

взаимодействий. В связи с этим представляется интересным проанализировать дисперсную структуру системы наночастиц. Для данной работы исходной информацией служат результаты исследований и выводы авторов ряда статей, которые показали необходимость контролировать размеры наночастиц и их агрегатов [5,6].

Для диспергирования наночастиц широко используется ультразвуковая обработка исходных материалов. Основные эффекты ультразвуковой обработки проявляются на двух уровнях - дезагрегации кластеров наночастиц и сонохимических реакций [7]. При относительно малых энергиях воздействия происходит диспергирование агрегатов наночастиц. Именно этот эффект озвучивания используется в работах [8-10].

Моделирование поведения пузырьков в условиях акустической кавитации показывает, что в конце сжатия их радиус находится в пределах 10^{-7} - 10^{-8} м при начальном радиусе $(1\text{-}10)\cdot 10^{-6}$ м. Согласно теоретическим и экспериментальным оценкам, при коллапсе внутри кавитационных пузырьков переходная температура и давление достигают 5000 К и 500 атмосфер. Несмотря на очень короткое время жизни кавитационных пузырьков, которое составляет порядка микро и наносекунд высокоэнергетическое воздействие приводит к термическому и химическому превращению вещества. Этот эффект лежит в основе сонохимических методов синтеза наночастиц [7,11]. Таким образом, интенсивность диспергирования может приводить к принципиально различным эффектам – диспергирование и инициация сонохимических процессов на поверхности частиц и др.

Таким образом, интенсивность диспергирования и кавитации наночастиц должна рассматриваться как один из важнейших параметров синтеза наночастиц и получения на их основе функциональных материалов. В настоящей работе исследуется влияние интенсивности диспергирования и

кавитации на магнитные и сорбционные свойства биогенного ферригидрита, выделенного из культур бактерий.

Особенность данной работы состоит, во-первых, в том, что на стадии выделения наночастиц в коллоидный раствор в дополнение к ультразвуковой обработке использовали высокоэнергетическое гидродинамическое диспергирование и кавитацию. Во-вторых, ультразвуковую и гидродинамическую обработку использовали не на стадии синтеза, т.е. при формировании центров нуклеации и роста наночастиц гидроксида железа, а на стадии выделения (уже) синтезированных наночастиц из культуральной жидкости в коллоидный раствор.

1.2 Динамическое рассеяние света

Методы измерения размеров наночастиц (наиболее часто применяемые) – просвечивающая электронная и сканирующая микроскопии (ЭМ и СЭМ), малоугловое рентгеновское рассеяние, сканирующая туннельная и атомно-силовая микроскопии (СТМ и АСМ), седиментационный анализ, нефелометрия, турбодиметрия, ультрамикроскопия, ультра-центрифугирование, метод статического рассеяния света с использованием теории Ми, метод динамического рассеяния света, называемый также методом фотонно-корреляционной спектроскопии, и некоторые другие методы. Наиболее надежным методом определения размера наночастиц является электронная просвечивающая микроскопия, однако, высокая стоимость установки, необходимость подготовки проб и большая продолжительность измерения осложняют использование этого метода.

Метод динамического рассеяния света имеет несколько преимуществ: длительность эксперимента невелика, требуются скромные затраты на проведение измерений. Приборы для определения характеристик дисперсий

методом ДРС широко используются для анализа объектов различной природы, в том числе коллоидных растворов магнитных частиц, которые включают как изолированные наночастицы, так и их агрегаты [12]. Интерпретация первичных данных, полученных тем или иным методом измерений, нередко требует специальных исследований.

Метод динамического рассеяния света – один из наиболее популярных методов для определения размеров наночастиц. Принцип измерения размеров частиц основан на измерении и анализе флуктуаций в разные моменты времени интенсивности рассеянного света в объеме, содержащем частицы в растворителе. Благодаря случайному движению частиц, вызванному некомпенсированными толчками молекул растворителя (Броуновское движение), интенсивность света осциллирует относительно своего среднего значения. Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц приводит к микроскопическим флуктуациям их локальной концентрации, что, в свою очередь, вызывает локальные флуктуации показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча, представляющего собой плоскую, монохроматическую, линейно поляризованную волну, через такую среду, часть света будет рассеяна на этих локальных неоднородностях показателя преломления. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц. Метод ДРС позволяет измерить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости. Поскольку коэффициент диффузии дисперсных частиц однозначно связан с размером частиц, ДРС, по существу, является методом измерения размеров таких нанометровых частиц. Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится во временной корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Предполагается, что единственной причиной движения частиц является диффузия, т.е. эффекты седиментации, температурной конвекции и движения жидкости должны быть исключены.

Это условие задает ограничение сверху по размерам частиц, которое обычно составляет до нескольких микрон. Ограничение по размерам снизу создает временная шкала измерительного прибора, что позволяет анализировать обычно частицы с размерами начиная от нескольких нанометров.

В типичной установке для проведения эксперимента ДРС зафиксированный образец освещается источником когерентного монохроматического света. Обычно используются лазеры с вертикальной поляризацией. Рассеянный свет от частиц собирается детектором под углом рассеивающего луча θ. Затем рассеянный луч выводится на Y-коннектор и направляется на датчик.

Считается, что при измерениях излучение лазера не оказывает влияния на объект. Однако, агрегаты магнитных наночастиц, образованных при участии сил магнитного взаимодействия, могут быть чувствительными к воздействию лазера (давлению излучения или другими эффектами высокоэнергетического возбуждения) [13,14]. Задача настоящей работы состояла в верификации этого предположения при определении дисперсной структуры золей гидроксида железа - ферригидрита.

1.3 Цитотоксичность наноматериалов

Установлено, что различные биологические механизмы, включая эндоцитоз, клеточное поглощение и эффективность обработки частиц в эндоцитотическом пути зависят от размера материала. Большое количество исследователей оценивали цитотоксичность наночастиц *in vitro* разного размера с использованием различных типов клеток, условий культуры, и времен экспозиции. Однако, оценка *in vivo* затруднена из-за более сложного характера биологических систем и требует более полной информации о частицах. В общем, токсичность наночастиц, зависимая от их размера, может быть связана с их способностью проникать в биологические системы, а затем

модифицировать структуру различных макромолекул, тем самым препятствуя выполнению биологических функций. Одним из основных механизмов токсичности *in vivo* является генерация окислительных реакций по образованию свободных радикалов, в которых размер наночастиц играет решающую роль. Как подчеркивают многие авторы, что чем меньше размер наночастиц, тем больше АФК они образуют. Эти свободные радикалы, как известно, представляют опасность для биологических систем, главным образом, за счет повреждения ДНК, путем окисления липидов, а также путем последующих воспалительных ответов [15].

Размер наночастиц также определяет их фармакологические свойства. Было замечено, что наночастицы, размером меньше, чем 50 нм, (введенные путем внутривенной инъекции) быстро проникали практически во все ближайшие ткани и производили потенциально токсический эффект в различных тканях. С другой стороны, наночастицы, размером больше, чем 50 нм (в частности, 100-200 нм, положительно заряженные частицы) легко захватываются ретикулоэндотелиальной системой (РЭС), которая задерживает их поступление к другим тканям. Хотя зазор ретикулоэндотелиальной системы защищает другие ткани, это делает органы РЭС, такие как печень и селезенка, основными мишенями окислительного стресса [15].

Некоторые токсикологические исследования показывают, что мелкие наночастицы размером <100 нм оказывают более сильное отрицательное воздействие на дыхательные пути человека по сравнению с более крупными частицами этого же материала. Частицы различных размеров, которые попадают через дыхательные пути, накапливаются в дыхательных путях человека. Было замечено, что частицы с диаметром <100 нм аккумулируют все ткани, в то время как частицы <10 нм откладываются в трахеобронхиальной области, а частицы от 10 до 20 нм имеют отложения в альвеолярной области. В результате, транслокация наночастиц зависит от

размера. Креулин с соавторами [16] показали, что инъекция Ir192 в виде наночастиц (80 нм) приводила к их накоплению в печени крыс в количестве 0,1% от общего количества. В то время как частицы размером 15 нм имеют повышенное накопление в количестве - 0,3-0,5%. Замечено, что задержка более мелких частиц в дыхательных путях на длительное время приводит к увеличению их транслокации в легочную интерстициальную ткань, и ведет к нарушению функции альвеолярного макрофага. Перераспределение наночастиц от их участка первичного накопления или депонирование в почечных тканях может также привести к токсичности. Что еще более важно, более крупные частицы менее токсичны, чем мелкие.

Отметим, что в работе [17] эндоцитоз сферических наночастиц происходил быстрее по сравнению с наночастицами в виде стержней или волокон. Сферические наночастицы были менее токсичными. Несферические наноматериалы способны проходить через капилляры, вызывая другие нежелательные биологические последствия.

Кроме того, было замечено, что поверхностный заряд наночастиц изменяет целостность гематоэнцефалического барьера и мембранную проницаемость. В связи с этим было установлено, что отрицательно заряженные наночастицы размером от 50 до 500 нм пронизывают кожу после дермального введения, в то время как таких эффектов не было обнаружено для положительно заряженных и нейтральных частиц, независимо от их размеров. В основном, наночастицы размером 50 нм пронизывают кожу из-за небольшого размера и большой удельной площади поверхности, в то время как 500 нм частицы проникают в кожу, так как большое количество и плотность заряженных групп приводит к высокой концентрации заряда, который позволяет преодолеть барьер кожи.

Так же на токсичность наночастиц влияют поверхностные свойства частиц, так как они играют решающую роль во взаимодействии их с клетками и другими биологическими структурами. Покрытие поверхности

может влиять на цитотоксические свойства наночастиц путем изменения их физико-химических свойств, таких как: магнитные, электрические и оптические свойства и химическая реакционная способность; и может изменить фармакинетику, распределение, накопление и токсичность наночастиц. Известно, что присутствие кислорода, озона, радикалов кислорода и переходных металлов на поверхности наночастиц приводит к образованию активных форм кислорода и индукции воспаления этими системами; это, безусловно, влияет на связанную с ними токсичность. Фубини и др. [18] показали, что удельная цитотоксичность кремнезема сильно связана с появлением поверхностных радикалов и активных форм кислорода на его поверхности.

С другой стороны, поверхностное покрытие может также быть использовано, чтобы уменьшить токсичность наночастиц. Поверхностное покрытие может смягчить или устранить неблагоприятные эффекты наночастиц. В частности, надлежащее покрытие поверхности может привести к стабилизации наночастиц, а также предотвратить выброс токсичных ионов из наноматериалов [15].

Перед началом любых нанотоксических исследований, крайне важно знать состояние наночастиц, которые будут использованы в экспериментах, и, в частности, их размер и распределение по размерам в соответствующей испытательной среде.

1.4 Хемилюминесцентный анализ

Во многих химических реакциях выделяется свободная энергия, большей частью в виде тепла. Известны условия, когда часть энергии выделяется в виде света. Это явление называется хемилюминеценцией. Хемилюминесценция веществ, применяющихся как индикаторы, наблюдалась впервые в 1928 г. В последнее время наиболее часто

применяется люминол (гидразид аминофталевой кислоты). В реакции этого вещества с перекисью водорода в щелочной среде в присутствии некоторых катализаторов, например солей меди и железа, наблюдается свечение.

Люминол может окисляться целым рядом одно- и двухэлектронных окислителей, среди которых присутствуют комплексы Fe(II), феноксильные радикалы, хлорноватистая кислота и некоторые другие соединения. Перекись водорода вступает в реакцию с окисленным люминолом и образует эндоперекись люминола, которая в конечном итоге превращается в 3-аминофталат, находящийся в возбужденном состоянии, а он, в свою очередь, может испускать синий свет с максимумом длины волны при 425 нм. Спектральная область люминесценции лежит в пределах 300-600 нм.

Известно, что наночастицы различных металлов принимают участие в реакции разложения перекиси водорода и являются катализатором данной реакции. Разложение пероксида водорода, катализируемое железом и медью, приводит к образованию химически активных окислителей, способных окислять различные органические соединения.

Не только размер, но и форма материалов оказывает непосредственное влияние на их свойства, в том числе каталитические. Форма изменяет открытые кристаллические грани и, следовательно, расположение атомов каждой из граней, которые будут иметь большое влияние на различные свойства. Кроме того, для разработки экономичных и устойчивых наноразмерных катализаторов является ключевым использование неблагородных металлов на основе наноматериалов в качестве катализатора, таких как оксиды железа. Магнитные свойства оксида железа делает его потенциальным кандидатом в приложениях, где обязательно эффективное разделение материала. Кроме того, активация оксида железа путем изменения формы частиц, чтобы выставить свой наиболее активный каталитический сайт, может дать дешевые и эффективные катализаторы для

различных реакций. Наряду с изменением формы, зависимые свойства фазы также могут быть доработаны путем изменения параметров синтеза [19].

Разложение пероксида водорода использовали в качестве модельной реакции для исследования каталитической активности наночастиц гидроксида железа.

2 Объекты и методы

2.1 Методика получения коллоидных растворов наночастиц

Объектом исследований в данной работе служили коллоидные растворы биогенного ферригидрита [20]. Известно, что диаметр наночастиц ферригидрита (2-х и 6-ти линейчатого) лежит в пределах 1-10 нм [21,22]. По данным малоуглового рентгеновского рассеяния в предположении сферической формы наночастицы биогенного ферригидрита имеют такие же размеры [20].

Наночастицы биогенного гидроксида железа (ферригидрита) получали в культуре аэробных гетеротрофных бактерий Delftia tsuruhatensis. Бактерии культивировали в периодическом режиме на минеральной среде, содержащей азот, фосфор, калий, серу и магний. Источником энергии и углерода служил цитрат железа. Ионы 3-х валентного железа, высвобождающиеся в результате утилизации бактериями органического углерода, гидролитически осаждались (преципитировали) в культуральной жидкости. Механизм образования биогенного ферригидрита подобен физико-химическому осаждению ионов трехвалентного железа в растворах. Культивирование бактерий производилось в биореакторе BioFlo®/CelliGen® 115. Продолжительность процесса культивирования бактерий составляла 3-4 суток. Накопление наночастиц гидроксида железа завершалось в стационарной фазе культуры бактерий. Далее наночастицы отмывали от бактерий и внеклеточных продуктов метаболизма в бидистиллированной воде путем обработки ацетоном и щелочью с выделением преципитатов центрифугированием при 4000 g (рефрижераторная центрифуга Eppendorf 5810R). На стадии очистки растворы, содержащие преципитаты наночастиц, обрабатывали ультразвуком в течение 4 мин. (22 кГц, 8 Вт/см^2, генератор Волна-М, Россия). На завершающей стадии очистки преципитат обрабатывали ультразвуком и

затем центрифугировали при 18500 g в течение 20 мин. Конечный продукт представляет собой коллоидный раствор, в котором около 90% наночастиц имеют радиус 1-5 нм [20]. Концентрация ферригидрита в растворе составляла 1 г/л. По данным мессбауэровской спектроскопии железо находится в 3-валентном состоянии, а по рентгенофазовому анализу в форме ферригидрита.

2.2 Ультразвуковое диспергирование и гидродинамическая кавитация

В настоящей работе золи биогенного ферригидрита подвергали дополнительно гидродинамическому диспергированию в миксере роторного типа [23]. Энергия воздействия в этом случае создавала эффект кавитации. В качестве рабочего органа использовали двухлопастную крыльчатку с клиновидным профилем и углом раскрытия клина 60º. Рабочее число оборотов ротора задавали равным 10000 об/мин., что обеспечивало получение чисел кавитации до $\chi = 0{,}05$. Объем растворов составлял 100 мл. Обработку вели в течение 240 и 600 секунд.

По расчетам [24] при озвучивании и схлопывании пузырьков с размерами 5 мкм максимальные значения температуры достигает 4713К, давления - 696.7 МПа и V_{turb} - 0.36 m/s. Для пузырьков с размерами 100 мкм эти оценки значительно меньше и имеют значения 409К, 288 кРа и 7.95 м/сек. При размере пузырьков свыше 25 мкм в растворе, отсутствуют перекись водорода, водород и свободные радикалы, появление которых характерно для кавитации. По экспериментальным оценкам при частоте ультразвука 20 кГц кавитационные пузырьки имеют размер порядка 170 мкм [25]. Отсюда следует, что в нашем эксперименте ультразвуковая обработка (22 кГц) золей создает, главным образом, режим дезагрегации кластеров наночастиц.

2.3 Определение дисперсной структуры ферригидрита методом ДРС

Дисперсную структуру коллоидной системы биогенного ферригидрита определяли на 4-х образцах. Исходный образец (№1), полученный при выделении из культуры с использованием только ультразвукового генератора, подвергали гидродинамическому диспергированию в течение 4 мин (образец №2). Мощность гидродинамического диспергатора многократно выше (частота вращения лопастной мешалки 10000 об/мин, кавитационное число 0,05) [23]. Образцы №№3 и 4 получали путем экспозиции первых двух в магнитном поле (2000 Э) в течение 15 мин.

Измерение распределения частиц по размерам проводили методом динамического рассеяния света (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, λ = 632.5 нм, α – 173°). Температура коллоидных растворов в измерительных кюветах поддерживалась равной 20 °С. При измерении распределений частиц по программе прибора предусматривается несколько циклов измерений с интервалом 2 мин на одном образце. В данной работе на каждом образце проводили 3 измерения.

В качестве форм-фактора наноразмерных частиц принята сфера, поэтому размер наночастицы характеризуется гидродинамическим диаметром (радиусом). Оценки, полученные с использованием метода ДРС, несколько превышают данные, полученные на просвечивающем электронном микроскопе, т.к. учитывается сольватная оболочка или адсорбированные на поверхности частиц соединения. Однако, этим методом анализируется дисперсная структура больших выборок, что позволяет получать более полную информацию о дисперсной структуре коллоидных систем.

С одной стороны, измерительный диапазон приборов на основе динамического рассеяния света широк и составляет около 0,5 – 6000 нм. С другой стороны, наибольший вклад в светорассеяние нелинейно зависит от

размеров частиц. Наибольшее светорассеяние дают частицы больших размеров. Вклад частиц размеров в сотни и тысячи нанометров больше на 6 порядков, чем частиц с размерами порядка нанометров или первых десятков нанометров. Относительно частиц с размерами порядка десятков нанометров их вклад выше на 3 порядка. В связи с этим динамический радиус частиц вычисляется по программе относительно интенсивности светорассеяния, объема или численности наночастиц в коллоидном растворе. Поскольку в данной работе исследовали золи ферригидрита, который имеет размеры наночастиц менее 10 нм, то дисперсную структуру распределения анализировали, используя все три шкалы оценки их гидродинамических радиусов.

2.4 Тестирование каталитической и биологической активности

Биологическая и каталитическая активности определялись хемилюминесцентным методом с помощью аппаратно–программного комплекса “Хемилюминометр CL – 3604 – ПЭВМ”. Биологическую активность определяли на клетках печени крыс. Пробы представляли собой гомогенат из клеток печени крыс, взятых из трех областей печени: центр печени, периферия и околососудистая ткань. Для этого в кювету помещали: 1 млн. клеток печени (подсчет количества клеток производился в камере Горяева); 200 мкл $2{,}2 \times 10^{-4}$М люминола в растворе Хенкса, или 10^{-4}М люцигенина; 50 мкл суспензии частиц монодисперсного латекса концентрацией 5×10^{8} частиц/мл для активирования фагоцитоза *in vitro*; 200 мкл наночастиц, разведенных лимонной кислотой в качестве стабилизатора в соотношении 1:100. Регистрацию генерации АФК при антигенной активации *in vitro* и без нее проводили в течение 90 мин. при температуре +37ºС. Каталитическую активность определяли на модельной реакции разложения перекиси водорода. Для этого в кювету помещали: 200 мкл наночастиц

разных концентраций; 200 мкл $2,2x10^{-4}$М люминола в растворе Хенкса; 200 мкл 3%-ной перекиси водорода. Кинетику образования АФК регистрировали в течение 60 мин.

3 Результаты

3.1 Определение дисперсной структуры золей ферригидрита, влияния лазерного излучения и магнитного поля на дисперсную структуру

Результаты определения дисперсной структуры коллоидного раствора биогенного ферригидрита, полученного при ультразвуковом диспергировании (образец 1), представлены на рисунке 1.

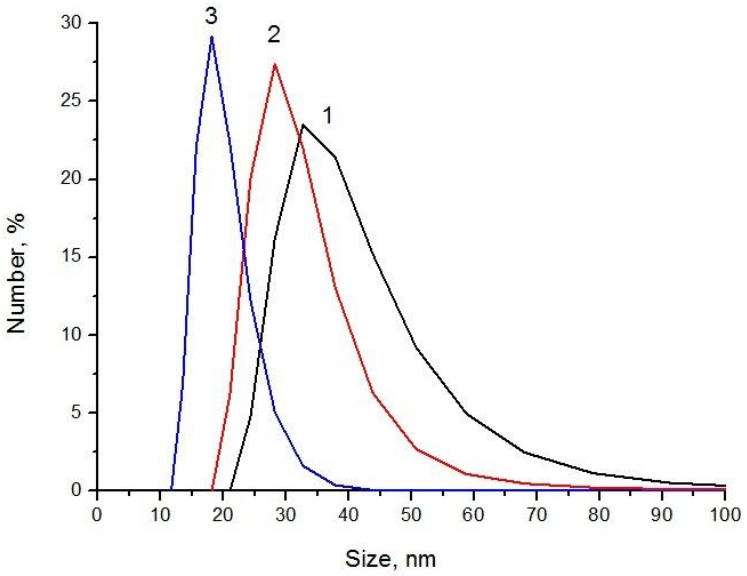

Рисунок 1 - Дисперсная структура коллоидного раствора биогенного ферригидрита, полученного при ультразвуковом диспергировании (1, 2 и 3 – номер распределения в последовательной серии измерений).

В качестве форм-фактора принята сфера. На рисунке 1 оценки модальных значений гидродинамических диаметров наночастиц, взвешенных на общее количество частиц, уменьшаются в порядке последовательности измерений 1 – 2 – 3 и равны 32.67 нм, 28.21 нм и 18.16 нм соответственно. Кривые распределения наночастиц по размеру, соответствующие измерениям 1, 2 и 3 на образце 1, имеют также существенный сдвиг относительно друг друга в сторону меньших значений гидродинамических диаметров. В

исходном распределении по размерам частицы с диаметром менее 20 нм не регистрируются. Поскольку диаметр наночастиц ферригидрита меньше 10 нм (2-линейчатого - 2-5 нм, а 6-ти линейчатого – до 10 нм) [7, 9], становится очевидным, что исходная коллоидная система (рисунок 1, кривая 1), полученная путем ультразвукового диспергирования осадков гидроксидов железа, представлена наноразмерными агрегатами наночастиц. При последующих измерениях в результате высокоэнергетического воздействия лазера они распадаются на более мелкие агрегаты (рисунок 1, кривые 2 и 3). Этот результат можно пояснить, используя энергетическую схему нашей системы, согласно которой каждому устойчивому образованию определенного размера соответствует относительный минимум энергии. Поскольку в системе присутствуют объекты разных размеров, то ее схема имеет вид последовательности энергетических минимумов, разделенных потенциальными барьерами. Лазерное облучение дополнительно стимулирует переходы между минимумами энергии, что проявляется в изменении распределения конгломератов наночастиц по размерам.

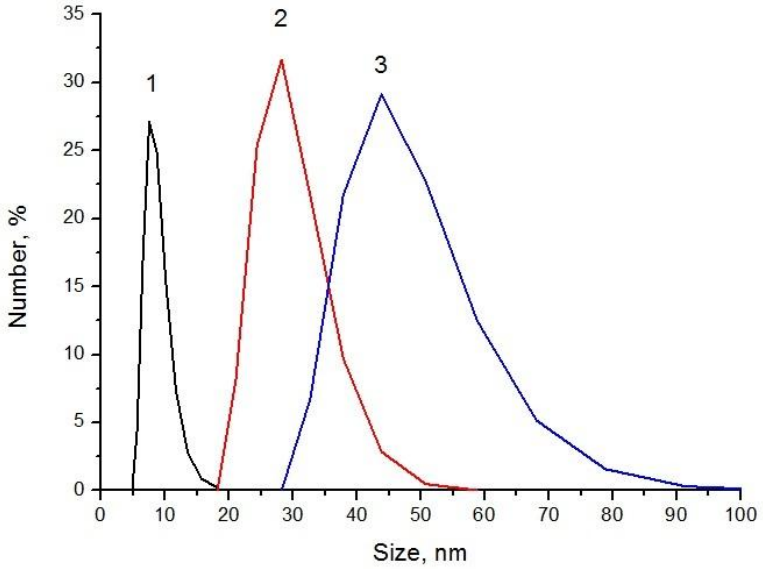

Рисунок 2 - Дисперсная структура коллоидного раствора биогенного ферригидрита, полученного с использованием гидродинамической кавитации (1, 2 и 3 – номер распределения в последовательной серии измерений).

Влияние на дисперсную структуру коллоидной системы биогенного ферригидрита гидродинамического диспергирования и излучения лазера демонстрирует рисунок 2. Из сопоставления рисунков 1 и 2 видно, что гидродинамическое диспергирование, более мощное, чем ультразвуковое, привело к уменьшению среднего диаметра наноразмерных частиц в 4 – 4,5 раз (модальные значения 32.67 нм в образце 1 и 7,53 нм в образце 2 в первом цикле измерения). При этом в образце 2 значительная часть (73,2 %) наночастиц имеет размеры менее 10 нм. Размер частиц в этом диапазоне соответствует значениям диаметров наночастиц ферригидрита, которые определялись с помощью просвечивающей электронной микроскопии [9,10]. По данным малоуглового рассеяния света в получаемых нами золях доля наночастиц с диаметром от 2 до 10 нм составляет около 90% [8]. Отсюда следует, что регистрируемые методом ДРС наночастицы фракции с размерами менее 10 нм находятся в изолированных состояниях либо агрегатах с минимальным числом наночастиц.

В первом цикле измерений основное различие между образцами 1 и 2 связано только со способом диспергирования. В последующих двух циклах измерений (и воздействия лазера) размеры частиц (агрегатов) значительно возрастают. Доминирующими по удельному содержанию становятся частицы с модальными значениями 28.21 и 43.82 нм (31,6% и 29%, соответственно), причем частицы диаметром менее 10 нм (не агрегированные) не регистрируются (рисунок 2, кривые 2 и 3). То есть, происходит рост размеров агрегатов и их доли. Естественно предположить, что воздействие лазера на частицы стимулирует этот процесс и имеет место аккумуляция воздействия при увеличении экспозиции лазерного излучения. В сравнении с данными полученными для образца 1 порядок изменений полидисперсной структуры обратный – в последовательной серии измерений размер частиц возрастает (рисунок 2). Порядок изменения размеров частиц в золях в серии

последовательных измерений зависит от исходного распределения частиц по размерам.

Один из механизмов увеличения размеров агрегатов может быть обусловлен процессами самоорганизации ферромагнитных наночастиц или их объединений малых размеров [12]. Как показано в этой работе, при выстраивании ферромагнитных наночастиц в цепочки происходит уменьшение энергии размагничивающих полей и полей рассеяния, чем обеспечивается выигрыш в энергии для таких объектов.

Очевидно, крупные частицы с размерами в сотни и тысячи нанометров в анализируемых нами золях не являются примесью посторонних частиц или артефактом. Известно, что коллоидные системы метастабильны, поэтому для рассматриваемых образцов ферригидрита обнаружение и нарастание доли частиц крупных размеров свидетельствует о потере устойчивости золей слабомагнитных наночастиц. Анализ дисперсной структуры золей по распределениям частиц относительно интенсивности рассеяния свет, объема или численности, а также чувствительности к сериям измерений дает более полную картину их состояний.

Предполагая, что наблюдаемая чувствительность золей ферригидрита к воздействию лазера связана с магнитными свойствами наночастиц и их агрегатов, проведен эксперимент по оценке влияния магнитного поля на дисперсную структуру образцов 1 и 2. Результаты определения распределения наночастиц в этих образцах после экспозиции в магнитном поле свидетельствуют о магнитной природе наблюдаемых изменений в структуре дисперсий (рисунок 3).

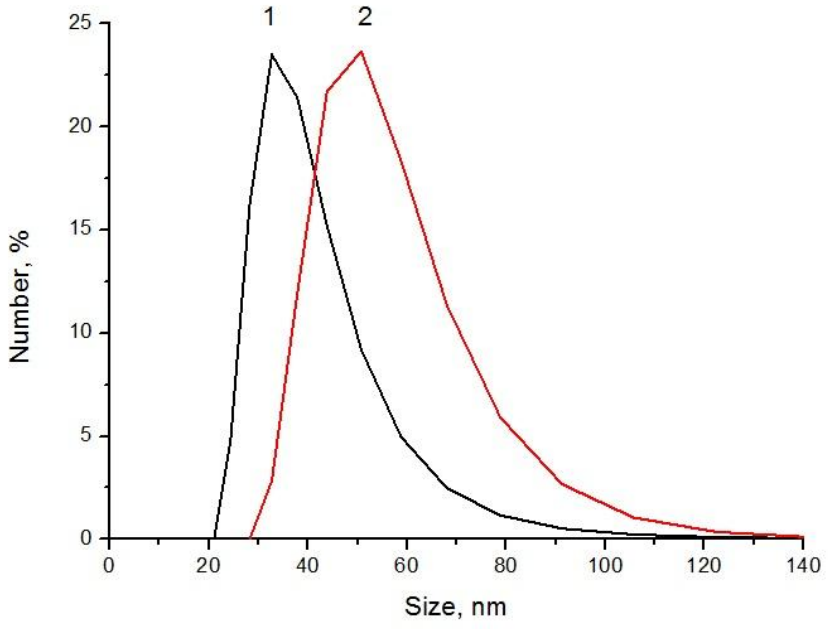

Рисунок 3 - Дисперсные структуры образцов золей, полученных с использованием ультразвукового диспергирования и внешнего магнитного поля (1 – образец 1, 2 – образец 3 (после экспозиции образца 1 в магнитном поле)).

Как видно на рисунке 3 в ответ на экспозицию в магнитном поле распределение частиц золя по размеру сдвигается в сторону больших размеров. Этот сдвиг – ожидаемое агрегирование и образование цепочек наночастиц во внешнем магнитном поле, которое неоднократно наблюдалось в ряде работ [26].

Эффект от внешнего магнитного поля, наложенного на золь полученный в результате гидродинамического диспергирования (образец 4), оказался небольшим. Наблюдался небольшой сдвиг распределения в сторону меньших размеров частиц, т.е. происходил распад агрегатов, а не агрегирование, как в образце 3 (рисунок 4, кривая 1). На рисунке 4 представлены распределения 1-1 и 1, полученные при первом измерении, т.е. при минимальном влиянии лазерного излучения. Отличие образцов 2 и 4 в том, что здесь доминируют свободные наночастицы и агрегаты минимальных размеров (от 2 до нескольких наночастиц). В этом случае внешнее поле должно было бы также способствовать агрегированию и образованию

цепочек наночастиц. Однако, магнитный момент, напряженность внешнего магнитного поля и экспозиция в поле, вероятно, оказались недостаточны, чтобы вызвать агрегирование наночастиц. При последующем измерении (2 – не показано) распределение сдвинулось влево (мода 7.53 нм сместилась к 4.84 нм), а в результате воздействия лазера при измерении 3 произошел скачок в распределении, появилась новая доминирующая фракция с диаметром частиц 58.77 нм (рисунок 4, кривая 3).

Если рассмотреть изменения распределения по размерам частиц, взвешенным на интенсивность светорассеяния, то можно видеть значительные сдвиги в соотношении разных разрядов. А именно, происходит сдвиг в сторону меньших размеров за счет перераспределения частиц по фракциям. Распад крупных агрегатов сопровождается увеличением доли частиц меньших размеров.

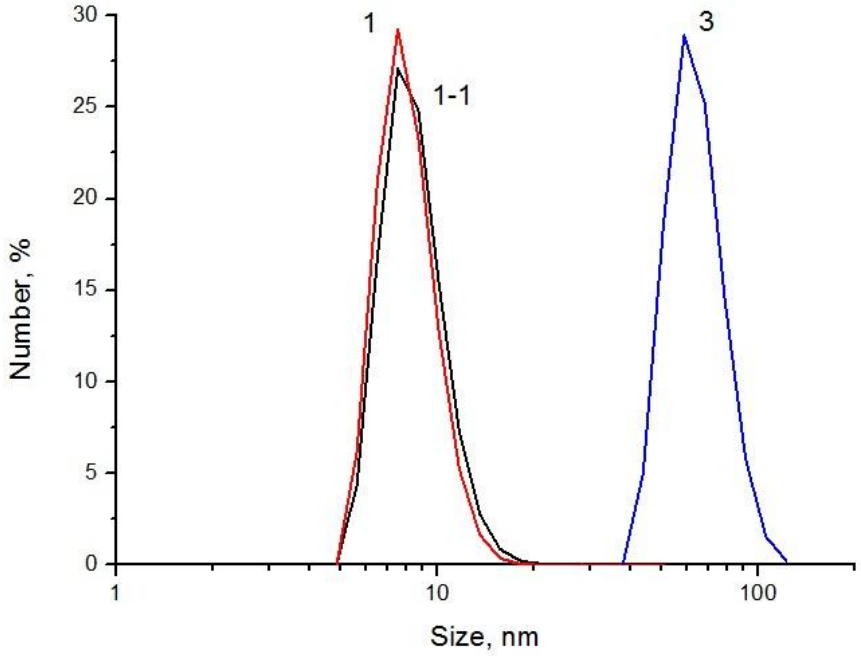

Рисунок 4 – Дисперсные структуры, полученные с помощью гидродинамического диспергирования и внешнего магнитного поля, (1-1 – образец 2, 1 и 3 – образец 2 после экспозиции в магнитном поле (образец 4)).

В результате 3-го измерения (воздействия лазера) этот сдвиг приводит к существенному возрастанию частиц диаметром 58.77 нм. На рисунке 4

(кривая 3) видно, что при определении диаметров частиц, взвешенных на их объем в коллоидной системе, при 3-ем цикле измерения доля частиц размером порядка 8 нм становится ниже порога определения. Это произошло в результате большого увеличения доли частиц диаметром 58.77 нм.

Отсюда следует, что для построения полной картины изменений в дисперсной структуре золей, нужно рассматривать распределения наночастиц по размерам, взвешенным на интенсивность светорассеяния, общий объем и численность наночастиц.

Чем объясняется неоднозначность ответа дисперсной системы на воздействие лазера - распад агрегатов наночастиц либо их агрегирование? Вероятно, в исходных золях в агрегатах отсутствует упорядоченность взаимного расположения наночастиц, т.к. они формировались при отсутствии каких-либо однонаправленных сил (силовых линий внешнего магнитного поля или других). Агрегат с хаотичным взаимным расположением частиц устойчив благодаря магнитным силам взаимодействия. Под давлением лазерного излучения частицы агрегата могут смещаться. При этом нарушается их устойчивое взаимное положение, происходит распад крупного агрегата и увеличение численности более мелких. Нарушение взаимного положения частиц в агрегатах происходит также, когда они поворачиваются в направлении силовых линий наложенного внешнего магнитного поля.

Агрегаты с упорядоченным взаимным положением наночастиц, которое образуется при наложении внешнего магнитного поля, реагируют на лазерное воздействие иначе. Луч лазера вызывает направленное смещение наночастиц и агрегатов. Для агрегатов с упорядоченным взаимным расположением наночастиц это смещение может не изменять их взаимное расположение (особенно для агрегатов, сложенных из небольшого числа наночастиц). С другой стороны, смещение последних способствует их агрегированию.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о чувствительности дисперсий слабомагнитных наночастиц к лазерному излучению прибора. Природа чувствительности обусловлена их магнитными свойствами. Интерпретация первичных данных, полученных методом динамического рассеяния света при анализе золей магнитных наночастиц, требует специального подхода, учитывающего межчастичные взаимодействия и воздействие лазерного луча.

3.2 Тестирование каталитической активности

Кинетика образования АФК при взаимодействии ферригидрита с перекисью водорода показана на рисунке 5. Как видно из рисунка 5, внесение концентрированного образца наночастиц (1 г/л) дает более высокую интенсивность свечения, чем внесение разбавленных растворов наночастиц. Характер поведения разбавленных растворов объясняется следующим образом: в разведенных растворах изначально концентрация наночастиц ниже, чем в концентрированном. При разведении раствора наночастиц дистиллированной водой частицы начинают агрегировать, следовательно, уменьшается общая площадь реакционной поверхности частиц и реакция затухает. Однако, характер кинетики образования АФК для концентрированного раствора (рисунок 5, кривая 1) вызывает вопрос. На поверхности наночастиц биогенного ферригидрита органический углерод находится в трех функциональных группах – углеводородной (C-H), гидроксильной (C-OH) и карбонильной (C=O). Было выдвинуто предположение, что в концентрированном растворе изначально происходит рост агрегатов наночастиц (в виду большой концентрации частиц), но при взаимодействии с перексидом водорода, органический углерод на поверхности агрегатов окисляется активными формами кислорода и агрегат распадается на более мелкие агрегаты и/или на одиночные наночастицы. С

ростом числа одиночных частиц и агрегатов с меньшим количеством частиц увеличивается суммарная площадь реакционной поверхности частиц и реакция усиливается.

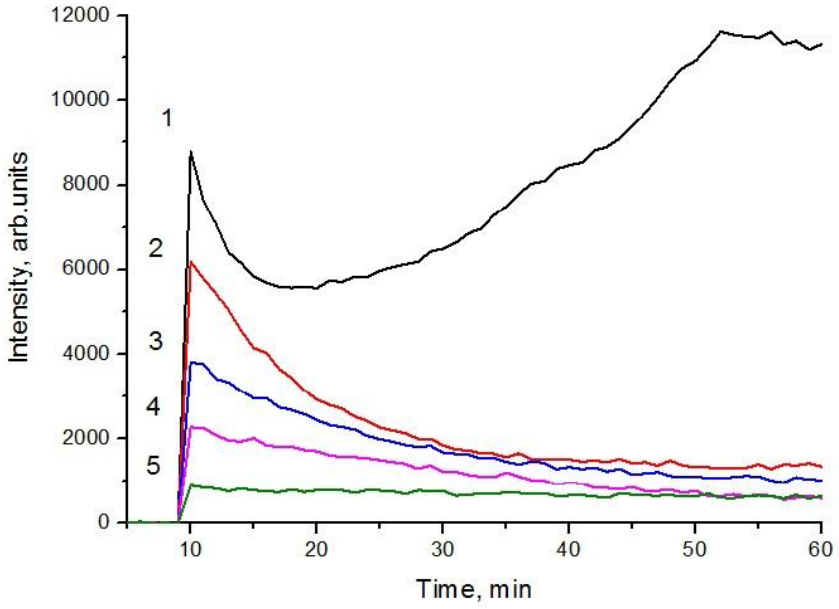

Рисунок 5 – Динамика образования свободных радикалов в зависимости от концентрации ферригидрита в реакционной смеси (1- исходный концентрированный раствор (1 г/л); 2, 3, 4 и 5 – разбавление раствора наночастиц в 20, 50, 100 и 500 раз соответственно).

Для проверки этого предположения было решено проверить, как изменяется дисперсная структура коллоидного раствора наночастиц при взаимодействии с перекисью водорода. Известно, что лимонная кислота обладает свойствами стабилизатора коллоидных наночастиц. Было отмечено, что внесение лимонной кислоты в коллоидный раствор позволяет стабилизировать исследуемые наночастицы. С использованием лимонной кислоты в качестве стабилизатора был получен коллоидный раствор биогенного ферригидрита, в котором агрегирование наночастиц было минимальным (модальное значение распределения наночастиц по гидродинамическому диаметру – 32,6 нм).

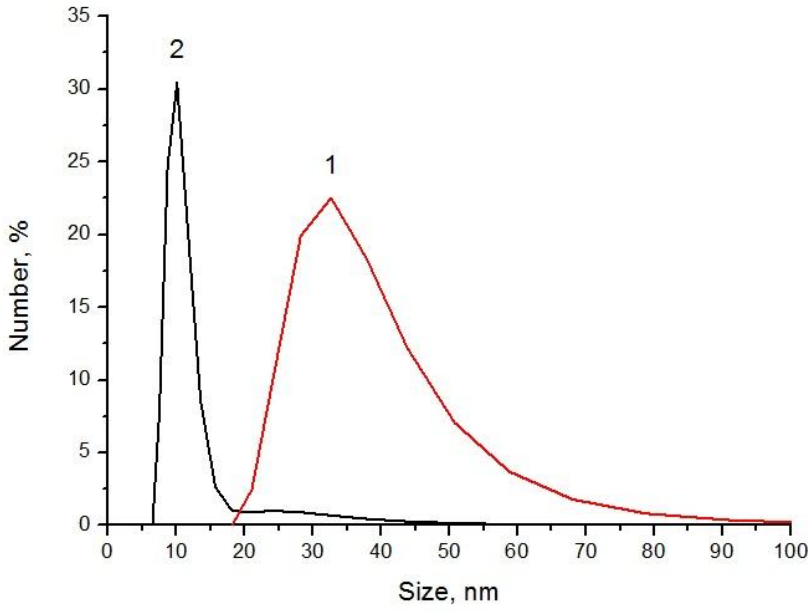

Рисунок 6 – Дисперсная структура образцов наночастиц, стабилизированных лимонной кислотой (1 – исходный раствор, 2 – тот же раствор с добавлением перекиси водорода).

При взаимодействии частиц с перекисью водорода распределение агрегатов наночастиц по размеру смешается влево (рисунок 6). Таким образом, выдвинутое предположение оказалось верным.

Группой исследователей [27] было обнаружено, что в экспериментах *in vitro* самыми токсичными оказались наночастицы магнетита, а менее токсичными – частицы липидокрокита. Проведя исследование, авторы пришли к выводу, что в коллоидном растворе магнетита присутствуют ионы двухвалентного железа, так как магнетит имеет некоторую растворимость. Как известно, железо в двухвалентном состоянии выступает как инициатор в реакции Фентона:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-} \quad (1)$$

Согласно мессбауэровским спектрам, в биогенном ферригидрите железо находится в трехвалентном состоянии, а не в двухвалентном. Исходя из этого, был поставлен эксперимент с целью сравнения активностей наночастиц гидрооксида железа и соли двухвалентного железа (сульфата железа(II)), как источника Fe^{2+}. Результат сравнительного анализа показан на рисунке 7.

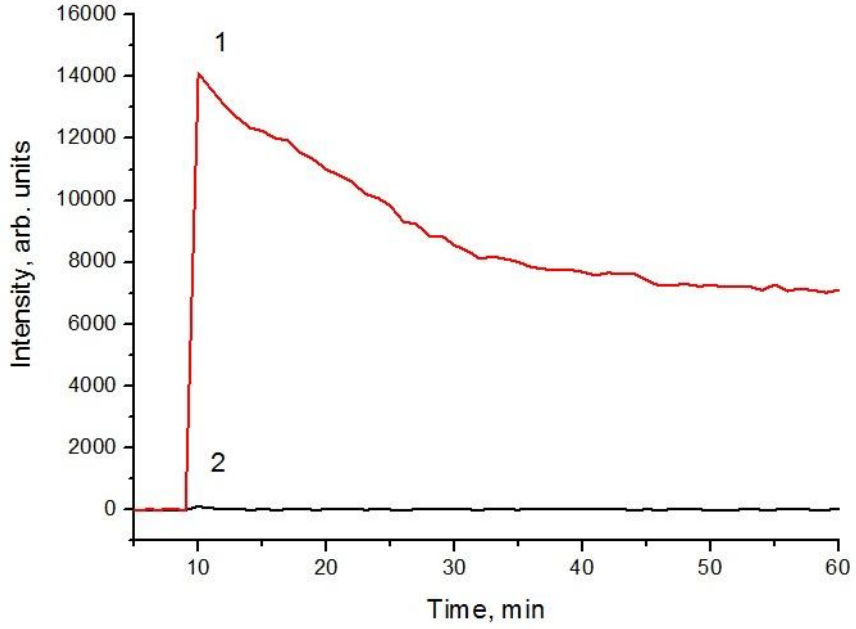

Рисунок 7 – Сравнение каталитической активности раствора наночастиц и растворимой соли железа (1 – ферригидрит, 2 – сульфат железа(II)).

Из рисунка 7 следует, что раствор биогенного ферригидрита на порядок активнее растворимой соли двухвалентного железа, которое считается классическим инициатором в реакции Фентона. Возникает вопрос о механизме взаимодействия пероксида водорода с наночастицами гидроксидов железа. Почему катализ ионами железа, которые находятся в составе нанокристаллитов, намного выше, чем ионами железа в растворе? Механизм разложения перекиси водорода наночастицами гидрооксида железа не известен. Объяснение его требует специальных исследований. Тестирование влияния наночастиц биогенного ферригидрита на разложение пероксида водорода показало, что они обладают высокой каталитической активностью, которая зависит от дисперсной структуры золя и концентрации их в растворе.

3.3 Тестирование биологической активности

Оценка биологической активности наночастиц биогенного ферригидрита проводилась в экспериментах с клетками печени опытных животных (крыс). Анализировали генерацию свободных радикалов в гомогенатах трех участков печени – околососудистая, центральная и периферическая часть печени. На рисунке 8 показаны результаты измерений на гомогенатах околососудистой части печени.

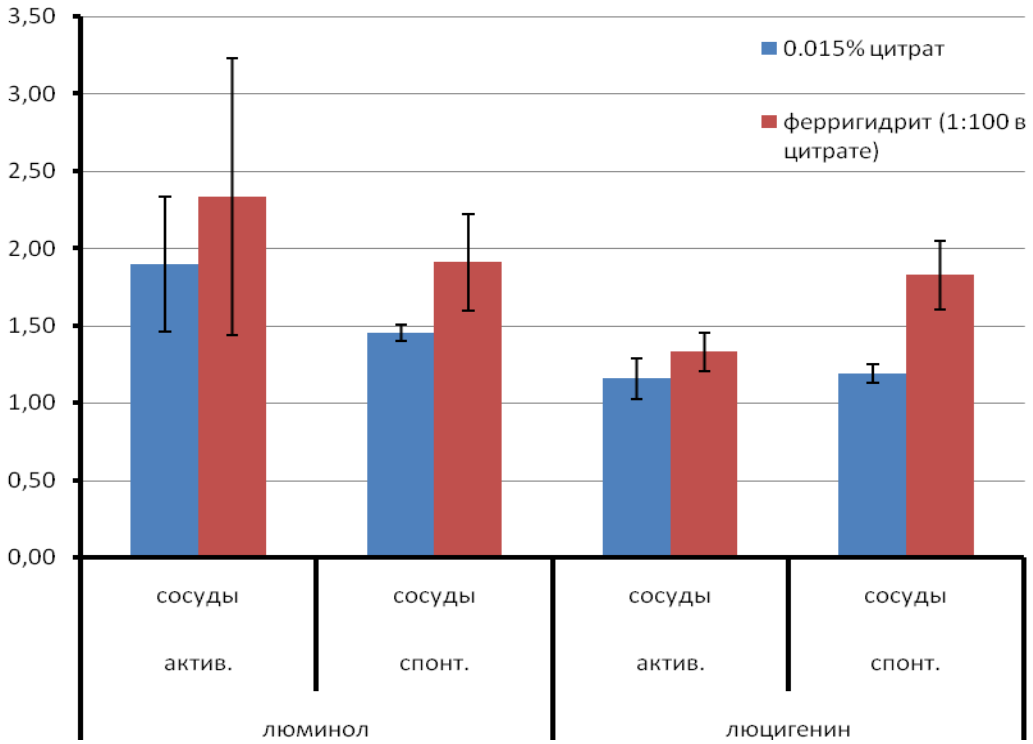

Рисунок 8 – Относительная светосумма генерации АФК клетками околососудистой ткани печени крыс.

Как видно на рисунке 8, генерация свободных радикалов статистически достоверно выше в варианте опытов без введения в гомогенаты антигенной нагрузки (латекс), активирующей производство перекиси водорода фагоцитирующими клетками. В качестве индикаторов радикалов использовали хемилюминесцентные зонды люминол и люцигенин. В

вариантах с активацией образования перекиси этот вывод статистически не подтверждается. Вероятно, это связано с тем, что собственная антиоксидантная система клеток находится в активированном состоянии, по отношению к которому воздействие наночастиц естественно меньше.

Выводы

1. Освоена методика получения коллоидных растворов биогенных наночастиц ферригидрита.
2. Получены сведения о дисперсной структуре коллоидных растворов биогенного ферригидрита методом динамического рассеяния света. Методом ДРС показано, что в седиментационно устойчивых коллоидных растворах биогенный ферригидрит находится в виде индивидуальных наночастиц с гидродинамическим диаметром 3 – 6 нм и наноразмерных агрегатов с гидродинамическим диаметром от 15 – 20 до 100 – 200 нм.
3. Установлено, что лазерное излучение прибора влияет на дисперсную структуру коллоидных растворов наночастиц ферригидрита. Влияние излучения лазера обусловлено магнитной природой наночастиц.
4. Показано, что наложение магнитного поля оказывает влияние на дисперсную структуру коллоидных растворов наночастиц ферригидрита. В магнитном поле наночастицы образуют цепочки из агрегатов.
5. Показано, что наночастицы биогенного ферригидрита оказывают каталитическое воздействие на разложение перекиси в системах «вода+перекись+люминол+наночастицы ферригидрита» и «клетки животных+люминол+наночастицы ферригидрита»
6. Генерация свободных радикалов при взаимодействии перекиси водорода с наночастицами биогенного ферригидрита зависит от дисперсной структуры золей.

Список используемой литературы:

1. L.C. Branquinho, M.S. Carrião, A.S. Costa, N. Zufelato, M.H. Sousa, R. Miotto, R. Ivkov & A.F. Bakuzis Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. Sci. Rep. 3, 2887; DOI:10.1038/srep02887 (2013).
2. B. Wang, J.-J. Yin, X. Zhou, I. Kurash, Z. Chai, Y. Zhao, and W. Feng Physicochemical Origin for Free Radical Generation of Iron Oxide Nanoparticles in Biomicroenvironment: Catalytic Activities Mediated by Surface Chemical States. dx.doi.org/10.1021/jp3101392 | J. Phys. Chem.
3. H. Liu, P. Lia, B. Lu, Y. Wei, Y. Sun // Transformation of ferrihydrite in the presence or absence of trace Fe(II): The effect of preparation procedures of ferrihydrite. J. Solid State Chemistry, 2009, v. 182, p. 1767–1771.
4. M. Xu, C.R.H. Bahl, C. Frandsen, S. Mørup // Interparticle interactions in agglomerates of α-Fe2O3 nanoparticles: influence of grinding. J. Colloid Interface Sci., 279 (2004) p. 132–136.
5. B. Gilbert,G. Lu,C.S. Kim The formation of stable nanoparticle clusters under environmentally relevant conditions. J. Colloid and Interface Science 313 (2007) 152–159.
6. Gilbert B., Ono R.K., Ching K.A. and Kim C.S. (2009). The effects of nanoparticle aggregation processes on aggregate structure and metal uptake. J. Colloid Interface Sci. 339, 285-295.
7. J.H. Bang, K.S. Suslick // Applications of Ultrasound to the Synthesis of Nanostructured Materials. Adv. Mater. 2010, 22, p.1039–1059.
8. А.Е. Баранчиков, В.К. Иванов, Г.П. Копица, С.В. Григорьев // Особенности мезоструктуры аморфных ксерогелей гидроксида железа (III), синтезированного в ультразвуковом поле. Физика твердого тела, 2010, том 52, вып. 5, с. 917 – 922.
9. В.К. Иванов, Г.П. Копица, Ф.Ю. Шариков, А.Е. Баранчиков, А.С. Шапорев, С.В. Григорьев // Ultrasound-induced changes in mesostructure

of amorphous iron (III) hydroxide xerogels: A small-angle neutron scattering study. PHYSICAL REVIEW B, 2010.

10. F. Zhang, C.-C. Wang // Fabrication of One-Dimensional Iron Oxide/Silica Nanostructures with High Magnetic Sensitivity by Dipole-Directed Self-Assembly. J. Phys. Chem. C 2008, 112, p.15151–15156.
11. А.Е. Баранчиков, В.К. Иванов, Ю.Д. Третьяков. Успехи химии 76, 147 (2007).
12. J.K. Lim, S.P. Yeap, H.X. Che, S.C. Low // Nanoscale Research Letters. – 2013. - 8. – P. 381-394.
13. И.И. Кургузенкова, Д.В. Гузатов, Л.С. Гайда // Проблемы физики, математики и техники. – 2013.- №2(15). - С. 11–17.
14. В.А. Сойфер, В.В. Котляр, С.Н. Хонина // Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2004, Т. 36, Вып. 6, С. 1368 - 1432.
15. Manzoor Ahmad Gatoo, Sufia Naseem, Mir Yasir Arfat, Ayaz Mahmood Dar, Khusro Qasim, and Swaleha Zubair // Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. BioMed Research International, V. 2014, Article ID 498420, 8 pages.
16. W. G. Kreyling, M. Semmler, F. Erbe et al. // Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low, *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, vol. 65, no. 20, pp.1513–1530, 2002.
17. J. A. Champion and S. Mitragotri. // Role of target geometry in phagocytosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 13, pp. 4930–4934, 2006.
18. B. Fubini, I. Fenoglio, M. Tomatis, and F. Turci. // Effect of chemical composition and state of the surface on the toxic response to high aspect ratio nanomaterials, *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 899–920, 2011.

19. Farheen N. Sayed, Vivek Polshettiwar. // Facile and Sustainable Synthesis of Shaped Iron Oxide Nanoparticles: Effect of Iron Precursor Salts on the Shapes of Iron Oxides. *Scientific Reports* 5, Article number: 9733 (2015)
20. М.И. Теремова, Э.А. Петраковская, А.С. Романченко, Ф.В. Тузиков, Ю.Л. Гуревич, О.В. Цибина, Э.К. Якубайлик. // Сб. докладов III Межд. конгресса «Цветные металлы-2011». Красноярск, 6–9 сентября 2011. - С. 333–337.
21. J.L. Jambor, J.E. Dutrizac // Chem. Rev. – 1998. – 98. - P. 2549–2585.
22. T. Mathew, K. Suzuki, Y. Nagai, T. Nonaka, Y. Ikuta, N. Takahashi, N. Suzuki, H. Shin // Chem. Eur. J., 2011, 17, P. 1092 – 1095.
23. В.А. Кулагин // Суперкавитационный миксер // Гидродинамика больших скоростей: Межвузовский сборник. Красноярск: КрПИ, 1992. С. 134–140.
24. Sankar Chakma and Vijayanand S. Moholkar. // Physical Mechanism of Sono-Fenton Process. AIChE Journal 2013 Vol. 00 No. 00
25. K.S. Suslick. // Sonochemistry, *Science*, vol. 247, no. 4949, pp. 1439–1445, 1990.
26. H. Wang, Y. Yu, Y. Sun, Q. Chen // NANO: Brief Reports and Reviews. 2011. - Vol. 6. - No. 1. – P. 1–17.
27. M.Auffan, W.Achouak, J.Rose, M.-A.Roncato, C.Chane´ak, D. T.Waite, A.Masion, J. C.Woicik, M. R.Wiesner, J.-Y. Bottero. // Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward Escherichia coli. *EnViron. Sci. Technol.* 2008, *42*, 6730–6735