

PACS numbers: 81.07.-b, 87.19.xj, 87.64.Ee, 87.64.kh, 87.80.Nj, 87.85.jj, 87.85.Rs

Разработка методов стандартизации нанокompозитных материалов на основе магнетита для онкологии

В. Ф. Чехун, Л. Ф. Суходуб*, Б. А. Мовчан, В. В. Бондар,
Н. Ю. Лукьянова, И. К. Хаецкий, С. Н. Данильченко***

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины,
ул. Васильковская, 45,
03022 Киев, Украина*

**Институт прикладной физики НАН Украины,
ул. Петропавловская, 58,
40030 Сумы, Украина*

***Институт электросварки им. Е. О. Патона НАН Украины,
ул. Боженко, 11,
03680, ГСП, Киев-150, Украина*

В работе сформулированы требования к материалам и методам исследований, которые необходимо соблюдать при создании биосовместимых нанокompозитов, используемых в качестве векторных систем направленной доставки лекарств в опухолевые клетки. На примере исследования магнитоуправляемых наночастиц магнетита показана возможность контроля состава, размеров и формы частиц в процессе получения наноконъюгатов для применения их в онкологии.

В роботі сформульовано вимоги до матеріалів і метод дослідження, яких необхідно виконувати при створенні біосумісних нанокompозитів, що використовуються в якості векторних систем спрямованого транспорту ліків до пухлинних клітин. На прикладі досліджень магнетокерованих наночастинок магнетиту показано можливість контролю складу, розмірів і форми частинок у процесі одержання наноконъюгатів для застосування їх в онкології.

The requirements are formulated for materials and methods of investigations, which must be followed when creating biocompatible nanocomposites to be used as vector systems to deliver drugs into tumour cells. Taking the study of the magnetically governed nanoparticles of magnetite as an example, the possibility to control the composition, size, and shape of particles during the process of fabrication of the nanoconjugates for applications in oncology is shown.

Ключевые слова: наночастица, опухоль, липосома, свойства, стандарты.

(Получено 19 октября 2010 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Исследования наноразмерных систем и материалов в конце 20-го и в начале 21-го веков получили большую поддержку в мире из-за перспективы их применения в различных областях науки и техники, в том числе и в медицине [1]. Эти исследования имеют комплексный характер и выполняются при участии физиков, биологов, материаловедов, химиков-технологов, медиков. По мере развития нанотехнологий и увеличения количества выпускаемой и реализуемой продукции очень важными становятся: выработка единой международно признанной терминологии и стандартов измеряемых характеристик наночастиц; обеспечение выполнения требований системы качества и безопасности [2]. Согласно определению (ISO/TS 27687): нанотехнологии включают разработку, характеризацию, производство и применение структур, устройств и измерительных систем посредством контроля формы и размеров материальных объектов в нанометровом (1–100 нм) диапазоне измерений. Нанотехнологии также включают изучение как морфологических, так и физико-химических свойств структур, систем и материалов с размером в одном пространственном направлении или с точностью производства менее 100 нм. Указанный диапазон размеров отдельных системных компонентов позволяет получать их новые функции и свойства для улучшения уже существующих продуктов и применений, или разработку и применение новых функциональных наноматериалов на молекулярном уровне.

Одним из приоритетных направлений фундаментальных и прикладных исследований в современной онкологии является создание новых противоопухолевых препаратов. Отсутствие избирательности действия известных препаратов и их высокая общая токсичность заставляет исследователей выполнять как дальнейший поиск новых соединений, так и усовершенствование лечебных форм уже существующих лекарств.

Большой научный интерес представляют исследования по магнитоуправляемой доставке лекарственных препаратов, инкапсулированных в биосовместимую среду вместе с магнитными наночастицами. Последние позволяют с помощью внешнего магнитного поля дистанционно концентрировать магнитные носители в локальных биологических структурах при создании векторных систем доставки лекарств в опухолевые клетки. Оксидные наночастицы железа (магнетит Fe_3O_4) обладают более слабыми магнитными свойствами по сравнению с металлическим железом, однако,

они более устойчивы к окислению, менее токсичны и имеют более стабильные во времени магнитные характеристики [3–9]. Для биомедицинского применения наночастицы магнетита должны обладать такими свойствами [10–12]:

— способность образовывать устойчивую коллоидную систему в водных растворах и других биосовместимых растворителях с возможностью вариации их физико-химических параметров для решения конкретных задач создания векторных систем;

— препятствование агрегации магнитных наночастиц в потоке биологической жидкости;

— обеспечение стабильных во времени характеристик наночастиц (по структуре, составу, размерам и физико-химическим свойствам), находящихся в магнитной жидкости.

Все эти требования мы попытались учесть при разработке технологии (стандартов) получения наноконъюгатов на основе магнетита и цитостатика-доксорубицина.

2. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОКОМПОЗИТОВ И МЕТОДЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для удовлетворения указанных выше требований нами разработана технология получения и контроля параметров наноконъюгатов на основе наночастиц магнетита [13]. Она включает следующие стандартные этапы приготовления и исследования образцов:

— характеристика исходного наноструктурного материала (наночастицы магнетита), полученного разными методами, с помощью рентгеноструктурного и рентгенофазового анализов, электронного парамагнитного резонанса, а также просвечивающей и растровой электронной микроскопии;

— отмывание в дистиллированной воде наночастиц магнетита от соляной матрицы или иного растворителя; стабилизация размеров частиц с помощью биосовместимого полимера (полидекстрана или хитозана);

— ультразвуковая обработка коллоидного раствора с целью достижения монодисперсности наночастиц; характеристика наночастиц по составу и размерам в коллоидном растворе с помощью оптической спектроскопии и лазерной корреляционной спектроскопии;

— создание наноконъюгата на основе наночастиц магнетита и цитостатика, инкапсулированных в фосфолипидную оболочку, — получение липосомальной формы; контроль формы, размеров и состава липосом с помощью сканирующего, туннельного и атомно-силового микроскопов, лазерной корреляционной спектроскопии, жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

В наших исследованиях использовался раствор полимера полидекстрана, который модифицировал поверхность наночастиц маг-

нетита и препятствовал их агрегации в более крупные частицы. Дополнительной важной функцией покрытия наночастиц полимером является повышение их биосовместимости. Установлено, что покрытие полидекстраном или хитозаном наночастиц магнетита препятствует их опсонизации клетками ретикуло-эндотелиальной системы при введении в кровяное русло. Альтернативным вариантом достижения биосовместимости является заключение наночастиц в фосфолипидный бислой — создание магнитоуправляемых липосом. **Рентгенодифракционные исследования** структуры исходного материала магнетита были выполнены на автоматизированном дифрактометре ДРОН4-07 (изготовитель — «Буревестник», Россия).

Использовалось излучение CuK_α (длина волны 0,154 нм) при условиях фокусировки по Брэггу–Брентано ($\vartheta - 2\vartheta$) (2ϑ — брэгговский угол). Ток и напряжение на рентгеновской трубке имели значения 20 мА и 40 кВ, соответственно. Образцы снимали в режиме непрерывной регистрации (скорость 1,0°/мин) в диапазоне углов 2ϑ от 20 до 75°.

Система автоматизации ДРОН-4-07 включает: микропроцессорный контроллер, обеспечивающий управление дифрактометром и сохранение результатов анализа, блок (пульта) управления гониометром ГУР-9, используемый при наладке и юстировке, ЭВМ, программный пакет поддержки эксперимента и обработки результатов DIFWIN-1 (разработчик — ТОО «Эталон ПТЦ», Россия).

Экспериментальные результаты автоматически передавались управляющей электроникой дифрактометра на ЭВМ в указанный выше программный пакет, где происходила предварительная обработка полученных данных. Для идентификации кристаллических фаз производилась дальнейшая передача данных из пакета DIFWIN-1 в программный пакет Crystallographica Search–Match (Oxford Cryosystems, www.crystallographica.co.uk).

Идентификация линий рентгеновского спектра выполнялась при установленном наложении ограничений на элементный состав образца путём автоматического сравнения полученных результатов с карточками базы данных Powder Diffraction File 2 с последующей ручной выборкой.

Растровая электронная микроскопия с рентгеновским микроанализом была реализована на приборе РЕММА-102 (SELMI, Украина). Прибор позволяет визуализировать поверхность образца в широком диапазоне увеличений с разрешением порядка 10 нм и получать данные об элементном составе из анализа характеристических рентгеновских спектров, возбуждаемых электронным зондом.

Изображение с увеличением $\times 1000$ было получено в режиме эмиссии вторичных электронов. Вторичные электроны обеспечивают максимальную по сравнению с другими сигналами разрешающую способность порядка 5–10 нм. Поэтому они являются в растровой электронной микроскопии главным источником информации для

получения изображения поверхности объекта. В режиме микроанализа элементного состава наночастиц с использованием энергодисперсионного спектрометра EDX (ЭДАР), аналитический сигнал накапливался в выбранных точках поверхности образца; для калибровок использовали штатные эталонные образцы. Обработка спектрометрической информации, выполнение необходимых калибровочных измерений, расшифровка характеристических рентгеновских спектров, качественный и количественный анализы выполнялись с помощью программного обеспечения системы микроанализа прибора ЭДАР.

Просвечивающая электронная микроскопия и электронная дифракция. Исследуемый порошок ($\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{KCl}$) наносился (распылялся) с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-А на углеродную плёнку толщиной не более 20 нм, размещённую на опорной медной сетке диаметром 3 мм с размером ячейки 100×100 мкм. Углеродная плёнка была заранее получена путём конденсации в вакууме на подложке NaCl при помощи вакуумного поста ВУП-5М. Затем подложку с нанесённой на неё плёнкой осторожно опускали в сосуд, заполненный дистиллированной водой. После растворения подложки, углеродную плёнку вылавливали медной сеточкой. После этого производилась диспергация и нанесение на сеточку исследуемой суспензии магнетита. Приготовленные описанным способом образцы помещались в вакуумную камеру микроскопа и дальнейшие исследования структуры и размеров наночастиц магнетита, микродифракция электронного пучка на кристаллитах выполнялись при помощи просвечивающего электронного микроскопа ПЭМ-125К. Основные параметры работы микроскопа: $U_{\text{уск}} = 90$ кВ, $I_{\text{пучка}} = 100$ мкА.

Магнитные характеристики магнетита и нанокompозита на его основе исследовались на всех технологических этапах приготовления с помощью ЭПР-спектрометра ELEXYS, Bruker 480 (частота — 9,876 ГГц, мощность — 0,02 мВт, модуляция — 1 Гаусс).

Контроль дисперсности размеров и формы наночастиц магнетита в коллоидном растворе и в липосомах осуществлялся с помощью лазерного корреляционного измерителя размера частиц Malvern Nano S по разработанной фирмой методике.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рисунке 1 показано изображение кристаллитов магнетита в соляной (хлористый калий) матрице (увеличение — $\times 1000$), полученное с помощью растрового электронного микроскопа в режиме эмиссии вторичных электронов. Согласно данным растровой электронной микроскопии, образцы представляют собой хаотическое скопление кристаллических частиц, преимущественно хлористого калия с

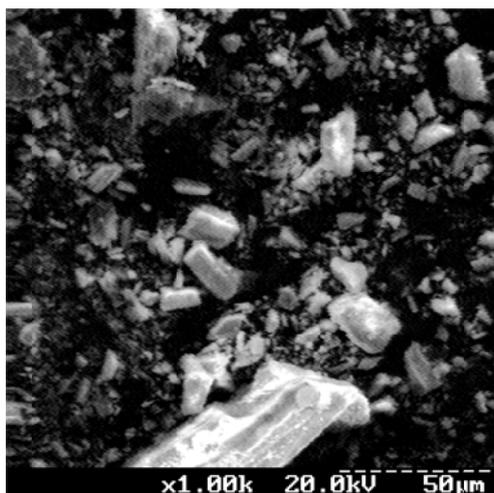


Рис. 1. Изображение кристаллитов магнетита в соляной матрице KCl (увеличение — $\times 1000$), полученное с помощью растрового электронного микроскопа в режиме эмиссии вторичных электронов.

вкраплениями магнетита. Более детальный рентгеновский микроанализ с накоплением сигналов по регистрируемым каналам (см. рис. 2, *a*, *b*) позволил установить соотношение магнетита и матрицы для образцов, полученных методом электронной бомбардировки мишеней в вакууме и химическим способом — смешиванием растворов хлорного и хлористого железа. При первом способе получения наночастиц магнетита (рис. 2, *a*) на спектрограмме преобладают атомы хлора и калия — более 90% и небольшой (порядка 4%) по интенсивности пик, соответствующий атомам железа. Для второго, химического способа получения из раствора наночастиц магнетита характерно преобладание (более 90%) атомов железа на фоне примесей неустановленной природы. Отдельно зарегистрирован пик, соответствующий атомам кремния.

Для идентификации кристаллической структуры наночастиц магнетита необходимо выполнить рентгеноструктурный анализ по схеме Брэгга–Брентано. На рисунке 3 представлены результаты рентгеноструктурных исследований исходного материала магнетита, полученного различными методами и с разным соотношением наночастица–матрица, а также стабилизированных по размерам частиц магнетита с помощью полимера антикоагулянта. Как видно из рентгеновских дифрактограмм, образец «*a*» представляет собой магнетит (Fe_3O_4) с довольно крупными размерами кристаллитов (пики сравнительно узкие и интенсивные); образец «*b*» состоит из хорошо закристаллизованной фазы KCl (JCPDS № 41-1476) со следами (порядка 4% весовых) монокристаллического Fe_3O_4 (слабая и

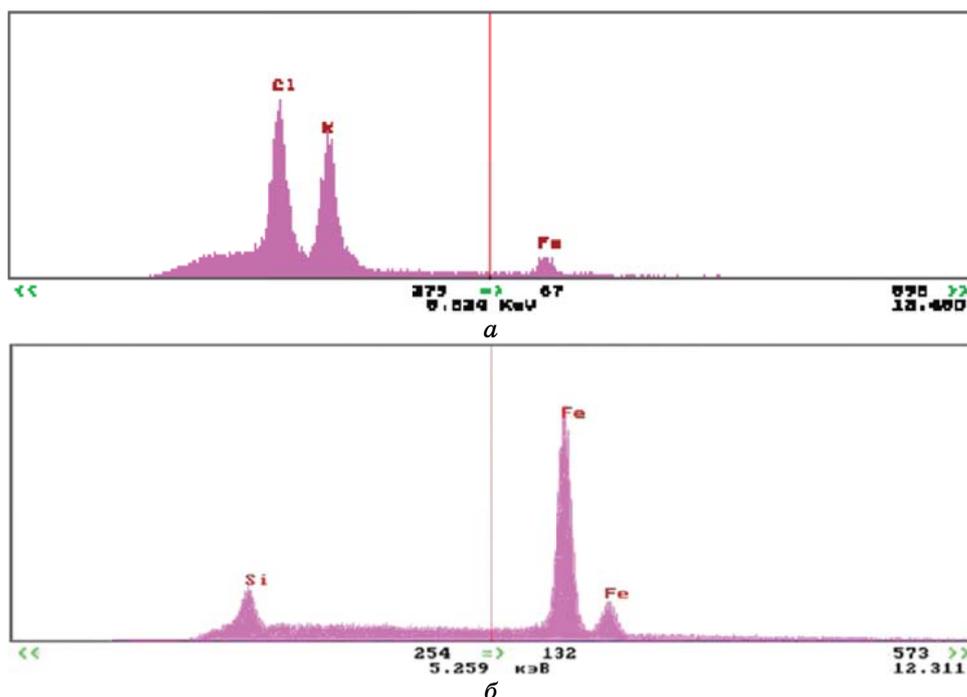


Рис. 2. Анализ элементного состава в режиме микроанализа с использованием энергодисперсионного спектрометра EDX (ЭДАР) исходных образцов магнетита, синтезированных с помощью: *a*) электронно-лучевого распыления в вакууме мишеней из магнетита и хлористого калия; *б*) химического способа — смешиванием растворов.

размытая линия при $35,5^\circ$ (2θ) соответствует положению основной линии фазы Fe_3O_4 — JCPDS No. 19-629). Образцы «*c*» и «*d*» по фазовому составу представляют собой монокристаллический Fe_3O_4 (JCPDS No. 19-629) и кристаллиты магнетита в композите хитозан/магнетит (соотношение компонентов — 50/50).

Следует отметить, что кристаллиты магнетита в композите существенно меньше, чем в чистом Fe_3O_4 . Этот факт указывает на ингибирование хитозаном — полимерной матрицей процессов укрупнения кристаллов Fe_3O_4 . Для образцов «*c*» и «*d*», размеры кристаллитов магнетита, исходя из качественных оценок уширений пиков дифракции, могут быть в пределах 20–100 нм. Спектры характеристического рентгеновского излучения подтверждают присутствие следов окиси кремния в образце «*a*», наряду с доминирующим количеством магнетита и отсутствием их в спектре «*c*». Напротив, в дифракционном спектре исходного магнетита, полученного электронно-лучевым распылением (спектр «*b*»), преобладают пики, ха-

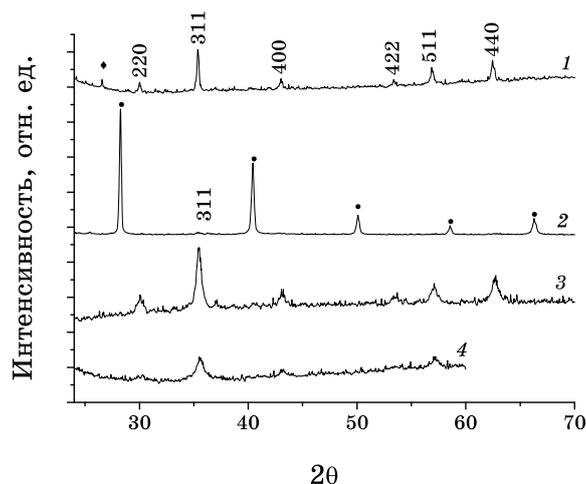


Рис. 3. Рентгеновские диффрактограммы исходного материала магнетита и магнетитсодержащих композитов: 1 — Fe_3O_4 , полученный химическим путём; 2 — Fe_3O_4 в матрице KCl, полученный электронно-лучевым распылением в вакууме; 3 — Fe_3O_4 -образец, полученный другим химическим методом; 4 — композитный материал хитозан/ Fe_3O_4 (соотношение — 50/50), т.е. застабилизированный полимером образец нанокompозита. Индексами Миллера отмечены линии магнетита (JCPDS 19-629); символами (•) отмечены линии посторонних фаз: SiO_2 (JCPDS 81-65) и соляной матрицы KCl (JCPDS 41-1476).

рактерные для хлористого калия — отмечены соответствующими значками, и следовые (до 4%) рефлексy от наночастиц магнетита.

Электронно-микроскопические снимки отмытых в дистиллированной воде кристаллов магнетита, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 4, увеличение — $\times 81000$), показывают хаотичное расположение нанокристаллов магнетита и кристаллитов матрицы — хлористого калия. Оценка среднего размера кристаллитов даёт значения около 40 нм.

Микродифракция электронов на отдельных кристаллах магнетита (рис. 5, а, б) указывает на существование кристаллической фазы — наличие интенсивных рефлексов и концентрических кругов. Более чёткие изображения характерны для магнетита, полученного химическим путём. Это свидетельствует об более крупных размерах кристаллитов по сравнению с кристаллитами, осаждёнными в вакууме из газовой фазы. Наличие следов соляной матрицы из хлористого калия также приводит к размыванию дифракционных колец и уменьшению интенсивности рефлексов.

Используя микродифракцию электронного луча на нанокристаллах, (рис. 5, а) были вычислены межплоскостные расстояния для кристаллической решётки магнетита, осаждённого из газовой фазы:

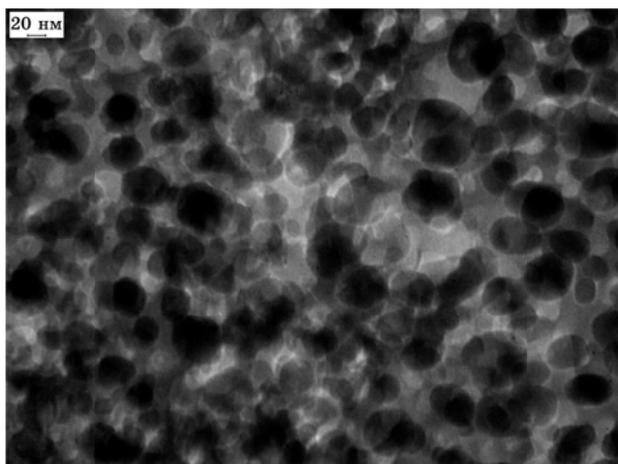


Рис. 4. Изображение наночастиц магнетита со следами соляной матрицы KCl, полученное с помощью просвечивающего электронного микроскопа (увеличение — $\times 81000$).

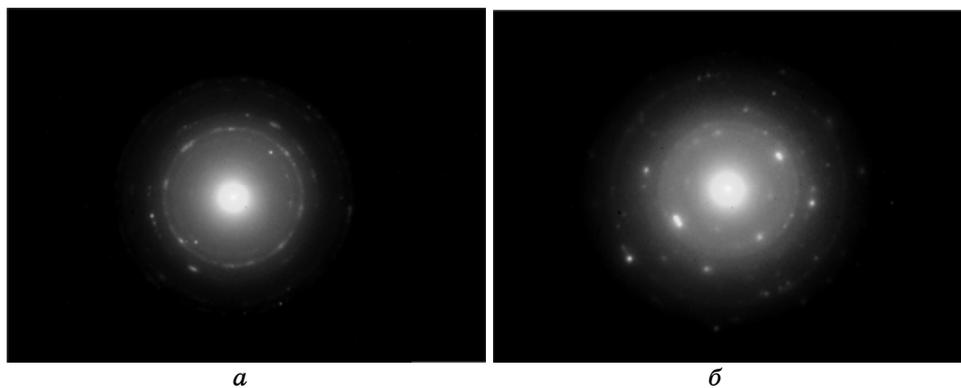


Рис. 5. Микроэлектроннограммы от наночастиц исходного магнетита, полученные с помощью: *а*) электронно-лучевого распыления в вакууме мишеней из магнетита и хлористого калия; *б*) химическим способом — смешиванием растворов.

$$d_{hkl_1} = 2,67 \text{ \AA}, d_{hkl_2} = 2,33 \text{ \AA}, d_{hkl_3} = 1,88 \text{ \AA}, d_{hkl_4} = 1,36 \text{ \AA}.$$

Используя микродифракцию от нанокристаллов магнетита, полученного химическим способом (рис. 5, б), были получены следующие значения для межплоскостных расстояний кристаллической решётки:

$$d_{hkl_1} = 2,70 \text{ \AA}, d_{hkl_2} = 2,35 \text{ \AA}, d_{hkl_3} = 1,90 \text{ \AA}, d_{hkl_4} = 1,48 \text{ \AA}.$$

Табличные данные межплоскостных расстояний для магнетита Fe_3O_4 с учётом интенсивности линий (наиболее интенсивная линия исследуемого образца — D_2):

$$d_{220} = 2,97 \text{ \AA}, d_{311} = 2,53 \text{ \AA}, d_{222} = 2,42 \text{ \AA}, d_{400} = 2,10 \text{ \AA}.$$

Наиболее интенсивная линия магнетита (Fe_3O_4) относится к линии 311 рентгенограммы, представленной на рис. 3.

Разница значений межплоскостных расстояний между полученными и табличными данными для магнетита может быть объяснена так: во-первых, наличием в исследуемом образце примеси KCl , а во-вторых, погрешностью измерений, ввиду того, что линии на микродифракционной картине не имеют чётких границ.

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), представленные на рис. 6, характеризуют изменения магнитных свойств исходного, находящегося в соляной кристаллической матрице магнетита и нанокompозита на основе магнетита в коллоидном растворе — магнитолипосомах. Для образца, полученного химическим путём и содержащего около 90% кристаллического магнетита, спектр ЭПР имеет классический вид (рис. 6, кривая 1) и имеет такие параметры: резонансное магнитное поле $H = 3174$ Гаусс и g -фактор = 2,2278, ширина линии 1570 Гаусс. Для кристаллитов, содержащих магнетит и хлористый калий в указанном выше соотношении, сигнал ЭПР

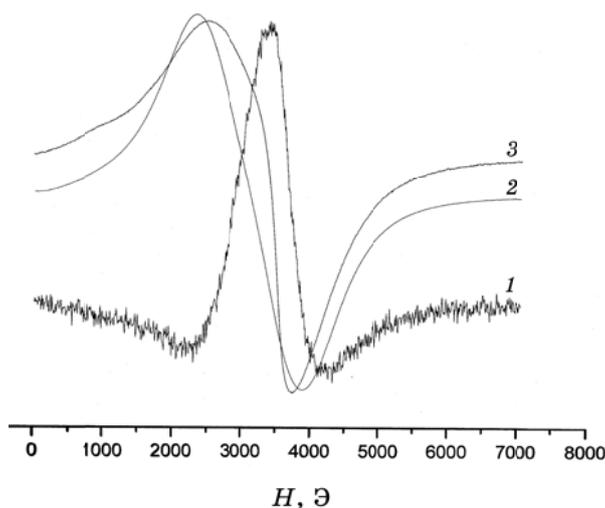


Рис. 6. Спектры ЭПР магнетита при комнатной температуре: кривая 1 — порошок магнетита (90%), полученный химическим путём из раствора; кривая 2 — порошок магнетита в кристаллической матрице хлористого калия; кривая 3 — коллоидный раствор магнетита в липосомах (магнитолипосомы).

уменьшается по величине, спектр уширяется (рис. 6, кривая 2), становится ассиметричным и характеризуется суммарной шириной линии 3404 Гаусс. Наибольшие изменения ЭПР-сигнала наблюдаются для магнетита в магнитолипосомах (рис. 6, кривая 3). Он видоизменился по форме, в несколько раз уменьшился по величине расщепления, и имеет такие характеристики: ширина линии слева — 500 Гаусс, справа — 3195 Гаусс; g -фактор определить затруднительно. Это свидетельствует об утере магнитных свойств магнетита в липосомальной форме и накладывает ограничения на применение ЭПР-спектроскопии для исследований при комнатной температуре.

По-видимому, необходимо пользоваться методом прямых измерений магнитных параметров, например, магнитной восприимчивости коллоидного раствора при приготовлении нанокompозита на основе магнетита и цитостатика.

На рисунке 7 представлены результаты измерений средних размеров наночастиц магнетита (гидродинамический диаметр) для нанокompозита (рис. 7, а) и магнитолипосом (рис. 7, б) в суспензии. Эти измерения выполнены на лазерном корреляционном спектрометре-измерителе Malvern Nano S с углом регистрации 120° в задней полусфере. Для нанокompозита, содержащего магнетит и доксорубицин в липосомальной оболочке, кривая дисперсности со стороны малых размеров частиц имеет плечо в области 30 нм и основной максимум при 80 нм. Это свидетельствует о том, что в рассеянии лазерного излучения участвуют две группы частиц с диаметрами указанных размеров. Для магнитолипосом регистрируется одна уширенная полоса с максимумом около 110 нм. Уширение полос как для нанокompозита, так и для магнитолипосом свидетельствует об отклонении от сферичности формы наночастиц. Различные значения гидродинамического диаметра наночастиц нанокompозита (около 80 нм) и диаметра наночастиц магнетита, полученного с помощью просвечивающей электронной микроскопии (около 40 нм) можно объяснить броуновским движением наночастиц в жидкости и образованием липосомальной оболочки в изготовленных образцах нанокompозита.

4. ВЫВОДЫ

1. В результате выполненных исследований было установлено, что условия получения, стабилизации формы и размеров наночастиц магнетита существенно влияют на их фазовый состав, параметры кристаллической решётки.
2. Минимально необходимые методы контроля кристаллической структуры, фазового состава и размеров нанокристаллов в твердой фазе следующие: рентгеноструктурный и рентгенофазовый (эмиссия вторичных электронов) анализы, просвечивающая и растровая электронная микроскопия.

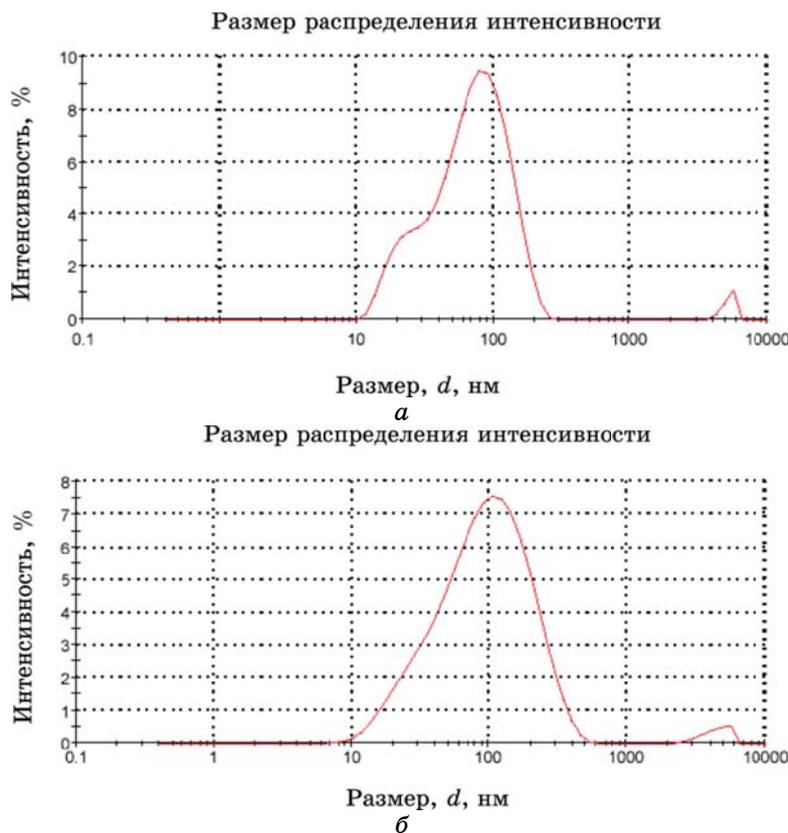


Рис. 7. Дисперсность размеров наночастиц магнетита, измеренных с помощью лазерного корреляционного спектрометра Malvern Zetasizer Nano S: верхний рисунок — нанокompозит содержит магнетит, доксорубин и лецитиновые капсулы; нижний рисунок соответствует магнитным липосомам, т.е. состоит из магнетита в липосомальной оболочке.

В процессе приготовления нанокompозитов на основе магнетита и цитостатиков в виде биосовместимых жидкостей для внутривенного введения онкологическим больным необходимо контролировать физико-химические свойства конъюгатов (заряд и форму поверхности липосом, их внутреннее содержание) с помощью потенциометрических измерений, оптических и нефелометрических методов исследования.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. П. П. Горбик, В. Ф. Чехун, А. П. Шпак, *Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології: Матеріали конференції (Київ: 2007)*.

2. В. Г. Удовицкий, *Физическая инженерия поверхности*, **6**, № 3–4: 193 (2008).
3. С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков, *Успехи химии*, **74**, № 6: 539 (2005).
4. M. Hasselov, J. W. Readman, and J. F. Ranville, *Ecotoxicology*, **17**: 344 (2008).
5. J. Giri, S. G. Thakurta, J. Bellare et al., *J. Magn. Magnet. Mater.*, **293**, No. 1: 62 (2005).
6. G. Q. Zhang, H. P. Wu, M. Y. Ge et al., *Materials Letters*, **61**: 2204 (2007).
7. D. Maity and D. C. Agrawal, *J. Magn. Magnet. Mater.*, **308**, No. 1: 46 (2007).
8. A. G. Roca, R. Costo, A. F. Reboledo et al., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **42**: 2240-02 (2009).
9. G. Goloverda, B. Jackson, C. Kidd, and V. Kolesnichenko, *J. Magn. Magnet. Mater.*, **321**: 1372 (2009).
10. J. Murbe, A. Rechtenbach, and J. Torfer, *Material Chemistry and Physics*, **110**: 426 (2008).
11. А. И. Галанов, Т. А. Юрмазова, Г. Г. Савельев и др., *Сибирский онкологический журнал*, № 3 (27): 50 (2008).
12. A. Kumar, P. K. Jena, S. Bahera et al., *Nanomedicine: Nanotech. Biolog. Med.*, **6**: 64 (2010).
13. В. Ф. Чехун, І. К. Хасцький, Н. Ю. Лук'янова, Ю. А. Курапов, Г. Г. Ді-дікін, С. Є. Литвин, Б. О. Мовчан, Б. Є. Патон, *Спосіб отримання стабілізованого розчину наночастинок магнетиту для адресної доставки протипухлинних препаратів* (Патент України 47930 від 25.02.2009 р.).
14. M. M. Noginov, N. Noginova, O. Amponsah et al., *J. Magn. Magnet. Mater.*, **320**: 2228 (2008).