

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии  
наименование кафедры

**Синтез углеродных наночастиц, допированных гадолинием**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) 4 курса 411 группы

направления (специальности) 04.03.01 «Химия»  
код и наименование направления (специальности)

**Институт химии**

наименование факультета, института, колледжа

**Мордовиной Екатерины Алексеевны**

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

**проф. кафедры, д.х.н., проф.**

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

**И.Ю. Горячева**

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

**д.х.н., проф.**

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

**Д.Г. Черкасов**

инициалы, фамилия

Саратов 2019 г.

## Введение

**Актуальность работы.** Углеродные наночастицы привлекают к себе научный интерес благодаря своим многочисленным уникальным свойствам. Преимуществом фотолюминесцентных углеродных наночастиц является простота синтеза, возможность модификации поверхности, фотостабильность, низкая цитотоксичность, а также высокая биосовместимость. Углеродные наночастицы нашли свое применение в качестве фотокатализаторов, различных биологических визуализаторов, а также могут применяться в терапевтических целях в медицине.

Большинство радиологических методов исследования организма, такие как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгенография, ультразвуковая диагностика и многие другие, предполагают использование контрастных веществ. Зачастую, МРТ не обходится без применения контрастных агентов (КА), в качестве которых обычно выступают комплексные соединения парамагнитных металлов, таких как гадолиний, железо и марганец. Использование контрастных агентов обуславливается тем, что они изменяют скорость релаксации протонов. Существующие КА являются несовершенными и нуждаются в дальнейшей доработке.

Особое место среди КА занимают специфические КА, которые позволяют осуществлять нацеленное контрастирование за счет использования специальных лигандов (например, фолиевая кислота). Создание таких КА в большинстве случаев является осложненным многостадийным процессом, требующим использования вспомогательных веществ, которые могут вносить дополнительную токсичность.

В последнее время разработка КА направлена на использование простых способов синтеза, позволяющих получить КА с более высокой релаксационной способностью, низкой токсичностью и высокой биосовместимостью.

**Целью данной работы** является получение многофункциональных углеродных наночастиц, допированных гадолинием. Данное направление является перспективным, поскольку сочетание флуоресцентной визуализации и

магнитно-резонансных исследований позволяет получать информацию об анатомической структуре тканей с высоким разрешением.

**Практическая значимость.** Создание специфичных контрастных агентов, содержащих фолиевую кислоту, открывает возможность нацеленного контрастирования, а также локальной визуализации раковых клеток и тканей.

**Научная новизна** данной работы заключается в разработке подходов, позволяющих получить многофункциональные УНЧ в одну стадию, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве специфичных КА за счет присутствия в их структуре фолиевой кислоты.

**Структура и объем работы.** Работа включает в себя введение, 2 основные главы (7 разделов), выводы и заключение, технику безопасности и список используемых источников, состоящий из 41 наименования. Работа изложена на 47 листах, включает 6 таблиц и 21 рисунок.

## Основное содержание работы

**Во введении** обоснована актуальность темы работы, изложена научная новизна и практическая значимость.

**В первой главе** представлен литературный обзор, в котором описан принцип магнитно-резонансного контрастирования, представлены сведения о существующих контрастных агентах, рассмотрены их достоинства и недостатки. Литературный обзор также включает данные о подходах к синтезу углеродных наночастиц (УНЧ), способы получения УНЧ, допированных гадолинием. Рассмотрены особенности строения фолиевой кислоты и возможность ее использование в качестве прекурсора для получения специфичных контрастных агентов.

**Во второй главе** представлено описание используемого оборудования и реагентов, описаны методы исследования, методики проведения экспериментов и полученные результаты.

Для синтеза УНЧ был выбран гидротермальный метод, основанный на термической обработке углеродного сырья в замкнутом объеме.

Определение свободного  $Gd^{3+}$  проводилось спектрофотометрическим методом в присутствии индикатора ксиленолового оранжевого (КО). Для определения были зарегистрированы спектры поглощения КО при различной концентрации добавки  $Gd^{3+}$  (рисунок 1). При увеличении концентрации металла происходит увеличение оптической плотности при 573 нм и уменьшение при 433 нм. В зависимости от соотношения поглощения при 573 и 433 нм была построена градуировочная зависимость (рисунок 2). Измерения для полученных Gd-УНЧ проводили аналогичным образом и определяли концентрацию свободного  $Gd^{3+}$  по градуировочной зависимости.

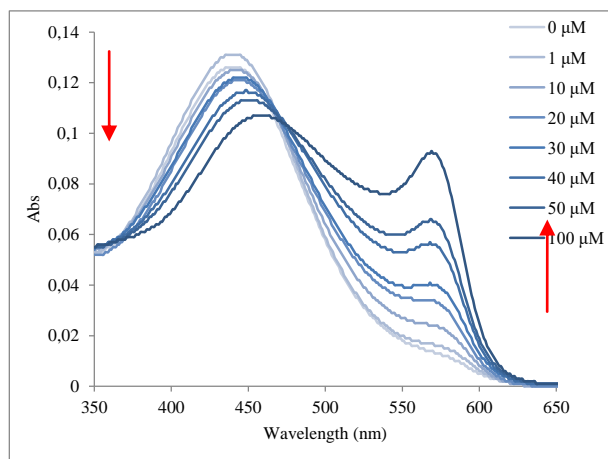


Рисунок 1 – Спектры поглощения стандартных растворов  $Gd^{3+}$  в присутствии КО

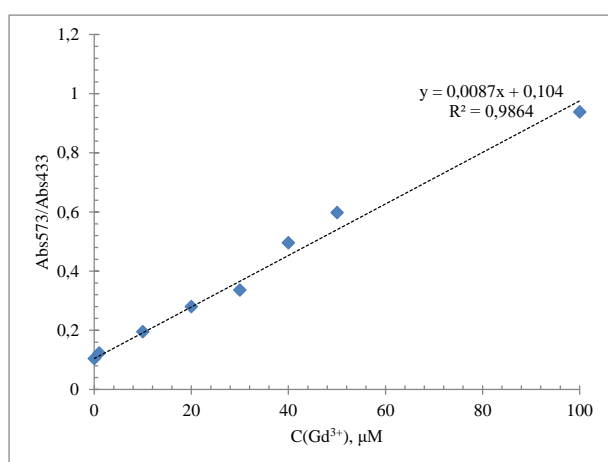


Рисунок 2 – Градуировочная зависимость

Для изучения влияния рН на оптические свойства ФК, исходный раствор с концентрацией  $10^{-3}$  М разбавляли растворами с различным рН до концентрации  $10^{-5}$  М. Для всех растворов регистрировали спектры поглощения и испускания.

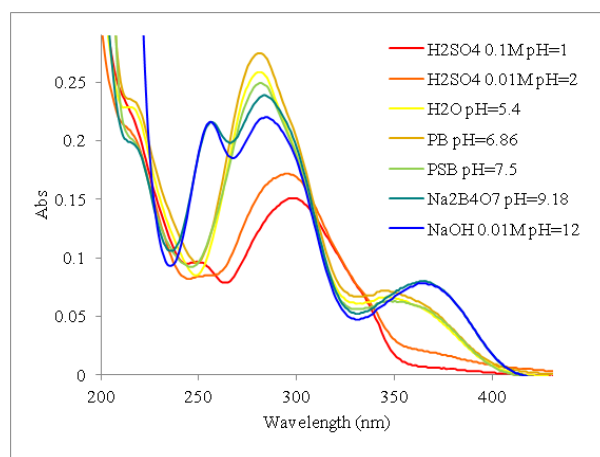


Рисунок 3 – Спектры поглощения ФК при различном рН

Спектры поглощения птеринов очень чувствительны к значениям рН (рисунок 3). Полоса поглощения в области 350 нм является типичной низкоинтенсивной полосой птеринов. В сильно кислых средах ярко выраженный пик в этой области отсутствует. При увеличении рН происходит длинноволновый сдвиг полосы поглощения птеринов до 365нм.

Спектры флуоресценции птеринов также являются зависимыми от рН (рисунок 4) Положение максимума испускания для основных форм (рН выше 9) сдвинуты в длинноволновую область в сравнении с кислотными формами (рН ~5). В сильно кислых средах также происходит длинноволновый сдвиг. Следовательно, природа заместителя в положении б оказывает влияние на пути дезактивации возбужденных состояний.

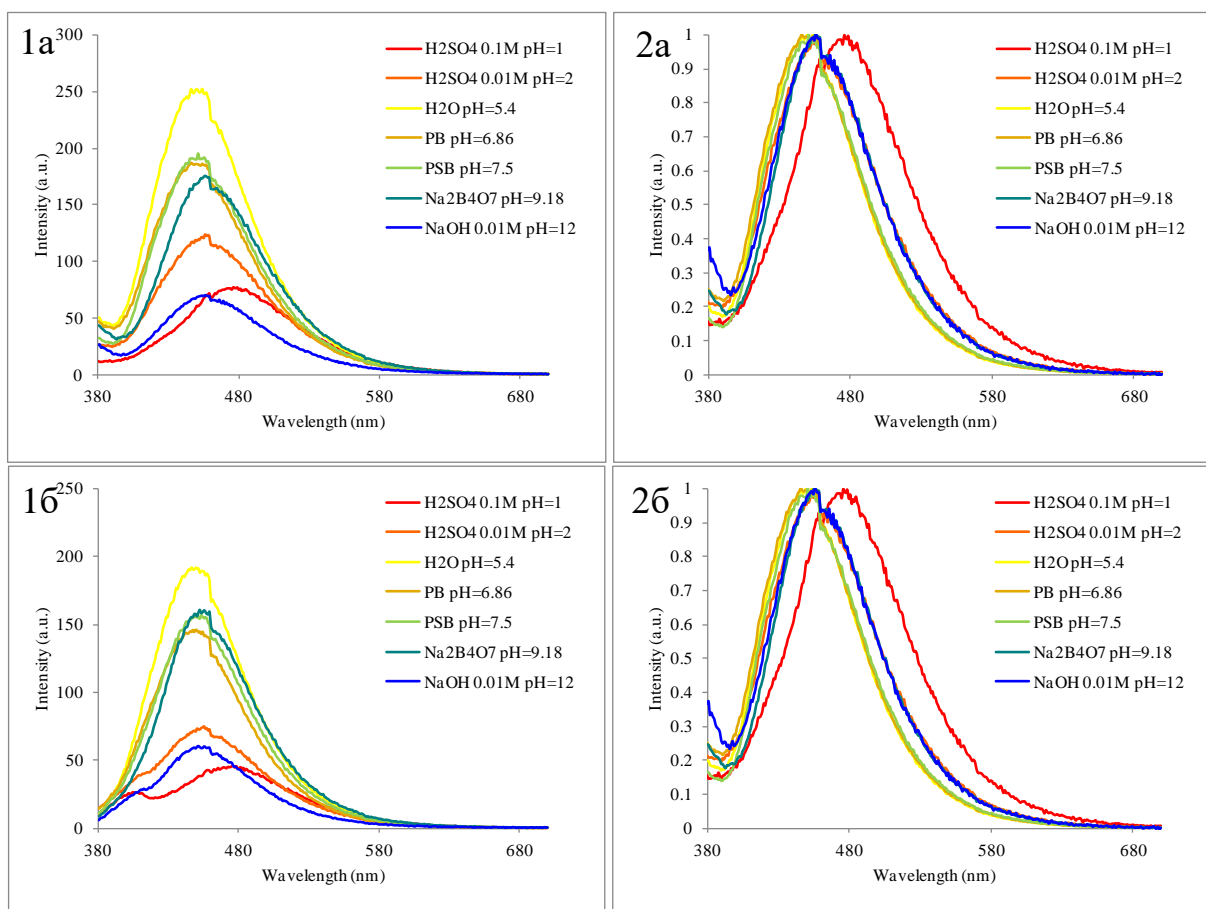


Рисунок 4 – Спектры испускания(1) и нормированные спектры испускания(2) ФК при различном рН и длине возбуждения 270нм (а) и 350нм (б)

При разработке многофункциональных меток на основе ФК необходимо уделять особое внимание сохранности птеринового фрагмента, так как он отвечает за специфическое взаимодействие с фолатными рецепторами. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что идентификацию птеринового фрагмента можно проводить путем измерения спектров поглощения растворов в щелочной среде.

Для оценки возможности хелатирования ионов гадолиния ФК при комнатной температуре, была приготовлена серия растворов. Для этого, в пробирку помещали стандартный раствора  $Gd^{3+}$  с концентрацией  $3 \cdot 10^{-5}$  М, и добавляли ФК, с концентрациями  $3 \cdot 10^{-5}$  М,  $6 \cdot 10^{-5}$  М и  $9 \cdot 10^{-5}$  М, чтобы соотношение Me:L составляло 1:1, 1:2 и 1:3 соответственно. После чего, для полученной серии растворов проводилось спектрофотометрическое определение свободного  $Gd^{3+}$ . Исходя из полученных данных (рисунок 5), можно сделать вывод, что при комнатной температуре не происходит связывания ионов гадолиния с ФК или полученный комплекс является неустойчивым.

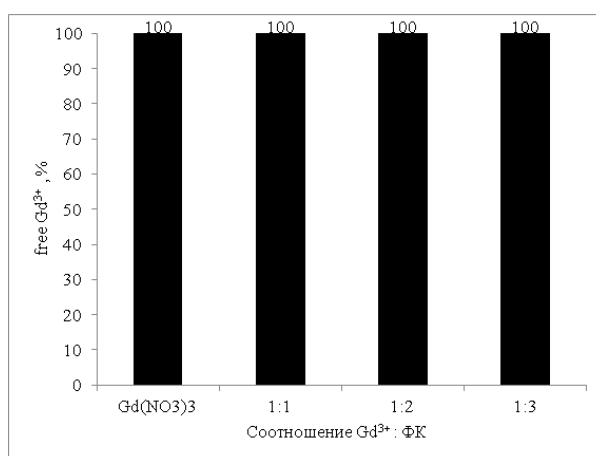


Рисунок 5 – Рассчитанное процентное содержание свободного  $Gd^{3+}$  при различном соотношении  $Gd^{3+}$  : ФК

Для оценки возможности хелатирования ионов гадолиния ФК в условиях гидротермальной обработки навеску  $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$  0,068г, соответствующую концентрации 0,05М, растворяли в 3мл ФК / ФК (ФСБ) и помещали в УЗ – ванну на 10минут. Полученные растворы помещали в тефлоновые стаканчики и автоклавировали при 200°C в течение 1 часа. После автоклавирования

регистрировали спектры испускания, возбуждения и поглощения, а также проводили спектрофотометрическое определение свободного  $Gd^{3+}$ .

Рассчитанное содержание свободного гадолиния составило 100% от введенной концентрации, из чего можно сделать вывод о том, что при повышении температуры также не происходит связывание ионов гадолиния с ФК или полученный комплекс является неустойчивым.

Для оценки хелатирования ионов гадолиния ЛК при комнатной температуре, была приготовлена серия растворов. Для этого, в пробирку помещали стандартный раствор  $Gd^{3+}$  с концентрацией  $3 \cdot 10^{-5}$  М, и добавляли раствор ЛК, с концентрациями  $3 \cdot 10^{-5}$  М,  $6 \cdot 10^{-5}$  М,  $9 \cdot 10^{-5}$  М,  $18 \cdot 10^{-5}$  М,  $27 \cdot 10^{-5}$  М и  $30 \cdot 10^{-5}$  М чтобы соотношение Me:L составляло 1:1, 1:2, 1:3, 1:6, 1:9 и 1:10 соответственно. После чего, для полученной серии растворов проводилось спектрофотометрическое определение свободного  $Gd^{3+}$ . Исходя из полученных данных (рисунок 6), можно сделать вывод, что при трехкратном избытке ЛК происходит полное связывание металла.

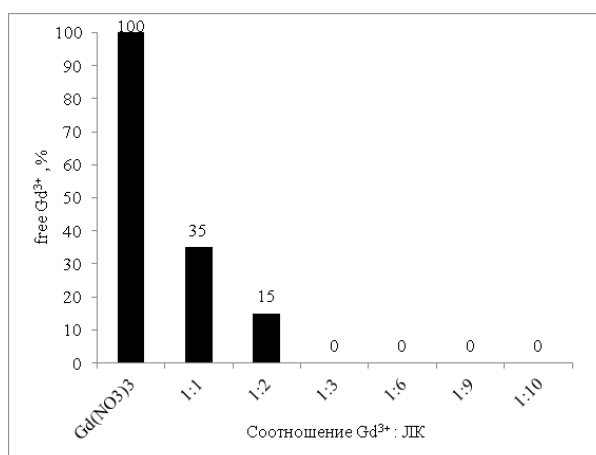


Рисунок 6 – Рассчитанное процентное содержание свободного  $Gd^{3+}$  при различном соотношении  $Gd^{3+}$  : ЛК

С целью увеличения углеродного сырья, а также исключения возможности высвобождения гадолиния в дальнейшей работе было использовано соотношение 1:10.

Gd-УНЧ были приготовлены на основе фолиевой и лимонной кислот, в качестве источника гадолиния выступал  $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ . Соотношение Me:ЛК составило 1:10.



Навески  $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ , соответствующую концентрации 0,05М, 0,1М, 0,15М и 0,2М и ЛК, соответствующие концентрациям 0,5М, 1М, 1,5М и 2М соответственно, растворяли в 4мл бидистиллированной воды и добавляли навеску ФК, соответствующую концентрации 0,001М. Растворы помещали в УЗ – ванну на 10 минут, затем в тефлоновые стаканчики и автоклавировали при 200°C в течение 1 часа. После автоклавирования регистрировали спектры испускания и поглощения, а также проводили фотометрическое определение свободного  $Gd^{3+}$ .

Спектры испускания полученных Gd-УНЧ представлены на рисунке 7. Максимум испускания для полученных образцов расположен в области 490нм, оптимальной длиной волны возбуждения является  $\lambda_{ex}=410$ нм.

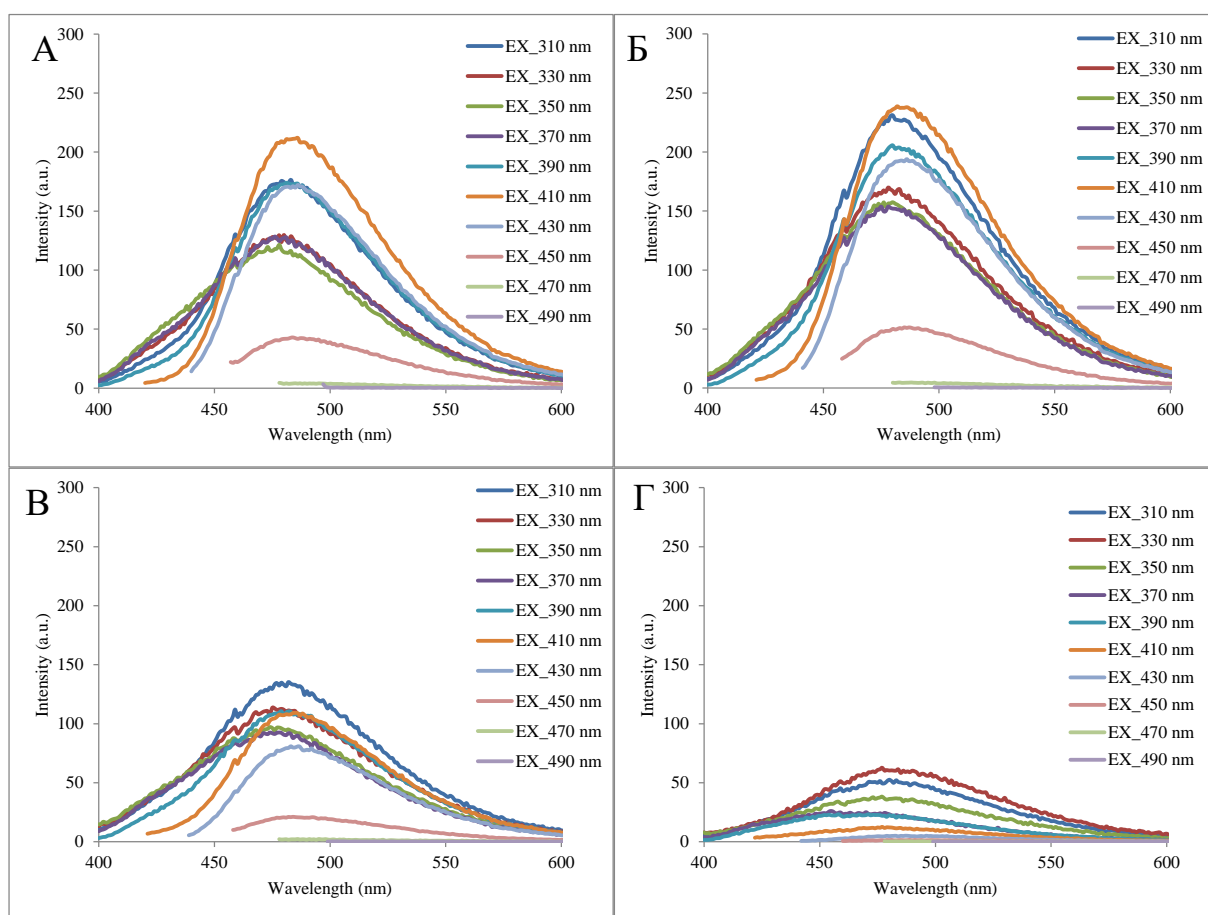


Рисунок 7 – Спектры испускания полученных Gd-УНЧ, при различной концентрации Gd:ЛК (от А до Г соответственно 0,05М:0,5М, 0,1М:1М, 0,15М:1,5М и 0,2М:2М)

$$(A_{\lambda=350} = 0.100 \pm 0.002)$$

С увеличением концентрации металла, происходит уменьшение флуоресценции и КВ (таблица 1). На рисунке 8 (1) представлены спектры испускания полученных образцов при длине волны возбуждения 350 и 410нм. Из зависимостей максимума испускания от концентрации добавки ЛК (рисунок 8 (2)) видно, что с увеличением концентрации металла происходит уменьшение интенсивности испускания, в независимости от длины волны возбуждения (рисунок 8 (2а и 2б)).

Таблица 1 – Квантовый выход и рН полученных Gd-УНЧ

	<b>А</b>	<b>Б</b>	<b>В</b>	<b>Г</b>
C(Gd:ЛК), М:М	0,05:0,5	0,1:1	0,15:1,5	0,2:2
КВ, %	7	8	5	3
рН	0	0	0	0

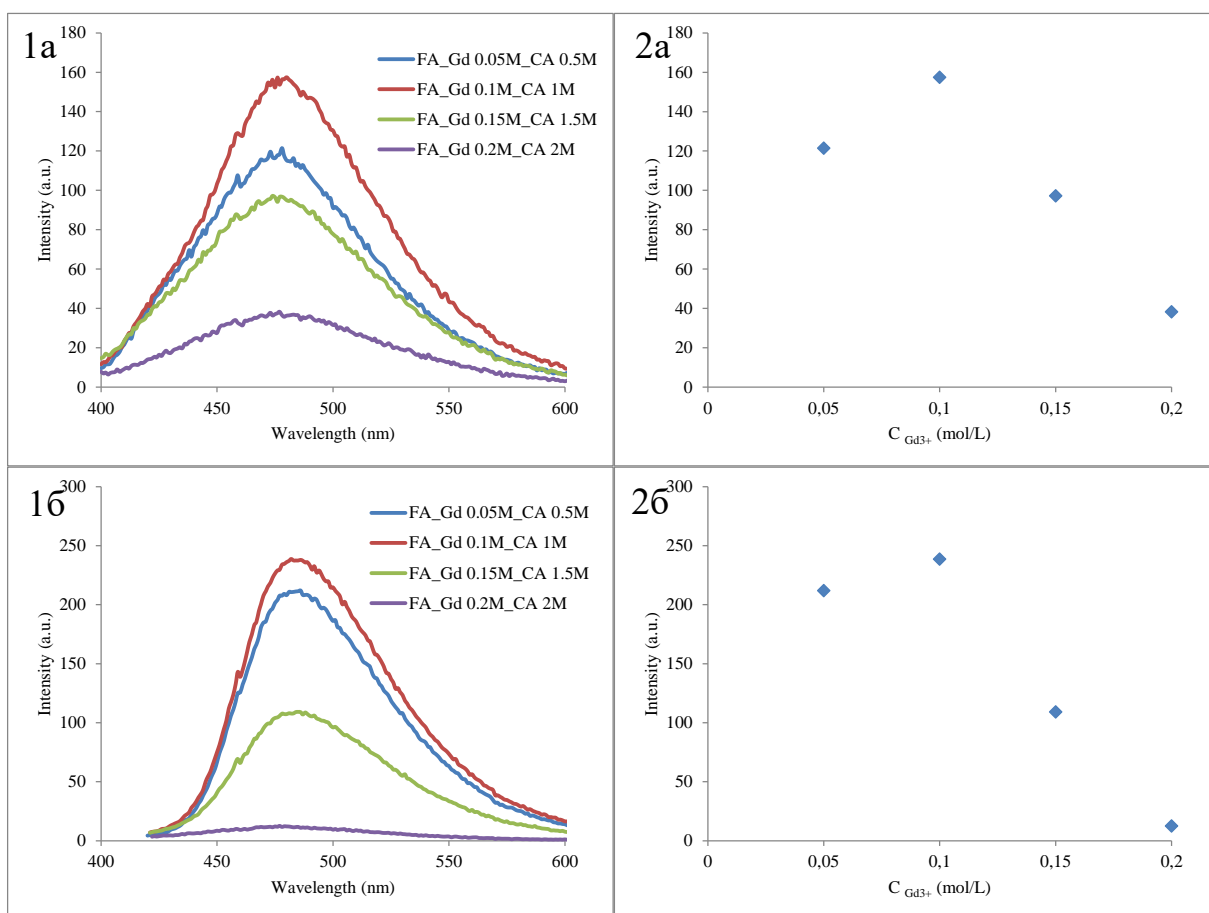


Рисунок 8 – Спектры испускания(1) и зависимость максимума испускания от концентрации добавки Gd<sup>3+</sup>(2) для полученных УНЧ при различной длине возбуждения 350 нм (а) и 410 нм (б) ( $A_{\lambda=350} = 0.100 \pm 0.002$ )

Рассчитанное содержание свободного гадолиния для всех образцов составило 0% от введенной концентрации, из чего можно сделать вывод о том, что происходит связывание ионов гадолиния с углеродной матрицей.

Спектры поглощения и возбуждения полученных образцов представлены на рисунке 9. Из полученных данных также видно появление интенсивной полосы возбуждения (рисунок 9(1б)) и увеличение оптической плотности (рисунок 9(2)) в области 400нм.

С увеличением концентрации Gd:ЛК происходит сглаживание характерной полосы поглощения птеринов, что может быть связано с низким значением рН (таблица б).

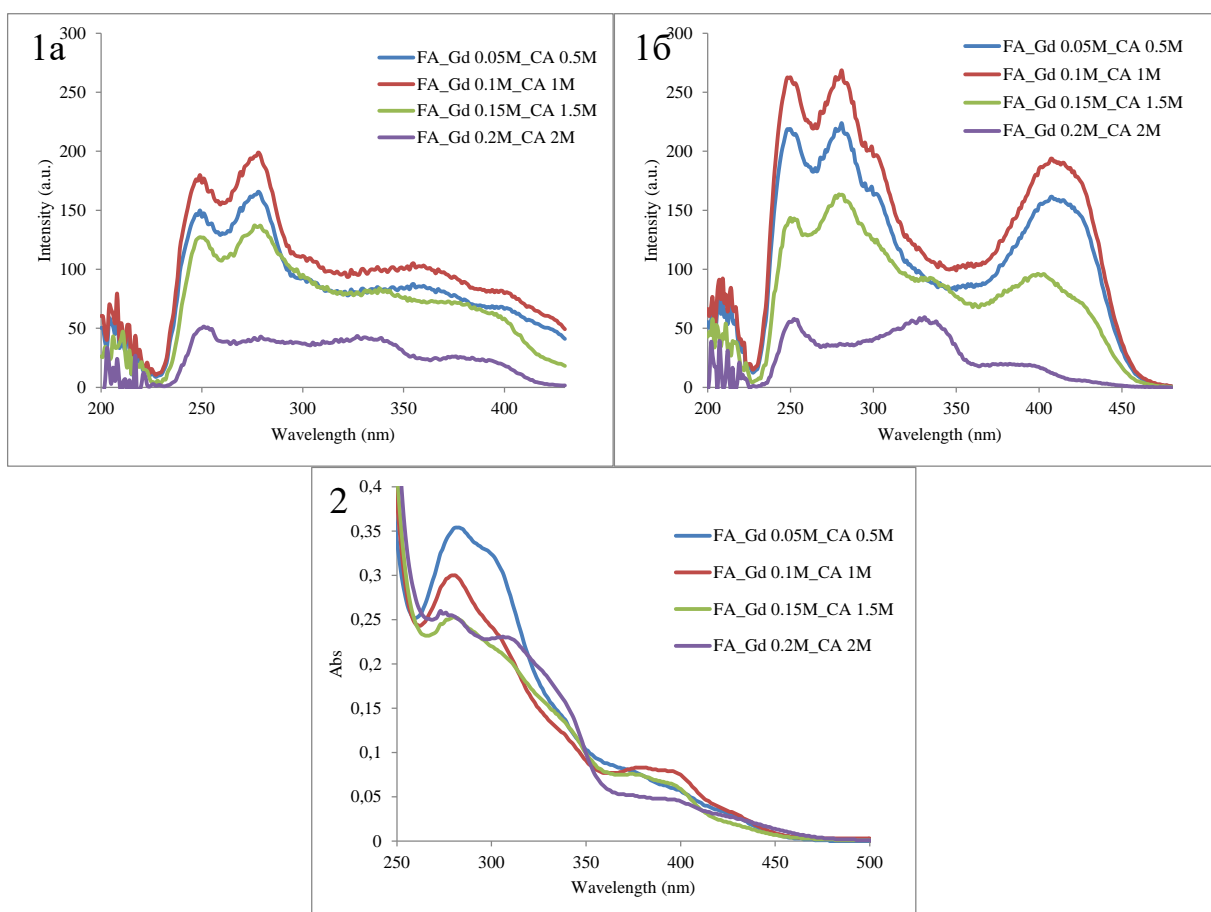


Рисунок 9 – Спектры возбуждения (1) при различной длине волны испускания 450нм(а) и 500нм(б) и спектры поглощения(2) ( $A_{\lambda=350} = 0.100 \pm 0.002$ )

На основе полученных данных, в качестве оптимального соотношения Gd и углеродного сырья было выбрано 0,05M Gd<sup>3+</sup> : 0,5M ЛК и 0,1M Gd<sup>3+</sup> : 1M ЛК, концентрация ФК 0,001M. При данных условиях, полученные частицы обладают наилучшими флуоресцентными свойствами.

В связи с тем, что в спектрах поглощения полученных частиц отсутствует характерная полоса птеринов, необходимо провести дополнительные исследования.

В щелочной среде для ФК происходит увеличение оптической плотности в области 365нм, что является характерным изменением для всех птеринов.

Для идентификации присутствия птеринового фрагмента, полученные Gd-УНЧ были разбавлены раствором воды и 0,1M NaOH в 100 раз и для полученных растворов были зарегистрированы спектры поглощения (рисунок10). В качестве образца использовался щелочной раствор ФК с концентрацией 10<sup>-5</sup>M.

При подщелачивании образцов, происходит появление широкой полосы поглощения в области от 350 до 480нм, тогда как для ФК пик поглощения является более узким. На основании полученных данных, нельзя сделать достоверный вывод о присутствии птеринового фрагмента в полученных образцах.

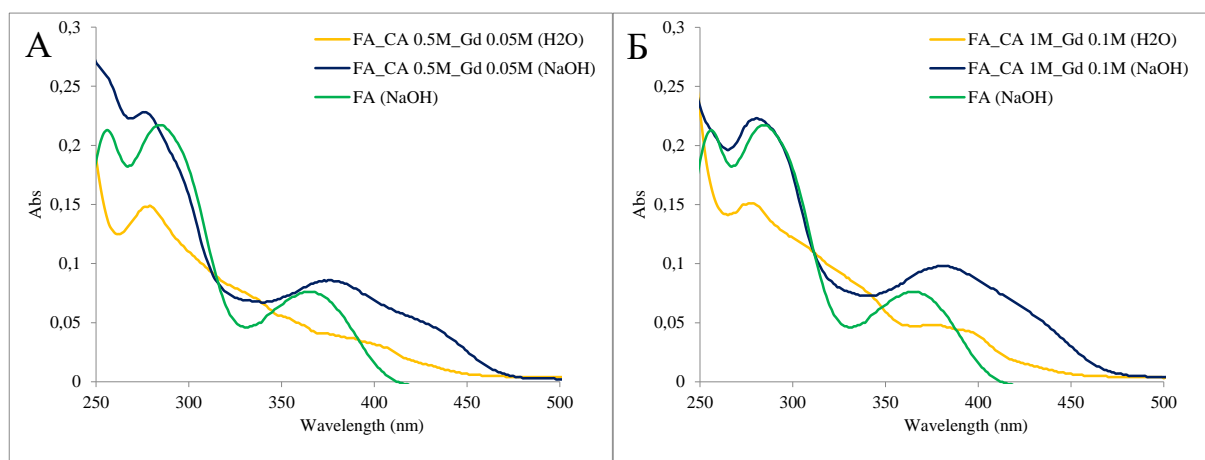


Рисунок 21 – Спектры поглощения водных и щелочных растворов Gd-УНЧ, при молярном соотношении Gd:ЛК 0,05M:0,5M(А) и 0,1M:1M(Б)

## Выводы и заключение

На основании проделанной работы можно сделать следующие выводы:

✓ В результате совместной гидротермальной обработки  $Gd^{3+}$  и фолиевой кислоты не происходит связывание иона-гадолиния в прочный комплекс

✓ При взаимодействии  $Gd^{3+}$  и лимонной кислоты при комнатных условиях происходит полное связывание металла при трехкратном избытке лимонной кислоты

✓ Полученные в результате совместной гидротермальной обработки  $Gd^{3+}$ , лимонной и фолиевой кислот Gd-УНЧ имеют максимум испускания в области 490 нм при оптимальной длине возбуждения 410нм. Рассчитанное содержание свободного  $Gd^{3+}$  составляет 0% от исходной концентрации. Увеличении концентрации металла приводит к уменьшению флуоресценции

✓ Спектры поглощения полученных образцов в растворе NaOH не позволяют сделать достоверного вывода о сохранении птеринового фрагмента.

Таким образом, совместная гидротермальная обработка нитрата гадолиния, фолиевой и лимонной кислот позволяет получить УНЧ, допированные гадолинием и обладающие флуоресценцией в сине-зеленой области спектра. В результате синтеза происходит полное связывание гадолиния с углеродным сырьем, что является важным для дальнейшего применения полученных частиц.

В связи с тем, что данные частицы нацелены на применение в биологических объектах, в дальнейшем необходимо более детально изучать разработанную систему.

### Список используемых источников

- 1 Шимановский, Н.Л. Контрастные средства: руководство по рациональному применению / Н.Л. Шимановский. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 464с. : ил. (библиотека врача специалиста).
- 2 Brücher, E. Kinetic Stabilities of Gadolinium (III) Chelates Used as MRI Contrast Agents / E. Brücher // *Top. Curr. Chem.* – 2002. – Vol. 221. – P. 103–122.
- 3 Hermann, P. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes / P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček and I. Lukeš // *Dalt. Trans.* – 2008. – № 23. – P. 3027–3047.
- 4 Important Drug Warning for All Gadolinium-Based Contrast Agents: PP-CONP-US-0063 May 2018 [Электронный ресурс]: [сайт]. - URL: [https://www.radiologysolutions.bayer.com/static/media/PDFs/Gadolinium\\_Info.pdf](https://www.radiologysolutions.bayer.com/static/media/PDFs/Gadolinium_Info.pdf) (дата обращения 24.01.2019). - Яз. англ.
- 5 Dekaliuk, M.O. Fluorescent carbon nanomaterials: “quantum dots” or nanoclusters? / M.O. Dekaliuk, O. Viagin, Y.V. Malyukin and A.P. Demchenko // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2014. – Vol. 16, № 30. – P. 16075–16084.
- 6 Liao, H. One-pot synthesis of gadolinium(III) doped carbon dots for fluorescence/magnetic resonance bimodal imaging / H. Liao, Z. Wang, S. Chen, H. Wu, X. Ma, and M. Tan // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 5, № 82. – P. 66575–66581.
- 7 Xu, Y. Carbon Quantum Dot Stabilized Gadolinium Nanoprobe Prepared via a One-Pot Hydrothermal Approach for Magnetic Resonance and Fluorescence Dual-Modality Bioimaging / Y. Xu, X.H. Jia, X.B. Yin, X.W. He, and Y.K. Zhang // *Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 86, № 24. – P. 12122–12129.
- 8 Barge, A. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note / A. Barge, G. Cravotto, E. Gianolio and F. Fedeli // *Contrast Med. Mol. Imaging.* – 2009. – Vol. 1. – P. 184–188.
- 9 Trilry, C. Etude Spectroscopique De l’Acide folique / C. Trilry // *Eur. J. Biochem.* – 1973. – Vol. 37, № 1. – P. 100–108.