

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

**Гидротермальный синтез наночастиц оксида церия, модифицированных
флуором
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТРСКОЙ РАБОТЫ**

Студента (ки) 2 курса 251 группы

направления 04.04.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Пигарева Сергея Викторовича

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
зав. кафедры, д.х.н., проф.

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., проф.

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Саратов 2024 г.

Введение

Актуальность работы. За последнее десятилетие применение наночастиц оксида церия (НЧ CeO_2) вызвало растущий интерес в различных областях, таких как материаловедение, химия, биология и медицина. Физико-химический состав НЧ может быть изменен таким образом, чтобы сделать их инертными или реакционноспособными по отношению к реагенту или окружающей среде. Широкий интерес к использованию НЧ CeO_2 в биомедицинских целях, а также в химической и нефтяной промышленности. НЧ CeO_2 имеют кристаллическую структуру флюорита с большим количеством кислородных вакансий, возникающих из-за дефектов решетки. Образование и миграция кислородных вакансий в НЧ CeO_2 приводят к обратимому превращению Ce(III) в Ce(IV) . Это основная причина их превосходных антиоксидантных свойств. Способность атомов Ce в наночастицах CeO_2 переключаться между валентными состояниями позволяет им имитировать определенные функции ферментов. Эти ферментоподобные свойства указывают на значительный потенциал НЧ CeO_2 в терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

Для эффективного применения НЧ CeO_2 в биомедицинских приложениях необходимо, чтобы НЧ имели малый размер с небольшой дисперсией и высокую коллоидную стабильность в биологических средах. Как правило, существующие подходы к синтезу и модификации НЧ CeO_2 удовлетворяющим этим требованиям сложны и многостадийны. В связи с этим, перспективным направлением является разработка методов одnoreакторного синтеза НЧ CeO_2 . Особенно перспективно создание НЧ CeO_2 со стабильной интенсивной флуоресценцией, поскольку это открывает возможности одновременной биовизуализации и терапии.

Целью работы является получение и характеристика НЧ CeO_2 , модифицированных флуорофором.

Задачи:

1. Синтез НЧ CeO_2 , модифицированных флуороформ, подбор оптимальных условий для получения НЧ с малым размером, высокой коллоидной стабильностью и интенсивностью флуоресценции

2. Изучение физико-химических свойств (морфологии и оптических свойств) полученных НЧ;

3. Оценка автокаталитических свойств и стабильности флуоресцентных свойств НЧ в присутствии окислителя;

4. Оценка цитотоксичности и возможности интернализации полученных НЧ CeO_2 клетками L929 (мышинные фибробласты).

Практическая значимость. Получение материалов, которые обладают высокой коллоидной стабильностью и интенсивной флуоресценцией, позволит использовать их в качестве флуоресцентных меток для визуализации и терапии одновременно.

Научная новизна данной работы заключается в получении малых и высокостабильных НЧ поверхность которых модифицирована флуороформом, которые в дальнейшем могут применяться для визуализации и терапии.

Структура и объем работы. Работа включает в себя введение, 3 основные главы (15 разделов), Выводы и заключение, технику безопасности и список используемых источников, состоящий из 95 наименований. Работа изложена на 53 листах, включая 14 рисунков.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы работы, изложена научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и задачи.

В первой главе представлен литературный обзор, в котором рассмотрены уникальные свойства НЧ CeO_2 , а также условия их применения в терапевтических целях. Описана структура НЧ CeO_2 и уникальная особенность данных НЧ изменять степень окисления от которой зависят свойства и структура. В литературном обзоре описаны методы синтеза НЧ CeO_2 , их преимущества и недостатки. Также рассмотрены примеры использования НЧ в биомедицинских целях, таких как доставка лекарств, антибактериальный агент, биокаркас, антиоксидантный агент.

Во второй главе представлено описание используемого оборудования и реагентов, описаны методы исследования. Представлена методика синтеза НЧ CeO_2 , оценки автокаталитических свойств НЧ CeO_2 -ИПКА, анализа цитотоксичности НЧ CeO_2 -ИПКА, интернализации НЧ CeO_2 -ИПКА клетками, расчета квантового выхода.

В третьей главе представлено описание результатов экспериментов, полученных в ходе работы.

Размер и заряд очищенных НЧ CeO_2 -ИПКА были охарактеризованы методом динамического рассеяния света (ДЛС). Результаты ДЛС показали, что образцы, полученные при соотношениях Ce^{3+} и ЛК 1:3 и 1:4, имеют одномодальное распределение по размерам (рис. 1а). Метод ДЛС не позволил корректно оценить гидродинамический диаметр НЧ CeO_2 -ИПКА, полученных при соотношении Ce^{3+} :ЛК 1:1. Предположительно зарождение нанокристаллов может происходить в небольших количествах или с небольшим размером, недостаточным для обнаружения методом ДЛС. Этот образец характеризуется двумя ζ -потенциалами -30 ± 4 и $+8 \pm 2$ мВ с преобладанием положительного (рис. 1б). При увеличении концентрации ЛК (соотношение Ce^{3+} и ЛК 1:2) образуются частицы с гидродинамическим диаметром 80 ± 5 нм, а также агрегаты > 1 мкм (рис. 1а). При этом наблюдаются два ζ -потенциала -25 ± 5 и

+21±2 мВ, с преобладанием отрицательного. Это свидетельствует о том, что при соотношении Ce^{3+} к ЛК 1:1 и 1:2 НЧ CeO_2 -ИПКА не образуются или происходит их агрегация из-за недостаточной стабилизации поверхности. Известно, что цитрат может образовывать хелатный комплекс с НЧ Ce^{4+} через центральные карбоксильные и α -гидроксильные группы ЛК [5]. В результате функциональные группы ЛК, участвующие в образовании флуорофора ИПКА, могут оказаться стерически недоступными. В ходе синтеза могут образовываться ИПКА-подобный флуорофор и продукты поликонденсации ЭДА [1,2,6] с различным зарядом.

При соотношении Ce^{3+} к ЛК 1:3 гидродинамический диаметр составил 20 ± 2 нм (рис. 1а) с индексом полидисперсности $0,21 \pm 0,04$ (табл. 1), ζ -потенциалом -45 ± 2 мВ (рис. 1б). Результаты демонстрируют, что данные НЧ CeO_2 -ИПКА имеют узкое распределение по размерам и высокую коллоидную стабильность. Дальнейшее увеличение концентрации ЛК (соотношение 1:4) приводит к образованию более крупных НЧ – 108 ± 12 нм с ζ -потенциалом -18 ± 3 мВ (рис. 1). Увеличение размера частиц связано с избытком ЛК и ЭДА в реакционной смеси. Предположительно, это может привести к побочным реакциям поликонденсации между ЛК и ЭДА, в результате которых НЧ CeO_2 -ИПКА сшиваются друг с другом.

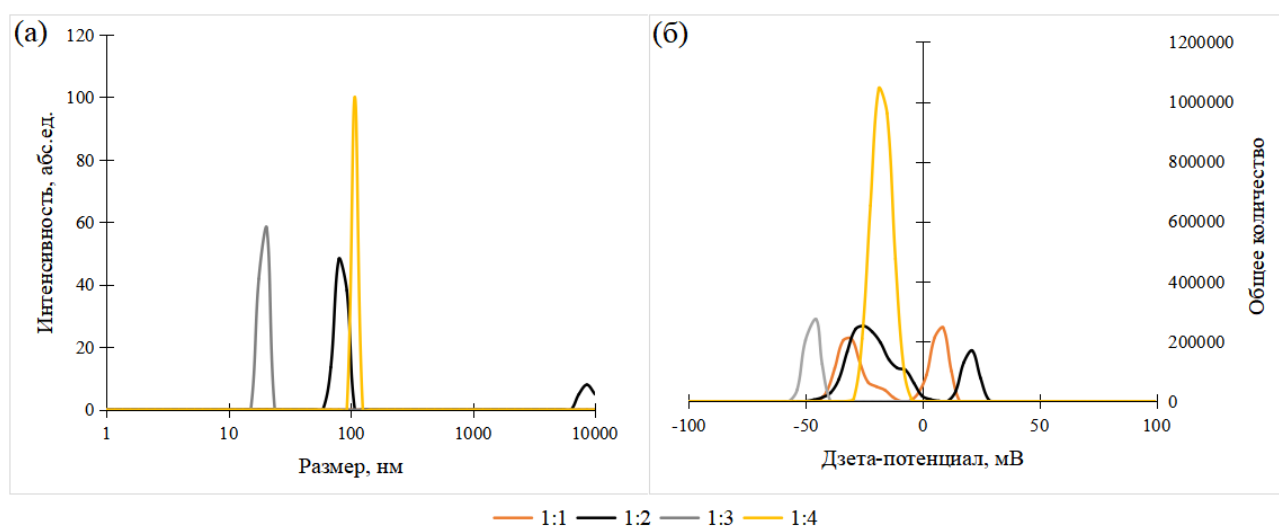


Рисунок 1. Гидродинамический диаметр (ДЛС)(а), дзета-потенциалы НЧ CeO_2 -ИПКА, полученных с различным соотношением Ce^{3+} и ЛК

Спектр поглощения молекулярной ИПКА имеет характерную полосу поглощения при 350 нм. Для сравнения полученных образцов спектры регистрировали при оптической плотности $0,100 \pm 0,003$ на длине волны 350 нм. На рисунке 2а представлены спектры поглощения образцов, полученных при различных соотношениях Ce^{3+} и ЛК, а также образца ИПКА, синтезированного в отсутствие Ce^{3+} . При изменении соотношения существенных изменений формы и положения максимума поглощения при 350 нм не наблюдается. При соотношении Ce^{3+} : ЛК 1:4 наблюдается уширение полосы в длинноволновой области (рис. 2б). Это связано с наличием в образце более крупных частиц (размером 108 ± 12 нм), рассеивающих свет. Известно, что НЧ CeO_2 имеют характерное поглощение в области 200-400 нм, обусловленное переходами с переносом заряда от атомов О к Се [7,8]. В результате у полученных образцов наблюдается более высокая оптическая плотность в этой области, чем у ИПКА.

Таблица 1. Морфологические, электрокинетические значения и значения КВ НЧ CeO_2 -ИРСА, полученных с различными соотношениями Ce^{3+} и ЛК.

Соотношение Ce^{3+} :ЛК	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности	ζ -потенциал, мВ	Квантовый выход, %
1:1	-	-	$-30 \pm 4, +8 \pm 2$	9 ± 3
1:2	$80 \pm 5; 8600 \pm 200$	$1,14 \pm 0,09$	$-25 \pm 5, +21 \pm 2$	20 ± 2
1:3	20 ± 2	$0,21 \pm 0,04$	-45 ± 2	62 ± 2
1:4	108 ± 12	$0,86 \pm 0,07$	-18 ± 3	12 ± 2

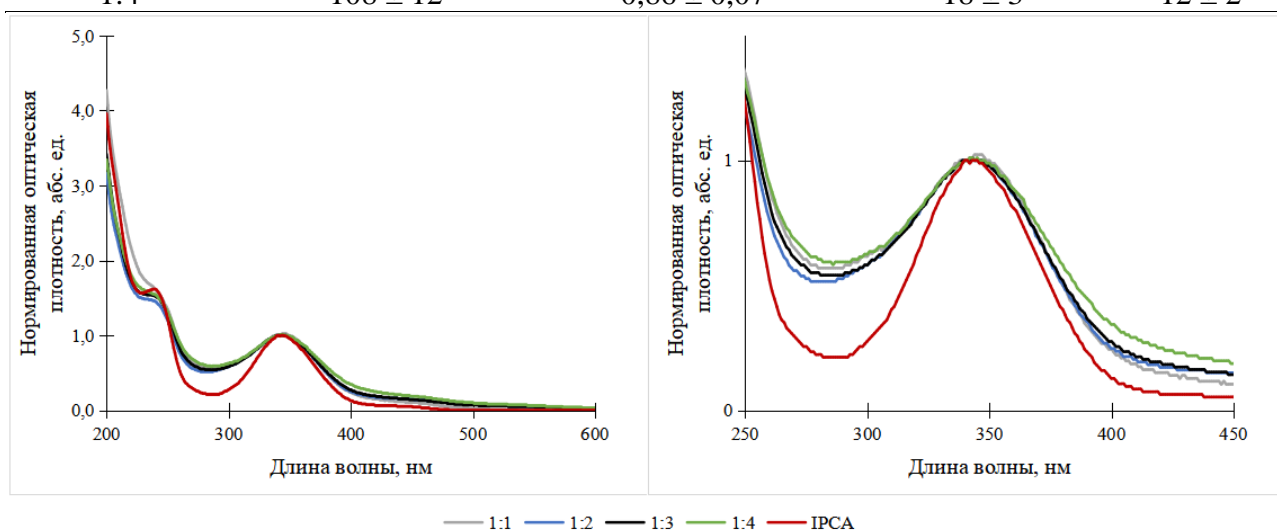


Рисунок 2. Спектры поглощения (а) и нормированные спектры поглощения (б) НЧ CeO_2 -ИПКА, полученных с различным соотношением Ce^{3+} и ЛК.

Для всех образцов НЧ CeO_2 -ИПКА не наблюдалось смещения максимума флуоресценции от длины волны возбуждения (рис.3). Это свидетельствует о том, что в процессе синтеза не образуются побочных наноструктур на основе углерода. Максимум излучения полученных образцов расположен в области 445–450 нм, а эффективная длина волны возбуждения совпадает с полосой поглощения и составляет 350 нм (рис. 4а). При сравнении спектров люминесценции видно, что характерный максимум для ИПКА ($\lambda_{\text{em}} = 450$ нм) сохраняется для образца при соотношении Ce^{3+} и ЛК, равном 1:3. Для остальных образцов наблюдается небольшой сдвиг в сторону более коротких волн ($\lambda_{\text{em}} = 445$ нм) (вставка на рис. 4б).

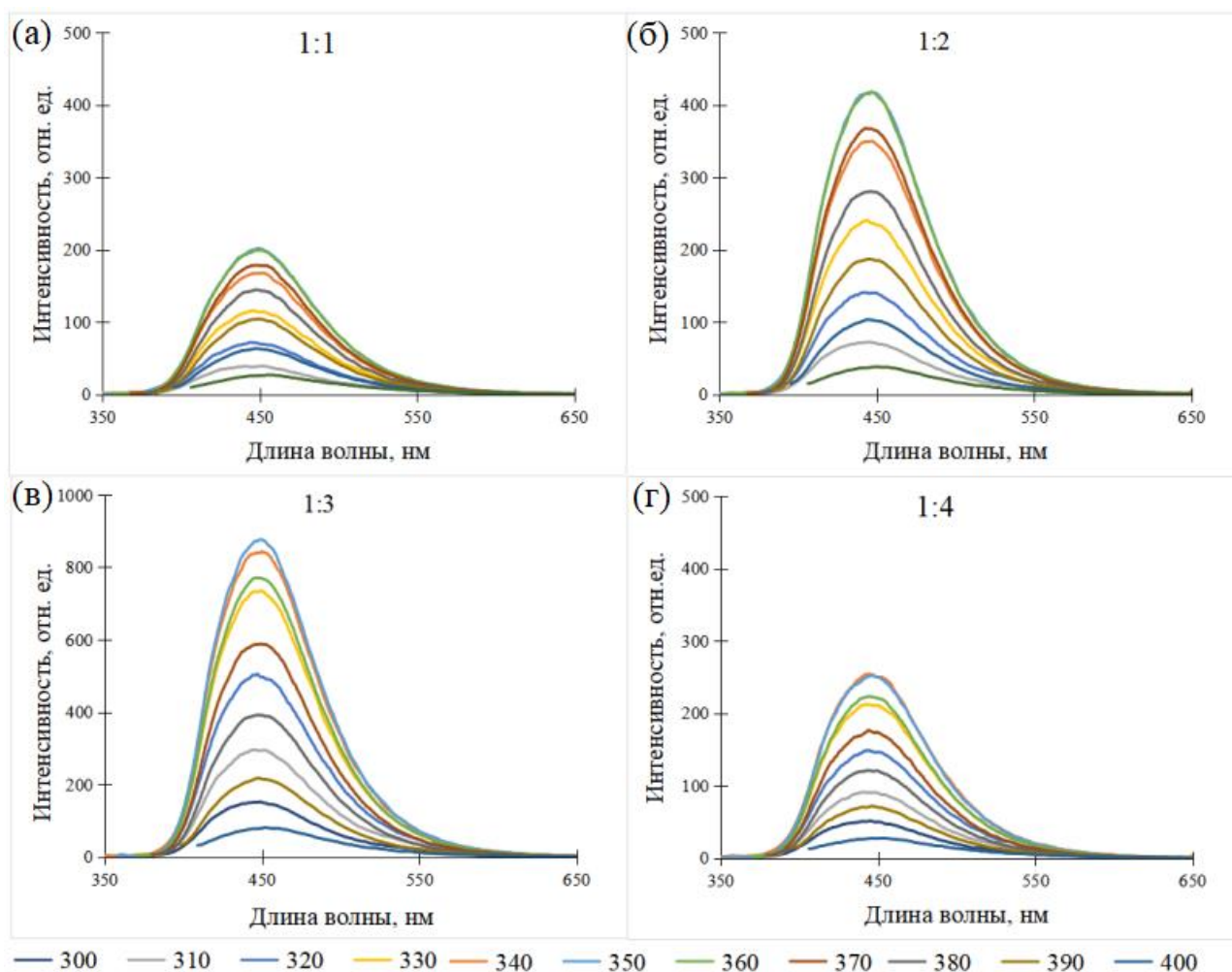


Рисунок 3. Спектры люминесценции ($\lambda_{\text{ex}} = 300\text{-}400$ нм) НЧ CeO_2 -ИПКА, полученных с различным соотношением Ce^{3+} и ЛК

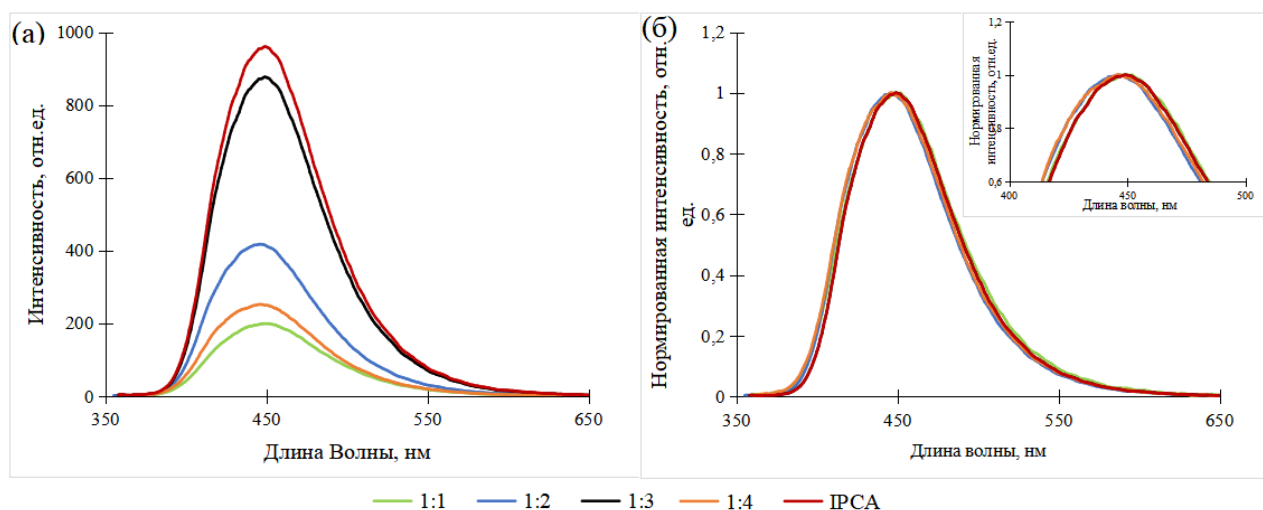


Рисунок 4. Спектры люминесценции ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ нм) (а) и нормированные спектры люминесценции (б) НЧ CeO_2 -ИПКА, полученных с различным соотношением Ce^{3+} и ЛК

Для оценки эффективности эмиссии измеряли относительный КВ (табл. 1) полученных образцов. Известно, что ИПКА, полученная гидротермальным методом из ЛК и ЭДА, имеет относительно высокий КВ $>60\%$ [3,4]. НЧ CeO_2 -ИПКА, полученные при соотношении Ce^{3+} :ЛК 1:3, имеют КВ $62\pm 2\%$, что сопоставимо с молекулярным флуорофором ИПКА. Образцы с другими соотношениями характеризуются меньшим КВ (табл. 1). Изменение положения максимума флуоресценции и низкий КВ также подтверждают предположение о протекании побочных реакций в процессе синтеза.

Таким образом, оптические характеристики полученных НЧ CeO_2 -ИПКА с соотношением Ce^{3+} :ЛК 1:3 коррелируют со спектральными характеристиками молекулярного флуорофора ИПКА. Это указывает на образование флуорофора ИПКА на поверхности НЧ CeO_2 при гидротермальном синтезе. В связи с этим соотношение Ce^{3+} :ЛК 1:3 является оптимальным для синтеза НЧ CeO_2 -ИПКА, а дальнейшее рассмотрение образцов при других соотношениях нецелесообразно.

Для демонстрации автокаталитических свойств полученных НЧ CeO_2 -ИПКА были проведены спектроскопические исследования на пропускание в УФ-видимой области спектра в отсутствие и присутствии H_2O_2 (окислителя).

При добавлении H_2O_2 к НЧ CeO_2 -ИПКА наблюдается значительный сдвиг спектра в длинноволновую область по сравнению со спектром НЧ CeO_2 без

добавления H_2O_2 (рис. 5). Это связано с изменением степени окисления Ce^{3+} на Ce^{4+} . Далее раствор НЧ CeO_2 -ИПКА, с добавлением H_2O_2 , хранили в темноте для дальнейших измерений в течение 7 дней. С течением времени наблюдался постепенный гипсохромный сдвиг спектра. Это изменение спектра отражает авторегенерацию НЧ CeO_2 -ИПКА (от Ce^{4+} до Ce^{3+}). При дополнительном введении H_2O_2 в спектре вновь наблюдалось красное смещение (рис. 5). Однако процесс повторного окисления протекает в меньшей степени, чем первичная реакция окисления. Оптическая плотность в области 600 нм не меняется при добавлении H_2O_2 ; следовательно, не происходит значительной агрегации частиц. Это указывает на высокую коллоидную стабильность НЧ при изменении степени окисления $Ce^{3+} \rightarrow Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+}$ в НЧ.

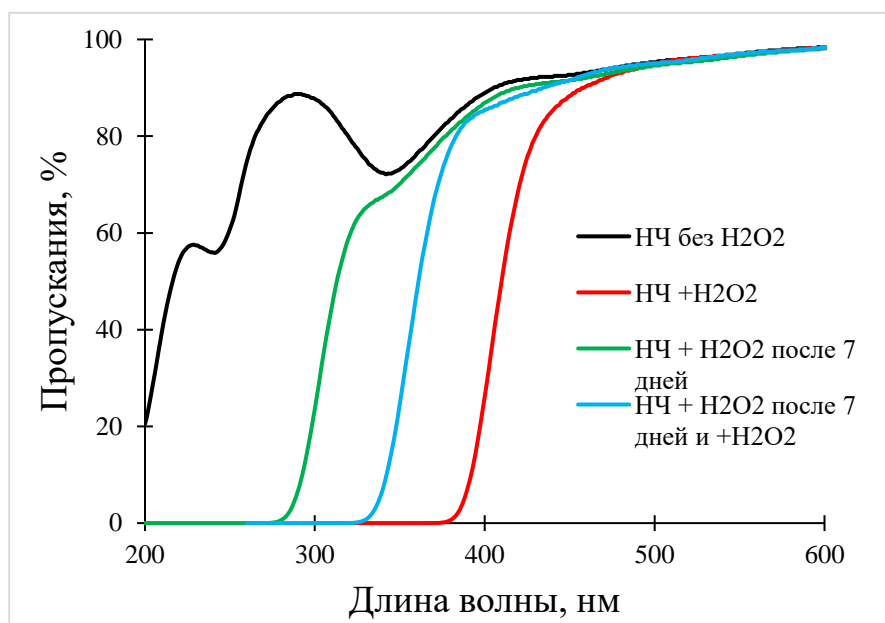


Рисунок 5. Спектры пропускания в УФ-видимом диапазоне НЧ CeO_2 -ИПКА в присутствии и отсутствии H_2O_2 .

Также было изучено изменение флуоресцентных свойств НЧ CeO_2 -ИПКА в присутствии H_2O_2 . При добавлении H_2O_2 к НЧ существенных изменений в спектре флуоресценции не происходит (рис. 6а). Однако со временем наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции. Через 7 дней интенсивность флуоресценции снизилась на 52%, изменений положения максимума флуоресценции не произошло, но наблюдалось уширение спектра. При дальнейшем добавлении H_2O_2 снижение интенсивности флуоресценции

незначительно. Тем не менее наблюдается смещение максимума излучения в коротковолновую область ($\lambda_{em} = 445$ нм) (рис. 6а, б). Предположительно, эти изменения связаны с частичным отрывом молекул ИПКА от поверхности НЧ и их окислением в присутствии H_2O_2 . Добавление H_2O_2 не приводит к дальнейшему отрыву молекул ИПКА, но возможно могут происходить некоторые изменения в структуре молекулы.

Таким образом, результаты показали, что полученные НЧ CeO_2 -ИПКА демонстрируют быстрое автогенеративное каталитическое восстановление. Это позволяет предположить, что флуоресцентные НЧ CeO_2 -ИПКА можно эффективно использовать в качестве антиоксиданта.

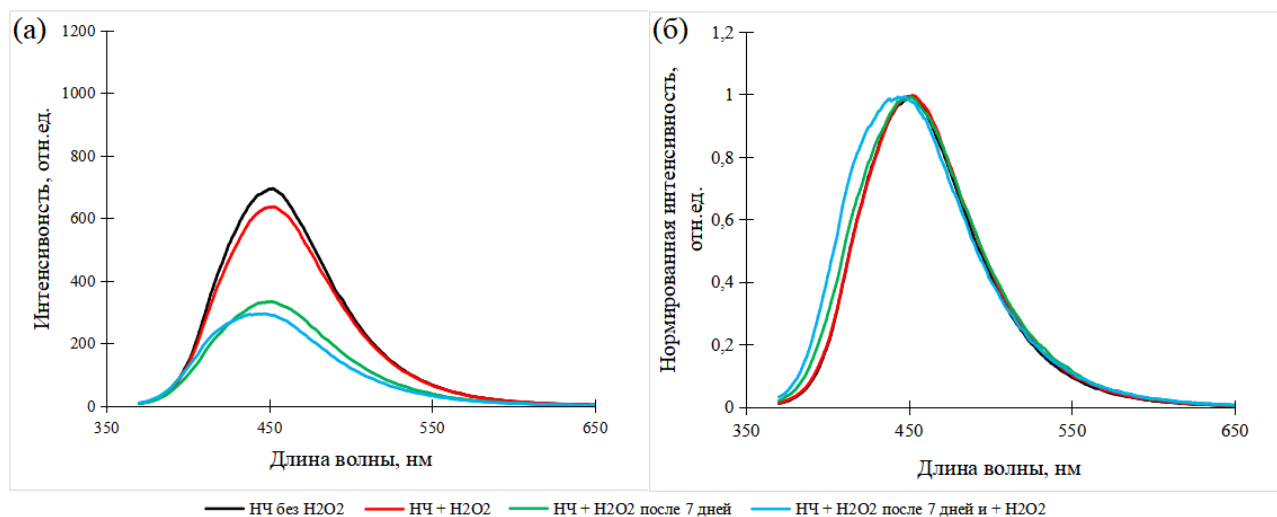


Рисунок 6. Спектры флуоресценции (а) и нормализованный спектр флуоресценции (б), НЧ CeO_2 -ИПКА в присутствии и отсутствии H_2O_2 .

Для дальнейшего использования полученных НЧ CeO_2 -ИПКА в биомедицинских областях, НЧ должны обладать хорошей биосовместимостью. Клетки L929 использовали для изучения цитотоксичности НЧ CeO_2 -ИПКА *in vitro*. Жизнеспособность клеток L929 изучалась при инкубации с НЧ CeO_2 -ИПКА при различных концентрациях. Для НЧ CeO_2 -ИПКА изменения жизнеспособности клеток по сравнению с контролем незначительны (рис. 7). Результаты демонстрируют, что цитотоксичность не наблюдалась в экспериментальных условиях для НЧ CeO_2 -ИПКА при всех исследуемых концентрациях.

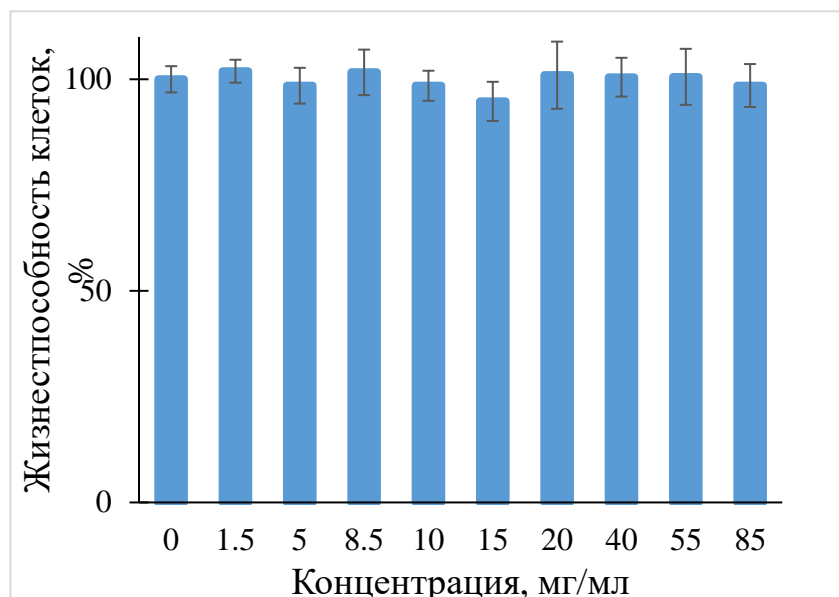


Рисунок 7. Жизнеспособность клеток L929 в зависимости от различных инкубированных концентраций наночастиц CeO_2 -ИПКА.

После установления отсутствия цитотоксичности была оценена интернализация НЧ CeO_2 -ИПКА клетками L929. Как показано на рис. 8, клетки, предварительно инкубированные с НЧ CeO_2 -ИПКА в течение 3 часов, проявляют слабую флуоресценцию, незначительно отличающуюся от автофлуоресценции клеток. При более длительной инкубации (24 часа) клеток с НЧ CeO_2 -ИПКА наблюдается усиление флуоресценции, что связано с накоплением НЧ внутри клеток. Флуоресценция НЧ CeO_2 -ИПКА наблюдается преимущественно в области ядра клетки. Примечательно, что во время наблюдения (регистрации сигнала) флуоресценции не происходит фотомерцания и обесцвечивания, это указывает на высокую фотостабильность НЧ CeO_2 -ИПКА.

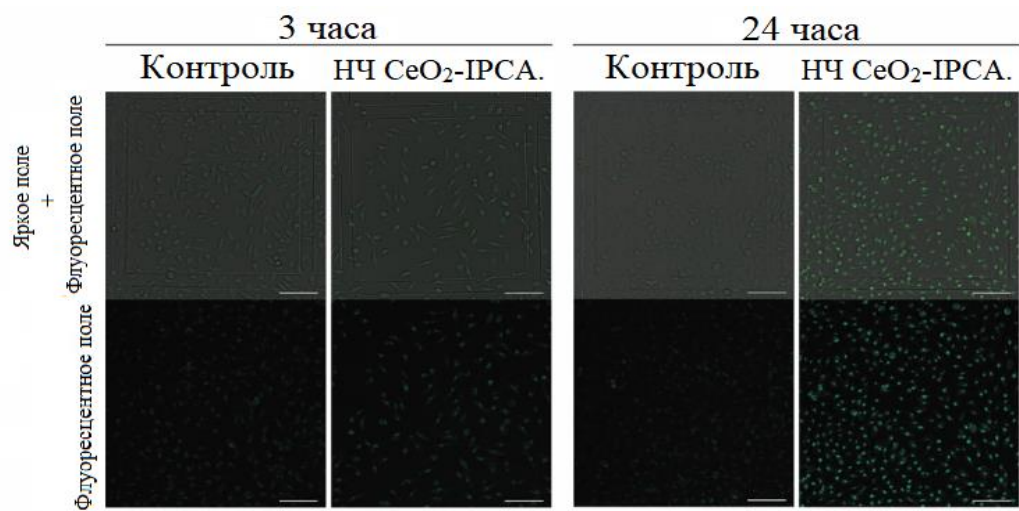


Рисунок 8. Изображения КЛСМ (масштаб 100 мкм) интернализованных НЧ СеО₂-ИПКА клетками L929

Выводы

На основании полученных данных можно сделать выводы:

1. Образцы, полученные при соотношении Ce^{3+} :ЛК 1:1 и 1:2 свидетельствуют о том, что НЧ CeO_2 не образуются или проходит их агрегация из-за недостаточной стабильности поверхности. Результаты, полученные при соотношении Ce^{3+} :ЛК 1:3 демонстрируют, что НЧ CeO_2 -ИПКА имеют узкое распределение по размеру (20 ± 2 нм) и высокую коллоидную стабильность (-45 ± 2 мВ). Дальнейшее увеличение концентрации ЛК приводит к образованию более крупных НЧ. Это связано с сшиванием НЧ друг с другом.

2. Данные оптических характеристик полученные при соотношении Ce^{3+} :ЛК 1:3 коррелируют со спектральными характеристиками молекулярного флуорофора ИПКА. Это указывает на образование флуорофора ИПКА на поверхности НЧ CeO_2 .

3. В результате оценки автокаталитических свойств НЧ CeO_2 можно сделать вывод, что в присутствии H_2O_2 происходит изменение степени окисления $\text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+} \rightarrow \text{Ce}^{3+}$. это указывает на авторегенерацию. Повторное окисление не приводит к агрегации частиц, что указывает на высокую коллоидную стабильность НЧ при изменении степени окисления.

4. Анализ на цитотоксичность показал, что жизнеспособность клеток в присутствии НЧ CeO_2 -ИПКА снижалась незначительно. Результаты интернализации показали, что при инкубации в 24 часа наблюдается усиление флуоресценции обусловлено накоплением НЧ внутри клетки. Отсутствие фотомерцания и обесцвечивания указывает на высокую фотостабильность НЧ CeO_2 .

Таким образом, нами был успешно разработан однореакторный метод синтеза НЧ CeO_2 , модифицированных флуорофором (ИПКА). Многофункциональные НЧ CeO_2 -ИПКА были синтезированы простым и эффективным гидротермальным методом в одну стадию. Использование *in-situ* синтезированного флуорофора в качестве модификатора НЧ CeO_2 придает НЧ

хорошую гидрофильность, биосовместимость и высокий и квантовый выход флуоресценции ~62%.

Полученные НЧ CeO_2 обладают многими необходимыми требованиями для их потенциального применения в биовизуализации и лечении заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Schneider, J.; Reckmeier, C. J.; Xiong, Y.; von Seckendorff, M.; Susha, A. S.; Kasák, P.; Rogach, A. L. Molecular Fluorescence in Citric Acid-Based Carbon Dots. *J. Phys. Chem. C* 2017, 121 (3), 2014–2022.
2. Song, Y.; Zhu, S.; Zhang, S.; Fu, Y.; Wang, L.; Zhao, X.; Yang, B. Investigation from Chemical Structure to Photoluminescent Mechanism: A Type of Carbon Dots from the Pyrolysis of Citric Acid and an Amine. *J. Mater. Chem. C* 2015, 3 (23), 5976–5984.
3. Podkolodnaya, Y. A.; Kokorina, A. A.; Goryacheva, I. Y. A Facile Approach to the Hydrothermal Synthesis of Silica Nanoparticle/Carbon Nanostructure Luminescent Composites. *Materials* 2022, 15 (23), 8469.
4. Kokorina, A. A.; Bakal, A. A.; Shpuntova, D. V.; Kostritskiy, A. Y.; Beloglazova, N. V.; De Saeger, S.; Sukhorukov, G. B.; Sapelkin, A. V.; Goryacheva, I. Y. Gel Electrophoresis Separation and Origins of Light Emission in Fluorophores Prepared from Citric Acid and Ethylenediamine. *Sci. Rep.* 2019, 9 (1), 14665.
5. Auffan, M.; Masion, A.; Labille, J.; Diot, M.-A.; Liu, W.; Olivi, L.; Proux, O.; Ziarelli, F.; Chaurand, P.; Geantet, C.; Bottero, J.-Y.; Rose, J. Long-Term Aging of a CeO₂ Based Nanocomposite Used for Wood Protection. *Environ. Pollut.* 2014, 188, 1–7.
6. Essner, J. B.; Kist, J. A.; Polo-Parada, L.; Baker, G. A. Artifacts and Errors Associated with the Ubiquitous Presence of Fluorescent Impurities in Carbon Nanodots. *Chem. Mater.* 2018, 30 (6), 1878–1887.
7. Hernández-Alonso, M. D.; Hungría, A. B.; Martínez-Arias, A.; Coronado, J. M.; Conesa, J. C.; Soria, J.; Fernández-García, M. Confinement Effects in Quasi-Stoichiometric CeO₂ Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004, 6 (13), 3524–3529.
8. Tsunekawa, S.; Fukuda, T.; Kasuya, A. Blue Shift in Ultraviolet Absorption Spectra of Monodisperse CeO_{2-x} Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* 2000, 87 (3), 1318–1321.