

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

**Высоколюминесцентные структуры на основе лимонной кислоты и
азотсодержащих молекул**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента (ки) 2 курса 251 группы

направления 04.04.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Шпунтовой Дарьи Владимировны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
профессор, д.х.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:
Профессор, д.х.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Д.Г. Черкасов
инициалы, фамилия

Саратов 2020 г.

Введение

Актуальность работы. В эволюции флуоресцентных материалов значительные усилия были направлены на разработку фотолюминесцентных сенсоров, не содержащих тяжелых металлов и с низкой токсичностью. Углеродные наночастицы (УНЧ), один из классов этих сенсоров, привлекли большое внимание в последние годы.

Люминесцентные УНЧ, нашли применение в широком спектре областей, таких как фотокатализ, аналитическая химия, биоимиджинг и т. д. Эта популярность обеспечивается благодаря: яркой фотолюминесценции, легкому синтезу, хорошей биосовместимости, фото- и химической стабильности. Однако структура и механизм люминесценции этих новых наночастиц является предметом дискуссий. Существуют теории присутствия sp^2 -гибридизованных доменов, погруженных в аморфную sp^3 -гибридизованную матрицу, которая обеспечивает зависимое от возбуждения излучение УНЧ. Недавние исследования демонстрируют другую модель фотолюминесценции (ФЛ), основанную на присутствии органических флуорофоров в углеродной смеси.

Лимонная кислота (ЛК) стала хорошим исходным реагентом для получения флуорофоров, благодаря наличию трех функциональных карбоксильных групп для комбинации с другими группами. Это позволяет получать наноструктуры с квантовыми выходами (КВ) более 70%.

Методы исследования. Регистрацию спектров поглощения растворов проводили на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800. Измерения спектров испускания растворов проводили на спектрофотометре Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, который предназначен для измерения и регистрации спектров испускания и возбуждения флуоресценции веществ в области спектра 220-820 нм.

Размер и форму частиц регистрировали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEOL 2010.

Наличие функциональных групп в полученных образцах регистрировали на ИК-спектрометре Shimadzu IRAffinity-1S.

Исследование структуры образцов проводили на ЯМР-спектрометре Varian-400.

Практическая значимость. Практическая значимость исследования заключается в возможности использования его результатов в иммуноанализе. Полученные люминесцентные УНЧ на основе ЛК и трис(гидроксиметил)аминомета (трис) с КВ 13% могут быть использованы в качестве универсальной биосовместимой метки, конъюгированной с антителами, для визуализации и таргетинга.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлся синтез флуорофоров и УНЧ с высоким КВ на основе ЛК и азотсодержащих молекул, изучение свойств и структуры полученных материалов.

Научная новизна. Состоит в:

1. оптимизации методик синтеза УНЧ и флуорофоров на основе ЛК с высоким КВ,
2. проведении исследований оптических свойств и структуры полученных наноструктур,
3. переходе к нетоксичным и безопасным исходным реагентам для создания биосовместимой метки.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, методик синтеза и очистки люминесцентных структур, изложения результатов и их обсуждения (3 главы), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 37 ссылок. Работа изложена на 53 страницах, содержит 38 рисунков и 2 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность проведенных исследований, сформулирована их основная цель, описаны научная новизна и практическая значимость.

В **главе 1** представлен обзор литературы, в котором описаны способы получения различных люминесцентных материалов из ЛК. Рассмотрены методы синтеза флуорофоров и люминесцентных УНЧ на основе ЛК и различных модифицирующих агентов, а также способы оптимизации процесса для повышения КВ и улучшения оптических свойств материалов. Был подробно описан механизм синтеза УНЧ из ЛК. Представлена общая информация по применению УНЧ в медицине, биосенсорике и иммуноанализе.

В **главе 2** представлено описание используемого оборудования и реагентов, используемых для проведения синтеза и очистки люминесцентных материалов. Представлены реагенты, которые необходимы для приготовления исходных растворов. Описаны методы исследования, которые применяли для изучения свойств полученных материалов. Описаны две методики синтеза флуорофора 5-оксо-1,2,3,5-тетрагидроимидазо[1,2-а]пиридин-7-карбоновой кислоты (ИПКК), с последующей модификацией полученным флуорофором УНЧ из аминопирена и фенантрена. Такой способ позволяет получить УНЧ с углеродным ядром, на поверхности которого находится флуорофор ИПКК. Также представлен синтез УНЧ, обладающих собственной люминесценцией, из безопасных и нетоксичных исходных реагентов.

Последующую очистку полученных материалов проводили с помощью центрифугирования и диализа. Данные методы позволили эффективно очистить УНЧ и флуорофор от сопутствующих продуктов реакции. Заряд и степень очистки контролировали с помощью гель-электрофореза.

Глава 3 посвящена изучению оптических и физических свойств флуорофора ИПКК и УНЧ.

Для подбора оптимальных параметров синтеза и получения флуорофора с оптимальными значениями КВ была получена серия образцов при различном времени нагрева от 0,5 до 6 часов.

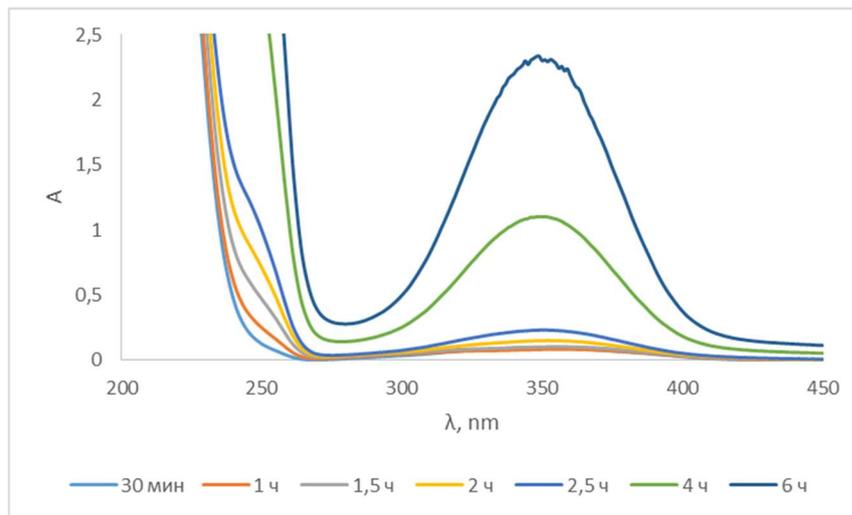
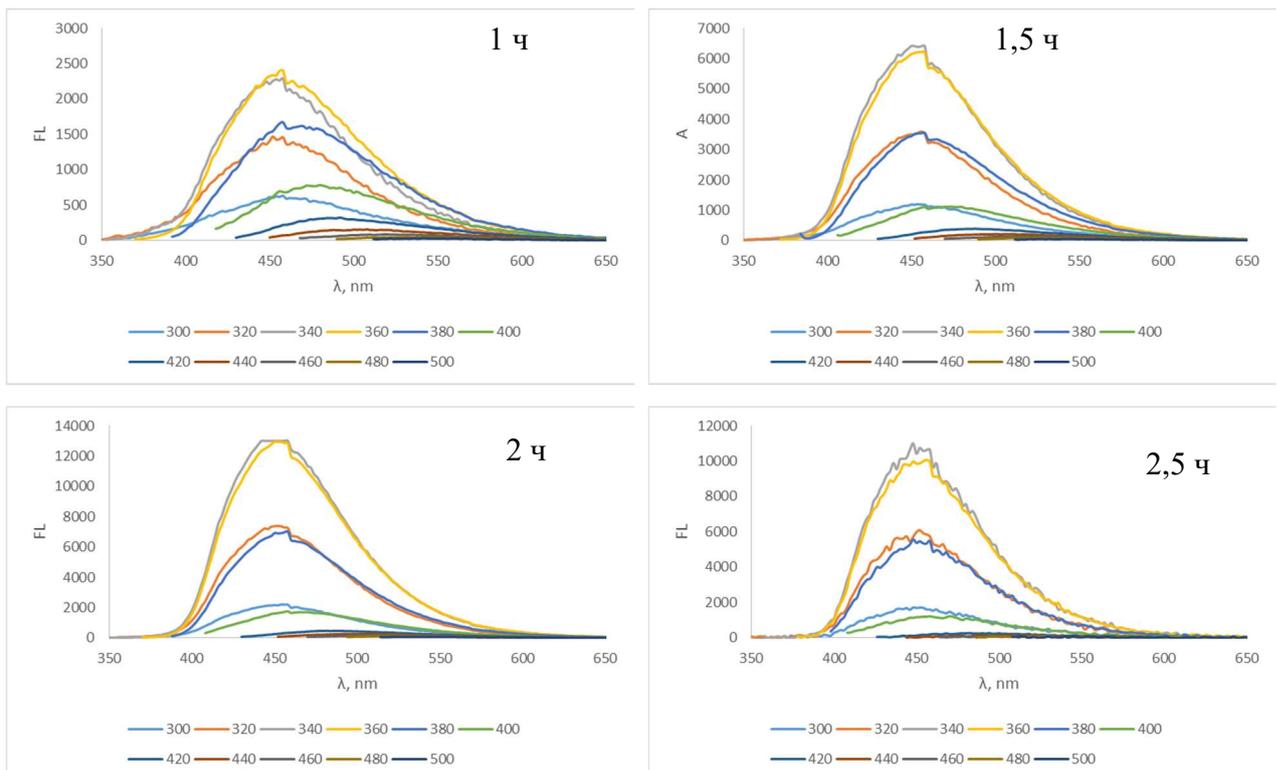


Рисунок 1 – Спектры поглощения образцов ИПКК при разном времени синтеза

Согласно спектрам поглощения формирование люминесцентного продукта начинается после 1 часа синтеза, появляется незначительный максимум поглощения в области 350 нм, что характерно для флуорофоров на основе ЛК и аминов. Далее по мере увеличения времени синтеза происходит накопление люминесцентного продукта и увеличение оптической плотности максимума поглощения 350 нм, при этом его позиция не меняется вплоть до 6 часов синтеза.



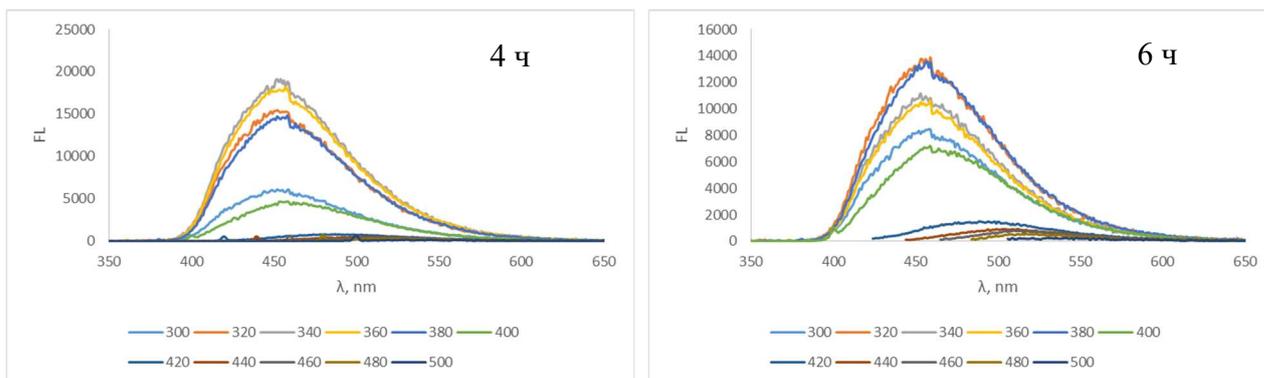


Рисунок 2 – Спектры люминесценции образцов ИПКК при разном времени синтеза

Пик ФЛ находится в области 450 нм. При синтезе в течение 1 часа видно, что спектры ФЛ нескольких продуктов синтеза накладываются. При увеличении времени синтеза интенсивность люминесценции возрастает и достигает максимума при синтезе в течение 6 часов.

Таблица 1 – КВ люминесценции образцов ИПКК при разном времени синтеза

Время синтеза, ч	0,5	1	1,5	2	2,5	4	6
КВ, %	5	11	26	48	68	84	94

При увеличении времени синтеза ИПКК происходит увеличение КВ люминесценции и достигает максимума в 94 % при времени синтеза 6 часов.

Для установления гомогенности и заряда продуктов синтеза провели гель-электрофорез полученных образцов и контрольных образцов ИПКК, полученной в условиях гидротермального синтеза при температуре 200°C в течение 3 часов.

Для образца, полученного при синтезе в течение 6 часов, КВ ФЛ и интенсивность ФЛ оказались самыми высокими, также наблюдалось увеличение оптической плотности образца по сравнению с другими образцами. Все это говорит о том, что условия, в которых был получен данный образец, являются оптимальными для синтеза флуорофора ИПКК. Дальнейшие исследования проводились с этим образцом.

Однако, как показала ЯМР-спектроскопия, проведение вышеописанного взаимодействия в условиях кипячения в водной среде привело к образованию флуоресцентного продукта лишь в малых количествах.

Была проведена очистка образца с помощью диализа. Через поры диализного мешка проходит низкомолекулярный флуорофор ИПКК, а в ретентата остаются примеси полимероподобных веществ.

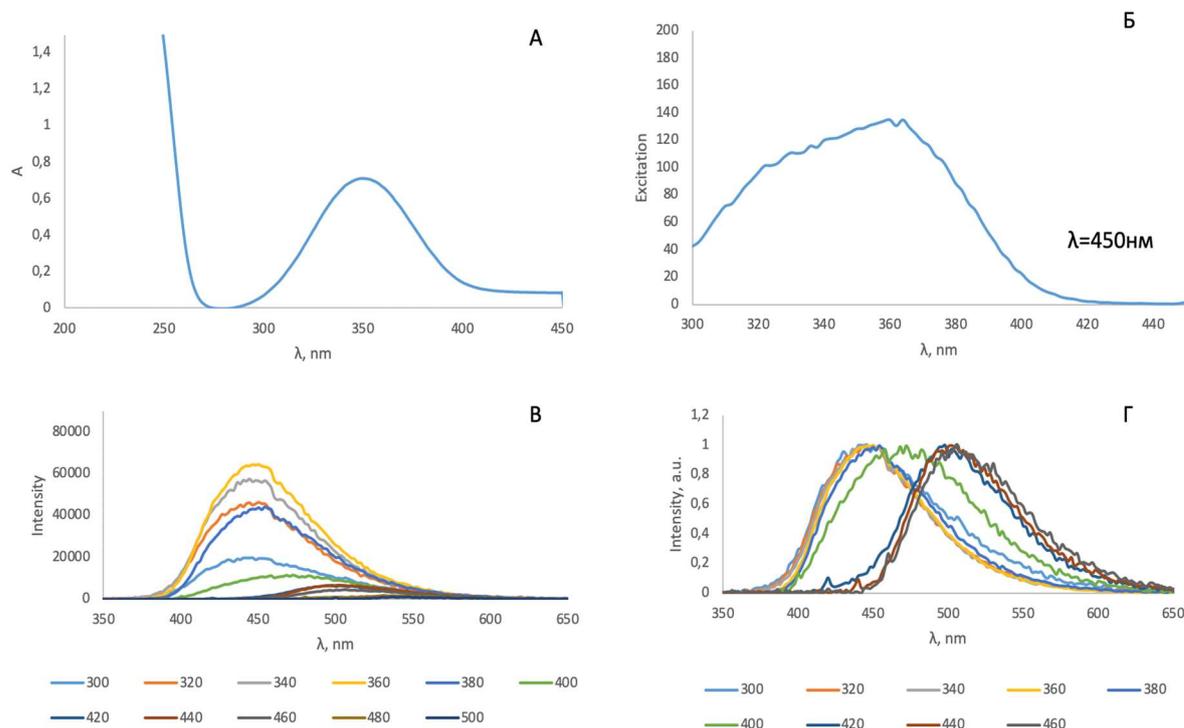


Рисунок 3 – Спектральные характеристики диализата: спектр поглощения (А), возбуждения (Б), спектры ФЛ (В) и нормированные спектры ФЛ (Г).

После очистки пик поглощения сохраняется. В спектрах ФЛ наблюдается зависимость от длины волны возбуждения. КВ ФЛ составил 95%.

Образец после очистки были исследованы с помощью ЯМР¹N спектроскопии. В результате этого было выявлено, что в диализном мешке остается только полиамид ЛК. В пробе, взятой из диализного мешка сигналов, принадлежащих искомому бициклическому соединению не обнаружено (рис.4).

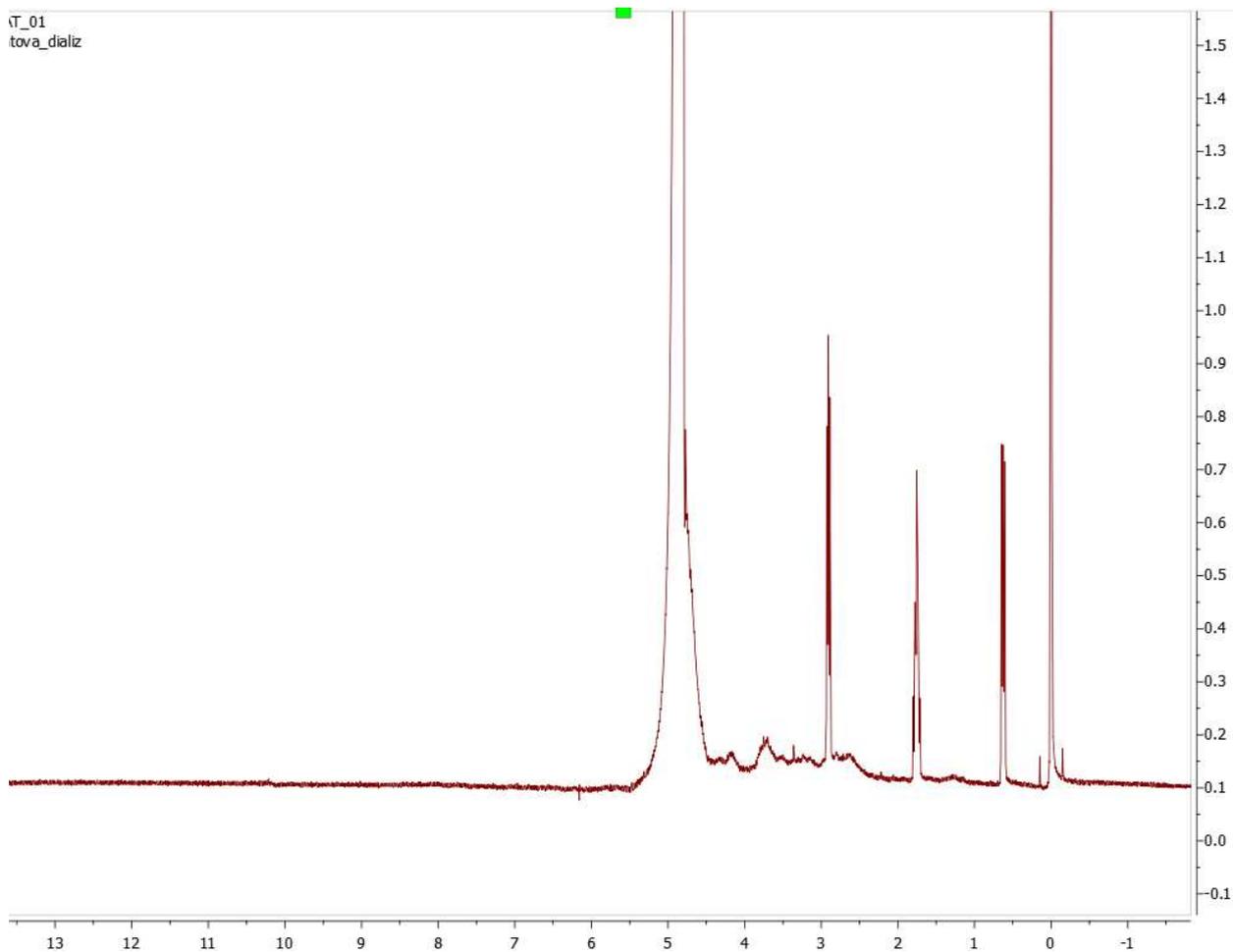


Рисунок 4 – ЯМР¹H спектр пробы из диализного мешка

В ЯМР¹H спектре диализата не обнаружено сигналов какого-либо вещества кроме сигналов стандарта и растворителя. Вероятно, из-за низкой концентрации флуорофора (рис.5).

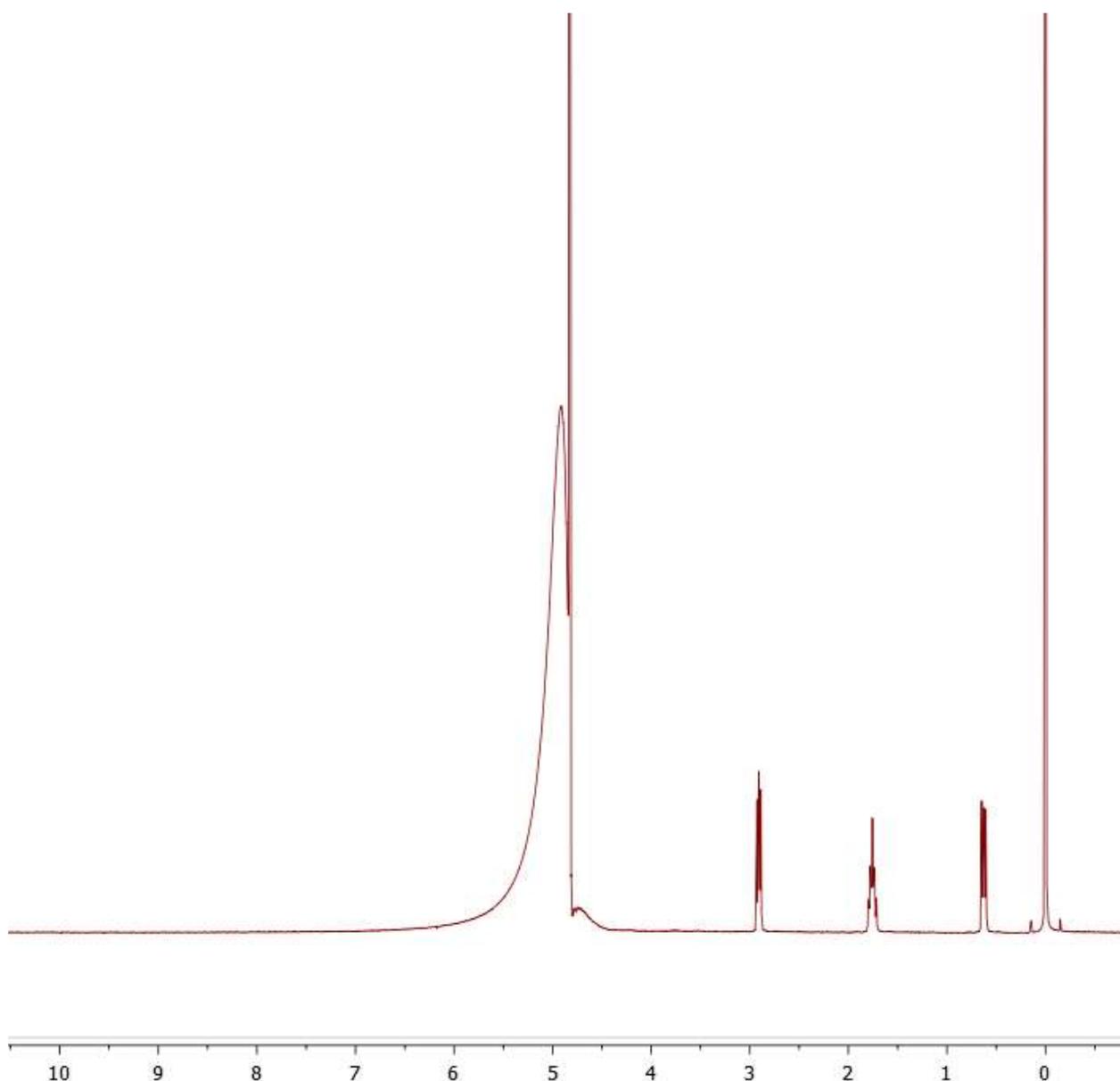


Рисунок 5 – ЯМР¹H спектр диализата

В результате эксперимента был получен флуорофор ИПКК с высоким КВ (94%). Было доказано наличие двух продуктов реакции: флуорофор и полимероподобные частицы. Флуорофор успешно очищен от побочного продукта и изучен спектральными методами. Как показал анализ ЯМР, выход продукта реакции невелик, поэтому в дальнейшем получали ИПКК гидротермальным методом.

Был проведен синтез по гидротермальному методу. Спектры поглощения, возбуждения и ФЛ продукта реакции были получены из 800-

кратно разбавленных растворов во избежание эффектов реадсорбции и представлены на рис. 6.

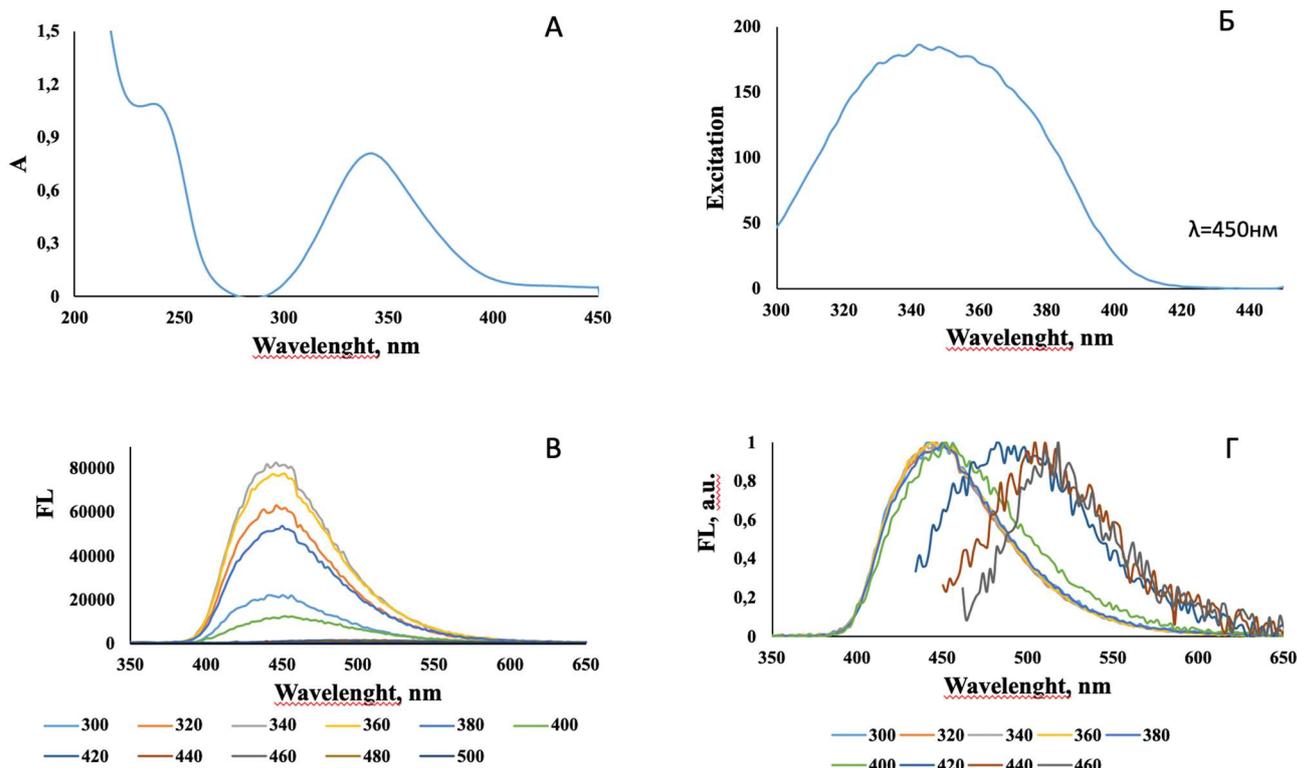


Рисунок 6 – Спектральные характеристики полученного материала: спектры поглощения (А), возбуждения (Б), ФЛ (В), нормализованные спектры ФЛ (Г)

Максимумы поглощения образца наблюдались при 240 и 350 нм. Спектр возбуждения имеет максимум при 350 нм ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$). Продукт реакции имеет сильную голубую люминесценцию при 450 нм, которая зависит от длины волны возбуждения в диапазоне 420-500 нм. Относительный КВ составил около 85%.

Анализ ЯМР ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBSC спектров показал, что в результате автоклавирования смеси ЭДА и ЛК получена ИПКК, а также, вероятно, продукт полимерной структуры – полиамид ЛК.

После разделения смеси диализат и ретентат были охарактеризованы оптической и ЯМР-спектроскопией. Спектры люминесценции ретентата зависят от длины волны возбуждения, которая подтверждает структуру полимера. Относительный КВ диализата составил 82%, а ретентата - только 2%.

Было показано, что гидротермальный синтез дает смесь ИПКК и полимероподобных структур из ЛК и ЭДА, которые приводят к тушению свечения флуорофора.

Был проведен синтез УНЧ из сопряженных ароматических структур, представляющих углеродное ядро, покрытое люминесцентными молекулами флуорофора ИПКК.

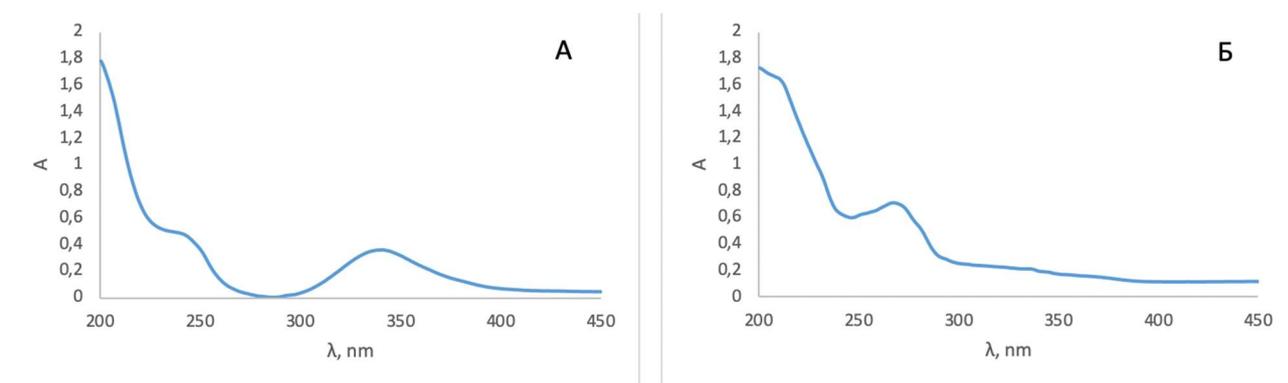


Рисунок 7 – Спектры поглощения образца ИПКК + фенантрен (А) и контрольного образца фенантрена (Б)

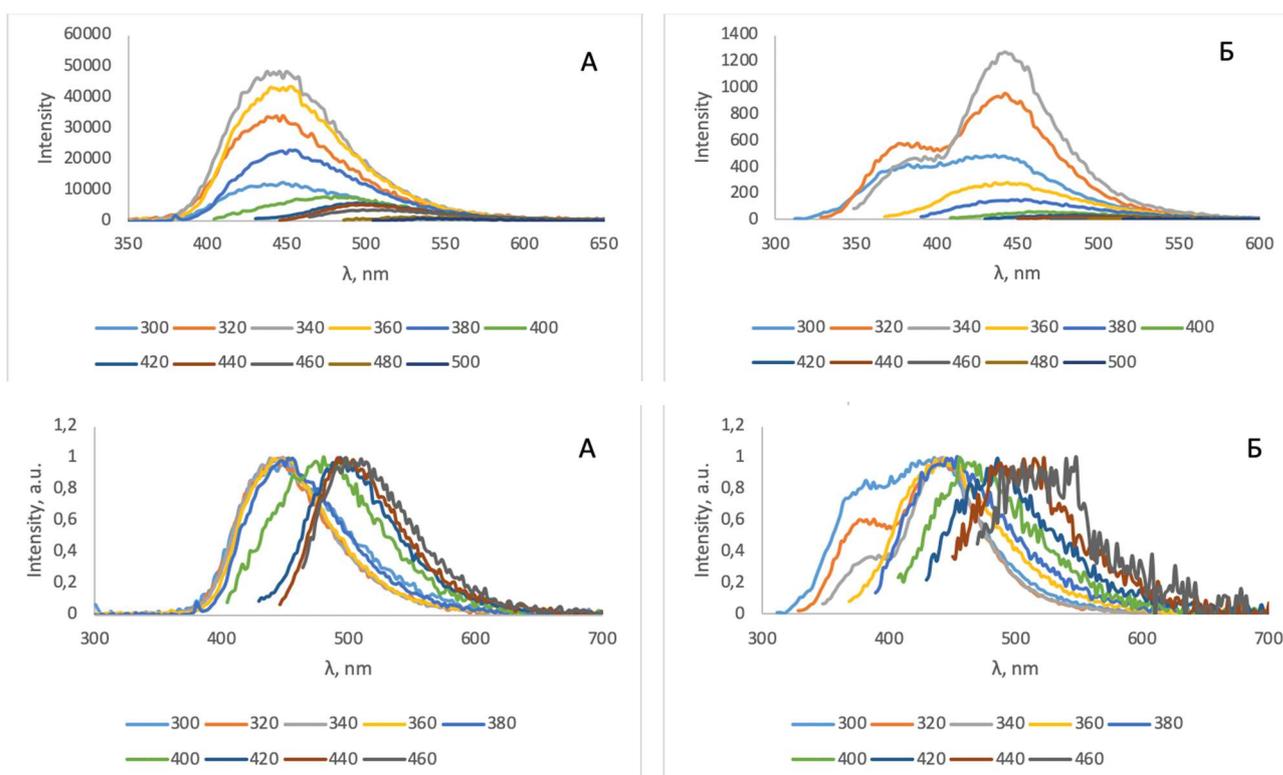


Рисунок 8 – Спектры ФЛ и нормированные спектры ФЛ образца ИПКК + фенантрен (А) и контрольного образца фенантрена (Б)

Спектры поглощения образца ИПКК + фенантрен имеют пик в области 350 нм и 240 нм, что является классическим для ИПКК. Вид спектров ФЛ также имеет классический для ИПКК вид. КВ ФЛ образца составил 90%, тогда как КВ ФЛ образца чистого фенантрена всего 10%.

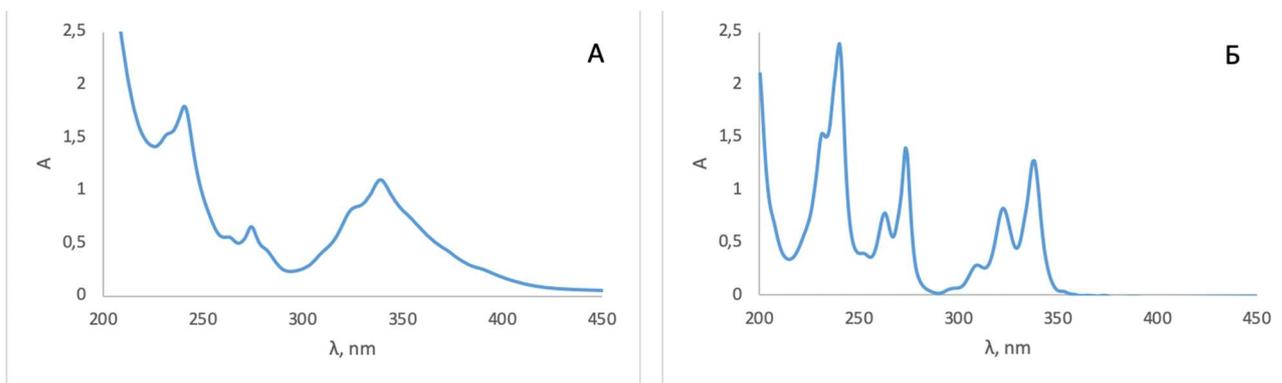


Рисунок 9 – Спектры поглощения образца ИПКК + аминопирен (А) и контрольного образца аминопирена (Б)

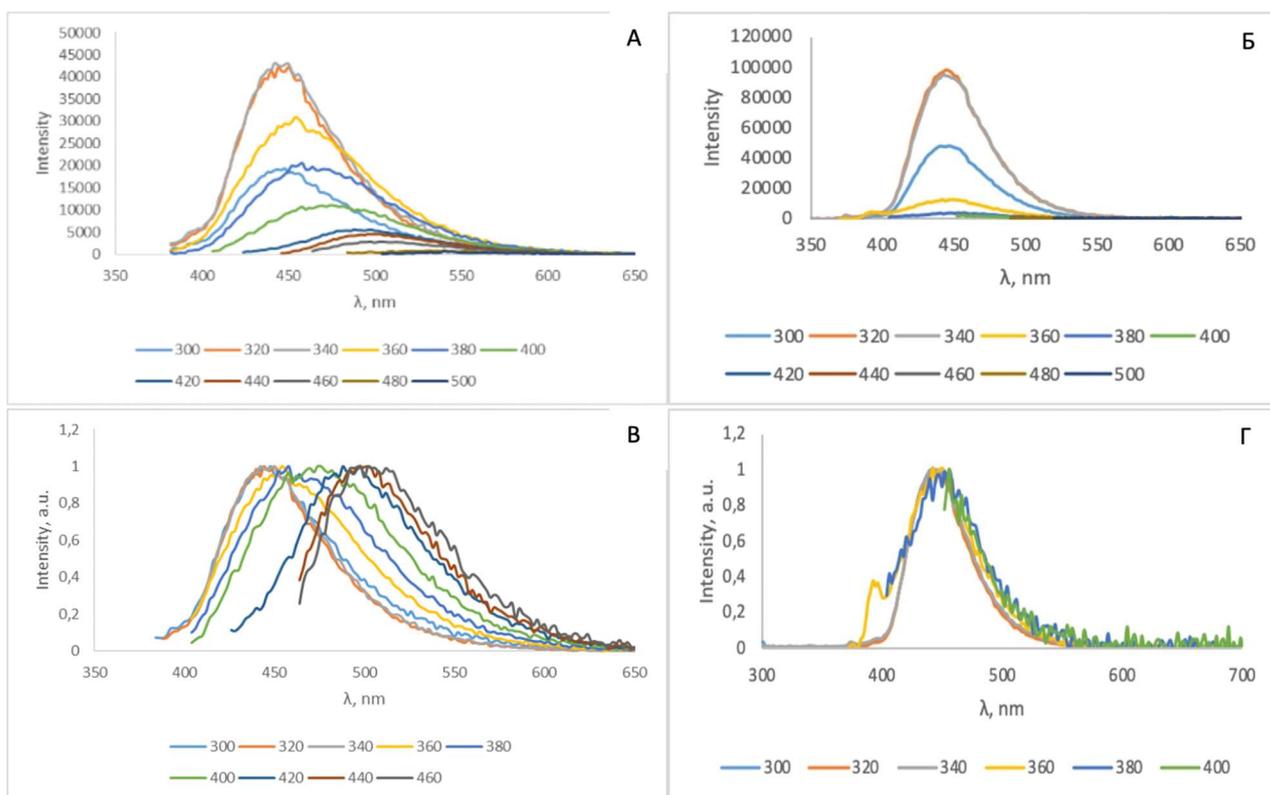


Рисунок 10 – Спектры ФЛ ИПКК + аминопирен (А) и контрольного образца аминопирена (Б) и нормированные спектры ФЛ образца ИПКК + аминопирен (В) и контрольного образца аминопирена (Г)

Спектры поглощения полученного образца имеют весьма неклассический вид: пик также расположен в области 240 нм и 350 нм, но имеет классический профиль ароматических соединений, кроме того, появляется дополнительный пик в области 270 нм. В данном случае видно, что спектры поглощения двух веществ накладываются. Действует закон аддитивности. В спектрах ФЛ также можем наблюдать наличие двух веществ в образце.

Данные образцы были исследованы с помощью метода гелелектрофореза.

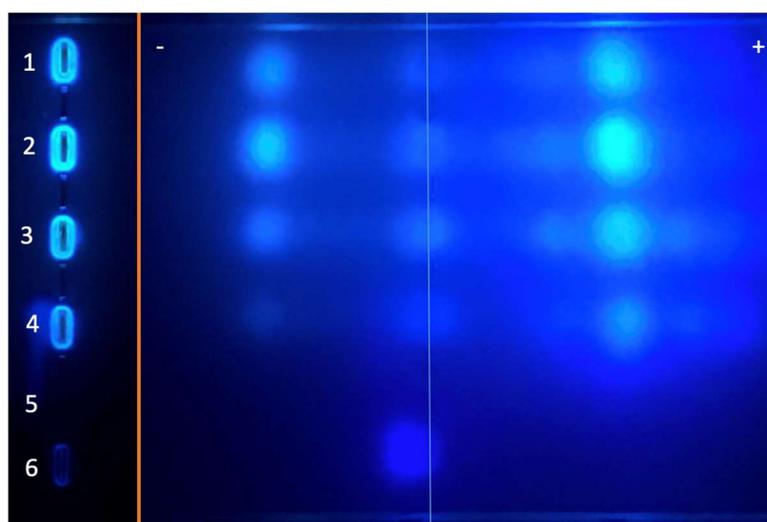


Рисунок 11 – Электрофореграмма под УФ-лампой ($\lambda=365$ нм) образцов ИПКК в воде (1), ИПКК в хлороформе (2), ИПКК + аминопирен (3), ИПКК + фенантрен (4), фенантрен (5), аминопирен (6)

По данной электрофореграмме можно сделать предположение, что органические молекулы связались с ИПКК, так как изменились положения пятен после электрофореза.

В качестве альтернативного модифицирующего агента был выбран ТРИС, так как, согласно литературным данным, он позволяет получать УНЧ с высоким КВ и при этом является не токсичным.

Установили, что оптимальными условиями для образования УНЧ является автоклавирование при температуре 250°C в течение 6 часов. Данный образец использовали в последующих экспериментах.

Для очистки образца от непрореагировавших исходных и побочных продуктов реакции использовали метод диализа.

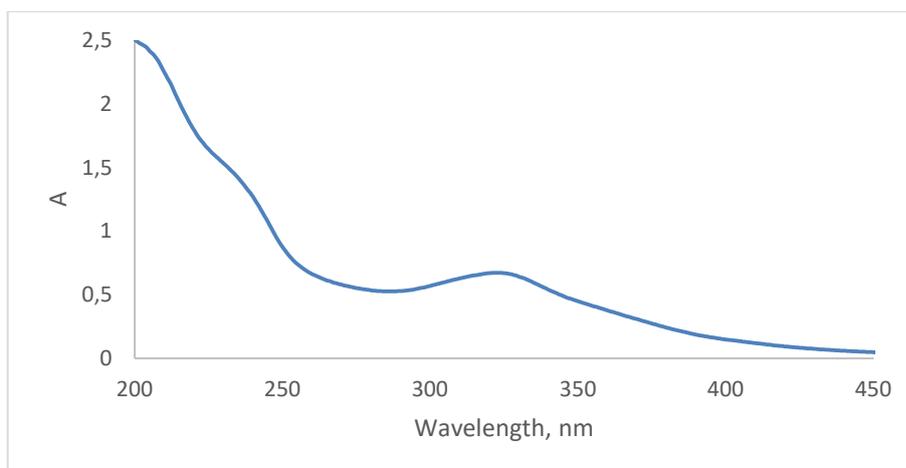


Рисунок 12 – Спектр поглощения образца после очистки

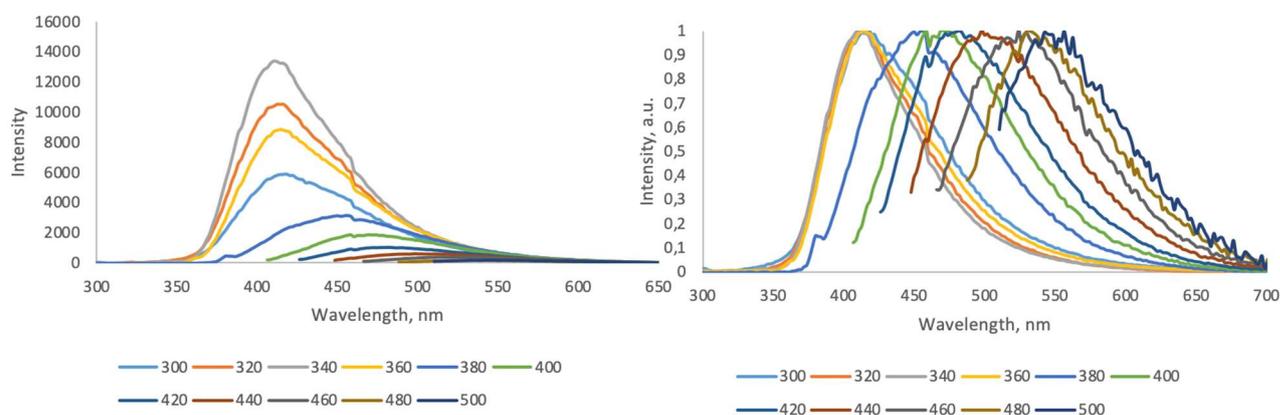


Рисунок 13 – Спектры ФЛ и нормированные спектры ФЛ образца после очистки

Вид спектра поглощения практически не изменился после очистки, пик находится в области 330 нм. В спектрах ФЛ наблюдается зависимость от длины волны возбуждения. Спектры имеют вид классических спектров ФЛ УНЧ.

Для анализа размера и морфологии были получены ПЭМ снимки образца после очистки. На рисунке 14А в масштабе 1 микрон наблюдаем агломераты

УНЧ, на рисунке 14Б – УНЧ с размерами до 10 нм

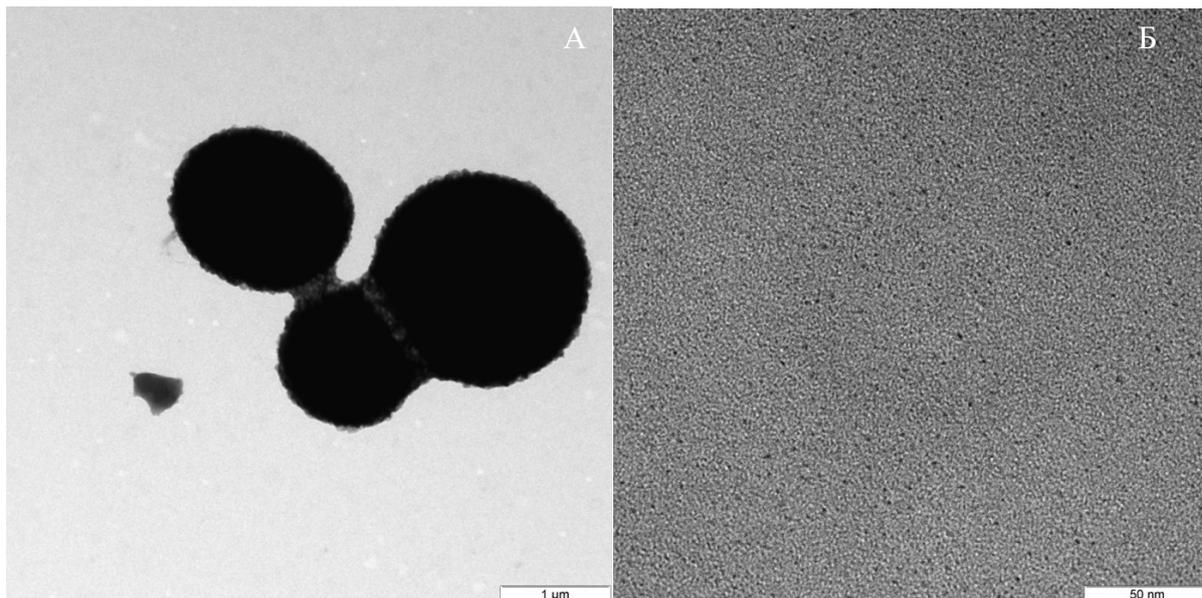


Рисунок 14 – Снимки образца с ПЭМ в разрешении 1 микрон (А) и 50 нм (Б)
Таким образом, по результатам эксперимента получили люминесцентные УНЧ из ЛК и трис. Максимум эмиссии находится в области 410 нм, максимум поглощения – в области 330 нм. КВ ФЛ составил 13%.

Заключение

1. Осуществлены синтезы флуорофора из ЛК и ЭДА по двум методикам: термический синтез при атмосферном давлении и гидротермальный синтез. По результатам эксперимента установлено, что формирование флуорофора в условиях гидротермального синтеза происходит эффективнее.
2. Доказано, что при гидротермальном синтезе из ЛК и ЭДА образуется несколько продуктов реакции: полимероподобные вещества и флуорофор ИПКК.
3. Показана возможность модификации поверхности УНЧ флуорофором ИПКК. Доказано связывание углеродного ядра и ИПКК.
4. Получены люминесцентные УНЧ, размером до 10 нм с КВ ФЛ 13%, из нетоксичных и биосовместимых исходных материалов ЛК и Трис.