

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

Сравнение подходов к модификации квантовых точек состава
CdZnSeS/ZnS для дальнейшего применения в биоанализе

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Строкина Павла Дмитриевича

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

ассистент

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

А.А. Кокорина

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

Д.Х.Н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Д.Г. Черкасов

инициалы, фамилия

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Квантовые точки (КТ) – люминесцентные полупроводниковые нанокристаллы, физический размер которых ограничен характерным для образующего их материала радиусом экситона Бора. Особенностью данных наночастиц является размерный эффект: зависимость оптических свойств (ширины запрещённой зоны и коэффициента экстинкции) от размеров нанокристаллов и их формы [1]. Это обуславливает перспективу для применения КТ в оптике, микроэлектронике, оптоэлектронике, медицине, биологии, полиграфии, энергетике.

Настройка свойств путем изменения лишь размера нанокристаллов накладывает ряд ограничений для классических КТ на основе гетеропереходов во многих областях применения, имеющих четко определенные требования, предъявляемые к данному параметру. Перспективной альтернативой классическим КТ являются многокомпонентные квантовые точки на основе твёрдых растворов (КТТР). Свойства КТТР позволяют настраивать оптические и электронные свойства с сохранением размера кристаллитов путём изменения таких параметров, как состав и внутренняя структура наночастицы [2, 3].

Ключевым требованием, предъявляемым к КТ в сферах применения, связанных с анализом полярных растворов (в том числе биологических жидкостей), является гидрофильность [4, 5]. Придать коллоидную стабильность КТ в полярной среде можно при помощи гидрофилизации. Метод замещения лигандов является оптимальным для гидрофилизации рассматриваемых КТТР, так как размер наночастиц после модификации практически не изменяется, что позволяет максимально реализовать преимущество КТ данной структуры.

В настоящей работе представлены результаты гидрофилизации КТТР состава CdZnSeS/ZnS методом замещения лигандов и рассмотрены следующие гидрофилизирующие агенты: дигидролипоевая кислота (ДЛК), тиогликолевая кислота (ТГК), меркаптопропионовая кислота (МПК), 2-меркаптоэтанол (МЭт).

Целью данной работы является сравнение влияния различных гидрофилизирующих агентов на оптические свойства КТТР, их стабильность и

токсичность, для выбора оптимального модификатора и дальнейшего применения полученных наноструктур в биоанализе.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Синтезировать КТТР состава CdZnSeS/ZnS и модифицировать их с варьированием гидрофилизирующих агентов;
- Изучить зависимости следующих оптических свойств модифицированных КТТР от условий гидрофiliation: относительный квантовый выход (КВ), ширина пика люминесценции на полувывоте (FWHM), положение пика люминесценции, время жизни (ВЖ) люминесценции, токсичность;
- Исследовать коллоидную и оптическую стабильность гидрофилизированных КТТР при длительном хранении;
- На основании полученных данных сделать вывод о преимуществах или недостатках применения рассматриваемых гидрофилизирующих агентов в вышеуказанном методе.

Краткая характеристика материалов исследования.

Определения оптических свойств проводили с применением спектрометрии в видимой и УФ области. Ключевым параметром для характеристики КТТР в данной работе является относительный КВ, рассчитанный по опубликованной методике [6], с использованием кумарина 153. При обработке и соотнесении полученных результатов прибегали к методам математической статистики и статистической обработки ручным или машинным способом. Токсичность модифицированных КТТР оценивали по жизнеспособности клеток, инкубированных с данными структурами. Для этого использовали протокол анализа клеточного окислительно-восстановительного статуса с помощью реагента Alamar Blue [7].

Описание структуры работы. Данная работа состоит из введения, двух глав (обзор литературы и экспериментальная часть), выводов, инструктажа по охране труда и технике безопасности и списка использованных источников. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 48 страниц, включая 21 рисунок и 3 таблицы. Всего проанализировано 46 литературных источников.

Научная значимость работы:

- Синтезированы КТТР состава CdZnSeS/ZnS и модифицированы с варьированием гидрофилизирующих агентов (в том числе с использованием сочетаний молекул тиокислот и тиолов);
- Показано, что при модификации КТТР с использованием МЭт, ТГК, МПК происходит увеличение КВ по сравнению с исходным, гидрофильным образцом;
- Установлено оптимальное сочетание ДЛК:МЭт, при использовании которого модифицированные КТТР обладают наилучшим набором результирующих параметров.
- Проведена оценка цитотоксичности КТТР, модифицированных ДЛК и МЭт.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы и определены основные цели и задачи.

В **первой главе** рассмотрены основные особенности и преимущества КТТР, представлены основные способы гидрофилизации наночастиц данного типа. Представлены ключевые литературные данные по использованию ДЛК, МПК, ТГК и МЭт для гидрофилизации КТ.

Благодаря структуре КТТР (ядро сплавного типа) открывается возможность изменения оптических свойств нанокристаллов с сохранением одного размера, путём корректировки их химического состава (а именно: изменением соотношения компонентов в нанокристалле). Данное преимущество позволяет решить проблемы, возникающие при применении КТ в биологической маркировке, наноэлектронике, а также в создании сверхрешёток [8, 9]. Также преимуществам КТТР по сравнению с классическими КТ на основе гетеропереходов можно отнести:

- Узкий пик эмиссии, который обуславливается равномерным распределением нанокристаллов по размеру и форме [10];
- Повышенная термо- и фотостабильность КТТР с градиентной структурой [11].

Существует несколько подходов придания КТ гидрофильных свойств:

1. Синтез КТ непосредственно в водной фазе;
2. Гидрофилизация – перевод гидрофобных КТ в полярный растворитель путем модификации лигандного слоя, покрывающего нанокристалл.

Недостатком КТ, синтезированных непосредственно в водной фазе, является низкий КВ, что объясняется большим количеством дефектов на поверхности нанокристаллов. Также данные КТ имеют низкую оптическую стабильность, что препятствует созданию образцов с длительным сроком хранения. Причиной данной проблемы является высокая вероятность окисления моноиольных лигандов, стабилизирующих КТ в водном растворе

[12].

КТ, синтезированные в органическом высококипящем растворителе, перечисленными недостатками не обладают. Они имеют высокий КВ и длительный срок хранения в неполярной среде. Однако данные КТ гидрофобные, что существенно ограничивает область их применения [4, 5].

Среди методов перевода КТ в водный раствор можно выделить 3 основных подхода:

- Метод замещения гидрофобных лигандов на гидрофильные;
- Создание вторичной оболочки из амфифильного полимера;
- Включение КТ в полимерные микросферы.

Преимуществами метода замещения являются простота процесса, а также сохранение первоначального размера коллоидных частиц (или незначительное уменьшение за счет уменьшения толщины органического стабилизирующего слоя) [25], что позволяет максимально реализовать преимущества КТТР. Методом замены лигандов можно модифицировать КТ с использованием тиокарбоновых кислот. Полученные таким образом наночастицы применимы в биоанализе благодаря концевым карбоксильным группам кислот, выступающих в качестве центров для конъюгации с биомолекулами.

После модификации на поверхности наночастицы могут оставаться непокрытые участки, что приводит к образованию дефектов в структуре КТ и падению КВ относительно исходных гидрофобных наночастиц [13].

Возможный способ решения данной проблемы – введение дополнительного гидрофилизующего агента, закрепление которого не будет стереохимически затруднено и позволит заполнить свободные адсорбционные центры на поверхности КТТР. Таким агентом в сочетании с молекулами карбоновых кислот (в частности, с ДЛК), может выступать МЭт, молекула которого эффективно встраивается в поверхность наночастицы (Рисунок 1). Подобный метод уже был применён на золотых наночастицах для их избирательного прикрепления к молекулярным маркерам в эпителиоподобной

клеточной линии [14].

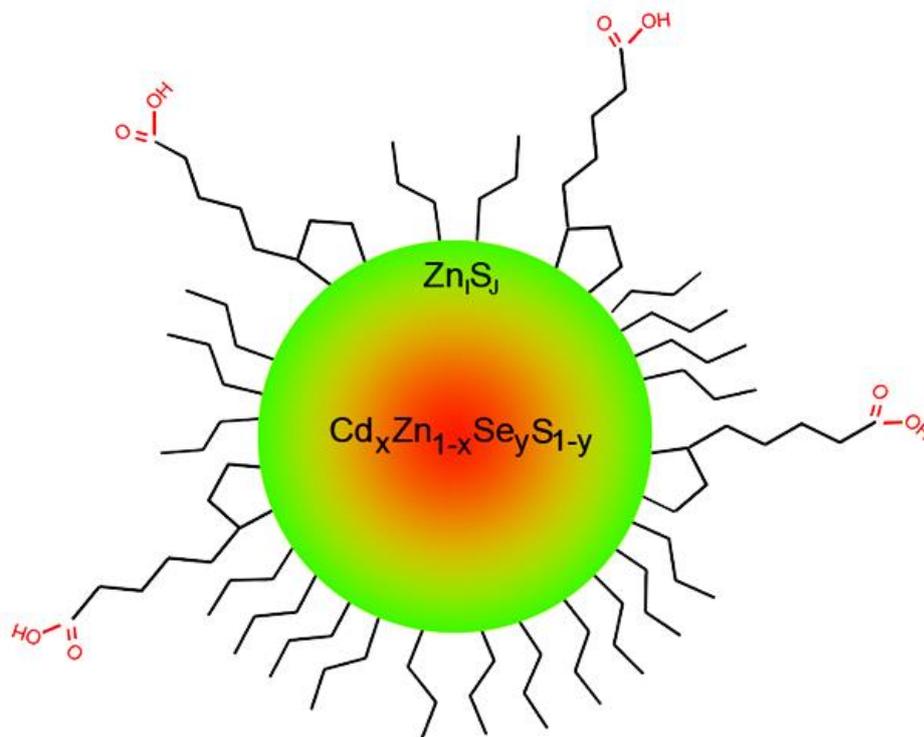


Рисунок 1 – Схематическое изображение КТТР, модифицированных комбинацией ДЛК и МЭт

Во **второй главе** приведена информация об используемых реагентах, материалах, оборудовании, методах исследования, оценке цитотоксичности модифицированных КТТР, а также методики синтеза и гидрофилизации КТ состава CdZnSeS/ZnS.

КТТР были получены методом высокотемпературного металлоорганического синтеза и очищены методом осаждения. Гидрофилизацию проводили при температуре реакционной среды 90 °С и перемешивании, в течение 2 часов.

В **третьей главе** представлены результаты и их обсуждение.

В ходе работы нами была синтезирована серия образцов КТТР состава CdZnSeS/ZnS, длина волны максимума эмиссии которых находилась в пределах 527-549 нм. Для синтезированных и очищенных КТТР наибольшее значение относительного КВ составило 37%.

Нами проведена гидрофилизация серии образцов выбранных КТТР с

применением различных сочетаний и соотношений мольных долей гидрофилизирующих агентов. Одним из технологических недостатков модификации КТТР с использованием ДЛК является длительное время растворения осадка КТ в водной среде на заключительном этапе гидрофиллизации. Это может быть объяснено гидрофобной природой алкильной цепи стабилизирующего лиганда или малоэффективным покрытием поверхности нанокристалла. Процесс растворения осадка занимает значительно меньшее время при модификации с добавлением других гидрофилизирующих агентов (МЭт, ТГК, МПК).

FWHM гидрофилизованных КТТР изменяется в пределах погрешности. Длина волны максимума эмиссии не изменяется. При гидрофиллизации КТТР с использованием МЭт отмечено существенное увеличение интенсивности люминесценции. Возможным объяснением данного эффекта является уменьшение числа дефектов на поверхности нанокристалла в результате встраивания серы из меркаптогруппы в кристаллическую решётку. Это так же объясняет резкое увеличение относительного КВ для КТТР модифицированных с использованием МЭт по сравнению с образцами, модифицированными исключительно ДЛК. Максимальное увеличение составляет 51% относительно исходного гидрофобного образца, в то время как для КТТР, гидрофилизованных с использованием ДЛК наблюдается незначительное, характерное для данного метода гидрофиллизации, снижение КВ (в среднем на 5%). Для КТТР модифицированных ТГК или МПК, как и в случае с использованием МЭт, наблюдается увеличение относительного КВ (в среднем на 15% при использовании ТГК, и на 25% при использовании МПК) после модификации. Наибольшее значение относительного КВ среди рассмотренных образцов (74%) имеет образец, гидрофилизованный комбинацией ДЛК:МЭт в мольном соотношении 1:4 (Рисунок 2).

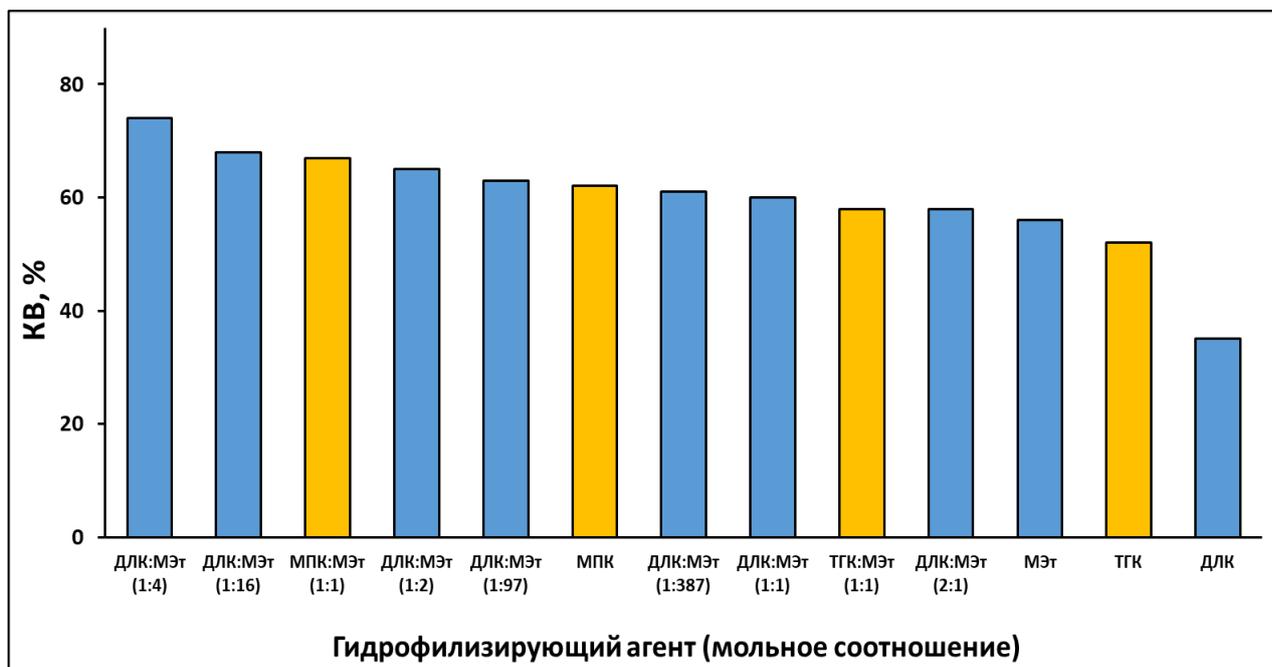


Рисунок 2 – Диаграмма зависимости относительного KB (%) от гидрофилизирующего агента, используемого при гидрофиллизации КТТР (относительный KB до гидрофиллизации = 37%)

Через неделю после гидрофиллизации образцы, модифицированные с использованием избытка МЭт (ДЛК:МЭт в соотношении 1:4, 1:16, 1:97, 1:387 соответственно, а также КТТР модифицированные исключительно МЭт) полностью утратили коллоидную стабильность. Возможным объяснением наблюдаемого эффекта является способность МЭт разрывать дисульфидную связь между стабилизирующим лигандом и центром связывания на поверхности КТТР, с восстановлением последнего (процесс ускоряется, когда в системе гидрофилизирующие агенты находятся в избытке по сравнению с числом доступных центров связывания на поверхности нанокристалла). При этом происходит не только отделение лигандов, но и выведение их из сферы реакции путем образования димера – бис(2-гидроксиэтил)дисульфида. В случае реализации данного механизма также увеличивается количество дефектов на поверхности КТТР, что, в совокупности с утратой части стабилизирующего слоя на поверхности наночастицы, приводит к агрегации и седиментации наноструктур. Данный процесс можно замедлить, понизив температуру

хранения, тем самым увеличив период коллоидной стабильности модифицированных КТТР. Для наноструктур, модифицированных ТГК и МПК, наблюдаются те же эффекты.

Проводили оценку поверхности модифицированных КТТР с применением гель-электрофореза (время: 120 мин; напряжение: 150 В; сила тока: 120 мА). Поверхность наночастицы заряжается отрицательно при наличии на ней молекул карбоновой кислоты. Поэтому после электрофореза мы должны наблюдать смещение модифицированных образцов к аноду. Образцы, модифицированные с избытком МЭт не смещаются. В случае применения ДЛК, необходимость присоединения сразу двух SH-групп к поверхности КТ для формирования равномерного лигандного слоя стереохимически затруднено. МЭт через одну SH-группу встраивается в поверхность нанокристалла значительно эффективнее, и можно предположить, что ДЛК при данных соотношениях не может встроиться в поверхность в процессе гидрофилизации. Данный фактор делает невозможной последующую конъюгацию модифицированных КТТР с белками.

Для оценки цитотоксичности клеточную линию L929 инкубировали с КТТР, модифицированными ДЛК или МЭт, в течение 24/48/72/120 часов. Содержание КТТР в исходном растворе: 0,7 мг/мл. Для исследования влияния концентрации КТТР на жизнеспособность клеток рассматривали также разбавления исходного раствора в 2 и в 4 раза (x2 и x4 соответственно). При добавлении КТТР, модифицированных с использованием МЭт, отмечается существенное снижение жизнеспособности клеток. При снижении концентрации КТТР данный эффект выражается менее явно. Возможной причиной утраты жизнеспособности является непосредственная токсичность гидрофилизирующего агента. При температуре инкубации 37 °С повышается вероятность отсоединения МЭт от поверхности наночастицы, что затрудняет применение КТТР с рассматриваемым модификатором в биоанализе.

По значениям процента жизнеспособности можно утверждать, что КТТР, модифицированные с использованием ДЛК оказывают меньшее токсическое действие на инкубированные клетки. Для КТТР с рассматриваемым модификатором при температуре 37 °С быстрая потеря стабильности в результате утраты стабилизирующего слоя не наблюдается, ДЛК не отсоединяется от поверхности. Также токсическое действие ДЛК на инкубированные клетки на данный момент не выявлено, напротив – её наличие может оказывать благоприятное действие на клеточный метаболизм. Эти данные подтверждают потенциальную возможность применения КТТР, модифицированных с использованием ДЛК, в биоанализе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы КТТР состава CdZnSeS/ZnS. Наибольший относительный КВ среди полученных образцов составил 37%. Проведена серия гидрофилизаций КТТР с использованием модифицирующих агентов (ДЛК, ТГК, МПК, МЭт) как в индивидуальных, так и в различных мольных соотношениях.

При гидрофизации с применением МЭт, ТГК и МПК отмечено увеличение КВ, что может быть объяснено уменьшением количества дефектов на поверхности нанокристалла. В качестве оптимальной комбинации ДЛК:МЭт с наилучшим набором результирующих параметров выбрано мольное соотношение 1:2.

Снижение коллоидной стабильности при длительном хранении для КТТР, гидрофизированных с использованием избытка МЭт, может быть объяснено утратой части стабилизирующего слоя и увеличением количества дефектов на поверхности нанокристалла в результате отделения молекул МЭт с дальнейшим образованием бис(2-гидроксиэтил)дисульфида. Данный эффект выражен менее явно для ТГК и МПК. Понижению температуры хранения замедляет рассматриваемый процесс и увеличивает периоды коллоидной стабильности модифицированных образцов.

Проведено исследование цитотоксичности КТТР, модифицированных с использованием ДЛК или МЭт. ДЛК является более перспективным модификатором для рассматриваемых КТТР в биоанализе. Структуры с данным гидрофизированным агентом оказывают меньшее токсическое действие на инкубированные клетки.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Yu W.W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals // *Chem. Mater.* 2003. Vol. 15, № 14. P. 2854–2860.
2. Vastola G., Zhang Y.W., Shenoy V.B. Experiments and modeling of alloying in self-assembled quantum dots // *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* Elsevier Ltd, 2012. Vol. 16, № 2. P. 64–70.
3. Aubert T. et al. Homogeneously alloyed CdSe_{1-x}S_x quantum dots (0 ≤ x ≤ 1): An efficient synthesis for full optical tunability // *Chem. Mater.* 2013. Vol. 25, № 12. P. 2388–2390.
4. Zhou J., Yang Y., Zhang C.Y. Toward Biocompatible Semiconductor Quantum Dots: From Biosynthesis and Bioconjugation to Biomedical Application // *Chem. Rev.* 2015. Vol. 115, № 21. P. 11669–11717.
5. Biju V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, № 3. P. 744–764.
6. Würth C. et al. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 8. P. 1535–1550.
7. alamarBlue HS and alamarBlue Cell Viability Protocol, for Microplates [Электронный ресурс] : (на 7 января 2019 года) // Thermo Fisher Scientific [Электронный ресурс] : [сайт]. - URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-proliferation-assay-protocols/cell-viability-with-alamarblue.html> (дата обращения 17.03.2021). - Загл. с экрана. - Яз. англ.
8. Peynshaert K. et al. Coating of Quantum Dots strongly defines their effect on lysosomal health and autophagy // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2017. Vol. 48. P. 195–205.
9. Bailey R.E., Nie S. Alloyed semiconductor quantum dots: Tuning the optical properties without changing the particle size // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 23. P. 7100–7106.
10. Zhong X. et al. Alloyed Zn_xCd_{1-x}S Nanocrystals with Highly Narrow Luminescence Spectral Width // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 44. P. 13559–13563.
11. Xing B. et al. Highly-fluorescent alloyed quantum dots of CdSe_{1-x}Tex synthesized in paraffin liquid: Gradient structure and promising bio-application // *J. Mater. Chem.* 2010. Vol. 20, № 27. P. 5664–5674.
12. Lees E.E. et al. The Preparation of colloiddally stable, water-soluble,

biocompatible, semiconductor nanocrystals with a small hydrodynamic diameter // ACS Nano. 2009. Vol. 3, № 5. P. 1121–1128.

13. Emin S. et al. Photostability of water-dispersible CdTe quantum dots: Capping ligands and oxygen // Chem. Lett. 2010. Vol. 39, № 6. P. 654–656.
14. Lee S. et al. Surface-enhanced Raman scattering imaging of HER2 cancer markers overexpressed in single MCF7 cells using antibody conjugated hollow gold nanospheres // Biosens. Bioelectron. 2009. Vol. 24, № 7. P. 2260–2263.