

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри нанофізики конденсованих середовищ
проф. Валерій Антонович Скришевський
Протокол №__ засідання кафедри
від “_____” _____ 2022 р.

**Властивості вуглецевих наночастинок для
біомедичних застосувань**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності
105 «Прикладна фізика та наноматеріали»
ОП «Нанофізика та комп'ютерні технології»
Пелешок Богдани Михайлівни

Науковий керівник від кафедри
завідувач кафедри нанофізики
конденсованих середовищ
проф. **Скришевський Валерій Антонович**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота бакалавра: 42 стор., 18 рис., 38 джерел.

Пелешок Б.М. Властивості вуглецевих наночастинок для біомедичних застосувань . – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 105 Прикладна фізика та наноматеріали ОП «Нанофізика та комп'ютерні технології».

У роботі розібрано принцип роботи установки зета-сайзер та освоєно роботу на ній. Проведено тестові дослідження залежності вимірів розмірів НЧ від рН буферного розчину , а також налаштувань у програмному забезпеченні Zetasizer (тобто вибір оптимальних умов). Було ознайомлено з методом синтезу та методами характеристики вуглецевих НЧ (фотолюмінесценція, ІЧ-спектроскопія, ТЕМ-зображення, визначення розмірів НЧ на установці зета-сайзер).

Ключові слова: Вуглецеві наночастинки, зета-сайзер, фотолюмінесценція, спектральні властивості.

ЗМІСТ

Вступ.....	6
Розділ 1. Огляд літератури.....	7
105.1.	Поня
ття про вуглецеві наночастинки	7
105.2.	Спос
оби синтезу	9
105.3.	Власт
ивості	15
105.4.	Фотол
юмінесценція	16
105.5.	Погли
нання клітинами	17
105.6.	Застос
ування в біології та медицині	19
105.7.	Лікув
ання раку	22
105.8.	Висно
вки до розділу	24
Розділ 2. Результати роботи	24
2.1. Постановка задачі	24
2.2. Ознайомлення із методом синтезу вуглецевих НЧ	25
2.3. Опис та принцип роботи установки зета-сайзер	27
2.4. Проведення тестових досліджень на зета-сайзері, вибір оптимальних умов (рН буферного розчину та налаштувань у програмному забезпеченні Zetasizer)	32
2.5. Додаткові дослідження спектральних властивостей отриманих НЧ (ІЧ -спектроскопія, фотолюмінесценція, ТЕМ-зображення)	36
Висновки	40
Література	42

Вступ

Вуглецеві наночастинки (далі НЧ) – новий клас фотолюмінісцентних наноматеріалів. Зростаючий інтерес до даних НЧ пов'язаний з простими способами їх синтезу та унікальними властивостями. Завдяки низькій цитотоксичності та оптичним властивостям вуглецеві НЧ використовуються в різних галузях біології та медицини. При цьому в даний час їх застосування обмежене відсутністю розуміння фундаментального взаємозв'язку між їх структурою та властивостями. Тому потрібне вивчення будови, складу та властивостей вуглецевих НЧ, а також їх застосуванню в біомедичних цілях.

Вуглецеві НЧ є структурами, що містять дефекти та неоднорідності, що визначає їх властивості. Наразі науковою спільнотою ще не вироблено єдиної думки про будову та властивості НЧ. Передбачається, що дані нанооб'єкти не мають певної форми, а являють собою нанофрагменти графену, що містять, крім гексагональних фрагментів, дефектні області, які впливають на люмінесцентні властивості НЧ. Через відсутність чіткої форми вони володіють дефектною поверхнею, яка також породжує цікаві люмінесцентні властивості.

Унікальні люмінесцентні властивості та простота методів отримання вуглецевих НЧ відкривають широкі перспективи їх потенційного застосування. Зростає кількість публікацій про методи синтезу, вивчення їх характеристик та люмінесцентних властивостей. А також про їх застосування в біомедичній сфері для візуалізації клітин і тканин.

Вуглецеві НЧ були випадково виявлені в процесі очищення вуглецевих нанотрубок, отриманих методом дугового розряду. Зацікавленість НЧ обумовлена багатьма факторами: малим розміром частинок, відсутністю необхідності модифікації поверхні, відсутністю трудомістких і дорогих етапів синтезу, відсутністю токсичних компонентів.

Відомо, що НЧ корисні в оптичних дослідженнях біологічних клітин і тканин завдяки їх здатності вибірково впроваджуватися і зберігатися в клітинах.

Дану роботу присвячено дослідженням властивостей вуглецевих НЧ для біомедичних застосувань, зокрема для майбутнього селективного лікування раку.

Розділ 1. Огляд літератури

1.1. Поняття про вуглецеві наночастинки

Вуглецеві наноматеріали - це наноматеріали із Карбону (до них належать фулерити, фулерени, нанотрубки і вуглецеві наночастинки).[1] Вони активно досліджуються як унікальні об'єкти нанотехнології. Їх властивості незвичні і цікаві.

Доведено, що вуглець може існувати не тільки в трьох формах - у вигляді графіту, алмазу і карбіну. Карбон (C) (або вуглець) це – хімічний елемент 4-ї групи головної підгрупи 2-го періоду періодичної системи Менделєєва, його порядковий номер 6, а атомна маса – 12 а. о. м. Електронна оболонка атома вуглецю містить чотири валентні електрони, що дозволяє атому вуглецю мати такі валентності: -4 , $+2$, $+4$. Вуглець демонструє велику різноманітність унікальних властивостей. Тому як сам вуглець, так і його сполуки є об'єктами фундаментальних досліджень і застосовуються у багатьох галузях техніки. [2] Вуглець має найбільшу кількість алотропних модифікацій (більше 8 вже виявлені). Алотропні модифікації за своїми властивостями відрізняються одна від одної.

Алотропія - існування двох і більше простих речовин одного і того ж хімічного елемента, різних за будовою і властивостями - алотропних модифікацій (форм). Алотропні модифікації можуть мати три типи гібридизації (sp^3 , sp^2 , sp) (рис.1). Гібридизація орбіталей – суперпозиція різних, але близьких за енергією орбіталей цього атома, з виникненням тієї самої кількості числа нових гібридних орбіталей, однакових за енергією. [3]

sp^3 -гібридизація відбувається при змішуванні однієї s- і трьох p-орбіталей. В результаті утворюється чотири однакові орбіталі, розміщення одна щодо іншої під кутами тетраедрів $109^{\circ}28'$ (наприклад алмаз).[4]

sp^2 -гібридизація відбувається при змішуванні однієї s - і двох p -орбіталей. Виникає три гібридні орбіталі з осями, розташованими в одній площині й спрямованими до вершин трикутника під кутом 120° . Негібридна p -атомна орбіталь перпендикулярна до площини і, як правило, бере участь в утворенні π -зв'язків. (наприклад графіт).[4]

sp -гібридизація відбувається при змішуванні однієї s - і однієї p -орбіталей. Утворюються дві рівноцінні sp -атомні орбіталі, розміщені лінійно під кутом 180° і спрямовані в різні сторони від ядра атома. Дві інші негібридні p -орбіталі розміщені у взаємно перпендикулярних площинах (наприклад карбін). [4]

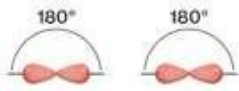

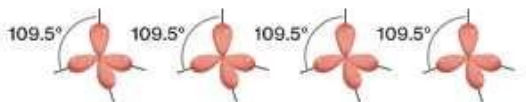
Atomic Orbitals Used	Hybrid Orbitals Formed	Orbital Geometry
$s + p$	sp 	Linear
$s + p + p$	sp^2 	Triangular planar
$s + p + p + p$	sp^3 	Tetrahedral

Рис.1 Типи гібридизації орбіталей

Вуглецеві НЧ представляють унікальний клас вуглецевих наноматеріалів. Аналогічно своїм відомим родичам, фулеренам і вуглецевим нанотрубкам, вуглецеві НЧ виявляють цікаві оптичні та електронні властивості, які можна використовувати для різноманітних застосувань.

Вуглецеві НЧ (англ. Carbon quantum dots) — це невеликі НЧ вуглецю (розміром менше 10 нм).

Структурний аналіз показує подібність будови вуглецевих НЧ, отриманих різними методами. Вуглецеві НЧ містять велику кількість С-С зв'язків графенового типу зі sp^2 -гібридними орбіталями атомів вуглецю, а також деяка кількість sp^3 -гібридованих атомів вуглецю, що призводить до більш розпорядкованої структури (рис. 2). Тим не менш використання різних

методів синтезу призводить до різноманітної ступені упорядкованості графенових фрагментів у вуглецевих НЧ, а також до утворення НЧ різної морфології. З цих причин питання назв і класифікації НЧ досі залишається відкритим.

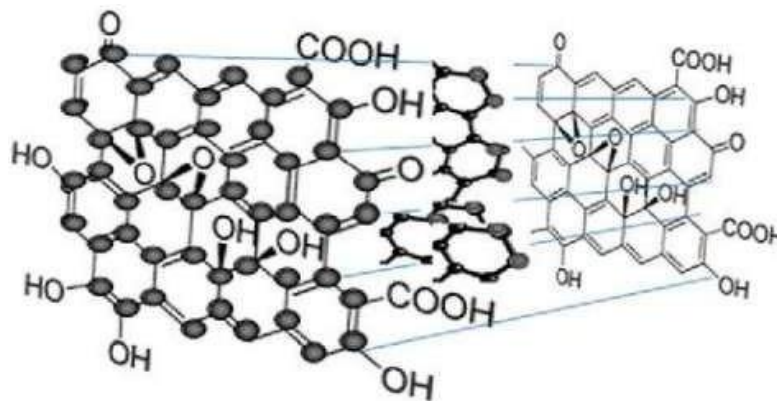


Рис.2 Структура вуглецевої НЧ

1.2. Способи синтезу

Способи отримання вуглецевих НЧ поділені на два методи «зверху-вниз» (top-down) та «знизу-вгору» (bottom-up). Методи «зверху-вниз» дозволяють отримувати вуглецеві НЧ із вуглецевих матеріалів, таких як графіт, сажа, оксид графіту.[5] Методи «знизу-вгору» дають змогу синтезувати вуглецеві НЧ із різних молекулярних органічних попередників. За допомогою даних методів синтезу можна контролювати розмір, форму і властивості отриманих НЧ. Однак ці підходи часто мають недоліки, пов'язані з важким перетворенням речовини в процесі синтезу і низьким виходом продукту. [6] Розглянемо методи детальніше:

1. Методи «зверху-вниз»:

а) Метод дугового розряду.

Метод заснований на розкладанні великих частинок вуглецевих матеріалів на вуглецеві фрагменти меншого розміру під дією електричної дуги. При очищенні одношарових вуглецевих НЧ, отриманих методом дугового розряду з сажі, було виявлено невідомий люмінесцентний

вуглецевий наноматеріал.[7] Після кип'ятіння в азотній кислоті та екстракції було отримано чорну суспензію, з якої було виділено вуглецеві НЧ. Їм відповідали три електрофоретичні смуги, що люмінесціюють у зелено-синій, жовтій та оранжевій області спектру. Кип'ятіння вуглецевих НЧ у розчині кислот-окислювачів використовується у більшості методів синтезу для введення карбоксильних функціональних груп, підвищення гідрофільності, збільшення кількості дефектів у структурі НЧ, які сприяють підвищенню інтенсивності фотолюмінесценції. Розміри таких НЧ становили від 0.5 до 18 нм з переважанням НЧ з діаметром приблизно 1 нм.

Недоліком даного методу є одержання суміші різних вуглецевих структур, у тому числі і залишків НЧ різних розмірів, що становить складність при очищенні та поділі, тому цей метод рідко використовується.

б) Метод лазерної абляції

Іншим швидким методом синтезу вуглецевих НЧ є абляція вуглецевого субстрату за допомогою лазера. Перевагами методу лазерної абляції є можливість отримання розмірів до 10 нм шляхом випаровування вуглецевого матеріалу з поверхні мішені у вигляді молекул, атомів й іонів та їх подальшої конденсації. Методом лазерної абляції вуглецеві НЧ були отримані групою вчених під керівництвом Сан.[8,9,10,11] Для абляції мішені вуглецю (суміш графітового порошку і цементу) в потоці аргону використовувався неодимовий лазер на алюмоїттриєвому гранаті.[8] Розмір частинок становив 3-10 нм. Для збільшення квантового виходу фотолюмінесценції та стабільності НЧ виконували їх пасивацію полімерними агентами, такі як поліетиленгліколь, що містить кінцеві аміногрупи або сополімер (пропіонілетиленімін-ко-етиленімін) [9]. Зразки очищали з допомогою діалізу, після центрифугування вуглецеві НЧ були в надосадовій рідині.[12]

Зробити процедуру в один етап дозволило опромінення дисперсії графіту або сажі в діетаноламіні ультразвуком. Отримані вуглецеві НЧ мали розмір $\sim 3,2$ нм з міжплощинною відстанню кристалічної решітки в діапазоні від 0,20 до 0,23 нм аналогічний алмазу.[10]

Збагачений ізотопом вуглецю C вуглецеві НЧ можна отримати при використанні в якості бази порошку, що містить ізотоп вуглецю C . [13] Таким чином були отримані вуглецеві НЧ діаметром 4-5 нм з квантовим виходом фотолюмінесценції 20%. [14]

Недоліком методу є часткове використання мішені: оскільки випаровування вуглецевого матеріалу проходить з вузької зони ерозії, коефіцієнт використання мішені часто не перевищує 5 %.

в) Електрохімічні методи.

Електрохімічні методи синтезу дають змогу отримувати вуглецевих НЧ у м'яких умовах. Стандартний електрохімічний синтез – це процес електрохімічного травлення різних вуглецевих матеріалів, таких як графіт, вуглецеві нанотрубки та нановолокна, які зазвичай виконують функцію електродів. Головна проблема даного методу - неможливо отримати вуглецеві НЧ з вузьким розподілом за розмірами у зв'язку зі складністю розщеплення електрода на вуглецеві НЧ одного розміру та морфології. [15]

Було синтезовано вуглецеві НЧ шляхом окислення графітового електрода при напрузі 3 В. [16] Отриманий розчин очищали центрифугуванням, а потім розділяли на фракції фільтруванням через мембрани з різними порами. Таким чином, було виділено дві флуоресцентні фракції: з довжиною хвилі випромінювання в області 445 нм та 510 нм. Було також показано, що вуглецеві НЧ мали графітову структуру з міжплощинною відстанню в кристалічній решітці 3.28 Å, що збігається з такою в гранях графіту кристалографічного напрямку.

Вуглецеві НЧ були синтезовані з графенових плівок, що використовувалися як робочі електроди у фосфатному буфері. [17] Отримані НЧ мали максимум випромінювання в зеленій області спектру, а також характеризувалися вузьким розподілом за розмірами, були стабільними у водному розчині.

Електрохімічне отримання вуглецевих НЧ не завжди може бути засноване на використанні графітових електродів як субстратів. Вже було

синтезовано НЧ з низькомолекулярних спиртів у лужному середовищі з використанням платинових електродів. [18] У процесі електрохімічного синтезу відбувається формування вільних радикалів, що зшиваються у вуглецеві фрагменти, і далі за рахунок процесів дегідратації відбувається формування наночастинок. В ІЧ-спектрах вуглецеві НЧ були присутні смуги при 3430, 2930 та 2850 см^{-1} , які підтверджують наявність у структурі фрагментів С-ОН та С-Н. Валентні коливання зв'язків С=О, С=С та С-О-С знаходяться в областях 1700, 1640 та 1250 см^{-1} відповідно. Квантовий вихід фотолюмінесценції для таких НЧ становив 15%.

Методом електрохімічної карбонізації було одержано вуглецеві НЧ на основі цитрату натрію та сечовини. Вони мали хорошу фотостабільність і мали високий квантовий вихід 11.9%. Середній розмір отриманих наночастинок становив 2.4 нм.

2. Методи "знизу-вгору"

а) Піроліз

Процес піролізу дозволяє легко і швидко отримувати вуглецеві НЧ з високою інтенсивністю фотолюмінесценції. Описано синтез НЧ за допомогою піролізу етилендіамінтетраацетату натрію при 400°C у трубчастій печі в атмосфері азоту. Отриманий чорний продукт обробляли ультразвуком у дистильованій воді з утворенням коричневої дисперсії, яку далі очищали. [19] Були отримані вуглецеві НЧ з розміром 7.7 нм без видимої агрегації, квантовий вихід склав 66%.

В результаті низькотемпературного піролізу лимонної кислоти були синтезовані вуглецеві НЧ із хорошою пасивацією поверхні, у той час як присутність розгалуженого поліетиленіміну дозволило легко отримати НЧ із пасивованою поверхнею та додатковим захисним шаром. Температура піролізу 200°C була обрана для запобігання деградації захисного полімеру. [20] В аналогічному синтезі для поверхневої пасивації застосовували N-(бета-аміноетил)-у-амінопропілметилдиметоксисилан. [21] Для синтезу вуглецевих НЧ використовували прожарювання бета-циклодекстрину трубчастої печі при

300°C. Отриманий чорний спінений вуглецевий залишок піддавали ультразвуковій обробці в азотній кислоті, обробляли в мікрохвильовій печі і потім очищали. Прожарюванням глютамату натрію в печі при 400°C з подальшим розтиранням приготовленого матеріалу та очищенням дворазовим диспергуванням отримували НЧ з фотолюмінесценцією в різних областях спектру.[22]

б) Гідротермальний синтез

Гідротермальний метод - один з найпоширеніших методів отримання вуглецевих НЧ, заснований на нагріванні водних розчинів матеріалів, що містять вуглець, в замкненому просторі.

З допомогою даного методу можна за одну стадію отримати поверхнево-модифіковані вуглецеві НЧ з інтенсивною люмінесценцією без необхідності проведення додаткової пасивації та подальшої модифікації. Серед недоліків даного методу варто відзначити можливе утворення сажі під час синтезу, що може знизити вихід продукту та ускладнити процедуру очищення. Групою вчених з Китаю був проведений гідротермальний синтез на основі розчинів природних вуглеводів (глюкози, сахарози, крохмалю) у присутності соляної кислоти або гідроксиду натрію.[23] Розчини вуглеводів в автоклаві нагрівали при 160°C протягом 4 год.. Вуглецеві НЧ, отримані з різних джерел, мали подібні морфологію та розміри (70-100 нм).

в) Синтез з використанням мікрохвильового випромінювання

Мікрохвильовий синтез дозволяє скоротити час отримання вуглецевих НЧ до декількох хвилин, а також варіювати розмір та властивості НЧ шляхом зміни потужності випромінювання. Квантові виходи люмінесценції НЧ, отриманих цим способом, зазвичай мають нижчі значення, порівняно з НЧ, синтезованими іншими методами.[24]

Суміш лимонної кислоти з бромідом тетраоктиламонію (ТОАБ) у різній концентрації піддавали дії мікрохвильового випромінювання протягом 2-3 хв при потужності 500 Вт.[25,26] Розмір вуглецевих НЧ не перевищував 10 нм, при цьому залежав від концентрації ТОАБ: зі збільшенням концентрації

останнього розмір наночастинок зменшувався. Частинки мали аморфну структуру з міжплощинною відстанню 3.55 Ангстрем, що більше ніж відстань між площинами в об'ємному графіті. В ІЧ-спектрах був присутній пік в області 1750 cm^{-1} , що відповідає коливанням карбонільної групи $\text{C}=\text{O}$, плече в області 1650 cm^{-1} відповідає коливанням фрагментів $\text{C}=\text{C}$ або CONH_2 . Пік області 1200 cm^{-1} обумовлений коливаннями груп $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$.

Також вчені отримували вуглецеві НЧ із лимонної кислоти у присутності амінів.[27] Було встановлено, що аміни можуть відігравати подвійну роль - поверхнево-пасивуючого реагенту та агента для введення азотовмісних функціональних груп. Найбільшу ефективність у синтезі НЧ виявили первинні аміни, на що вказувало збільшення квантового виходу (до 30% при використанні етилендіаміну). В ІЧ-спектрах спостерігалися характерні валентні коливання зв'язків $\text{C}=\text{O}$ і $\text{C}-\text{N}$.

г) Озолення (хімічне або термічне окислення)

Цей метод є ефективним підходом до синтезу вуглецевих НЧ у великій кількості. Однією з переваг цього методу, крім простоти виробництва сажі для синтезу НЧ, є можливість його очищення від деяких металів та їх сполук під час нагрівання. Частинки, що утворюються на основі сажі, мають середні розміри < 10 нм.[28,29,30] Однак в цьому методі використовуються важкі умови протягом тривалого часу, і концентровані кислоти, в результаті чого виготовляють частинки з відносно низької квантовим виходом та поганим розподілом розмірів. [24]

Наукова група Мао отримала НЧ збираючи сажу із свічок, яку нагрівали з азотною кислотою, подібно до методів "зверху вниз", щоб збільшити кількість поверхневих дефектів та окислення поверхні.[28] В результаті були отримані НЧ з діаметром ~ 2 нм. НЧ, очищали діалізом. Склад очищених НЧ значно відрізнявся від початкового складу сажі.

У подальших дослідженнях наукова група Сен займалася синтезом НЧ вуглецю шляхом спалювання природного газу.[30] Отриману сажу кип'ятили з азотною кислотою, виділені шляхом центрифугування НЧ очищали за

допомогою діалізу, розмір часток становив $4,8 \pm 0,6$ нм. Дослідження методами спектроскопії ЯМР та ІЧ-спектроскопії дозволило визначити наявність sp^2 -гібридизованих атомів вуглецю, і присутність карбоксильних груп, що привело до висновку, що вуглецеві НЧ складаються з нанокристалічного ядра на основі sp^2 -гібридизованих атомів вуглецю з функціоналізованою поверхнею, що містить карбоксильні групи.

Був розроблений підхід до підготовки вуглецевих НЧ з людської волосини. Суміш волосся і концентрованої сірчаної кислоти нагрівали при 40, 100 і 140 °С протягом 24 год..[31] Приготовані НЧ включали функціональні групи, що містять атоми азоту і сірки. Квантовий вихід, елементний склад і оптичні властивості сильно залежали від температури проведення реакції та середніх розмірів вуглецевих НЧ. НЧ, отримані при більш високих температурах, мали менші розміри, містили велику кількість сірки, а також мали флуоресценцію при більш великих довжинах хвиль спектра.

Одним з унікальних методів є процес отримання вуглецевих НЧ при відсутності термічної обробки. [32] Просте змішування оцтової кислоти, води та оксиду фосфору дало можливість приготувати великі і стабільні у водному розчині НЧ з випромінюванням в зеленій області спектра. У процесі синтезу оцтова кислота служить в якості джерела вуглецю. Середній розмір частинок був ~ 105 нм. Аналогічним способом були отримані вуглецеві НЧ на основі глюкози.[33] Вони також мали великий розмір (~ 120 нм), смугу випромінювання в зеленій області спектра і низький квантовий вихід ($\sim 8\%$).

1.3. Властивості

Через відносну новизну і складність вуглецевих НЧ, вивчення їх хімічної природи і властивостей потребує застосування різних фізико-хімічних методів. Так як вуглецеві НЧ виявляють цікаві оптичні властивості, численні дослідження були зосереджені на спробах пояснити механізми фотофізичних явищ, що відбуваються у даних вуглецевих НЧ.

Поглинання світла в ультрафіолетовій і видимій області оптичного

спектру (УФ-видимого поглинання) відбувається завдяки електронним переходам. Вуглецеві НЧ, отримані різними методами, демонструють поглинання в УФ-області спектра (260 – 320 нм), і при цьому положення піку поглинання змінюється в залежності від умов синтезу частинок.

В спектрі поглинання вуглецевих НЧ, отриманих за допомогою лазерної абляції з вуглецевої мішені, був відсутній виражений пік.[8] У випадку НЧ, отриманих шляхом електрохімічного синтезу, інтенсивний і вузький пік поглинання реєстрували при довжині хвилі 270 нм (4,59 eV). Цей факт пов'язували з вузьким розподілом за розмірами отриманих частинок ($2,8 \pm 0,5$ нм). НЧ, отримані гідротермальним синтезом з графенових листів, на додаток до піку при 230 нм, що присутній у вихідних графенових фрагментах, з'явився новий пік при 320 нм, пов'язаний з утворенням НЧ.[34]

Також, вуглецеві НЧ мають властивість фотолюмінесценції (див. п. 1.4.) та фотоакустичні, вони ефективно перетворюють енергію з поглиненого світла в тепло порівняно з іншими досліджуваними наноматеріалами (детальніше див. п. 1.7.).

1.4. Фотолюмінесценція

Найбільш цікавою властивістю вуглецевих НЧ є фотолюмінесценція, яка залежить від довжини хвилі, широкий спектральний діапазон, і відносно високі пікові інтенсивності випромінювання. У той час як колір фотолюмінесценції напівпровідникових квантових точок пов'язаний з ефектами квантового розміру і, таким чином, корелює з діаметром НЧ, положення піку НЧ може бути пояснено іншими властивостями. Процеси синтезу вуглецевих НЧ дозволяють отримати частинки різних розмірів, проте, випромінювання в залежності від довжини хвилі збудження, ймовірно, пов'язане з появою нових енергетичних станів НЧ, що виникають через присутність поверхневих дефектів вуглецевих НЧ. Із зменшенням кількості дефектів, в першу чергу на поверхні НЧ, мабуть, можна зменшити залежність спектра фотолюмінесценції від довжини хвилі збуджуючого світла.[35]

Найчастіше, НЧ, отримані різними методами демонструють залежну від довжини хвилі фотолюмінесценцію, з діапазоном випромінювання, що лежить в синьо-зеленій області спектра.

1.5. Поглинання клітинами

Відповідно до унікальних оптичних властивостей, що залежать від розміру, флуоресцентні вуглецеві НЧ мають великий потенціал для довгострокової нетоксичної біологічної візуалізації. Проте механізм їх взаємодія з живими клітинами ще не повністю вивчений. Вже було показано, що на клітинне поглинання НЧ може впливати набір факторів, таких як: розмір НЧ, форма поверхні та склад білків на поверхні НЧ.

Кілька досліджень показали ефект розведення НЧ під час поділу клітини. Крім того, більшість досліджень продемонстрували поглинання НЧ клітинами. Нещодавно одна команда показала роль клітинного циклу в поглинанні НЧ.[36] Проте всі ці спостереження були проведені за проліферуючими клітинами.

На прикладі НЧ на основі карбїду кремнію (SiC) було показано вплив різних клітин, поділу клітин на поглинання НЧ. Вибрані НЧ мають переваги, такі як невеликий розмір невеликого, яскрава флуоресценція, високе поглинання клітинами, природне націлювання на ядро клітини.

Було виявлено, що внутрішньоклітинна локалізація та поглинання НЧ SiC сильно залежать від проліферації клітин. Це було показано двома різними способами, спочатку в здорових клітинах і другий у ракових клітинах.

НЧ SiC проникають у клітини і переважно розташовуються всередині ядра [36]. Поглинання НЧ SiC відбувається швидко (протягом 3 годин). НЧ SiC були в основному присутні в ядрах, коли нормальні клітини діляться, і невелика кількість НЧ майже однорідно присутні в цих клітинах без значної концентрації в ядрах, коли клітини зливалися.

Ракові клітини, навпаки, продовжують ділитися завжди, і НЧ SiC завжди є в ядрі незалежно від статусу злиття. Це підтвердило гіпотезу про те, що

націлювання НЧ на ядра тісно пов'язане з поділом клітин (див рис.3).[37] Між здоровими і раковими клітинами існують дві відмінності з точки зору маркування.

По-перше, поглинання НЧ значно більше у ракових, ніж у здорових клітинах, навіть коли вони проліферують. По-друге, SiC НЧ в ракових клітинах в основному були розташовані в ядрах незалежно від стану злиття, тоді як у здорових клітинах ядра були погано мічені, а НЧ в основному розташовані в цитоплазмі. Ці відмінності можна легко пояснити наявністю позаклітинного матриксу в здорових клітинах, що зливаються, що може зменшити поглинання НЧ.

Порівняння здорових клітин без злиття з раковими клітинами показує, що мічення завжди вище в ракових клітинах порівняно зі здоровими клітинами. [38] Це також добре узгоджується з ефектом поділу, оскільки ракові клітини діляться інтенсивніше, ніж здорові. Спостереження привели до висновку, що концентрація НЧ в ядрах пов'язана з поділом клітини. Хоча зв'язок між поділом клітин і ядерним поглинанням НЧ SiC ще не повністю пояснений, але певні дослідження свідчать про специфічність поглинання НЧ раковими клітинами.

Отже, поведінка НЧ може бути неоднаковою для неконфлюентних (проліферуючих) і зливних (не проліферуючих) клітин.

Результати дали пояснення переважного знищення ракових клітин з високою концентрацією НЧ SiC .Але у той же час причина переважного знищення ракових клітин НЧ SiC не була встановлена. Дослідження показало, що воно залежить від збільшення поглинання НЧ раковими клітинами порівняно з нормальними , відповідно до інтенсивності клітинного поділу.

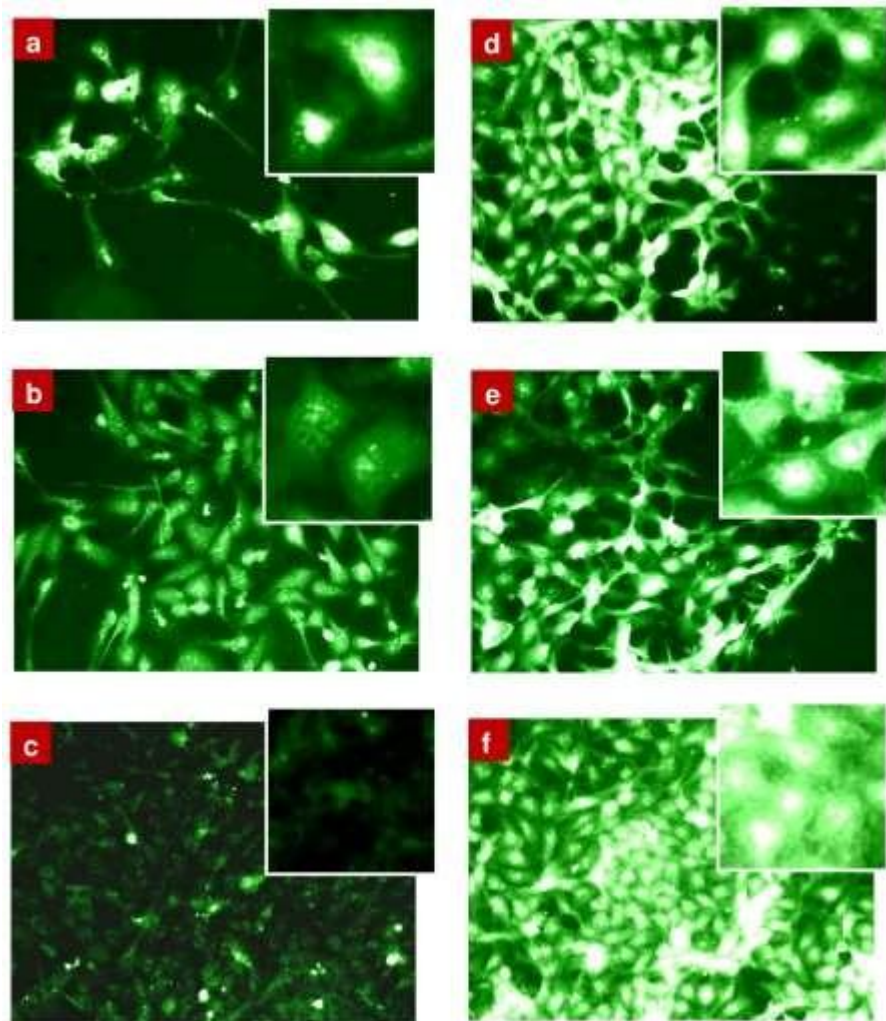


Рис 3. Флуоресцентна мікроскопія

зображення клітин мічених НЧ SiC. У здорових клітинах мічення змінюється із станом злиття: при злитті мічення низьке і відсутнє в ядрах (с), тоді як воно сильне і присутнє в ядрах під час поділу клітин (а і b). У ракових клітинах, які проліферують на мічення не впливає злиття (d, e і f).

1.6. Застосування в біології та медицині

Вуглецеві НЧ застосовуються у біомедичних цілях , тому що у цій сфері особливо важливі нетоксичність та розмір використовуваних агентів. Оскільки вуглець є основним елементом живих організмів, вуглецеві наноматеріали мають низьку токсичність у порівнянні з іншими наноматеріалами.

Вуглецеві НЧ не містять у своїй структурі важких металів, як широко відомі напівпровідникові квантові точки, тому не можуть провокувати проблеми зі здоров'ям та навколишнім середовищем, вони мають розмір у нанометровому діапазоні, тому зручні для впровадження у клітину *in vivo* (*in vivo* — у перекладі з латині: у живому (чи на живому) — означає, що подія відбувається всередині організму). Крім того, поверхня вуглецевих НЧ містить безліч функціональних груп і може бути модифікована органічними, неорганічними, полімерними та іншими речовинами, що володіють різними властивостями.

Візуалізація. Вуглецеві НЧ перспективні як альтернатива напівпровідникових квантових точок для візуалізації біологічних систем як *in vitro* (*In vitro* (лат. *in vitro* - «у склі») - це техніка виконання експерименту чи інших маніпуляцій у пробірці, або, більш загально, у контрольованому середовищі поза живим організмом), так і *in vivo*. Було показано, що поверхнево-пасивовані вуглецеві НЧ з низькою токсичністю можуть безпечно використовуватися у високих концентраціях *in vivo*. [38] Покриті поліетиленгліколом вуглецеві НЧ не мали токсичної дії *in vivo* протягом 28 днів при внутрішньовенному введенні мишам у кількості 8-40 мг•кг⁻¹, Фізіологічні показники були однакові у всіх мишей, які отримували різну дозу вуглецевих НЧ, що вказує на передбачувану нетоксичність вуглецевих НЧ при вказаних і нижчих дозах, які зазвичай використовуються для візуалізації *in vivo*. У взятих для дослідження органах не було виявлено відхилень, незважаючи на те, що концентрація вуглецевих НЧ у печінці та селезінці була вищою, ніж в інших органах. Крім того, було досліджено життєздатність клітин після їх обробки вуглецевими НЧ у різній концентрації. Виявлено, що середня життєздатність клітини становить >95% при концентрації вуглецевих НЧ, що не перевищує 1.8 мг•мл⁻¹. Дані результати наочно показали, що вуглецеві НЧ набагато більш біосумісні, ніж напівпровідникові квантові точки. [37]

Локалізація вуглецевих НЧ у клітинах багато в чому визначається

властивостями їхньої поверхні. Частинки, пасивовані сополімером і синтезовані з активованого вугілля, можуть служити мітками для клітинної мембрани і цитоплазми клітин.

Були отримані вуглецеві НЧ, покриті амфіфільним біосумісним полімером, які виявилися здатними проникати через мембрану і накопичуватися в цитозолі. [37]

Перед візуалізацією клітини зазвичай інкубують з вуглецевими НЧ для поглинання частинок клітинами. Було припущено, що вуглецеві НЧ переміщуються в клітину за допомогою ендоцитозу. Крім того, поглинання НЧ, імовірно, можна поліпшити за рахунок їх зв'язування з мембранопроникними білками.

Як було згадано вище, вуглецеві НЧ здатні люмінесціювати в різних діапазонах довжин хвиль, що дозволяє дослідникам контролювати та вибирати довжини хвиль випромінювання та збудження. Якщо довжина хвилі збудження досить зсунута в червону область спектра, вуглецеві НЧ здатні випромінювати у ближній ІЧ-області спектру. Незважаючи на те, що випромінювання в ближній ІЧ-області спектру відносно слабке, вуглецеві НЧ мають великий потенціал для роботи в області прозорості біотканин. Було показано можливість застосування вуглецевих НЧ як контрастного агента в живих мишах. В експериментах НЧ вводили мишам підшкірно, в результаті чого спостерігалася яскрава фотолюмінесценція, що загасала лише через 24 год. У разі внутрішньовенного введення вуглецевих НЧ фотолюмінесценція спостерігалася лише в області сечового міхура, підтверджуючи, що сечовипускання є основним шляхом виведення з організму введених внутрішньовенно вуглецевих НЧ.

Незважаючи на те що вуглецеві НЧ на даний момент використовуються для візуалізації об'єктів не тільки *in vitro*, а й *in vivo*, фотолюмінесценція більшості вуглецевих НЧ знаходиться в УФ- або короткохвильовій видимій області, що істотно обмежує застосування їх для моніторингу глибоких тканин. Крім того, майже всі організми мають автолюмінесценцію в тих же

областях спектру, що може серйозно впливати на результати дослідження. Тому необхідно створення вуглецеві НЧ, які мають люмінесценцію в ближній ІЧ-області.

Вуглецеві НЧ можуть бути використані у фотодинамічній терапії для лікування поверхневих пухлин. Спочатку вуглецеві НЧ локалізують у пухлинній тканині, після чого їх опромінують світлом певної довжини хвилі, що спричиняє утворення синглетного кисню, що впливає на ракові клітини.

1.7. Лікування раку

Були проведенні дослідження для виявлення проникнення вуглецевих наноматеріалів в органи (серце, печінка, селезінка, нирки, м'язи, легені та мозок) через 24 години після внутрішньовенної ін'єкції НЧ до хвоста щура, безпечних доз та лікування тварин вуглецевими наноматеріалами (з підшкірним і внутрішньовенним введенням).[37] Чотири різних типи наноматеріалів, зокрема вуглецеві мезочастинки фтору, вуглецеві НЧ, синтезовані з β -аланіну та сечовини+лимонної кислоти за допомогою мікрохвильового нагрівання та НЧ глюкози-етилендіаміну, отриманих шляхом гідротермального синтезу. Перед ін'єкцією всі НЧ були змішані з окремою плазмою крові, таким чином покриваючись аутологічною біокороною з білків плазми. Це дослідження було проведене, щоб надати експериментальні докази, що фотоакустичний сигнал НС можна використовувати для кількісного виявлення розподілу вуглецевого наноматеріалу в організмі. Уколи були внесені в хвостову вену щурів розведеними розчинами вуглецевих наноматеріалів в обсязі 300 мкл.

Органи щурів використовували для фотоакустичного аналізу через 24 години після внутрішньовенного введення вуглецевих наноматеріалів. Щурів анестезували та вбивали шляхом швидкого обезголовлення та після цього різні органи розсікали, а зразки заморожували.

З допомогою фотоакустичної установки реєстрували збуджені

фотоакустичні сигнали . Для всіх досліджених НЧ зафіксовано найбільш значне посилення фотоакустичного сигналу в печінці. Фотоакустичний сигнал НЧ також посилювався в нирках, селезінці та серці.

Генерацію фотоакустичної реакції можна описати наступними трьома кроками: (1)поглинання випромінювання досліджуваним об'єктом, (2) перетворення поглиненого випромінювання в тепло і появу підвищення температури в нагрітій області, і (3) термопружне розширення, що призводить до випромінювання акустичних хвиль.

Флуоресцентні та фотоакустичні властивості вищевказаних вуглецевих наноматеріалів роблять їх багатofункціональними агентами , які можуть бути використані для бімодальної флуоресцентно-фотоакустичної візуалізації.

Глюкозо-етилендіамінові НЧ мали більш сильну фотоакустичну відповідь, їх вводили в концентраціях, у 10 разів менших. У цьому контексті глюкоза-етилендіамін можна рекомендувати як перспективний засіб у фототермічній терапії для боротьби з раком, оскільки вони можуть ефективно перетворюють енергію з поглиненого світла в тепло і підвищують температуру навколишнього середовища тканина.

Важливим висновком цього дослідження є той факт, що фотоакустичні сигнали НЧ етилендіаміну глюкози, вуглецевих НЧ із сечовини+лимонної кислоти та β -аланіну та мезочастинок фтору можна реєструвати через 24 години після їх внутрішньовенного введення. З'ясовано, що вищевказані вуглецеві наноматеріали мають тривалий час циркуляції в організмі, що робить їх перспективними пролонгованими циркулюючими контрастними речовинами в неінвазивній фотоакустичній візуалізації для отримання патологічної інформації без опромінення. Також можна припустити, що тривалість перебування наноматеріалів в організмі протягом 24 годин дозволяє їх акумулювати пухлинними клітинами за рахунок посиленого ефекту проникнення та утримування, тобто пасивного націлювання на НЧ з використанням патофізіологічних властивостей пухлинних тканин.

Кількість і місце накопичення НЧ в пухлині залежать від їх розміру та

заряду. Фотоакустичні сигнали НЧ етилендіаміну глюкози, вуглецевих наноточок із сечовини+лимонної кислоти та β -аланіну та мезочастинок фтору можна реєструвати через 24 години після внутрішньовенного введення ці вуглецеві наноматеріали, попередньо покриті антологічною біокоронаю з плазми білків у печінці, нирках, серці та селезінці. Ці вуглецеві наноматеріали мають тривалий час циркуляції в організмі, що робить їх перспективними довготривалими циркулюючими контрастними речовинами для фотоакустичної томографії. Тривалість перебування вуглецевих наноматеріалів в організмі сприяє їх накопиченню в пухлині внаслідок інтенсивного пасивного націлювання. Флуоресцентні властивості перерахованих вище вуглецевих наноматеріалів роблять їх багатофункціональними агентами, і можуть бути використані в бімодальній флуоресцентно-фотоакустичній візуалізації. НЧ етилендіаміну глюкози більш ефективно перетворюють енергію з поглиненого світла в тепло порівняно з іншими досліджуваними наноматеріалами, що робить їх перспективними агентами для фототермічна терапія для боротьби з раком.

1.8. Висновки до розділу

З моменту виявлення люмінесцентних вуглецевих НЧ проводилися їх різнобічні дослідження. Було запропоновано безліч підходів до синтезу НЧ, модифікації їх структури, розроблено методики очищення та фракціонування, а також розширено сферу застосування вуглецевих НЧ. Вуглецеві НЧ характеризуються фото- та хімічною стабільністю, незначною токсичністю для клітин та живих організмів, у зв'язку з чим одними з основних областей їх застосування є біологія та медицина.

Розділ 2. Результати роботи

2.1. Постановка задачі

Ознайомитись з методом синтезу та методами характеристизації вуглецевих НЧ (фотолюмінесценція, ІЧ-спектроскопія, ТЕМ-

зображення, визначення розмірів НЧ на установці зета-сайзер). Вивчити принцип роботи установки зета-сайзер . Освоїти роботу на установці та провести тестові дослідження залежності вимірів розмірів НЧ від рН буферного розчину , а також налаштувань у програмному забезпеченні Zetasizer (тобто вибір оптимальних умов). Додатково було розглянуто оптичні властивості, а саме : фотолюмінесценцію, ІЧ-спектр, отримати ТЕМ-зображення. Провести аналіз даних та зробити висновок.

2.2. Ознайомлення із методом синтезу вуглецевих НЧ

Було синтезовано наногібриди вуглецевих НЧ на основі лимонної кислоти, сечовини, амінів , а також із додаванням хлориду гадолінію.

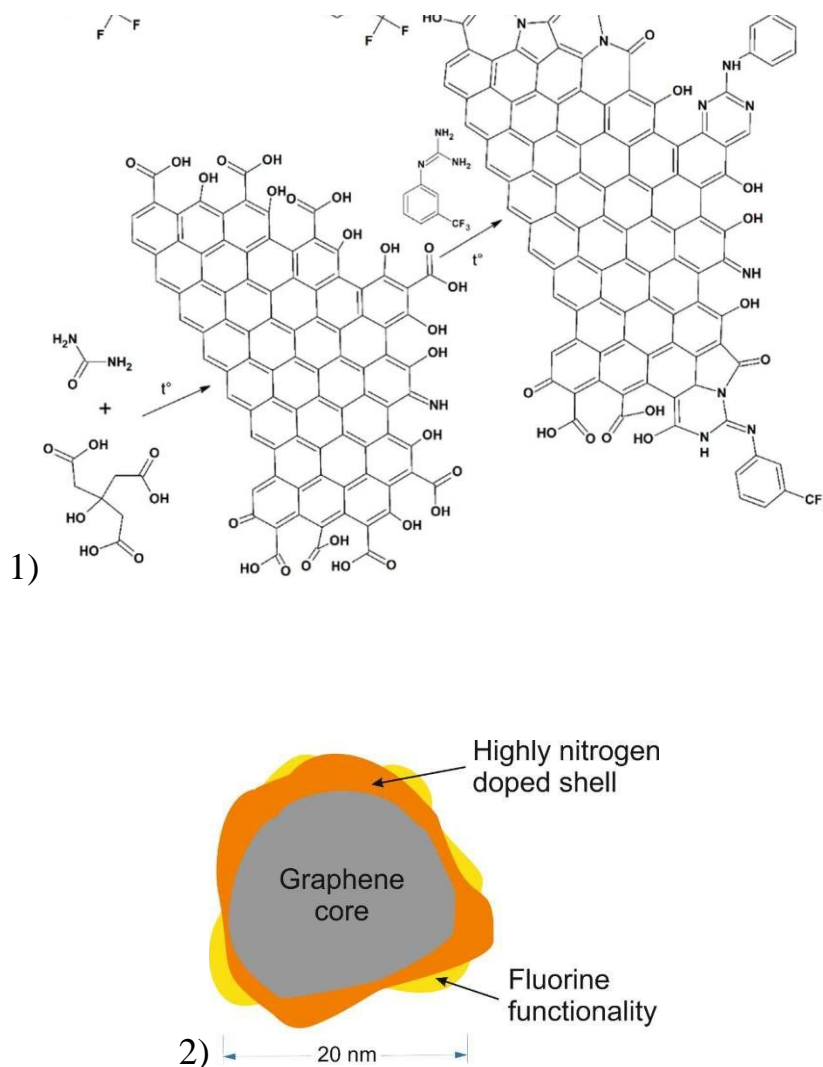


Рис.4 (1)Схема синтезу вуглецевих квантових точок на основі лимонної кислоти, сечовини та амінів та (2) і люстрація продукту карбонізації, збагаченого азотом і фтором

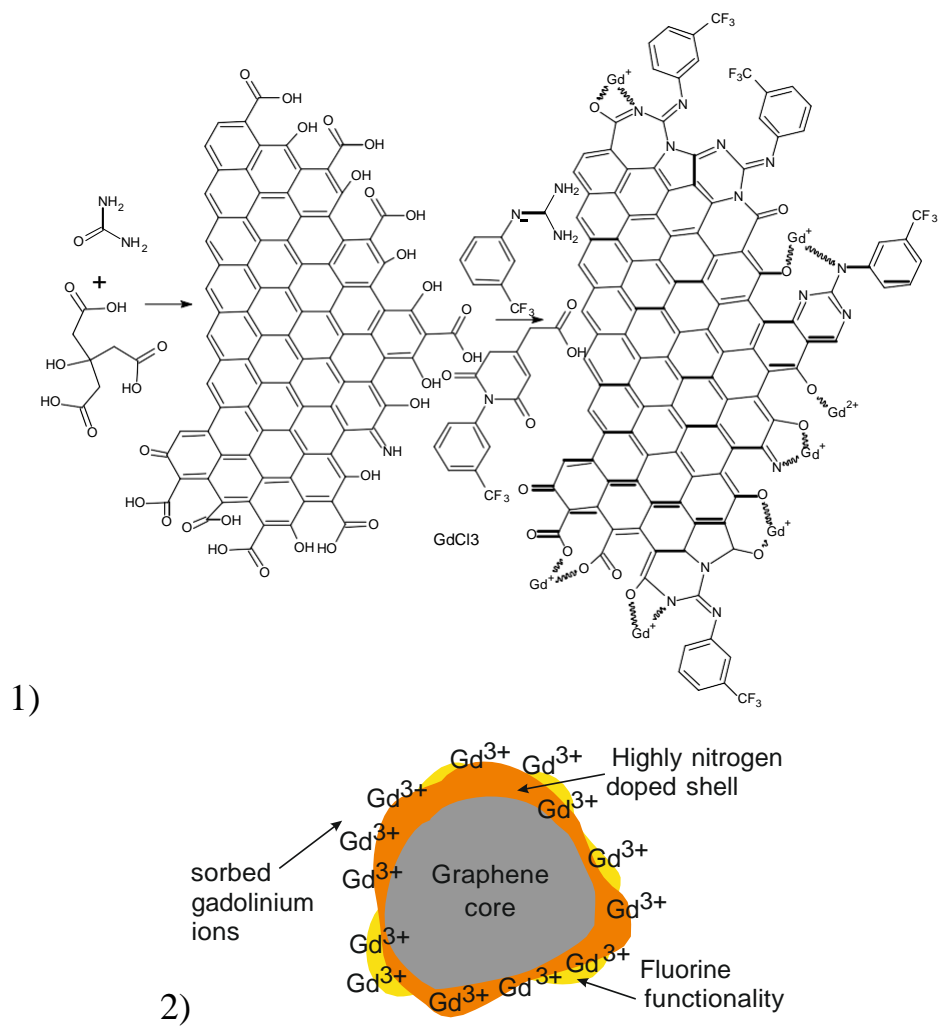


Рис.5 (1) Схема синтезу вуглецевих квантових точок у присутності хлориду гадолінію та (2) ілюстрація продукту карбонізації, збагаченого азотом і фтором, що дають комплекс з іонами гадолінію



Рис.6 Кінцевий продукт

Було підготовлено декілька різних концентрацій вуглецевих НЧ у буферному розчині з різним рН для подальшого дослідження на зета-сайзері.

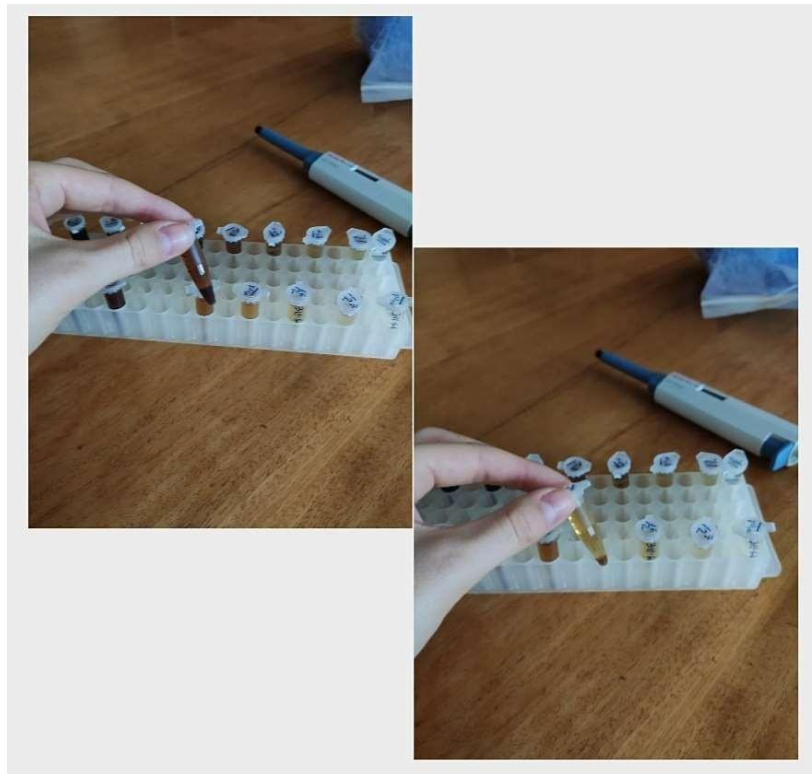


Рис.7 Мікропробірки типу Eppendorf з різними концентраціями вуглецевих НЧ

2.3. Опис та принцип роботи установки зета-сайзер

Установка зета-сайзер (Zetasizer) забезпечує можливість вимірювання трьох характеристик частинок або молекул у рідкому середовищі. Цими трьома основними параметрами є розмір частинок, дзета-потенціал і молекулярна маса. Унікальна технологія дозволяє вимірювати ці параметри в широкому діапазоні концентрацій.

1. Розмір частинок

Розмір частинок, виміряний за допомогою приладу динамічного розсіювання світла (DLS), дорівнює діаметру кулі, яка дифундує з тією ж швидкістю, що й вимірювана частинка. Система зета-сайзер визначає розмір, спочатку вимірюючи броунівський показник рух частинок у зразку за допомогою DLS, а потім інтерпретує розмір з використанням усталених теорій.

Динамічне розсіювання світла (також відоме як PCS – фотонна кореляційна спектроскопія) вимірює броунівський рух і пов'язує його з

розміром частинок. Він робить це, висвітлюючи частинки лазером і аналізуючи коливання інтенсивності в розсіяному світлі.

Броунівський рух визначається як: довільний рух частинок у рідині внаслідок бомбардування молекулами, які їх оточують. Частинки в рідині рухаються хаотично, а швидкість їх руху використовується для визначення розміру частинки.

Важливою особливістю броунівського руху для DLS є те, що маленькі частинки рухаються швидко, а великі — повільніше. Зв'язок між розміром частинки та її швидкістю внаслідок броунівського руху визначається рівнянням Стокса-Ейнштейна.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (1)$$

де D – коефіцієнт дифузії частинок, k_B - константа Больцмана, T - абсолютна температура і η - динамічна в'язкість середовища, в якій є частинки радіуса R .

Коли частинки рухаються, конструктивне та деструктивне додавання фаз розсіяного світла призведе до зростання яскравих і темних ділянок і зменшення їх інтенсивності - або, інакше кажучи, інтенсивність у будь-якій конкретній точці коливається. Система зета-сайзер вимірює швидкість флуктуації інтенсивності, а потім використовує її для обчислення розміру частинок.

Інформація про коефіцієнт дифузії частинок міститься в залежності від часу кореляційної функції флуктуацій інтенсивності. Тимчасова автокореляційна функція згідно з визначенням має такий вигляд:

$$G(\tau) = \langle I(0)I(t - \tau) \rangle = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(t)I(t - \tau) dt \quad (2)$$

де інтенсивність I має різні значення під час t та $(t-\tau)$, t_m – це час інтегрування (час накопичення кореляційної функції).

Вочевидь, що при $\tau = 0$, автокореляційна функція дорівнює середньоквадратичній інтенсивності розсіювання $\langle I^2 \rangle$. Для нескінченного часу кореляція відсутня, і автокореляційна функція дорівнює квадрату середньої

інтенсивності розсіювання:

$$G(\tau) = \langle I(0)I(t - \tau) \rangle = \langle I(0) \rangle \langle I(t - \tau) \rangle = \langle I \rangle^2 \quad (3)$$

На графіку нижче показано кореляційну функцію для великих і малих частинок. Як видно, швидкість розпаду для кореляційної функції пов'язана з розміром частинок, оскільки швидкість розпаду набагато швидша для малих частинок, ніж для великих.

Після вимірювання кореляційної функції цю інформацію можна використовувати для розрахунку розподілу розмірів. Програмне забезпечення зета-сайзеру використовує алгоритми для отримання швидкостей розпаду для ряду класів розмірів для отримання розподілу розмірів.

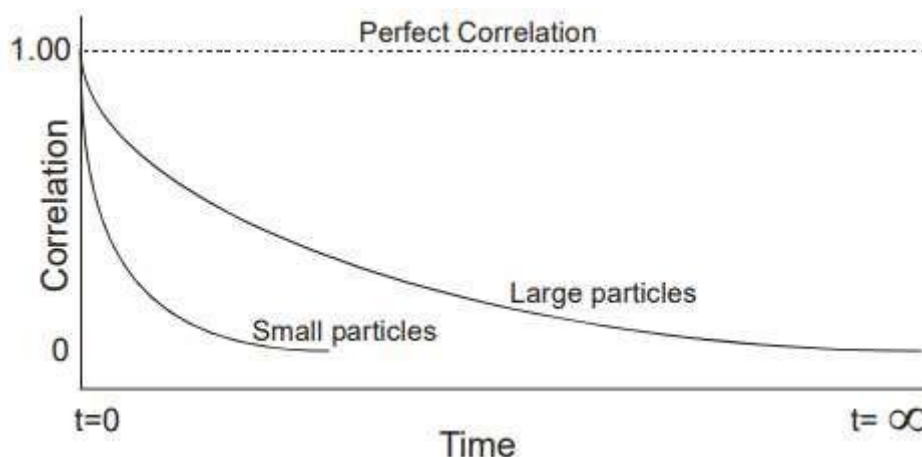


Рис.8 Кореляційна функція розсіяного світла для частинок різних розмірів

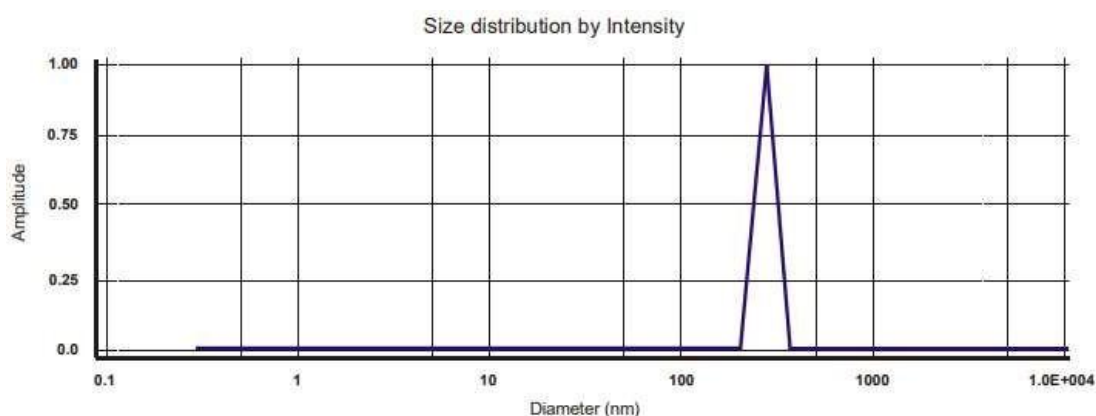


Рис.9 Типовий графік розподілу розмірів

2.Дзета-потенціал і електрофорез

Більшість рідин містять іони; це негативно та позитивно заряджені атоми, які називаються катіонами та аніонами відповідно. Коли заряджена

частинка знаходиться в зваженому стані в рідині, іони протилежного заряду будуть притягуватися до поверхні зваженої частинки.

Негативно заряджений зразок притягує позитивні іони з рідини, а позитивно заряджений зразок притягує негативні іони з рідини. Іони, близькі до поверхні частинки, будуть сильно зв'язані (це внутрішня область, яка називається шаром Штерна), тоді як іони, які знаходяться далі, будуть слабо зв'язані, утворюючи так званий дифузний шар. Усередині дифузного шару є умовна межа, і будь-які іони всередині цієї межі будуть рухатися разом з частинкою, коли вона рухається в рідині; але будь-які іони поза межею залишаться там, де вони є – ця межа називається площиною ковзання. Між поверхнею частинки та диспергуючою рідиною існує потенціал, який змінюється залежно від відстані від поверхні частинки – цей потенціал у площині ковзання і називають дзета-потенціалом.

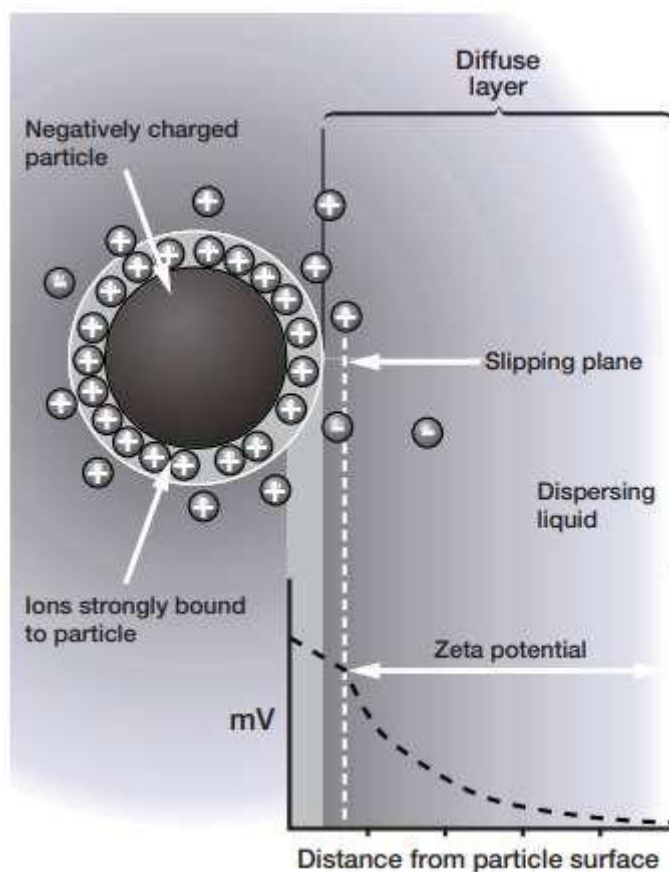


Рис.10 Схема концентрації іонів частинки, зваженої в дисперсійному середовищі

Дзета-потенціал вимірюється за допомогою комбінації методів

вимірювання: електрофорезу та лазерної доплерівської велоциметрії, яку іноді називають лазерним доплерівським електрофорезом. Цей метод вимірює швидкість руху частинки в рідині при застосуванні електричного поля. Коли ми знаємо швидкість частинки та прикладене електричне поле, ми можемо, використовуючи дві інші відомі константи зразка - в'язкість і діелектричну проникність - розрахувати дзета-потенціал.

Застосовують рівняння Генрі:

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(K_a)}{3 \eta}, \quad (5)$$

де z - дзета-потенціал, U_E - електрофоретична рухливість (швидкість частинки в електричному полі), ε - діелектрична проникність, η - в'язкість, $f(K_a)$: функція Генрі.

Величина дзета-потенціалу свідчить про потенційну стабільність колоїдної системи. Колоїдна система - це коли один з трьох станів речовини: газоподібний, рідкий і твердий, тонко диспергований в одному з інших. Для цієї техніки нас цікавлять два стани: тверда речовина, диспергована в рідині, і рідина, диспергована в рідині, тобто емульсія.

Якщо всі частинки в суспензії мають великий негативний або позитивний дзета-потенціал, то вони будуть мати тенденцію відштовхуватися одна від одної, і немає тенденції до флокуляції. Однак, якщо частинки мають низькі значення дзета-потенціалу, то немає сили, яка б перешкоджала частинкам зближуватися та флокулювати.

3. Молекулярна маса

Молекулярна маса речовини — це маса в одиницях атомної маси (а.о.м.) усіх атомів однієї молекули цієї речовини. Математично молекулярну масу можна обчислити з молекулярної формули речовини; це сума атомних ваг усіх атомів, що входять до складу молекули. За допомогою інструментів установки зета-сайзер тепер можна визначити молекулярну масу за допомогою методів вимірювання статичного світлорозсіювання (SLS). В даній роботі не використовується визначення молекулярної маси.

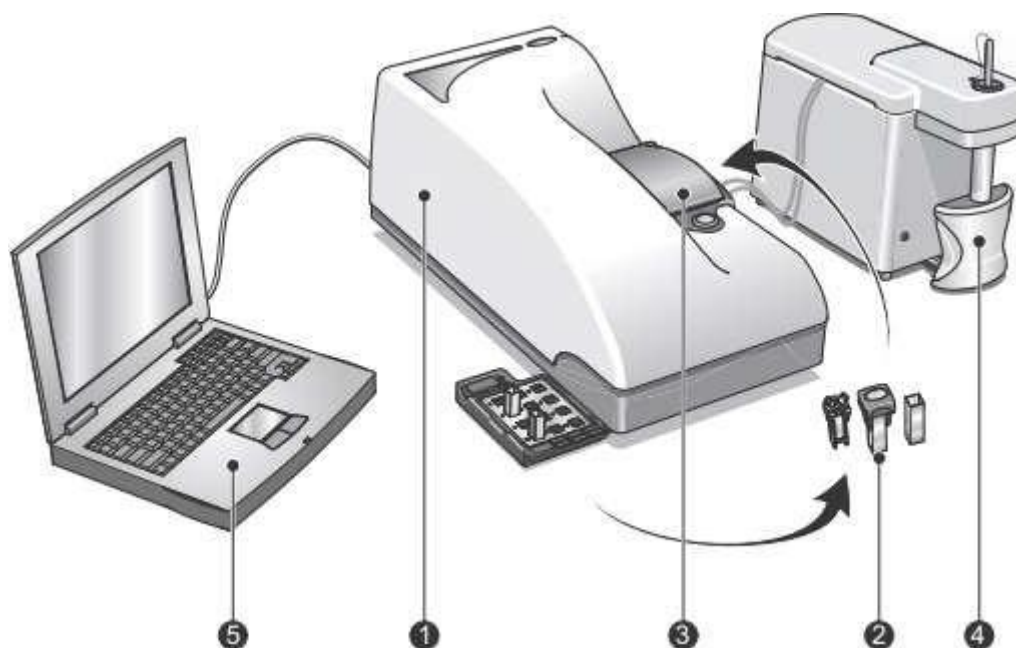


Рис.11 Установка зета-сайзер

(1- оптичний блок– вимірює зразок за допомогою довжин хвиль червоного та зеленого світла, 2 – кювета із зразком, 3 - область для кювети для проведення вимірювання, 4 - титратор МРТ-2, показаний поряд, може бути включено в загальну систему, 5 - комп'ютер з програмним забезпеченням Zetasizer – це керує оптичним блоком, а також обробляє та представляє виміряні дані для визначення розміру, молекулярної маси або дзета-потенціалу для виміряного зразка)

2.4. Проведення тестових досліджень на зета-сайзері, вибір оптимальних умов (рН буферного розчину та налаштувань у програмному забезпеченні Zetasizer)

Для проведення тестових досліджень використали два буферних розчинів з різним рН : перший - сода-буфер із рН = 7,0-8,5 та другий - із рН = 9. Зразки поміщали у скляну кювету.



Рис.12 Зразки та буферні розчини

У налаштуваннях програмного забезпечення Zetasizer вибирали спочатку зворотне розсіювання (Backscatter) , яке виконує «стандартне» вимірювання під кутом 175° , а потім пряме розсіювання (Forward-scatter), яке виконує вимірювання під кутом $12,8^\circ$; тип кювети – скло ; диспергатор - вода. Вводили температуру 23°C та час = 10 с, який потрібно залишити зразку для врівноваження до початку вимірювання , а також кількість вимірів для кожного зразка – 3.

В результаті декількох перших вимірів зрозуміло, що в налаштуваннях краще обирати зворотне розсіювання . Адже при прямому розсіянні (рис. 13) були лише скупчення НЧ (агломерати) порядку декілька сотень нм , а при зворотньому – можна було побачити агломерати порядку менше сотні нм (рис. 14).

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 862,9	Peak 1: 698,2	100,0	118,5
Pdl: 1,000	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,715	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

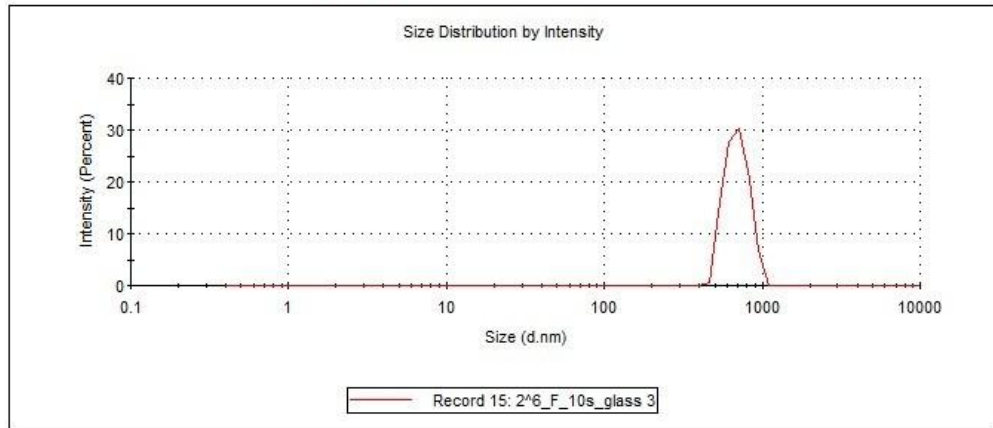


Рис.13 Forward-scatter

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 695,9	Peak 1: 654,4	68,9	244,5
Pdl: 0,562	Peak 2: 5017	17,9	602,4
Intercept: 0,362	Peak 3: 96,53	13,2	25,73

Result quality : Refer to quality report

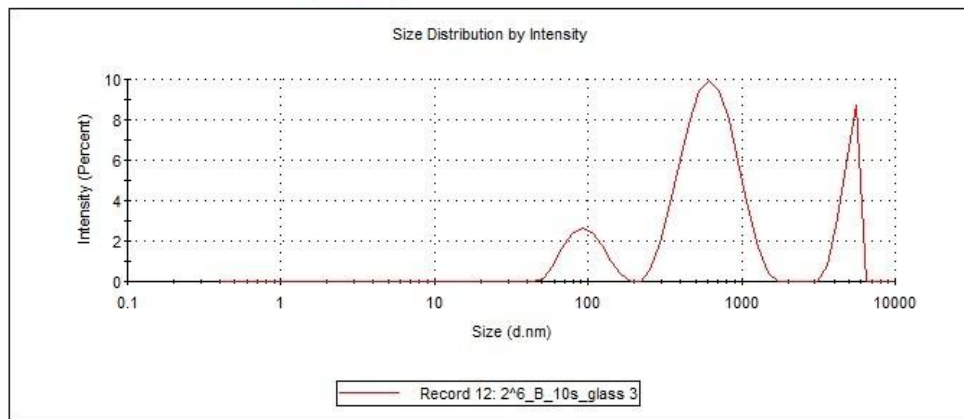


Рис.14 Backscatter

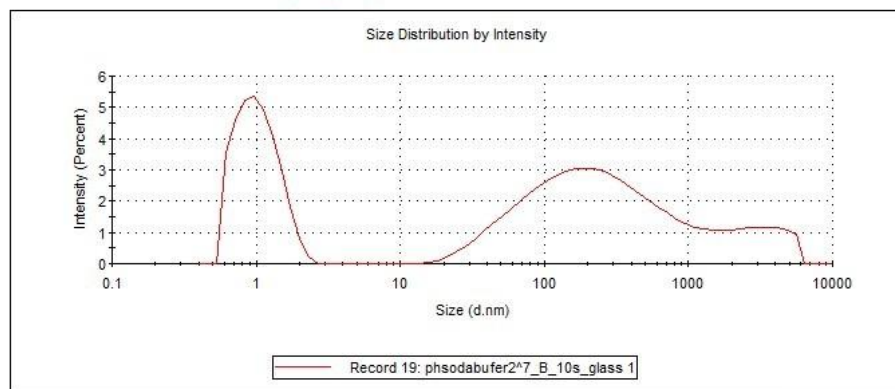
Далі проводилися дослідження для різних буферних розчинів та концентрацій. Порівнюючи графіки зразків однієї концентрації, але різних буферних розчинів (рис.15 (а , b)) можна побачити , що із двох досліджуваних буферних розчинів краще обирати сода-буфер (із рН =7-8,5). Адже при цьому можна побачити розміри НЧ порядку біля 1 нм (33.1% для даної концентрації), хоч і в присутності агломератів(скупчень НЧ) порядку сотень нм, інколи навіть тисяч нм (9.8% для даної концентрації).

Що стосується концентрації НЧ, то краще використовувати зразок із

меншою концентрацію досліджуваних НЧ ($1:2^7$ чи $1:2^8$), адже це теж зменшує ймовірність їх скупчення (рис.15 (с,d)).

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 97,05	Peak 1: 347,0	57,1	375,2
Pdl: 0,530	Peak 2: 1,059	33,1	0,3553
Intercept: 0,142	Peak 3: 3293	9,8	1202

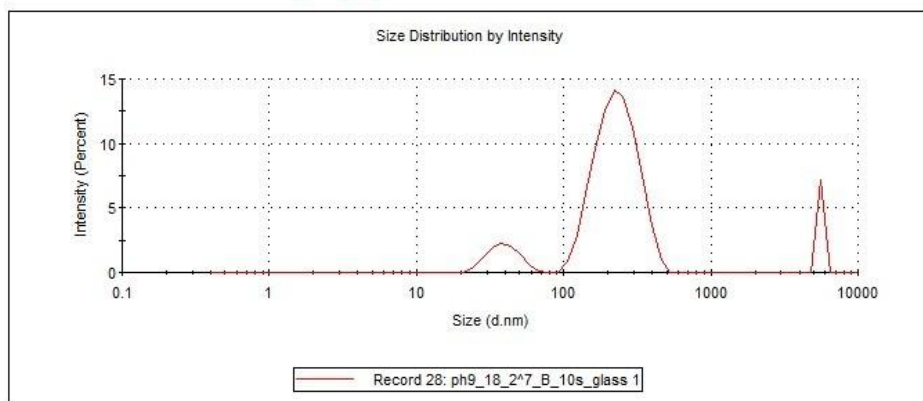
Result quality : Refer to quality report



a.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 681,4	Peak 1: 236,1	82,9	73,79
Pdl: 0,589	Peak 2: 39,63	9,9	9,243
Intercept: 0,304	Peak 3: 5560	7,2	6,104e-5

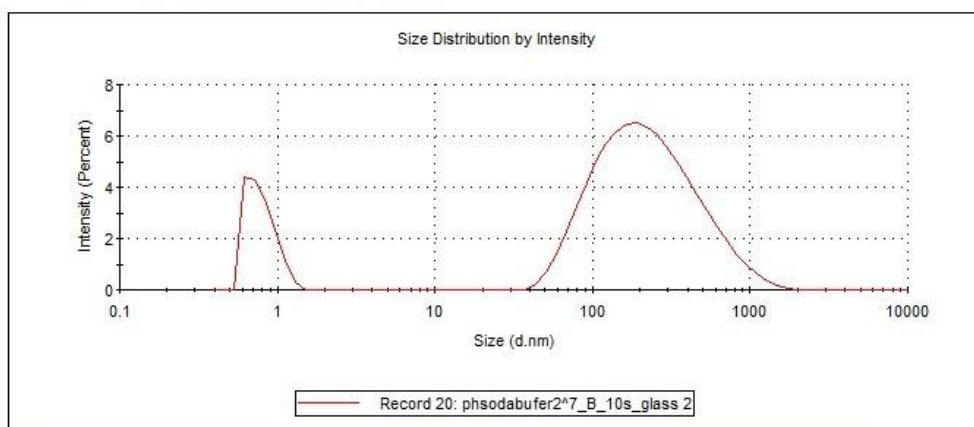
Result quality : Refer to quality report



b.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 131,3	Peak 1: 275,5	83,9	222,3
Pdi: 0,494	Peak 2: 0,7929	16,1	0,1633
Intercept: 0,116	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

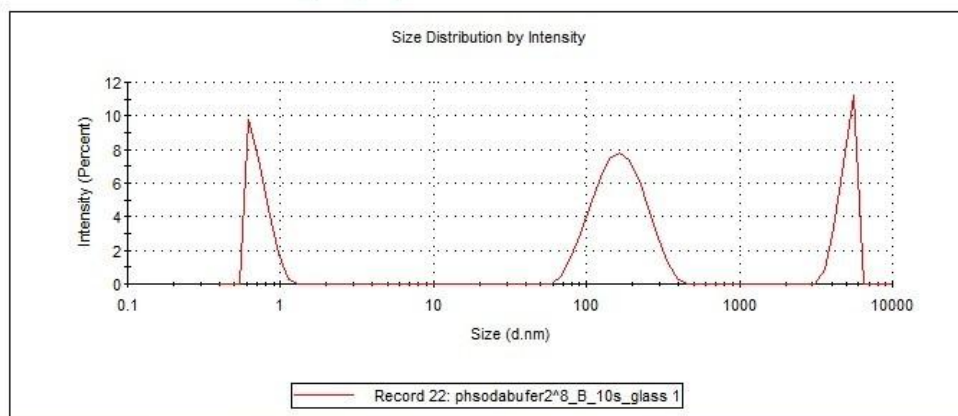
Result quality : Refer to quality report



c.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 419,8	Peak 1: 173,2	53,6	63,96
Pdi: 0,479	Peak 2: 0,7236	23,7	0,1130
Intercept: 0,209	Peak 3: 5033	22,6	592,7

Result quality : Refer to quality report



d.

Рис.15 Розподіл розмірів (із зета-сайзера) для різних умов

Аналіз тестових графіків підтверджує утворення полідисперсних скупчень (агломератів) монодисперсних первинних частинок. Псевдосферичні НЧ мають різний діапазон розподілу розмірів, зокрема часто агломерати мають порядок сотень та інколи тисяч нм .

2.5. Додаткові дослідження спектральних властивостей отриманих НЧ (ІЧ -спектроскопія, фотолюмінесценція, ТЕМ-зображення)

1) Спектр повного відбиття інфрачервоного поглинання

Спектри повного відбиття ІЧ поглинання з перетворенням Фур'є (FTIR ATR) були записані на приладі Shimadzu IRPrestige 21.

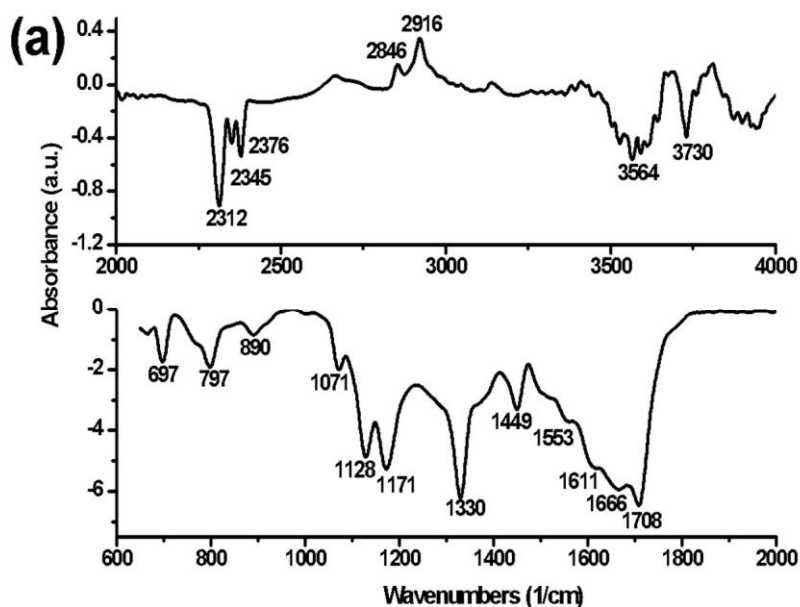


Рис.16 Спектр FTIR ATR

Спектр FTIR ATR (Рис.16) підтверджує утворення різних функціональних груп, що утворюють оболонку на поверхні НЧ. Для всіх ароматичних похідних, що містять групи CF_3 та зв'язки С–Н (включаючи CH_3), широкосмуговий діапазон поблизу 1330 cm^{-1} з'являється з дуже сильною інтенсивністю. Смуги при 1611 cm^{-1} та 1553 cm^{-1} можна віднести до протонування піридинового азоту. Антипик при 1071 cm^{-1} відповідає валентним коливанням зв'язку С–О, а широкосмуговий діапазон $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ можна віднести до валентних коливань групи О–Н.

3) TEM – зображення

Зображення просвічуючої електронної мікроскопії (TEM) були отримані на електронному мікроскопі (Jeol JEM-2100F, при 200 кВ). Енергодисперсійний рентгенівський аналіз (EDX) зразків зображених на TEM проводили на енергодисперсійному спектрометрі AZtec X-MAX від Oxford Instruments.

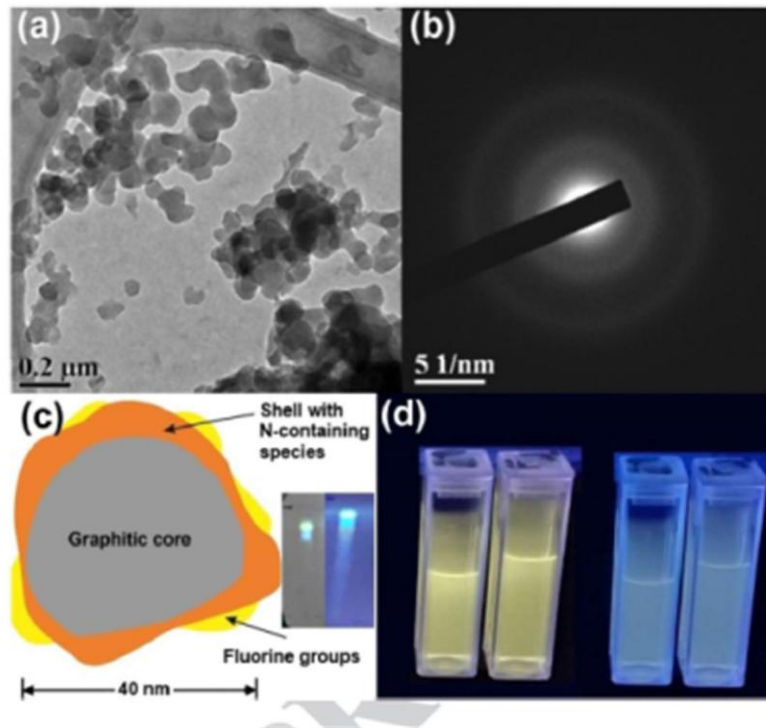


Рис.17 (а) ТЕМ-зображення та (b) патерн електронної дифракції CFN-NP, осаджених за допомогою з HCl, модель структури (c), фотографія НЧ після 10 та 1 кДа фільтрації при освітлені 254 нм та 365 нм (зліва направо)(d)

Аналіз EDX підтверджує утворення полідисперсних агломератів монодисперсних первинних частинок. Незважаючи на те, що псевдосферичні вуглецеві НЧ мають широкий діапазон розподілу розмірів, від 25 нм до 80 нм, середній діаметр їх агломерату становить близько 55.5 нм. Шаблон SAED (рис. 17 (b)) підтверджує аморфну структуру виготовлених агломерованих вуглецевих НЧ.

4) Фотолюмінесценція (ФЛ)

Спектри фотолюмінесценції (ФЛ) колоїдних розчинів CF-NP вимірювали при 20 °C на спектрофотометрі PL (PerkinElmer LS 55, лампа-спалах Хе).

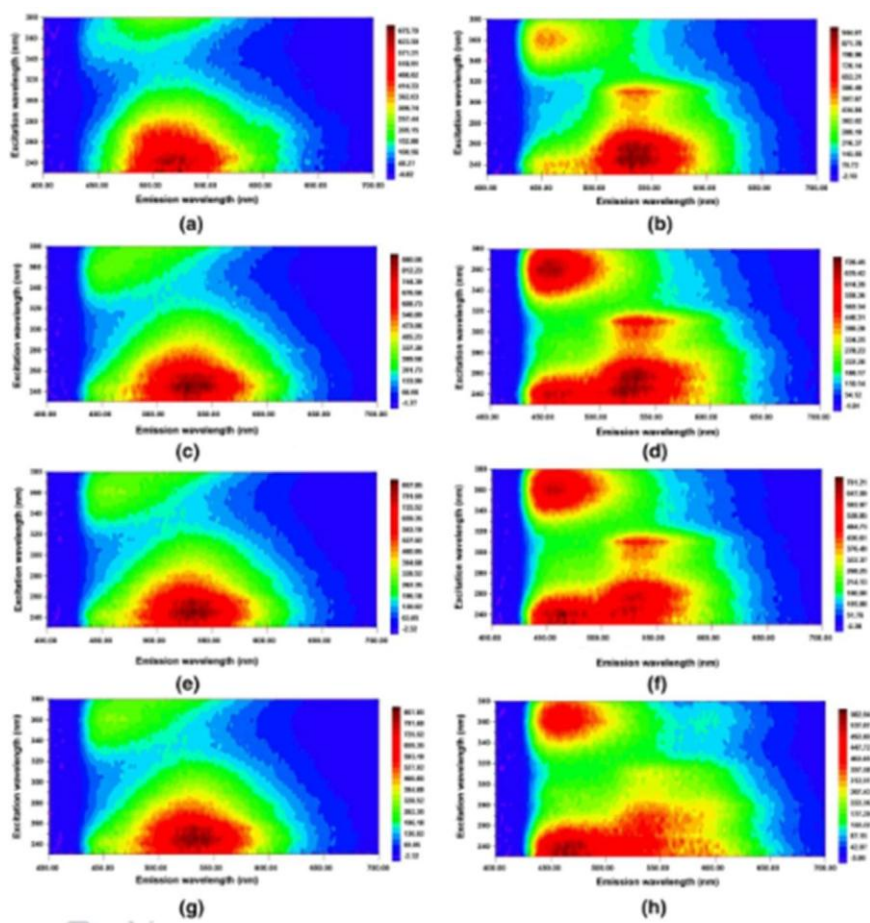


Рис.18 Спектри ФЛ НЧ при різних рН: (а) 1,07, б(5,32), с (6,17), d (9,03), е (9,81), f (10,13), g (10,73) і h (12.03).

При збудженні 365 нм розчин демонструє сильне синє випромінювання з квантовим виходом ФЛ вище 40%. Було виявлено, що НЧ вуглецю є чудовими зондами ФЛ для вимірювання рН (рис.18) Іони гідроксонію OH^- можуть реагувати з піридиновим N у вуглецевому скелеті НЧ з утворенням абсорбуючого комплексу, що призводить до чутливого гасіння ФЛ за допомогою ефекту внутрішнього фільтра. Після оптимізації умов експерименту була розроблена система ФЛ для вимірювання рівня рН у водних розчинах.

Висновки

1) Проведено аналітичний огляд по синтезу та характеристиці вуглецевих НЧ та їх застосуванню в біології та медицині. На основі цього аналізу вибрано типи НЧ, синтезовані із лимонної кислоти, сечовини та амінів, а також у присутності хлориду гадолінію, для проведення досліджень.

2) Ознайомилися з методом синтезу та методами характеристики даних НЧ (фотолюмінесценція, ІЧ-спектроскопія, ТЕМ-зображення, визначення розмірів НЧ на установці зета-сайзер). Зокрема розібрано та вивчено принцип роботи установки зета-сайзер (на основі яких оптичних явищ працює, яких фізичних рівнянь відбувається розрахунок розподілу розмірів, з чого складається).

3) Освоєно роботу на зета-сайзері та проведено тестові дослідження виміру розмірів НЧ, а саме вибір оптимальних умов для майбутніх детальних досліджень. А точніше : як залежать результати від вибору налаштувань у програмному забезпеченні Zetasizer , від рН буферного розчину , а також концентрації НЧ.

4) В результаті проведення тестових досліджень підібрано оптимальні умови для подальших досліджень. Зокрема, у налаштуваннях програмного забезпечення Zetasizer потрібно обирати наступні умови: зворотне розсіювання (Backscatter), тип кювети – скло; диспергатор – вода, температура 23°C та час = 10 с, який потрібно залишити зразку для врівноваження до початку вимірювання, а також із трьох послідовних вимірів для кожного зразка кращим виявився перший. Адже при таких налаштуваннях можна було побачити розміри порядку біля 1 нм, хоч і в присутності агломератів(скупчень НЧ) порядку сотні нм, інколи навіть тисяч нм. Із двох досліджуваних буферних розчинів краще обирати сода-буфер(із рН =7-8,5). Це теж сприяє меншому скупченню НЧ. А також краще використовувати зразок із меншою концентрацією досліджуваних НЧ, що теж зменшує ймовірність їх прилипання.

5) Розглянуті додаткові результати дослідження спектральних властивостей отриманих НЧ (ІЧ - спектроскопія, фотолюмінесценція, ТЕМ-

зображення) дають можливість показати молекулярний склад досліджуваних НЧ (наявності кисню, водню, азоту, вуглецю).

б) Отримані результати підбору оптимальних умов для визначення розміру НЧ будуть застосовані для детальнішого їх вивчення , а далі у майбутньому використання вуглецевих НЧ у медицині.

Література

1. Куцова В.З., Котова Т.В., Аюпова Т.А. Наноматеріали та нанотехнології. Навч. посібник. У двох частинах. –Дніпропетровськ: НМетАУ, 2013. – 103 с.
2. Поплавко Ю. М. Нанофізика, наноматеріали, наноелектроніка: навч. посіб. / Ю. М. Поплавко, О. В. Борисов, Ю. І. Якименко. – К. : НТУУ “КПІ”, 2012. – 300 с, - Бібліогр.: с. 299.-300 пр.
3. Функціональні матеріали для високоенергетичної електроніки Лекція 14 – 15 : <https://ppt-online.org/165649>
4. Проценко І. Ю., Наноматеріали і нанотехнології в електроніці П57 підручник. – Суми : Сумський державний університет, 2017 – 155 с.
5. Y.Dong, R.Wang, H.Li, J.Shao, Y.Chi, X.Lin, G.Chen. Carbon, 50, 2810 (2012)
6. A.Ananthanarayanan, X.Wang, P.Routh, B.Sana, S.Lim, D.-H.Kim, K.-H.Lim, J.Li, P.Chen. Adv. Funct. Mater., 24, 3021 (2014)
7. X.Xu, R.Ray, Y.Gu, H.J.Ploehn, L.Gearheart, K.Raker, W.A.Scrivens. J. Am. Chem. Soc., 126, 12736 (2004)
8. Y.-P.Sun, B.Zhou, Y.Lin, W.Wang, K.A.S.Fernando, P.Pathak, M.J.Meziani, B.A.Harruff, X.Wang, H.Wang, P.G.Luo, H.Yang, M.E.Kose, B.Chen, L.M.Veca, S.-Y.Xie. J. Am. Chem. Soc., 128, 7756 (2006)
9. L.Cao, X.Wang, M.J.Meziani, F.Lu, H.Wang, P.G.Luo, Y.Lin, B.A.Harruff, L.M.Veca, D.Murray, S.-Y.Xie, Y.-P.Sun. J. Am. Chem. Soc., 129, 11318 (2007)
- 10.S.-L.Hu, K.-Y.Niu, J.Sun, J.Yang, N.-Q.Zhao, X.-W.Du. J. Mater. Chem., 19, 484 (2009)
- 11.X.Wang, L.Cao, F.Lu, M.J.Meziani, H.Li, G.Qi, B.Zhou, B.A.Harruff, F.Kermarrec, Y.-P.Sun. Chem. Commun., 3774 (2009)
- 12.Y.-P.Sun, X.Wang, F.Lu, L.Cao, M.J.Meziani, P.G.Luo, L.Gu, L.M.Veca. J. Phys. Chem. C, 112, 18295 (2008)
13. M.O.Dekaliuk, O.Viagin, Y.V.Malyukin, A.P.Demchenko. Phys. Chem.

- Chem. Phys., 16, 16075 (2014)
14. S.-T. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P. G. Luo, L. Cao, M. J. Meziani, J.-H. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Huang, Y.-P. Sun. *J. Phys. Chem. C*, 113, 18110 (2009)
 15. B.-P. Qi, L. Bao, Z.-L. Zhang, D.-W. Pang. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 28372 (2016)
 16. Q.-L. Zhao, Z.-L. Zhang, B.-H. Huang, J. Peng, M. Zhang, D.-W. Pang. *Chem. Commun.*, 5116 (2008)
 17. Y. Li, Y. Hu, Y. Zhao, G. Shi, L. Deng, Y. Hou, L. Qu. *Adv. Mater.*, 23, 776 (2011)
 18. J. Deng, Q. Lu, N. Mi, H. Li, M. Liu, M. Xu, L. Tan, Q. Xie, Y. Zhang, S. Yao. *Chem. ã Eur. J.*, 20, 4993 (2014)
 19. X. Li, J. Chang, F. Xu, X. Wang, Y. Lang, Z. Gao, D. Wu, K. Jiang. *Res. Chem. Intermed.*, 41, 813 (2015)
 20. Y. Dong, R. Wang, H. Li, J. Shao, Y. Chi, X. Lin, G. Chen. *Carbon*, 50, 2810 (2012)
 21. C. Liu, P. Zhang, X. Zhai, F. Tian, W. Li, J. Yang, Y. Liu, H. Wang, W. Wang, W. Liu. *Biomaterials*, 33, 3604 (2012)
 22. N. Zheng, S. Ding, X. Zhou. *Colloids Surf., B*, 142, 123 (2016)
 23. X. He, H. Li, Y. Liu, H. Huang, Z. Kang, S.-T. Lee. *Colloids Surf., B*, 87, 326 (2011)
 24. A. Das, P. T. Snee. *ChemPhysChem*, 17, 598 (2016)
 25. H. Zhu, X. Wang, Y. Li, Z. Wang, F. Yang, X. Yang. *Chem. Commun.*, 5118 (2009)
 26. M. L. Bhaisare, A. Talib, M. S. Khan, S. Pandey, H.-F. Wu. *Microchim. Acta*, 182, 2173 (2015)
 27. X. Zhai, P. Zhang, C. Liu, T. Bai, W. Li, L. Dai, W. Liu. *Chem. Commun.*, 48, 7955 (2012)
 28. H. Liu, T. Ye, C. Mao. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 46, 6473 (2007)
 29. S. C. Ray, A. Saha, N. R. Jana, R. Sarkar. *J. Phys. Chem. C*, 113, 18546 (2009)

30. L. Tian, D. Ghosh, W. Chen, S. Pradhan, X. Chang, S. Chen. *Chem. Mater.*, 21, 2803 (2009)
31. D. Sun, R. Ban, P.-H. Zhang, G.-H. Wu, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu. *Carbon*, 64, 424 (2013)
32. Y. Fang, S. Guo, D. Li, C. Zhu, W. Ren, S. Dong, E. Wang. *ACS Nano*, 6, 400 (2012)
33. P. Zuo, D. Xiao, M. Gao, J. Peng, R. Pan, Y. Xia, H. He. *Microchim. Acta*, 181, 1309 (2014)
34. D. Pan, J. Zhang, Z. Li, M. Wu. *Adv. Mater.*, 22, 734 (2010)
35. R. Jelinek. *Carbon Quantum Dots*. Springer, Cham, 2017
36. Final report on WP5 "Photo-induced cancer therapy" Joint researches between INSA Lyon and RT in order. Task Leader: Dr. Emmanuelle Berger (INSA Lyon), page: 23-45.
37. Cançado LG, Takai K, Enoki T, Endo M, Kim YA et al (2006) General equation for the determination of the crystallite size L_a of nanographite by Raman spectroscopy. *Appl Phys Lett* 88:163106. <https://doi.org/10.1063/1.2196057>
38. FULL ARTICLE: Impact of cell division on intracellular uptake and nuclear targeting with fluorescent SiC-based nanoparticles Tetiana Serdiuk*, Vladimir Lysenko, Barbara Mognetti⁴, Valery Skryshevsky, and Alain Ge'lo'e'n*;