

УДК 541.182, 543.4

**Гидротермальный синтез углеродных точек для использования
в качестве меток в иммуноанализе**

П. Д. Насиров[✉], С. А. Новикова, Е. Д. Грибова, П. П. Гладышев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Университет «Дубна», Дубна, Россия.

✉ chembios.lne@gmail.com

Аннотация. С момента своего открытия и по настоящее время углеродные точки пользуются большим интересом ученых, ввиду своих уникальных свойств, включающих сильную флуоресценцию, хемо- и фотостабильность, биосовместимость, обуславливающих их потенциал применения в биосенсорике, биовизуализации, точечной доставке лекарств и многих других областях. В данной работе представлен новый подход синтеза высоколюминесцентных углеродных точек, разработанный в процессе поиска решений проблемы применения углеродных точек в иммунохроматографическом анализе.

Ключевые слова: углеродные точки, наночастицы, иммуноанализ.

ВВЕДЕНИЕ

В иммунохимических методах анализа в качестве меток для формирования аналитического сигнала в зависимости от концентрации аналита обычно используются коллоидные наночастицы золота. Такие системы дороги, имеют высокие пределы обнаружения и низкую эффективность. Квантовые точки - гораздо более совершенные метки, позволяющие достичь высокого уровня чувствительности в иммунохимическом анализе. Однако они по-прежнему очень дороги и имеют ряд недостатков, таких как высокая стоимость, биотоксичность и необходимость модификации поверхности, предшествующей

их конъюгации с биомолекулами. Углеродные точки (УТ) могут служить альтернативой квантовым точкам. Системы на основе УТ могут иметь чувствительность, сопоставимую с системами на основе квантовых, а сами УТ биосовместимы, просты в синтезе и дешевы в производстве. Внедрение УТ в качестве аналитических меток в иммуноанализе осложняется их меньшим квантовым выходом люминесценции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез УТ производили в автоклавном реакторе вместимостью 25 мл. Навески 3.6 ммоль лимонной кислоты и 2.7 ммоль трис-(гидроксиметил)-аминометана растворяли в 5 мл бидистиллированной воды, после чего помещали в муфельную печь на 6 часов при температуре 200°C. Полученный желтый раствор фильтровали через шприцевой фильтр (0.22 мкм) и подвергали очистке диализом (0.5 кДа) против бидистиллированной воды. Раствор очищенных УТ лиофилизировали.

Для поверхностной модификации полученных УТ лиофилизат перерастворяли в смеси 10 мл тетрагидрофурана и 2 мл ледяной уксусной кислоты и помещали в круглодонную колбу объемом 50 мл, оснащенную обратным холодильником. К полученному раствору при интенсивном перемешивании постепенно, во избежание разогрева реакционной массы, добавляли 8.0 ммоль малеинового ангидрида. После образования гомогенного раствора реакционную массу разогревали до 70°C. Реакцию проводили в течение 6 часов, после чего нагрев отключали и к реакционной массе добавляли 8 мл 20% водного раствора гидроксида натрия.

Очистка полученных модифицированных углеродных точек производилась путем фильтрации через шприцевой фильтр (0.22 мкм), диализа (0.5 кДа) против бидистиллированной воды. Для хранения и дальнейшего применения раствор лиофилизировали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лимонная кислота является наиболее распространенным реагентом для получения УТ микроволновым методом [1], тем не менее гораздо лучшие результаты демонстрируют УТ, полученные комбинацией лимонной кислоты и аминокислотосодержащего соединения, например, мочевины [2]. Подобное улучшение свойства связано с двумя факторами: более эффективной полимеризацией низкомолекулярных прекурсоров и пассивацией поверхностных состояний частиц. В данной работе в качестве дополнительного реагента для получения УТ на основе лимонной кислоты предложен трис-(гидроксиметил)-аминометан. Трис-(гидроксиметил)-аминометан – высокоразветвленное аминокислотосодержащее соединение, способное вступать в реакцию с лимонной кислотой посредством образования амидной и сложноэфирной связей. Свойства полученных УТ были охарактеризованы при помощи методов УФ-Вид спектроскопии, флуориметрии и ИК-спектроскопии.

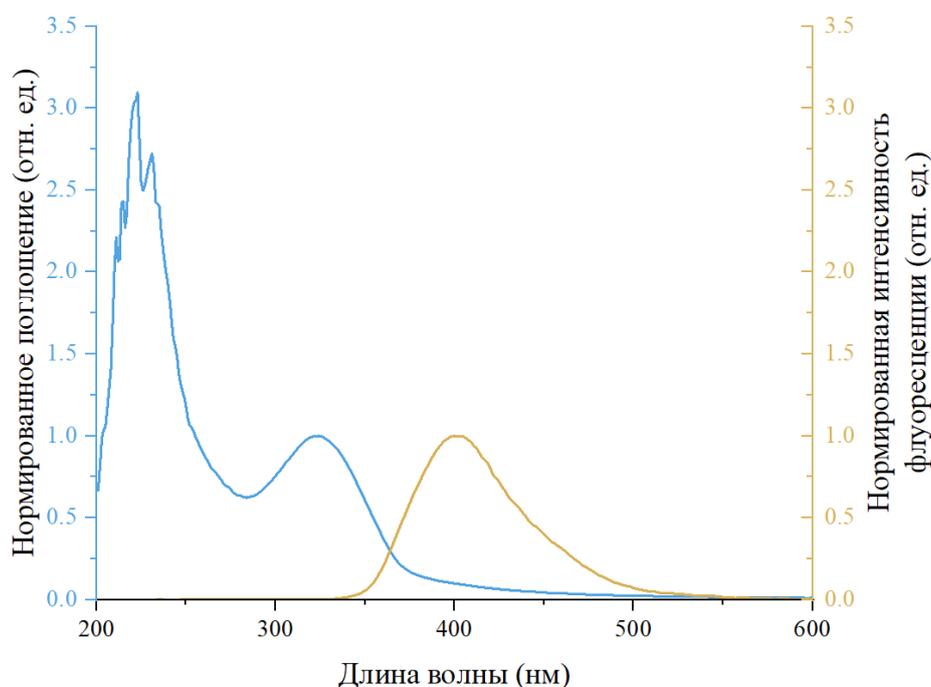


Рис 1. Сопоставление спектров поглощения и люминесценции УТ из лимонной кислоты и трис-(гидроксиметил)-аминометана

Спектр поглощения УТ, синтезированных из лимонной кислоты и трис-(гидроксиметил)-аминометана, демонстрирует две полосы поглощения с максимумами вблизи 230 нм и 330 нм (рис 1.). Пик поглощения вблизи 230 нм, предположительно, обусловлен электронными переходами органических функциональных групп аморфной части УТ, в то время как широкая полоса вблизи 330 нм соответствует поглощению sp^2 -гибридизованных углеродных фрагментов различной природы. Пик флуоресценции данных УТ при облучении 330 нм может быть охарактеризован как узкий с небольшой асимметрией в длинноволновой области с максимумом на длине волны 405 нм. Для УТ, синтезированных в данной работе, рассчитанный квантовый выход флуоресценции составил 65%, что является превосходным показателем для данного класса флуоресцентных материалов.

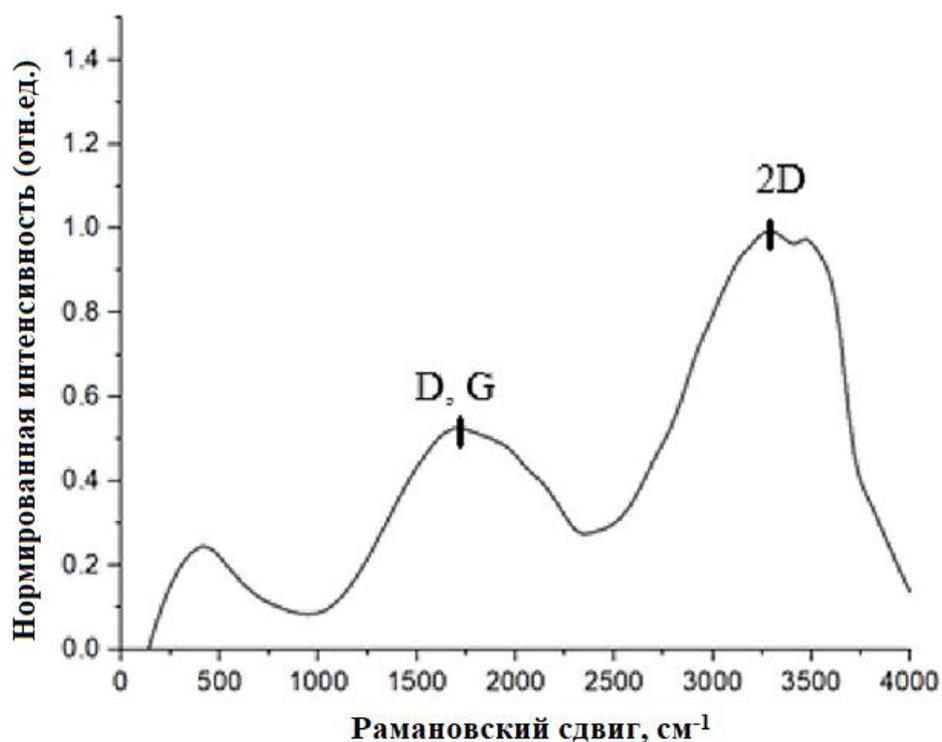


Рис 2. Спектр комбинационного рассеяния УТ, синтезированных из лимонной кислоты и трис-(гидроксиметил)-аминометана

С целью исследования степени кристалличности полученные УТ исследовались методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рис 2.). Полученный рамановский спектр демонстрирует наличие широкого пика средней интенсивности вблизи 1700 см^{-1} , соответствующего наложению D- и G-полос, что свидетельствует об общей высокой степени разупорядоченности структуры, но, в то же время и о наличии кристаллических sp^2 -гибридных фрагментов. Относительно высокая интенсивность, ширина и положение максимума 2D-полосы вблизи 3300 см^{-1} свидетельствует о многослойном характере расположения sp^2 -гибридных фрагментов в структуре данных УТ. На основании полученных данных можно сделать вывод о наличии в структуре данных УТ кристаллического ядра, состоящего из нескольких графеновых слоев. Вероятные различия в размерах и относительном смещении слоев графеновых доменов приводит к уширению полос поглощения в УФ-диапазоне, асимметрии пика флуоресценции и уширению 2D- и G-полос КР-спектра. Данные рамановской спектроскопии, показывающие высокую степень аморфности структуры, коррелируют с данными УФ-Вид спектроскопии, содержащими полосу поглощения органических функциональных групп вблизи 250 нм. Подобные наблюдения могут быть обусловлены наличием в структуре УТ аморфной оболочки, не подвергшейся карбонизации в условиях синтеза. Подобное строение может положительно сказаться на качестве иммуноанализа с применением подобных аналитических меток, так как излучающее ядро и ковалентно пришитая к наночастице биомолекула будут пространственно разделены.

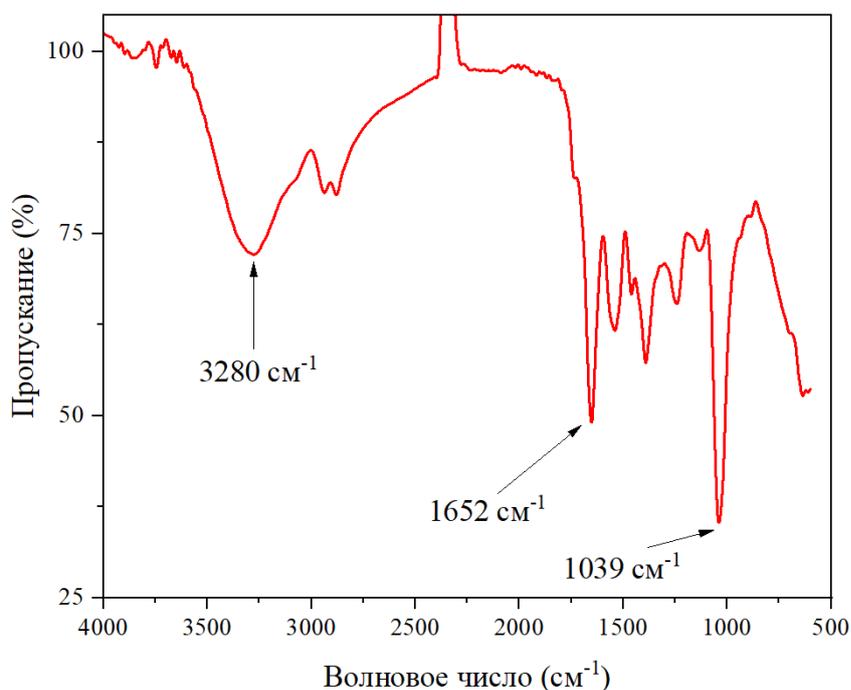


Рис 3. ИК-спектр УТ, полученных из лимонной кислоты и трис-(гидроксиметил)-аминометана

ИК-спектр УТ (приставка НПВО), полученных в данной работе, содержит полосы поглощения на 1039 см^{-1} (С-О деф.), 1652 см^{-1} (С=О вал.), 3280 см^{-1} (О-Н вал.), доказывающие присутствие на поверхности УТ гидроксильных групп (рис 3.). Частота колебания карбонильной группы не характерна для карбоновых кислот и, вероятнее всего, соответствует амидным связям. В совокупности с данными КР-спектроскопии можно сделать вывод о том, что молекулы трис-(гидроксиметил)-аминометана взаимодействуют с карбоксильными группами продуктов карбонизации лимонной кислоты, изолируя излучательный домен от внешней среды.

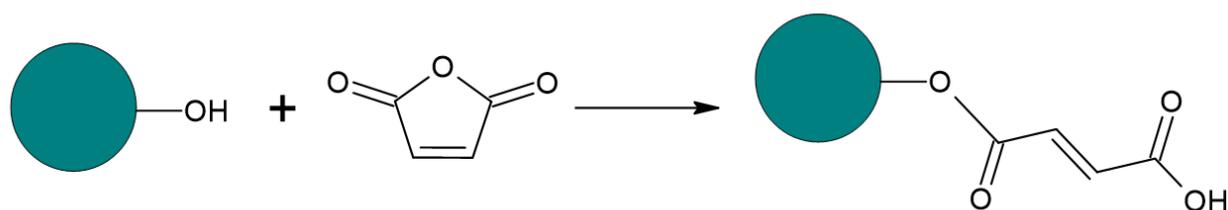


Рис 4. Схема ацилирования поверхностных гидроксильных групп УТ
малеиновым ангидридом

Наличие COOH -групп на поверхности наночастиц сильно упрощает их применение в качестве аналитических меток для иммуноанализа ввиду распространенности карбодиимидно-сукцинимидного метода конъюгации с биомолекулами [3]. В данной работе предложен способ поверхностной модификации УТ путем ацилирования поверхностных гидроксильных групп малеиновым ангидридом. Предполагается, что раскрытие цикла малеинового ангидрида в реакции ацилирования приведет к образованию терминальных карбоксильных групп на поверхности УТ, при этом условия реакции будут достаточно мягкими для того, чтобы образующиеся карбоксильные группы не вступали в реакцию (рис.4.).

ИК-спектр модифицированных УТ (рис.5) демонстрирует наличие двух пиков на 1652 см^{-1} и 1720 см^{-1} , характерных для колебания $\text{C}=\text{O}$ связи, соответствующих амидным и карбоксильным группам. Помимо этого, заметно снижение интенсивности полосы поглощения в районе 3280 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям $\text{O}-\text{H}$ связей. Данные результаты указывают на успешную модификацию поверхности частиц.

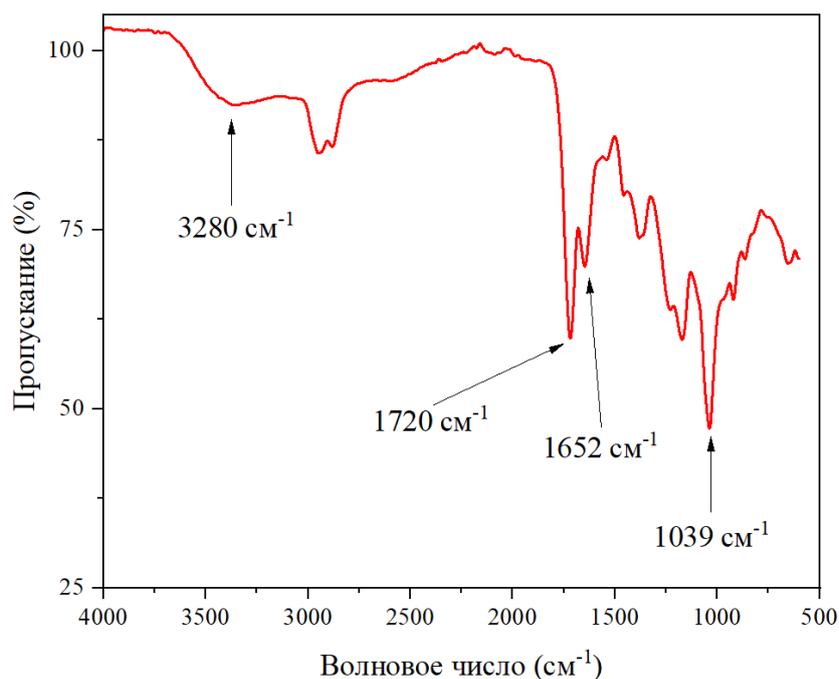


Рис 5. ИК-спектр УТ, полученных из лимонной кислоты и трис-(гидроксиметил)-аминометана, модифицированных малеиновым ангидридом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

УТ, полученные из лимонной кислоты и трис-(гидроксиметил)-аминометана характеризуются узким пиком флуоресценции и высоким квантовым выходом 65%, что выделяет их среди УТ, полученных другими способами. Применение комбинации приведенных в данной работе оптических методов анализа позволило выдвинуть предположение о структуре исследуемых УТ. Для УТ, полученных в данной работе, характерно наличие карбонизированного ядра, окруженного аморфной оболочкой, что может способствовать сохранению высокого квантового выхода данных наночастиц после конъюгации с биомолекулами. Однако, поверхность данных УТ не содержит карбоксильные группы, необходимые для наиболее распространенных методов биоконъюгации. В результате поверхностной модификации малеиновым ангидридом удалось привить на поверхность данных УТ карбоксильные группы. Конечный результат представляет собой материал, перспективный для применения в качестве недорогих, простых в

производстве и высокофлуоресцентных аналитических меток для иммунохимических методов анализа.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 1024011000011-7-1.4.2;3.5.2 Конъюгаты борсодержащих квантовых точек с биовекторами для диагностики и бор-нейтронозахватной терапии поверхностных злокачественных опухолей (FEEM-2024-0011)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ludmerczki R. et al. Carbon dots from citric acid and its intermediates formed by thermal decomposition. Chemistry – A European Journal. 2019; 25:11963-11974.
2. Kasprzyk W. et al. Luminescence phenomena of carbon dots derived from citric acid and urea—a molecular insight. Nanoscale. 2018; 10 (29): 13889-13894.
3. Song F., Chan W. C. W. Principles of conjugating quantum dots to proteins via carbodiimide chemistry. Nanotechnology. 2011; 22(49): 494006.