

АКТИВАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА, O,N-ДОПИРОВАННЫМИ УГЛЕРОДНЫМИ ТОЧКАМИ

Аманжолова Г.С., Сыздыкова З.Р.

Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова,
Караганда, Казахстан,

Исследованы структурные и спектрально-люминесцентные свойства O,N-допированных углеродных точек как сенсбилизаторов молекулярного кислорода. Углеродные точки имеют сферическую форму, их размер варьируется от 6 до 20 нм, средний диаметр составляет 9 ± 3 нм. Максимум поглощения приходится на 410 нм, быстрая флуоресценция наблюдается при 520 нм с квантовым выходом 0,13 в воде и 0,45 в этаноле. В спектрах длительной люминесценции зафиксирована замедленная флуоресценция из триплетного состояния. Повышение доли этанола усиливает фосфоресценцию синглетного кислорода и увеличивает её время жизни. С увеличением концентрации углеродных точек интенсивность фосфоресценции возрастает, что подтверждает их эффективность как сенсбилизаторов синглетного кислорода и перспективность для биомедицинских приложений.

Ключевые слова: углеродные точки, синглетный кислород, сенсбилизация, фосфоресценция, фотодинамическая терапия.

Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ — наиболее стабильное возбужденное состояние молекулярного кислорода $^3\text{O}_2$, играющее ключевую роль в биологических, химических и промышленных процессах. Он востребован в фотодинамической терапии (ФДТ) для лечения рака и доброкачественных заболеваний, а также используется в органическом синтезе, инактивации белков, фотодеградации загрязнителей [1], дезинфекции воды и стерилизации материалов [2].

Одним из методов генерации $^1\text{O}_2$ является фотосенсбилизация [3], при которой люминофоры переходят в триплетное состояние. Оптимальными сенсбилизаторами считаются углеродные точки (УТ), обладающие высокой стабильностью, растворимостью и низкой цитотоксичностью. Их триплетные состояния, зависящие от химического состава, играют ключевую роль в сенсбилизации $^1\text{O}_2$. Например, N-допированные УТ, синтезированные из антрацита и DMF, демонстрируют высокий квантовый выход (QY 47,0%) и эффективность генерации $^1\text{O}_2$ ($\phi_{\Delta}=0,19$). Другие исследования показали, что N-допированные УТ на основе 1-аминоантрахинона имеют $\phi_{\Delta}=0,35$ и проявляют фототоксичность для раковых клеток. Совместное допирование серой и азотом усиливает селективность фотосенсбилизации $^1\text{O}_2$ и увеличивает гене-

рацию ROS [4]. O,N-допированные графеновые точки демонстрируют эффективность генерации $^1\text{O}_2$, обусловленную наличием структурных дефектов и функциональных групп. Однако взаимосвязь между химической структурой УТ и их способностью генерировать $^1\text{O}_2$ и ROS остается недостаточно изученной.

В данной работе синтезированы O,N-допированные УТ и исследованы их структурные и оптические свойства для применения в качестве сенсбилизаторов $^1\text{O}_2$. Проанализирована эффективность генерации $^1\text{O}_2$ в зависимости от концентрации УТ и содержания этанола. Полученные результаты могут быть полезны при разработке фотосенсбилизаторов для ФДТ, диагностики и терапии заболеваний, а также фотокаталитических приложений.

O,N-допированные УТ синтезировали микроволновым методом из лимонной кислоты и мочевины в соотношении 1:4 в деионизированной воде. Раствор подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 минут, затем нагревали в микроволновой печи мощностью 800 Вт в течение 6 минут. Полученные частицы диспергировали в этаноле и очищали центрифугированием при 10000 об/мин.

Спектры поглощения были получены с использованием спектрофотометра Cary-300 (Agilent Technologies). Спектры быстрой флуоресценции регистрировали с использованием спектрофлуориметра Eclipse (Agilent Technologies).

Кинетика быстрой флуоресценции была зарегистрирована с использованием метода время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC, BeckerHickl). В качестве источника возбуждения использовали пикосекундный полупроводниковый лазер BDL с частотой повторения импульсов 50 МГц и длительностью импульса ~ 120 пс. Длина волны возбуждения составляла 375 нм. Измерения проводились при комнатной температуре.

Для регистрации кинетики длительной люминесценции был использован спектрометр FLS1000 (Edinburgh Instr.), оснащенный высокочувствительными фотодетекторами Hamamatsu для УФ, видимой и ИК области спектра. Фотовозбуждение образцов на $\lambda_{\text{возб}}=410$ нм осуществлялось с помощью лазерной системы на основе Nd:YAG лазера LQ529, параметрического генератора света LP604 и генератора второй гармоники LG305(SolarLS).

Квантовый выход флуоресценции был измерен относительным методом согласно методике, описанной в работах [5,6]. В качестве эталона использовался бисульфат хинина, квантовый выход флуоресценции которого при длине волны возбуждения 345 нм составляет 53,7%.

Как показано в работе [7], синтезированные УТ имеют сферическую форму, а их размер варьируется от 6 до 20 нм со средним диаметром 9 ± 3 нм. В FTIR спектрах зарегистрированы характерные полосы, указывающие на наличие функциональных групп. Полосы в области 3417 и 3216 cm^{-1} соответствуют валентным колебаниям $-\text{OH}$ и $-\text{NH}$, а пик при 1717 cm^{-1} связан с карбонильной группой $-\text{C}=\text{O}$. Присутствие полос при 1409 и 1452 cm^{-1} указывает на наличие $-\text{C}-\text{N}$ и бензольных фрагментов, что подтверждает включение азотсодержащих групп.

В электронном спектре поглощения (рис. 1а) УТ зарегистрирована полоса с максимумом около 410 нм и плечом ~ 330 нм, обусловленная $n \rightarrow \pi^*$ переходами, а также интенсивная полоса $250\text{--}270$ нм, связанная с $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в углеродном ядре [8]. Измерения показали, что добавление воды в этанольный раствор УТ не оказывает заметного влияния на форму спектров поглощения, а также на их оптическую плотность (таблица 1).

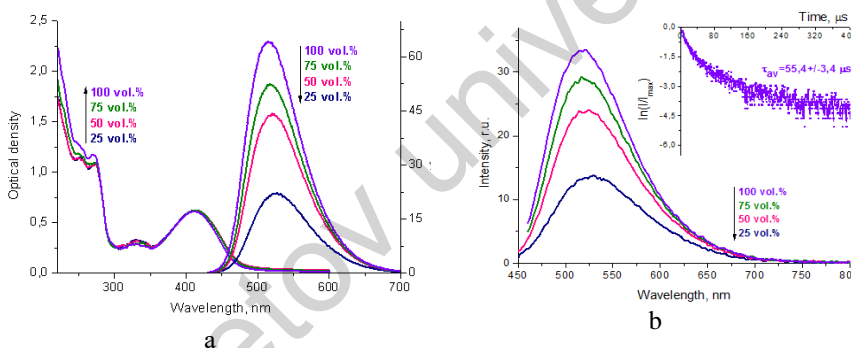


Рисунок 1 – Спектры (а) поглощения и флуоресценции; (б) длительной люминесценции О,N-содержащих УТ в растворах с различным содержанием этанола. Спектры свечения УТ зарегистрированы при $\lambda_{\text{exc}}=410$ нм при атмосферном давлении

Максимум полосы флуоресценции синтезированных УТ приходится на 520 нм (рисунок 2а). Наиболее интенсивное свечение было зарегистрировано для УТ в 100% этаноле. Квантовый выход флуоресценции (ϕ_f) исследуемых УТ в чистых воде и этаноле составили $0,13$ и $0,45$ соответственно. Тогда как для О,N-содержащих УТ, полученных из [9], в 65% этаноле $\phi_f = 0,36$. т.е. видно, что в этаноле эффективность свечения синтезированных нами УТ выше, чем в водных растворах. При этом время жизни флуоресценции полученных нами УТ составляет $\tau_{0.1} = 10,9 \pm 0,15$ нс и практически не зависит от соотношения этанол:вода.

Таблица 1 – Данные по оптическим параметрам O,N-содержащих УТ в растворах с различным содержанием этанола

| Концентрация этанола, об% | λ_{abs} , нм | D | λ_{fl} , нм | I^{Fl} , о.е. | λ_{DFI} , нм | I^{DFI} , о.е. |
|---------------------------|-----------------------------|------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 25 | 410 | 0,62 | 520 | 31,1 | 526 | 13,7 |
| 50 | 410 | 0,62 | 520 | 39,2 | 522 | 23,8 |
| 75 | 410 | 0,62 | 520 | 47,2 | 520 | 28,8 |
| 100 | 410 | 0,61 | 520 | 58,9 | 520 | 33,5 |

Спектры длительной люминесценции O,N-УТ в растворах с различным содержанием этанола (рис. 1б) показали, что максимум спектра длительной люминесценции УТ совпадает по положению со спектром их быстрой флуоресценции и ее можно отнести к ЗФ УТ. Интенсивность длительного свечения снижается с увеличением содержания воды, что объясняется уменьшением ригидизации среды и усилением безызлучательной дезактивации возбужденных состояний [10]. Для образцов УТ в чисто этанольных растворах кинетика затухания ЗФ является биэкспоненциальной со временами жизни $\tau_1=14,8\pm 0,85$ мкс и $\tau_2=78,8\pm 3,8$ мкс. Среднее время жизни длительной люминесценции составляет $55,4\pm 3,4$ мкс. При содержании этанола в растворе 25% времена жизни составляют $\tau_1=12,5\pm 1,25$ мкс и $\tau_2=61,8\pm 6,3$ мкс, а среднее время жизни долгоживущей люминесценции уменьшается до $44,1\pm 5,5$ мкс. Таким образом, увеличение содержания воды в растворе приводит к уменьшению времен жизни фосфоресценции образцов УТ.

При регистрации кинетики сенсibilизованной посредством УТ фосфоресценции синглетного кислорода при $\lambda_{\text{ref}}=1270$ нм были получены кривые, представленные на рисунке 2. Измерения показали, что уменьшение доли воды в растворе УТ приводит к росту интенсивности кинетики свечения $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, что свидетельствует о повышении эффективности его сенсibilизации. При этом длительность фосфоресценции синглетного кислорода в воде составляет $4,8\pm 0,5$ мкс, а в этанольном растворе это значение увеличивается до $11,9\pm 0,2$ мкс. Наблюдаемые различия в длительности свечения $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ связаны как с различной растворимостью молекулярного кислорода, так и с различным временем жизни τ_Δ синглетного кислорода в воде и этаноле. Этанол, благодаря меньшему числу –ОН групп в своей структуре и большей растворимости кислорода [11], создает благоприятные условия для более высокой концентрации молекул O_2 , способных вступать в реакцию с сенсibilизаторами-УТ. Поэтому для дальнейших исследований были выбраны растворы УТ, содержащие 100 об% этанола.

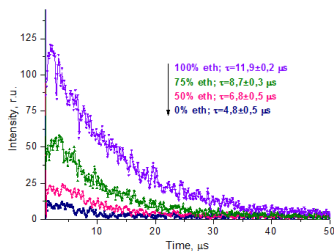


Рисунок 2 – Кинетики затухания фосфоресценции $O_2(^1\Delta_g)$ ($\lambda_{\text{рег}}=1270$ нм), сенсibilизованной O,N-допированными УТ, в растворах с различным содержанием этанола. Спектры свечения УТ зарегистрированы при $\lambda_{\text{exc}}=410$ нм при атмосферном давлении

Для определения влияния концентрации сенсibilизатора на эффективность фосфоресценции $O_2(^1\Delta_g)$ были подготовлены растворы УТ различной оптической плотности: 0,17; 0,31; 1,18 и 2,41. Далее они будут обозначены как CD1, CD2, CD3, CD4, соответственно.

Измерения (рис. 3а) показали, что форма спектров поглощения УТ в этаноле не зависит от их концентрации, а оптическая плотность при 410 нм растет пропорционально содержанию УТ. Спектры флуоресценции также сохраняют форму при изменении концентрации, но интенсивность свечения достигает максимума в растворе CD3, снижаясь при дальнейшем увеличении концентрации из-за концентрационного тушения [12]. Аналогичная зависимость наблюдается для интенсивности 3Ф (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние концентрации O,N-допированных УТ на интенсивность их флуоресценции и фосфоресценции $O_2(^1\Delta_g)$ в растворах при атмосферном давлении

| Растворы | D | I_{fl} , о. е. | $I_{\text{ph}}(O_2(^1\Delta_g))$, о. е. | τ_{ph} , мкс |
|----------|------|-------------------------|--|--------------------------|
| CD1 | 0,17 | 33,3 | 405 | 13,4±0,21 |
| CD2 | 0,31 | 37,4 | 576 | 12,8±0,14 |
| CD3 | 1,18 | 66,1 | 1129 | 10,9±0,08 |
| CD4 | 2,41 | 48,8 | 1002 | 8,85±0,07 |

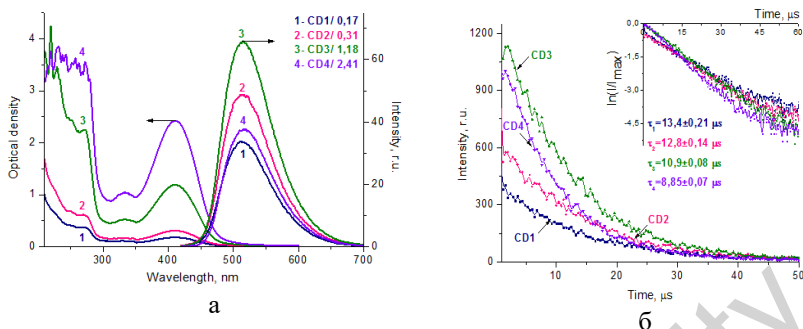


Рисунок 3 – Спектры поглощения, флуоресценции (а) и кистици затухания сенсбилизированной фосфоресценции $^1\text{O}_2$ (б) в этанольных растворах О,N-допированных УТ различной концентрации этанольных растворов с О,N-допированными УТ различной концентрации

Измерения кинетики сенсбилизированной фосфоресценции синглетного кислорода показали, что ее интенсивность (рисунок 3б) линейно увеличивается до концентрации CD3, а затем незначительно тушится. При этом длительность фосфоресценции $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ сокращается с $13,4 \pm 0,21$ мкс (для CD1) до $8,85 \pm 0,07$ мкс (таблица 2). Как видно из полученных результатов, характер изменения фосфоресценции $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ повторяет таковые для ЗФ О,N-допированных УТ.

Синтезированы О,N-допированные УТ на основе лимонной кислоты и мочевины с соотношением по массе 1:4. Полученные УТ имеют сферическую форму, а их размер варьируется от 6 до 20 нм со средним диаметром 9 ± 3 нм. Максимум спектра поглощения приходится на 410 нм, а максимум быстрой флуоресценции на 520 нм с квантовым выходом свечения ϕ_f равным 0,13 и 0,45, соответственно, для УТ в чистой воде и этаноле. В спектрах длительной люминесценции О,N-допированных УТ в растворе зарегистрирована полоса свечения с максимумом около 520 нм, относящаяся к ЗФ из триплетного состояния T_1 .

Изучена эффективность генерации $\text{O}(^1\Delta_g)$ посредством сенсбилизации от УТ в зависимости от их концентрации и содержания этанола в растворе. Показано, что увеличение доли этанола в растворе способствует росту интенсивности и увеличению времени жизни фосфоресценции $\text{O}(^1\Delta_g)$. Установлено, что с увеличением концентрации УТ в растворе интенсивность фосфоресценции синглетного кислорода возрастает до оптической плотности УТ, равной 1,18. Дальнейший рост концентрации УТ приводит к насыщению сигналов, зарегистрированных как для ЗФ УТ, так и для фосфоресценции $\text{O}(^1\Delta_g)$. Полученные данные показывают, что О,N-допированные углеродные точки могут

быть высокоэффективными сенсбилизаторами синглетного кислорода и иметь потенциал для применения в области ФДТ и других биомедицинских приложений, таких как диагностика и терапия.

Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP23490195).

1. Aerssens D., Cadoni E., Tack L., Madder A. (2022) A photosensitized singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) toolbox for bio-organic applications: Tailoring $^1\text{O}_2$ generation for DNA and protein labelling, targeting and biosensing. *Molecules*, **27**(3), 778. <https://doi.org/10.3390/molecules27030778>
2. Wang Y., Lin Y., He S., Wu S., Yang C. (2024) Singlet oxygen: Properties, generation, detection, and environmental applications. *J. Hazard. Mater.*, **461**, 132538. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132538>
3. Minaev B.F. (2007) Electronic mechanisms of molecular oxygen activation. *Russ. Chem. Rev.*, **76**(11), 988-1010. <https://doi.org/10.1070/RC2007v076n11ABEH003720>
4. Pillar-Little T.J., Wanninayake N., Nease L., Heidary D.K., Glazer E.C., Kim D.Y. (2018) Superior photodynamic effect of carbon quantum dots through both type I and type II pathways: Detailed comparison study of top-down-synthesized and bottom-up-synthesized carbon quantum dots. *Carbon*. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.09.004>
5. Ibrayev N.Kh., Aimukhanov A.K. (2019) Influence of plasmon resonance in silver nanoparticles on the properties of stimulated emission of 1,3,5,7,8-pentamethyl-2,6-diethylpyrromethene-difluoroborate molecules in film of porous aluminum oxide. *Opt. Laser Technol.*, **115**, 246-250. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2019.02.040>
6. Dong J., Gao W., Han Q., et al. (2019) Plasmon-enhanced upconversion photoluminescence: mechanism and application. *Phys. Rev. J.*, **4**, 100026. <https://doi.org/10.1016/j.revip.2018.100026>
7. Amanzholova G., Seliverstova E., Ibrayev N., Terukov E. (2023) Structural and optical properties of carbon nanodots based on citric acid doped with nitrogen atoms. *Bull. Karaganda Univ. Phys. Ser.*, **3**(111), 91-97. <https://doi.org/10.31489/2023PH3/91-97>
8. Ibrayev N., Dzhanabekova R., Amanzholova G., et al. (2021) Optical properties of N- and S-doped carbon dots based on citric acid and L-cysteine. *Fullerenes, Nanotubes Carbon Nanostruct.*, **30**(1), 1-5. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2021.1999933>

9. Qu S., Liu X., Guo X., et al. (2013) Amplified spontaneous green emission and lasing emission from carbon nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.*, **24**(18), 2689-2695. <https://doi.org/10.1002/adfm.201303352>

10. Li Q., Zhou M., Yang M., et al. (2018) Induction of long-lived room temperature phosphorescence of carbon dots by water in hydrogen-bonded matrices. *Nat. Commun.*, **9**, 734. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03144-9>

11. Ogilby P.R. (2010) Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.*, **39**(8), 3181-3209. <https://doi.org/10.1039/b926014p>

12. Лакович Дж. (1986) Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. М.: Мир, 496 с.