

## Исследование спектральных свойств хиральных углеродных наночастиц на основе глутатиона

© Е.А. Степаниденко<sup>1</sup>, М.Д. Мирущенко<sup>1</sup>, А.В. Королева<sup>2</sup>, Е.В. Жижин<sup>2</sup>, А.М. Митрошин<sup>1,3</sup>,  
П.С. Парфенов<sup>1</sup>, С.А. Черевков<sup>1,\*</sup>, Е.В. Ушакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Международный научно-образовательный центр физики наноструктур, Университет ИТМО,  
197101 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Научный парк, Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН,  
199004 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: s.cherevko@itmo.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023 г.

В окончательной редакции 06.12.2023 г.

Принята к публикации 11.12.2023 г.

Получены углеродные наночастицы (С-точки) из хиральных молекул L-глутатиона в формамиде. С-точки обладают фотолюминесценцией (ФЛ) в красной области спектра на 690 nm и высоким для данной полосы квантовым выходом, достигающим 10.8%. Кроме того, в спектрах кругового дихроизма С-точек наблюдается сигнал в области 370–470 nm, где находится оптический переход, связанный с легированными атомами азота и кислорода  $sp^2$ -гибридизованными углеродными доменами.

**Ключевые слова:** углеродные наночастицы, длинноволновая фотолюминесценция, круговой дихроизм, хиральность, глутатион.

DOI: 10.61011/OS.2023.12.57409.5833-23

### Введение

В последнее десятилетие люминесцентные углеродные наночастицы (С-точки) привлекают все большее внимание благодаря своим уникальным свойствам, таким как низкая токсичность, высокие значения квантового выхода (КВ) фотолюминесценции (ФЛ), возможность настройки положения оптических переходов во всем видимом диапазоне спектра [1]. Простота и низкая стоимость синтеза, а также возможность получения стабильных коллоидных растворов в различных средах делают С-точки привлекательными для применения в качестве активных материалов устройств оптоэлектроники [2,3], фотовольтаики [4], сенсорики [5], для каталитических систем [6], а также для биомедицинских приложений [7,8]. Для последней области применений, в частности биовизуализации, особый интерес вызывают наночастицы с оптическими переходами в областях прозрачности тканей — в красной и ближней инфракрасной (БИК) спектральных областях [9]. Для того, чтобы получить С-точки с переходами в интересующих спектральных диапазонах, были разработаны методы синтеза с использованием органических красителей [10], смесей лимонной кислоты и мочевины в диметилформамиде [11,12], лимонной кислоты в формамиде [13,14] и др. Другим важным параметром наночастиц при взаимодействии с биологическими объектами является наличие хиральности [15,16]. Получение хиральных С-точек можно

разделить на два подхода: одностадийный, при котором используются хиральные молекулы в качестве прекурсоров в сольвотермальном или микроволновом нагреве [17]; двухстадийный, при котором хиральные молекулы ковалентно присоединяются к поверхности С-точек в результате их химической обработки в растворе [18].

Принимая выше сказанное во внимание, для биологических применений наиболее привлекательными объектами будут С-точки, обладающие как оптическими переходами в красной/БИК области спектра, так и хиральной поверхностью для управляемого взаимодействия с биологическими объектами. Для получения таких наночастиц одним из самых подходящих прекурсоров является глутатион — органическая молекула с хиральными группами. Было показано, что нагрев глутатиона в растворе формамида в автоклаве приводит к формированию С-точек с положением полосы фотолюминесценции в области 650–710 nm [19,20]. Однако хиральные свойства таких С-точек до сих пор не были изучены. Целью настоящей работы стало исследование спектральных характеристики С-точек, полученных сольвотермально из глутатиона в формамиде. Такие наночастицы размером 4 nm обладают яркой фотолюминесценцией с максимумом полосы на 690 nm и сигналом кругового дихроизма в области 370–470 nm, где находится оптический переход ядра С-точек.

## Материалы и методы исследований

### Материалы

В работе были использованы формамид ( $\geq 99.0\%$ ), L-глутатион ( $\geq 98.5\%$ ), полиэтиленгликоль (молекулярный вес 2000, PEG-2000). Все химические реагенты были использованы без дополнительной очистки. В ходе экспериментов была использована деионизированная (DI) вода (вода Milli-Q).

### Синтез углеродных наночастиц

C-точки были синтезированы одностадийным сольво-термальным методом из L-глутатиона (94 mg) в формамиде (10 mL) в закрытом автоклаве из нержавеющей стали и при температуре  $160^\circ\text{C}$  в течение 6 h. После реакции смесь была охлаждена до комнатной температуры естественным путем и диализована в DI воде с помощью диализных мешков с порогом отсечения по молекулярной массе (Molecular weight cut-off, MWCO), равным 3.5 kDa в течение 4 дней. Полученный образец был отфильтрован с помощью шприцевого фильтра с размерами пор  $0.22\ \mu\text{m}$ , лиофилизирован, в результате чего был получен зеленый порошок C-точек CD-Glu-Ref.

Для получения C-точек с более стабильными свойствами обычно в процессе синтеза добавляют полимер в реакционную смесь. Для того, чтобы проверить данное утверждение, в данной работе к исходным прекурсорам было добавлено еще 13 mg PEG-2000. Далее синтез был проведен аналогично предыдущему образцу, полученные C-точки обозначены в работе как CD-Glu-PEG.

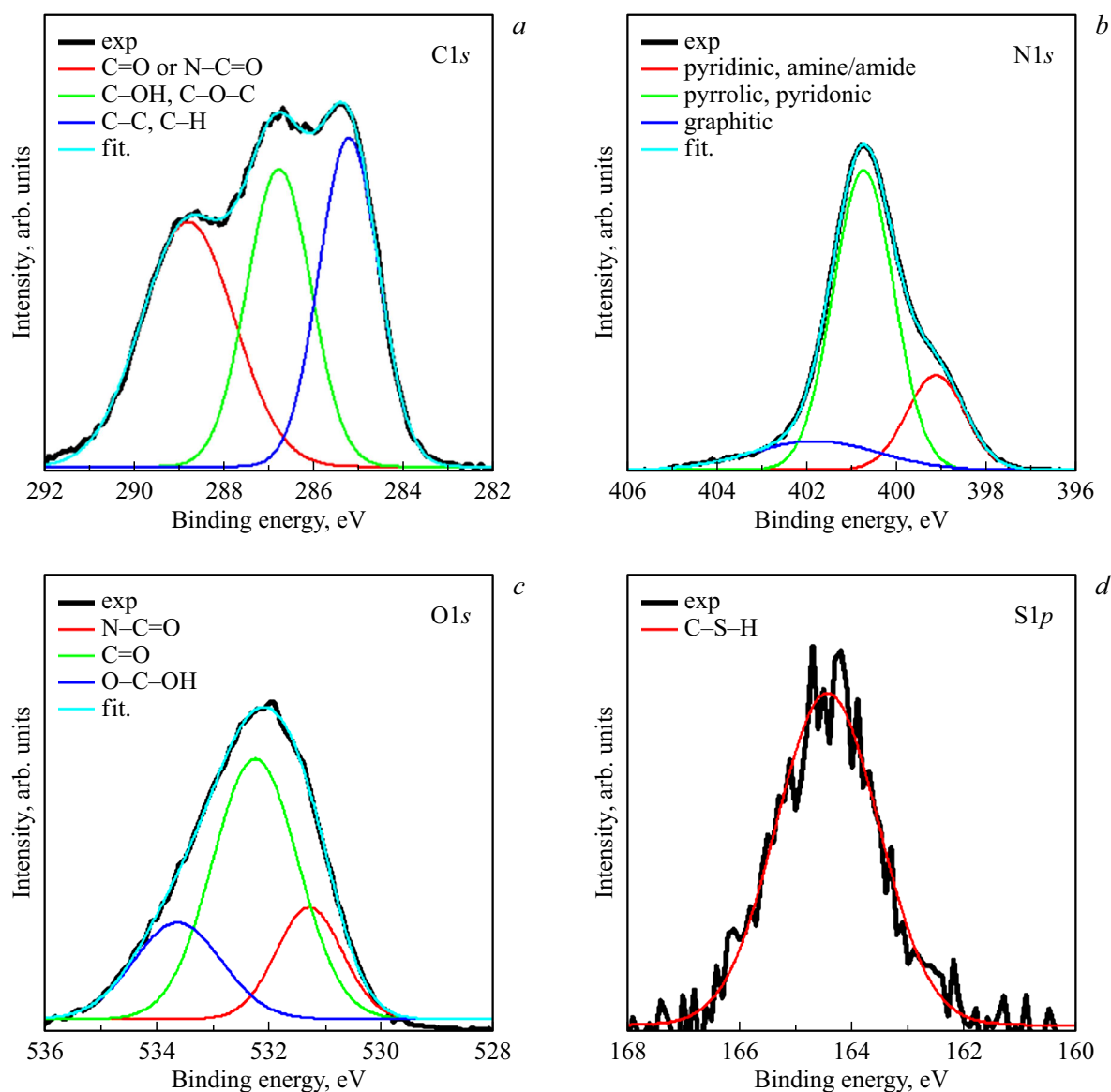
### Методы исследования

Анализ размеров образцов был проведен методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Москва, Россия) в полуконтактном режиме. Инфракрасные (ИК) спектры были получены на спектрофотометре Tensor II (Bruker, Billerica, США). Для элементного анализа полученных наночастиц был применен метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФС), спектры были измерены с помощью фотоэлектронного спектрометра ESCALAB 250Xi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США) (излучение  $\text{AlK}\alpha$ , энергия фотонов  $1486.6\ \text{eV}$ ). Спектры поглощения растворов были получены на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Kyoto, Япония); карты распределения интенсивности фотолюминесценции (ФЛ) в зависимости от длины волны возбуждения образца (PL-PLE карты) были зарегистрированы на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, США). Спектры поглощения кругового дихроизма (КД) были зарегистрированы на спектрофотометре J-1500 (Jasco, Tokyo, Япония).

## Результаты и обсуждение

Для исследования химической структуры C-точек на основе глутатиона и формамида были зарегистрированы РФС спектры. Из обзорного спектра РФС было установлено, что CD-Glu-Ref состоит из основных элементов: углерода (C1s, 55.28%), кислорода (O1s, 24.97%), азота (N1s, 19.61%) с небольшим содержанием серы (S2p, 0.14%). Спектры высокого разрешения для полос C1s, N1s, O1s, S2p и их разложение на пики, соответствующие различным связям, представлены на рис. 1. На основе анализа полосы C1s было установлено присутствие связей C–C/C–H ( $285.2\ \text{eV}$ ), C–OH/C–O–C ( $286.7\ \text{eV}$ ) и C–N/R–C=O ( $288.8\ \text{eV}$ ) (рис. 1, a). C-точки содержат большое количество азота (19.61%), который в основном находится в формах пиррола/пиридона ( $400.7\ \text{eV}$ ), пиридина и в составе амидов и аминов ( $399.1\ \text{eV}$ ), также в образце присутствует небольшое количество графитоподобного нитрида углерода ( $401.8\ \text{eV}$ ) (рис. 1, b). Из РФС спектра для полосы O1s видно, что преобладают C=O связи в составе амидов и карбоксильных групп (пики на  $531.3$ ,  $532.2$  и  $533.6\ \text{eV}$  рис. 1, c). В образце также было зарегистрировано небольшое содержание серы в форме тиола ( $164.4\ \text{eV}$ , рис. 1, d).

На рис. 2, a–d представлены типичные АСМ изображения и соответствующие диаграммы распределения частиц по высотам. Средняя высота частиц CD-Glu-Ref была оценена как  $4.1\text{--}1.5\ \text{nm}$  (рис. 2, a, b). При добавлении полиэтиленгликоля в реакционную смесь формируются наночастицы большего размера, так, для образца CD-Glu-PEG наблюдается широкое распределение со средним значением  $6 \pm 3\ \text{nm}$ , в образце присутствовали агрегаты до  $15\ \text{nm}$  (рис. 2, c, d). Анализ ИК спектров показал, что добавление полимера в синтез практически не влияет на формирование связей в C-точках: все характерные полосы в ИК спектрах повторяются для обоих образцов (рис. 2, e). Было обнаружено небольшое количество S–H-связей, о чем свидетельствует пик на  $2535\ \text{cm}^{-1}$ . Широкая полоса поглощения на  $3000\text{--}3400\ \text{cm}^{-1}$  относится к колебаниям H-связей, пики на  $3200\ \text{cm}^{-1}$  относятся к валентным колебаниям N–H. Пики на  $2848$  и  $2930\ \text{cm}^{-1}$  относятся к связям C–H алифатических групп, и они являются более интенсивными в образце CD-Glu-PEG, что говорит о присутствии полимерной алифатической цепочки. Пики на  $1346$  и  $3040\ \text{cm}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям C–N и C–H связей в ароматическом кольце. Пики на  $1295$ ,  $1230$  и  $1085\ \text{cm}^{-1}$  могут свидетельствовать о наличии групп (NH)–C=O и колебаниях C–O внутри C-точек соответственно. Узкие интенсивные пики на  $1667$ ,  $1590$  и  $1530\ \text{cm}^{-1}$  относятся к валентным колебаниям C=O и деформационным N–H в амидах. Кроме того, в данной области  $1660\text{--}1550\ \text{cm}^{-1}$  могут присутствовать колебания C=C ароматических колец. Поглощение около  $1150$  и  $1134\ \text{cm}^{-1}$  можно объяснить колебаниями C–O–C, а пик на  $1150\ \text{cm}^{-1}$  может быть связан с деформационными колебаниями N–H в (NH<sub>2</sub>)–C=O. Следовательно, в



**Рис. 1.** Спектры РФС высокого разрешения образца CD-Glu-Ref: (a) C1s, (b) N1s, (c) O1s, (d) S2p. Экспериментальные данные (exp., черные линии), аппроксимация (fit, цветные линии), с указанием в легенде полос, характерных для различных химических групп.

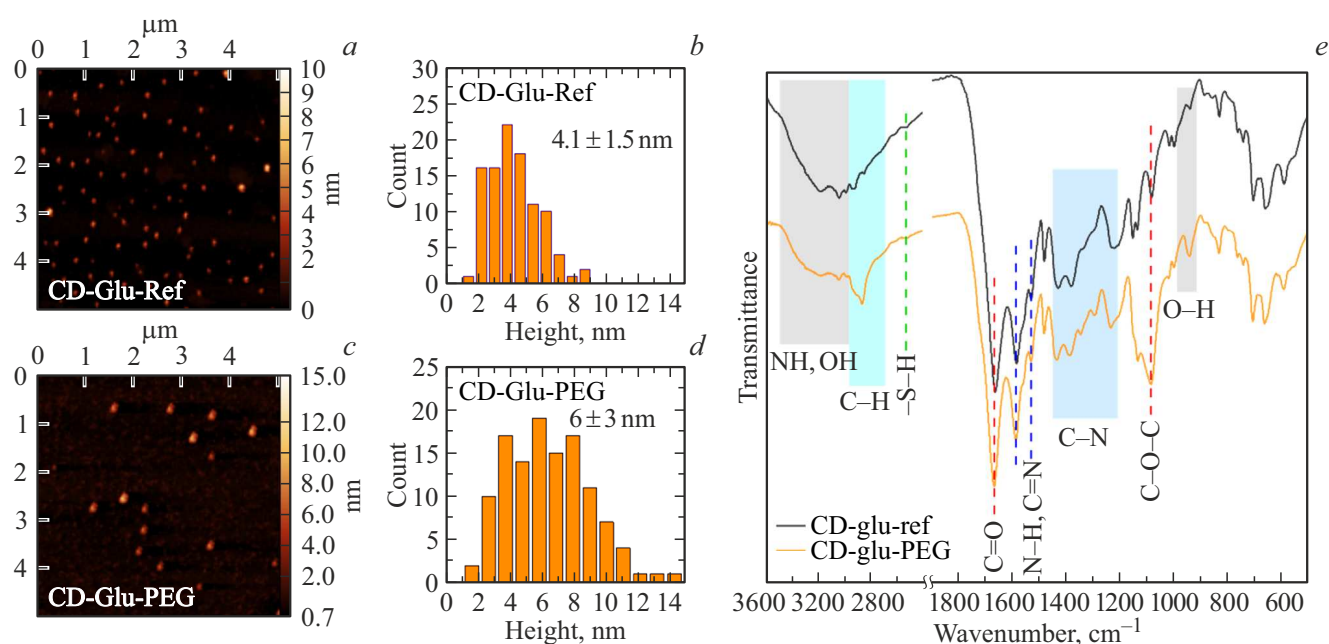
образцах присутствуют ароматические домены, легированные азотом и кислородом, а на поверхности С-точек присутствует множество аминогрупп, что соотносится с результатами РФС. В образце CD-Glu-PEG наблюдается значительное количество алифатических углеродных групп из-за присутствия полимера, что также соотносится с результатами АСМ и объясняет больший размер CD-Glu-PEG по сравнению с CD-Glu-Ref.

Анализ спектральных характеристик образцов показал, что добавление полимера не приводит к формированию новых оптических центров, как видно из рис. 3. В спектре поглощения обоих образцов наблюдается слабоинтенсивный пик на 260 nm, который можно связать с присутствием бензола и его производных (рис. 3, a). Наиболее интенсивный пик поглощения наблюдается на

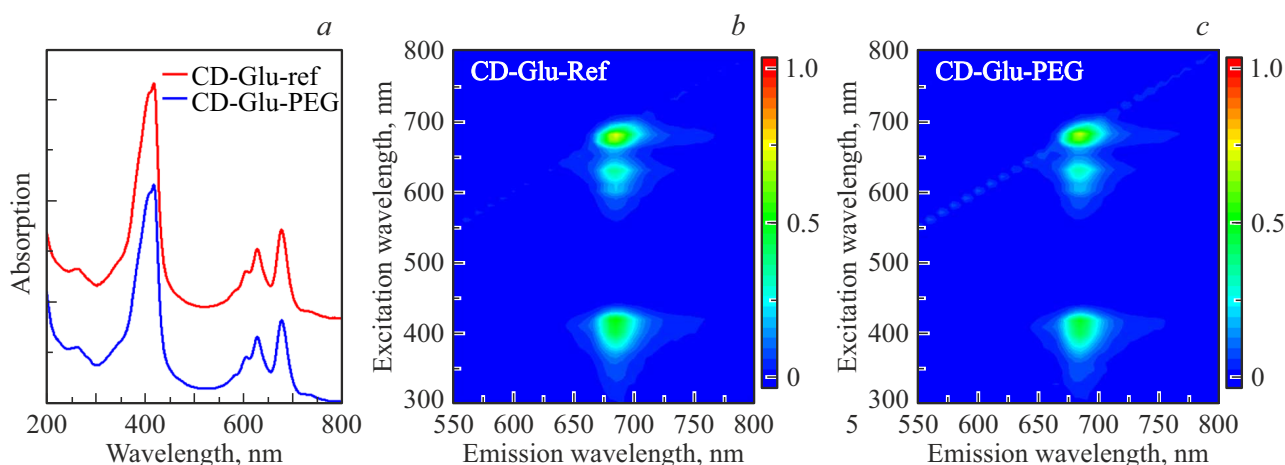
Квантовый выход ФЛ образцов водных растворов С-точек

Образец	Квантовый выход, %	
	$\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$
CD-Glu-Ref	9.5	10.8
CD-Glu-PEG	8.4	10.2

405–417 nm, а в длинноволновой полосе ярко выражена колебательная структура с пиками на 578, 603, 627, 675 и 734 nm. Оптические переходы в области 400–415 nm и в области 600–690 nm отвечают за длинноволновую полосу ФЛ с максимумом на 690 nm (рис. 3, b, c). КВ ФЛ составил 8–11%, его значение зависит от длины волны



**Рис. 2.** АСМ изображения (*a, c*) и соответствующие распределения высот (*b, d*) образцов CD-Glu-Ref (*a, b*) и CD-Glu-PEG (*c, d*). ИК спектры образцов с отмеченными областями, типичными для колебания различных связей (*e*).



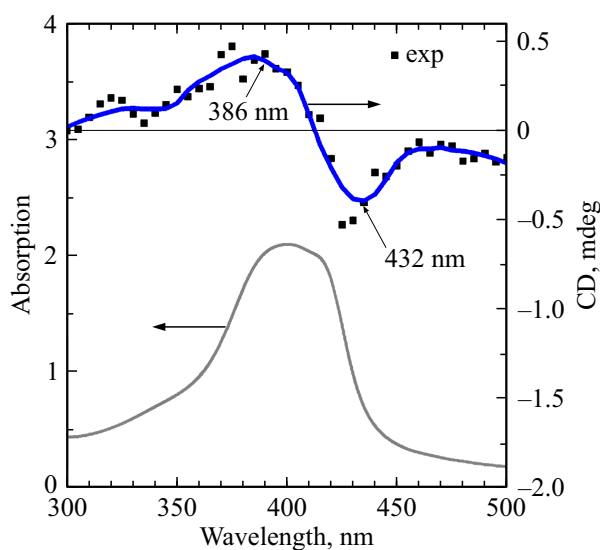
**Рис. 3.** (*a*) Спектры поглощения и (*b, c*) PL-PLE карты водных растворов CD-Glu-Ref (*b*) и CD-Glu-PEG (*c*).

возбуждения  $\lambda_{ex}$  и образца (таблица). Как предполагалось, использование полимера в ходе синтеза позволит усилить КВ ФЛ, однако, как видно из таблицы, интенсивность ФЛ образца без модификации немного выше, что говорит о том, что в данном случае PEG-2000 не взаимодействует с центрами ФЛ С-точек.

Анализ литературы показал, что полоса ФЛ С-точек на основе глутатиона практически всегда имеет максимум на 690 nm и не зависит от длины волны возбуждения, что типично для органических люминофоров. В работе [21] Y. Ganjhanlou и др. показали, что такая полоса ФЛ имеет схожую природу с излучением Q-полосы макромолекул — производных порфирина. Авторами работы было показано, что макромолеку-

лы формируют аморфные агрегаты при высыхании на подложках. В наших экспериментах не наблюдалось никаких крупных агрегатов, напротив, распределение высот наночастиц в обоих образцах не превышало 10 nm. В результате проведения тонкослойной хроматографии мы не обнаружили разделения образца на несколько фракций наночастиц, т.е. в результате проведенного синтеза формируется один тип С-точек. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемая длинноволновая ФЛ обусловлена оптическими центрами, схожими с производными порфирина, внедренных в аморфную углеродную матрицу С-точек.

Так как L-глутатион является хиральной молекулой, мы предполагали, что в результате синтеза будут фор-



**Рис. 4.** Спектр поглощения (серая линия), усредненный сигнал кругового дихроизма (черные квадраты и синяя линия) для образца CD-Glu-Ref в воде.

мироваться либо полностью хиральные наночастицы, либо С-точки с хиральными группами на поверхности. Измерение сигнала кругового дихроизма показало, что в области 300–500 nm есть низкоинтенсивный сигнал, спектр которого представлен на рис. 4. В спектральных областях 200–300 и 500–800 nm отношение сигнал-шум было слишком низким, что свидетельствует об отсутствии сигнала кругового дихроизма в данных диапазонах спектра. Из рис. 4 видно, что в области 350–450 nm, которая соответствует поглощению N, O — легированных  $sp^2$ -доменов С-точек, наблюдается отрицательный эффект Коттона с максимумом на 386 nm и минимумом на 432 nm и величиной кругового дихроизма +0.5 и –0.5 mdeg соответственно. Фактор дисимметрии  $g$  составил +0.8 и  $-1.2 \cdot 10^{-5}$  для положительного и отрицательного пиков соответственно. Такое значение на 1–2 порядка меньше опубликованных ранее значений для С-точек, полученных одностадийным методом ( $1.6 \cdot 10^{-3}$  [17] и  $1.5 \cdot 10^{-3}$  [22]). Мы предполагаем, что наличие данного сигнала связано с декомпозицией молекулы глутатиона в процессе сольвотермального синтеза в присутствии формамида и формировании N, O-легированных  $sp^2$ -доменов с малым количеством хиральных центров из-за возможной рацемизации при высоких температурах синтеза. В большинстве опубликованных работ по синтезу хиральных С-точек сигналы кругового дихроизма наблюдаются в области до 350 nm и больше связаны с исходными хиральными молекулами-прекурсорами или их агрегатами, ковалентно связанными с поверхностью С-точек [23–26]. Регистрация сигналов кругового дихроизма, обусловленных именно внутренней структурой С-точек, в области более 350 nm является редким наблюдением и требует дальнейших исследований. Также следует отметить, что синтезиро-

ванные в данной работе хиральные С-точки обладают самой длинноволновой полосой ФЛ по сравнению с ранее опубликованными данными, где полоса ФЛ наблюдалась на 601 [24], 620 [25] и 630 nm [26] с квантовым выходом 10.8, 6.8 и 16.2% соответственно.

## Заключение

В работе были исследованы хиральные С-точки на основе глутатиона и формамида, излучающие в красной области спектра с относительно высоким КВ. Использование полимера в синтезе не повлияло на формирование оптических центров С-точек, но способствовало увеличению размера и количества алифатических цепочек на поверхности. С-точки обладают собственной хиральностью, которая обусловлена формированием хиральных центров внутри N, O-легированных ароматических доменов при взаимодействии глутатиона с формамидом. Природа люминесценции связана с формированием оптических центров, схожих с макромолекулами — производными порфиринов, которые внедрены в матрицу С-точки. Таким образом, синтезированные в данной работе наночастицы являются перспективными для дальнейших исследований и применении их в биологии и медицине в качестве люминесцентного маркера.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность ЦКП „Нанотехнологии“ Университета ИТМО. РФС исследования проводились на оборудовании Ресурсного центра „Физические методы исследования поверхности“ Научного парка СПбГУ.

## Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00294).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] B. Wang, G.I.N. Waterhouse, S. Lu. Trends Chem., **5** (1), 76 (2023). DOI: 10.1016/j.trechm.2022.10.005
- [2] Е.А. Степаниденко, Е.В. Ушакова, А.В. Федоров, А.Л. Рогач. Nanomaterials, **11** (2), 364 (2021). DOI: 10.3390/nano11020364
- [3] R. Fu, H. Song, X. Liu, Y. Zhang, G. Xiao, B. Zou, G.I.N. Waterhouse, S. Lu. Chinese J. Chem., **41** (9), 1007 (2023). DOI: 10.1002/CJOC.202200736
- [4] N. Gao, L. Huang, T. Li, J. Song, H. Hu, Y. Liu, S. Ramakrishna. J. Appl. Polym. Sci., (2020). DOI: 10.1002/app.48443

- [5] A.A. Vedernikova, M.D. Miruschenko, I.A. Arefina, A.A. Babaev, E.A. Stepanidenko, S.A. Cherevko, I.G. Spiridonov, D.V. Danilov, A.V. Koroleva, E.V. Zhizhin, E.V. Ushakova. *Nanomaterials*, **12** (19), 3314 (2022). DOI: 10.3390/NANO12193314/S1
- [6] M. Sbacchi, M. Mamone, L. Morbiato, P. Gobbo, G. Filippini, M. Prato. *ChemCatChem*, **15** (16), e202300667 (2023). DOI: 10.1002/CCTC.202300667
- [7] E. Liu, T. Liang, E.V. Ushakova, B. Wang, B. Zhang, H. Zhou, G. Xing, C. Wang, Z. Tang, S. Qu, A.L. Rogach. *J. Phys. Chem. Lett.*, **12** (1), 604 (2020). DOI: 10.1021/ACS.JPCLETT.0C03383
- [8] J. Wang, Y. Fu, Z. Gu, H. Pan, P. Zhou, Q. Gan, Y. Yuan, C. Liu. *Small*, (2023). DOI: 10.1002/sml.202303773
- [9] D. Li, E. V. Ushakova, A.L. Rogach, S. Qu. *Small*, **17** (43), 2102325 (2021). DOI: 10.1002/sml.202102325
- [10] E.A. Stepanidenko, I.D. Skurlov, P.D. Khavlyuk, D.A. Onishchuk, A.V. Koroleva, E.V. Zhizhin, I.A. Arefina, D.A. Kuryukov, D.A. Eurov, V.G. Golubev, A.V. Baranov, A.V. Fedorov, E.V. Ushakova, A.L. Rogach. *Nanomaterials*, **12** (3), (2022). DOI: 10.3390/nano12030543
- [11] D. Chen, M. Xu, W. Wu, S. Li. *J. Alloys Compd.*, **701**, 75 (2017). DOI: 10.1016/j.jallcom.2017.01.124
- [12] J. Zhu, X. Bai, J. Bai, G. Pan, Y. Zhu, Y. Zhai, H. Shao, X. Chen, B. Dong, H. Zhang, H. Song. *Nanotechnology*, **29** (8), 085705 (2018). DOI: 10.1088/1361-6528/aaa321
- [13] S. Sun, L. Zhang, K. Jiang, A. Wu, H. Lin. *Chem. Mater.*, **28** (23), 8659 (2016). DOI: 10.1021/acs.chemmater.6b03695
- [14] S. Zhou, Y. Sui, X. Zhu, X. Sun, S. Zhuo, H.Li. *Chem. — An Asian J.*, **16** (4), 348 (2021). DOI: 10.1002/asia.202001352
- [15] A. Dö ring, E. Ushakova, A.L. Rogach. *Light Sci. Appl.*, **11**, 75 (2022). DOI: 10.1038/s41377-022-00764-1
- [16] B. Bartolomei, A. Bogo, F. Amato, G. Ragazzon, M. Prato. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **61** (20), e202200038 (2022). DOI: 10.1002/ANIE.202200038
- [17] A. Das, E. V. Kundelev, A.A. Vedernikova, S.A. Cherevko, D. V. Danilov, A. V. Koroleva, E. V. Zhizhin, A.N. Tsympkin, A.P. Litvin, A. V. Baranov, A. V. Fedorov, E. V. Ushakova, A.L. Rogach. *Light Sci. Appl.*, **11**, 92 (2022). DOI: 10.1038/s41377-022-00778-9
- [18] A. Das, I.A. Arefina, D.V. Danilov, A.V. Koroleva, E. V. Zhizhin, P.S. Parfenov, V.A. Kuznetsova, A.O. Ismagilov, A.P. Litvin, A.V. Fedorov, E.V. Ushakova, A.L. Rogach. *Nanoscale*, **13** (17), (2021). DOI: 10.1039/d1nr01693h
- [19] J.R. Macairan, I. Zhang, A. Clermont-Paquette, R. Naccache, D. Maysinger. *Part. Part. Syst. Charact.*, **37** (1), (2020). DOI: 10.1002/ppsc.201900430
- [20] P. Gao, H. Hui, C. Guo, Y. Liu, Y. Su, X. Huang, K. Guo, W. Shang, J. Jiang, J. Tian. *Carbon NY.*, **201**, (2023). DOI: 10.1016/j.carbon.2022.09.052
- [21] Y. Ganjkanlou, J.J.E. Maris, J. Koeck, R. Riemersma, B.M. Weckhuysen, F. Meirer. *J. Phys. Chem. C*, **126** (5), (2022). DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c10478
- [22] A.Visheratina, L. Hesami, A. K. Wilson, N. Baalbaki, N. Noginova, M. A. Noginov, N.A. Kotov. *Chirality*, **34** (12), (2022). DOI: 10.1002/chir.23509
- [23] F. Li, Y. Li, X. Yang, X. Han, Y. Jiao, T. Wei, D. Yang, H. Xu, G. Nie. *Angewandte Chemie*, **130** (9), (2018). DOI: 10.1002/ange.201712453
- [24] Y.Y. Wei, L. Chen, X. Zhang, J.L. Du, Q. Li, J. Luo, X.G. Liu, Y.Z. Yang, S.P. Yu, Y.D. Gao. *Biomater. Sci.*, **10** (15), (2022). DOI: 10.1039/d2bm00429a
- [25] S. Wei, B. Wang, H. Zhang, C. Wang, S. Cui, X. Yin, C. Jiang, G. Sun. *Chem. Engineering J.*, **466**, (2023). DOI: 10.1016/j.ccej.2023.143103
- [26] Z. Hallaji, Z. Bagheri, B. Ranjbar. *ACS Appl Nano Mater.*, **6** (5), (2023). DOI: 10.1021/acsanm.2c04466