

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА
ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙНИЯ
ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ФУЛЛЕРЕНОВ C₆₀ И ИХ КОВАЛЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ
С КРАСИТЕЛЯМИ**

© 2015 г. Д. А. Полетаева, Е. А. Хакина, В. И. Кукушкин, А. Ю. Рыбкин, Н. С. Горячев,
А. Ю. Белик, А. В. Жиленков, П. А. Трошин, Р. А. Котельникова, А. И. Котельников

Представлено академиком РАН С.М. Алдошиным 28.07.2014 г.

Поступило 14.08.2014 г.

DOI: 10.7868/S0869565215010144

Известно, что водорастворимые производные фуллеренов C₆₀ имеют широкий спектр биологической активности и перспективны с точки зрения создания на их основе эффективных лекарственных средств [1]. В связи с этим актуальной задачей является разработка методов детектирования таких наноструктур в биологических объектах. В современных исследованиях для детектирования различных органических соединений широко применяют УФ-видимую спектроскопию и высокочувствительный метод флуоресценции. Однако фуллерены и их производные имеют слабое поглощение в видимой или в ближней УФ-области спектра и практически не обладают флуоресценцией, что затрудняет их наблюдение традиционными спектральными методами.

В то же время известно, что в силу уникальной сферической структуры углеродного каркаса фуллерены C₆₀ имеют характерный спектр рамановского рассеяния, состоящий преимущественно из одной высокоинтенсивной линии в области 1462–1469 см⁻¹ [2, 3]. В случае нанесения анализируемых молекул на поверхность серебряных или золотых наночастиц возникает эффект гигантского (поверхностно-усиленного) комбинационного рассеяния (ГКР, в англоязычной тран-

скрипции – SERS), в результате интенсивность сигнала может усиливаться на 5–6 порядков [3–6]. В ряде случаев удается регистрировать спектры ГКР отдельных молекул фуллеренов C₆₀ [7]. Высокая чувствительность метода ГКР, сопоставимая с таковой метода флуоресценции, принципиально важна для исследования механизмов действия и фармакокинетики биологически активных соединений, которые находятся в биообъектах в микро- и наномолярных количествах.

В ИПХФ РАН разработаны эффективные методы синтеза различных водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов C₆₀ (ППФ) путем ковалентного присоединения к фуллереновому сфероиду пяти аддендов, несущих на себе положительные или отрицательные заряды [8, 9]. Такие соединения имеют рекордную растворимость в воде (более 100 мг/мл), малотоксичны и проявляют биологическую активность различных видов, в том числе противовирусную, антибактериальную и нейропротекторную [10, 11]. На основе синтеза комплексов или ковалентных конъюгатов производных фуллерена и красителей в ИПХФ РАН ведутся работы по созданию фотодинамических препаратов нового поколения, значительно превышающих по эффективности генерации активных форм кислорода клинические фотодинамические препараты [12–14]. В связи с этим чрезвычайно актуальной является разработка современных высокочувствительных и информативных аналитических методов, позволяющих исследовать процессы переноса подобных производных фуллеренов через биологические мембраны, их накопление в структуре белков и клеток, распределение и фармакокинетику подобных производных фуллеренов в организме животных.

*Институт проблем химической физики
Российской Академии наук,
Черноголовка Московской обл.*

*Институт физики твердого тела
Российской Академии наук,
Черноголовка Московской обл.*

*Московский физико-технический институт
(государственный университет),
Долгопрудный Московской обл.*

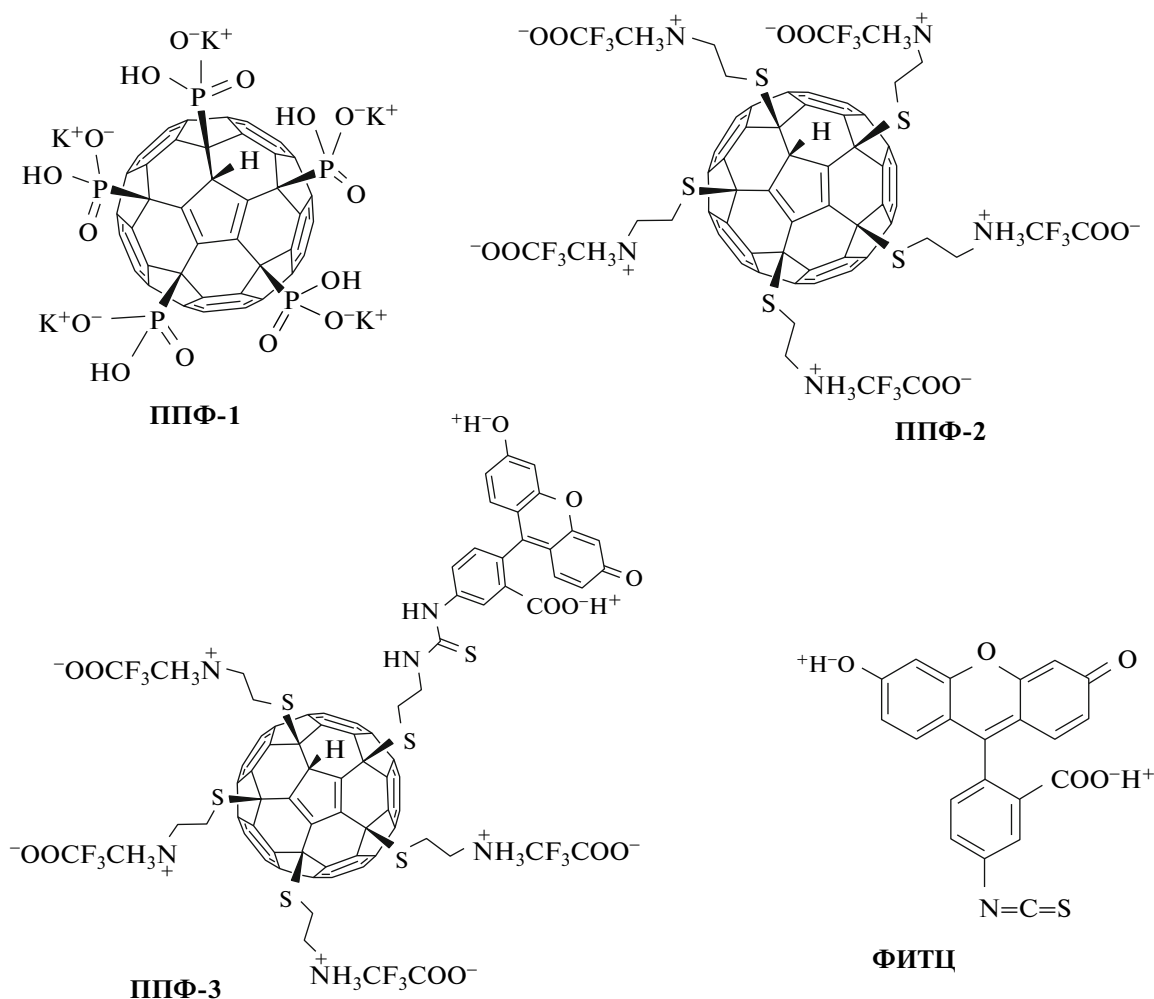


Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений.

Настоящее сообщение посвящено анализу возможности применения метода спектроскопии ГКР для детектирования водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов и их ковалентных конъюгатов с красителями на примере ППФ-1, ППФ-2 и ППФ-3 (рис. 1).

Соединения ППФ-1 и ППФ-2 получены путем присоединения пяти катионных и анионных аддендов к фуллереновому сфероиду, в результате чего сферическая симметрия фуллеренового каркаса нарушается и переходит в аксиальную. Вследствие этого спектр ГКР фуллерена может существенно измениться, как это наблюдается при переходе от фуллерена C_{60} к фуллерену C_{70} [5, 6].

Соединение ППФ-3 получено путем ковалентного присоединения к одному из аддендов ППФ-2 флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ), в результате чего получается меченное флуоресцеином водорастворимое производное фуллерена. При синтезе ППФ-3 предполагали, что это соединение, в силу наличия в нем флуоресцеинового

фрагмента, будет обладать хорошо регистрируемой флуоресценцией. Это позволит детектировать наличие таких производных фуллеренов в биологических системах. Однако оказалось, что флуоресценция красителя в данном соединении полностью потушена, а это исключило возможность применения метода флуоресценции для проведения фармакокинетических исследований с помощью ППФ-3.

В качестве препарата сравнения в работе исследовали ГКР-спектры ФИТЦ (“Serva”), рис. 1.

Структуру синтезированных ППФ-1, ППФ-2 и ППФ-3 доказывали методами ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР на ядрах 1H и ^{13}C и электроспрей-масс-спектрометрии.

Регистрацию спектров ГКР осуществляли с помощью рамановского микроскопа РамМикс M532[®], сочетающего возможности раман-анализатора ИнСпектр R532[®] Scientific Edition и микроскопа Olympus CX-41 (ИФТТ РАН), что позволяет регистрировать спектры неупругого рассеяния

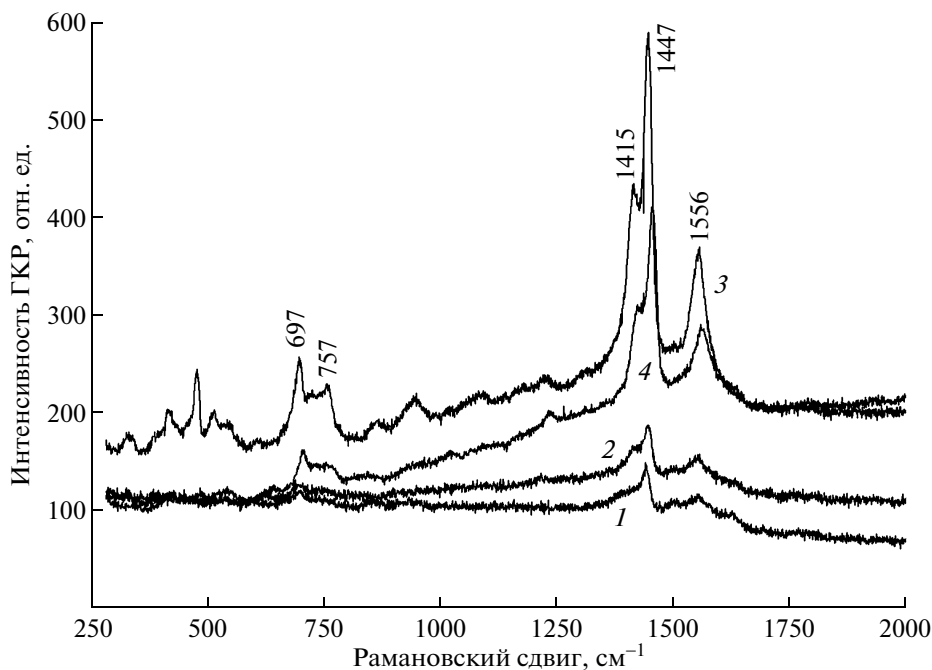


Рис. 2. Спектры ГКР полизамещенных производных фуллерена при различных концентрациях. 1 – ППФ-1 ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 2 – ППФ-2 ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 3 – ППФ-1 (10^{-5} М), 4 – ППФ-2 (10^{-5} М).

света и сигнала люминесценции органических образцов или биологических материалов с подложки с пространственным разрешением 1 мкм и спектральным разрешением $4\text{--}6\text{ см}^{-1}$ [<http://enspectr.com/>]. Возбуждение осуществляли твердотельным лазером Nd:YAG (2w) с длиной волны 532 нм. Свет, рассеянный на подложке с нанесенным на нее веществом, после спектрометра попадает на регистрирующее устройство – охлаждаемую CCD-камеру, которая подключена к компьютеру. Благодаря охлаждению этой камеры удается подавить тепловой шум детектора, что позволяет значительно улучшить отношение сигнал/шум.

Для измерения спектров ГКР веществ использовали оригинальные подложки ИнСпектр SERS на основе наночастиц серебра, позволяющие проводить анализ химических веществ с помощью эффекта ГКР в ультрамалой концентрации (вплоть до нескольких молекул) [<http://enspectr.com/>]. Растворы исследуемых производных фуллерена C_{60} в дистиллированной воде в определенных концентрациях наносили на такую подложку в объеме 1 мкл и после полного высыхания капли при комнатной температуре (площадь пятна $\approx 3\text{ мм}^2$) проводили измерения. Регистрацию спектра осуществляли при возбуждении образца сфокусированным лучом лазера диаметром 1 мкм. Сигнал накапливался и усреднялся по 25 измерениям, осуществленным последовательно в разных точках подложки с шагом 10 мкм в квадрате $40 \times 40\text{ мкм}$.

На рис. 2 и 3 представлены спектры ГКР исследованных соединений.

Как видно из рис. 2, соединения ППФ-1 и ППФ-2, имеющие различные адденды, проявляют сходные, хорошо регистрируемые спектры ГКР, которые состоят из интенсивной линии с максимумом при 1447 см^{-1} и второй линии при 1556 см^{-1} , что на $10\text{--}20\text{ см}^{-1}$ меньше по сравнению с литературными данными по спектроскопии ГКР исходных фуллеренов C_{60} [2–7], а также из нескольких менее интенсивных линий в интервале $400\text{--}800\text{ см}^{-1}$.

При исследовании спектров ГКР ковалентного конъюгата ППФ-2 с ФИТЦ (ППФ-3), рис. 3, было обнаружено, что это производное обладает интенсивным спектром ГКР, значительно отличающимся от спектров ППФ-1 и ППФ-2 и близким по форме к спектру ФИТЦ. Это означает, что основной вклад в спектр ГКР структуры ППФ-3 вносит молекулярный фрагмент флуоресцеина. При этом его интенсивный сигнал ГКР, в отличие от флуоресценции, не исчезает при ковалентном связывании ФИТЦ с производным фуллерена. Эта особенность делает соединение ППФ-3 чрезвычайно перспективным для дальнейших исследований его взаимодействий с биологическими структурами методом ГКР.

Известно, что явление ГКР возникает вследствие резонансного взаимодействия электромагнитного диполя возбужденной молекулы и плаз-

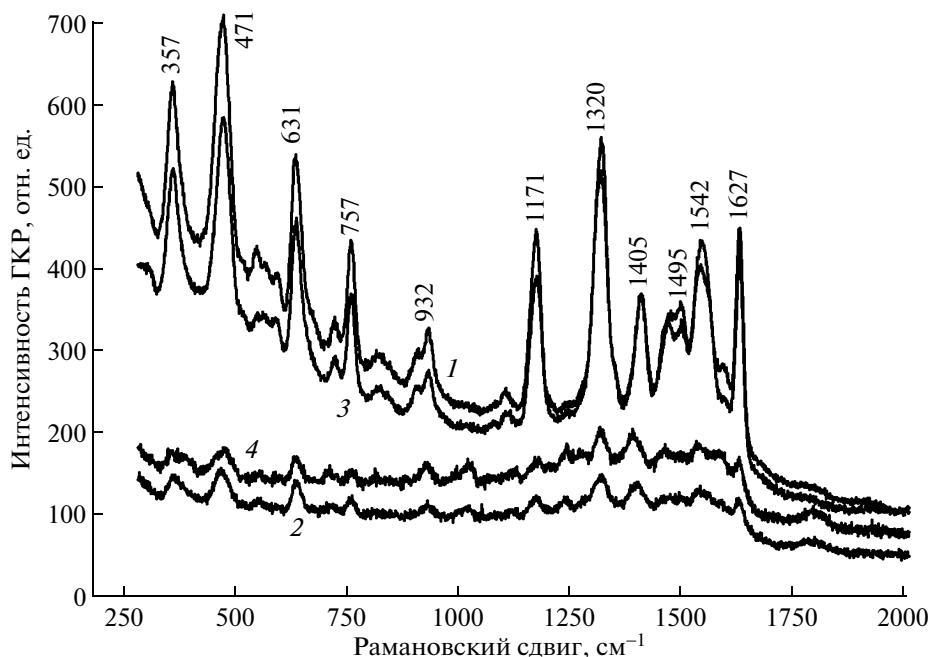


Рис. 3. Спектры ГКР конъюгата ППФ-2 с ФИТЦ (ППФ-3) при соответствующих концентрациях. 1 – ФИТЦ ($3 \cdot 10^{-6}$ М); 2 – ФИТЦ ($3 \cdot 10^{-8}$ М), амплитуда сигнала увеличена в 4 раза; 3 – ППФ-3 ($3 \cdot 10^{-6}$ М); 4 – ППФ-3 ($3 \cdot 10^{-8}$ М), амплитуда сигнала увеличена в 5 раз.

монных колебаний подложки. Эффект наблюдается при непосредственном контакте молекулы анализируемого вещества с поверхностью подложки, и интенсивность сигнала ГКР резко снижается при удалении молекул вещества от подложки на расстояние более 300 Å [15]. Вследствие этого интенсивность сигнала ГКР при исследовании водных растворов веществ должна сильно зависеть от концентрации вещества и способа нанесения пробы на подложку.

В то же время при использовании производных фуллеренов для исследования биологических систем важным моментом является возможность количественного анализа соединений в той или иной биологической пробе. Для этого необходимо, чтобы наблюдалась хорошая воспроизводимость сигнала при определенной концентрации и его линейная зависимость от концентрации вещества в исследуемом диапазоне.

Как видно из рис. 1 и 2, спектры ГКР соединений ППФ-1 и ППФ-2 уверенно регистрируют в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-6} М, а спектры соединения ППФ-3 и ФИТЦ – при концентрации до $3 \cdot 10^{-8}$ М.

Для контроля воспроизводимости сигнала был проведен анализ спектров ГКР ФИТЦ в одной пробе в 25 точках в квадрате 40×40 мкм с шагом 10 мкм по двум координатам. Было обнаружено, что отклонения амплитуды сигналов в каждой

точке не превышают 20%, а после усреднения сигнала по 25 измерениям среднеквадратичное отклонение не превышает 7%.

Изучение зависимости интенсивности сигнала ГКР от концентрации исследуемых соединений в растворе показало, что для всех этих соединений наблюдается линейная зависимость ин-

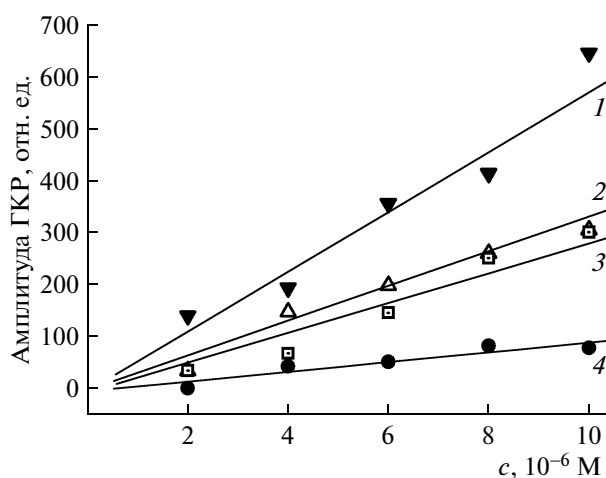


Рис. 4. Зависимость амплитуды сигнала ГКР от концентрации различных соединений. 1 – ФИТЦ, 2 – ППФ-1, 3 – ППФ-3, 4 – ППФ-2.

тенсивности линий ГКР от концентрации в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-5} М (рис. 4).

В качестве амплитуды брали величину пиков в спектре ГКР, которую измеряли как разность максимума и минимума интенсивности ГКР на следующих волновых числах: 1490 и 1447 см^{-1} для ППФ-1 и ППФ-2, 415 и 471 см^{-1} для ППФ-3 и ФИТЦ.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать заключение, что изученные в данной работе водорастворимые производные фуллеренов, получаемые путем присоединения к фуллереновому сфероиду пяти катионных или анионных аддендов, обладают хорошо регистрируемым спектром ГКР, что дает возможность их уверенно детектировать в водных растворах при концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} М. Ковалентное присоединение к фуллереновому производному красителя позволяет регистрировать такие гибридные молекулярные структуры по высокоинтенсивному спектру ГКР красителя в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-5} М. Это открывает возможность широко использовать метод ГКР для исследования взаимодействия таких производных фуллеренов с биологическими структурами различного уровня организации.

Исследования поддержаны РФФИ (грант 14–04–31587–мол_а) и Президиумом РАН (программа № 24 “Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Da Ros T.* Twenty Years of Promises: Fullerene in Medicinal Chemistry. In: Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. В.: Springer Sci.; Business Media B.V., 2008. P. 1–22.
2. *Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.C.* // J. Raman Spectrosc. 1996. V. 27. № 3/4. P. 351–371.
3. *Fang Y., Huang Q., Wang P., Li X., Yu N.* // Chem. Phys. Lett. 2003. V. 381. № 3/4. P. 255–261.
4. *Chase S.J., Bacsa W.S., Mitch M.G., Pilione L.J., Lannin J.S.* // Phys. Rev. B. 1992. V. 46. № 12. P. 7873–7877.
5. *Akers K.L., Cousins L.M., Moskovits M.* // Chem. Phys. Lett. 1992. V. 190. № 6. P. 614–620.
6. *Zhixun L., Yan F.* // Chem. Phys. 2006. V. 321. P. 86–90.
7. *Zhixun L., Loo B.H., Peng A., Ma Y., Fu H., Yao J.* // J. Raman Spectrosc. 2011. V. 42. № 3. P. 319–323.
8. *Kornev A.B., Khakina E.A., Troyanov S.I., Kushch A.A., Deryabin D.G., Peregodov A.S., Vasilchenko A., Martynenko V.M., Troshin P.A.* // Chem. Communs. 2012. V. 48. P. 5461–5463.
9. *Khakina E.A., Yurkova A.A., Peregodov A.S., Troyanov S.I., Trush V., Vovk A.I., Mumyatov A.V., Martynenko V.M., Balzarini J., Troshin P.A.* // Chem. Communs. 2012. V. 48. P. 7158–7160.
10. *Fedorova N.E., Klimova R.R., Tulenev Yu.A., Chichev E.V., Kornev A.B., Troshin P.A., Kushch A.A.* // Mendeleev Communs. 2012. V. 22. P. 254–256.
11. *Kornev A.B., Peregodov A.S., Martynenko V.M., Balzarini J., Hoorelbeke B., Troshin P.A.* // Chem. Communs. 2011. V. 47. P. 8298–8300.
12. *Баринов А.В., Горячев Н.С., Полетаева Д.А., Рыбкин А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А., Шмитт Ф.И., Ренгер Г., Эйхлер Г.И., Котельников А.И.* // Рос. нанотехнологии. 2012. Т. 7. № 7/8. С. 66–70.
13. *Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А.* // ДАН. 2013. Т. 452. № 4. С. 408–412.
14. *Kotelnikov A.I., Rybkin A.Yu., Khakina E.A., Kornev A.B., Barinov A.V., Goryachev N.S., Ivanchikhina A.V., Peregodov A.S., Martynenko V.M., Troshin P.A.* // Org. Biomol. Chem. 2013. V. 11. № 26. P. 4397–4404.
15. *Кукушкин В.И., Ваньков А.Б., Кукушкин И.В.* // Письма в ЖЭТФ. 2013. Т. 98. № 6. С. 383–388.