

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Буняев Виталий Андреевич

Модификация оксида графена и углеродных нанотрубок с применением меченных тритием соединений

1.4.13. Радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н., доцент Бадун Г.А.

Москва - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 13 |
| 1.1. ОКСИД ГРАФЕНА И УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ: ИХ СТРОЕНИЕ, СИНТЕЗ, ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА И СПОСОБЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 13 |
| 1.1.1. Оксид графена, восстановленный оксид графена | 13 |
| 1.1.2. Инструментальные методы анализа как подход к исследованию структур..... | 22 |
| 1.1.3. Адсорбционный подход в модифицировании структур биополимерами..... | 29 |
| 1.1.4. Углеродные нанотрубки | 34 |
| 1.1.5. О некоторых способах модифицирования углеродных нанотрубок..... | 39 |
| 1.1.6. Инструментальные методы анализа углеродных нанотрубок | 43 |
| 1.2. О НЕКОТОРЫХ СПОСОБАХ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 48 |
| 1.2.1. Изотопное модифицирование оксида графена и его субстратов..... | 48 |
| 1.2.2. Изотопное модифицирование углеродных нанотрубок | 54 |
| 1.2.3. Методы введения тритиевой метки | 57 |
| 1.2.4. О некоторых возможностях метода термической активации трития..... | 60 |
| 1.3. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) | 63 |
| 1.3.1. Молекулярный докинг | 64 |
| 1.3.2. Молекулярная динамика | 64 |
| 1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ..... | 67 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 69 |
| 2.1. ОКСИД ГРАФЕНА, ВОССТАНОВЛЕННЫЙ ОКСИД ГРАФЕНА, УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА..... | 69 |
| 2.1.1. Оксид графена и углеродные нанотрубки..... | 69 |
| 2.1.2. Характеристика углеродных наноматериалов | 69 |
| 2.1.3. Характеристика газовых смесей дейтерия и трития | 70 |
| 2.2. ХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ОКСИДА ГРАФЕНА..... | 71 |
| 2.2.1. Аминокислотное восстановление | 71 |
| 2.2.2. Гидротермальное восстановление в воде | 72 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.3. Восстановление β -меркаптоэтанолом..... | 72 |
| 2.2.4. Восстановление атомарным дейтерием и тритием | 72 |
| 2.2.5. Синтез высокоочищенного тритием оксида графена | 73 |
| 2.3. АДСОРБЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ УНТ БИОПОЛИМЕРАМИ | 75 |
| 2.3.1. Углеродные нанотрубки, модифицированные хитозаном и белком бычьим сывороточным альбумином | 75 |
| 2.4. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ОКСИДА ГРАФЕНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ТЕРМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ТРИТИЯ..... | 79 |
| 2.4.1. Методика введения трития | 79 |
| 2.4.2. Методика введения трития в комплекс даларгин-углеродный наноматериал: ОГ, ОГ _{восст.} , УНТ | 80 |
| 2.4.3. Методика введения трития в БСА, предварительно адсорбированного на ОГ | 81 |
| 2.4.4. Методика введения трития в лизоцим, предварительно адсорбированный на ОГ | 82 |
| 2.4.5. Определение ферментативной активности лизоцима, адсорбированного на ОГ | 82 |
| 2.5. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЬБУМИНА С ОКСИДОМ ГРАФЕНА | 84 |
| 2.5.1. Методика подготовки файлов к проведению компьютерного моделирования..... | 84 |
| 2.5.1.1. Подготовка файла структуры белка БСА..... | 84 |
| 2.5.1.2. Подготовка файла структуры ОГ для молекулярного докинга..... | 84 |
| 2.5.1.3. Подготовка файлов для моделирования методом молекулярной динамики | 85 |
| 2.5.2. Методика проведения молекулярного докинга в программе AutoDock Vina 1.2 | 86 |
| 2.5.3. Методика проведения молекулярно-динамического расчета в программе Gromacs с использованием ресурсов СКЦ МГУ | 87 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 90 |
| 3.1. ПОЛУЧЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА | 90 |
| 3.2. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОМЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА | 99 |
| 3.3. ВЛИЯНИЕ ОКСИДА ГРАФЕНА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА РЕАКЦИЮ АТОМОВ ТРИТИЯ С ДАЛАРГИНОМ..... | 106 |
| 3.4. АДСОРБЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОКСИДА ГРАФЕНА ЛИЗОЦИМОМ..... | 114 |
| 3.5. ТРИТИЕВЫЙ ЗОНД И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ОКСИДА ГРАФЕНА И АЛЬБУМИНА..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| 3.6. ХИТОЗАН И СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН КАК МОДИФИКАТОРЫ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК | 145 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 155 |
| ВЫВОДЫ | 157 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 159 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 161 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 192 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Углеродные наноматериалы: оксид графена (ОГ), восстановленный оксид графена (ОГ_{восст}) и углеродные нанотрубки (УНТ) обладают развитой поверхностью с различными функциональными группами, которые открывают широкие возможности для их модификации. Модификация поверхности углеродных наноструктур может изменить их физико-химические свойства и тем самым расширить потенциал применения. Среди большого числа возможных модификаторов углеродных наноматериалов особый интерес привлекают природные биополимеры - белки и аминополисахариды. Известно, что при модификации ОГ и УНТ биополимерами повышается их агрегационная устойчивость в воде. Тем не менее, современные аналитические подходы не дают полной информации о природе сорбционных процессов, а моделирование системы «биополимер–углеродный наноматериал» осложняется недостатком экспериментальных данных.

Для количественного описания взаимодействия модификатора с углеродным субстратом используют метод радиоактивных индикаторов. С помощью меченных тритием соединений можно определять до 10^{-14} моль в анализируемой пробе. Метод термической активации трития (ТАТ) позволяет получать меченные тритием углеродные материалы для использования в качестве радиоактивных индикаторов, в том числе при исследовании их биораспределения [1]. Более того, материалы, в которых тритий находится в конденсированном состоянии, могут быть рассмотрены в качестве потенциальных кандидатов на роль компонента атомных батарей (АБ).

При обработке атомами трития сложных объектов, например, глобулярных белков и различных надмолекулярных образований можно определять их структурную организацию из анализа распределения метки по компонентам объекта. Для белков из анализа распределения трития по аминокислотным остаткам проводят реконструкцию их пространственной структуры (метод тритиевой планиграфии) [2]. В последние годы развивается комплексный подход использования меченных тритием соединений как радиоактивных индикаторов и обработку атомарным тритием изучаемого объекта с определением распределения трития по компонентам – метод тритиевого зонда [3].

В качестве дополнительного анализа по взаимодействию биомакромолекул с углеродными наноматериалами применяется компьютерное моделирование, которое позволяет подробно рассмотреть процессы модификации углеродных субстратов и дать оценку о возможных механизмах образования их комплексов.

Степень разработанности темы исследования

На момент, предшествующий выполнению данной работы, в литературе рассматривается изотопный обмен между атомарным тритием, получаемым методом ТАТ, и углеродными наноматериалами, а также веществами, нанесенными на такие материалы. При этом не исследовано влияние функционального состава поверхности углеродных материалов и изменение конформации молекул при адсорбции на результаты изотопного обмена. Отсутствуют данные о взаимном влиянии модифицирующих углеродные наноматериалы агентов и не изучена структура образующихся комплексов. Сочетание методов радиоактивных индикаторов и компьютерного моделирования для определения состава образующихся комплексов не применялось.

В последние годы появились работы по исследованию изменения свойств ферментов при их взаимодействии с углеродными наноматериалами, в частности при адсорбции лизоцима на ОГ. Однако нет данных о том, как происходит адсорбция белка на поверхности ОГ и насколько сохраняется ферментативная активность лизоцима после адсорбции.

В настоящее время активно исследуется взаимодействие альбумина с ОГ. Комбинированное использование метода тритиевого зонда и моделирования с использованием методов молекулярной динамики открывает новые возможности для детального анализа этих процессов. Такой подход позволит получить более глубокое понимание природы взаимодействий между белками и углеродными наноматериалами.

Небольшая энергия β -частиц трития делает его перспективным радионуклидом для создания безопасных микроразмерных источников тока. Для этого необходимо создавать новые материалы, прочно удерживающие тритий. ОГ как такой материал ранее не рассматривался. Не было исследовано, как влияет химический состав ОГ на его способность связывать тритий. Не определены предельно высокие уровни связывания трития с ОГ.

Цель и задачи работы

Цель данной работы состояла в получении меченного тритием оксида графена и его восстановленной формы, а также комплексов углеродных наноматериалов (оксид графена и углеродные нанотрубки) с биополимерами с регулируемыми гидрофобными и агрегационными свойствами.

Для достижения цели поставлены следующие *задачи*:

1. Сопоставить разные способы получения восстановленного оксида графена (аминокислоты: глицин, валин, фенилаланин, пролин; β -меркаптоэтанол; гидротермальный метод; атомарный водород) и определить, как влияет восстановление ОГ на способность связывать атомарный тритий.
2. Получить меченный тритием оксид графена с предельно высокой удельной радиоактивностью и дать оценку возможного применения данного соединения в качестве компонента атомной батареи.
3. Получить и охарактеризовать адсорбционные комплексы оксида графена с даларгином, лизоцимом и альбумином.
4. Выявить роль подложки и расположения на ней органической молекулы (даларгина, лизоцима, альбумина) на распределение трития в аминокислотных остатках после обработки атомарным тритием композитов на основе оксида графена и углеродных нанотрубок.
5. Получить и охарактеризовать многокомпонентные материалы с регулируемыми гидрофобными и агрегационными свойствами на основе углеродных нанотрубок, хитозана и альбумина.

Объекты исследования – одностенные углеродные нанотрубки, модифицированные фтором, однослойный оксид графена, восстановленный оксид графена, олигопептид даларгин, глобулярные белки – бычий сывороточный альбумин и лизоцим, полисахарид хитозан различной средней молекулярной массой. **Предмет исследования** – модификация углеродных субстратов меченными соединениями и атомарным тритием в целях получения как препаратов с высокой удельной радиоактивностью, так и для исследования состава образующихся комплексов.

Методология и методы исследования

В работе использованы радиохимические и физико-химические методы исследования, а также компьютерное моделирование: молекулярный докинг и молекулярная динамика. Углеродные наноструктуры и их модифицированные аналоги проанализированы методами спектроскопического комбинационного рассеяния, просвечивающей электронной микроскопии и рентгенофазового анализа. С помощью ИК-спектроскопии определен функциональный состав поверхности углеродных наноматериалов. По данным электрофоретического рассеяния света установлен заряд поверхности в водной среде исходных и модифицированных наноуглеродных структур. Меченные тритием вещества были получены при изотопном обмене с атомарным тритием. Генерация атомарного трития осуществлялась при диссоциации молекулярного трития на разогретой до температуры 1850-2000 К вольфрамовой проволоке. Выделение меченых препаратов проводили с помощью различных видов хроматографии. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках после тотального гидролиза белков и пептида проводили на аминокислотном анализаторе с дополнительным контролем радиоактивности, а также получали дериваты, для определения которых использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию. Регистрацию β -излучения трития осуществляли с помощью жидкостной сцинтилляционной спектрометрии.

Методика эксперимента включала следующие этапы:

1. Синтез восстановленного оксида графена;
2. Получение меченных тритием веществ, в том числе получение высокомеченного тритием оксида графена;
3. Получение адсорбционных комплексов оксида графена и углеродных нанотрубок, модифицированных белками, олигопептидом даларгином и полисахаридом хитозаном;
4. Проведение компьютерного моделирования методом молекулярной динамики взаимодействия белка альбумина с поверхностью оксида графена.

Научная новизна работы

В работе **впервые:**

Проведено систематическое исследование восстановления ОГ аминокислотами. Показано, что для аминокислот ключевую роль в восстановлении

играет взаимодействие α -аминогруппы с эпокси- и гидроксильными группами ОГ. Впервые предложено для восстановления ОГ использовать β -меркаптоэтанол и показано, что восстановление проходит в мягких условиях. Модифицирована методика гидротермального восстановления ОГ. Проведено восстановление ОГ атомарным водородом и его изотопами. Показано, что скорость связывания атомарного трития практически не зависит от изменения химического состава ОГ в процессе восстановления.

С помощью метода термической активации трития получен оксид графена с предельно высоким содержанием трития, предложено использовать его в бета-вольтаических атомных батареях.

Показано, что результат взаимодействия атомарного трития с органическими веществами (на примере даларгина), нанесенными на углеродные наноматериалы (УНТ, ОГ и $OГ_{восст.}$), зависит не только от изменения реакционной способности атомов трития, но и от конформации молекулы в адсорбционном комплексе.

С помощью комплексного подхода, использующего меченные тритием соединения и обработку атомарным тритием (метод тритиевого зонда), определен состав и структурная организация адсорбционных комплексов белков альбумина и лизоцима на поверхности ОГ, $OГ_{восст.}$ и УНТ.

Показано, что лизоцим в составе адсорбционного комплекса с ОГ сохраняет ферментативную активность, однако она снижается из-за изменения стерической доступности и морфологии активного центра лизоцима.

Обнаружено, что порядок последовательной модификации углеродных нанотрубок хитозаном и альбумином не влияет на состав комплекса, но позволяет регулировать гидрофильность и агрегационную устойчивость композиционного материала.

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны новые методы синтеза восстановленного оксида графена как в условиях гидротермального синтеза, так и с помощью химического восстановления при комнатной температуре.

Методом термической активации трития получены образцы высокомеченого оксида графена, перспективного материала как компонента бета-вольтаических

атомных батарей (патент RU 2813551 С1 «Способ получения высокомеченного тритием оксида графена»).

С помощью методов тритиевого зонда и компьютерного моделирования определена роль конформационного расположения даларгина, лизоцима и альбумина на распределение радиоактивной метки в аминокислотных остатках. Оценено изменение ферментативной активности лизоцима в присутствии фазы исходного и восстановленного оксида графена.

Разработана методика получения высокомеченого альбумина, адсорбированного на оксиде графена, с удельной радиоактивностью, равной 1500 Ки/ммоль.

Разработаны методы адсорбционного модифицирования углеродных наноматериалов для обеспечения их биосовместимости и коллоидной устойчивости в средах, аналогичным биологическим.

Положения, выносимые на защиту

1. При получении меченного тритием восстановленного оксида графена количество неабильного трития определяется только условиями обработки атомарным тритием и не зависит от условий предварительно восстановления оксида графена.
2. Метод термической активации трития позволяет получать высокомеченный оксид графена с удельной активностью до 1,5 Ки/мг (55 ТБк/г) для применения в бета-вольтаических источниках тока.
3. При обработке атомами трития адсорбционных комплексов пептидов и белков, нанесенных на углеродные наноматериалы, на распределение трития по аминокислотным остаткам влияет как природа подложки, так и расположение молекул на ней.
4. Последовательное адсорбционное модифицирование поверхности углеродных нанотрубок хитозаном и альбумином позволяет регулировать гидрофильность и агрегационную устойчивость композиционного материала.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13. Радиохимия по области исследований:

- Получение и идентификация меченых соединений. Физико-химические, методы синтеза.
- Метод радиоактивных индикаторов.

Степень достоверности

Достоверность полученных в работе результатов определяется использованием стандартных методик измерения, использованием современного оборудования и воспроизводимостью полученных результатов.

Личный вклад автора

Вклад автора состоял в поиске и анализе научной литературы и подготовке обзора, участии в проведении экспериментов по химическому восстановлению оксида графена, изотопному обмену с газообразным тритием между даларгином, лизоцимом и альбумином, нанесенных на углеродные субстраты, получению высокомеченного тритием оксида графена, а также компьютерного моделирования взаимодействия альбумина с оксидом графена и анализа конформационного расположения белка на поверхности оксида графена. Работы по получению, очистке меченных тритием соединений, анализе ферментативной активности лизоцима, анализе межмолекулярного взаимодействия синтезируемых веществ выполнены совместно с к.х.н. Бадуним Г.А., д.х.н. Чернышевой М.Г., к.х.н. Шнитко А.В. Анализ веществ методом спектроскопии комбинационного рассеяния проведен к.х.н. Григорьевой А.В. Рентгенофазовый анализ ОГ и УНТ проведен к.х.н. Ереминой Е.А. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках белков проведен совместно с к.х.н. Ксенофонтовым А.Л. Анализ и оценка изменения функционального состава поверхности по данным ИК-Фурье спектроскопии определены к.х.н. Поповым А.Г. ПЭМ-микрофотографии получены к.х.н. Егоровым А.В. и Егоровой Т.Б. Компьютерное моделирование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. Личный вклад автора в совместные публикации основополагающий.

Данная работа является частью исследований, связанных с получением меченых соединений и их применением для изучения их взаимодействия с оксидом графена, одностенных углеродных нанотрубок, выполненных при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (19-08-00452, 18-33-20147-

мол_а_вед), а также рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова, регистрационный номер 122012600116-4.

Апробация работы

Основные результаты настоящей работы были представлены на всероссийских и международных конференциях: Международной конференции со школой и мастер-классами для молодых ученых «Химическая технология функциональных наноматериалов» (2017); Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2018, 2019, 2020, 2021, 2024); IX и X Российской конференции с международным участием «Радиохимия 2018» и «Радиохимия 2022» (2018, 2022); 14th и 15th International Conference «Advanced Carbon NanoStructures» (ACNS'2019 и ACNS'2021) (2019, 2021), Восьмой всероссийской Каргинской конференции. Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ. «Полимеры - 2020» (2020), LXXII International conference "Nucleus-2022: Fundamental problems and applications" (2022), Всероссийская конференция «Поверхностные явления в дисперсных системах» (2023), The 3rd International Electronic Conference on Biomolecules (2024); XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists “Mendeleev 2024” (2024); XXII Mendeleev Congress on general and applied chemistry (Symposium on nuclear chemistry (BRICS+)) (2024).

Публикации

Основные результаты, положения и выводы диссертации изложены в 6 научных работах автора, в том числе 5 публикациях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science и Scopus) и входящих в ядро РИНЦ общим объемом 3,8 п.л.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 205 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и 5-и приложений. Список цитируемой литературы содержит 347 наименований. Работа содержит 5 таблиц и 46 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОКСИД ГРАФЕНА И УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ: ИХ СТРОЕНИЕ, СИНТЕЗ, ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА И СПОСОБЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В 2004 году в научном мире произошло одно из крупнейших событий – впервые был получен графен методом микромеханического расщепления графитовых слоёв, о чём сообщается в одних из самых цитируемых работ [4–6]. Графен – аллотропная модификация атомов углерода, образующих кристаллическую решетку толщиной в один атом. Такие структуры как: графит, углеродные нанотрубки, фуллерены имеют в своём составе преимущественно атомы углерода в sp^2 -гибризованном состоянии. Обладая выдающимися физико-химическими свойствами [7,8] не удивителен всеобщий интерес в разработке эффективных методов крупномасштабного синтеза данного типа материалов. Производство композитов [9,10], микроэлектроника [11], материалы с перспективой медицинского применения [12–20], селективные адсорбенты [21–26], синтез катализаторов [27–30] – вот некоторые области возможного практического применения графена и графеноподобных структур.

На момент написания настоящего обзора производство графена в крупнотоннажном объёме не производится в виду экономической нецелесообразности метода микромеханического расщепления графита. Перед учёными сформировалась новая научно-техническая проблема, решением которой рассматриваются различные механизмы восстановления оксида графена (ОГ) – возможного прекурсора графена [31].

1.1.1. Оксид графена, восстановленный оксид графена

Оксид графита представляет собой слоистую структуру, аналогичную структуре графита, но с наличием на поверхности кислородсодержащих функциональных групп (карбокисильных, эпоксидных, гидрокисильных, карбонильных), образованных в процессе кислотного модифицирования графита. Таким образом не только увеличивается расстояние между слоями окисленного графита [32], но и происходит изменение их физико-химических свойств с гидрофобного механизма молекулярного взаимодействия на гидрофильный. При суспензировании твердой фазы оксида графита в таких полярных растворителях как

вода, этиловый спирт, N,N-диметилформамид (ДМФА) и пр. под действием ультразвуковой обработки молекулы растворителя проникают в полости межслоевого пространства, и протекают процессы расслоения. Образованные слои толщиной в один атом и называются оксидом графена [33]. В работе [34] довольно подробно описаны предполагаемые как старые модели структур оксида графена, в которых отсутствуют вариации, учитывающие неоднозначность расположения тех или иных кислородсодержащих функциональных групп, так и предложена модель Лерфа - Клиновского, как наиболее близкая к реальной. Идеальная структура листа ОГ, как и графена, не имеет дефектов во внутренних полостях, но в процессе окисления графита обнаружены различные дефекты, которые могут быть следствием неоднородности структуры исходного графита, а также образованные в процессе кислотной модификации [35].

Методы синтеза оксида графена

Оксид графена был получен ещё в 1859 году по методу Броди. Синтез протекает в условиях многостадийной обработки графита смесью дымящей азотной кислоты и хлората калия при температуре 60 °С в течение четырёх суток. Полученный продукт был назван «графитовой кислотой», но по причине небезопасности процесса, в ходе которого образовывалась хлорноватая кислота имел место риск самопроизвольного разложения с последующим взрывом реакционной смеси. Тем не менее этот эксперимент положил начало разделению графеновых листов, оперируя химическими методами [36].

Через 39 лет в 1898 году Штауденмайер предложил усовершенствовать синтез до одностадийного процесса, добавив в реакционную систему серную кислоту. Эксперимент оставался потенциально опасным, занимал продолжительное время и требовал выдерживать реакционную смесь при нагреве (4 дня, 90 °С) [37].

В 1958 году был разработан метод синтеза для крупнотоннажного производства оксида графена (метод Хаммерса). Окислительными агентами выступали перманганат калия, нитрат натрия, концентрированная серная кислота. Расслоение оксида графита проводилось в водной среде при ультразвуковой обработке суспензии и охлаждении реакционной смеси с 66 до 0 °С. Данный метод исключал вероятность взрыва, но оставался довольно вредным для окружающей среды по

причине образования растворимых солей марганца, ядовитых паров оксидов азота [38].

Из современных методов синтеза ОГ предложен метод Тура, разработанный в 2010 году [39], усовершенствующий метод Хаммерса. Основным отличием которого выступает увеличение исходной концентрации серной кислоты в 2 раза и заменой нитрата натрия на фосфористую кислоту (в объёмном соотношении $H_2SO_4 : H_3PO_3 = 9 : 1$). Отсутствие нитрата натрия в реакционной системе позволяет избежать образование паров оксида азота, а присутствие фосфористой кислоты- повысить выход целевого продукта.

В работе [40] исследуется механизм деградации оксида графена в биологически активных почвах для определения безопасности графеновых наноматериалов для окружающей среды. Особенностью работы является применение метода радиоактивных индикаторов для исследования миграции графеноподобных структур в условиях окружающей среды. В качестве прекурсора оксида графена был выбран графит, меченный ^{14}C . Синтез проводили по методу Тура.

И по сей день учёными разрабатываются всё новые методы синтеза оксида графена. В основе каждой технологии предлагается исключить азотсодержащие окислители и минимизировать концентрацию перманганата калия (или вовсе его заменить на перекись водорода, феррат калия, оксид фосфора(V) и пр.) [41,42]. Основой каждого нового синтеза принят метод Хаммерса, вследствие чего устоялся термин «модифицированный метод Хаммерса».

Восстановленный оксид графена и его синтез

Перед изложением методов восстановления оксида графена стоит уделить внимание иным подходам к производству графеновых структур. В настоящее время известны такие процессы как: микромеханическое расщепление графита [4], выращивание эпитаксиальных плёнок [43–45], химическое осаждение из газовой фазы (метод CVD (chemical vapor deposition)) [46], расщепление графеновых слоёв в водных растворах фульвокислот (метод жидкофазного расщепления) [47]. Приведенные технологии позволяют получать продукт довольно высокого качества, но осложнены высокой стоимостью реализации технологического процесса (первые три примера), следственно, дорогостоящие, и побочной модификацией графеновых

слоёв действием гуминовых веществ.

Примечательной особенностью ОГ является наличие кислородсодержащих функциональных групп, которые возможно частично удалять. После такой модификации физико-химические свойства материала становятся близкими к свойствам структуры графена. Такой материал принято называть восстановленным оксидом графена ($\text{ОГ}_{\text{восст.}}$). Существует две основные стратегии синтеза материала: применение физических процессов восстановления и химических.

Физические методы восстановления оксида графена

Термическое восстановление как один из возможных методов приведён в работе [48]. Процесс проводят в условиях нагрева твердой фазы ОГ массой 5 грамм при 250 °С в муфельной печи в течение 20-40 минут, с последующим суспензированием в деионизированной воде при ультразвуковой обработке (концентрация суспензии 1 г/л) в течение двух часов. Согласно данным ИК-спектроскопии (ИК-Фурье спектроскопия) авторы делают вывод о снижении доли кислородсодержащих групп, что указывает на восстановление оксида графена. Преимуществами выбранной стратегии являются: высокая степень восстановления, экологичность, технологичность (возможно получение больших объёмов продукта). Минусами отмечаются сворачивание графенового листа, эпоксидные группы не удаляются, относительно высокая доля образования различных структурных дефектов во время разложения карбонильных, карбоксильных групп.

Фотонное восстановление рассмотрено в [49]. Оксид графена массой 100 мг суспензировали в 100 мл в 4-(2-гидрокси этокси) фенил 2-гидрокси-2-пропил кетоне (20 мМ) в стеклянном флаконе и при постоянном перемешивании облучали через светофильтр 320-390 нм потоком фотонов на установке Nonle Bluepoint 4 Esosure (Германия). Расстояние световода до реакционной смеси было оптимизировано таким образом, чтобы удельная мощность фотонов, проходящих через суспензию, была в пределах 200-500 мВт/см². Далее твёрдую фазу продукта отделяли центрифугированием, а адсорбированную органическую фазу удаляли с поверхности восстановленного оксида графена многократной обработкой тетрагидрофураном (ТГФ). Плюсы метода: высокая степень восстановления и удаления эпоксидных групп. Минусы: дороговизна оборудования и органических

реактивов.

Восстановление оксида графена под действием **электромагнитных волн СВЧ-диапазона** рассмотрено в [50–52]. Авторы работ отмечают два основных подхода в выборе метода восстановления: твердофазное восстановление оксида графена и восстановление суспензии ОГ в полярном растворителе. Полярные кислородсодержащие функциональные группы взаимодействуют с микроволнами, генерируемыми магнетроном СВЧ-установки. В ходе таких взаимодействий происходят колебания молекул под действием электромагнитных волн с преобразованием таких колебаний в тепловую энергию. Известно, что структура оксида графена не устойчива при высоких температурах, и протекает его конверсия в восстановленный оксид графена. Плюсами метода отметим высокую скорость процесса восстановления, но дороговизна реализации крупнотоннажного синтеза, высокая степень деградации поверхности ОГ в результате микроволнового излучения – нивелируют положительный эффект.

Химические методы восстановления оксида графена

Химическое восстановление обладает бесспорным преимуществом по сравнению с методами физического подхода. Основными плюсами выбора химической стратегии являются: самое высокое качество синтезируемого продукта, масштабируемость и воспроизводимость технологического процесса, широкий спектр применяемых восстановителей - всё это определяет химическое восстановление оксида графена как наиболее перспективное [53].

Гидразин - эффективный восстановитель, широко применяемый в химической отрасли. Авторы статьи [54] осуществили синтез восстановленного оксида графена с помощью гидразина гидрата. Коллоидную суспензию ОГ в деионизированной воде (3 г/л) перенесли в тефлоновый лабораторный стакан и выдержали в ультразвуковой ванне в течение трёх часов при 25 °С. Моногидрат гидразина (98%, Aldrich) в соотношении 1 мкл на 3 мг ОГ аккуратно ввели в суспензию при постоянном перемешивании и нагрели на масляной бане (80 °С, 12 часов). Цвет суспензии изменился с темно-коричневого до черного и оставили охлаждаться до 25 °С. Разделение твердой фазы продукта от раствора провели на стеклянном фильтре со средним размером пор, а осушку под вакуумом в течение 12 часов. По данным

рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), термогравиметрического (ТГА), рентгеновской дифракции (РФА) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) охарактеризован восстановленный оксид графена.

Натрий боргидрид, соединение, обладающее меньшей токсичностью, чем гидразин, применяемый как химический восстановитель, выбран коллективом ученых в статье [55]. Особенностью приведенной методики заключается в мгновенном взаимодействии раствора восстановителя с ОГ при 25 °С. Описаны основные стадии синтеза, предложены механизмы реакций. Структура восстановленного оксида графена охарактеризована с использованием таких инструментальных методов, как: оптическая спектроскопия (УФ-спектроскопия), рентгеновская фотоэлектронная и комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия), рентгеноструктурного анализа, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).

Разработка безопасных для окружающей среды методов синтеза, безотходных производств и исследования в области «зелёной химии» задают вектор развития современной химической промышленности. Прогнозирование возможных негативных последствий от внедрения той или иной технологии – обязательная составляющая этических норм любого исследователя. В обзоре [56] и статьях [57–70] подробно описаны пути синтеза восстановленного оксида графена, основанные на использовании таких соединений как: аминокислоты, белки, пептиды, сахараиды.

Восстановление **L-цистеином** проводят при комнатной температуре в течение 72 часов. Для этого к водной суспензии оксида графена (1 г/мл) при постоянном перемешивании добавляют раствор (в 0.1 М NaOH) аминокислоты концентрации 0.4 г/л. Затем твёрдую фазу фильтруют, многократно промывают деионизированной водой до нейтрального показания pH. Сушку продукта проводят при 65 °С. Выход составил 86% масс. от теоретического [57].

Исследователи [58] предлагают восстанавливать оксид графена **L-аскорбиновой кислотой** при комнатной температуре. К 50 мл водной суспензии ОГ (0.1 г/л) добавляют 50 мг аскорбиновой кислоты, перемешивая реакционную смесь. За ходом процесса восстановления следили с помощью оптической спектроскопии. По мере протекания процесса, интенсивности пиков спектра отвечающих за фазу

оксида графена (230 и 300 нм) полностью затухают за 24 часа. Интенсивность поглощения в области выше 300 нм резко выросла с образованием пика в области 264 нм. Опираясь на данные ИК-Фурье спектроскопии, как подтверждающего анализа, сделан вывод об образовании $ОГ_{восст}$.

Алифатическая аминокислота **аланин**, как восстанавливающий агент, рассмотрен авторами [68]. 10 мг оксида графена суспензируют в 200 мл водного раствора аминокислоты (10 г/л). Реакционные смеси выдерживают в интервале температур 25 - 85 °С в течение 4 – 24 часов. Образец-сравнения представляет собой водную суспензию $ОГ$ без аланина. Отмечается изменение цвета суспензий со светло-коричневого (исходного $ОГ$) до тёмного (образец с наибольшим временем выдержки и температуры). Предложены возможные механизмы реакций восстановления эпоксидных групп $ОГ$.

Двойная роль **глицина** как эффективного восстановителя, так и соединения, которое способно к модифицированию поверхности $ОГ_{восст}$, рассмотрена авторами в статье [70]. К 100 мл водной суспензии $ОГ$ (0.25 г/л) добавляют 125 мг глицина, перемешивают в течение 15 минут. Смесь выдерживают в течение 30 минут в ультразвуковой ванне. При интенсивном перемешивании оставляют на 12 часов при комнатной температуре, затем нагревают до 95 °С и выдерживают в течение 24 часов на установке с обратным холодильником. Темный осадок фильтруют и многократно промывают деионизированной водой. Применяемые аналитические методы контроля: РФА, УФ-спектроскопия, ИК-Фурье, атомно-силовая микроскопия (АСМ), РФЭС, СКР.

Белки - сложные биополимерные соединения, состоящие из множества аминокислот, связанных между собой пептидной связью. В структуре белков имеются как гидрофобные (лиофобные), так и гидрофильные (лиофильные) фрагменты. Одновременное наличие в одной молекуле таких участков называют свойством амфифильности (дифильности). Благодаря амфифильности возможна адгезия этого типа макромолекул как на гидрофобных, так и на гидрофильных участках различных материалов.

Белок **бычий сывороточный альбумин** (БСА) образован из 583 аминокислотных остатков двадцати аминокислот, молекулярная масса которого

равна 66,5 кДа. Наличие остатков аминокислоты тирозина в структуре белка позволило успешно провести эксперимент по восстановлению ОГ [59]. К суспензии ОГ вводится водный раствор белка, среда доводится до pH равным 12 (NaOH 1.0 M), затем реакционная смесь выдерживается при температуре от 55 до 90 °С.

Лизоцим, фермент, состоящий из 129 аминокислотных остатков (молекулярная масса белка 14,4 кДа). Как модельный белок он широко применяется в исследовательской практике. Его доступность, известные свойства, более высокая стабильность структуры, чем у БСА (за счёт образования жесткой структуры глобулы) – делают привлекательным объектом исследований. Белок может выступать как соединение, обеспечивающее седиментативную стабильность суспензии восстановленного оксида графена [60]. Известно, что в полярных средах оксид графена устойчив, способен к высокой степени диспергируемости за счёт наличия кислородсодержащих функциональных групп на его поверхности. В процессе восстановления доля таких групп снижается, его структура преобразуется в графеноподобную и тем самым становится более гидрофобной. Основные этапы синтеза: подбирается такая исходная концентрация лизоцима, которая будет варьироваться в конечной реакционной смеси от 0.25 до 1.0 г/л. К 1 мл гидразин гидрата (98%, Aldrich) вносится лизоцим, затем смесь вводится к 20 мл (0.38 г/л) водной суспензии оксида графена. Водным раствором NaOH (1.0 M) pH среды доводится до 12. Реакционная смесь выдерживается при 80 °С в течение 24 часов. Обработка ультразвуком 30 минут, центрифугирование (8000 rpm, 30 мин). Контрольные образцы подготовлены аналогично, но с заменой лизоцима на неионные, катионные и анионные среды: Triton, цетилтриметиламмоний бромид, додецилбензолсульфонат натрия соответственно. На основе данных, полученных при измерении заряда поверхности (электрокинетического потенциала, ζ-потенциала) образцов, авторы делают вывод о том, что лизоцим способствует увеличению стабильности суспензии в области pH 7-12. В области pH 2-7 значения ζ-потенциала во всех образцах близки и отличаются в пределах статистической погрешности. Анализ образцов восстановленного оксида графена проводится с помощью: спектроскопических методов УФ-спектроскопия, СКР, РФЭС, микроскопических методов: ПЭМ, АСМ.

Гуманин – митохондриальный пептид, состоящий из 24 аминокислотных остатков (молекулярная масса пептида 2656 Да). Гуманин рассматривается как нетоксичный восстановитель ОГ [61]. К суспензии оксида графена (1 г/л) вносят водный раствор гуманина (2 г/л), обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, выдерживают смесь при 40 °С (1 ч) с последующим охлаждением до комнатной температуры и повторной ультразвуковой обработкой в течение 10 минут. В результате образуется гомогенная суспензия черного цвета. Структурные и морфологические методы анализа показали снижение доли функциональных групп, свойственных ОГ. Модификация поверхности восстановленного оксида графена делает его седиментативно устойчивым в водной среде. Продукты реакции и исходные материалы охарактеризованы с помощью: ТГА, АСМ, СКР, СЭМ, ИК-Фурье спектроскопии, РФА. Размер частиц определяли методом динамического рассеяния света (DLS) и СЭМ, среднее значение которых составило 8 мкм исходного ОГ и 10 мкм ОГ_{восст.}. Согласно данным комбинационного рассеяния изменяется отношение значений интенсивностей пиков области D ($1350 \pm 8 \text{ см}^{-1}$) и G ($1580 \pm 8 \text{ см}^{-1}$) с $I_D/I_G < 1.0$ для исходного оксида графена на $I_D/I_G > 1.0$ для восстановленного образца. Так же следует отметить, что пик в области 2750 см^{-1} , отвечающий за наличие дефектов структуры (2D-область) в ходе восстановления уширяется. Для оценки удельной электрической проводимости ОГ_{восст.} ($105 \pm 8.0 \text{ См/м}$), синтезированного в работе, авторы представляют данные по проводимости исходного оксида графена ($0.05 \pm 0.01 \text{ См/м}$) и образца, восстановленного гидразином (200 См/м) [71]. На основе экспериментальных данных исследования учёными делается вывод об успешности данной методики.

Также в качестве возможного химического восстановителя оксида графена предложен **L-глутатион** (N-(N-L-гамма-Глутамил-L-цистеинил)глицин) – трипептид, антиоксидант, который не является незаменимым веществом в живых организмах [62]. К суспензии ОГ (0.1 г/л) вносят водный раствор L-глутатиона (2 г/л), обрабатывают ультразвуком в течение 1 часа, затем выдерживают при 50 °С (6 ч) с последующим остыванием суспензии до комнатной температуры и повторной обработкой ультразвуком (1 ч). Суспензия изменила цвет со светло-коричневого до тёмного, предложены схемы механизмов восстановления. Анализ образцов проводился с помощью: ИК-Фурье, РФЭС, РФА, ТГА, ПЭМ, АСМ.

1.1.2. Инструментальные методы анализа как подход к исследованию структур

Всесторонний анализ материалов является основой любого исследования по разработке новых (или усовершенствования имеющихся) методов их синтеза. Невозможно представить научную работу без приведённых современных аналитических подходов. Отметим, что верная интерпретация экспериментальных данных определяет состоятельность абсолютно каждого исследования.

В главе рассмотрены аналитические методы, применяемые в описании структур оксида графена и его восстановленной формы.

Основные методы, предлагаемые в рамках работы являются: рентгеновская фотоэлектронная, Рамановская (спектроскопия комбинационного рассеяния), инфракрасная, оптическая спектроскопия; рентгенодифракционный, термогравиметрический анализ; электрофоретическое рассеяние света.

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Применительно к исследованию графеноподобных структур (ОГ, ОГ_{восст.}) является подтверждающим методом анализа. Спектры показывают интенсивность испускаемых фотоэлектронов различных элементов анализируемого образца. По соотношению интенсивности атомов углерода (область энергии фотоэлектронов 250-300 эВ) к кислороду (500-550 эВ) в исходном оксиде графена и восстановленном оксиде графена даётся характеристика синтезируемого материала. Логично, что в процессе восстановления удаляются кислородсодержащие функциональные группы, следственно доля атомов углерода в соотношении С/О будет увеличиваться в препарате восстановленного оксида графена. Опираясь на результаты полученные в работе [72], доля атомов углерода в исходном ОГ составляет 0.46 против 2.14 в восстановленном образце. Максимум пика в области энергии фотоэлектронов 284.6 ± 0.1 эВ соответствует фазе углерода в sp^2 -гибризованном состоянии. Пик в области 286.7 эВ относится к гидроксильной группе, 289.4 эВ карбоксильной группе, 287.1 эВ эпоксидной группе. Для ОГ_{восст.} интенсивность в областях 286.7 и 289.4 снижается с уширением пиков, а отсутствие сигналов при 287.1 эВ свидетельствует о полной конверсии эпоксидных групп.

Другой подход интерпретации результатов и оценки содержания атомов

элементов в исследуемых образцах приведён в работе [73]. Авторы предлагают определять атомное содержание по анализу площади спектров соответствующих элементов после вычитания неупругого фона с использованием коэффициента чувствительности, предполагающее однородное распределение. Для установления содержания поверхностных функциональных групп экспериментальные данные анализа аппроксимированы функциями Гаусса (метод GL30) согласно их значениям по энергиям связи фотоэлектронов. Во всех расчетах применяется программа XPS Peak Fit. Кислородсодержащие функциональные группы смещены относительно углерода в sp^2 -гибридизованном состоянии (284.5 эВ) в пределах: 0.7-1.0 (sp^3 -гибридизованный углерод), 1.3-2.4 эВ (-ОН-группы), 2.6-3.5 эВ (-C=O), 4.3-5.4 эВ (-COOH). Значения энергии связывания фотоэлектронов для групп с одинарной (C-O) и двойной (C=O) связью напрямую зависят от метода синтеза оксида графена и термической обработки в процессе его восстановления.

Спектроскопия комбинационного рассеяния

(Рамановская спектроскопия)

Рамановский спектр графена хорошо изучен. Он состоит из трёх характерных пиков, а именно D-мода, отвечающий за наличие структурных дефектов (sp^3 -гибридизованный углерод), G-мода (sp^2 -гибридизованный углерод) и G' (или 2D). Существует еще ряд других пиков меньшей интенсивности (D', D+G, D+D', G+D', 2D' и пр.), наличие или отсутствие которых, их формы, положения и отношения интенсивностей дают информацию о структуре графенового листа. Описание оксида графена методом Рамановской спектроскопии осложнено неоднородностью экспериментальных данных анализа (одинаковые интенсивности D и G пиков, отсутствие 2D или сильное уширение пика с низкой интенсивностью), обусловленных в том числе и энергией лазера в процессе исследования образцов. В целом спектры ОГ сильно отличаются от графена, но до сих пор нет единой системы оценки методов анализа результатов [74].

При анализе спектров **комбинационного рассеяния света** на примере образцов исходного оксида графена и его восстановленного гуманином аналога, применяют когерентное лазерное излучение (532 нм) мощностью <1 мВт [61]. Для оксида графена максимумы в области D-моды, G-моды и 2D расположены в

областях 1338 см^{-1} , 1571 см^{-1} и 2750 см^{-1} соответственно. В процессе восстановления происходит не только уширение пика 2D моды, но и увеличение отношения интенсивностей D (1342 см^{-1}) / G (1591 см^{-1}) со смещением максимумов в область уменьшения волнового числа, что указывает на рост структурных дефектов и неполную рекуперацию структуры графена.

В работе [55] восстанавливали ОГ боргидридом натрия. Образцы исследовались с помощью Рамановской спектроскопии. Авторы отмечают рост I_D/I_G в образцах $OГ_{\text{восст.}}$ с 0.94 до 1.53. Примечательно, что область моды 2D не приведена, хотя интенсивность и форма пика также должны изменяться.

Комбинированный подход, который включает экспериментальные данные о спектральных изменениях и теоретические расчеты полос комбинационного рассеяния (с целью определения связи между интенсивностью D^* моды к G моде при сравнении степени дефектов структуры $OГ_{\text{восст.}}$) рассмотрен в [75]. D-область характеризует наличие дефектов структуры. Ссылаясь на работу [76], авторы предлагают оценивать степень дефектности восстановленного оксида графена по возможному скрытому пику D^* моды с максимумом в области 1150 см^{-1} . Происхождение данного пика было постулировано через теорию возмущения функционала плотности на основе квантово-химических расчетов. D^* мода в оксиде графена имеет меньшее значение интенсивности по сравнению с его восстановленным типом и по соотношению их значений возможно определение степени дефектности.

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

При исследовании таких структур как оксид графена, восстановленный оксид графена, **инфракрасная спектроскопия** применяется для определения функциональных групп материалов. Для оксида графена характеристические пики связей C-O находятся в областях: $1230\text{-}1215\text{ см}^{-1}$, $1120\text{-}1110\text{ см}^{-1}$ (эпокси-группы); 1160 см^{-1} , 1415 см^{-1} (карбонильные или карбоксильные группы); $1080\text{-}1040\text{ см}^{-1}$ (алкокси или эпокси-группы), указывающих на то, что в ходе окисления графита была разрушена π -орбитальная система и кислородсодержащие группы внедрены в кристаллическую решетку. Наличие карбоксильных групп на поверхности графенового листа подтверждается модой колебаний карбонильной группы в 1740-

1720 cm^{-1} . С увеличением степени окисления поверхности графенового листа увеличивается интенсивность пика C=O с параллельным снижением интенсивности O-O (OH-OH или O-O-C связи). Гидроксильные группы определяются в диапазоне 4000-3000 cm^{-1} . Присутствие полосы спектра в области 3450 cm^{-1} может свидетельствовать о наличии фазы адсорбированной воды. Сигнал неокисленных атомов углерода (алкеновая C=C связь) определяется в области 1640-1620 cm^{-1} . Ароматическая связь C=C определяется в области 1420 cm^{-1} .

В процессе восстановления ОГ до структуры, близкой структуре графена, интенсивности пиков функциональных групп (C=O, O-O и N-H) уменьшаются до почти полного исчезновения. Появление сигнала в области 1585-1565 cm^{-1} характеризует образование ароматических групп C=C. В случае химического восстановления увеличивается интенсивность пиков в области 2950-2850 cm^{-1} , относящиеся к валентному колебанию C-H связей [77,78].

Приведены спектры исходного и восстановленного (физическим и химическим методами) оксида графена [53]. Гидроксильные группы образца термически восстановленного оксида графена (область 3700 cm^{-1}) практически полностью удалены, а полосы поглощения, соответствующие C-O (1275 cm^{-1}) и C=O (1770 cm^{-1}) показали лишь частичное удаление. Путём нуклеофильных атак гидразина на гидроксил, в процессе химического восстановления образца, отмечается исчезновение полос поглощения в области 3700 cm^{-1} . В тоже время появляются две полосы при 2899 cm^{-1} и 3000 cm^{-1} соответственно, что позволяет предположить образование новых N-H групп.

Спектроскопия в видимом (ультрафиолетовом) диапазоне

По изменению положения максимумов спектров поглощения исследуемых образцов в видимой (ультрафиолетовой) области длин волн возможно определить эффективность методов синтеза оксида графена и его восстановления. Продолжительность и температура синтеза, концентрация окислителей являются определяющими факторами при получении оксида графена. Влияние различных условий проведения реакции на степень окисления ОГ исследовали с помощью спектроскопии УФ-диапазона [79]. Авторы применили модифицированный метод Хаммерса, варьируя концентрацию перманганата калия от 29.5 до 44.4 г/л,

температуру реакционной смеси от 40 до 50 °С, время выдержки от 8 до 14 часов. Химическое восстановление провели аскорбиновой кислотой. Спектры поглощения образцов ОГ и ОГ_{восст.} получены при длинах волн от 200 до 800 нм. Максимум пиков поглощения образцов оксида графена лежит в диапазоне длин волн 228 ± 2 нм. При более высокой степени окисления отмечается более высокая интенсивность спектров поглощения. Успешное восстановление оксида графена также было подтверждено данными по оптическому поглощению света, проходящего через суспензии образцов. Для ОГ_{восст.} максимум пика сдвигается в область 262 нм, что указывает на то, что внутри графеновых листов электронное сопряжение восстановлено (т.к. после восстановления формируется область с увеличенной концентрацией электронов, что подтверждается измерениями электропроводности материалов).

Рентгеноструктурный (дифракционный) анализ

Как один из методов анализа фаз оксида (и восстановленного оксида) графена рассмотрен в [73,80,81]. Изучение морфологии нано структурированных материалов важно и представляет высокую значимость для современного исследователя.

Графит имеет два характерных пика при $2\theta = 26^\circ$ (d 0.34 нм) и $2\theta = 55^\circ$ (d 0.17 нм). Эти пики в результате окисления сдвигаются в область меньших углов, причём возможно образование новых сигналов. Под действием ультразвука модифицировали поверхность восстановленного оксида графена сульфированными фенильными радикалами и получили спектр, который ранее не приводился в литературе для этого типа материала [82]. В другой работе образцы исходного ОГ и ОГ_{восст.} проанализированы РФА под углом 2θ в диапазоне ($5-70^\circ$), длиной волн 1.5406 Å при 40 кВ и 30 мА [81]. Все образцы были помещены на держателе из аморфного кремния. Синтез ОГ осуществили по методу Хаммерса. При рентгеноструктурном анализе фиксируется характеристический максимум при $9.5 \pm 0.5^\circ$, что подтверждает эффективность реакции окисления, в ходе которой возрастает межплоскостное расстояние между графеновыми листами. Согласно данным РФА еще определяются пики: $2\theta = 14^\circ$ (d 0.63 нм), $2\theta = 17^\circ$ (d 0.52 нм), $2\theta = 19^\circ$ (d 0.48 нм) и один слабый сигнал в области $2\theta = 26^\circ$ (d 0.34 нм).

После восстановления оксида графена с помощью термического или

химического методов обнаружено, что сигнал 10° исчез, в то время как на дифрактограмме остались сигналы при 14° , 17° , 20° . Этот факт указывает на частичное удаление кислородных функциональных групп и подтверждается данными анализа ИК-Фурье спектроскопии. Предполагается, что наличие сигнала в области 26° говорит о присутствии фазы графена.

Термогравиметрический анализ

Определение термической стабильности исследуемых материалов возможно с использованием **термогравиметрического метода**. По кинетике изменения массы образца делается вывод о возможных механизмах фазовых переходов и образование новых соединений в процессе конверсии при изменении температуры исследуемого материала. Данный аналитический метод нашёл широкое применение в области катализа [83,84], синтеза перспективных соединений класса координационных полимеров [85–87] и графеноподобных структур [23,53,88].

Подробное описание фазовых переходов образцов исходного ОГ и его восстановленного аналога с использованием термогравиметрического анализа приводится в работе [53]. Экспериментальные данные ТГА получены при температуре от 30 до 1000 °C со скоростью нагрева 10 °C/мин в атмосфере кислород (21% об) – азот (79% об). Отмечается три основные области фазовых переходов оксида графена: 30-200 °C; 200-475 °C; 475-1000 °C. При нагреве до 200 °C потеря массы составляет 21%, здесь происходит десорбция воды, адсорбированной на поверхности ОГ. Снижение массы протекает по линейной зависимости до температуры в 180 °C; 180-200 °C функция имеет вид кривой с последующей линейной зависимостью до 230 °C. В диапазоне температур 200-475 °C протекает удаление наиболее стабильных кислородсодержащих функциональных групп (масса ОГ 51% от исходной). Дальнейшее повышение температуры до 550 °C приводит к росту структурных дефектов графенового листа с образованием моно- и диоксида углерода (остаточная масса образца 19% от исходной). Нагрев до 1000 °C не способствует каким-либо изменениям.

Нагревание химически восстановленного оксида графена до 200 °C приводит к снижению массы образца на 2%, что рассматривается как удаление остаточных наиболее лабильных кислородных групп. Дальнейшее повышение температуры до

550 °C приводит к снижению массы образца по линейной зависимости и обосновывается наличием в структуре sp^3 гибризованного углерода. По данным ИК-спектроскопии подтверждают изменения состава поверхностных групп.

Электрофоретическое рассеяние света

Седиментационная устойчивость суспензий может быть охарактеризована с помощью **электрофоретического рассеяния света**. Частицы и молекулы, имеющие заряд поверхности, передвигаются к противоположному заряду электрода с определённой скоростью под действием электрического поля в объёме жидкой фазы растворителя. Такое передвижение способствует разрыву двойного электрического слоя на границе заряженной частицы со средой, формируя плоскость скольжения, лежащей между адсорбционными и диффузными слоями. Разность потенциалов, приложенных к этой плоскости, называется электрокинетическим (или ζ -дзета) потенциалом. Описание коллоидных состояний графеновых суспензий в зависимости от природы растворителя, pH среды, степени окисления (восстановления) ОГ, влияния модификации поверхности биополимерами - возможно настоящим методом. На примере работ [89–91] дана характеристика коллоидных состояний графеноподобных структур.

Влияние ионной силы раствора на коллоидное состояние образцов ОГ и $OГ_{восст.}$ рассмотрено также в работе [91]. Известно, что оксид графена хорошо диспергируется в воде из-за наличия кислородсодержащих функциональных групп, в частности карбоксильных, расположенных по краям графенового листа. Между этими группами происходят электростатическое отталкивание, что и объясняет возможность диспергируемости в полярных растворителях. При добавлении соли (хлорида натрия, например), в которой катион одновалентен, специфических взаимодействий с функциональными группами поверхности ОГ не наблюдается. В тоже время наличие двухвалентных солей (хлорида магния, например) может привести к процессу «сшивки» листов оксида графена. Дзета-потенциал образцов суспензии ОГ и $OГ_{восст.}$ в деионизированной воде (4 мг/л) измерен при 25 °C. С увеличением концентрации водного раствора хлорида натрия с 0 до 100 мМ отмечается синхронное снижение седиментативной устойчивости как ОГ (с -35 до -15 мВ), так и $OГ_{восст.}$ (с -30 до -15 мВ) и выходит на плато, не изменяясь с ростом

концентрации соли. Как и ожидалось, при контакте водного раствора хлорида магния с ОГ и ОГ_{восст.} устойчивость суспензий резко снизилась в области концентраций MgCl₂ от 0 до 60 мМ и составила с -35 до -3 мВ (для ОГ) и с -30 до +2 мВ (для ОГ_{восст.}). Дальнейшее увеличение ионной силы раствора не влияет на значения ζ-потенциала графеновых структур.

1.1.3. Адсорбционный подход в модифицировании структур биополимерами

Обеспечение биосовместимости углеродных наноматериалов представляет интерес для исследований современной медицины. В работах рассмотрены такие возможные сферы применения биополимеров, как: биосенсоры [92,93], адресная доставка лекарств [18,94,95], материалы с антибактериальными свойствами [96], стабилизация и контроль роста наночастиц [97–102].

Хитин- один из самых распространённых в природе полисахаридов, основной компонент структуры панцирей ракообразных, моллюсков, экзоскелета насекомых. С химической точки зрения представляет собой линейный полисахарид, состоящий из β-1,4-N-ацетилглюкозамина, неспособный к растворению в обычных полярных растворителях из-за высокой кристалличности структуры, обусловленной множеством водородных связей между гидроксильными и карбоксильными группами. Поэтому хитин находит ограниченное практическое применение в исходном виде. При деацетилировании хитина синтезируется хитозан, образованный из глюкозаминовых и N-ацетилглюкозаминовых фрагментов [103].

Хитозан обладает не только лучшей растворимостью и биосовместимостью, чем хитин, но и антиоксидантным, иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами. Адсорбционная модификация графеноподобных материалов хитозаном рассматривается в некоторых публикациях [104–108].

Хитозан (степень деацетилирования >92%, средняя молекулярная масса 580000 г/моль) применяют для модификации поверхности оксида графена [108]. При комнатной температуре получили 2% раствор хитозана, растворив его в водном растворе уксусной кислоты, перемешивая в течение 2 ч. Суспензия ОГ также в 2% растворе кислоты прикапывается к ранее приготовленному водно-уксуснокислому раствору хитозана в таком количестве, что массовое соотношение хитозан/водный

раствор уксусной кислоты в реакционной смеси составляло порядка 1%. Массовое соотношение хитозан/ОГ варьируется в пределах (0.3-1.0) : 1.0 соответственно. На последней стадии плёнки композитного материала высушены под вакуумом (60 °С, 24 ч). Контрольные образцы представляли собой хитозан без фазы ОГ. Для исследования структур композитов были применены следующие аналитические методы: СЭМ, ИК-Фурье, ТГА.

Исследовано влияние степени окисления ОГ на структуру и физические свойства его композита с хитозаном [106]. Как было сказано ранее, степень окисления графена зависит от ряда условий: от концентрации окислителя, времени и температуры синтеза. Твёрдую фазу хитозана (степень деацетилирования 85%) растворили в 1.5%об водном растворе уксусной кислоты до концентрации 1.5% масс/мл, перемешивая (50 °С, 2 ч). К полученному раствору прикапывали водную суспензию ОГ, ввели в реакционную смесь глицерин (роль пластификатора) и перемешивали 30 мин. Для всех образцов массовая доля ОГ и глицерина относительно массы хитозана составляла 0.5% и 20.0%масс соответственно. Контрольные образцы представлены в виде плёнок без ОГ и с фазой графита. Из основных выводов следует отметить, что с увеличением доли кислородсодержащих функциональных групп на поверхности оксида графена, увеличиваются более чем в три раза механическая прочность на растяжение, модуль Юнга, прочность на разрыв композитной пленки. Все образцы проанализированы: Рамановской спектроскопией, СЭМ, ИК-Фурье.

Рассмотрены методы модифицирования поверхности ОГ и ОГ_{восст.} белком **ЛИЗОЦИМОМ** в литературном обзоре [109] и статьях [60,110,111].

Во всех экспериментах адсорбция белка проводится из его водного раствора. Оксид графена (или ОГ_{восст.}) массой 200 мкг выдерживается в 2 мл раствора лизоцима (0-2 г/л) в течение 24 ч при комнатной температуре [111]. Образцы центрифугируются (12000 rpm, 5 мин) и концентрация белка в надосадочной жидкости определяется по методу Бредфорда в диапазоне длин волн 240-310 нм. В области концентраций белка (0-2 г/л) наблюдается линейный рост адсорбции. Следует отметить, что адсорбционная ёмкость ОГ была выше его восстановленного аналога и составила порядка 0.48 г лизоцима / г адсорбента.

Водная суспензия ОГ (и других графеноподобных материалов) объёмом 0.125 мл (0.5 г/л) вносится к раствору лизоцима, добавляется деионизированная вода в таком количестве, что концентрация белка в каждом образце составляет от 0 до 1.0 г/л [110]. Образец-сравнения представляет собой раствор лизоцима без фазы графенового материала. Предварительные эксперименты показали, что для достижения адсорбционного равновесия достаточно трёх часов (25 ± 2 °С, перемешивание 200 об/мин). Образцы центрифугируются (15000 грм). Определение концентрации лизоцима в водной фазе проводили при 280 нм, адсорбцию рассчитывали по уравнению:

$$q_e = (C_i - C_e) V/m \quad (1)$$

где q_e – равновесная адсорбция (мг белка / г адсорбента), C_i и C_e – исходная и равновесная концентрация белка, m – масса адсорбента (г).

Для лучшего объяснения адсорбции белка на наноматериалах приводятся модели Ленгмюра, Фрейндлиха и Темкина:

Модель Ленгмюра применяется для описания мономолекулярной адсорбции:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_L q_m C_e} \quad (2)$$

где q_m – максимум равновесной адсорбции (мг белка / г адсорбента), K_L – константа Ленгмюра.

Модель Фрейндлиха учитывает неоднородность поверхности адсорбента, применяется для описания области средних концентраций адсорбата:

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (3)$$

где K_F – константа Фрейндлиха, n – индекс линейной области.

Модель Темкина применима для описания адсорбционных экспериментов в области высоких концентраций адсорбата, учитывает как образование плотного монослоя, так и объемные конденсированные состояния:

$$q_e = K_T \ln C_e + K_T \ln f \quad (4)$$

где K_T – константа Темкина.

Модель Ленгмюра предполагает наличие только монослоя адсорбата на

поверхности адсорбента и является простейшей моделью описания процесса адсорбции. В то время как модель Фрейндлиха эмпирическая, применяемая в исследованиях адсорбции, а Темкина учитывает электростатические взаимодействия между заряженными поверхностями белка и адсорбента [112,113].

В выводах авторы отмечают, что в области равновесных концентраций лизоцима (0-0.6 г/л) максимальная адсорбция ОГ составляет ≥ 0.5 г/г (для образцов графена и одностенных углеродных нанотрубок она не превышает 0.85 г/г), что объясняется электростатическим взаимодействием белка с гидроксильной и карбоксильной функциональными группами, расположенными на поверхности оксида графена. pH среды значительно не влияет на адсорбцию белка на всех образцах, однако присутствие одновалентных и двухвалентных катионов в среде существенно изменяет адсорбцию белка на графене и углеродных нанотрубок, что подтверждается данными по измерению ζ -потенциала.

Модификация оксида графена и его восстановленного аналога белком **бычьим сывороточным альбумином** предложена в следующих публикациях [59,114–116].

Проводят адсорбцию БСА на ОГ из водного раствора белка [114,115]. Для определения кинетики адсорбции при постоянном перемешивании к 50 мг исходного оксида графена вносят 50 мл водного раствора белка (0.8 г/л). Через равные промежутки времени (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 мин) отбираются одинаковые аликвоты и отделение твёрдой фазы от надосадочной жидкости проводят через стекловолоконные фильтры (0.22 мкм). Концентрацию белка измеряют при 280 нм. Каждый спектр получен по среднему значению трёх независимых измерений при комнатной температуре. Диапазон концентраций белка калибровочного графика составляет 0-4.0 г/л. Кинетика адсорбции соответствует кинетической модели псевдо-второго порядка и представляет собой быстрый процесс, согласующийся с моделью, представленной в работе [117]. По экспериментальным и расчетным данным установлено, что образование новых водородных связей, гидрофобные и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия вносят вклад в адсорбцию БСА на поверхности ОГ.

Для модификации поверхности восстановленного оксида графена предложена предварительная обработка водного раствора БСА алкалоидом природного

происхождения – нитидина хлорид (NC) $C_{21}H_{18}ClNO_4$ [116]. Лиофилизированный БСА массой 26.4 мг растворяют в 39.6 мл 10% этанола. 250 мкл 10%водно-спиртового раствора NC (1.5 г/л) вносят в 20 мл БСА (0.67 г/л), перемешивают. Полученную смесь вводят к 61.2 мл 10%водно-спиртовой суспензии ОГ (0.25 г/л), обрабатывают ультразвуком (15 мин, 4 °С) с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 5 ч. Центрифугируют, трижды промывая осадок 10% этанолом, высушивают под вакуумом (40 °С) и продукт хранят при 4 °С. Данные анализов синтезируемых структур получены с помощью: СЭМ, Рамановской спектроскопии, УФ-спектроскопии.

1.1.4. Углеродные нанотрубки

Открытие таких устойчивых наноразмерных sp^2 -гибридизованных модификаций углерода как фуллерены, графен, углеродные нанотрубки (УНТ) вызвал интерес в области материаловедения. Большинство физических свойств УНТ обусловлены схожестью их строения с графеном. Идеальная форма УНТ представляет собой цилиндр из свернутого листа графена, причём существуют как одностенные (образованы из одного слоя графена), так и многостенные (слои графенового листа упакованы по принципу «матрёшки») углеродные нанотрубки. Различают полые и закрытые с одной или двух сторон нанотрубки. Размеры внутреннего диаметра, моно- полислоиность таких структур, связаны прежде всего с методами и условиями их синтеза [118].

Первый успешный синтез углеродных нанотрубок был предложен японским ученым Сумио Иидзума [119]. Ученый применил метод электродугового испарения графита в среде аргона (при давлении 100 торр) и обнаружил, что на конце углеродного электрода (катода) образуются нитеподобные структуры. По данным просвечивающей электронной микроскопии определены диаметры внутренних полостей новых углеродных наноструктур, которые варьировались от 2.2 до 6.7 нм в зависимости от количества графеновых слоёв синтезируемого материала.

Чем же интересны свойства углеродных нанотрубок, каковы возможности их прикладного применения? Эти вопросы я бы хотел рассмотреть в дальнейшем, а пока стоит уделить внимание на отличие многостенных (МУНТ), от одностенных (ОУНТ) углеродных нанотрубок.

Углерод способен образовывать различные химические связи, создавая структуры с совершенно разными свойствами. Как было сказано ранее, sp^2 -гибридизованные структуры имеют вид слоистой формы со слабым Ван-дер-Ваальсовым взаимодействием на их границе и сильными С-С связями в самой структуре. **Многостенные** углеродные нанотрубки состоят от двух до нескольких десятков графеновых листов, свёрнутых в концентрические цилиндрические формы с определенным межслоевым расстоянием и измеряются в пределах от 0.34 до 0.39 нм [120]. В зависимости от числа графеновых слоёв внутренний диаметр МУНТ лежит в пределах от 0.4 до нескольких нанометров, в то время как внешний от 2.0 до

30 нм. Оба конца трубок обычно закрыты фуллереноподобной молекулой, имеющей вид купола.

Одностенные углеродные нанотрубки образованы из одного слоя графенового листа, внутренний диаметр которых варьируется от 0.4 до 3 нм, а длина трубок обычно лежит в микрометровом диапазоне. Одной из особенностей данного типа материала является способность образовывать конгломераты, трудно поддающихся механическому разделению без специальных инструментальных методов. Кристаллическая решетка представляет собой гексагонально-организованную систему атомов [121].

На настоящий момент рассматриваются следующие возможные области применения УНТ: новые конструкционные материалы повышенной прочности, медицина (искусственные импланты, диагностика раковых клеток, носители лекарственных средств) [14,15,122], электроника [123].

Методы синтеза углеродных нанотрубок

Электродуговой плазменный синтез углеродных нанотрубок приведён в работе [118]. Два графитовых стержня (чистота 99.99% масс.) диаметром 15 мм используются в качестве электродов, в каждом из которых просверлены отверстия диаметром 7 мм на глубине 80 мм, заполненные смесью порошков кобальта (10% масс.) и графита. Для обеспечения устойчивого дугового разряда и образования стабильной плазмы система находится в инертной среде гелия (140 торр), на электроды подаётся напряжение 20-30 В при силе тока 700 А. В процессе зажигания дуги на стенках камеры формируется сажа, которую обрабатывают *o*-ксилолом для извлечения фазы фуллерена с последующим прокаливанием (500-600 °С, 0.5 ч) для удаления аморфного углерода. Для растворения оксида и карбида кобальта сажу обрабатывают раствором азотной кислоты. Промывание продукта водой до нейтральной среды и последующая ультразвуковая обработка суспензии в этаноле – заключительный этап синтеза.

Согласно данным ПЭМ авторы отмечают образование различных форм УНТ, преимущественно многостенных с закрытыми концами фуллереноподобной структуры. При проведении эксперимента в данных условиях без добавки порошка кобальта не наблюдается образование нанотрубок. Делается вывод о его роли как

каталитической фазы, обеспечивающей рост УНТ.

Каталитическая конверсия метана, монооксида углерода, масла кокоса, бензола, этанола рассмотрены в работах [124–128].

Каталитический пиролиз метана на активных центрах железного катализатора нанесенного типа предлагают авторы [124]. Двухэтапный метод синтеза катализатора заключается в предварительном получении структуры типа Fe@C с последующей её агрегации на носителе Al₂O₃. На первой стадии смесь водных растворов декстрозы (D-глюкозы) и Fe(NO₃)₃·9H₂O греют с обратным холодильником (180 °C, 3 ч) и твёрдую фазу отделяют от раствора на центрифуге (2000 rpm), сушат при 110 °C. На заключительной стадии Fe@C агрегирует с оксидом алюминия, полученным по золь-гель процессу. Пиролиз метана на катализаторе проводят в кварцевом реакторе с неподвижным слоем при пропускании метана (5% об., объемный расхода метана 200 мл/мин) на газе-носителе азоте при температуре 700 °C. Синтезируемые структуры исследованы с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния, ПЭМ, СЭМ, термогравиметрического анализа. Из основных выводов стоит отметить высокую степень конверсии метана (>97% масс.) с образованием фазы углеродных нанотрубок (135 мг_{УНТ} / Г_{кат.}). Настоящий метод применим для синтеза многостенных УНТ.

Конверсия **монооксида углерода** на кобальтовом катализаторе может быть рассмотрена как метод синтеза одностенных УНТ [125]. В водный раствор CoSO₄·7H₂O при постоянном перемешивании вносят твердую фазу SiO₂, суспензия подвергается состариванию (25 °C, 1 ч) с последующей сушкой в вакуумной печи (100 °C, 2 ч). Далее высушенная смесь измельчается и прокаливается в муфельной печи при 400 °C (скорость нагрева 1 °C/мин, выдержка 1 ч). Полученный катализатор массой 100 мг помещают в кварцевый реактор, активируют потоком чистого водорода (1 бар, чистота 99.99% масс.) при нагреве от комнатной температуры до 540 °C (скорость нагрева 20 °C/мин). При достижении заданной температуры в реакционную систему подаётся аргон той же степени чистоты, и ведётся нагрев до 780 °C с последующей заменой на поток монооксида углерода (6 бар, чистота 99.9% масс., объемный расход 200 см³/час). Для анализа синтезируемых структур авторы приводят данные по фотолюминесцентной, оптической и спектроскопии

комбинационного рассеяния; ПЭМ; ТГА.

Опираясь на экспериментальные данные анализа синтезируемых структур, предложен следующий механизм формирования УНТ. На катализаторах с массовой долей кобальта менее 5% химическое восстановление сульфата кобальта до фазы Co_9S_8 (средний размер частиц ~ 2 нм) приводит к наиболее равномерному распределению последнего на поверхности оксида кремния. В процессе формирования УНТ значительная доля частиц Co_9S_8 под действием монооксида углерода восстанавливаются до металлического каталитически активного кобальта (~ 1.2 нм). Невосстановленный Co_9S_8 способствует стабилизации металлической фазы, на поверхности которой происходит селективный рост одностенных УНТ.

Напротив, с увеличением массовой доли кобальта в реакционной смеси ($>5\%$) наблюдается формирование более крупных агрегатов, которые приводят к увеличению доли многостенных УНТ. Таким образом, авторы предлагают оптимальное количество кобальта в реакционной смеси порядка 3% масс.

Каталитический пиролиз **кокосового масла** для синтеза УНТ также рассмотрен [126]. В минимальном количестве воды растворяют $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ и мочевины в массовом соотношении 1:3 соответственно. Водные растворы смешивают и выдерживают в сушильном шкафу (98°C , 80 мин) с последующим прокаливанием осадка в муфельной печи (500°C) до полного выгорания мочевины. Образованный оксид железа (III) восстанавливают потоком водорода (600°C , 2 ч). В кварцевые реакторы горизонтального типа, соединенные между собой, помещают образец катализатора (0.5 г) и кварцевую лодочку с образцом кокосового масла (20 г). В качестве инертной атмосферы и газа-носителя для паров кокосового масла применяют азот (100 мл/мин), пропуская поток через реакционную систему. Образец масла нагревают до температуры кипения (305°C), а катализатор при 850°C и выдерживают температуру в течение 60 минут.

Морфологию и размер частиц определяют микроскопическими методами (СЭМ, ПЭМ). На основе экспериментальных данных о размерах частиц УНТ авторы работы отмечают образование многостенных углеродных нанотрубок. Доступность возобновляемого природного материала и аппаратного оформления, масштабируемость процесса и его экологичность делают данный метод синтеза

перспективным.

Метод каталитического синтеза с бис-η⁵-циклопентадиенилжелезом(II) (ферроцен), в качестве катализатора синтеза УНТ с использованием **бензола** в качестве сырья рассмотрено в работе [127]. Температуру нагрева катализатора варьируют от 150 до 570 °С. Для этого в кварцевый реактор горизонтальной геометрии помещают три керамические лодочки с образцом катализатора (по 0.2 г в каждой). Предварительно активируют катализатор, пропуская поток водорода (300 мл/мин) при нагреве до 570 °С через реакционную зону. Приток аргона (200 мл/мин) создаёт инертную среду и обеспечивает очистку стенок реактора от продуктов каталитического пиролиза бензола. Оценку морфологии и размера синтезируемых УНТ проводят с использованием СЭМ и ПЭМ соответственно. По данным ТГА сформулированы выводы о чистоте углеродных наноматериалов. Уделено особое внимание зависимости температуры активации катализатора от свойств синтезируемых УНТ. Образование продукта происходит при температурах порядка 400 °С, причём с ростом температуры наблюдается тенденция к увеличению длины нанотрубок. Опираясь на экспериментальные данные анализа ПЭМ внешний диаметр УНТ составляет 23±0.16 нм, стенки трубок образованы из множества графеновых слоёв, что в свою очередь позволяет сделать вывод о применимости настоящей методики для синтеза многостенных УНТ.

Рассмотрено каталитическое разложение **этанола** с ферроценом в пламени водородной горелки для синтеза одностенных углеродных нанотрубок [128]. Источником углеродного сырья и катализатора выбрана смесь этанола и ферроцена в массовом соотношении 99:1 соответственно. В поток аргона (0.1 л/мин), нагретого до 100 °С шприцевым насосом впрыскивается реакционная смесь (0.5 мл/мин) и после смешивания с газом подвергается выгоранию в пламени водородной горелки. Для визуализации фронта водородного пламени в систему вводят метан (0.4% об). Варьируя высоту распылителя относительно зоны выгорания локально формируют области, способствующие неполному окислению реакционной смеси. Синтезируемый продукт собирается в контейнере из нержавеющей стали с установленным мембранным фильтром (размер пор 0.45 мкм). Анализ продуктов реакции проведен с помощью РФА, Рамановской спектроскопии, электронной и

просвечивающей микроскопии, общелабораторных методов аналитического контроля.

Несомненным достоинством настоящей методики заключается в технологичности процесса и его масштабируемости, обеспечивающий непрерывный цикл синтеза углеродных наноматериалов.

1.1.5. О некоторых способах модифицирования углеродных нанотрубок

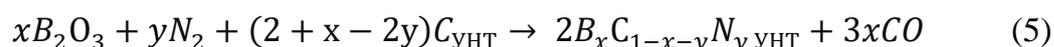
Получение материалов с заданными свойствами за счет изменения методики синтеза позволяет решать научные проблемы, которые определены меняющимися потребностями человека.

В настоящей главе рассмотрены методы модификации поверхности и структуры УНТ, оперируя различными инструментальными подходами лабораторного синтеза. Внедряя в кристаллическую решётку углеродных наноматериалов следовые количества таких атомов как: бор, азот, фосфор-происходят существенные изменения электрических и оптических свойств УНТ [129–132]. Действие водного раствора тетрахлоропалладат(II) калия на одностенные УНТ носит двойной эффект: формирование листов графена за счёт каталитического «разрезания» нанотрубок, и образование на их поверхности фазы металлического палладия [133]. Способы повышения биосовместимости углеродных наноматериалов приведены в работах [13,16,19,134–136].

Формирование устойчивых химических связей в кристаллической решетке УНТ между атомами углерода структуры и примесными атомами-модификаторами является частным случаем легирования и носит название «допирование». Образование структурных дефектов в таких соединениях способствует улучшению их электропроводности. Посредством нагревания (при 1503-1773 К) механической смеси порошков одностенных УНТ и B_2O_3 действием когерентного (лазерного) излучения неодимового лазера (Nd:YAG) в потоке азота (0.2 л/мин) в течение 30-240 минут [132] формируются допированные **бором и азотом** УНТ по следующим стадиям:

1) Оксид бора при 1773 К претерпевает фазовый переход из жидкого в газообразное состояние.

2) Поток азота способствует диффузии оксида бора через слой УНТ, тем самым протекает реакция замещения по реакции:



Очевидно, что настоящая реакция возможна до тех пор, пока происходит контакт между углеродным наноматериалом и парами оксида бора в токе азота. Увеличение внешнего диаметра УНТ (с 1.4 до 2.1-3.4 нм) в процессе легирования, может быть объяснено образованием дополнительных структурных дефектов поверхности близлежащих УНТ, которые компенсируют эти дефекты образованием новой оболочки большего диаметра, срачиваясь между собой.

Введение азота в структуру УНТ с использованием никелевой подложки также рассмотрено [130]. Источником углерода и азота выбран моноэтанолламин. Образец никелевой пластины отжигается (850-1000 °С) в потоке азота (1 л/мин) в течение 10 минут, затем в реакционную систему подают моноэтанолламин при нагреве до 120 °С в течение 20 минут. По окончании реакции реактор охлаждают газообразным азотом до комнатной температуры. Синтезируемые образцы УНТ исследовали с помощью микроскопических (АСМ, ПЭМ, СЭМ) и спектрометрического (РФЭС) методов. Особенностью синтеза является отсутствие катализатора в смеси с моноэтанолламином. Доля атомов азота в структуре УНТ составляет 2-2.5 % ат. Образцы представляют собой гофрированную структуру, напоминающую бамбук. Авторами делается вывод, что при увеличении температуры отжига никелевой пластины увеличивается средний диаметр УНТ, обусловленный ростом среднеквадратичной шероховатости металлической подложки.

Фосфор и азот, как легирующие атомы в структуре углеродных нанотрубок, рассмотрены в работе [131]. Первым этапом необходимо подобрать оптимальные условия роста УНТ. Исходным прекурсором УНТ и источником азота выбран бензиламин. Изменяя массовую долю трифенилфосфина (донор фосфора) в порядке 0, 2.5, 3.3%, варьируя температуру синтеза с 720 до 840 °С, объёмный расход аргона с 0.8 до 1.6 л/мин, оставляя неизменной долю катализатора-ферроцена (7.5%), осуществлён ряд синтезов и сформулированы выводы, основанные на данных анализа синтезируемых структур.

С увеличением содержания фосфора при заданной температуре синтеза, снижается выход целевого продукта. Синхронное снижение длины УНТ от 70 до 2 мкм связано с увеличением массовой доли трифенилфосфина в реакционной смеси с 0 до 3.3%. Синтезируемые образцы преимущественно состоят из высокоупорядоченных массивов многостенных углеродных нанотрубок с очень низким содержанием аморфного углерода, что подтверждается СЭМ. Таким образом, при необходимости синтезировать многостенные УНТ, допированные фосфором в условиях, аналогичных настоящей работе, авторами рекомендуется следующие режимы работы: температура синтеза не должна превышать 760 °С, доля трифенилфосфина $\leq 2.5\%$ масс., объёмный расход аргона с 0.8 л/мин.

Рассмотрен синтез графеноподобных структур за счет разрыва С-С связей одностенных УНТ в процессе спонтанного переноса электронов между углеродным субстратом и **неорганическим комплексом палладия** в водном растворе [133]. Одностенные УНТ способны к окислительно-восстановительным (ОВР) реакциям (потенциал +0.5В по водородному электроду) с ионами металлов, имеющие большее значения потенциала (для пары $\text{PdCl}_4^{2-}/\text{Pd}$ 0.599В), следственно, такая реакция была использована для безэлектродного осаждения наночастиц палладия с раскрытием трубок в структуру, аналогичной структуре графенового листа. Суспензию УНТ (2.5 мг) в 5 мл 1М азотной кислоты обрабатывают ультразвуком в течение 1 часа. После многократной промывки деионизированной водой УНТ отделяют от раствора кислоты на центрифуге. После процедуры очистки от примесей, суспензию УНТ в воде (0.1 г/г) объёмом 5 мл смешивают с 5мкМ водным раствором тетрахлорпалладата(II) калия. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 48 часов. Отделяют на центрифуге и высушивают под вакуумом.

По данным ПЭМ оценено изменение морфологии УНТ при взаимодействии с водным раствором комплексной соли палладия. Приведены данные по рентгеноструктурному, РФА, СКР, оптической спектроскопии, ИК-Фурье.

Адсорбционная модификация многостенных УНТ **аминокислотой L-фенилаланином** рассмотрена в работе [16]. Поверхность УНТ необходимо окислить, для этого 0.5 г углеродного субстрата вносят в охлажденную (0 °С) смесь

концентрированной 96% серной кислоты (12 мл) и нитрата натрия (0.25 г). Постепенно, при постоянном перемешивании, в реакционную смесь добавляют перманганат калия (1.5 г) так, чтобы температура не превышала 20 °С. После растворения перманганата калия, нагревают смесь до 35 °С и выдерживают в течение 30 минут, с последующим добавлением 25 мл воды и нагревом до 98 °С (выдержка 15 минут). По окончании реакции добавляют смесь 70 мл дистиллированной воды и 2 мл 30% H_2O_2 . Твердую фазу отделяют от раствора на фильтре, промывают водой и 10% раствором HCl , сушат при 60 °С. В суспензию окисленных УНТ в воде (0.1 г/10 мл) вносят 0.3 г аминокислоты и 10 мл водного раствора эквимольного NaOH . Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре (24 ч). По окончании синтеза твердую фазу отделяют на фильтре и промывают этанолом и водно-этанольным раствором. Для обеспечения большей дисперсности продукт можно обработать 5% раствором HCl .

Далее рассмотрим адсорбционную модификацию многостенных УНТ белками **бычьего сывороточного альбумина и лизоцимом** [16]. Особенностью данной работы заключается в применении УНТ с исходной модифицированной структурой. Авторы используют три типа многостенных УНТ, на поверхностях которых присутствуют гидроксильные, карбоксильные функциональные группы и графитизированные многостенные УНТ. Для адсорбции БСА к образцам углеродных адсорбентов массой каждого 20 ± 0.5 мг вносят 40 ± 0.3 мл водного раствора белка концентрации от 0 до 0.6 г/л. Адсорбция лизоцима: 3 ± 0.2 мг УНТ, 40 ± 0.3 мл водного раствора лизоцима (концентрация от 0 до 13 г/л). Все образцы встряхивают на лабораторном шейкере (25 °С, 150 rpm, 72 ч). Отделение твердой фазы от жидкой осуществляют на центрифуге (3000 rpm, 25 мин). Концентрацию белка в надосадочной жидкости определяют по методу Бредфорда на спектрофотометре при 595 нм. Дополнительными методами анализа синтезируемых образцов выбраны ПЭМ и ИК-спектроскопия.

Для описания процесса адсорбции применяют модели Ленгмюра: уравнение 6 – учитывает только обратимую адсорбцию по модели, аналогичной Ленгмюра, которая была применена при адсорбции БСА на поверхности титана при pH 8.0 и 9.0 [137]; уравнение 7 – учитывает и необратимую адсорбцию [138].

$$Q_e = \frac{Q_0 b C_e}{1 + b C_e} \quad (6)$$

Где Q_0 (мг/г) – максимальная адсорбционная ёмкость за счёт Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, Q_e (мг/г) – равновесная концентрация адсорбата, C_e (мг/л) – равновесная концентрация белка в растворе и b – адсорбционный коэффициент.

$$Q_e = \frac{Q_0 b C_e}{1 + b C_e} + Q_1 \quad (7)$$

Где Q_1 (мг/г) – необратимая адсорбция за счет образования химических связей между белком и адсорбентом.

На основании экспериментальных данных авторами работы отмечено, что как площадь, так и функциональный состав поверхности модифицированных УНТ влияют на адсорбцию белков; механизм адсорбции бычьего сывороточного альбумина на всех образцах УНТ имеет вид монослойной адсорбции, в то время как лизоцим образует много слоёв, взаимодействующих между собой, а не только с поверхностью УНТ, что подтверждает высокая адсорбционная способность последнего (81.8-90.7 г/г); в фосфатном буфере образцы, модифицированные БСА, обладали седиментативной устойчивостью, в отличие от модифицированных лизоцимом.

1.1.6. Инструментальные методы анализа углеродных нанотрубок

При исследовании УНТ применяют методы спектроскопического и дифракционного [78,139–146] анализа. Для наиболее полного описания исследуемых материалов также важны данные, полученные с помощью методов электронной микроскопии [123,147] и термогравиметрического анализа [148].

Рамановская спектроскопия углеродных нанотрубок

Спектроскопия комбинационного рассеяния является важным методом анализа углеродных наноструктур. По соотношению максимумов интенсивности полос в области D и G моды (~ 1350 и 1585 см^{-1} соответственно) позволяет определить степень дефектности углеродных нанотрубок. Согласно литературным источникам [139,149] необходимо учитывать также сигналы в областях 100 - 200 см^{-1} (уникальная мода, которая свойственна только УНТ, частота сигнала которой зависит от диаметра трубок) и ~ 2700 см^{-1} (G' мода (или 2D мода) свойственна

углеродным материалам, в кристаллической решетке которых атомы углерода образуют гексагональную форму).

Мощность лазера и природа подложки, на которую нанесен образец УНТ, влияют на смещение пиков комбинационного рассеяния [149]. Мощность лазера варьировалась от 0.5 до 10 мВт, образцы УНТ размещались на подложках из стекла, алюминия и без подложки в виде тонкой мишени наноуглеродной структуры. Отмечено, что с энергией лазерного излучения меньше или равной 2 мВт не наблюдаются смещения максимума пиков D, G и G' мод, однако с увеличением мощности максимумы переходят в область меньших значений волновых чисел. Определена роль природы подложки в смещении пиков. Если образец УНТ нанесен на предметное стекло, то с увеличением мощности лазера в диапазоне от 0.5 до 10 мВт смещения D моды не наблюдается при синхронном снижении значений волновых чисел G и G' моды. Для препарата УНТ, нанесенного на подложку из алюминия, при мощности лазера ≤ 2 мВт волновые числа полос D и G не изменяются, но с увеличением энергии также смещаются в область низких значений. G' мода смещается во всем диапазоне мощности лазера.

Экспериментальные данные подтверждают положение, описанное в рамках линейной термоупругости, в котором изменение волнового числа рамановского пика пропорционально мощности лазера.

Оценка изменения функционального состава поверхности УНТ в процессе их модификации по данным ИК- и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии

При решении некоторых прикладных задач нередко приходится иметь дело с процессами химического модифицирования исходных исследуемых объектов. Оценка эффективности выбора метода даётся по результатам аналитического контроля модифицированных структур. Важным инструментальным методом в исследовании состава поверхностных групп модифицированных углеродных нанотрубок выделяют ИК- и фотоэлектронную спектроскопию. Основными минусами данных методов анализа определяют большие количества образца для исследований (РФЭС ~5 мг) и сложность в интерпретации результатов, метод не количественный, и его эффективность напрямую зависит от природы исследуемого

материала (ИК-Фурье спектроскопия) [150].

В литературе приведены данные по **рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии** химически модифицированных одностенных и многостенных углеродных нанотрубок [140]. Для РФЭС реперными значениями определяют положения пиков основного уровня C 1s (284.5 эВ) и O 1s (532.5 эВ). Предварительная модификация УНТ состоит из этапов кислотной обработки от аморфного углерода, суспензирования образцов в среде полярных протонных и апротонных растворителей, кислотном «разрезании» в нитрующей смеси кислот (для многостенных УНТ) и в адсорбционной модификации ОУНТ сукцинимидиловым эфиром 1-пиренбутановой кислоты, и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (для МУНТ). Авторы статьи отмечают роль растворителя дисперсионной фазы: многостенные модифицированные УНТ в метаноле показывают больший процент кислорода (14.315%) по сравнению с многостенными нанотрубками в ДМФА (8,156%). В тоже время при кислотном «разрезании» МУНТ отмечают рост кислорода до 19.273 ат.%, что может быть связано как с увеличением площади поверхности, так и количества доступных открытых концов УНТ, так как функционализация боковой поверхности стенок нанотрубок протекает труднее. На основании данных РФЭС определены следующие области энергии связи функциональных групп: sp^2 C=C (284.38–284.53 эВ), sp^3 C-C (285.11–285.5 эВ), C-O (286.21–287.53 эВ), C-NH_x (286–288.5 эВ), >C=O (286.45–287.92 эВ), -COO (288.39–289.54 эВ), O-COO (289–291.6 эВ), CHF (287.8–290.2 эВ), O=C (531.65–531.94 эВ), O-C (533.30–533.80 эВ); NH₂ (400.23–400.44 эВ).

Химически модифицированные МУНТ были исследованы методом **ИК-Фурье спектроскопии** [16]. Окислительную модификацию поверхности УНТ осуществили по методу Хаммерса. Функционализацию поверхности окисленных трубок провели в водном растворе аминокислоты L-фенилаланином с эквимольным количеством NaOH, а химическую модификацию полимером, метод синтеза которого описан в [151]. Приведены данные анализа при разрешении 4 см⁻¹ в области 400 – 4000 см⁻¹. Окисленные МУНТ имеют сильные O-H валентные колебания (с центром поглощения при 3433 см⁻¹), отвечающие за наличие гидроксильных и карбоксильных групп поверхности, алифатические sp^3 C-H (~2921 см⁻¹), C=O валентные колебания

карбонных кислот и С-О в гидроксильных группах при 1715 и 1225 см⁻¹ соответственно. После модифицирования поверхности L-фенилаланином появляются два дополнительных пика (3438 и 1625 см⁻¹), отвечающие валентным колебаниям NH и карбонильным группам амидов. В результате окончательной химической модификации полимером увеличивается интенсивность пика при 1625 см⁻¹.

Рентгенодифракционный анализ

Рентгенодифракционный структурный анализ хорошо зарекомендовал себя как мощный инструмент анализа структурных особенностей исследуемых материалов, который может применяться для измерения межслоевого расстояния между слоями графена в УНТ. Согласно литературным данным характеристическим пиком в исследовании УНТ является 002 ($2\theta = 25^\circ$), но на дифрактограмме также имеются пики 100, 101, 110 (в области $2\theta > 40^\circ$) [143]. По положению пиков при $2\theta < 5^\circ$ можно сделать вывод о количестве графеновых слоёв исследуемых образцов. Так, наличие пиков при $2\theta > 40^\circ$ отражают структуру отдельной УНТ, когда пик 002 отражает структуру, образованную совокупностью трубок. Следственно, пики при 100, 101, 110 отражают атомную структуру графенового листа, а 002 – уникален, потому что он может вносит вклад как от отдельной трубки, так и от их ансамбля. Для ОУНТ характерно уширение пика 002 (при $2\theta \sim 10^\circ$ до 35°), отвечающего за расстояние между единичными структурами одностенных УНТ. Для МУНТ характерен более суженный пик 002 (при $2\theta \sim 20^\circ$ до 30°), отвечающий за межслоевое расстояние графеновых листов, образующих УНТ.

Просвечивающая электронная микроскопия

Применительно к анализу структур УНТ позволяет сделать вывод о количестве графеновых слоев. По микрофотографиям **ПЭМ** определяют толщину стенок углеродных нанотрубок. Расчет диаметра ОУНТ возможен при уточнении вида плотной упаковки атомов углеродной структуры, образующих цилиндрическую форму. Известно три различных вида упаковки: «кресло», «хиральная» и «зигзагообразная» [123]. Индексы m и n описывают хиральный вектор и непосредственно влияют на электрические параметры ОУНТ. Количество единичных векторов в сотовой кристаллической решетке графенового листа определяется согласно этим индексам. Принято считать, что при $n = m$ нанотрубки

называются кресельными, при $m = 0$ – зигзагообразными, а прочие состояния – хиральными. Таким образом, диаметр УНТ может быть рассчитан по уравнению 8.

$$d = \frac{a\sqrt{m^2+mn+n^2}}{\pi} \quad (8)$$

Где $a = 1.42\sqrt{3}$ – константа, относящаяся к структуре кристаллической решетки графенового листа.

Термогравиметрический анализ углеродных нанотрубок

ТГА является разрушающим методом исследования структур, определяет термическую устойчивость как исходных УНТ, так и их модифицированных прекурсоров. Серьезными недостатками метода выделяют значительные массы исследуемых образцов (>10 мг), а интерпретация данных зачастую носит субъективный характер [150].

Анализ термической устойчивости одностенных [152] и многостенных [153] углеродных нанотрубок представлен в литературе.

Приводится сравнение термической устойчивости исходных ОУНТ и очищенных от аморфного углерода кислотной обработкой [152]. Как выяснилось, температура начала разложения очищенного образца составила 490 °С, а у исходного 440 °С, что подтверждает более высокую стабильность образцов, подвергшихся кислотной обработке. Наличие фазы аморфного углерода способствует образованию локального перегрева образца, что и может объяснять более низкую устойчивость исходных ОУНТ.

Получены данные по термической устойчивости как МУНТ, так и их комплекса с оксидом графена [153]. Анализ проводили при скорости нагрева 20 °С/мин в атмосфере азота. Для многостенных УНТ в интервале температур 25-800 °С составило 15% от исходных значений. Стоит отметить, что термическая устойчивость композита МУНТ-ОГ выше, чем у исходного оксида графена. В исследуемом диапазоне температур потеря массы композита составила ~58% против 70% исходного оксида графена. За счет образования π - π связей между ароматическими фрагментами листов ОГ и боковыми стенками УНТ возможно образование комплекса, более термически устойчивого, чем ОГ.

1.2. О НЕКОТОРЫХ СПОСОБАХ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Среди всех химических элементов на сегодняшний день известно свыше трёх тысяч изотопов, из которых только 255 стабильных [154]. С помощью изотопных меток можно изучать поведение веществ в сложных физико-химических и биохимических системах, при этом применение радиоизотопных меток (на примере метода радиоактивных индикаторов) позволяет обходить многие мешающие воздействия, позволяя определять содержание меченых веществ в очень малых концентрациях. Методом радиоактивных индикаторов можно определять свойства индивидуальных веществ, качественно и количественно описывать их взаимодействия [155–162]. Вещества, меченные радиоактивными изотопами, могут применяться в ядерно-химическом синтезе соединений, получение которых приемами органического синтеза затруднено или невозможно [163,164], в диагностике и лечении злокачественных новообразований [165–169], в разработке микроразмерных источников электроэнергии длительного срока службы [170–173], в сельском хозяйстве [174,175] и пр.

В настоящей главе рассмотрены различные методы изотопного модифицирования углеродных наноматериалов, дана оценка их возможного практического применения. Особое внимание уделено методам введения тритиевой метки в различные соединения.

1.2.1. Изотопное модифицирование оксида графена и его субстратов

Меченный ^{131}I восстановленный оксид графена

^{131}I ($T_{1/2} \sim 8$ сут) образуется преимущественно как продукт осколочного деления ядер изотопов урана, плутония в процессе поглощения нейтронов в активной зоне ядерных реакторов. Возможен ядерный синтез при облучении теллуровой мишени потоком нейтронов по ядерной реакции $^{130}\text{Te}(n, \beta^-)^{131}\text{I}$. Ядро радионуклида нейтроноизбыточное, в процессе распада которого образуется ^{131}Xe , β^- частицы с различной максимальной энергией (от ~ 0.3 до 0.8 МэВ), а также γ -кванты ($0.164 - 0.637$ МэВ) в результате изомерного перехода $^{131\text{m}}\text{Xe}$ [176]. Радиохимические свойства изотопа позволили успешно применять его в качестве

радиотерапевтического нуклида, в том числе для лечения раковых новообразований, локализующихся в щитовидной железе [177].

Рассмотрен меченный ^{131}I комплекс восстановленного оксида графена с полиэтиленгликолем (ПЭГ) для комбинированного тераностического подхода в лечении раковых опухолей [178]. Этапы введения радиоактивной метки заключаются в обработке предварительно синтезированного комплекса хлорамином Т в присутствии ^{131}I . К 0.5 мл суспензии комплекса (2 г/л) вносят 200 мкл хлорамина Т (4 г/л) и 1 мКи ^{131}I в форме иодида натрия. В реакционную смесь добавляют водный раствор фосфатного буфера PBS (7.5 рН) и выдерживают (25 °С, 30 мин). Для удаления избытка ^{131}I препарат многократно отфильтровывают с измерением радиоактивности фильтрата с помощью сцинтилляционного детектора. Стоит отметить, что ^{131}I образует связь с углеродом структуры восстановленного оксида графена, а роль ПЭГ состоит в достижении седиментативной устойчивости препарата в плазме крови мышей в течение семи дней.

Основным достоинством данной работы авторы отмечают улучшенные сорбцию и удержание в опухоли радионуклида, связанного с углеродным носителем, по сравнению с нативным ^{131}I . Проблема биоразлагаемости ОГ существенна и на данный момент является основным ограничивающим фактором в применении таких препаратов в исследованиях *in vivo*.

Меченный $^{99\text{m}}\text{Tc}$ оксид графена

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($T_{1/2} \sim 6$ ч) находит применение в радионуклидной диагностике, так как в процессе внутренней конверсии метастабильного ядра испускается γ -квант с энергией ~ 0.14 МэВ [176]. Наиболее широко применяемым методом наработки радионуклида является генераторный - за счет распада материнского ^{99}Mo ($T_{1/2} \sim 66$ ч), с которым дочерний нуклид технеций находится в подвижном равновесии. Известны методы синтеза радионуклида и на циклотронах при бомбардировке мишени ^{100}Mo протонами по реакции $^{100}\text{Mo}(p, pn)^{99}\text{Mo}$ [179].

Приведены методы введения радиоактивной метки в структуру оксида графена [180]. Варьируя составом реакционной смеси, температурой и временем контакта фаз определены наиболее оптимальные параметры по получению препарата с максимальным содержанием связанного с ОГ $^{99\text{m}}\text{Tc}$. К 1 мл водной суспензии ОГ (1

г/л) вносят 10 мкг $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 200 мкл водного раствора аскорбиновой кислоты (10 г/л), рН доводят до 6, используя ацетатный буфер, с последующим введением в смесь 0.5 мл препарата с удельной радиоактивностью $^{99\text{m}}\text{Tc}$ равной 22 мКи/мл и выдерживают (25 °С, 45 мин). Процедура очистки препарата основывалась на методах тонкослойной хроматографии и электрофореза. По данным измерения радиоактивности на сцинтилляционном счетчике дана оценка его радиохимической чистоты. Дополнительно определен состав функциональных групп поверхности (ИК-Фурье), РФА, электрокинетический потенциал синтезируемых соединений.

Из основных выводов авторы отмечают эффективность введения метки технеция в случае использования хлорида олова в качестве его восстановителя, ОГ продемонстрировал благоприятную радиохимическую и метаболическую стабильность *in vivo* на примере экспериментов на мышах.

Меченный ^{64}Cu оксид графена и его восстановленный аналог

^{64}Cu ($T_{1/2}$ 12.7 ч) имеет сложную схему распада, в которой присутствует позитронный (17.8%) и β^- (38.4%) распад, электронный захват (43.8%). Из основных методов наработки радионуклида выделяют ядерный синтез под действием нейтронов $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$, $^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$, а также бомбардировкой протонами на ускорителях по реакции $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$. Перспективен для применения в позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) и относится к диагностическим радионуклидам, так как максимальная энергия заряженных частиц составляет (~0.6-0.65 МэВ) [176,181].

Предложен метод введения радиоактивной метки в наноуглеродные материалы без предварительной стадии хелатирования [182]. Механизм введения метки заключается во взаимодействии между переходным металлом (^{64}Cu) и π -электроном структуры оксида графена. В основе механизма лежит перенос заряда между катионом $^{64}\text{Cu}^{2+}$ и π -связями в ароматических фрагментах оксида графена. Синтез заключается в простом смешивании углеродного субстрата в среде 0.1 М натрий-ацетатного буфера с раствором соли, содержащей катионы $^{64}\text{Cu}^{2+}$. Для образования устойчивой электронной конфигурации для иона $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ($3d^9$) необходим 1 электрон, донором которого могут стать π -электроны в ароматических фрагментах оксида графена. Таким образом, количество π -связей на графеновых наноматериалах становится важным фактором, влияющим на эффективность мечения и устойчивых

к радиолизу синтезируемых материалов. Предполагается, что в процессе химического восстановления ОГ доля π -связей будет возрастать, а следственно и увеличиваться количество связанного со структурой ^{64}Cu . Согласно данным автораддиографии, комплексы, в которых радионуклид связан с восстановленным ОГ более устойчивы (на пластинках ТСХ остаются на линии старта), чем на исходном ОГ. По ИК-Фурье анализу в области волновых чисел 1350 и 3000 cm^{-1} для меченного ^{64}Cu восстановленного оксида графена обнаруживаются сигналы, отвечающие за образование связи между радионуклидом и структурой восстановленного ОГ.

Меченный $^{198,199}\text{Au}$ оксид графена, модифицированный

3-аминопропил-триметоксисиланом

Для золота известно тридцать семь изотопов и только ^{197}Au – стабилен. Периоды полураспада для ^{198}Au и ^{199}Au составляют 2.7 и 3.1 дня соответственно. $^{198,199}\text{Au}$ являются нейтроноизбыточными изотопами, подвергающиеся β^- распаду. Однако, в схеме распада присутствуют γ -переходы, в результате которых данные радионуклиды нашли применение в однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Основной метод ядерного синтеза заключается в обработке стабильного изотопа потоком тепловых нейтронов по реакции $^{197}\text{Au}(n,\gamma)^{198}\text{Au}$ и $^{197}\text{Au}(2n,\gamma)^{199}\text{Au}$ [176,183,184].

Приведен метод синтеза меченного $^{198,199}\text{Au}$ модифицированного оксида графена [185]. Первый этап модифицирования заключается во взаимодействии оксида графена с 3-аминопропил-триметоксисиланом. К 10 мл водной суспензии ОГ (5 г/л) вносят 10 мкл (~9.7 мг) модификатора, смесь выдерживают в течение 20 ч и трижды промывают этанолом и высушивают под вакуумом при комнатной температуре в течение 5 часов. Введение метки $^{198,199}\text{Au}$ проводят простым перемешиванием в течение 2 ч в 1 мл ацетатного буфера (рН ~5.5) 50 мкг свежеприготовленного модифицированного ОГ и $[^{198,199}\text{Au}]$ в виде тетрахлоаурата(III) водорода (~6.6 мкг) с удельной радиоактивностью метки 0.15 мКи/мкг. Для анализа синтезируемой структуры применяли сцинтилляционную и ИК-Фурье спектрометрию, РФЭС, СКР.

На основании экспериментальных данных на мышинной модели определили кинетику биораспределения меченного препарата в органах животных.

Установлено, что в первый час после введения в организм препарат аккумулируется преимущественно в почках, на четвертый час – в печени, селезенке, почках и опухоли, к 24 часу после введения – наибольшая концентрация вещества приходится в опухоли.

Меченный ^{14}C оксид графена

Нейтронноизбыточный ^{14}C (β^- 100%, $T_{1/2} \sim 5700$ лет, $E_{\max, \beta^-} 0.156$ МэВ) космогенный радионуклид и биогенный элемент. Синтез радионуклида возможен при облучении мишени ^{14}N тепловыми нейтронами по следующей ядерной реакции $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$. Также ^{14}C накапливается в графитовых стержнях-замедлителях в процессе эксплуатации уран-графитовых ядерных реакторов и может быть извлечен из них [176,186].

С помощью радиоактивной метки ^{14}C определено влияние на процесс миграции ОГ в почвах при различных условиях проведения эксперимента [40]. Метод синтеза [^{14}C]ОГ заключается во взаимодействии смеси меченного ^{14}C графита (с удельной активностью 2.5 мКи/г) массой 0.1 г, 0.6 г перманганата калия в 13 мл смеси концентрированных $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4$ (9:1) при нагреве и постоянном перемешивании (45 °С, 48 ч). Для расщепления слоев оксида графена смесь суспензировали в деионизированной воде с добавлением 0.15 мл 30% H_2O_2 , осадок центрифугировали (13500 rpm, 20 мин) и повторно поочередно промывали водой и 10% соляной кислотой не менее, чем 4 раза на каждую стадию промывки. Препарат повторно промыли этанолом не менее, чем 2 раза. Получена суспензия [^{14}C]ОГ в воде (10 г/л) с удельной радиоактивностью 13,5 мКи/мл. Синтезируемый [^{14}C]ОГ охарактеризован методами УФ-спектроскопии, ИК-спектроскопии и дифракции рентгеновских лучей. Радиоактивность образцов измерена на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Установлено, что ОГ плохо минерализуется в почвах (рН 5.72-7.42) и остается в ней в стабильной форме, что говорит о возможности экологических рисков при загрязнении окружающей среды данным наноуглеродным соединением.

Синхронное мечение и восстановление дейтерием оксида графена

Изотопными метками могут быть не только радиоактивные изотопы. В

широком смысле – мечеными веществами называются соединения, в которых изотопный состав атомов отличается от природного. Дейтерий - стабильный изотоп водорода, ядро состоит из одного протона и одного нейтрона. При исследовании соединений, меченных стабильными изотопами, применяют методы анализа, основанные на различии резонансных колебаний между ядрами одного элемента, но с разным нуклонным составом. Такими методами анализа, в основном, являются ядерный магнитный резонанс, ИК-Фурье спектроскопия, масс-спектрометрия [176,187–189].

Взаимодействие водного раствора щелочи с металлическим алюминием сопровождается бурным выделением реакционноспособного водорода. Такой водород способен взаимодействовать с поверхностью оксида графена. Приведен пример введения изотопной метки дейтерия в структуру ОГ в среде протонного растворителя, причем ОГ синтезирован при различных условиях: по методу Хаммерса и Хофманна [190]. На первом этапе эксперимента подтвердили возможность проведения химического восстановления, на втором – эксперимент повторяли, но с введением в систему изотопной метки. К 100 мг ОГ добавляют 100 мл 0.1 М раствора NaOH (в H₂O) или 0.1 М NaOD (в D₂O), при УЗ-обработке (400 Ватт, 30 мин) в реакционную смесь вносят 1.5 г металлического алюминия и выдерживают в течение 24 часов при постоянном перемешивании. В случае восстановления с изотопной меткой реакционная смесь находится в среде аргона. Твердую фазу продукта отфильтровывают, очищают многократной промывкой в деионизированной воде и 10% об. HCl, высушивают (60 °С, 48 ч). Синтезируемые образцы анализировали с помощью СКР, ИК-Фурье и фотоэлектронной спектроскопии.

По отношению интенсивностей D и G мод (1340 и 1560 см⁻¹ соответственно) образцов восстановленного ОГ, синтезированных по методу Хаммерса это значение составило 1.19±0.9 (для ОГ, синтезированного по методу Хофманна: 1.035±0.05). Данные СКР показывают более высокую степень восстановления при меньшем количестве структурных дефектов при синтезе ОГ по методу Хофманна. Подтверждающим анализом являются данные по ИК-спектроскопии, коррелирующие с составом исходного оксида графита, где ОГ, синтезированный по

методу Хаммерса, содержал более высокую концентрацию карбоновых кислот и кетонных функциональных групп. Эти функциональные группы были сформированы как на краях графеновых листов, так и были связаны с дефектами внутри графенового листа.

1.2.2. Изотопное модифицирование углеродных нанотрубок

Модифицированные ^{211}At одностенные углеродные нанотрубки

С химической точки зрения астат - галоген, по свойствам близок к иоду. Стабильных изотопов не имеет. Ядро изотопа ^{211}At ($T_{1/2} \sim 7.2$ ч, $E_{\alpha} 5.87$ МэВ) испускает α -частицы (42%) и претерпевает электронный захват (ЭЗ) (58%). Определение радионуклида основано на детектировании характеристических Оже электронов (77-92 кэВ). Синтез радионуклида базируется на взаимодействии мишени ^{209}Bi с высокоэнергетическими (>28 МэВ) α -частицами на ускорителях заряженных частиц по реакции $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$. Данный радионуклид перспективен для производства α -излучающих радиофармпрепаратов (РФП) терапевтического действия [176,191].

Описано модифицирование ОУНТ астатом-211 [192]. В работе варьируют выбор окислительных активаторов между хлорамином Т (в воде), либо N-хлорсукцинимидом (в метаноле). ОУНТ (0.1 мг) суспензируют в 250 мкл воды / метанола с добавлением 35 мкл раствора активатора и последующим введением 25-50 мкл водного раствора изотопной метки $^{211}\text{At}^-$ (в NaOH) с удельной радиоактивностью 0.64 мКи/мл. Отмечена необходимость добавить раствор уксусной кислоты (до итоговой концентрации в реакционной смеси 1% масс.) в случае, если активатором выбран N-хлорсукцинимид. Время реакции 10 минут, отделение твердой фазы центрифугированием (12000 об/мин, 5 мин). Оценка состояния функционального состава поверхности синтезируемых препаратов дана на основе данных РФЭС, радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционных детекторов.

В средах, аналогичных биологическим, определена устойчивость меченых препаратов в растворе фосфатного буфера (PBS) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

Модифицированные ^{111}In одностенные углеродные нанотрубки

^{111}In нейтронодефицитный радиоактивный изотоп ($T_{1/2} \sim 2.8$ д, ЭЗ 100%). Детектируется на сцинтилляционном γ -спектрометре по двум характеристическим γ -квантам (245 кэВ и 171 кэВ). Синтез радионуклида осуществляется на циклотронах при бомбардировке мишени протонами согласно реакции $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$. Применяется в РФП для диагностических целей [176,193,194].

Приведен пример введения метки ^{111}In в модифицированную структуру одностенных углеродных нанотрубок, которые перед изотопным модифицированием подвергаются сложной многоступенчатой ковалентной функционализации поверхности [195]. Метку ^{111}In ввели при обработке препарата смесью 1 М водного раствора ацетата аммония (рН 5) и 20% ацетонитрилом с добавлением индикаторного количества $^{111}\text{InCl}_3$. Согласно экспериментам, проведенных на мышинной модели, меченные комплексы устойчивы в биологических средах, и их максимальная концентрация в опухоли достигается через сутки после введения препарата.

Инкапсуляционная модификация $^{225}\text{Ac}^{3+}$

одностенных углеродных нанотрубок

Актиний-225 ($T_{1/2} \sim 10$ д, $E_{\alpha} \sim 5.9$ МэВ) α -излучатель ($\sim 100\%$) способный к кластерному распаду (вероятность $\sim 6 \cdot 10^{-13}$) с испусканием ядра углерода-14. Входит в естественный ряд семейства ^{237}Np , но по причине практически полного распада данного семейства синтез ^{225}Ac возможен с помощью экстракционного выделения из генератора ^{229}Th . Выраженное радиотерапевтическое действие радионуклида ^{225}Ac вызывает интерес в разработке радиофармпрепаратов на его основе [154,196].

Предварительная модификация ОУНТ заключается в обработке углеродного наноматериала газообразным фтором (125 °С, 12 ч) с последующим отжигом прекурсора в среде аргона (1000 °С, 2 ч). В ходе синтеза длина ОУНТ уменьшилась с 5 мкм до 20-80 нм, а на поверхности графенового листа образовались структурные дефекты-полости. Активация поверхностных групп полостей осуществлена согласно методу восстановления по Бёрчу, для этого препарат нанотрубок

суспензируют в смеси безводного ТГФ с металлическим калием. Инкапсуляция $^{225}\text{Ac}^{3+}$ во внутренние полости ОУНТ осуществлена простым перемешиванием твердой фазы нанотрубок с 3 мкл $^{225}\text{AcCl}_3$ (62 мКи/мл) в 200 мкл деионизированной воды. Препарат трижды промывают деионизированной водой с измерением радиоактивности на сцинтилляционном детекторе. Установлено, что $^{225}\text{Ac}^{3+}$ прочно удерживается во внутренних полостях ОУНТ, так как суммарная радиоактивность промывных вод составляет 5% от значений исходной радиоактивности $^{225}\text{AcCl}_3$ внесенного в реакционную смесь [197].

Для установления устойчивости инкапсулированного радионуклида в ОУНТ препараты выдерживали в растворе фосфатного буфера ЧСА, варьируя температурой (25-37 °С) и временем выдержки (4-12 ч). Отметим, что полученные комплексы устойчивы в моделируемой биологической среде.

Адсорбционная модификация ^{68}Ga многостенных углеродных нанотрубок

^{68}Ga – нейтронодефицитный радионуклид ($T_{1/2} \sim 1.13$ ч), претерпевает β^+ распад (~89.14%) и ЭЗ (~10.49%). Из-за аннигиляции позитронов нашел применение в ПЭТ [154,198]. Методы наработки радионуклида: генераторный ($^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$) и облучение цинковой мишени потоком протонов на циклотронных ускорителях по реакции $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ [199].

Рассмотрена модификация многостенных углеродных нанотрубок данным радионуклидом [200]. Углеродный наноматериал предварительно выдерживают в газовой смеси $\text{Ar}+\text{H}_2$ (90 и 10 об% соответственно) при 800 °С в течение 5 часов. К 10-200 мкг гидрированных УНТ вносят водный раствор $^{68}\text{GaCl}_3$ с удельной радиоактивностью 1.35 мКи/мл. По разнице радиоактивности надосадочного раствора измерена кинетика адсорбции ^{68}Ga на поверхности модифицированных нанотрубок. В растворе фосфатного буфера БСА (40 г/л) при 25 °С оценена устойчивость синтезируемых соединений.

Меченные ^{14}C многостенные углеродные нанотрубки

Крупнотоннажное производство наноуглеродных материалов так или иначе может привести к загрязнению окружающей среды. Формулируются следующие задачи: важно оценить токсичность, пути миграции и места возможного накопления

в живых организмах таких потенциально опасных веществ, как углеродные нанотрубки. Одно из решений поставленной задачи по мониторингу поведения УНТ в живых организмах заключается в применении метода радиоактивных индикаторов.

Введение радиоактивной метки ^{14}C в структуру УНТ по методу каталитической конверсии паров $[\text{}^{14}\text{C}]$ бензола и определение мест накопления углеродного наноматериала на примере мышинной модели рассмотрено в работе [201]. Реакционная смесь из 1.5 мл бензола, 0.5 мл $[\text{}^{14}\text{C}]$ бензола (125 мКи/ммоль) и 4 масс.% ферроцена в потоке аргона (1 л/мин) отжигалась в кварцевом реакторе при 850 °С. Удельная радиоактивность меченных углеродом-14 многостенных углеродных нанотрубок ($[\text{}^{14}\text{C}]$ МУНТ) достигает ~0.27 мКи/мг и соответствует изотопному соотношению $^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$ как 1 / 17. Твердую фазу продукта анализировали с помощью микроскопических методов (СЭМ, ПЭМ), поверхностные функциональные группы определены по РФЭС. Состав инъекционного препарата: 2 мг $[\text{}^{14}\text{C}]$ МУНТ суспендированные в 5 мл раствора (фосфатного буфера в физиологическом растворе, рН 7.4, 5 мМ D-глюкозы, 0.6 г/л мышинный сывороточный альбумин, 0.01 г/л 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина).

Кинетика и места накопления меченых УНТ в организме животных определялась после 1 и 7 дня, а также 1, 3, 6, 9 и 12 месяца с момента инъекции препарата (10 мкг) в легкие животных. Исследование накопления УНТ проводили в следующих органах: легкие, печень, селезенка, мозг, сердце, тимус и костный мозг. По данным жидкостной сцинтилляционной спектрометрии определена радиоактивность $[\text{}^{14}\text{C}]$ МУНТ локализующихся в исследуемых органах. Отмечено сложное синхронное изменение концентрации $[\text{}^{14}\text{C}]$ МУНТ в легких (на третий месяц после введения препарата доля $[\text{}^{14}\text{C}]$ МУНТ не превышает 10% с последующим максимальным ростом до 40%), селезенке (до 0.3%) и печени (до 1.5%). Таким образом, за один год после однократного введения препарата из организма естественным путём выходит порядка 60% УНТ, наибольшая концентрация вещества приходится в легких.

1.2.3. Методы введения тритиевой метки

Радиоактивный изотоп водорода **тритий** имеет период полураспада равный

12.33 года, претерпевает β^- распад (100%) с максимальной энергией заряженных частиц 18.6 кэВ. Радионуклид получают по реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$ облучением потоком нейтронов, генерируемых в ядерных реакторах, мишени ${}^6\text{Li}$ в связанной форме (например, в виде фторида или в виде интерметаллидов Li-Mg/Li-Al). В ходе ядерной реакции газообразный тритий (Т) извлекается из системы как в виде атомов отдачи, так и при радиохимической переработке облученной мишени. Способность к изотопному замещению протия в структуре органических соединений, длительный период полураспада, низкие значения пробега заряженных частиц в веществе, отсутствия проникающей радиации в процессе его распада и, как следствие, нестрогие требования дозиметрического контроля - определяют тритий как один из наиболее перспективных радионуклидов для проведения научных исследований [176,202].

Принципиально различают три группы методов введения тритиевой метки: физико/ядерно-химический, химический и биосинтез.

К **химическим** методам относят направленный синтез меченых соединений компонентами реакции, в составе которых присутствует тритий (NaBT_4 , LiAlT_4 , CNTCl_2 и пр.) [203], изотопный обмен с тритиевой водой [204]. Для **биосинтеза** характерны реакции, протекающие в живых организмах (*in vivo*) или с помощью ферментатических (*in vitro*) реакций, где изотопная метка находится в составе одного из взаимодействующих между собой ферментов или фермента с субстратом [205,206]. **Физико/ядерно-химические** методы отличаются видом активации как элементарного трития (термической, электродуговой, каталитической диссоциацией или в ходе радиоактивного распада молекулярного трития с образованием активной частицы He^3H^+ согласно методу Вильцбаха), так и ион-молекулярными реакциями, индуцированные распадом трития в составе многократно меченых молекул [164,207–210].

Определение механизма ингибирования $\alpha 3\beta 4$ никотиновых рецепторов способствует разработке эффективных средств лечения от никотиновой зависимости, одним из перспективных таких соединений рассматривается (+/-)-мекамиламин. Примером химического метода введения тритиевой метки предложен меченый с помощью NaBT_4 мекамиламин [203]. В общем виде препаративный

подход состоит из двух стадий: окисления N-метильной группы мекамиламина с последующим её восстановлением натрий бортридом. Удаление лабильной метки по положению $-N^3HCH_x^3H_y$ (где x, y от 1 до 2) произвели двукратным упариванием меченого препарата в среде этанола. Методом обращённо-фазовой жидкостной хроматографией ВЭЖХ, элюируя водной 0.1 масс. %-ной трифторуксусной кислотой : ацетонитрилом (90:10), получили очищенный препарат с удельной радиоактивностью 35.5 Ки/ммоль. Согласно данным ТСХ радиохимическая чистота продукта ~97%. Анализ [N-метил- 3H](+/-)-мекамиламина осуществили методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии, масс-спектрометрии и ЯМР.

Антагонисты рецептора A_{2a} обладают потенциалом в лечении болезни Паркинсона. МК3814 (preladenant) - продукт конденсации производных тозила и пиперазина, который на мышинной модели (*in vivo*) продемонстрировал эффективность в лечении болезни Паркинсона [204]. Синтез меченого тритием МК3814 заключается в введении тритиевой метки по СН-связи в пиперазиновый цикл по положениям 2,6 с последующей конденсацией с производной тозила. Каталитическую активацию реакции изотопного обмена с тритиевой водой (50 Ки/мл) провели на рутениевом катализаторе. Реакционную смесь, состоящей из 24.4 мг производной пиперазина, 2.1 мг трис-трифенилфосфин рутения (II) хлорида, 100 мкл диоксана и 10 мкл тритиевой воды перенесли в стеклянные ампулы, вакуумировали и заморозили в жидком азоте с дальнейшим нагревом (120 °С, 3ч). После экстракции дихлорметаном (2 x 5 мл), промывки водой экстракта, его выпаривания и ВЭЖХ очистки (градиент буфера 0-20% 2М метаноламина в дихлорметане). Удельная радиоактивность прекурсора равна ~466 мКи/ммоль, радиохимическая чистота ~98%. После реакции конденсации и этапов очистки препарата удельная радиоактивность [3H]МК3814 снизилась до 95.5 мКи/ммоль (радиохимическая чистота ~95%). Положения радиоактивной метки определены методом ЯМР. На основании данных ЖСС измерена радиоактивность веществ. Также в рамках работы привлечены методы масс-спектрометрического анализа.

По данным ЯМР предполагается, что включение метки в -СН связи положений 3 и 6 обусловлено образованием Ru-N связи между атомами азота пиперазинового цикла с рутением.

Синтез меченного тритием L-тирозина с помощью энзиматических реакций приведен в литературе [206]. В общем виде ферментативная реакция состоит из двух основных этапов. На первой стадии тритиевая метка вводится в метиленовую группу малоновой кислоты в результате изотопного обмена с тритиевой водой при нагреве, далее по реакции Кнёвенагеля происходит конденсация [2-³H]-малоновой кислоты и бензальдегида с образованием [2-³H]-коричной кислоты и последующим превращением её в [2-³H]-L-Phe с помощью фермента фенилаланин-аммиак-лиазой (КФ 4.3.1.5). Вторая стадия заключается в формировании гидроксильной группы в *para*-положение бензольного кольца [2-³H]-L-Phe после его инкубирования в среде, содержащей фермент L-фенилаланин-4'-монооксигеназу (КФ 1.14.16.1). Для поддержания энзиматической реакции на второй стадии в реакционную систему внесены соединения-кофакторы: D,L-6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптерин и D,L-дифлотиотреитол, и каталаза (КФ 1.11.1.6), ингибирующая окисление [2-³H]-L-Тур перекисью водорода, формирующегося в ходе энзиматических реакций.

Преимуществом энзиматических реакций является более простое, по сравнению с классическим многоступенчатым органическим синтезом, получение биологически активных меченых соединений.

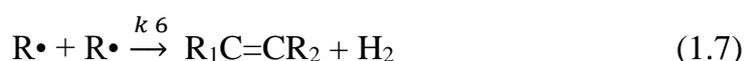
1.2.4. О некоторых возможностях метода термической активации трития

В 1909 году американский химик Ирвинг Ленгмюр, изучая влияние электрических разрядов в газах, доказал, что на яркость свечения электрических ламп влияет химическая природа ионизируемого газа, а не уровень вакуума в лампе. Результаты своих исследований по термической диссоциации водорода Ленгмюр опубликовал в [211–213]. Сформулированы следующие выводы: 1) нагревая вольфрамовую проволоку ($T > 1500\text{K}$) в среде водорода при охлаждении стенок стеклянного сосуда жидким азотом, давление газа в системе уменьшается; 2) уменьшение давления связано с диссоциацией водорода на атомы с последующей адсорбцией их на охлажденных стенках; 3) атомарный водород, получаемый таким способом, является радикалом, в связи с чем - химически чрезвычайно активен.

Учитывая, что химические свойства изотопов одного и того же элемента неизменны, то атомарный тритий будет аналогично реакционноспособен атомарному протию. В связи с чем разработана методика изотопного обмена между

атомарным тритием и протием в бомбардируемой мишени. Метод, основанный на термической диссоциации молекулярного трития на поверхности вольфрамовой проволоки, нагретой электрическим током, принято называть «методом термической активации трития» (ТАТ). Термическая активация трития относится к группе физико-химических методов получения меченых соединений [210]. Согласно номенклатуре меченных соединений, вещества, меченные тритием по методу ТАТ относятся к группе изотопно-меченных, подгруппе неселективно-меченных соединений.

Ниже приведены основные процессы, включающие диссоциацию трития, радикальное изотопное замещение трития и образование целевого меченого соединения и побочных продуктов.



Стоит отметить, что только реакции 1.2 и 1.4 способствуют образованию целевого меченого продукта [214].

В случае реакции изотопного обмена с углеродными наноматериалами побочными могут быть только реакции с отрывом функциональных групп 1.3. Однако, для образования максимально меченого продукта такие реакции могут быть полезны, так как в химической связи С-Т тритий является нелабильным. Процесс изотопного обмена, проводимый методом термической активации трития, гибок в выборе контроля образования побочных продуктов реакции. Оперирруя

давлением газовой смеси в системе, временем экспонирования вольфрамовой нити, её температурой, геометрией реакционного сосуда, материалом субстрата мишени, а также толщиной слоя мишени и дополнительным охлаждением внешних стенок колбы реактора – возможен контроль образования побочных продуктов реакции, а также изменение удельной радиоактивности трития в структуре меченого соединения.

В нашей лаборатории разработаны методы введения трития в различные углеродные наноматериалы: наноалмазы [215], однослойный ОГ и его восстановленный аналог, а также в ОУНТ [1,216,217].

Стоит отметить, что изотопное замещение трития в веществе мишени атомарным тритием протекает преимущественно по радикальному механизму, это значит, что основная доля меченых атомов придется на алифатические фрагменты молекул мишени. На примере введения тритиевой метки в олигопептид даларгин, нанесенный на различные углеродные материалы, удельная радиоактивность трития в ароматических фрагментах существенно выше, чем в препарате, нанесенном на стеклянные стенки реакционного сосуда [214]. Предположительно углеродная поверхность способствует изменению как механизма изотопного обмена с радикального на электрофильный, так и изменению конформационной доступности даларгина для атомарного трития, что будет рассмотрено в следующих частях настоящей диссертации.

Метод термической активации трития позволяет получить гидриды металлов, а так же высокомеченный тритием ОГ для применения в составе бетавольтаических атомных батарей (АБ) [218,219].

1.3. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

С появлением электронных вычислительных машин в арсенале современного исследователя существенно сократилось время на поиски возможных методов синтеза новых веществ, объяснение механизмов межмолекулярного взаимодействия стало более наглядно, а решение некоторых нетривиальных научных задач более изящным.

Одним из критериев научного знания является воспроизводимость эмпирического материала. Накопленный опыт различных экспериментальных данных, их интерпретация и выводы позволяют найти закономерность протекания того или иного процесса. В последние десятилетия учеными особое внимание уделяется полуэмпирическим методам компьютерного моделирования. Такие методы берут за основу экспериментальные данные хорошо исследованных процессов.

Методы компьютерного моделирования можно разделить на две большие группы: квантовой химии и методы молекулярной механики. В первой группе особое внимание уделяется электронной структуре исследуемого вещества. С помощью таких расчетов можно оценить образование химических связей и как следствие – определить физико-химические свойства исследуемых веществ. В самом общем виде главной задачей квантовой химии является решение уравнения Шрёдингера. Однако для систем с большим количеством атомов и различных связей решение данного уравнения аналитически невозможно и для этого используют различные приближенные решения [220–222].

Метод молекулярной механики основывается на законах классической физики. Наименьшими частицами принято считать атомы и, как следствие, в отличие от методов квантовой химии наличие отдельных электронов явно не учитывается. Однако сильная сторона данного метода состоит в возможности исследовать многоатомные молекулярные системы. Молекулярная механика может быть применена для исследования процессов диффузии, физической адсорбции, межмолекулярного взаимодействия органических и неорганических соединений в широком интервале давления и температур. Размеры молекулярных систем могут

достигать сотен тысяч атомов, что в свою очередь позволяет проводить расчет со сложными биомолекулярными структурами: белками, полисахаридами и другими биополимерами. В отличие от квантово-химических расчетов в молекулярной механике требуется явный выбор параметров силового поля, которое определяет координаты движения всех атомов системы [223].

В настоящем диссертационном исследовании применяются методы **молекулярного докинга** и **молекулярной динамики**, которые являются частью группы методов классической молекулярной механики.

1.3.1. Молекулярный докинг

Нашёл свое применение в исследованиях взаимодействия биологических макромолекул с веществами-лигандами. Практическая значимость метода обусловлена поиском эффективных лекарственных средств, селективно связывающихся с биологической мишенью и изменяющие её биохимические свойства. В классическом понимании молекулярный докинг рассматривает малые (до сотен атомов тяжелее водорода) молекулы лиганда, однако в случае исследования взаимодействия двух биологических макромолекул применяется макромолекулярный докинг [224]. По характеру взаимодействия различают «жесткий» и «гибкий» докинг [225]. В первом случае длины и углы межатомных связей молекул как биополимера, так и лиганда остаются неизменными на всех этапах моделирования. Во втором случае есть возможность явно указывать фрагменты молекул, способные изменять свои геометрические характеристики в процессе моделирования. Основным плюсом метода можно выделить высокую скорость расчета и возможность параллельного анализа массива лигандов. Ограничение по количеству степеней свободы к движению большинства атомов в системе могут давать результаты, которые не будут коррелировать с реальным экспериментом. Таким образом, данный метод целесообразно использовать в тех случаях, когда заведомо предположено место стыковки лиганда с биополимером.

1.3.2. Молекулярная динамика

Круг задач, которые могут быть решены методом молекулярной динамики значительно шире молекулярного докинга. Данный метод основывается на моделировании траектории движения атомов за определенный промежуток времени.

Поскольку на атомы действуют законы классической механики, то теоретической основой метода является Ньютоновская механика. Важно понимать какие параметры силового поля используются в расчете, так как интегрирование уравнения движения атомов в конечном итоге определяет их координаты в пространстве.

Как было сказано ранее, метод молекулярной динамики способен применяться в самых разных областях химии. Так, определены термодинамические и структурные свойства смеси оксидов кальция и алюминия при различном их молярном соотношении при температуре 1873К, что в свою очередь имеет практическую значимость при разработке новых составов цемента [226]. Объектами исследования в работе [227] выбраны биологические макромолекулярные системы, в динамическом исследовании оценено их поведение в среде полярных растворителей при различной температуре, и сформулированы выводы об изменении конформационных свойств таких структур. Моделирование взаимодействия органических соединений с неорганическими на примере нековалентного модифицирования глинистых минералов четвертичными аммониевыми основаниями приводят авторы в статье [228]. Важным параметром в исследовании кинетики процесса массопереноса вещества является поиск коэффициента диффузии, приводятся данные по расчету коэффициента диффузии на границе несмешивающихся фаз [229]. В последние годы актуальной проблемой стала борьба с новой коронавирусной инфекцией и с помощью методов компьютерного моделирования активно проводится поиск наиболее эффективных ингибиторов белка данного вируса [230].

Нековалентное модифицирование углеродных наноматериалов различными органическими соединениями носит прикладной характер. Исследование механизма такого взаимодействия является фундаментальной составляющей. Методом молекулярной динамики приводятся данные по нековалентной модификации ОУНТ органическими полимерами [231,232], оценка взаимодействия дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с ОГ и его химически восстановленной формой дана в работе [233]. Поиск эффективных способов борьбы с вирусом иммунодефицита человека остается актуальной проблемой, в работе [234] учеными

определено влияние ОГ на конформационное изменение вирусного фрагмента Vpr 13-33 (структура в Protein Data Bank: 1FI0).

Существуют различные программы для проведения моделирования и их выбор основывается на природе взаимодействующих молекул. Выбор программ актуален при исследовании межмолекулярного взаимодействия сложных органических соединений как между собой [235,236], так и с неорганическими субстратами [237]. При анализе взаимодействия неорганических веществ, изменения их фазового состояния при различных условиях - предпочтительна программа LAMMPS [238].

В данной работе применяются методы компьютерного моделирования по исследованию образования белок-лигандного комплекса для интерпретации структурной организации белка на поверхности углеродного наноматериала. Для расчетов используется пакет программ Gromacs версии 2022.4. Выбор программы основан на анализе литературных данных, в которых расчетные данные сопоставимы с реальным экспериментом [239,240].

1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ

Оксид графена и углеродные нанотрубки обладают высокой химической устойчивостью. Имея высокую механическую прочность и одновременно гибкость, одностенные углеродные нанотрубки могут представлять интерес для современной медицины в качестве компонента, улучшающего прочностные характеристики протезов. Оксид графена, который можно получить в промышленных масштабах, рассматривается как возможный прекурсор графена, а также как потенциальная платформа адресной доставки лекарственных средств. Способность модифицировать УНТ и ОГ радиоактивными изотопами открывает возможности по поиску новых и эффективных препаратов для лечения раковых новообразований методом радиоэмболизации. Однако для достижения поставленных целей важно добиться биосовместимости данных материалов. Устойчивость оксида графена к действию ионизирующего излучения при распаде трития позволяет удерживать радионуклид в конденсированном состоянии, что позволяет рассматривать ОГ как потенциальный компонент атомной батареи на основе трития. В настоящем диссертационном исследовании применяются однослойный оксид графена, а также модифицированные фтором одностенные углеродные нанотрубки.

На гидрофильной поверхности оксида графена присутствует большое количество кислородсодержащих функциональных групп, вследствие этого водные суспензии ОГ будут обладать отрицательным ζ -потенциалом, что позволяет легко модифицировать поверхность ОГ различными белками. Гидрофобная поверхность УНТ также может участвовать в процессе нековалентной модификации, за счет как связей с гидрофобными участками молекул-модификаторов, так и за счет электростатического взаимодействия.

Изменение функционального состава поверхности ОГ в ходе его модификации можно определить с помощью ИК-спектromетрии, а на основании данных Рамановской спектроскопии по отношению характеристических I_D/I_G интенсивностям дать оценку эффективности процесса восстановления ОГ. Анализ функционального состава поверхности УНТ с помощью ИК-спектromетрии трудно осуществим, однако с помощью меченных тритием соединений и по изменению ζ -потенциала полученных комплексов можно установить количественный состав

исследуемых адсорбционных комплексов, а также дать оценку о возможных механизмах их формирования.

Меченные тритием полисахарид хитозан, олигопептид даларгин, белки бычий сывороточный альбумин и лизоцим применяются для изучения их взаимодействия с поверхностью ОГ и УНТ. Регистрацию излучения для контролирования количества адсорбированного модификатора осуществляли методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии. Методом термической активации трития были получены горячие атомы трития, которые ковалентно связываются с атомами углерода, замещая протий, при этом меченные тритием вещества химически идентичные немеченым.

Основная задача направлена на анализ различных способов модифицирования углеродных наноструктур, определение закономерности формирования сложных комплексов, определение их состава с применением метода тритиевого зонда и компьютерного моделирования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. ОКСИД ГРАФЕНА, ВОССТАНОВЛЕННЫЙ ОКСИД ГРАФЕНА, УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

2.1.1. Оксид графена и углеродные нанотрубки

В работе использовали однослойный оксид графена (ОГ), одностенные углеродные нанотрубки (УНТ) форма поставки, обозначения и производитель приведены в таблице 1.

Таблица 1. Углеродные наноматериалы, использованные в работе

| Компания производитель | Материал/Форма поставки | Обозначение в данной работе | $S_{уд}$ БЭТ, m^2/g |
|---------------------------|--|--------------------------------|--------------------------|
| Cheap Tubes | Однослойный оксид графена/порошок | ОГ | 60 |
| | Одностенные углеродные нанотрубки функционализированные фтором /порошок | УНТ | 570 |

В экспериментах по адсорбционной модификации углеродных наноматериалов биополимерами, введению тритиевой метки в биополимеры, предварительно адсорбированных на поверхности ОГ и УНТ – применяются исходные углеродные материалы без дополнительной модификации (кроме образцов химически восстановленного оксида графена(ОГ_{восст.})).

Для углеродных материалов определены: морфология, функциональный состав поверхности (ИК- и спектроскопия комбинационного рассеяния), седиментативная устойчивость водных суспензий ОГ (ОГ_{восст.}) при различных рН.

2.1.2. Характеристика углеродных наноматериалов

Оксид графена, восстановленный оксид графена и углеродные нанотрубки

характеризовали с помощью рентгенодифракционного анализа, просвечивающей электронной микроскопии, ИК-спектроскопии, Рамановской (комбинационного рассеяния) спектроскопии, по данным измерения электрокинетического потенциала водной суспензии ОГ определена её седиментативная устойчивость.

Данные рентгенодифракционного анализа исходных образцов углеродных наноматериалов были получены на дифрактометре RINT2000 (Япония) к.х.н. Ереминой Е.А. Параметры съёмки: Cu K α $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, скорость сканирования 5°/мин, шаг 0.02°.

Морфологию частиц ОГ и УНТ определяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Изображения были получены с помощью микроскопа ультравысокого разрешения марки JEM-2100 F (JEOL, Япония) (оборудование ЦКП МГУ) к.х.н. Егоровым А.В. и м.н.с. Егоровой Т.Б.

Функциональный состав поверхности определяли методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье с помощью спектрометра Nicolet Protege 460 в диапазоне от 400 до 4000 cm^{-1} при оптическом разрешении 4 cm^{-1} . Порошок ОГ (восстановленный оксид графена) смешивали с порошком KBr, прессовали в таблетку массой 1 мг и помещали в прибор. ИК-спектры были получены с.н.с. кафедры физической химии химического факультета МГУ к.х.н. Поповым А.Г.

Для определения эффективности метода химического восстановления оксида графена образцы были проанализированы методом молекулярной спектроскопии на Рамановском спектрометре Renishaw inVia Reflex Raman (Великобритания) в диапазоне от 100 до 3250 cm^{-1} (λ 514 нм, 20 мВ). Спектры комбинационного рассеяния получены доц. кафедры наноматериалов факультета наук о материалах МГУ к.х.н. Григорьевой А.В.

Данные по краевому углу смачивания образцов УНТ и УНТ, модифицированных биополимерами получены д.х.н. Чернышевой М.Г.

На анализаторе частиц Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) исследована седиментативная устойчивость водных суспензий ОГ (0.1 мг/л, 0.2 г/л) и ОГ_{восст.} (0.1 мг/мл) при pH среды 2.5-13.

2.1.3. Характеристика газовых смесей дейтерия и трития

Во всех экспериментах по введению дейтерия или трития использовали их смесь с водородом в следующих объемных соотношениях:

$$D_2:H_2 = 1:10;$$

$$T_2:H_2 = \text{от } 3:10 \text{ до } 4:10.$$

2.2. ХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ОКСИДА ГРАФЕНА

2.2.1. Аминокислотное восстановление

На рисунке 1 представлена микрофотография исходного оксида графена, полученная на ПЭМ.

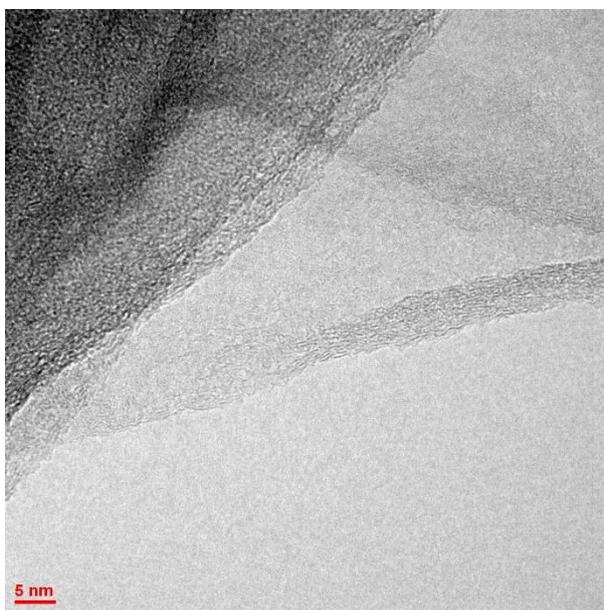


Рисунок 1. ПЭМ изображение однослойного оксида графена.

На рисунке 2 приведена дифрактограмма исходного оксида графена.

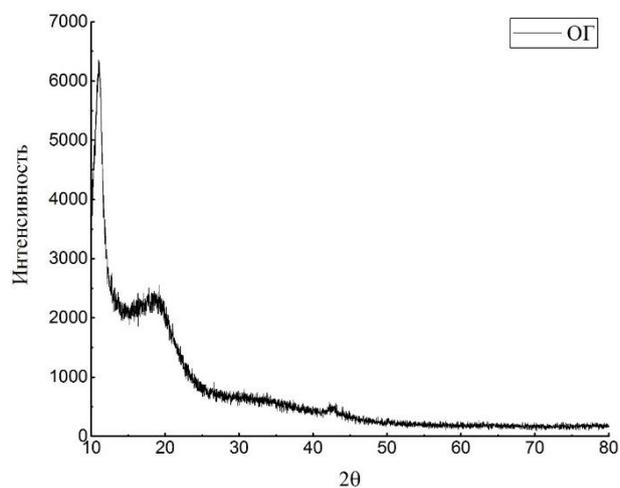


Рисунок 2. РФА однослойного оксида графена.

Суспензию, состоящую из ОГ (0.6-2мг) и водного раствора аминокислоты (10-20.2 г/л) выдерживали на водной бане (90 °С, 3 ч). Образец-сравнения представлял собой суспензию ОГ без добавления восстановителя. Цвет суспензий образцов с аминокислотой-восстановителем изменялся с коричневого на черный, образец-сравнения цвет не изменял. Отделение твердой фазы $OГ_{восст.}$ от надосадочной жидкости проводили при центрифугировании (21000 rpm, 0.5 ч), с последующим этапом однократной промывки продукта водой.

2.2.2. Гидротермальное восстановление в воде

1 мл водной суспензии ОГ (2 г/л) поместили в стеклянную ампулу, заморозили в жидком азоте под вакуумом и запаляли. Ампулу с образцом выдерживали в сушильном лабораторном шкафу (155 °С, 1 ч) с последующим охлаждением до комнатной температуры. Этапы отделения $OГ_{восст.}$ от водной фазы аналогичны п. 2.2.1.

2.2.3. Восстановление β -меркаптоэтанолом

4 мг ОГ суспензировали в 2 мл гидролизной смеси, состоящей из концентрированной соляной и трифторуксусной кислот в объёмном соотношении 2:1, с добавкой 0.001% β -меркаптоэтанола. Затем реакционную смесь перенесли в ампулы, заморозили жидким азотом под вакуумом и выдержали в термостате при 25 °С и 90 °С в течение 1 часа. Образцы центрифугировали (21000 rpm, 0.5 ч) и твердую фазу промыли водой до нейтрального pH.

2.2.4. Восстановление атомарным дейтерием и тритием

Для подготовки вещества к обработке атомами дейтерия или трития водную суспензию ОГ (0.5 мг ОГ при обработке дейтерием и 0.1-0.3 мг ОГ при обработке тритием) равномерно распределяли на внутренних стенках колбы-реактора, замораживали и высушивали при помощи лиофилизации. Колбу с веществом-мишенью подсоединяли к специальной вакуумной установке, откачивали воздух из системы до остаточного давления <0.01 Па и заполняли газообразным тритием или дейтерием до давления 1.5 Па (эксперименты при комнатной температуре мишени)

или 0.5 Па (эксперименты при 77 К). Для охлаждения стенок сосуда до 77 К использовали жидкий азот. В экспериментах при комнатной температуре мишени жидким азотом охлаждали только дно реакционного сосуда. Атомизацию газа проводили при 2000 К путем нагрева электрическим током вольфрамовой спирали, расположенной в центре реакционного сосуда. Использовали время нагревания спирали от 10 с до 1 мин и после каждой процедуры атомизации удаляли остаточный газ и заполняли систему его новой порцией. Суммарное время обработки атомарным дейтерием составило 4 мин, суммарное время обработки атомами тритием варьировалось от 20 с до 22 мин. По окончании реакции меченный дейтерием (тритием) $\text{OГ}_{\text{восст.}}$ смывали со стенок сосуда водой (или водно-спиртовой смесью $\text{H}_2\text{O-EtOH}$ 1:1) объемом 3.5 - 7.6 мл. Удаление изотопной метки из лабильных положений (гидроксо-, карбоксильных групп) проводили при помощи испарения жидкой фазы на роторном испарителе с повторным суспензированием твердой фазы в воде.

На всех стадиях химического восстановления OГ применяли деионизированную воду, очищенную с помощью системы Milli-Q (Millipore). Образцы восстановленного и исходного OГ сравнивали по данным СКР по отношению значений интенсивностей D-моды к G-моды. Изменение функционального состава поверхности образцов определяли из данных ИК-Фурье спектроскопии. Радиоактивность меченных тритием суспензий $\text{OГ}_{\text{восст.}}$ определяли по данным жидкостной сцинтилляционной спектрометрии, измерения проводили на ЖС-спектрометре RackBeta 1215 (Финляндия) [216]. Для определения седиментативной устойчивости суспензий $\text{OГ}_{\text{восст.}}$ использовали водные суспензии концентрации 0.1 мг/л.

2.2.5. Синтез высокомеченного тритием оксида графена

В первой серии экспериментов использовали способ, описанный в предыдущем пункте (п. 2.2.4). При подготовке препаратов к введению трития с помощью метода термической активации распределяли водную суспензию препарата (0.1 мг OГ) на стенках реакционного сосуда с последующим удалением воды лиофилизацией. Изотопный обмен проводили при комнатной температуре, охлаждая жидким азотом (77 К) только дно реакционного сосуда.

Во второй серии экспериментов 30 мкл суспензии ОГ (концентрация 2 г/л) наносили на кремниевые пластинки размером 0.8x0.8 см (площадь поверхности 0.64 см²), высушивали на воздухе. Условия проведения реакции были следующие: мишень ОГ находилась при комнатной (294-297 К) температуре, давление газообразного трития 1.2-1.5 Па, температура атомизатора 2000 К. Нагревание электрическим током вольфрамовой проволоки проводили импульсами сначала по 20 с (первые 3 мин), а затем по 60 с. Каждый раз после остановки реакции удаляли остаточный газ и наполняли сосуд новой порцией газообразного трития. Суммарное время обработки ОГ, нанесенного на стенки реакционного сосуда, атомарным тритием составило 22 мин, далее препарат смывали со стенок 8 мл смеси вода-метанол (1:1), измерили радиоактивность препарата на ЖС-спектрометре RackBeta 1215, упаривали досуха, чтобы избавиться от лабильного трития. Пластины с нанесенным слоем ОГ после обработки атомарным тритием, а также лиофилизированный высокоомеченный оксид графена кипятили в 70%-ной HNO₃ при 122 °С в течение 3 часов в круглодонной колбе с обратным холодильником. По измерению радиоактивности кислотного раствора определяли общее количество трития в исследуемых образцах.

В третьей серии эксперимента был достигнут более эффективный способ получения высокоомеченного препарата с меньшим расходом газообразного трития. Водную суспензию ОГ производства Chear Tubes (США), содержащую 0.1 мг вещества, равномерно наносили на боковые стенки стеклянного цилиндрического реакционного сосуда объемом 0.40 дм³ и удаляли воду лиофилизацией. Сосуд с ОГ присоединяли к вакуумной установке (суммарный объем, включая объем реакционного сосуда, 0.96 дм³), удаляли воздух до остаточного давления <0.01 Па, затем охлаждали жидким азотом до температуры 77 К как доньшко, так и боковые стенки реакционного сосуда. Заполняли сосуд газообразным тритием до давления 0.5 Па. Вольфрамовую проволоку атомизатора, расположенную в центре реактора, нагревали электрическим током до 2000 К. Затем нагрев прекращали, удаляли остаточный газ, наполняли систему новой порцией трития и повторяли атомизацию нагреванием вольфрамовой проволоки. Провели три повтора нагревания атомизатора продолжительностью 20 с, два повтора нагревания атомизатора продолжительностью 30 с, и далее использовали время нагревания по 60 с.

Суммарное время обработки атомами трития ОГ 16 минут (19 напусков).

2.3. АДСОРБЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ УНТ БИОПОЛИМЕРАМИ

2.3.1. Углеродные нанотрубки, модифицированные хитозаном и белком бычьим сывороточным альбумином

На рисунке 3 представлена ПЭМ микрофотография исходных одностенных углеродных нанотрубок, используемых в работе.

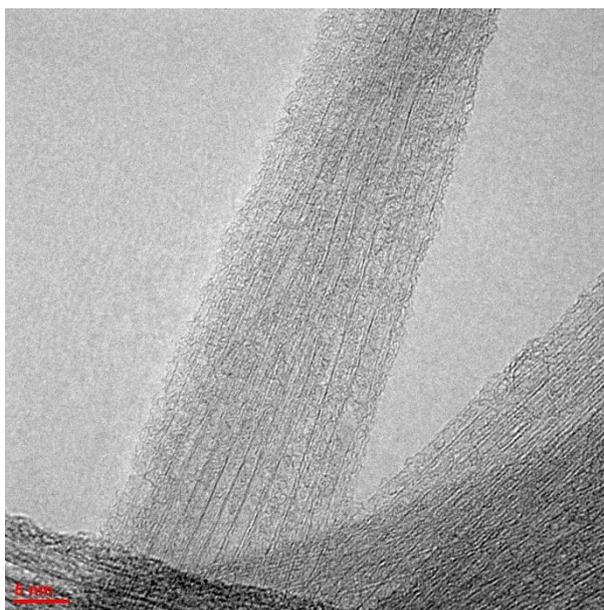


Рисунок 3. ПЭМ изображение одностенных углеродных нанотрубок.

На рисунке 4 приведена дифрактограмма исходных одностенных углеродных нанотрубок.

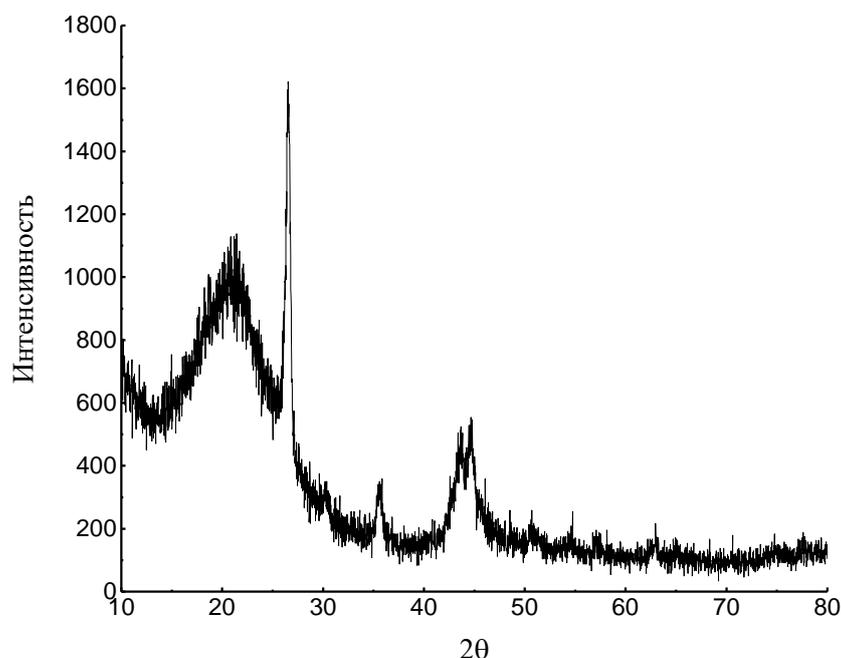


Рисунок 4. РФА одностенных углеродных нанотрубок.

УНТ использовали для получения адсорбционных комплексов с органическими веществами. В качестве биополимеров мы выбрали белок бычий сывороточный альбумин (БСА) (Fraction V modified, Biowest США) с молекулярной массой 66.5 кДа и полисахарид хитозан (Aldrich) со средней молекулярной массой 50 и 210 кДа и степенью деацетилирования 65% и 68% соответственно (рисунок 5). Степень деацелирования определили с помощью титрования водным раствором NaOH (0.1M) по методике, описанной в работе [241].

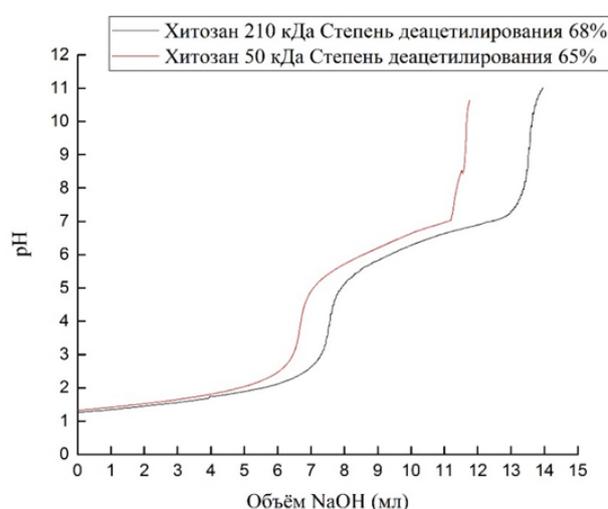


Рисунок 5. Кривые титрования хитозана различной средней молекулярной массы.

Для определения количества адсорбированных биополимеров нами применён

метод радиоактивных индикаторов, который заключается в получении меченого тритием хитозана и БСА по методу термической активации трития и проведению адсорбционных экспериментов с известной радиоактивностью водных растворов биополимеров.

К водному раствору биополимера добавляли раствор меченого тритием хитозана (или белка) с известной концентрацией и удельной радиоактивностью. Итоговая концентрация биополимера варьировалась в диапазоне от 0.2 до 8.0 г/л, удельная радиоактивность раствора - от 2.0 до 3.6 мкКи/мл. В полученный раствор вносили известное количество УНТ ($5 \text{ мг} \pm 0.2 \text{ мг}$), суспензировали при обработке в УЗ-ванне «Град» в течение 10 минут при мощности 119 Вт и оставляли в воздушном термостате при $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ от двух до семи суток.

Осадок отделяли от надосадочного раствора центрифугированием (13400-21000 rpm, 15-30 мин). Измеряли радиоактивность раствора по методу жидкостной сцинтилляционной спектрометрии отбором аликвоты в сцинтилляционную жидкость Optiphase HiSafe-III. Твёрдую фазу промывали деионизированной водой (2 x 1 мл). На каждой стадии промывки измеряли радиоактивность надосадочного раствора и отбирали надосадочную жидкость. После последней стадии промывки к образцам вносили по 1 мл воды, суспензировали и выдерживали в термостате при $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение двух-четырёх суток.

Для определения количества прочно связанного с поверхностью УНТ биополимера использовали методику кислотного разложения хитозана при нагревании. Для этого осадок переносили в стеклянный флакон, добавляли 1 мл 53% масс. HNO_3 , герметично закрывали флакон крышкой и нагревали в течение 1 ч до температуры кипения. Затем выдерживали 1 ч для остывания до комнатной температуры. Потерю раствора из флакона в процессе нагревания определяли по изменению массы флакона, и она не превышала 2%.

Для определения взаимного влияния белка и хитозана на процесс адсорбции биополимеров на УНТ использовали методику последовательного модифицирования нанотрубок этими веществами. К одностенным УНТ, с известным количеством адсорбированного альбумина или хитозана вносили по 1 мл водного раствора хитозана 210 кДа (от 0.5 до 5.0 г/л, удельная радиоактивность каждого

образца 3.7 мкКи/мл) или по 1 мл водного раствора БСА (от 0.2 до 5.0 г/л, удельная радиоактивность каждого образца составила 2.0 мкКи/мл) соответственно. Дальнейший ход адсорбционного эксперимента аналогичен методике индивидуального модифицирования УНТ биополимерами, описанный в начале данного пункта.

На рисунке 6 представлена ПЭМ микрофотография модифицированных альбумином одностенных углеродных нанотрубок.

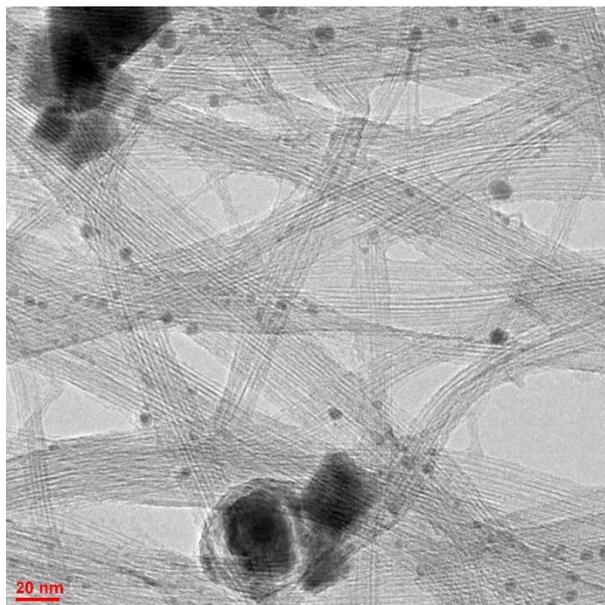


Рисунок 6. ПЭМ изображение модифицированных БСА одностенных углеродных нанотрубок

2.4. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ОКСИДА ГРАФЕНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ТЕРМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ТРИТИЯ

Меченные тритием БСА, хитозан, получали с помощью метода термической активации трития [22,23]. Методика получения меченного тритием олигопептида даларгина (тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат) («Эллара», Россия), БСА, лизоцима предварительно адсорбированных на углеродных наноматериалах (п. 2.4.2-2.4.5) разработана в данной работе. Предложено использовать метод ТАТ для получения ОГ с предельно высокой радиоактивностью, что позволит его использовать как компонент атомных батарей, методика приведена в п. 2.2.5 настоящей работы.

2.4.1. Методика введения трития

Водный раствор (или суспензия), содержащий(ая) 0.15-0.5 мг вещества, равномерно наносили на стенки стеклянного цилиндрического реакционного сосуда, замораживали жидким азотом и высушивали с помощью лиофилизации. Затем сосуд с готовой мишенью присоединяли к вакуумной установке для работы с газообразным водородом. Воздух из системы предварительно откачивали с помощью форвакуумного насоса, с последующим доведением до остаточного давления (0.01 Па) с помощью диффузионного ртутного насоса. В момент установления равновесного давления в системе реакционный сосуд заполняли газообразным тритием до давления 0.5 Па (эксперимент при 77 К) или 1.2-1.5 Па (эксперимент при комнатной температуре). Для этого реакционный сосуд охлаждали жидким азотом целиком или только его доньшко. Вольфрамовую спираль-атомизатор, расположенную в центре реактора, нагревали с помощью электрического тока до 1850 – 2000 К в течение 10 - 60 с. Выбор времени обработки атомарным тритием, температуры спирали, число напусков газа в систему обусловлен природой вещества, которое используем в качестве метки, и целей эксперимента. По истечении процесса изотопного обмена с газообразным тритием мишень смывали со стенок реакционного сосуда водой (или водно-спиртовой смесью), измеряли начальную радиоактивность и после избавлялись от лабильной метки многократным растворением (суспензированием) образца в протонных растворителях и последующим упариванием на роторном испарителе/лиофильной

сушки. При необходимости проводили очистку продукта с помощью хроматографии или диализом.

2.4.2. Методика введения трития в комплекс даларгин-углеродный наноматериал: ОГ, ОГ_{восст.}, УНТ

На первом этапе проводили химическое восстановление ОГ аспарагиновой аминокислотой согласно п. 2.2.1. Далее к 1 мл метанольного раствора даларгина (0.15 г/л) вносили навески углеродного материала (5 мг), суспензировали при УЗ-обработке и выдерживали в термостате в течение суток при 25 °С. Распределяли суспензию на стенки реакционного сосуда. Последующие этапы работы представлены в п. 2.4.1 (0.5 Па, 10 с, T_w 1850 К, охлаждение стенок реакционного сосуда при 77 К).

Для оценки распределения радиоактивной метки по аминокислотным остаткам пептида необходимо провести тотальный кислотный гидролиз меченного соединения без предварительного удаления углеродного материала и последующей дериватизацией аминокислотных остатков фенилизотиоцианатом (ФИТЦ) [244].

Образцы меченного тритием даларгина (³H)Даларгин), нанесенного на различные углеродные наноматериалы после удаления лабильного трития лиофилизацией, подвергались тотальному кислотному гидролизу при нагреве в запаянных ампулах (155 °С, 60 мин) с последующей дериватизацией ФИТЦ. Разделение дериватов провели при помощи обращенно-фазовой хроматографии. Разделение дериватов аминокислот провели методом ВЭЖХ на хроматографе Waters (США) на колонке C-18 NovoPark (градиент буфера AccQ Tag Eluent (Waters) и 60 % ацетонитрила в воде, скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 260 и 246 нм). Фракции элюата собирали и измеряли в них радиоактивность. На рисунке 7 представлен типичный профиль радиоактивности элюата.

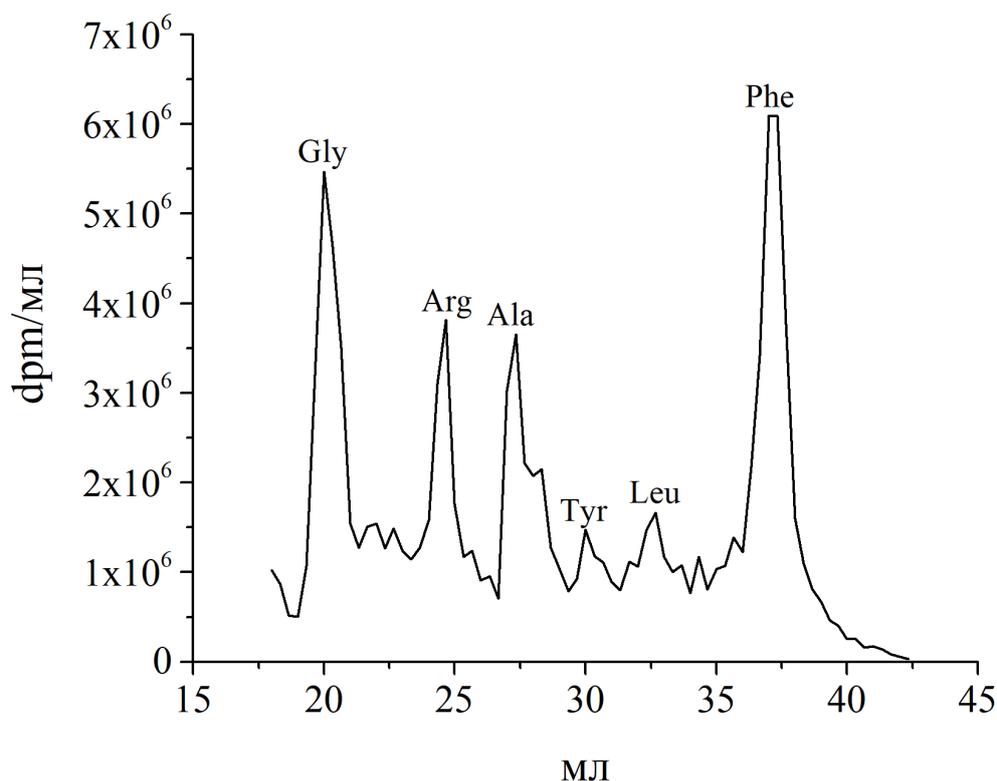


Рисунок 7. Хроматографический профиль радиоактивности элюата при анализе ФИТЦ-derivатов аминокислот (анализ образца [^3H]даларгина, нанесенного на ОГ).

В результате анализа находили удельную радиоактивность аминокислот и определяли распределение трития по аминокислотным остаткам даларгина [214].

2.4.3. Методика введения трития в БСА, предварительно адсорбированного на ОГ

К навескам ОГ (2.25 ± 0.25 мг) вносили заранее приготовленные водные растворы БСА в диапазоне концентраций 0.2-2.3 г/л с удельными радиоактивностями 1-12 мкКи/мл. Суспензировали смесь, аккуратно перемешивая без УЗ-обработки и оставляли при 25 °С в воздушном термостате в течение трёх суток. Дальнейшие этапы отделения твердой фазы и промывки водой аналогичны адсорбционным экспериментам п. 2.3.1, но без кислотного разложения белка и без дополнительной модификации хитозаном.

Твердую фазу ОГ с прочно связанным белком доводили до 1 мл деионизированной водой, наносили на стенки реакционного сосуда и обрабатывали атомарным тритием по методике п. 2.4.1. (1820 К; 1.5 Па; 10 с; 1 напуск; охлаждение только доньшка реакционного сосуда при 77 К). Смыв со стенок реакционного

сосуда 7 мл водно-метанольной смесью ($H_2O : MeOH = 3 : 4$). После удаления лабильной метки проводили тотальный гидролиз, аналогичный п. 2.4.2, но без предколоночной дериватизации. Разделение аминокислотных остатков гидролизата проводил к.х.н., с.н.с. Ксенофонтов А.Л. на аминокислотном анализаторе Hitachi L-8800 (Япония) с постколоночной дериватизацией нингидрином, регистрация поглощения при 570 и 440 нм. В качестве подтверждающего анализа измеряли радиоактивность фракций элюата на жидкостном сцинтилляционном счётчике RackBeta 1215.

2.4.4. Методика введения трития в лизоцим, предварительно адсорбированный на ОГ

Приготавливали три адсорбционные системы. По 200 мкл водной суспензии ОГ (2 г/л) вносили в заранее приготовленные водные растворы лизоцима (исходный раствор 1.7 г/л) с известной удельной радиоактивностью каждого (0.48 мкКи/мл) в таком количестве, чтобы суммарная концентрация лизоцима в образцах составила 0.17, 0.5, 1.0 г/л, а объём каждой суспензии равен 1 мл. Образцы выдерживали в термостате (25 °С, 21 ч). Центрифугировали (13400 rpm, 15 мин), измеряли радиоактивность надосадочного раствора и промывали водой по методике, аналогичной п. 2.3.1., но с выдержкой в воде в течение 7 суток после последней стадии промывки осадка.

Подготавливали мишени ОГ с прочно связанным лизоцимом и в качестве образца сравнения мишень из водного раствора лизоцима (1.06 г/л) без фазы оксида графена. Изотопный обмен с газообразным тритием осуществляли по п. 2.4.1. (1840 К; 1.4 Па; 10 с; 1 напуск; охлаждение доньшка сосуда 77 К). Смыв со стенок реакционного сосуда 4 мл водно-этанольной смесью ($H_2O : EtOH = 2 : 2$). Последующие этапы эксперимента аналогичны п. 2.4.3.

2.4.5. Определение ферментативной активности лизоцима, адсорбированного на ОГ

Из водного раствора лизоцима (5.18 г/л) приготавливали четыре образца объемом 2.76 мл каждый, с исходной концентрацией белка 0.2-1.9 г/л. В каждый образец вносили по 734 ± 4 мкл водной суспензии ОГ (1.89 г/л). Инкубировали в течение 45 часов при комнатной температуре. Центрифугировали (6500 rpm, 15 мин)

и отбирали надосадочную жидкость. По измерению оптической плотности раствора (при λ 280 нм) определяли содержание белка в суспензии и в растворе.

Анализ на ферментативную активность лизоцима на лизис лиофилизированных клеток *M. luteus* проводили с помощью турбидиметрического метода [245,246]. Уменьшение оптической плотности суспензии клеток под действием лизоцима связана пропорциональной зависимостью со скоростью (dA/dt) уменьшения количества клеток и может служить характеристикой активности белка.

Приготавливали суспензию *M. luteus* в воде (4.9 ± 0.2 г/л), в кварцевую кювету вносили 950 мкл воды и 30 мкл суспензии клеток. Вначале кювету термостатировали при 37 °С в течение 5 мин и после определения фонового осаждения клеток в отсутствие лизоцима – вносили 20 мкл надосадочной жидкости, содержащей свободный лизоцим после инкубирования. Далее твердую фазу ОГ с адсорбированным лизоцимом отмывали в воде и на спектрофотометре измеряли содержание лизоцима в промывной воде, определяли количество лизоцима (0.13-0.44 мг), прочно связанного с ОГ. Доводили водой суспензию ОГ с прочно связанным лизоцимом до 3 мл и измеряли ферментативную активность лизоцима, адсорбированного на ОГ. Для сравнения ферментативной активности свободного лизоцима с лизоцимом, адсорбированным на ОГ, был проведен калибровочный эксперимент для определения ферментативной активности свободного лизоцима в отсутствие ОГ.

2.5. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЬБУМИНА С ОКСИДОМ ГРАФЕНА

В настоящем разделе диссертации приводится методическая часть компьютерного моделирования по взаимодействию белка бычьего сывороточного альбумина с оксидом графена. На рисунке 8 представлена блок-схема программ и подготовки файлов к расчету. В пунктах 2.5.1 – 2.5.3 представлены основные этапы работы.

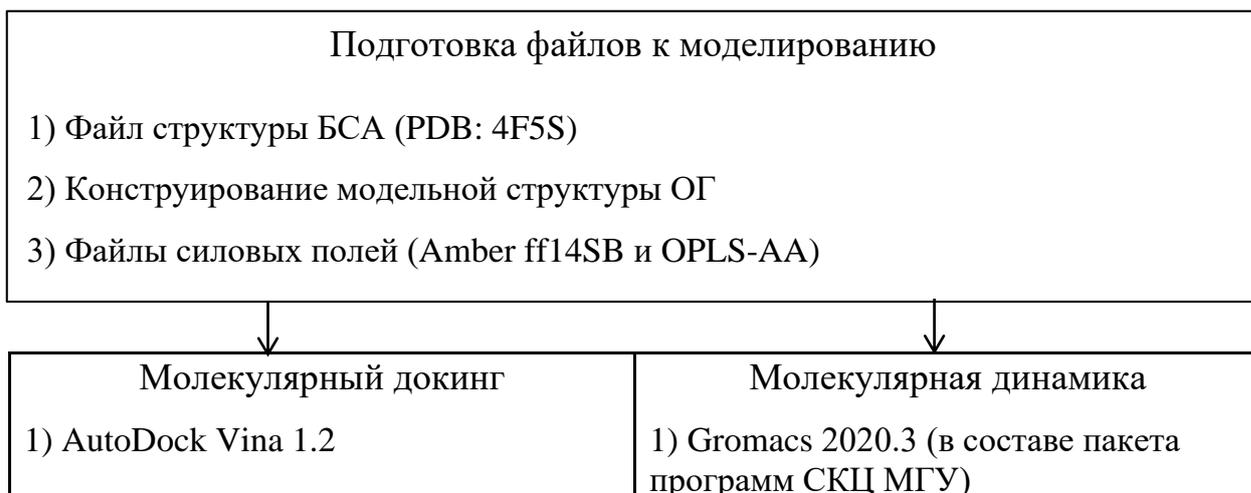


Рисунок 8. Блок-схема проведения компьютерного моделирования.

2.5.1. Методика подготовки файлов к проведению компьютерного моделирования

2.5.1.1. Подготовка файла структуры белка БСА

Модельная pdb-структура БСА получена из базы данных белковых структур (<https://www.rcsb.org/structure/4f5s>). В среде программы UCSF Chimera 1.15 [247] удаляли все лишние структуры, не являющиеся белком (молекулы растворителя и лиганда), а также в молекуле БСА оставляли только цепь А. Далее геометрию структуры оптимизировали в силовом поле AMBER ff14SB с добавлением недостающих атомов водорода и заряда белковой структуры по методу Gaisteger.

2.5.1.2. Подготовка файла структуры ОГ для молекулярного докинга

Конструирование файла структуры оксида графена с последующей оптимизацией геометрии проводили с помощью пакета программ ChemBioDraw/3D Ultra 11.0.2. Поскольку для молекулярного докинга в программе AutoDock Vina 1.2

структура молекулы лиганда ограничена 100 атомов тяжелее водорода, то брутто-формула оксида графена, применяемого в молекулярном докинге, имеет следующий вид $C_{(73\div 76)}H_{(30\div 34)}O_{(24\div 27)}$, площадь молекулы составляет $\sim 3.3 \text{ нм}^2$. Молекула ОГ представлена в виде монослоя атомов sp^2 -гибридизованного углерода с наличием эпокси-, гидроксильных и карбоксильных групп с учётом структурных дефектов Стоуна-Уэйлса. Оптимизацию геометрии структуры проводили методом молекулярной механики в силовом поле MMFF94 (500000 итераций, grad 0.001) [248].

2.5.1.3. Подготовка файлов для моделирования методом молекулярной динамики

В рамках настоящего диссертационного исследования методом молекулярной динамики оценено взаимодействие оксида графена с БСА в водной среде в условиях, аналогичных экспериментальным. Было получено несколько структур ОГ по методике, аналогичной предыдущему пункту, но с большим числом атомов. Первую модель использовали для определения частичных зарядов атомов и длин связей, рассчитанных с помощью полуэмпирического подхода квантовой химии в программе MORAC2016 [249], предварительно установленной в интерфейс программы ChemBio3D Ultra 11.0.2. Параметры расчета в программе MORAC2016 приведены в приложении 2. Первая модельная структура имеет следующий вид $C_{324}(COOH)_{10}(OH)_{56}(-O-)_{28}$ (соотношение C:O = 3.2:1) с площадью поверхности углеродного листа $\sim 9 \text{ нм}^2$. Гипотетическую модель структуры ОГ построили по данным элементного состава, приведенного на сайте производителя (<https://www.cheaptubes.com/product/single-layer-graphene-oxide/>), и по ИК-спектроскопии (п.2.1.2), по которой определен функциональный состав поверхности ОГ. Похожие структуры используют в других работах [250,251]. Для проведения расчетов с помощью молекулярной динамики использовали вторую модельную структуру ОГ с аналогичным соотношением функциональных групп, молекулярная формула которой $C_{8070}(COOH)_{247}(OH)_{1386}(-O-)_{691}$ (площадь поверхности углеродного листа $\sim 225 \text{ нм}^2$, соотношение C:O = 3.2:1), сохранили файл координат в *.mol2*-формате и последующей конвертацией в программе PyMol [252] в *.pdb*-формат.

Файл структуры БСА получали по методике, описанной в п. 2.5.1.1, однако предварительную оптимизацию структуры белка в силовом поле AMBER ff14SB не

проводили. Сохранили как файл *4f5s.pdb*. Минимизацию осуществляли в силовом поле OPLS-AA [253] уже в самой программе Gromacs.

Перед моделированием необходимо подготовить специальные текстовые исполняемые файлы в *.mdp*-формате (приложение 1). Подбор параметров расчета сделали на основе данных, представленных в руководстве по молекулярно-динамическому расчету в программе Gromacs 2022.4 [254]. Наиболее полно раскрыто теоретическое обоснование в выборе метода в следующей работе [255].

Важный этап перед запуском моделирования состоит в подготовке файлов топологии оксида графена и белка. В файлах топологии указаны длины связей, значения межатомных и двугранных углов. Для белковых структур процесс формирования файла протекает в автоматическом режиме с помощью команды *gmx pdb2gmx*, однако для формирования файла топологии оксида графена необходимо внести данные о длинах межатомных связей и частичных зарядов атомов (получены в программе MORAC2016) в текстовый файл «*atomname2type.n2t*», расположенный в директории выбранного силового поля.

Пример заполнения файла «*atomname2type.n2t*» представлен в приложении 3.

2.5.2. Методика проведения молекулярного докинга в программе AutoDock Vina 1.2

В работе исследовали межмолекулярное взаимодействие между белком БСА и углеродным наноматериалом ОГ. Предполагается, что изначально неизвестно место стыковки лиганда (оксида графена) с белком, поэтому применяли метод «слепого» молекулярного докинга и в качестве программы выбрана *AutoDock Vina* версии 1.2 [256]. На первом этапе с помощью *Discovery Studio Visualizer* определяли координаты возможных сайтов связывания БСА с ОГ. Получили координаты расчетной области: $x_{\text{мин}} y_{\text{мин}} z_{\text{мин}}$ (-8.68; 9.58; 85.67) и $x_{\text{макс}} y_{\text{макс}} z_{\text{макс}}$ (31.73; 20.29; 123.8), которые собой область, охватывающую расположение всей молекулы белка в трёхмерном пространстве. Размер расчетной области представляет собой куб стороной 156 Å, выбор такого большого значения обусловлен поиском возможного места стыковки между белком и оксидом графена в условиях «слепого» докинга. Далее подготовили файлы структур белка и лиганда (п. 2.5.1.1 - 2.5.1.2), сохранив данные структур в *.pdbqt* и *.sdf*-формате соответственно. В текстовом файле с *.txt*-

расширением построчно вносили данные координат и размера сторон расчетной области. Установили рН и тип растворителя в системе, создали параметризованную область (.gpf-файл), добавили модель растворителя (приложение 4).

2.5.3. Методика проведения молекулярно-динамического расчета в программе Gromacs с использованием ресурсов СКЦ МГУ

Методом молекулярной динамики [237] оценено взаимодействие оксида графена и БСА в водной среде. Блок-схема основных этапов моделирования приведена на рисунке 9.



Рисунок 9. Основные этапы проведения компьютерного моделирования по методу молекулярной динамики.

В рамках настоящей работы рассмотрено несколько алгоритмов термостата и

баростата. В первом случае динамика осуществляется в неканоническом ансамбле (алгоритм Берендсена для термостата и баростата), во втором случае реализуется канонический ансамбль – алгоритмы Нозе-Гувера для термостата и Паринелло-Рамана для баростата [257–260].

Параметры основного моделирования взаимодействия БСА с ОГ для первого случая: время моделирования 100 нс, шаг одной итерации 2 фс, алгоритм термостата - Берендсена, температура термостата 300К, алгоритм баростата - Берендсена, время термостатирования и утряски растворителя по 100 пс соответственно, тип растворителя - вода (трехточечная модель TIP3P), количество молекул воды 414521, 0.15М буферный раствор NaCl, расчетная область – куб, объемом 12932 нм³.

Для второго случая взаимодействия БСА с ОГ применяли следующие параметры: время моделирования 100 нс, шаг одной итерации 2 фс, алгоритм термостата - Нозе-Гувера, температура термостата 300К, тип баростата - Паринелло-Рамана, время термостатирования и утряски растворителя по 100пс соответственно, тип растворителя вода (трехточечная модель TIP3P), количество молекул воды 414536, 0.15М буферный раствор NaCl, расчетная область – куб, объемом 12936 нм³.

Подготовительный этап состоит из процесса конвертации файла структуры ОГ (полученного по п. 2.5.1.3) из *.pdb* в *.gro*-формат. Далее подготовили файлы топологии структуры ОГ и белка БСА (п. 2.5.1.3), в процессе работы программы выбрали рабочее силовое поле (OPLS-AA), а также среду растворителя, в котором планируется расчет (water, TIP3P). В файле главной топологии белка (*topol.top*) указали ссылки на силовые поля и на файл топологии оксида графена. Объединили файлы координат белка и оксида графена в единый текстовый файл (*complex.gro*).

Ограничение положения оксида графена связано с тем, что в реальных условиях эксперимента линейные размеры листа ОГ существенно больше размеров белка, таким образом в моделировании предполагается полная подвижность молекулы БСА при ограниченной подвижности ОГ.

Определение области моделирования. В настоящей работе выбрали кубическую геометрию с размером грани ~23.5 нм. При данных параметрах структуры БСА и оксида графена расположены внутри расчетной области таким

образом, что не ограничены в свободном перемещении внутри неё.

Минимизацию свободной энергии системы без растворителя осуществляли процедурой предварительной обработки, создав текстовый файл *minim.mdp* (приложение 1), с последующей активации программы.

Далее **добавляем растворитель и буферный раствор**. Заполнили свободное пространство расчетной области молекулами растворителя, добавив 414521÷414536 молекул воды. Суммарный заряд белка БСА и ОГ имеет отрицательное значение [88,261], а для получения корректных данных электростатического взаимодействия - система должна иметь общий нейтральный заряд. Для компенсации отрицательного заряда системы в расчетную область вводим 0.15 М буферный раствор хлорида натрия.

Повторяем этап **минимизации свободной энергии**, но уже с учетом растворителя и буферного раствора.

Система состоит из структуры белка, оксида графена, растворителя и ионов буферного раствора. **Определили положение систем**, создав индекс-файл по ограниченному положению системы «БСА-ОГ» и системы «вода-ионы». Этот этап необходим для того, чтобы в процессе термостатирования и баростатирования (утрямки растворителя) белок и оксид графена не подвергались структурным изменениям.

В предпоследнем этапе перед проведением молекулярно-динамического моделирования провели этапы **предварительного термостатирования** до температуры 200 К, **термостатирования (NVT) и утряски (NPT)**. Растворитель равномерно заполняет всю расчетную область. Для работы необходимы исполняемые файлы *pr.mdp*, *nvt.mdp* и *npt.mdp* (приложение 1).

Заключительным этапом является запуск основного моделирования.

В приложении 5 перечислены набор команд, применяемых на всех этапах моделирования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ПОЛУЧЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА

В данном разделе приведены результаты химического восстановления оксида графена β -меркаптоэтанолом, водой в гидротермальных условиях, аминокислотами, а также действием атомарного дейтерия и трития. Выбор условий и основные этапы проведения эксперимента были опубликованы в работе [216]¹.

При использовании в качестве восстановителей ОГ воды или растворов все образцы изменили свой цвет с коричневого (исходного ОГ) на черный (рисунок 10).

При воздействии на твердые образцы ОГ атомарного водорода (дейтерия или трития) цвет препаратов также менялся на черный только при длительной обработке (более 20 мин).

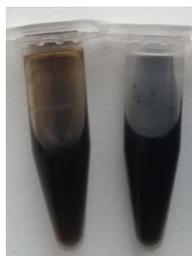


Рисунок 10. Водные суспензии исходного (слева) и восстановленного оксида графена (справа).

Образцы исследованы с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. На рисунке 11 представлены Рамановские спектры исследуемых образцов восстановленного и исходного (H_2O 90 °C) ОГ.

¹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Bunyaev V.A., Chernysheva M.G., Popov A.G., Grigorieva A.V., Badun G.A. Comparison Analysis of Graphene Oxide Reduction Methods // Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures 2020. V. 28. P. 191–195 (Импакт-фактор(SJR): 0.362) (25%)

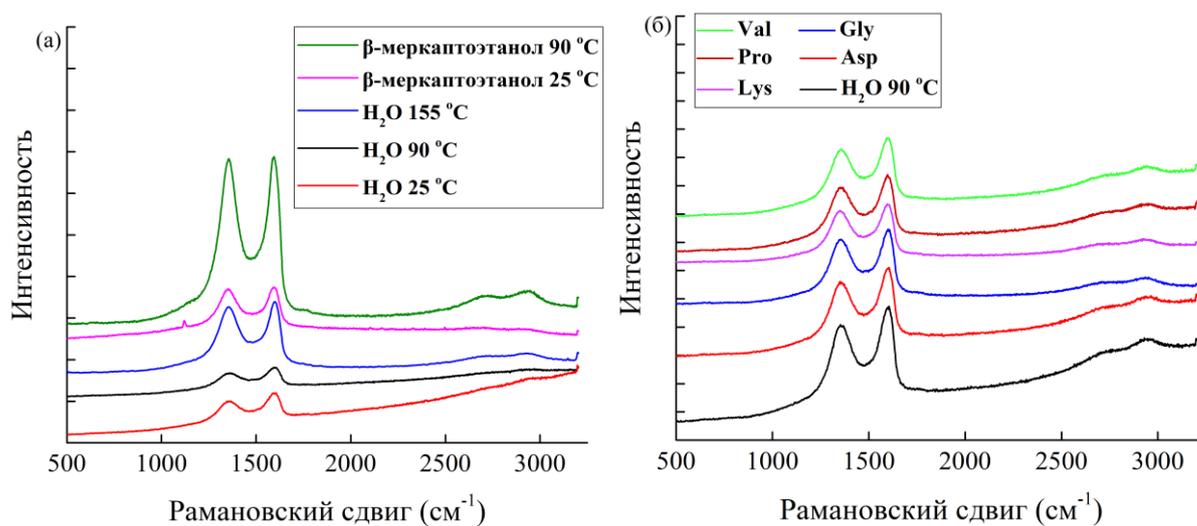


Рисунок 11. Спектры комбинационного рассеяния ОГ и ОГвосст., восстановленные водой (а, б), β-меркаптоэтанолом (а), аминокислотами (б).

Отношения интегральной интенсивности (I_D/I_G) приведены в таблице 2. В качестве контрольного образца выбрана водная суспензия оксида графена, выдержанная на водяной бане (3 ч, 90 °C).

Таблица 2. Химическое восстановление оксида графена.

| Восстановитель | I_D/I_G | Параметры анализа |
|---------------------------------|-------------|--|
| Валин | 1.27 | 514 нм, х50 кратность увеличения, мощность лазера 10% от максимальной, время экспозиции 10 с |
| Пролин | 1.22 | |
| Лизин | 1.27 | |
| Глицин | 1.49 | |
| Аспарагиновая кислота | 1.27 | |
| Вода (среда), 155°C | 1.45 | |
| β-меркаптоэтанол, 25 °C / 90 °C | 1.35 / 1.38 | |
| Контрольный образец | 1.20 | |

Характеристические D- и G-моды расположены в области 1352 и 1598 см⁻¹ соответственно. Увеличение отношения I_D/I_G максимумов этих областей для образцов оксида графена, восстановленного в воде (в гидротермальных условиях) и β-меркаптоэтанолом свидетельствует о снижении доли кислородсодержащих функциональных групп с уменьшением среднего размера sp² доменов в процессе

образования восстановленного ОГ. Полученные данные согласуются с работой [65], в которой применен метод гидротермального восстановления оксида графена. Рост I_D/I_G в приведенной статье составил с 1.08 (для исходного ОГ) до 1.45 для восстановленного образца (140 °С, 6 ч). В нашем случае аналогичное изменение I_D/I_G с 1.16 до 1.45 было достигнуто за 1 ч нагрева до 155 °С.

В данной работе показано, что восстановление ОГ β-меркаптоэтанолом в кислой среде (смесь концентрированных трифторуксусной кислоты : соляной кислоты : β-меркаптоэтанола = 2 : 1 : 0.001 об%) возможно даже при комнатной температуре и нагрев до 90 °С необязателен, так как даёт практически одинаковый результат: отношение I_D/I_G при 25 °С и при 90 °С изменялось до 1.35 и 1.38 соответственно. Восстановительные свойства β-меркаптоэтанола связаны с наличием тиольной группы, возможно взаимодействие с эпоксидными группами ОГ по механизму S_N2 нуклеофильного замещения с последующим термическим отщеплением восстановителя [262]. В нашей работе впервые применен β-меркаптоэтанол для химического восстановления ОГ.

Из таблицы 2 видно, что наилучшими восстанавливающими свойствами обладает глицин. Для лизина, аспарагиновой кислоты и валина получены практически одинаковые результаты, а пролин в наименьшей степени способствует восстановлению ОГ. Важно отметить, что наилучший результат получен для глицина - самой простой α-аминокислоты, у которой отсутствует боковая цепь. Различие в боковых цепях лизина, аспарагиновой кислоты и валина никак не сказалось на способности восстанавливать ОГ. То есть присутствие боковой цепи ухудшает восстановительную способность аминокислот, а ее химический состав - только углеводородная цепь или наличие в ней амино- или карбоксильной групп уже не влияет на результат. Отличие пролина в том, что азот α-положения относительно карбоксильной группы представляет собой имин, входящий в состав пирролидинового кольца. Таким образом можно сделать вывод, что восстановление ОГ происходит прежде всего за счет реакции нуклеофильного замещения, в которую вступают α-аминогруппы аминокислоты с эпокси- и гидроксильными группами, входящими в состав структуры оксида графена. Для аминокислот с дополнительным боковым фрагментом результат ухудшается, вероятно, из-за стерических затруднений в образовании переходного реакционного комплекса. Отчасти

полученные в данной работе результаты согласуются с данными других работ, в которых проводились попытки использовать аминокислоты в качестве восстановителей ОГ, однако систематическое исследование большого набора аминокислот сделано впервые.

Следующим этапом была оценена седиментационная устойчивость водной суспензий восстановленного глицином ОГ при различных значениях pH среды. На рисунке 12 показано изменение ζ -потенциала водной суспензии ОГ при изменении pH.

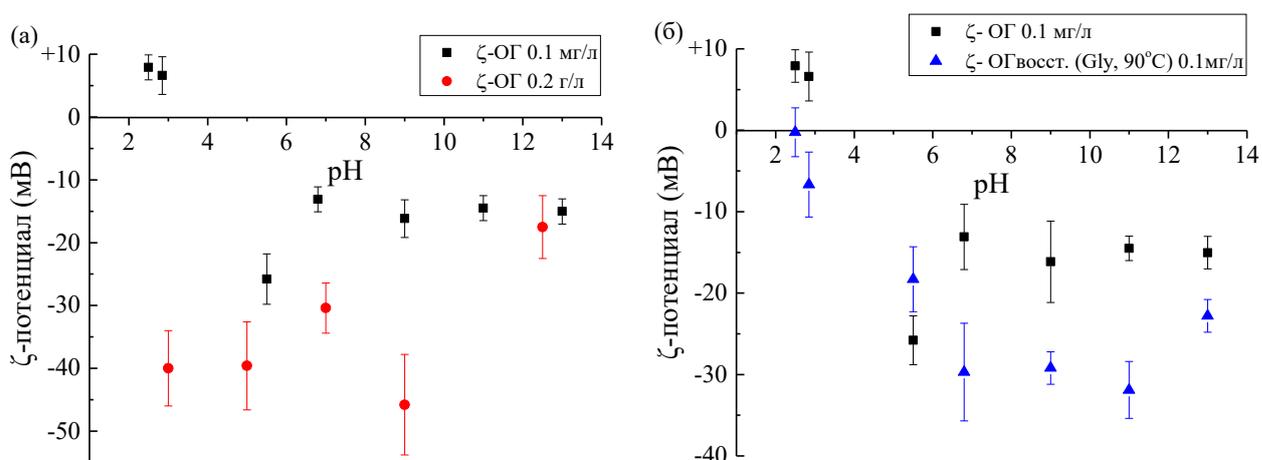


Рисунок 12. ζ -потенциал при pH 2.5-13 водной суспензии ОГ различной концентрации (а, б); восстановленного глицином ОГ (б).

Известно, что оксид графена и его восстановленный субстрат чувствительны к pH среды, в которой находятся суспензии. Нами изучена устойчивость суспензии ОГ при двух концентрациях от pH водных средах в диапазоне pH 2.5 - 13, а также устойчивость суспензии восстановленного глицином оксида графена в тех же условиях (рисунок 12). Известно, что стабильность коллоидных систем связана с балансом сил между Ван-дер-Ваальсовым взаимодействием, способствующему агрегации, и дисперсионными силами электростатического отталкивания.

Для оксида графена (0.2 г/л) наибольшее значение электрокинетического потенциала наблюдается в слабощелочной области pH 9. В кислой среде суспензия проявляет умеренно-хорошую стабильность (-40 ± 5 мВ). Наблюдаемое снижение седиментационной устойчивости в области pH 9 - 12.5 возможно связано с сжатием двойного электрического слоя с ростом ионной силы среды. Стоит отметить, что для ОГ меньшей концентрации (0.1 мг/л) суспензия остаётся нестабильной во всей

области pH.

Стабильные суспензии восстановленного оксида графена образуются только в щелочной среде (pH 8 - 11) и максимальное значение ζ -потенциала составляет -35 мВ, что коррелирует с данными литературы [263].

Предполагается, что седиментационная устойчивость суспензий ОГ и его восстановленного субстрата является следствием отрицательного заряда графенового листа из-за наличия кислородсодержащих функциональных групп на его поверхности.

Оценка изменения функционального состава поверхности синтезируемых образцов в процессе химического восстановления ОГ дана на основе данных ИК-спектроскопии (рисунок 13).

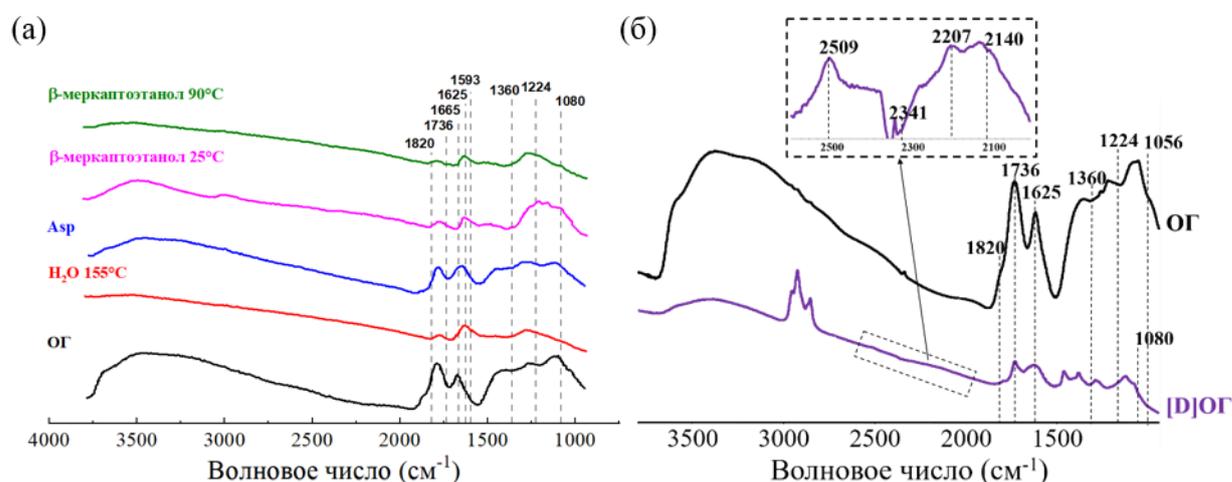


Рисунок 13. ИК-Фурье спектры оксида графена (ОГ) и восстановленного оксида графена (ОГвосст.) аспарагиновой кислотой, β -меркаптоэтанолом, водой (а); атомарным дейтерием (б).

Интерпретация экспериментальных данных анализа дана в соответствии с литературными источниками [78,264–267]. В исходном ОГ широкая полоса в области 3400 см^{-1} обусловлена колебаниями ОН-групп, пики при 1820 и 1736 см^{-1} свидетельствуют о присутствии С=О групп, а сигнал при 1625 см^{-1} обусловлен присутствием адсорбированной воды и С=С связей. Сигнал 1360 см^{-1} относится к колебаниям карбоксилов. Наличие связей С-О алкокси- и эпоксидных групп обуславливает полосы в областях $1230\text{--}1215\text{ см}^{-1}$ и $1080\text{--}1040\text{ см}^{-1}$.

В процессе восстановления ОГ аспарагиновой кислотой наблюдается сглаживание области 1820 см^{-1} , отвечающей за наличие С=О связей кето- и карбоксильных групп. Смещение полос в область 1593 см^{-1} связано с увеличением

C=C связей, что позволяет предположить протекание процесса восстановления оксида графена. Механизм восстановления ОГ аспарагиновой кислотой приводят авторы [69]. Как и в случае рассмотренного в работе [262] предполагается двухступенчатый механизм нуклеофильного замещения S_N2 и термическим отщеплением. На первой стадии амин аспарагиновой кислоты атакует электрофильный углерод связи C-O, вызывая его разрыв и последующим раскрытием цикла эпоксидной группы. Уходящая группа в форме алкоксида претерпевает превращение в спирт и воду.

В образцах оксида графена, восстановленного β -меркаптоэтанолом и в воде, наиболее четко выражен рост колебаний, соответствующих C=C связям (рис. 13а). Предполагается, что восстановление β -меркаптоэтанолом связано с переносом электрона к атому углерода графенового листа, расположенного рядом с протонированной OH_2^+ -группой с последующим высвобождением молекулы воды. На основании исчезновения полосы в области 1625 см^{-1} предложен данный механизм.

Под действием атомарного дейтерия при бомбардировке мишени оксида графена нанесенной тонким слоем на стенки реакционного сосуда протекает иной механизм процесса восстановления. В результате реакции наблюдается рост интенсивности сигналов в области $2930\text{-}2890\text{ см}^{-1}$, отвечающих за колебания $C_{sp^3} - H$ связей. В спектре наблюдаются неярко выраженные пики в области 2207 и 2140 см^{-1} , которые соответствуют связи $C_{sp^3} - D$. Характеристическим для связи $C_{sp^2} - D$ является пик в области 2341 см^{-1} , полученные данные согласуются с литературными [268]. Такая разница в интенсивности спектров поглощения для углерода разной гибридизации, связанного с дейтерием, может означать, что преимущественно введение дейтерия происходит в лабильные положения метки, чем образование связи $C_{sp^2} - D$ в процессе отрыва функциональной группы атомарным дейтерием от атома углерода в ароматическом фрагменте ОГ.

Химическое связывание дейтерия с углеродом в составе оксида графена может происходить по двум путям: изотопное замещение водорода и замещение функциональных групп (-OH, -COOH) при их элиминировании в процессе восстановления. Предполагается радикальный механизм реакции восстановления на основании снижения интенсивности сигнала в области колебания адсорбированной воды (1630 см^{-1}) и C=O связей. Последние, вероятно, восстанавливаются до $C_{sp^3} - H$

и ОН- связей. Наличие сигнала при 2509 см^{-1} отвечает за колебания OD-связей. Введение дейтерия в этих положениях вполне возможно при обработке ОГ атомами дейтерия, однако данные положения являются лабильными и при суспендировании препарата в протонном растворителе (в данной работе – в воде) будет происходить обратный изотопный обмен с протонами воды. Сохранение сигнала при 2509 см^{-1} означает, что восстановленный ОГ становится достаточно гидрофобным материалом, что затрудняет обмен. Такое наблюдение открывает перспективы для использования, восстановленного атомарным тритием ОГ как конденсированного носителя трития, о чем будет изложено в следующей главе диссертации.

Для определения того, насколько сильно изменились химические свойства ОГ при различных способах восстановления, и оценки применения таких материалов как потенциальных носителей трития в составе бетавольтаических батарей провели обработку атомами трития как исходного ОГ, так и его восстановленных форм.

Чтобы определить, влияет ли восстановление ОГ на его взаимодействие с атомарным тритием, полученные образцы восстановленного ОГ обработали атомарным тритием в условиях «кинетического режима», когда радиоактивность меченого продукта пропорциональна скорости реакции изотопного замещения водорода на тритий (продолжительность реакции 20 с, температура мишени 77 К, давление газа 0.5 Па). Данные по начальной радиоактивности различных форм ОГ и после удаления трития из лабильных положений молекул приведены в таблице 3.

Таблица 3. Радиоактивность меченого тритием оксида графена и его восстановленных прекурсоров.

| Образец | Общая радиоактивность (мКи) | После очистки от лабильного трития (мКи) | Условия эксперимента |
|---|-----------------------------|--|---|
| ОГ | 28.5 ± 5 | 4.6 ± 0.3 | масса мишени 0.3 мг, давление газа 0.5 Па, время реакции 20 с, температура атомизатора 2000 К, температура стенок сосуда 77 К |
| ОГ _{восст.} (Asp, 90°C) | 32.1 ± 2.7 | 3.78 ± 0.3 | |
| ОГ _{восст.} (β-меркаптоэтанол, 25 °C) | 28.4 ± 0.55 | 3.78 ± 0.55 | |
| ОГ _{восст.} (H ₂ O, 155 °C) | 26.5 ± 1.9 | 4.6 ± 0.06 | |

Предполагалось, что в результате восстановления оксида графена из-за

уменьшения количества кислородсодержащих групп и увеличения углерода в sp^2 гибридизации увеличится скорость связывания трития по связям С-Н. Однако оказалось, при восстановлении химический состав ОГ изменялся, величины начальной радиоактивности всех препаратов оказались близкими. Средняя величина с доверительным интервалом при 95 %-ной доверительной вероятности составила 28.9 ± 2.5 мКи. Также радиоактивность препаратов после удаления лабильной метки отличалась незначительно и описывается средней величиной 4.2 ± 0.4 мКи. Равенство начальной радиоактивности препаратов означает отсутствие влияния химического состава мишени на общую скорость связывания трития и хорошую воспроизводимость экспериментов. Труднее объяснить отсутствие влияния химического состава разных форм ОГ на скорость связывания трития по связям С-Н. Такое связывание происходит по двухступенчатому механизму с образованием промежуточного радикала вследствие трех реакций, инициированных атомарным тритием: отрыв атома водорода, присоединение атома трития к ароматическому ядру, удаление кислородсодержащей группы (-ОН, -СОО-). При восстановлении ОГ вклад этих реакций может изменяться, но уменьшение одной из них компенсировалось возрастанием другой. В результате суммарная скорость связывания трития оказалась близкой, то есть разные формы ОГ являются одинаково хорошими акцепторами атомарного трития.

В мягких условиях обработки атомарным тритием значения радиоактивности оказались близки (3.8 - 4.6 мКи) для образцов исходного ОГ, восстановленного аспарагиновой кислотой, β -меркаптоэтанолом и водой в гидротермальных условиях. По данным ИК-спектроскопии для всех образцов восстановленного ОГ отмечается снижение интенсивности сигналов пиков, в областях, отвечающих за наличие кислородсодержащих функциональных групп, с параллельным увеличением интенсивности сигналов С=С связи. Установлено, что в ходе изотопного обмена с атомарным дейтерием преимущественно образуются связи с sp^3 -гибридизованным углеродом, следственно, образование $C_{sp^2} - D$ связи в процессе отрыва кислородсодержащей функциональной группы атомарным водородом менее вероятен, и, как следствие, может объяснить низкую долю трития в нелабильных положениях молекулы.

Близкие значения радиоактивности образцов, восстановленных в разных

условиях, и исходного ОГ после обработки атомарным тритием может свидетельствовать о том, что выбор метода предварительного химического восстановления ОГ не влияет на долю нелабильного трития в конечном меченом продукте. Наличие адсорбированной воды на поверхности структур может также влиять на доступность для атомарного трития поверхности ОГ.

Таким образом, снижение доли нелабильного трития возможно объяснить: наличием адсорбированной воды на поверхности ОГ и его восстановленных прекурсоров, конкурирующим изотопным обменом с тритием в гидроксильных и карбоксильных группах, образующейся тритиевой воды в процессе гидрирования эпокси- и кето-, отрывом -ОН и -СООН групп и её последующее удаление в процессе выпаривания.

3.2. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОМЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА

Получение ОГ с высоким содержанием в нем трития открывает перспективы использования этого материала как компонента атомной батареи, сопряженного с полупроводниковым преобразователем энергии излучения за счет бетавольтаического эффекта [171,269,270]. Целью данной работы является поиск условий получения меченного тритием ОГ с максимально высокой удельной активностью, чтобы энерговыделение было достаточным для создания атомной батареи на основе этого материала. Материалы настоящей главы опубликованы в журнале «Радиохимия» [271]².

Оксид графена не имеет точной структуры, но известно, что в его состав входят эпоксидные, гидроксильные, кетонные и карбоксильные группы [272]. Такой состав обеспечивает возможность введения значительного количества трития в ОГ путем изотопного обмена или путем образования восстановленной формы [1,216]. Введение трития может быть осуществлено с помощью метода термической активации трития [1]. Введение трития в оксид графена интересен еще и тем, что графен-кремниевые диоды Шоттки уже изготовлены [273]. Более того, Амирмазлагани и соавторы предложили использовать уменьшенный гетеропереход ОГ-кремний для бетавольтаических батарей с ⁶³Ni [273]. Таким образом, сочетание физических и химических свойств оксида графена и введенного в него трития позволяет рассматривать самые различные технические решения его использования.

Несмотря на то, что ОГ представляет собой соединение переменного состава, и количество функциональных групп зависит от метода синтеза, для интерпретации результатов работы рассматривали структурный элемент (брутто-формула C₇₇H₄₂O₃₇, молекулярная масса 1558 г/моль), представленный на рисунке 14. По данным спецификации элементного состава (<https://www.cheaptubes.com/product/single-layer-graphene-oxide/>), составу функциональных групп (ИК-спектроскопии [216]) и на основе литературных

² При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Бадун Г.А., Буняев В.А., Чернышева М.Г. Получение высокомеченого оксида графена с помощью метода термической активации трития для использования в бета-вольтаическом элементе ядерной батареи // Радиохимия. 2024. Т. 66, № 2. С. 165–170. (Импакт-фактор: 0.739) (33%)

источников [250,251], рассматриваемый фрагмент ОГ приближен типичной структуре.

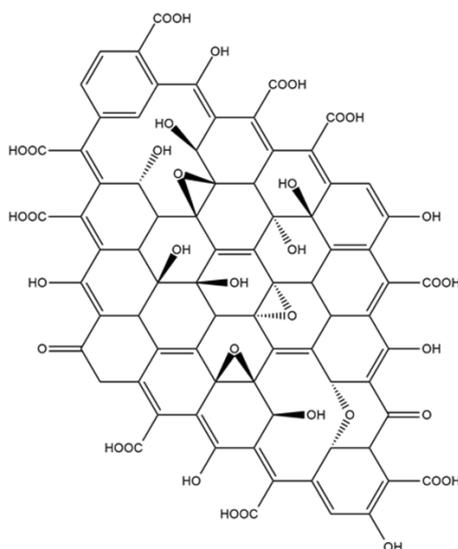


Рисунок 14. Типичный структурный фрагмент ОГ.

При изотопном обмене с атомарным тритием радиоактивная метка будет встраиваться как в лабильное (связи $O-^3H$), так и нелабильное ($C-^3H$) положение молекулы, одновременно возможно образование и тритиевой воды. Вследствие этого для интерпретации результатов рассматривали общую активность (A_0) меченного тритием препарата, в которой учитывается общий вклад активности трития во всех положениях, а также образующуюся тритиевую воду. Также рассматривали удельную активность ОГ после удаления тритиевой воды и трития их лабильных положений (A_1).

В случае охлаждения стенок реакционного сосуда жидким азотом (77 К) образующаяся тритиевая вода оставалась в составе мишени. В эксперименте при 295 К тритиевая вода конденсировалась на дне реакционного сосуда, и ее активность измеряли отдельно.

Применили несколько способов нанесения мишени нанокремниевой субстрата. В первом случае ОГ наносили непосредственно на поверхность кремниевой пластики, которая является элементом преобразования энергии излучения трития в атомной батарее. Во втором случае ОГ наносили тонким слоем на стенки реакционного сосуда. Основной плюс первой методики заключается в том, что насыщенный тритием материал уже находится в контакте с преобразователем, исключая стадию предварительного нанесения меченого препарата на поверхность

кремниевой пластины (0.64 см^2). Минусом необходимо отметить, что полученный «толстый» (0.94 г/м^2) слой мишени может снизить диффузию атомарного трития через слой ОГ, тем самым активность препарата будет снижена. Плюсом второго метода нанесения является большая доступность поверхности ОГ для атомарного трития (геометрическая площадь поверхности стенок реакционного сосуда 180 см^2 , толщина мишени 0.0056 г/м^2), однако после обработки тритием полученный материал потребуется затем перенести на поверхность полупроводникового преобразователя, что несколько осложняет технологический процесс.

Так как пробег β -излучения трития в веществе ограничен из-за низкой энергии излучения, толщина слоя ОГ, нанесенного на кремниевую пластину, должна составлять не более 1 г/м^2 . Поэтому в экспериментах с нанесением ОГ на кремниевые пластинки получали слои толщиной 0.94 г/м^2 .

Необходимо учитывать, что при использовании метода термической активации глубина проникновения реакционных атомов трития в твердое тело зависит от свойств исследуемого объекта и условий проведения реакции [274]. Поэтому в экспериментах с нанесением ОГ на стенки реакционного сосуда получали покрытие толщиной 5.6 мг/м^2 .

Если весь водород в ОГ заместить на тритий, то удельная активность препарата, структурный фрагмент которого представлен на рисунке 14, составит 0.78 Ки/мг для исходной массы ОГ и 0.74 Ки/мг с учетом увеличения массы препарата за счет замещения водорода на тритий. Возрастает доля трития, ковалентно связанного с ОГ по связям $\text{C-}^3\text{H}$ в процессе восстановления кислородсодержащих групп в реакции с атомарным тритием. Если образующаяся при этом тритиевая вода останется в составе ОГ, то удельная активность препарата также будет расти. Известно, что ОГ хорошо сорбирует воду – до 0.56 г на 1 г вещества (до 52 молекул воды на рассматриваемый структурный фрагмент) [275]. При связывании такого количества тритиевой воды удельная активность материала достигнет величины 1.09 Ки/мг с учетом массы тритиевой воды или 1.86 Ки/мг , если исходить из массы исходного ОГ. Если провести реакцию с атомарным тритием, то при замещении всего водорода на тритий и связывании тритиевой воды как продукта реакции в самом материале, удельная активность составит 1.50 Ки/мг с учетом увеличения массы материала или 2.64 Ки/мг в пересчете на исходную массу ОГ.

На рисунке 15 представлены зависимости изменения поверхностной удельной активности ОГ, нанесенного на кремниевую пластинку (1) и стенки сосуда (2), при увеличении времени обработки атомарным тритием при комнатной температуре мишени (температура стенок 295 К). Необходимо иметь ввиду, что здесь указана активность ОГ без учета тритиевой воды, конденсировавшейся на дне реакционного сосуда, которую в случае нанесения ОГ на кремниевые пластины не собирали.

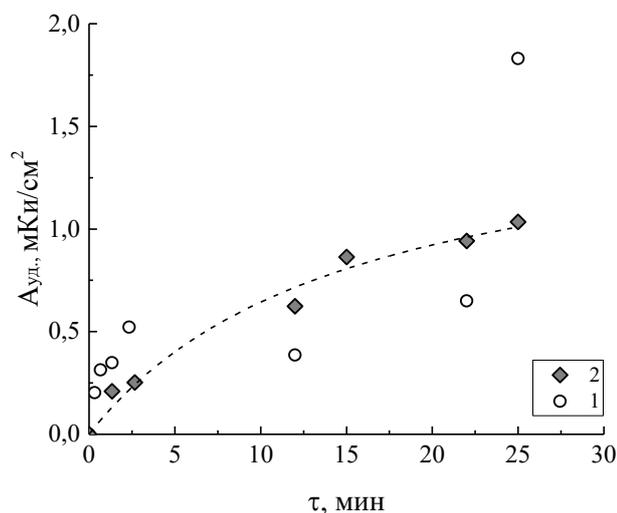


Рисунок 15. Зависимость поверхностной удельной активности ОГ, нанесенного на кремниевые пластинки, толщина слоя 0.94 г/м^2 (1), и стенки реакционного сосуда, толщина слоя 0.0056 г/м^2 (2), от времени обработки атомами трития при комнатной температуре.

Тенденция увеличения активности при увеличении продолжительности обработки атомами трития в целом выполнялась для ОГ, нанесенного на кремниевые пластины, хотя иногда наблюдались существенные расхождения с данными, полученными для ОГ, нанесенного на стенки сосуда. Возможно ухудшение воспроизводимости связано с техническими трудностями при подготовке препарата к введению трития. При таком способе нанесения ОГ образует плотный слой вещества, который мало проницаем для атомарного трития. Поэтому при нанесении ОГ на кремниевые пластинки слоем толщиной 0.94 г/м^2 в реакцию вступает только поверхностная часть мишени, и удельная активность ОГ недостаточна для применения в ядерной батарее.

Для достижения предельно высокой удельной активности гораздо эффективнее наносить ОГ непосредственно на стенки реакционного сосуда с получением покрытия толщиной около 5.6 мг/м^2 . Для поиска оптимальных условий рассмотрели

два температурных режима для мишени. В первом случае охлаждали стенки сосуда жидким азотом, а во втором – только дно сосуда, а стенки оставались при комнатной температуре (295 К). На рисунках 16 и 17 представлены зависимости изменения общей активности ОГ (A_0) и активности ОГ после удаления лабильного трития (A_1) с увеличением времени обработки.

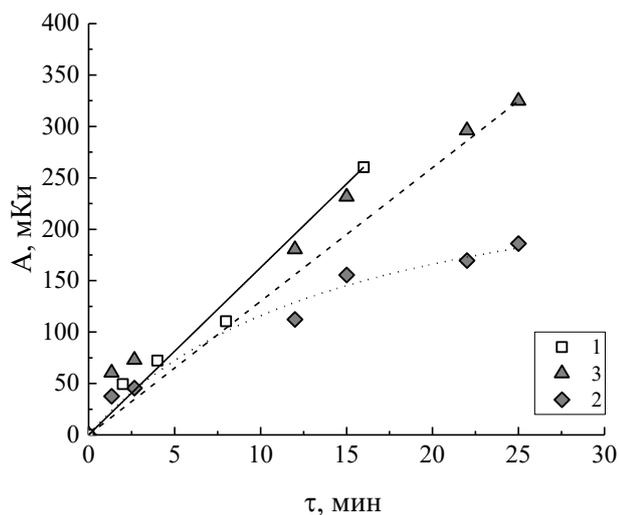


Рисунок 16. Зависимость активности ОГ от времени обработки атомами трития при 77 К (1), 295 К (2), а также суммы активности $[^3\text{H}]\text{ОГ}$ и тритиевой воды в эксперименте при 295 К (3).

Увеличение продолжительности обработки ОГ атомарным тритием приводило к росту активности ОГ (A_0) практически линейно как при 77 К, так и 295 К. В эксперименте при 77 К весь тритий содержался в составе ОГ, и его удельная активность достигла 2.6 Ки/мг при расчете на массу исходного ОГ (1.5 Ки/мг с учетом увеличения массы мишени) при продолжительности обработки 16 мин.

В эксперименте при комнатной температуре мишени ОГ тритиевая вода собиралась в охлаждаемой жидким азотом части реакционного сосуда и ее активность составляла около 40% от общей активности препарата. Суммарная активность трития, собранного в реакционном сосуде ($[^3\text{H}]\text{ОГ}$ + тритиевая вода) в эксперименте при 295 К и активности трития, связавшегося с ОГ при 77 К, изменялись с увеличением времени эксперимента практически одинаково. Максимальная активность ОГ 1.8 Ки/г была достигнута при продолжительности обработки 25 мин. При добавке активности тритиевой воды, сконденсированной на дне сосуда, расчетная величина удельной активности без учета изменения массы

препарата достигла 3.2 Ки/г.

После удаления лабильного трития, активность ОГ оказалась выше в эксперименте при 77 К, причем сохранилась линейная зависимость от времени (рис. 17). Для экспериментов при комнатной температуре мишени линейность наблюдалась только при малых временах обработки (менее 3 мин), а далее рост замедлился и достиг величины 30 мКи при 25 мин обработки.

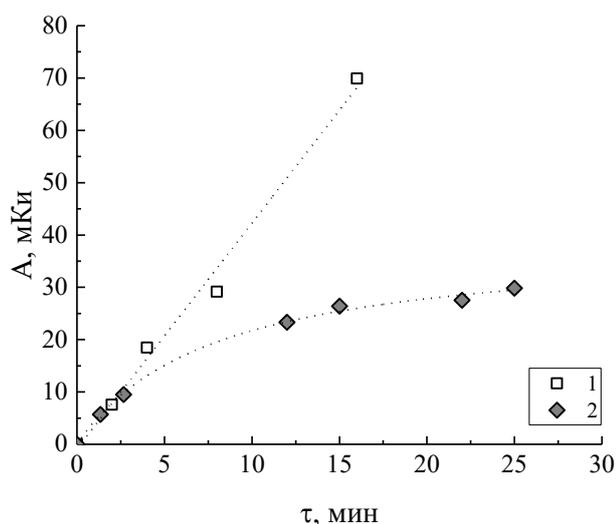


Рисунок 17. Зависимость активности $[^3\text{H}]\text{ОГ}$ после удаления лабильной метки от времени обработки атомами трития при 77 К (1) и 295 К (2).

При температуре мишени 77 К и времени обработки 16 мин активность $[^3\text{H}]\text{ОГ}$ после удаления лабильной метки составила 70 мКи. То есть удельная активность 0.70 Ки/мг (0.66 Ки/мг с учетом замещения водорода на тритий) оказалась близкой к максимальной величине, рассчитанной из рассматриваемой структуры ОГ. Отсутствие насыщения ОГ тритием при обработке при 77 К может быть связано с тем, что при таком режиме обработки происходит дальнейшая модификация ОГ с образованием восстановленных форм оксида графена, насыщенных тритием. Подтверждением этого явилась «гидрофобизация» ОГ: после воздействия атомарного трития препарат не удавалось диспергировать в воде с применением ультразвука. Извлечь меченный тритием материал из реакционного сосуда удалось только смесью воды с этанолом.

ОГ является хорошей альтернативой гидриду титана (TiH_2), который рассматривается как один из подходящих материалов для атомной батареи [276]. При полном замещении водорода на тритий в гидриде титана можно достичь

содержания трития 0.037 моль/г и удельной активности 1.07 Ки/мг. Однако для получения такой удельной активности требуется работа с газообразным тритием при высоких давлениях и температурах, что технически трудно. Предложенный в данной работе подход позволяет насыщать ОГ тритием при пониженном давлении газа и охлаждении стенок реакционного сосуда. Если удержать образующуюся тритиевую воду в составе материала, то удельная активность $[^3\text{H}]\text{OG}$ будет даже выше, чем у тритида титана. Удобнее работать с материалом, который содержит тритий, ковалентно связанный с углеродом, поэтому будет прочно удерживаться в его составе без использования защитных покрытий. В этом случае удельная активность 0.66 Ки/мг оказывается ниже, чем у Ti^3H_2 , однако удельное энерговыделение 22.3 Вт/кг вполне достаточно для использования $[^3\text{H}]\text{OG}$ в качестве компонента атомной батареи.

3.3. ВЛИЯНИЕ ОКСИДА ГРАФЕНА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА РЕАКЦИЮ АТОМОВ ТРИТИЯ С ДАЛАРГИНОМ

При адсорбции органических молекул на углеродных материалах они могут изменять свою конформацию в результате межмолекулярных взаимодействий, что отразится на их химических и физико-химических свойствах. Недавно был обнаружен интересный эффект, показывающий, что механизм взаимодействия атомарного трития с органическими молекулами может зависеть от химического окружения (материала подложки), что приводит к изменению распределения трития по аминокислотным остаткам пептида даларгина при нанесении его на активированный уголь и малослойный графит [277].

В данной работе [214]³ исследовано, как влияют на реакцию атомарного трития с даларгином материалы подложки (ОГ, ОГвосст. и УНТ). Даларгин - олигопептид, состоящий из шести аминокислотных остатков. В своём составе имеет как ароматические (Tyr, Phe), так и алифатические (Ala, Gly, Leu, Arg) остатки. Известно, что реакции радикального замещения водорода на тритий легче протекают прежде всего с алифатическими фрагментами молекул, а электрофильного замещения – с ароматическими. Для объяснения полученных результатов в работе используется также компьютерное моделирование расположения пептида на поверхности различных углеродных наноматериалов.

Эксперимент по введению тритиевой метки в олигопептид даларгин осуществили методом термической активации трития. 0.15 мг даларгина наносили на 5 мг углеродных наноматериалов из метанольного раствора и полученные препараты обрабатывали атомарным тритием при температуре мишени 77 К, температуре атомизатора 1850 К, давлении газа 0.5 Па в течение 10 с. При нанесении даларгина на ОГ был получен препарат с удельной радиоактивностью 0.57 Ки/ммоль. Для препаратов даларгина, нанесенного на ОГвосст. (Asp, 90 °С) и УНТ, удельная радиоактивность оказалась близкой и составила 0.84 Ки/ммоль. При

³ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Чернышева М.Г., Буняев В.А., Бадун Г.А. Влияние Оксидов Графена И Углеродных Нанотрубок На Реакцию Атомов Трития С Даларгином // Радиохимия. 2020. Т. 62. № 2. С. 169–174. (Импакт-фактор: 0.739) (33%)

нанесении даларгина непосредственно на стенки реакционного сосуда удельная радиоактивность достигла величины 8.4 Ки/ммоль.

Необходимо отметить, что при нанесении на стенки реакционного сосуда даларгин образовывал мишень средней толщины 10 мг/м², то есть в этом случае материал подложки не участвовал в процессе метки. При нанесении пептида на углеродные материалы средняя толщина покрытия составляла 0.5 мг/м² (для ОГ и ОГвосст.) или меньше (для УНТ). Это означает, что покрытие материалов пептидом не было сплошным, и атомарный тритий был способен взаимодействовать с подложкой, что приводило с одной стороны к уменьшению удельной активности даларгина, а с другой стороны могло изменять механизм реакции, что отражается во внутримолекулярном распределении трития.

Различие в удельной активности ОГ и ОГвосст. не очень большое, но вместе с тем отражает общую тенденцию влияния подложки: чем больше в составе подложки функциональных групп, тем выше их конкуренция за атомы трития. Поэтому у даларгина, нанесенного на ОГ_{восст.} и УНТ, удельная радиоактивность выше, чем в опытах с активированным углем и ОГ.

Помимо различия в общей удельной радиоактивности даларгина важным параметром, отражающим влияние углеродной подложки, является внутримолекулярное распределение трития. Распределение трития по аминокислотным остаткам даларгина определяли из удельной радиоактивности индивидуальных аминокислот, найденной из анализа кислотного гидролизата пептида. При анализе результатов использовали нормировку на сумму удельных радиоактивностей всех аминокислот:

$$\Omega(\%) = \frac{a_{\text{моль}i}}{\sum_i a_{\text{моль}i}} \times 100\% \quad (9)$$

где $a_{\text{моль}}$ удельная радиоактивность i -го аминокислотного остатка.

Оценка способности водорода индивидуальных аминокислотных остатков к изотопному обмену с газообразным тритием сделана через нормировку количества неабильного протия в составе каждой аминокислоты. Расчет производится по формуле 10:

$$\omega(\%) = \frac{a_{\text{моль}i}}{n_i \sum_i a_{\text{моль}i}} \times 100\% \quad (10)$$

где n_i – число необменных атомов водорода в i -ом аминокислотном остатке.

На рисунке 18 приведены столбчатые диаграммы распределения радиоактивности каждого из остатка с учетом нормировки по формулам 1 и 2.

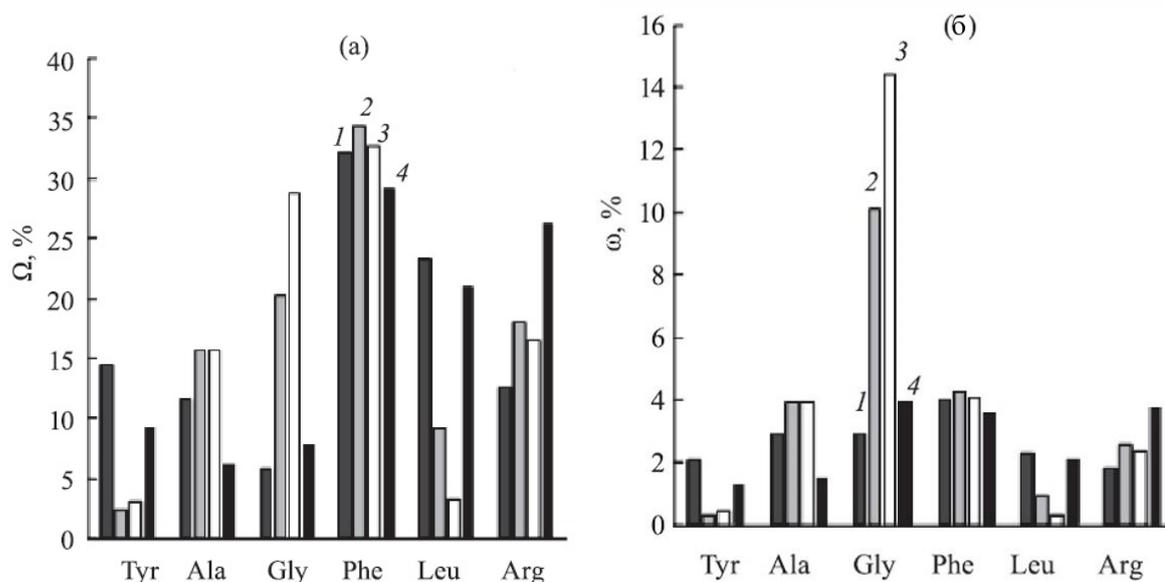


Рисунок 18. Распределение трития по аминокислотным остаткам даларгина, нанесенного на углеродные материалы: (1) активированный уголь [277]; (2) ОГ; (3) ОГвосст. (Asp, 90 °С); (4) УНТ. Нормализованные по удельной радиоактивности каждого из аминокислотного остатка (а); по числу необменных атомов водорода (С-Н) в аминокислотных остатках (б).

При анализе распределения трития по аминокислотным остаткам даларгина показано, что для всех использованных углеродных наноматериалов наблюдается высокое (от 29 до 34 %) содержание трития в остатке фенилаланина (Phe).

При нанесении даларгина на стеклянные стенки реакционного сосуда в аналогичных условиях проведения эксперимента содержание трития в фенилаланине составляет только 4 %. Ранее было показано, что при реакции атомарного трития с даларгином, нанесенным на активированный уголь содержание трития в фенилаланине составляло 30 % [278]. Такое различие объясняется тем, что при нанесении даларгина монослоем на поверхность углеродного материала реализуется преимущественно электрофильный механизм реакции изотопного обмена по причине того, что на первой стадии происходит взаимодействие атомарного трития с материалом подложки, а затем уже с мишенью, нанесенной на субстрат.

Сформулировано предположение о поляризации атомов трития или образования протона на поверхности углеродного субстрата за счет взаимодействия трития с кислородом на поверхности материала подложки, за счет чего и возможен

электрофильный механизм реакции [277]. Наличие кислородсодержащих функциональных групп ОГ и его восстановленного субстрата подтверждает данное предположение. При попадании атома трития на углеродную поверхность происходит реакция с кислородными группами поверхности с образованием кислотных центров Бренстеда ($-O^3H$) [279], на которых возможен изотопный обмен по электрофильному механизму замещения в ароматических аминокислотных остатках пептида. Таким образом углеродная подложка, адсорбируя активированный тритий, влияет на механизм изотопного обмена. При образовании плотного слоя пептида на стекле реакция протекает по радикальному механизму. Если стекло при температуре жидкого азота адсорбирует водород посредством образования химических или Ван-дер-Ваальсовых связей [280], то углеродная поверхность способствует перемещению активных форм водорода [281–284].

Важно отметить, что доля трития в остатке фенилаланина мало меняется для всех рассмотренных углеродных материалов. Вместе с тем обнаружено большое различие по включению трития в остатки глицина, лейцина и тирозина. При обработке атомами трития даларгина, нанесенного на оксид графена и восстановленный оксид графена, резко снижалась радиоактивность остатков лейцина и тирозина, но возрастала радиоактивность глицина. Такое синхронное снижение радиоактивности для алифатического и ароматического остатков нельзя объяснить только изменением механизма реакции из-за изменения химического состояния вступающего в реакцию трития. Вероятно, здесь может сказываться структурная организация молекул в адсорбционном слое.

Принимая во внимание площадь поверхности, занимаемую даларгином, равную 2.93 нм^2 (PubChem CID 6917894) и удельную поверхность углеродных материалов, можно оценить плотность покрытия: оксид графена покрывается монослоем даларгина, а в случае нанотрубок образуется ненасыщенный слой. Если молекулам даларгина доступно только $100 \text{ м}^2/\text{г}$ поверхности нанотрубок, то толщина образующегося слоя близка к монослою, что видится более реалистичным для молекул с молекулярной массой 725.8 г/моль .

Для оценки расположения даларгина на поверхности углеродных материалов провели моделирование методом молекулярной механики с помощью программы HyperChem 8.0 [285] в силовом поле AMBER (рисунок 19).

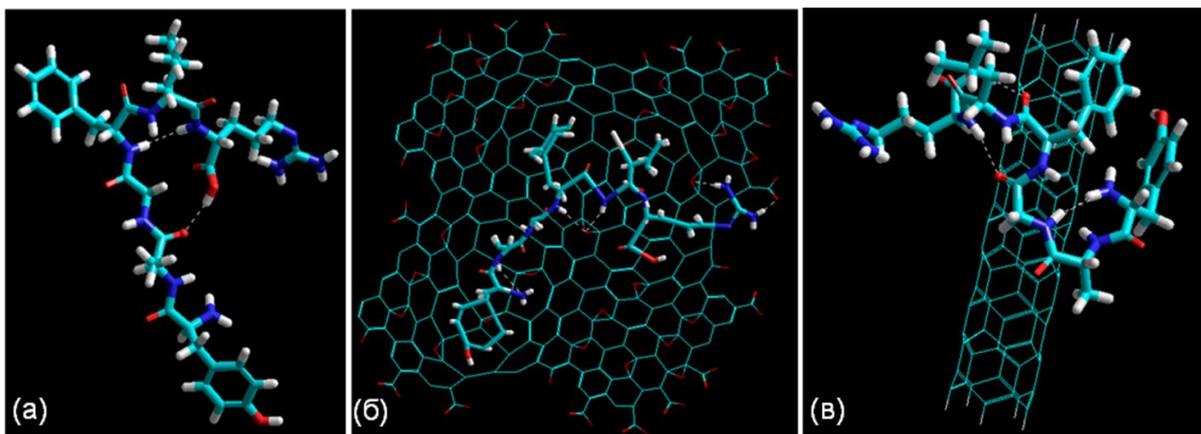


Рисунок 19. Структура даларгина в свободном виде (а), на поверхности оксида графена (б) и углеродных нанотрубок (в), полученная моделированием методом молекулярной механики.

Структура молекулы даларгина без участия подложки удерживается за счет образования внутримолекулярных водородных связей между остатками аргинина и глицина, а также остатками аргинина и фенилаланина. На поверхности оксида графена внутримолекулярные водородные связи заменяют водородные связи между кислородом поверхности и NH-группами аргинина, лейцина и тирозина. За счет этого молекула даларгина плоско «лежит» на поверхности оксида графена. Так как в остатке глицина расстояние между атомами азота и углерода карбонильной группы увеличивается от 2,49 Å (свободная молекула) до 2,68 Å (на оксиде графена), атомы водорода в остатке глицина становятся более доступны для взаимодействия с атомами трития, как поступающим из газовой фазы, так и диффундирующим по поверхности оксида графена. Также при адсорбции даларгина на поверхности оксида графена остатки фенилаланина и лейцина испытывают достаточное сильное взаимодействие с атомами подложки, что способствует изменению механизма реакции на электрофильный. Кроме того, из-за уменьшения угла между ароматическим кольцом фенилаланина и алкильным радикалом лейцина от 107° (свободная молекула) до 93° (на оксиде графена) возможно некоторое экранирование атомов водорода в остатках лейцина.

При контакте даларгина с углеродной нанотрубкой молекула «обворачивается» вокруг трубки. На поверхности нанотрубок образуются внутримолекулярные водородные связи между остатками аргинина и фенилаланина, аргинина и глицина, а также тирозина и аланина. В результате все аминокислотные остатки не испытывают стерических и других затруднений для реакции с тритием и

распределение трития по остаткам становится гораздо более равномерным.

Представленные данные показывают сложность процессов изотопного обмена трития при нанесении соединений мономолекулярным слоем на подложки. В результате взаимодействия атомов трития с углеродной подложкой они превращаются из радикалов в катионы, которые могут вступать в реакцию изотопного обмена по механизму электрофильного замещения. Во фрагментах молекулы, не контактирующих с подложкой, возможен изотопный обмен по радикальному механизму. Поэтому для объяснения результатов необходимо учитывать межмолекулярные взаимодействия и структурную организацию адсорбционного слоя.

В случае адсорбции даларгина на подложку из восстановленного оксида графена достигнута максимальная (29 %) доля радиоактивности остатка глицина среди других углеродных материалов. Очевидно, что неполное удаление кислородсодержащих функциональных групп в процессе химического восстановления ОГ вносит свой вклад в конформацию даларгина на поверхности субстрата. Возможно, что при интерпретации результатов о конформационной доступности для атомарного трития аминокислотных остатков, нанесенного на поверхность ОГвосст., необходимо учитывать параллельное влияние как гидрофобных взаимодействий между углеродной подложкой и ароматическими аминокислотными остатками (Tyr, Phe), так и образование водородных связей между оставшимися кислородсодержащими функциональными группами и аминокислотными остатками Ala, Gly, Leu, Arg.

Следственно, на распределение метки в веществе мишени первостепенно влияет как материал подложки, так и стерическая доступность молекулы мишени для атомарного трития.

На рисунке 20 представлены спектры комбинационного рассеяния образцов исследуемых углеродных наноматериалов с адсорбированным даларгинном после процесса изотопного обмена с газообразным тритием.

Для описания состояния углеродных наноматериалов выбираем метод расчета дефектности структур по отношению максимумов интенсивности I_D к I_G моде (область 1352 и 1598 cm^{-1} соответственно), результаты представлены в таблице 4.

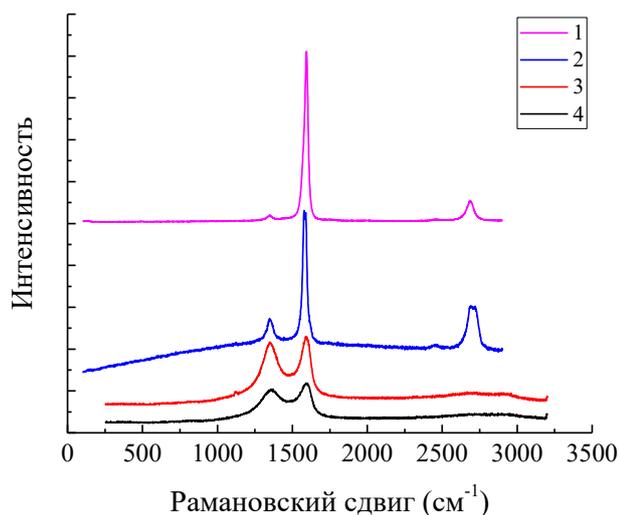


Рисунок 20. Спектры комбинационного рассеяния образцов после изотопного обмена с атомарным тритием. Одностенные углеродные нанотрубки с нанесенным слоем даларгина (1) и без фазы пептида (2); комплекс даларгина с восстановленным аспарагиновой кислотой ОГ (3) и исходный ОГ с нанесенным слоем даларгина (4).

Таблица 4. Данные СКР углеродных наноматериалов с нанесенным слоем даларгина с последующим введением тритиевой метки.

| Образец | I_D/I_G | Параметры анализа |
|---------|-----------|---|
| | | λ (нм); кратность увеличения; % от макс.; время экспозиции (с) |
| 4 | 1.12 | 514 нм; x100; 100%; 10 с |
| 3 | 1.34 | 514 нм; x100; 100%; 10 с |
| 2 | 0.32 | 514 нм; x50; 10%; 10 с |
| 1 | 0.12 | 514 нм; x100; 10%; 10 с |

Рост значений отношения интегральной интенсивности (I_D/I_G) для областей (1352 и 1592 cm^{-1}) образца восстановленного оксида графена аспарагиновой кислотой с нанесенным слоем даларгина после обработки атомарным тритием свидетельствует об удалении кислородсодержащих функциональных групп, с уменьшением среднего размера sp^2 доменов. Отметим, что при восстановлении ОГ аспарагиновой кислотой не отмечался существенный рост структурных дефектов, но в составе комплекса с олигопептидом и после обработки атомарным тритием наблюдаем рост интенсивности сигнала D-моды. Данный факт ещё раз подтверждает предположение о том, что атомарный тритий взаимодействует с

углеродной подложкой и это способствует протеканию реакции изотопного обмена с даларгином по механизму электрофильного замещения.

Уменьшение интенсивности D-моды образца одностенных углеродных нанотрубок с нанесенным слоем даларгина (рисунок 20, образец 1), возможно объяснить также действием атомарного трития на УНТ. Тритий в форме радикала способен взаимодействовать с функциональными группами нанотрубок, локализующихся на их поверхности. В результате отрыва функциональной группы при взаимодействии её с атомами трития, углерод графеновой структуры образует C=C связь с соседним атомом углерода структуры, тем самым отмечается рост интегральной интенсивности G-моды.

3.4. АДСОРБЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОКСИДА ГРАФЕНА ЛИЗОЦИМОМ

При модификации углеродных материалов белками может изменяться структура белков, что влияет на их свойства, в том числе на ферментативную активность. Для определения специфики взаимодействия углеродных материалов с белками рассмотрели адсорбцию лизоцима на ОГ и ОГ_{восст.} [286]⁴. Количество адсорбированного белка определяли с использованием меченного тритием лизоцима, ферментативную активность определяли по лизису клеток *M. luteus*. Для определения возможного изменения молекулы при адсорбции и ее ориентации в адсорбционном слое применили обработку атомами трития полученных комплексов лизоцима на ОГ с последующим анализом распределения трития по аминокислотным остаткам белка.

На первом этапе работы методом радиоактивных индикаторов определили адсорбцию (рисунок 21) лизоцима на поверхности ОГ и ОГ_{восст.}, восстановленного водой по методу гидротермального синтеза (H₂O, 155 °С), приведенного в экспериментальной части настоящей работы.

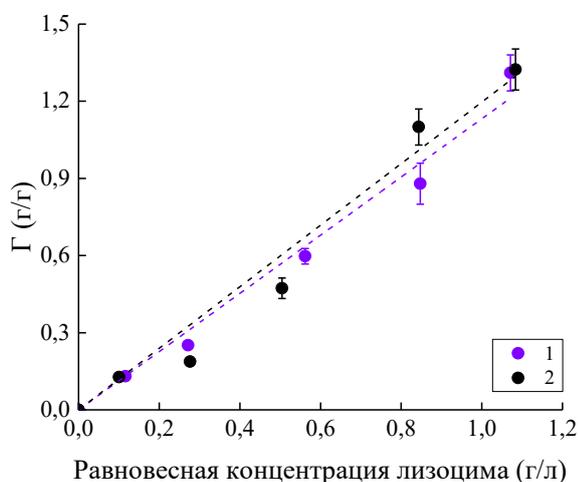


Рисунок 21. Зависимость адсорбции прочно связанного лизоцима на ОГ (1) и восстановленного ОГ (2).

⁴ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Bunyaev V.A. et al. Structural peculiarities of lysozyme-graphene oxide adsorption complexes // Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures. 2022. Vol. 30, № 1. P. 99–105. (Импакт-фактор (SJR): 0.362) (20%)

Обнаружено, что адсорбция лизоцима практически одинаковая как на исходном, так и на восстановленном ОГ. Результаты отличаются от полученных в работе [111,287]. Авторами отмечается более сильная адсорбция лизоцима на поверхности ОГ, особенно в области низких концентраций белка (до 0.08 г/л). Предполагается, что, используя в качестве восстановителя витамин С, функциональный состав поверхности ОГ_{восст.} будет существенно отличаться от восстановленного оксида графена, полученного в гидротермальных условиях. Вследствие разного функционального состава поверхности ОГ_{восст.} может и быть объяснена разница в адсорбции белка.

Связь белка с поверхностью оксида и восстановленного оксида графена может осуществляться за счет образования водородных связей, электростатического, гидрофобного, слабого Ван-дер-Ваальсового, π - π и ковалентного взаимодействий, которые влияют на структуру белка, в частности, уменьшая содержание α -спирали, приводящей к изменению ферментативной активности лизоцима [288,289]. Такую разницу можно объяснить различным содержанием кислородсодержащих функциональных групп на поверхности образцов в нашей работе и в цитируемой.

Образец восстановленного ОГ в гидротермальных условиях становится более гидрофобным, что объяснено снижением C=O групп с параллельным ростом C=C (сильный сигнал при 1583 см^{-1}), что было показано по данным ИК-анализа [78,214]. Поскольку значения адсорбции лизоцима одинаковы для обоих структур углеродного наноматериала, то можно предположить, что в формировании комплекса ОГ-лизоцим (или ОГ_{восст.}-лизоцим) доминирует взаимодействие по типу белок-белковое, также известное как «белковая корона» [290–292], которые описаны для наночастиц. Наличие гидрофобных участков в структуре оксида графена уменьшает воздействие водной среды на нефункционализированные области графенового листа [89]. Такая поверхность ОГ более доступна для белков. Что же касается взаимодействий между лизоцимом и ОГ_{восст.}, то в этом случае превалируют силы Ван-дер-Ваальсового взаимодействия за счет увеличения гидрофильности восстановленного оксида графена. Межслоевое взаимодействие молекул белка, адсорбированных на поверхности углеродного материала и лизоцима в растворе, очевидно, слабее.

Десорбированный обратно в раствор белок может иметь конформацию, отличную от нативной (первоначальной) и это может повлиять на его ферментативную активность. Таким образом, мы измерили ферментативную активность лизоцима как прочно связанного с поверхностью углеродного материала, так и в надосадочной жидкости, отобранной из адсорбционной системы. Образцом сравнения выбрали водный раствор лизоцима с известной концентрацией. Зависимость ферментативной активности лизоцима как функции, зависящей от равновесной концентрации белка в надосадочной жидкости, представлена на рисунке 22.

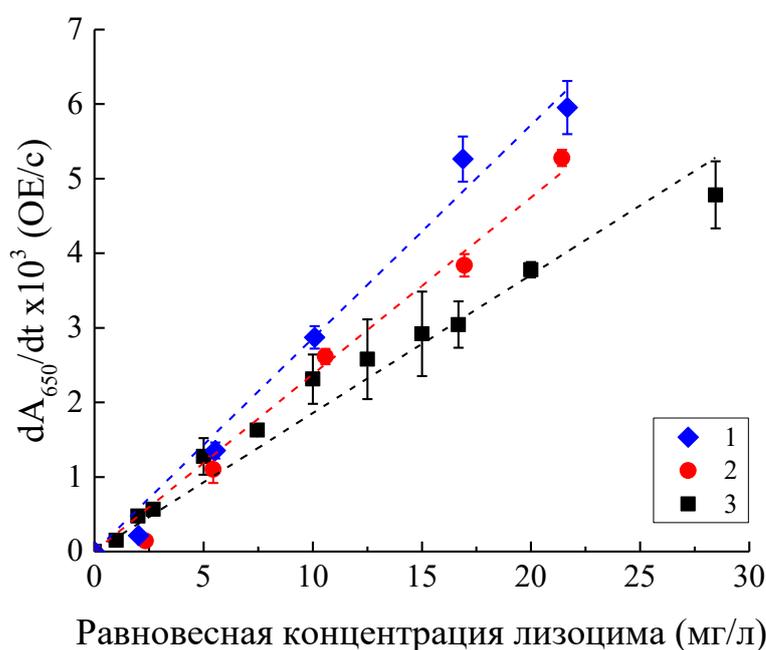


Рисунок 22. Зависимость ферментативной активности лизоцима в надосадочной жидкости (получена при разбавлении исходного раствора в 50 раз). Надосадочная жидкость после инкубирования с восстановленным ОГ (1) и оксидом графена исходным (2); контрольный образец лизоцима без предварительного инкубирования с наноуглеродным субстратом (3).

Было обнаружено, что ферментативная активность лизоцима после взаимодействия с ОГ и его восстановленным субстратом возросла в 1.3-1.5 раза. Предполагается изменение структуры белка в результате взаимодействия с поверхностью углеродных структур. Механизм таких изменений описан в работе [293]. На твердой поверхности молекулы белка разворачиваются и в таком измененном виде десорбируются обратно в раствор. Как ожидается, адсорбированный лизоцим на поверхности ОГ и ОГ_{восст.} будет прочно связан, однако

слои белка, образующие «белковую корону» будут связаны меньшей силой межмолекулярного взаимодействия и способны десорбироваться обратно в раствор в измененном виде.

Сравнение ферментативной активности лизоцима, прочно связанного с поверхностью ОГ (или $OГ_{восст.}$) также была определена. Зависимость ферментативной активности прочно связанного лизоцима с поверхностью углеродного материала, как функция от его концентрации на этой поверхности представлена на рисунке 23.

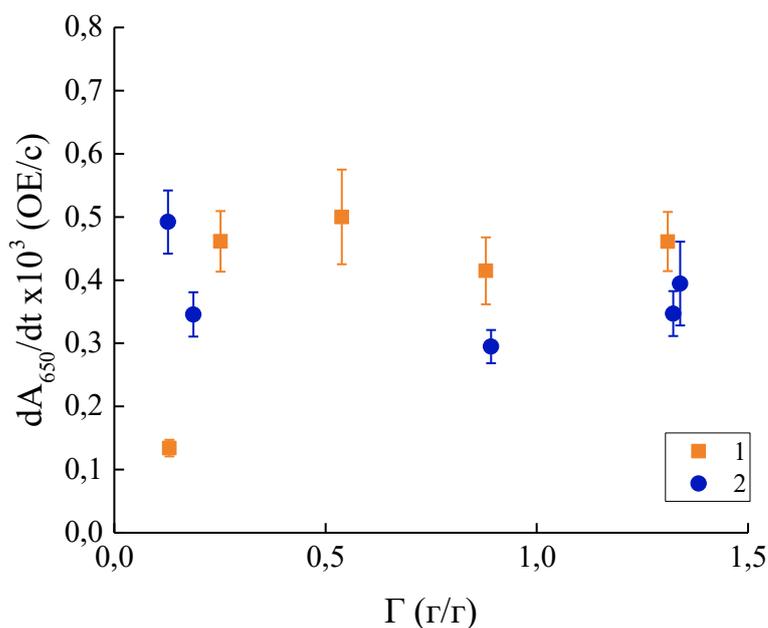


Рисунок 23. Зависимость ферментативной активности лизоцима, прочно связанного на ОГ (1) и восстановленном ОГ (2).

Было найдено, что у лизоцима, адсорбированного на ОГ и $OГ_{восст.}$, сохранялась способность к лизису клеток *M. Luteus*, не зависела от того, с ОГ или $OГ_{восст.}$ образовывался комплекс. Скорость лизиса составляла от $0.3 \cdot 10^{-3}$ до $0.5 \cdot 10^{-3}$ OE/c и практически не зависела от содержания лизоцима в составе комплекса в диапазоне значений от 0.2 до 1.4 г/г. Формально ферментативная активность лизоцима адсорбированного на ОГ соответствовала его объемной концентрации 0.11 ± 0.03 мг/мл, хотя концентрация лизоцима адсорбированного на ОГ находилась в диапазоне 0.3-3.5 мг/мл. Такой необычный вид зависимости может быть связан с тем, что взаимодействие клеток с лизоцимом ограничено тонким поверхностным слоем белка на поверхности углеродного материала. При удельной поверхности ОГ

60 м²/г при соотношении масс лизоцим:ОГ 0.2 г/г средняя толщина покрытия составляет 3.3 мг/м², то есть этот материал покрывается монослоем белка. Дальнейшее увеличение содержания лизоцима на ОГ не увеличивает его доступность клеткам, что и объясняет обнаруженную независимость скорости лизиса. Для суспензий с наименьшим содержанием лизоцима 0.2 г/г, когда обеспечивается максимальная доступность молекул, скорость лизиса примерно в 3 раза ниже, что отражает последствия взаимодействия лизоцима с поверхностью ОГ.

Снижение ферментативной активности лизоцима в монослойном покрытии ОГ может быть связано с тем, что активный центр становится менее доступен или изменяется его структура вследствие взаимодействия фермента с поверхностью углеродного материала [287]. С другой стороны, существует механизм, предполагающий связывание ОГ с пептидогликановым слоем грамположительных бактерий [294]. В контрольном эксперименте, где к суспензии клеток был добавлен лизоцим после внесения суспензии ОГ, ферментативная активность также снижалась, по сравнению с экспериментами без фазы ОГ. Таким образом мы рассматриваем два возможных фактора, влияющих на ферментативную активность лизоцима по отношению к *M. luteus*: структурное изменение белка после контакта с ОГ и доступность для лизиса клеток активного центра белка, связанного в комплекс с ОГ.

Для выявления структурной организации молекул лизоцима на поверхности ОГ использовали обработку полученных адсорбционных комплексов атомами трития с последующим анализом внутримолекулярного распределения метки. В варианте полного анализа всех аминокислотных остатков белка (метод тритиевой планиграфии) можно надежно определить изменение структурной организации макромолекул [295,296]. Однако такое исследование требует длительного дорогостоящего эксперимента, включающего предварительный ферментативный протеолиз белка с последующим разделением полученных пептидов, дальнейшим кислотным гидролизом выделенных пептидов и аминокислотным анализом. Более простой вариант, когда проводят кислотный гидролиз белка целиком, позволяет достаточно эффективно исследовать структурные особенности лизоцима в составе смешанных адсорбционных слоев [297,298]. Для лизоцима такой более простой

вариант метода позволяет определить ориентацию молекул белка в адсорбционном слое и составить самые общие представления о взаимодействии лизоцима с другими соединениями. Его и использовали в данной работе.

Эксперимент проводили с образцами оксида графена с различным содержанием прочно связанного лизоцима (от 0.2 до 1 г/г). В качестве контрольного образца использовали водный раствор лизоцима без фазы ОГ, который наносили на стенки реакционного сосуда и воду удаляли лиофилизацией. Результат распределения тритиевой метки в аминокислотных остатках лизоцима представлен на рисунке 24. Значения доли радиоактивности аминокислотных остатков нормированы относительно суммарной радиоактивности белка.

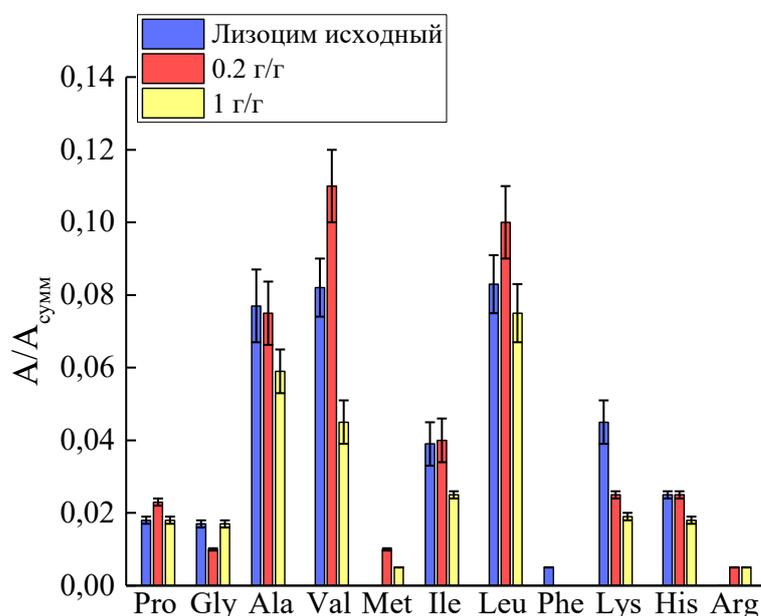


Рисунок 24. Распределение тритиевой метки в аминокислотных остатках исходного и адсорбированного на ОГ лизоциме.

В большинстве случаев распределение трития по типам аминокислотных остатков для исследуемых образцов оказалось сходным. Поскольку аминокислотные остатки пролина и фенилаланина расположены на различных областях белковой глобулы (рисунок 25), то по их отношению удельных активностей можно сделать оценку ориентации молекул лизоцима в адсорбционном слое. Красным выделен фрагмент структуры белка, отвечающий за его ферментативный центр, расположенный в области между Glu35 и Asp52.

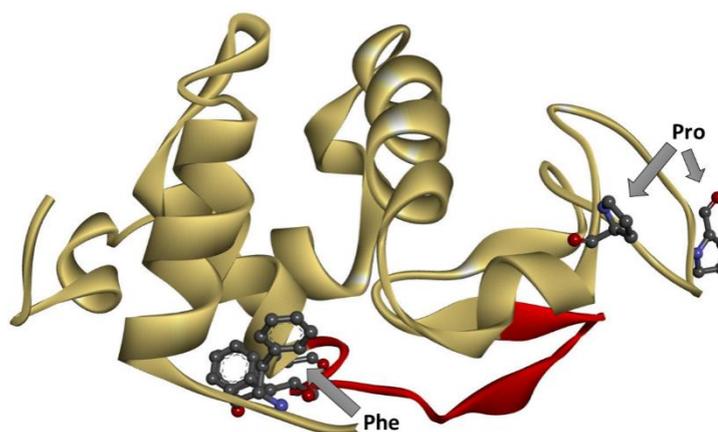


Рисунок 25. Структура лизоцима (PDB: 6lyz) с выделенными «реперными» аминокислотными остатками Phe и Pro (атомы водорода не показаны).

Отношение удельных радиоактивностей пролина и фенилаланина сильно менялось. В контрольном эксперименте, когда лизоцим наносили на стенки реакционного сосуда можно предлагать равновероятную ориентацию молекул в мишени, отношение удельных активностей составило $A(\text{Phe})/A(\text{Pro})=0.8$. Для препарата ОГ с содержанием лизоцима 0.2 г/г это отношение уменьшилось до 0.2. Для препарата с максимальным содержанием лизоцима 1.0 г/г $A(\text{Phe})/A(\text{Pro})=0.08$. Так как ферментативный центр у лизоцима находится в области между аминокислотными остатками Glu35 и Asp52, то полученные результаты показывают, что при адсорбции лизоцима на ОГ его активность к лизису может снижаться по причине стерических затруднений. Формально можно представить, что доля молекул, способных лизировать клетки, уменьшается в 4-10 раз, однако такая оценка очень грубая, так как не учитывает возможные структурные изменения белка.

Похожий результат наблюдали, когда лизоцим адсорбировали на наноалмазах детонационного синтеза [297]. Таким образом можно предположить наличие нескольких механизмов адсорбции лизоцима на ОГ: не ковалентный (когда белок адсорбирован на гидрофобной области листа ОГ ароматическими аминокислотными остатками через π - π взаимодействие [298]) и электростатическое (когда с отрицательно заряженными кислородными группами, локализуемых на поверхности ОГ, образуются связи с положительно заряженными аминокислотными остатками лизоцима). Так, снижение радиоактивности Lys и низкая радиоактивность Arg объясняется их электростатическим взаимодействием с поверхностью ОГ, расположение остатков Lys в структуре лизоцима (1, 13, 33, 96, 97 и 116)

предполагает расположение белка на поверхности ОГ в плоском виде.

Описание расположения лизоцима в глобулярной форме на поверхности ОГ дано с использованием расчетного метода – молекулярного докинга. Оптимизация структуры ОГ осуществлена в силовом поле AMBER. Молекулярная pdb-структура лизоцима взята из базы данных белковых структур (PDB: 6lyz). Молекулярное моделирование провели с использованием программного обеспечения HEX 8 [224]. Рассчитанная полная энергия связи составила -466.4 кДж/моль, что говорит о возможности самопроизвольного протекания процесса адсорбции. На рисунке 26 представлено расположение белка на поверхности ОГ с наименьшей затраченной энергией связи.

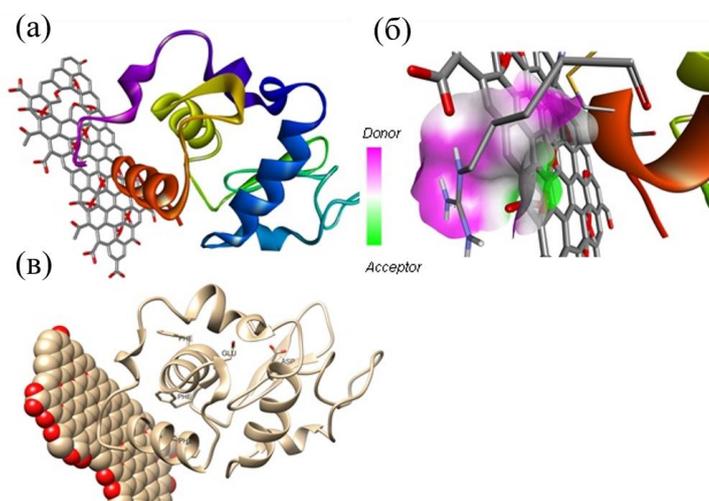


Рисунок 26. Результаты взаимодействия ОГ с лизоцимом по методу молекулярного докинга.

Отметим, что движущими силами связывания лизоцима с оксидом графена являются водородная связь и силы Ван-дер-Ваальсового взаимодействия [299]. Результаты анализа предполагают образование связи между поверхностью ОГ и Cys6, Arg128. Такое положение обеспечивает ориентацию остатков Phe, направленных в сторону поверхности ОГ и активный центр фермента доступен для взаимодействия с углеродным субстратом (рисунок 26в). Мы также предполагаем наличие π - π связей между остатками ароматических аминокислот и поверхностью ОГ. Итак, данные молекулярного докинга хорошо согласуются с экспериментальными данными.

3.5. ТРИТИЕВЫЙ ЗОНД И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ОКСИДА ГРАФЕНА И АЛЬБУМИНА

Исследования взаимодействия различных углеродных субстратов с биологическими макромолекулами принципиально важно как при разработке новейших носителей адресной доставки лекарственных средств [300], оценке цитотоксичности наноуглеродных материалов [301], так и при конструировании биосенсоров для диагностических целей [302–304]. Сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок, выполняющий транспортную роль и участвующий в метаболических процессах живых организмов. В крови человека содержание белка сывороточного альбумина наиболее высокое среди всех белков крови. В связи с этим активно проводятся исследования по взаимодействию альбумина сыворотки крови с различными углеродными материалами [288,305–307]. Стоит отметить, что вместо человеческого, в научных работах часто используют бычий сывороточный альбумин [308].

Изучение механизмов адсорбции белков на углеродных наноматериалах необходимо при оценке эффективности модификации углеродных субстратов данными биологическими макромолекулами в конкретной среде [309]. На корректность интерпретации экспериментальных данных влияет как правильная пробоподготовка препаратов [310], так и выбор метода анализа полученных комплексов белок-углеродный субстрат [114,311,312]. Также следует учитывать процессы образования поверхностного слоя белка за счет взаимодействия с поверхностью углеродного наноматериала, так и последующего межмолекулярного взаимодействия между адсорбированными молекулами и молекулами белка, находящимися в водном растворе [313,314].

В настоящее время мощным инструментом исследования является молекулярный докинг - метод компьютерного моделирования, в котором определяются возможные места контактов биологической макромолекулы с различными лигандами [299,315]. При рассмотрении систем, состоящих из тысяч атомов, активно применяется метод молекулярно-динамического расчета, который позволяет оценить межмолекулярное взаимодействие в различных условиях эксперимента [233,257,316].

Цель данной работы заключается в исследовании взаимодействия оксида графена (ОГ) с белком бычьим сывороточным альбумином (БСА) с применением комплексного подхода, включающего метод тритиевого зонда и компьютерное моделирование (молекулярный докинг и молекулярная динамика) [3,224,225,232–234,317,318]. Использовали меченный тритием БСА как радиоактивный индикатор для определения количества белка, связавшегося с ОГ. Затем полученный комплекс обрабатывали атомами трития с последующим анализом распределения трития по типам аминокислотных остатков альбумина. Полученные экспериментальные данные и компьютерное моделирование позволили предположить пространственную организацию альбумина на поверхности ОГ.

С помощью меченного тритием БСА определили его адсорбцию из водного раствора на ОГ. На рисунке 27 приведены изотермы адсорбции в диапазоне равновесной концентрации белка от 0.1 до 1.8 мг/мл. На рисунке 27 для сравнения показана изотерма адсорбции белка лизоцима, полученная в работе [286] и изотерма адсорбции БСА на УНТ [319].

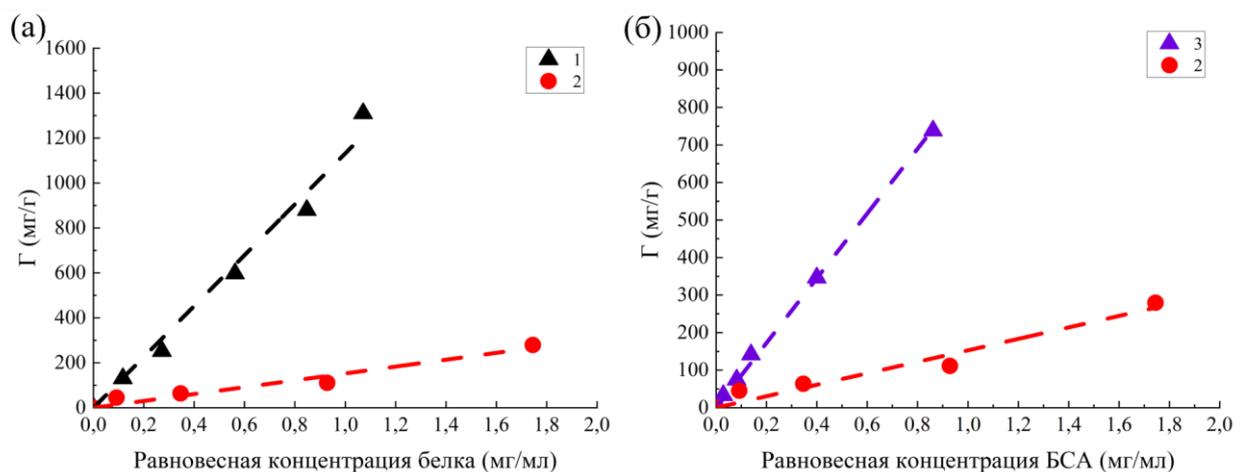


Рисунок 27. Изотермы адсорбции прочно связанного белка на оксиде графена (а): лизоцима (1) [286] и БСА (2); адсорбции прочно связанного БСА на оксиде графена и УНТ (б): БСА на ОГ (2), БСА на УНТ (3) [319].

Наблюдается монотонный рост содержания как БСА, так и лизоцима в комплексе с оксидом графена и УНТ при увеличении концентрации белка в растворе, который можно аппроксимировать линейной зависимостью (аналогичной изотерме Генри, уравнение 11).

$$\Gamma = K_{\Gamma}C \quad (11)$$

где K_{Γ} – константа (мл/мг); C – равновесная концентрация белка в растворе (мг/мл). Для комплекса лизоцима и БСА с оксидом графена коэффициент детерминации R^2 равен 0.991 (константа Генри 1132 ± 43 мл/мг) для лизоцима и R^2 равен 0.971 (константа Генри 153 ± 12 мл/мг) для БСА соответственно. Для комплекса БСА с УНТ константа Генри равна 862 ± 11 мл/мг (R^2 равен 0.998). Расчет коэффициента детерминации и погрешности константы Генри произвели с помощью программы OriginPro 2016.

Такое большое различие в адсорбции этих белков связано с разным аминокислотным составом поверхности белковых глобул, что приводит к изменению межмолекулярного взаимодействия между белком и углеродным субстратом. Так как на поверхности лизоцима много остатков лизина, белок имеет положительный заряд, а ОГ из-за наличия карбоксильных групп – отрицательный заряд, и при образовании комплекса «лизоцим – ОГ» большую роль играют электростатическое взаимодействия. Роль гидрофобных взаимодействий на примере восстановленного оксида графена и лизоцимом менее значима [111].

Белковая глобула БСА имеет отрицательный заряд, что препятствует адсорбции белка на ОГ за счет электростатических взаимодействий. Однако адсорбция возможна за счет других взаимодействий, что приводит к снижению константы Генри в 7.4 раза по сравнению с адсорбцией лизоцима на ОГ. Адсорбция альбумина на гидрофобной поверхности, примером которой могут служить одностенные углеродные нанотрубки, более существенна (константа Генри больше в 5.6 раза), чем при адсорбции БСА на поверхности оксида графена. Известно, что адсорбция БСА на восстановленном оксиде графена значительно превосходит адсорбцию на исходном оксиде графена [320], что подтверждает доминирующую роль гидрофобных взаимодействий. Таким образом при оценке взаимодействия между БСА и оксидом графена необходим комплексный анализ для выявления вклада гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей, а также π - π и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия [115,321].

Для того чтобы определить структурную организацию БСА на поверхности ОГ

использовали метод «третиевого зонда». Обработка атомами трития комплекса белок – ОГ («БСА-ОГ») и свободного белка, нанесенного на стенки сосуда без ОГ, привела к изменению распределения трития по аминокислотным остаткам БСА. Из изменения радиоактивности меченных тритием аминокислот в составе белка возможно предположить ориентацию БСА, адсорбированного на поверхности ОГ. Толщина реакционной зоны для белков, в которой происходит изотопный обмен между тритием и водородом по механизму радикального замещения, ограничена аминокислотными остатками, находящимися на поверхности молекулы. Ранее было обнаружено влияние углеродной подложки на механизм изотопного обмена между атомарным тритием и олигопептидом даларгином [277]. Сделано предположение, что в случае доступности для атомарного трития кислородсодержащих функциональных групп углеродного субстрата возможно изменение механизма изотопного обмена с радикального на электрофильный по причине поляризации атомов трития с атомами кислорода при их взаимодействии с поверхностью ОГ, и как следствие изотопная метка будет встраиваться преимущественно в ароматические фрагменты аминокислот, связанных с поверхностью углеродного субстрата. Однако необходимо учитывать и конформационное расположение молекулы вещества для атомарного трития, поступающего из газовой фазы в виде радикала, поскольку установлено, что природа подложки вносит свой вклад в пространственную организацию адсорбированного на ней соединения [214].

Оказалось, что обработка адсорбционного комплекса «БСА-ОГ» позволила получить меченый препарат с высокой удельной активностью, которая зависела от содержания белка в составе комплекса (рисунок 28). При содержании БСА 63 мг/г удельная радиоактивность достигала 1500 Ки/ммоль и снижалась до 400 Ки/ммоль с повышением содержания белка до 368 мг/г. Такая удельная радиоактивность соответствует введению в состав молекулы белка от 50 до 13 атомов трития всего за 10 с проведения реакции. При аналогичных условиях введения трития в БСА, нанесенный непосредственно на стенки реакционного сосуда (масса мишени 1 мг), была достигнута удельная активность 104 Ки/ммоль (среднее содержание 3.6 атома трития на молекулу).

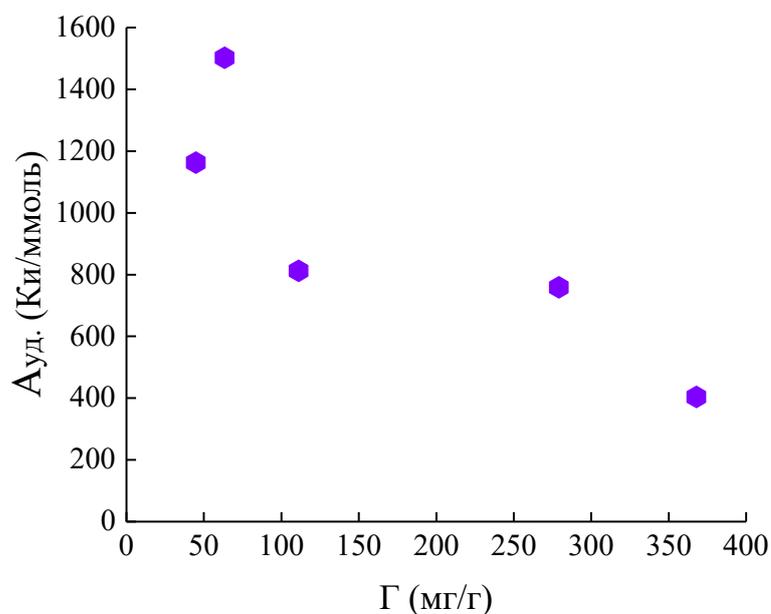


Рисунок 28. Изменение удельной активности БСА от его количества на ОГ.

Резкое увеличение удельной радиоактивности БСА в составе комплекса с ОГ можно объяснить повышенной доступностью аминокислотных остатков белка атомам трития по сравнению с белком, нанесенного непосредственно на стеклянные стенки реакционного сосуда. Причиной такого повышения может быть как благоприятное расположение молекул белка на углеродной подложке, так и изменением конформации белка. Для выявления причины такого изменения провели анализ распределения трития по типам аминокислотных остатков. На рисунке 29 представлены эти данные для комплексов «БСА-ОГ» с различным содержанием белка, а также аналогичные эксперименты с нанесением БСА непосредственно на стенки реакционного сосуда («БСА исходный»). Образец с максимальным содержанием прочно связанного БСА (368 мг/г) был получен при равновесной концентрации БСА равной 2.4 г/л. «Asp-Glu» соответствует суммарной радиоактивности аспарагина, аспарагиновой кислоты, треонина, серина и глутаминовой кислоты. Значения доли радиоактивности аминокислотных остатков нормированы относительно суммарной радиоактивности белка (уравнение 9).

Обнаружено существенное различие в распределении трития по некоторым аминокислотным остаткам, что может быть связано как со структурной организацией молекул адсорбированного белка, так и изменением механизма изотопного обмена, которое может происходить за счет поляризации атомарного трития с кислородом в составе ОГ.

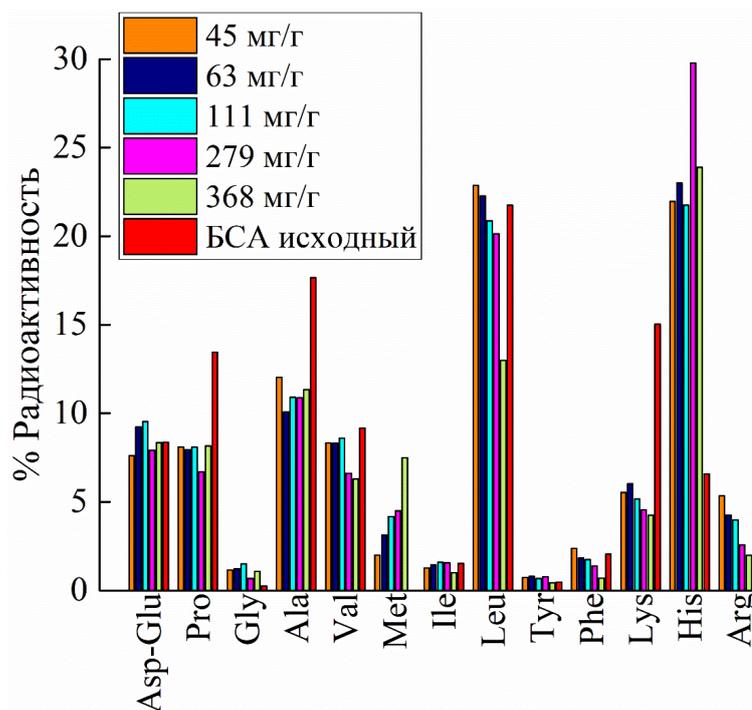


Рисунок 29. Распределение трития в аминокислотных остатках белка бычьего сывороточного альбумина, адсорбированного на оксиде графена и нанесенного непосредственно на стенки реакционного сосуда.

Образец «БСА исходный» является белком, нанесенный на стенки реактора без оксида графена. Следует отметить, что в таком случае образуется толстая мишень, большая часть трития оказалась в остатке лейцина (Leu), а в ароматических аминокислотных остатках тирозина (Tyr), фенилаланина (Phe) и гистидина (His) радиоактивность минимальна, что может свидетельствовать о протекании изотопного обмена по радикальному механизму между атомарным тритием и аминокислотными остатками, образующие внешнюю сторону глобулы белка.

Для белка, нанесенного на оксид графена, наблюдается существенное увеличение содержания трития в гистидине. Однако при максимальном содержании БСА на ОГ (368 мг/г) обнаружено синхронное снижение доли радиоактивности фенилаланина (Phe), гистидина (His), лейцина (Leu) с синхронным увеличением радиоактивности остатка метионина (Met). Снижение доли радиоактивности гистидина можно объяснить ограниченной доступностью для атомарного трития кислородсодержащих функциональных групп, расположенных на поверхности ОГ, тем самым ограничивая возможность протекания изотопного обмена по электрофильному механизму. Можно предположить, что за счет межмолекулярного взаимодействия между адсорбированным БСА со свободным белком, находящимся

в растворе, снижается доступность углеродной подложки для атомарного трития. Изменение радиоактивности алифатических остатков при максимальной концентрации белка можно объяснить изменением стерической доступности нелабильного водорода в этих остатках для атомарного трития. Таким образом при максимальной концентрации адсорбированного белка возможно образование поверхностного слоя белка, мешающего атомарному тритию взаимодействовать с поверхностью ОГ.

Для подтверждения экспериментальных данных приведем результаты компьютерного моделирования взаимодействия оксида графена с белком бычьим сывороточным альбумином (PDB: 4F5S). Определены конкурирующие сайты связывания как между БСА и оксидом графена, так и между адсорбированным на ОГ белком и свободным белком, находящимся в растворе.

Ранее нами были рассчитаны комплексы БСА и оксида графена с помощью метода молекулярного докинга⁵. Этапы расчета приведены в экспериментальной части настоящей диссертации. Наличие связей между оксидом графена и БСА обусловлено совокупностью нековалентных взаимодействий как с кислородсодержащими функциональными группами углеродного наноматериала, так и за счет π - π взаимодействий ароматических фрагментов ОГ и ароматических аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки аспарагиновой кислоты (Asp 1, 248, 255, 258), треонина (Thr 2, 68), гистидина (His 3, 9, 67, 246), лизина (Lys 4, 64, 239, 242), серина (Ser 5, 65), глутаминовой кислоты (Glu 6, 63, 95, 243, 251), аргинина (Arg 10), лейцина (Leu 66), глутамина (Gln 94), пролина (Pro 96), цистеина (Cys 245) способны образовывать нековалентные связи с ОГ. Однако полученные расчетные данные взаимодействия БСА с ОГ по методу молекулярного докинга справедливы для модели оксида графена, в которой элементный состав ограничен 100 атомов тяжелее водорода.

Для оценки взаимодействия БСА с ОГ бóльшей молекулярной массой

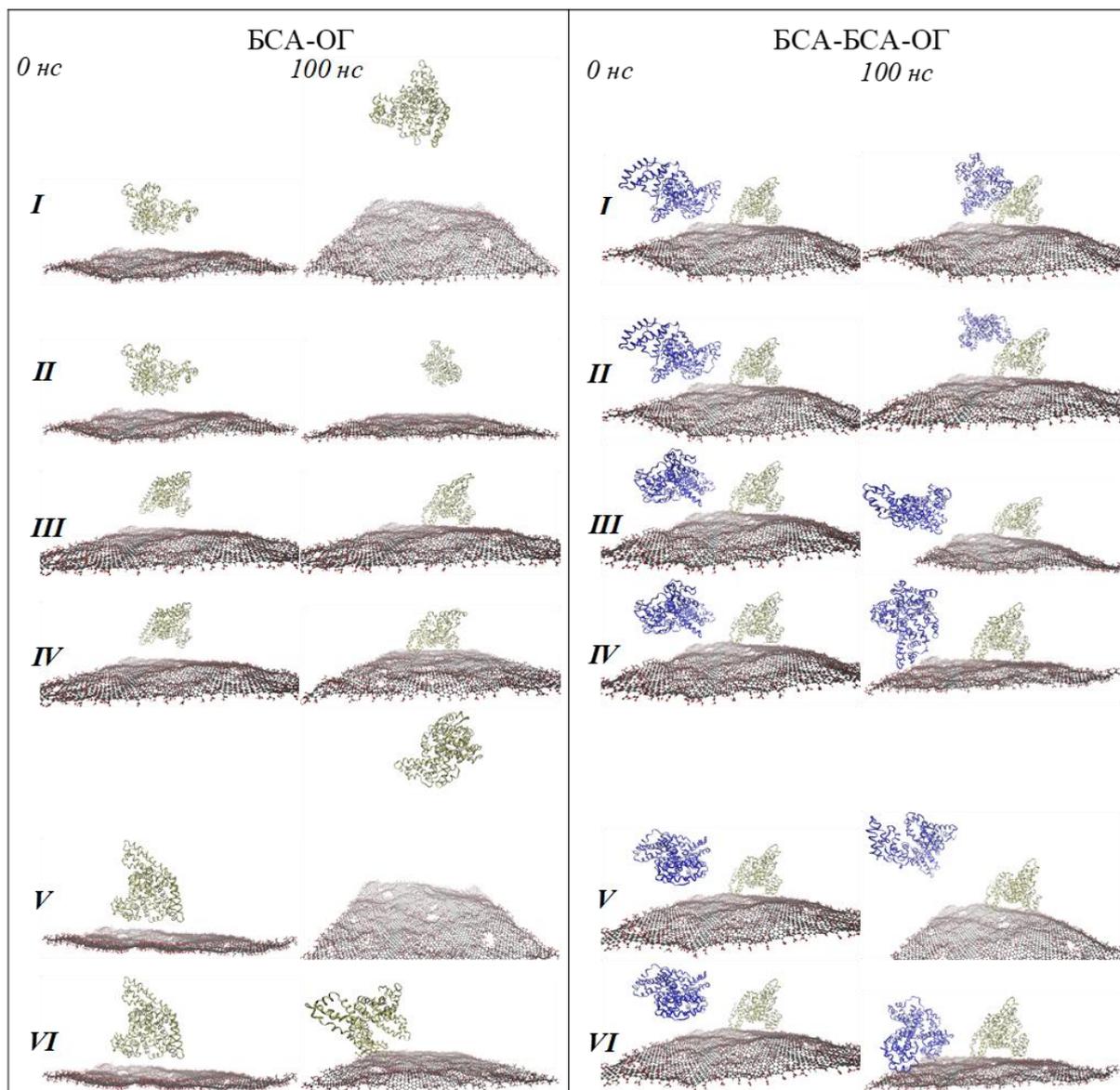
⁵ Bunyaev V.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L., Badun G.A. Interaction of serum albumin and graphene oxide: Investigation by tritium probe and molecular docking // LXXII International conference "NUCLEUS-2022: Fundamental problems and applications" (Book of Abstracts)

применили метод молекулярной динамики ⁶. Дополнительно рассмотрено взаимодействие БСА с комплексом адсорбированного на поверхности ОГ белка.

Динамику эволюции состояния всей расчетной системы принято называть траекторией. Для анализа взаимодействия оксида графена с БСА рассмотрено десять различных траекторий, в которых варьировалось исходное положение белка относительно поверхности оксида графена. На рисунке 30 римскими цифрами показаны траектории белка относительно ОГ (БСА-ОГ) и при образовании сложного комплекса (БСА-БСА-ОГ). В траекториях *I, III, V, VII* и *IX* применены модель термостата и баростата Берендсена; в траекториях *II, IV, VI, VIII* и *X* - модель термостата Нозе-Гувера, а модель баростата Паринелло-Рамана [322]. При рассмотрении образования сложного комплекса между адсорбированным на ОГ белком и белком из раствора (PDB: 4F5S, chainB) был выбран комплекс БСА-ОГ, полученный в результате расчета взаимодействия БСА с ОГ. Для сложного комплекса также рассмотрено десять траекторий. Одним из определяющих параметров любого молекулярно-динамического исследования является время, за которое рассматриваемая система достигнет равновесного состояния. Для сложных систем, состоящих из биомолекулярных комплексов, время расчета рекомендуется производить в течение 100 нс с шагом одной итерации равным 2 фс [323].

В начале моделирования между белком и субстратом преобладают силы дальнедействующего кулоновского взаимодействия [324]. В случае адсорбции БСА на оксиде графена отталкивание белка от поверхности ОГ можно объяснить тем, что в непосредственной близости к ОГ поверхность БСА содержит большое количество отрицательно заряженных аминокислотных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислоты. Однако заряд поверхности БСА не является строго локальным, поскольку на поверхности белковой глобулы содержатся и положительно заряженные аминокислотные остатки лизина, гистидина и аргинина, что может объяснить притяжение молекулы белка к поверхности ОГ [325].

⁶ Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [347].



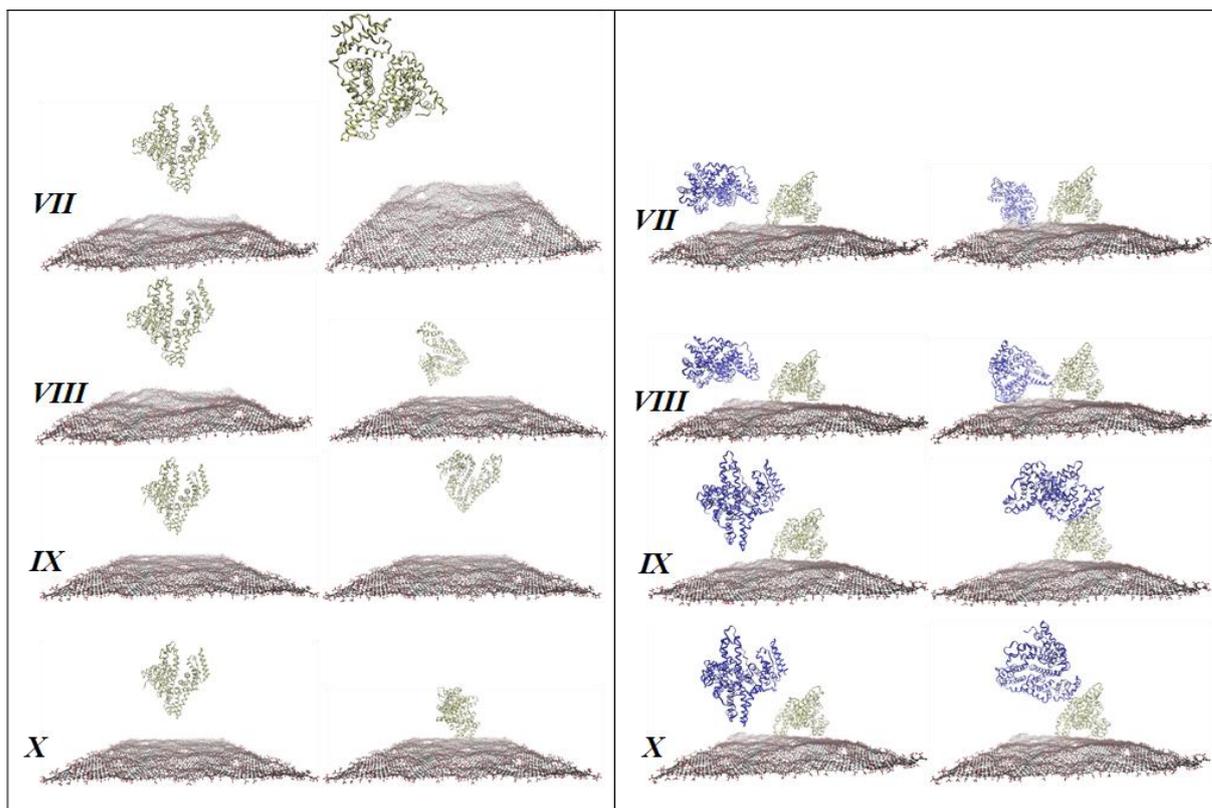


Рисунок 30. Структурная организация БСА относительно поверхности ОГ.

БСА-ОГ: положение БСА относительно поверхности оксида графена;

БСА-БСА-ОГ: положение БСА относительно комплекса БСА-ОГ.

Изображения слева – исходное положение белка (0 нс); справа – после проведения молекулярно-динамического расчета (100 нс). Римскими цифрами обозначен порядковый номер траектории. Для сложного комплекса БСА-БСА-ОГ расстояние между свободным белком и комплексом БСА-ОГ составляет от 1.2 до 2 нм. При таких начальных условиях основной вклад вносит дальнедействующее электростатическое взаимодействие.

В расчетах по взаимодействию ОГ с БСА только в третьей (*III*), четвертой (*IV*), шестой (*VI*) и десятой (*X*) траекториях образуется устойчивый комплекс белка с ОГ, причем структурная организация БСА в третьей и четвертой траекториях схожа при различных вариациях моделей термостата и баростата. На рисунке 31 приведены данные, позволяющие дать оценку устойчивости комплексов БСА с ОГ.

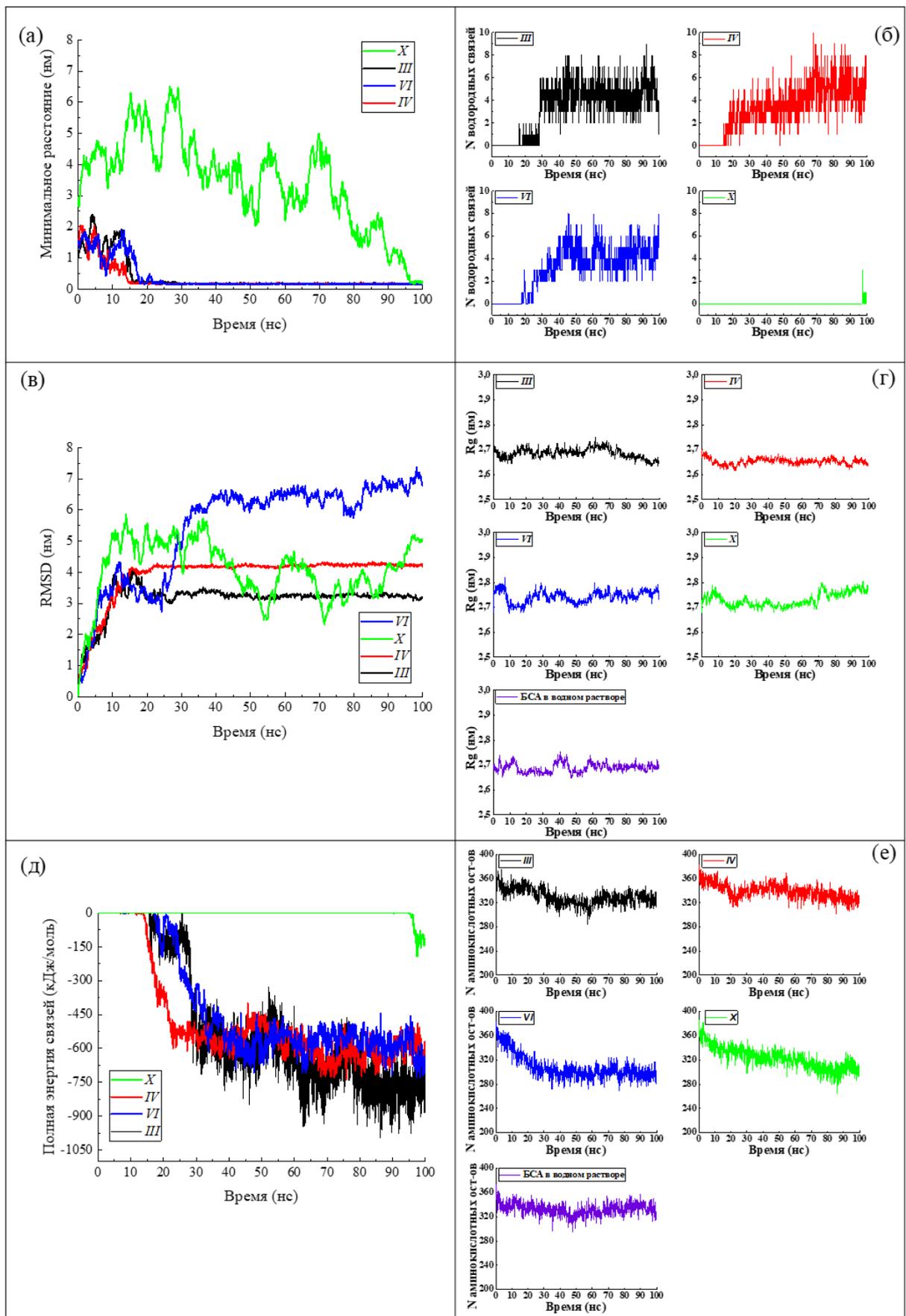


Рисунок 31. Динамика изменения свойств исследуемых систем при взаимодействии ОГ и БСА. Изменение минимального расстояния между белком и ОГ (а); число водородных

связей между БСА и ОГ (б); среднеквадратическое отклонение БСА (в); радиус инерции БСА (г); полная энергия связей (д) и число аминокислотных остатков, образующих вторичную структуру (α -спиралей) БСА (е).

Исходное минимальное расстояние между БСА и ОГ составило 1.2 нм, но уже после 30 нс не превышало 2.5 Å для трех траекторий, что может свидетельствовать о возникновении водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (рисунок 31а). На рисунке 31б видно, что число образующихся водородных связей близки по значению (кроме десятой траектории). Широко применяемым при интерпретации данных молекулярно-динамического исследования является анализ среднеквадратического отклонения (RMSD - Root Mean Square Deviation) позиций атомов относительно референсной структуры [234]. Рассмотрено среднеквадратическое отклонение БСА относительно ОГ при образовании комплекса (рисунок 31в). После 30 нс для траекторий *III* и *IV* колебания имеют тенденцию к затуханию и выходу на плато, что говорит о формировании устойчивого комплекса. В траектории *VI* белок располагается на краю листа ОГ, а в траектории *X* образует меньшее количество водородных связей, что и может объяснить более сильные колебания среднеквадратического отклонения. По изменению радиуса инерции (R_g - Radius of gyration) можно охарактеризовать динамику изменения компактности исследуемых систем. Радиус инерции является среднеквадратическим расстоянием между центром масс и всеми атомами исследуемого вещества. Взаимодействие БСА с ОГ не приводит к сильным структурным изменениям белка. При адсорбции БСА на ОГ изменяется радиус инерции в пределах 1 Å, что сопоставимо с поведением белка в водном растворе без ОГ. Оценочным параметром, в котором отображена динамика изменения энергии межмолекулярного взаимодействия может применяться полная энергия связей между белком и ОГ (рисунок 31д). Полная энергия связи не является мерой свободной энергии Гиббса, однако учитывает суммарный вклад в межмолекулярное несвязанное взаимодействие при образовании нековалентных связей. Из графика полной энергии связи можно сделать вывод о том, что его минимальное значение соответствует траектории *III*. В дальнейшем комплекс БСА-ОГ из траектории *III* применяли в расчете взаимодействия между свободным белком и комплексом БСА-ОГ.

Для более достоверной оценки изменения структуры белка проводили анализ изменения числа аминокислотных остатков, вовлеченных в образование вторичной структуры БСА. На рисунке 31е приведена динамика изменения числа аминокислотных остатков, образующих α -спирали вторичной структуры БСА. Во временной области расчета 0 – 20 нс наблюдается постепенное снижение числа остатков с 370 до 340 (в траекториях III и IV), что можно объяснить взаимодействием глобулы белка с растворителем (водой), за это время происходят конформационные изменения поверхности белковой глобулы [326]. В траектории VI наблюдается более существенное изменение, что может быть связано с тем, что белок взаимодействует с карбоксильными группами, которыми насыщен край листа ОГ. В траекториях III и IV за время моделирования претерпело изменение около 11% аминокислотных остатков, отвечающих за образование α -спиралей вторичной структуры белка. Вклад каждого аминокислотного остатка в динамику конформационного изменения структуры белка в процессе молекулярно-динамического расчета для траектории III представлен на рисунке 32 в виде dssp-диаграммы (DSSP - Determine the Secondary Structure of a Protein) [327].

Вторичная структура

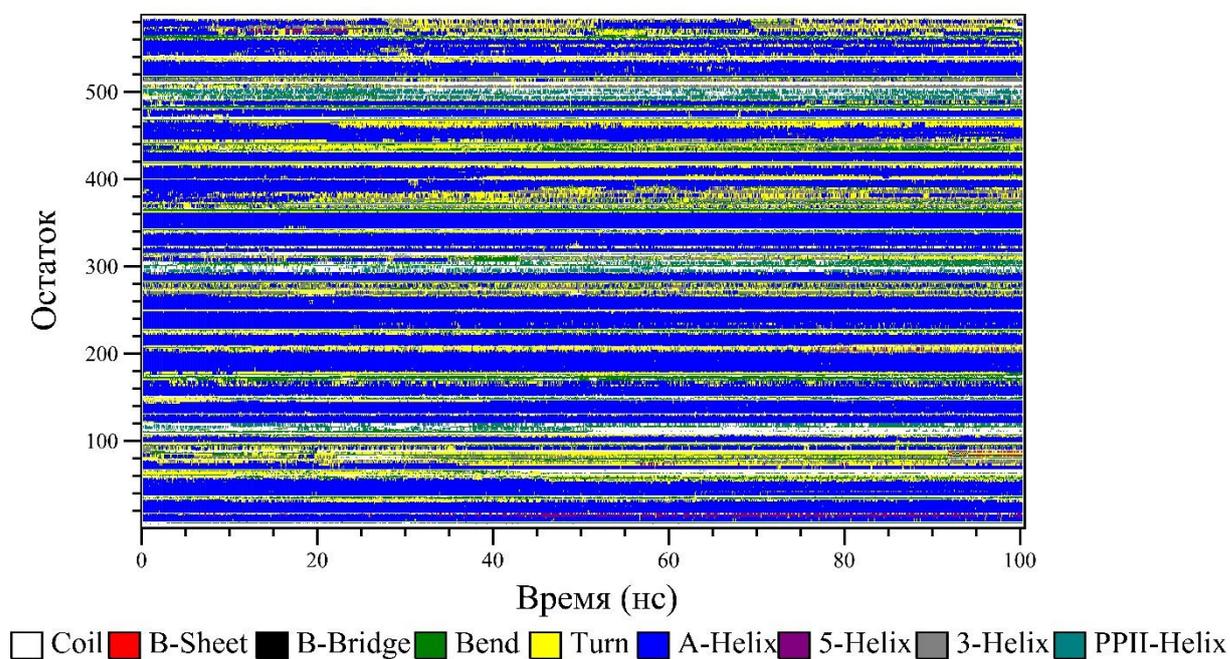


Рисунок 32. Динамика изменения вторичной структуры БСА в процессе образования комплекса с оксидом графена.

Синей областью (рисунок 32) отображены аминокислотные остатки,

образующие α -спираль вторичной структуры. При инкубации белка в воде остатки с порядковым номером 560-583, 370-380 претерпевают конформационные изменения в течение первых 30 нс времени расчета, что может быть объяснено образованием водородных связей с молекулами растворителя. В процессе образования комплекса белка с оксидом графена (30 - 100 нс), конформационные изменения претерпевают аминокислотные остатки с порядковым номером 70-80, 305-320, 485-490. В целом вторичная структура БСА слабо изменяется, и белок сохраняет свою структуру в комплексе с оксидом графена. Дальнейшую оценку взаимодействия БСА-ОГ проводили исходя из траектории III.

На рисунке 33 приведены аминокислотные остатки поверхности глобулы БСА, образующие нековалентные связи с кислородсодержащими функциональными группами и гидрофобными участками поверхности оксида графена.

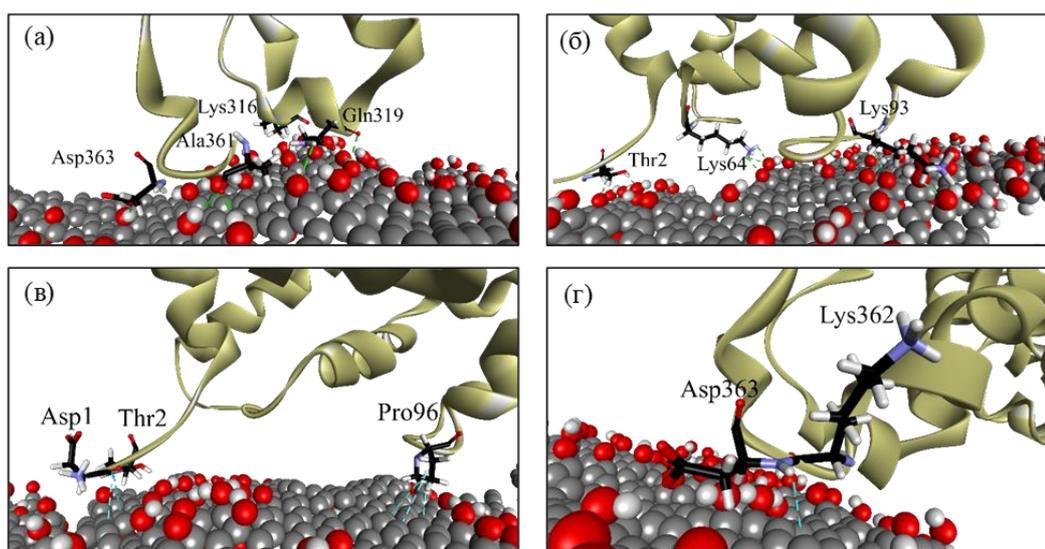


Рисунок 33. Водородные связи (а, б) и гидрофобные взаимодействия (в, г) аминокислотных остатков БСА с поверхностью ОГ.

Аминокислотные остатки Lys (64, 93, 316), треонина (Thr2), Ala361, Gln319 и Asp363 образуют водородные связи с кислородсодержащими функциональными группами оксида графена (рисунок 33, а, б). Между атомами углерода пептидных связей Asp1-Thr2, Lys362-Asp363, а также гетероциклом Pro96 возникают гидрофобные взаимодействия с sp^2 -гибридизованными атомами углерода поверхности ОГ.

В качестве дополнительного подтверждения образования связей между белком

и ОГ рассмотрим график среднеквадратичных флуктуаций аминокислотных остатков БСА, находящегося как в водном растворе, так и на поверхности ОГ (рисунок 34).

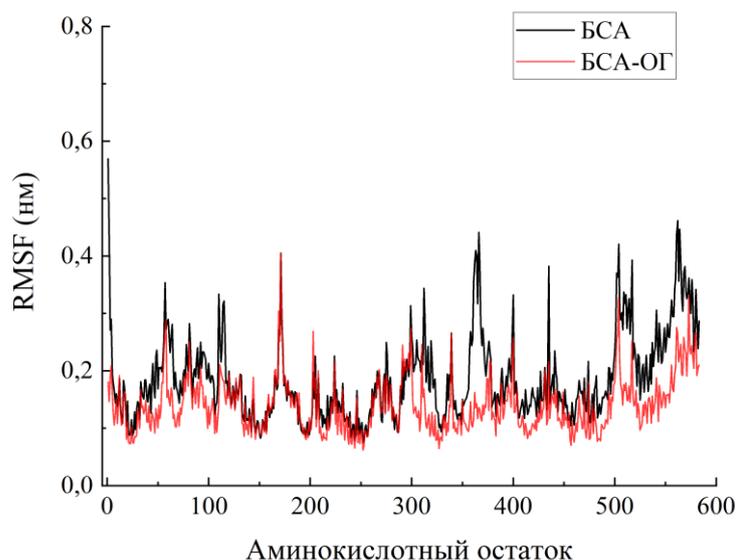


Рисунок 34. Среднеквадратичные флуктуации аминокислотных остатков БСА в растворе (БСА) и на ОГ (БСА-ОГ).

Из данных графика (рисунок 34) можно сделать вывод о том, что аминокислотные остатки, участвующие в образовании нековалентных связей с ОГ имеют более низкие значения RMSF (Root Mean Square Fluctuation), поскольку становятся менее подвижными по сравнению с белком в растворе. Так, подвижность остатков аминокислот с порядковым номером 1, 2, 64, 93, 96, 316, 319, 361, 362, 363 уменьшается при образовании комплекса БСА с ОГ. Стоит отметить, что у остатков 560-583 так же уменьшаются значения RMSF, что в совокупности с данными рисунка 32 подтверждает предположение об изменении вторичной структуры белка.

Одним из факторов стабилизации белка на поверхности оксида графена может выступать образование межмолекулярных водородных связей между аминокислотными остатками белка и кислородсодержащими функциональными группами ОГ через образование водяных мостиков с молекулами воды [328]. На рисунке 35 представлены возможные водяные мостики, связывающие ОГ с БСА.

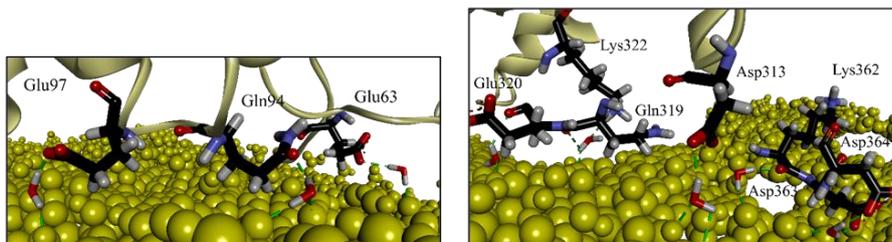


Рисунок 35. Образование водяных мостиков комплекса БСА-ОГ.

Карбоксильные группы аминокислотных остатков аспарагиновой (Asp313, 363, 364) и глутаминовой кислоты (Glu 63, 97, 320) взаимодействуют с атомом водорода молекулы воды, которая в свою очередь образует водородные связи с функциональными группами поверхности ОГ. У глутамина (Gln94, 319) связь с молекулой воды образуется через карбонильную группу аминокислотного остатка. Положительно заряженные остатки лизина (Lys322, 362) также образуют связи с молекулой воды. Аминогруппа боковой цепи Lys322 взаимодействует с атомом кислорода молекулы воды. Аминокислотный остаток Lys362 связан с молекулой воды через карбонильную группу пептидной связи с Asp363.

Проведен анализ SASA (Solvent Accessible Surface Areas) по методу, описанному в работе [329] по доступности аминокислотных остатков глобулы БСА для молекул воды. С помощью данного метода возможно определить площадь, занимаемую белком при его адсорбции на поверхности ОГ (уравнение 12) [234].

$$\text{Площадь контакта} = \frac{(SASA_{\text{БСА}} + SASA_{\text{ОГ}} - SASA_{\text{БСА-ОГ}})}{2} \quad (12)$$

где $SASA_{\text{БСА}}$, $SASA_{\text{ОГ}}$, $SASA_{\text{БСА-ОГ}}$ – площадь поверхности БСА, ОГ, комплекса БСА-ОГ, доступная для зондовой молекулы воды (нм^2);

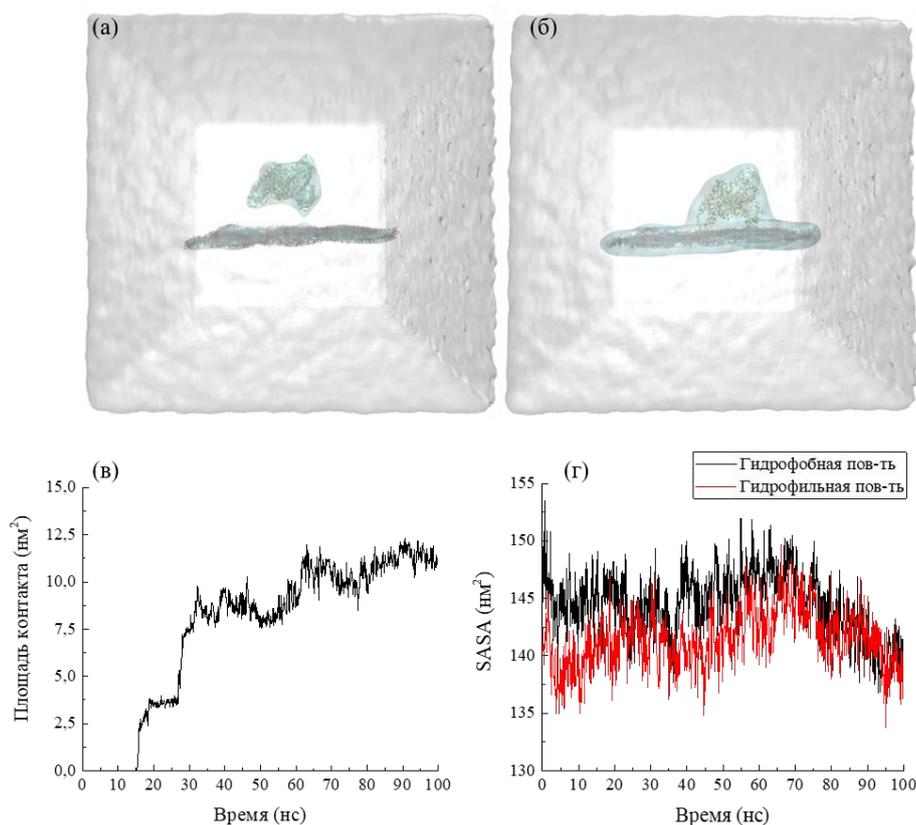


Рисунок 36. Доступная растворителю площадь поверхности: (а) $SASA_{BCA}$, $SASA_{OI}$; (б) $SASA_{BCA-OI}$; (в) площадь контакта БСА с ОI; (г) изменение доступности для молекул воды гидрофобных и гидрофильных сайтов БСА.

На рисунке 36 представлены состояния системы до проведения расчета (а) и после (б). Поверхность, доступная для воды, отображена бирюзовой областью. Среднее значение площади контакта белка с поверхностью ОI составляет 11 nm^2 (рисунок 36, в). При образовании комплекса БСА с ОI гидрофобная поверхность белка становится менее доступной для молекул воды, и это может быть связано с гидрофобным взаимодействием, представленным на рисунке 33 (в, г). А также в виду изменения вторичной структуры белка согласно рисунку 32.

Максимальная площадь, которую могут занимать молекулы адсорбированного на ОI альбумина, возможно определить по выражению 13:

$$S_{BCA}^{адс} = \frac{m_{BCA} N_A}{M_{BCA}} S_{контакта} \quad (13)$$

где m_{BCA} масса адсорбированного белка, г; M_{BCA} молекулярная масса БСА, 66500 г/моль ; N_A постоянная Авогадро, $6.02 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$; S_{BCA}^{max} площадь контакта

одной молекулы БСА с ОГ равна 11 нм^2 . Площадь, занимаемая одной молекулой БСА, в 4 раза больше площади контакта [320].

При значении адсорбции БСА на поверхности ОГ (368 мг/г) максимальная площадь молекул белка составляет $3.3 \times 10^{17} \text{ нм}^2$. Поскольку в водном растворе при нейтральном pH монослойный оксид графена представляет собой равномерно распределенную суспензию, то для молекул белка поверхность углеродного субстрата остается полностью доступной. Определим максимальную доступную для белка площадь ОГ по выражению 14:

$$S_{\text{ОГ}}^{\Sigma \text{max}} = \frac{m_{\text{ОГ}} N_A}{M_{\text{ОГ}}} S_{\text{ОГ}} \quad (14)$$

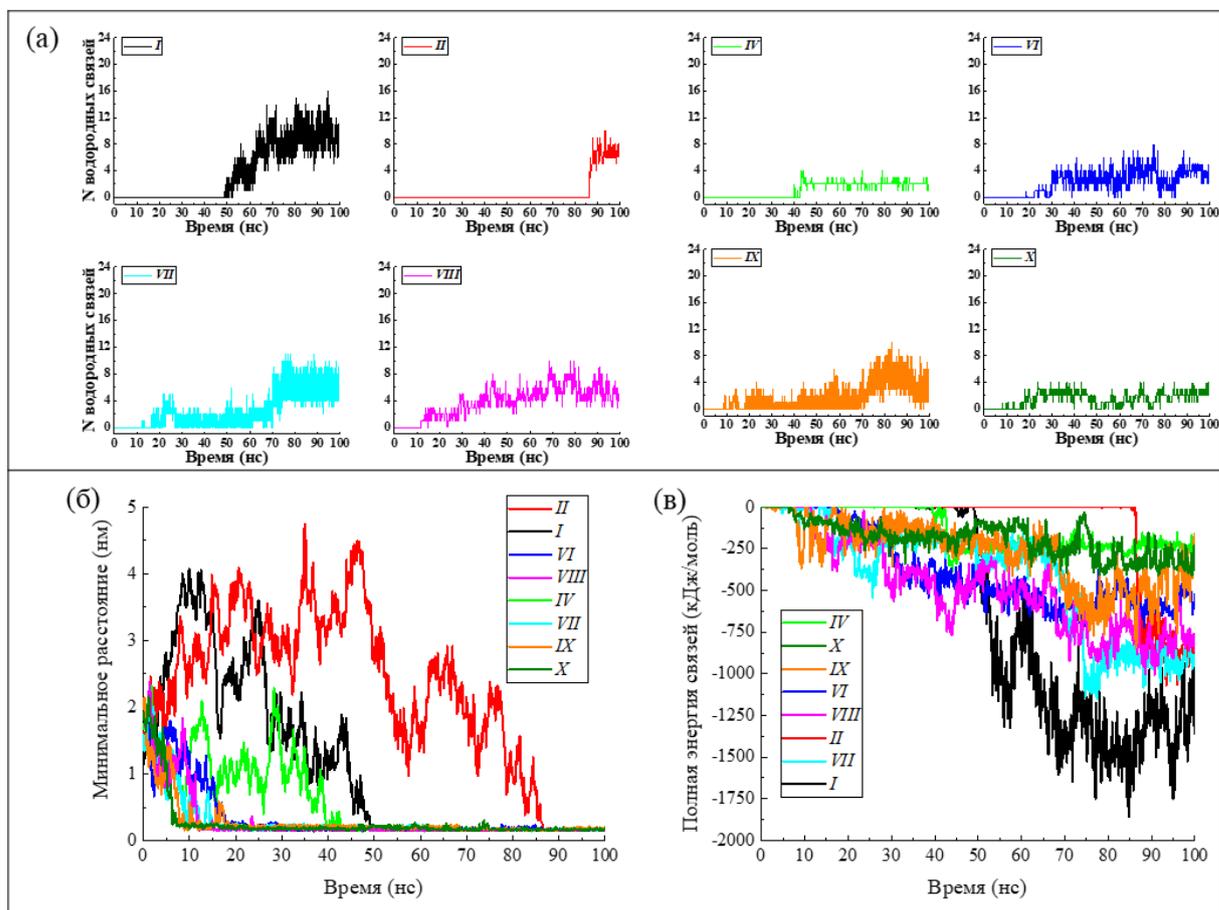
где $m_{\text{ОГ}}$ масса ОГ, г; $M_{\text{ОГ}}$ молекулярная масса ОГ, г/моль; N_A постоянная Авогадро, $6.02 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$; $S_{\text{ОГ}}$ площадь одной молекулы ОГ, нм^2 .

В расчетной части работы использовали структуру ОГ с молекулярной массой равной 143000 г/моль и площадью поверхности 225 нм^2 . Таким образом максимальная площадь доступной поверхности ОГ для молекул белка составляет $2.1 \times 10^{18} \text{ нм}^2$, что в шесть раз выше максимальной площади, занимаемой всеми молекулами адсорбированного белка. Учитывая и обратную сторону поверхности ОГ максимальная доступная площадь углеродного субстрата возрастает до $4.2 \times 10^{18} \text{ нм}^2$.

С одной стороны, согласно расчетам по уравнению 14 поверхность ОГ остается доступной для образования мономолекулярного слоя белка, поскольку площадь, занимаемая молекулами БСА при его максимальной адсорбции, значительно меньше площади доступной поверхности оксида графена. С другой стороны, с увеличением количества адсорбированного БСА резко снижается его удельная радиоактивность при введении трития в комплекс БСА-ОГ (рисунок 28). Исходя из этого, предполагаем, что молекулы БСА при адсорбции на ОГ формируют не монослой, а предпочтительными адсорбционными центрами являются уже иммобилизованные на поверхности ОГ молекулы БСА.

Для подтверждения данного предположения был проведен расчет взаимодействия в трехкомпонентном комплексе БСА-БСА-ОГ (рисунок 30). В

расчетах по взаимодействию БСА с комплексом БСА-ОГ за формирование сложного комплекса отвечают траектории *I*, *II*, *IV*, *VI-X*. Причем четыре из них (*I*, *II*, *IX*, *X*) приводят к образованию поверхностного слоя белка. В остальных траекториях белок из раствора располагается на краю листа оксида графена.



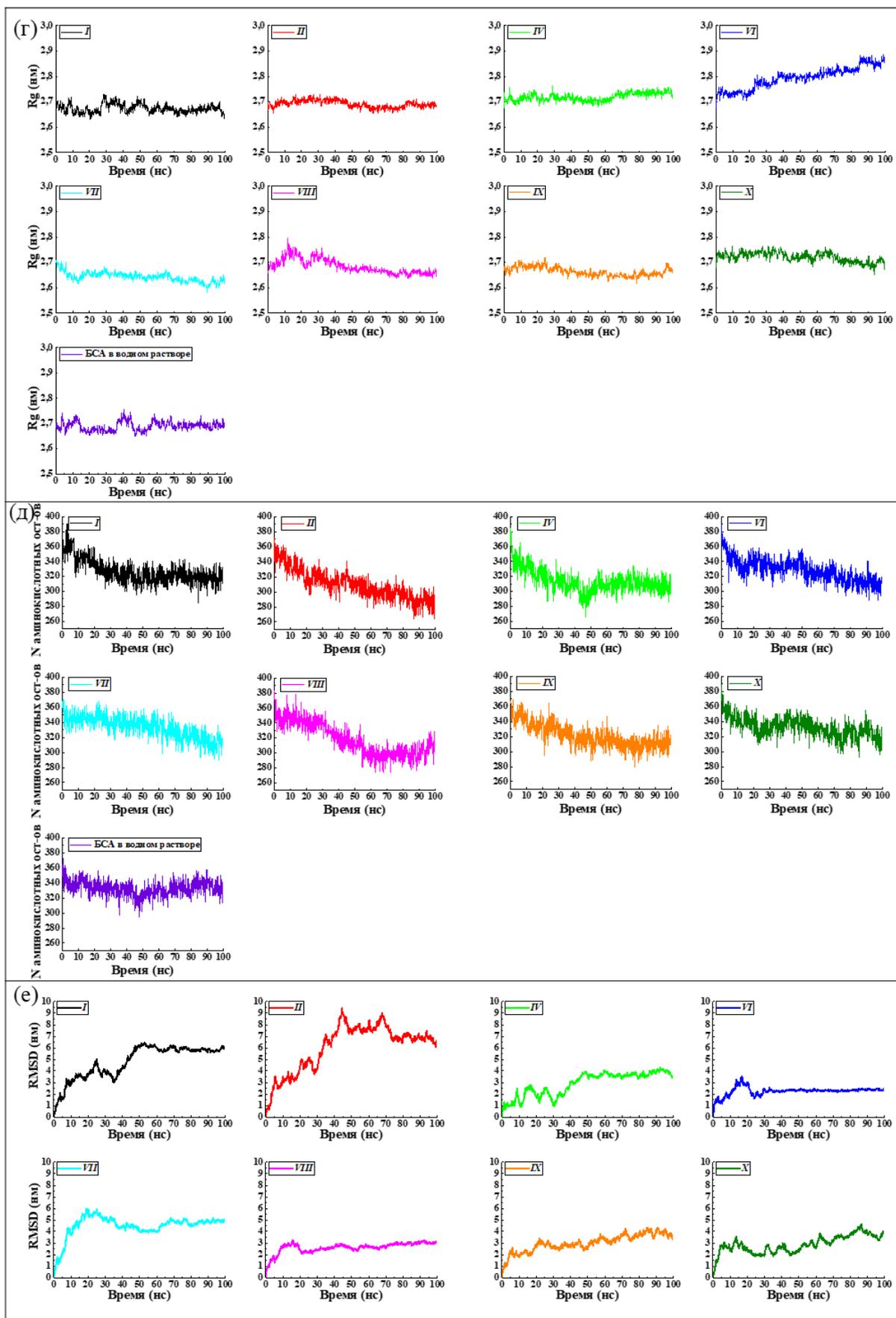


Рисунок 37. Динамика изменения свойств исследуемых систем при взаимодействии БСА с комплексом БСА-ОГ. Изменение числа водородных связей

между БСА и БСА-ОГ (а); минимального расстояния между белком из раствора и БСА-ОГ (б); полной энергии связей (в); радиуса инерции БСА из раствора (г); число аминокислотных остатков белка из раствора, образующих вторичную структуру (д); среднеквадратического отклонения (е).

На рисунке 37 приведены данные, позволяющие дать оценку устойчивости сложных комплексов БСА-БСА-ОГ. Исходное минимальное расстояние между БСА в растворе и комплексом БСА-ОГ составило от 1.2 до 2 нм и на протяжении всего времени моделирования во всех рассматриваемых траекториях минимальное расстояние белка с БСА-ОГ достигло значений 2.5 Å, что может свидетельствовать о возникновении нековалентных межмолекулярных водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (рисунок 37б). Максимальное число образующихся водородных связей соответствует *I* траектории, отвечающей за белок-белковое взаимодействие (рисунок 37а). После 50 нс среднеквадратичное отклонение *I* траектории мало изменяется и выходит на плато (рисунок 37е). Изменение структуры БСА из раствора незначительно, поскольку его радиус инерции не превышает значения в 1 Å (рисунок 37г). Из графика полной энергии связи можно сделать вывод о том, что траектория *I* имеет наименьшее значение и наиболее вероятно, что будет образование именно такого комплекса. Из всех рассматриваемых траекторий именно в *I* образуется наиболее устойчивый комплекс БСА с БСА-ОГ.

Анализ нековалентных связей между белком, адсорбированным на поверхности ОГ и белком в растворе представлен на рисунке 38.

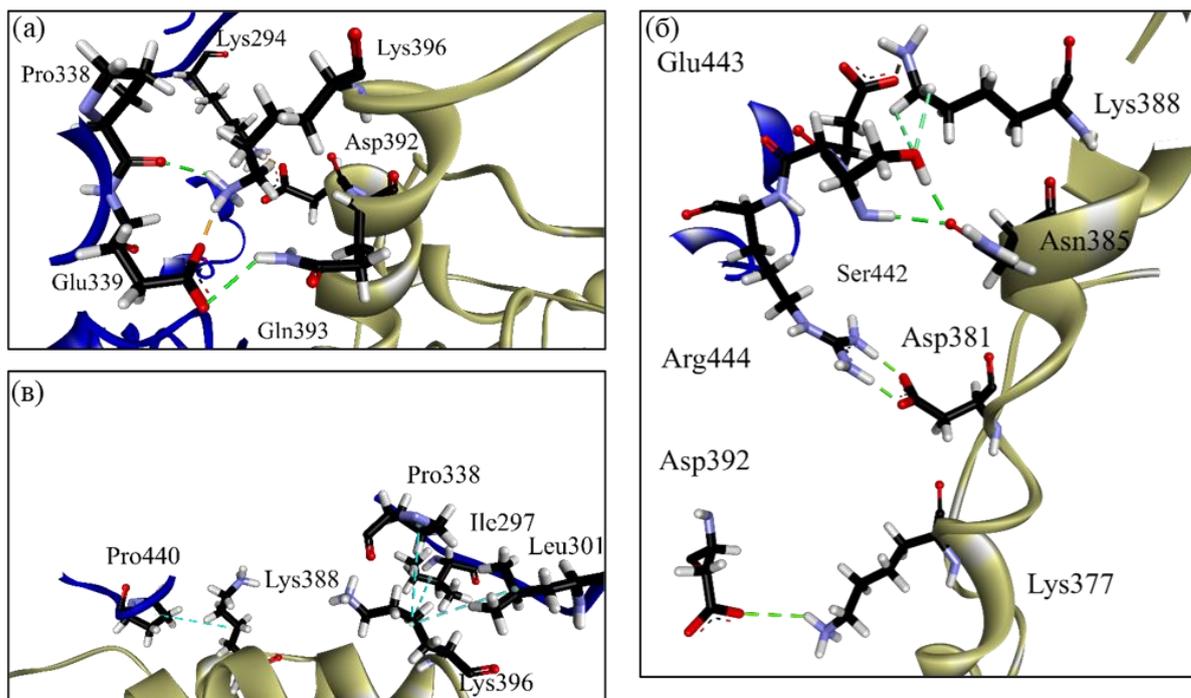


Рисунок 38. Водородные связи (а, б) и гидрофобные взаимодействия (в) аминокислотных остатков БСА из раствора с поверхностью БСА, адсорбированного на ОГ.

За образование водородных связей между БСА из раствора и БСА-ОГ отвечают остатки Lys294, Pro338, Glu (339,443), Arg444, Ser442, Asp392 БСА из раствора и остатки Lys (377,388,396), Asp (381,392), аспарагина Asn385, Gln393 БСА, адсорбированного на ОГ рисунок 38 (а, б). Гидрофобные взаимодействия происходят между аминокислотными остатками Pro (338,440), Ile297, Leu301 БСА из раствора и остатками Lys (388,396) БСА на ОГ (рисунок 38, в).

В образовании связей между молекулами белка также принимают участие молекулы воды [330]. На рисунке 39 приведены водяные мостики, связывающие белок, адсорбированный на ОГ с белком из раствора.

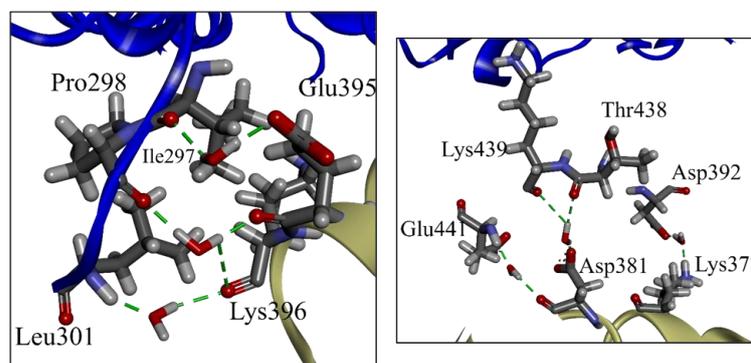


Рисунок 39. Образование водяных мостиков тройного комплекса БСА-БСА-ОГ.

Аминокислотные остатки Ile297, Pro298, Leu301, Thr438, Lys439, Glu441, Asp392 БСА из раствора связываются через водяные мостики с остатками Glu395, Lys (377,396), Asp381 белка, адсорбированного на ОГ.

С помощью метода радиоактивных индикаторов определено количество бычьего сывороточного альбумина, прочно связанного с поверхностью оксида графена. Особенности структурной организации белка на поверхности ОГ определили с помощью обработки атомами трития адсорбционного комплекса БСА-ОГ и изучением распределения трития по типам аминокислотных остатков. На основе данных компьютерного моделирования определены сайты связывания как БСА с ОГ, так и БСА в составе тройного комплекса БСА-БСА-ОГ. С помощью двух независимых расчетных методов (молекулярного докинга и молекулярной динамики) установлены участки связывания комплекса БСА-ОГ. При адсорбции БСА на ОГ изменению подвергаются 11% аминокислотных остатков, входящих в α -спираль вторичной структуры. С помощью методов тритиевого зонда и молекулярной динамики установлено, что взаимодействие БСА из раствора происходит преимущественно с поверхностью предварительно адсорбированного БСА на ОГ. В образовании комплексов принимают участие электростатические, гидрофобные взаимодействия, водородные связи, в том числе посредством мостиковых молекул воды.

3.6. ХИТОЗАН И СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН КАК МОДИФИКАТОРЫ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

За основу написания настоящей главы были взяты результаты работы нашего научного коллектива в виде опубликованной статьи в журнале «Журнал физической химии» [319]⁷.

Интерес к такому типу материалов как углеродные нанотрубки (УНТ) обусловлен их физико-химическими и механическими свойствами [331]. Обладая высокой прочностью и в тоже время гибкостью, одностенные углеродные нанотрубки могут быть рассмотрены как материал протезов - компонентов анатомического и функционального восстановления частей тела человека. При таком использовании УНТ важно обеспечить их биосовместимость. При адсорбции полисахаридов или белков на поверхности УНТ изменятся физико-химические свойства материала, что можно использовать при разработке биосовместимых материалов.

Сывороточный альбумин является важным компонентом крови и представляет собой глобулярный белок, выполняющий роль регулятора онкотического давления плазмы и рН крови. С точки зрения транспортной функции альбумины связывают и переносят биологические молекулы (белки, пептиды, жирные кислоты и пр.) и ионы металлов внутри живого организма [332]. Поскольку вышеперечисленные функции белка являются критически важными для нормального функционирования организма человека - необходимо исследовать взаимодействие УНТ с альбумином.

Материалы, которые не проявляют токсичности к компонентам крови и не рассматриваются иммунной системой как чужеродные, принято считать биосовместимыми. Такие материалы можно отнести к двум основным классам: неорганические (некоторые сплавы металлов, керамика медицинского назначения, композитные неорганические материалы) и органические (белки, полисахариды и

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Буняев В.А., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. Хитозан и сывороточный альбумин как модификаторы углеродных нанотрубок // Журнал физической химии 2024. Т. 98, № 7. С. 29–36. (Импакт-фактор (SJR): 0.204) (33%)

другие биodeградируемые биополимеры) [333,334]. Для обеспечения биосовместимости можно использовать покрытия, в том числе биополимерами, например, хитозаном. Хитозан получают из хитина путем деацетилирования N-ацетилглюкозамина. Амин в гликозаминовом звене в области низких значений pH (<6) находится в протонированной форме, что повышает растворимость хитозана в водной среде. Количество гликозаминовых звеньев хитозана определяет его среднюю молекулярную массу, а степень деацетилирования - долю аминогрупп, освобожденных от ацетильной функциональной группы [335,336].

Важно знать количество модификатора, нанесенного на поверхность УНТ, что является нетривиальной задачей. В данной работе для определения количества модификатора, связанного с углеродным материалом, предложено использовать метод радиоактивных индикаторов и меченные тритием хитозан и бычий сывороточный альбумин (БСА). Универсальным методом получения меченных тритием соединений является метод термической активации трития, в котором реакционными частицами являются атомы трития, получаемые диссоциацией молекул на вольфрамовой проволоке, нагретой электрическим током до 1500-2100 К. Этот метод позволяет ввести тритий как в низкомолекулярные соединения, так и полимеры с сохранением их свойств [3,242].

Для модификации УНТ использовали меченные тритием хитозан и БСА, что позволило определить количество модифицирующего агента, связавшегося с углеродным наноматериалом. Было найдено, что в исследуемых областях концентраций белка и полисахарида наблюдается практически линейная зависимость адсорбции от начальной и равновесной концентраций модификатора (рисунок 40).

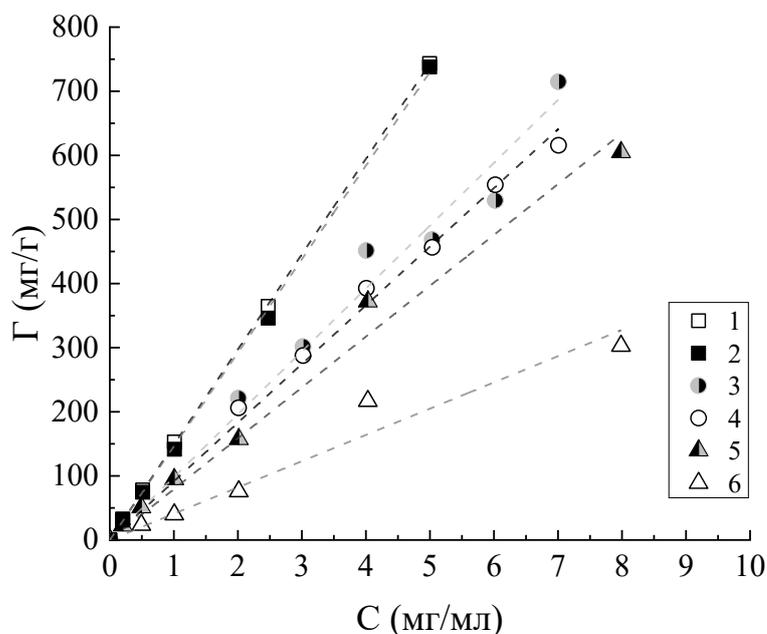


Рисунок 40. Изотермы адсорбции биополимеров на УНТ: БСА, рН 7 (1, 2), хитозан 50 кДа, рН 1.6 (3, 4), хитозан 210 кДа, рН 2 (5, 6); равновесная адсорбция (1, 3, 5) и после отмывки водой (2, 4, 6).

Было показано, что значительное количество хитозана и БСА прочно удерживается на поверхности УНТ и не удаляется после промывки сорбента водой. Поэтому при интерпретации результатов использовали начальную концентрацию адсорбата в растворе, которая прежде всего определяет, как будет протекать адсорбция.

На примере хитозана 210 кДа исследовали влияние рН раствора на адсорбцию. Увеличение рН приводило к тому, что равновесная адсорбция уменьшалась, а необратимая возрастала (рисунок 41).

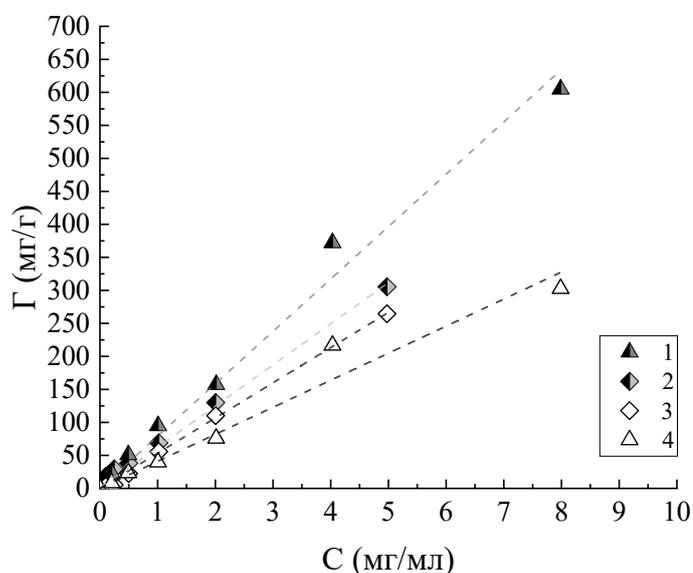


Рисунок 41. Изотермы адсорбции хитозана 210 кДа на УНТ при рН 2 (1, 3) и рН 7 (2, 4); равновесная адсорбция (1, 2) и после отмывки водой (3, 4).

Изотермы адсорбции описали уравнением, аналогичным уравнению Генри, приведенное в девятой главе диссертации (уравнение 11). В таблице 5 приведены значения константы этого уравнения для всех сорбционных экспериментов.

В результате адсорбции хитозана повышалась стабильность УНТ в водном растворе за счет увеличения электрокинетического потенциала, который измеряли для препаратов, отмываемых от раствора модификатора, то есть содержащих прочно связанный хитозан. Данные представлены на рисунке 42. Хотя адсорбция хитозана 50 кДа была выше, чем хитозана 210 кДа, изменение электрокинетического потенциала при увеличении концентрации хитозана в растворе происходило похожим образом, и при концентрации 8 мг/мл были получены близкие значения электрокинетического потенциала 36 ± 1 мВ для обоих препаратов.

Таблица 5. Константа линейной зависимости количества адсорбированного вещества от начальной концентрации адсорбата в растворе.

| Адсорбент | Адсорбат | Константа в уравнении (11), мл/мг | |
|---------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------|
| | | Равновесие с адсорбатом | После отмывки |
| УНТ | Хитозан 50 кДа (рН 1.6) | 98.1±3.1 | 91.5±1.4 |
| УНТ | Хитозан 210 кДа (рН 2) | 79.3±2.8 | 41.0±2.5 |
| УНТ | Хитозан 210 кДа (рН 7) | 62.4±1.4 | 53.3±0.6 |
| УНТ | БСА (рН 7) | 148.6±0.4 | 145.9±1.5 |
| УНТ/хитозан 210 кДа | БСА (рН 7) | 144.5±3.9 | 144.8±1.8 |
| УНТ/БСА | Хитозан 50 кДа (рН 1.6) | - | 81.5±2.5 |
| УНТ/БСА | Хитозан 210 кДа (рН 2) | - | 31.5±1.1 |

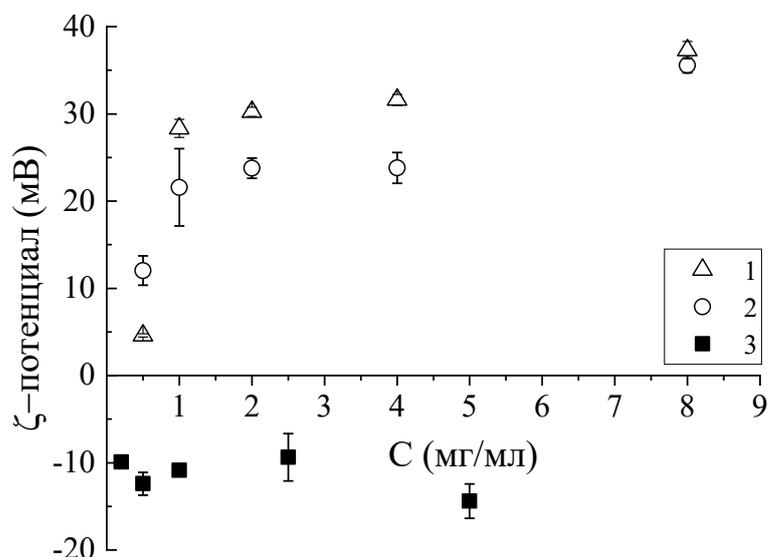


Рисунок 42. Зависимость электрокинетического потенциала комплекса УНТ-модификатор: хитозан 210 кДа (1), хитозан 50 кДа (2), БСА (3); от концентрации полимера в насыщающем растворе.

Использование кислой среды для адсорбции хитозана связано с тем, что растворы получали растворением хитозана в соляной кислоте. Таким образом полимерные молекулы хитозана в растворе представляли собой поликатионы с хлорид-ионом в качестве противоиона. Известно, что взаимодействие между полисахаридами и УНТ протекает преимущественно по нековалентному механизму [337]. Одним из факторов, влияющих на связывания хитозана с УНТ, может быть присутствие в их составе других атомов кроме углерода или углеродсодержащих функциональных групп. Так как при очистке углеродных нанотрубок после синтеза проводят их обработку кислотами или кислородом при нагревании, на поверхности образуются кислородсодержащие функциональные группы, которые могут вносить свой вклад в электростатическое взаимодействие между УНТ с полисахаридом [338,339]. Так как равновесная адсорбция при кислом рН возрастала, а необратимая изменялась мало, можно сделать вывод, что карбоксильных групп в составе УНТ мало, и они не оказывают влияние на адсорбцию хитозана.

Согласно данным производителя в составе УНТ содержится фтор в количестве $7 \pm 2\%$ ат. Такие УНТ обычно имеют электронейтральную поверхность, что и было показано при измерении электрокинетического потенциала немодифицированных УНТ. Потенциально можно представить возможность взаимодействия аминогруппы хитозана с фтором по нуклеофильному механизму [340]. Однако в условиях адсорбционного эксперимента, проводимого при комнатной температуре,

реализация такого механизма маловероятна. Вместе с тем необратимую адсорбцию хитозана на УНТ можно объяснить образованием множественных водородных связей между фтором и амино- и гидроксильными группами хитозана. Дополнительными факторами, объясняющими необратимую адсорбцию хитозана на УНТ, могут являться гидрофобные и π - π взаимодействия между карбонильным фрагментом ацетильной группы полисахарида с sp^2 -гибридизованным углеродом в составе УНТ [341].

Для объяснения обнаруженных закономерностей адсорбции хитозана на УНТ будем исходить из того, что на поверхности углеродного материала достаточно мало карбоксильных групп, поэтому первоначально поверхность УНТ является незаряженной, особенно при $pH < 2$. Отсутствие электростатических взаимодействий с молекулами хитозана частично компенсируется диполь-дипольными и дисперсионными взаимодействиями, в том числе из-за присутствия фтора в составе УНТ. Благодаря фтору повышается также возможность образования водородных связей с гидроксильными и аминогруппами хитозана. Множественные водородные связи приводят к тому, что молекула прочно удерживается на поверхности, и такая адсорбция будет практически необратимой. Уменьшение средней молекулярной массы хитозана способствует более плотной упаковке молекул в адсорбционном слое, что и наблюдали в эксперименте.

В качестве модифицирующего агента использовали также БСА. Изотермы адсорбции БСА представлены на рисунке 44. Зависимость адсорбции белка от его концентрации в растворе оказалась близкой к линейной. Прочное связывание БСА с УНТ возможно за счет различных взаимодействий: электростатического, гидрофобного, образования водородных связей между фтором и амино- и гидроксильными группами аминокислотных остатков. Подтверждением возможных типов взаимодействий являются данные спектроскопии комбинационного рассеяния как исходных УНТ, так и их композитов с БСА [342]. Известно, что при $pH 7$ заряд белка имеет отрицательное ($-18e$) значение [343]. В результате адсорбции БСА электрокинетический потенциал комплекса УНТ с БСА изменялся от -10 мВ до -18 мВ при увеличении концентрации белка в растворе от 0.2 до 5 мг/мл (рисунок 42).

Модификация УНТ хитозаном и БСА приводила к получению устойчивых в растворе наночастиц за счет изменения электрокинетического потенциала. Были

получены суспензии, которые были достаточно устойчивы в водной среде в отличие от немодифицированных УНТ. Для определения способности полученных комплексов менять свойства поверхности, на которую их можно нанести, провели измерение краевого угла смачивания стекол, на которые наносились исследуемые комплексы. Изображение стекол с нанесенными углеродными нанотрубками, нанотрубками, модифицированными хитозаном и БСА, показаны на рисунке 43.

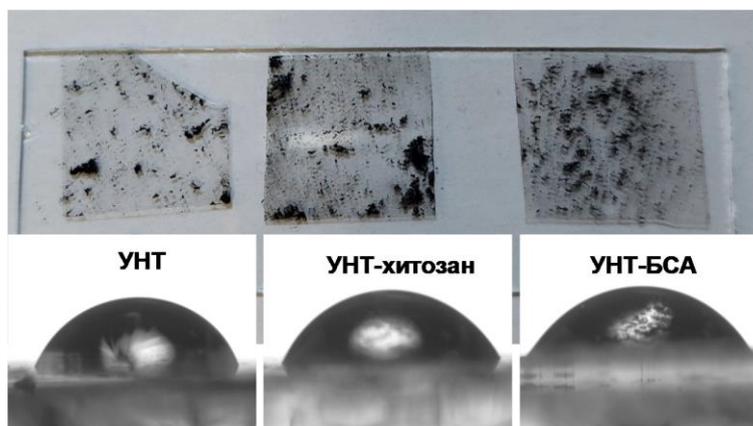


Рисунок 43. Изображения стекол с нанесенными нанотрубками и капли воды на этой поверхности.

Краевой угол смачивания составил 73° , 66° и 60° для нанотрубок, нанотрубок, модифицированных хитозаном, и нанотрубок, модифицированных альбумином, соответственно. Из полученных данных следует, что хитозан и альбумин увеличивают гидрофильность покрытия, причем альбумин в большей степени. Результат измерения, конечно, зависит от качества покрытия стекла нанотрубками. Необходимо отметить, что трубки, модифицированные альбумином, хуже удерживались на поверхности стекла, что связано с отрицательным электрокинетическим потенциалом покрытия.

В данной работе сделали попытку определить, как изменятся свойства УНТ при последовательной модификации двумя биополимерами. Для этого проводили сначала адсорбцию хитозана при концентрации 4.0 мг/мл и после отмывки не связавшегося полисахарида добавляли растворы БСА с разной концентрацией. Аналогичный эксперимент провели с обратной последовательностью нанесения модификаторов: сначала адсорбировали БСА при концентрации раствора 2.5 мг/мл, затем наносили хитозаны 50 и 210 кДа.

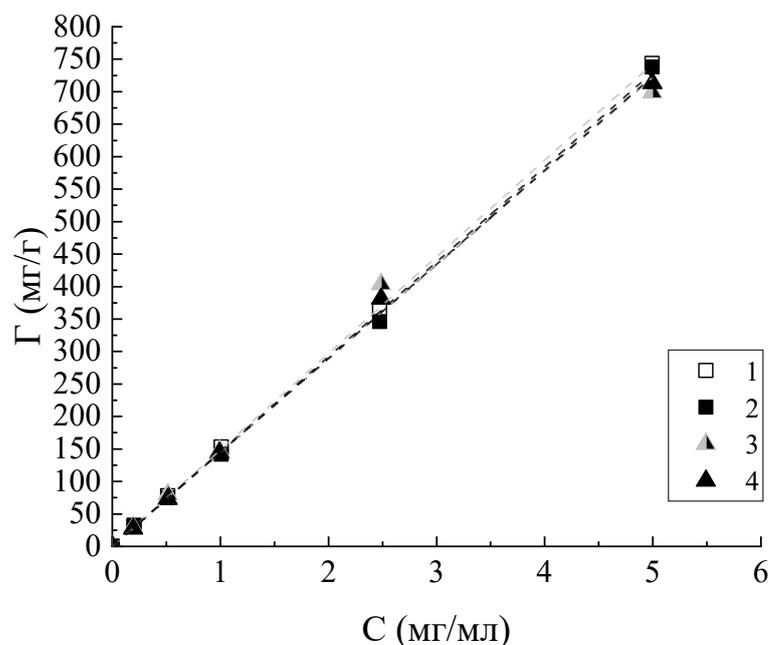


Рисунок 44. Изотермы адсорбции БСА, рН 7 на УНТ: исходных (1, 2) и модифицированных хитозаном 210 кДа (3, 4); равновесная адсорбция (1, 3) и после отмывки водой (2, 4).

Оказалось, что предварительная модификация УНТ хитозаном не влияет на количество БСА, входящего в состав адсорбционного комплекса (рисунок 44). Однако модификация альбумином снижала электрокинетический потенциал комплекса даже при низких концентрациях альбумина. При увеличении концентрации белка до 2.5 г/л для УНТ, предварительно модифицированных хитозаном 210 кДа, электрокинетический потенциал изменялся от +32 до +3 мВ (рисунок 45). Аналогичное изменение (от +24 до +7 мВ) было обнаружено и для УНТ, предварительно модифицированных хитозаном 50 кДа. Эффект оказался значительно больше наблюдавшегося для комплексов БСА-хитозан, которые образуются в растворе без участия УНТ [344]. Известно, что межмолекулярное взаимодействие между хитозаном и БСА обусловлено как электростатическим взаимодействием, так и образованием водородных связей между аминогруппами хитозана и карбоксильными группами аминокислот в составе альбумина [345].

Необходимо также учитывать возможное изменение вторичной структуры БСА [346]. Было показано, что при взаимодействии альбумина с поверхностью УНТ доля α -спиралей белка снижается по сравнению с его исходной структурой [134]. Совокупность этих причин, видимо, и приводит к тому, что предварительно

нанесенный хитозан не влияет на связывание альбумина с поверхностью УНТ, но получаемое покрытие способствует более сильному снижению электрокинетического потенциала комплекса.

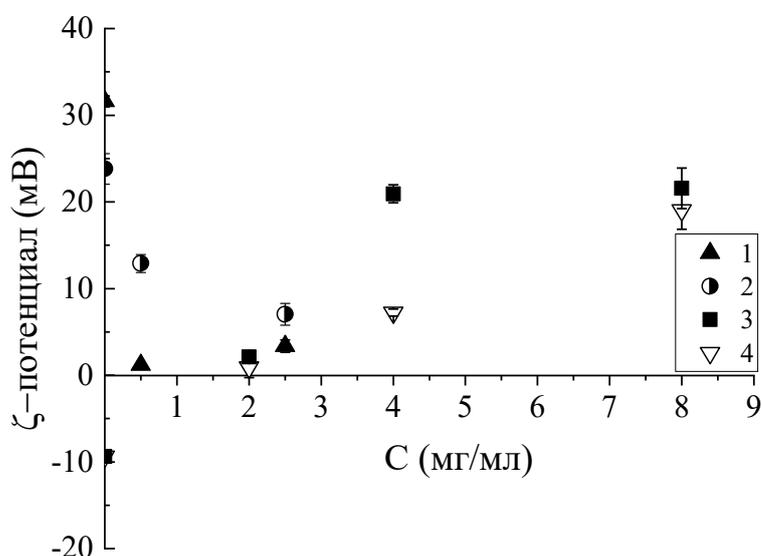


Рисунок 45. Зависимость электрокинетического потенциала адсорбционных комплексов УНТ-полимер от концентрации раствора второго модификатора при проведении последовательной модификации двумя полимерами: хитозан 210 кДа-БСА (1), хитозан 50 кДа-БСА (2), БСА-хитозан 210 кДа (3), БСА-хитозан 50 кДа (4).

Результаты по адсорбции хитозана на предварительно модифицированных белком УНТ представлены на рисунке 46. Наблюдался линейный рост количества связываемого с УНТ хитозана с увеличением его концентрации в растворе, причем коэффициент в уравнении (11) оказался меньше примерно на 10 мл/мг по сравнению с адсорбцией на немодифицированных УНТ (таблица 5) вне зависимости от молекулярной массы хитозана. Однако формирование покрытия из хитозана сильно влияло на электрокинетический потенциал комплекса (рисунок 45). Обнаружено, что при адсорбции хитозана на такой поверхности происходила нейтрализация заряда при концентрации хитозанов 2 г/л. Увеличение концентрации в растворе хитозана с молекулярной массой 210 кДа до 4 г/л приводило к увеличению электрокинетического потенциала до 20 ± 1 мВ и эта величина далее практически не менялась при возрастании концентрации до 8 г/л. Для хитозана с молекулярной массой 50 кДа увеличение электрокинетического потенциала происходило медленнее с увеличением концентрации биополимера в растворе, но также достигало 20 ± 1 мВ при концентрации 8 г/л.

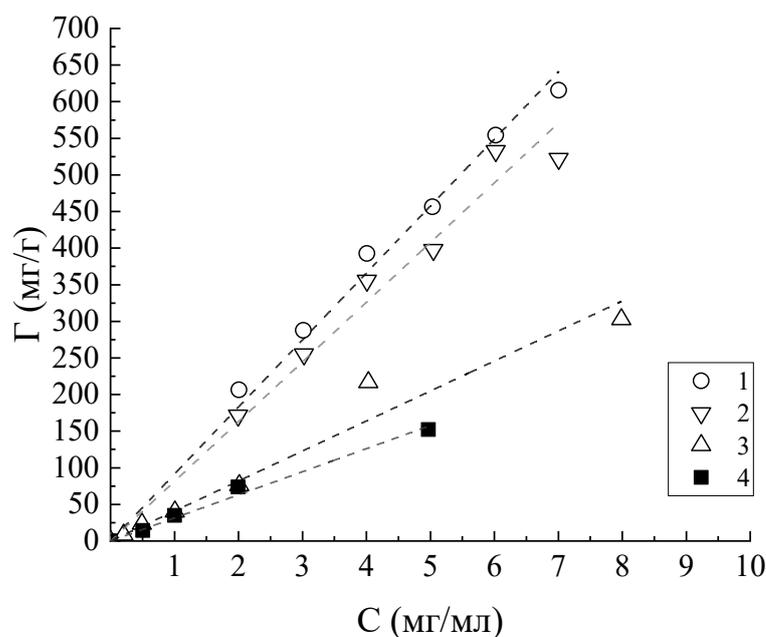


Рисунок 46. Изотермы адсорбции хитозана 50 кДа, рН 1.6 (1, 2) и 210 кДа, рН 2 (3, 4) на УНТ: исходных (1, 3) и модифицированных БСА (2, 4) после отмытки водой.

Проведена адсорбционная модификация углеродных нанотрубок хитозаном и бычьим сывороточным альбумином, и определен состав образующихся комплексов. Установлено, что порядок последовательной модификации углеродных нанотрубок не влияет на состав комплекса, что может быть объяснено разными механизмами связывания биополимеров и отсутствием конкуренции за сайты связывания.

Полученные комплексы обладают высокой седиментационной устойчивостью в водных средах. С увеличением концентрации модифицирующего белка до 2.5 мг/мл наблюдается снижение дзета-потенциала в комплексе УНТ-Хитозан. При увеличении концентрации модифицирующих хитозанов до 2 мг/мл наблюдается нейтрализация заряда в комплексе УНТ-БСА и обнаружен рост электрокинетического потенциала до 20 ± 1 мВ при повышении концентрации до 4 мг/мл и до 8 мг/мл для хитозана 210 кДа и 50 кДа соответственно. Рассмотрено влияние средней молекулярной массы и рН исходных растворов хитозана на формирование адсорбционных слоев прочно связанного с УНТ полимера. Согласно данным измерения краевого угла смачивания стекол с нанесенным слоем модифицированных УНТ биополимерами БСА и хитозаном обнаружен рост гидрофильности таких покрытий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, **поставленная цель работы достигнута**. Получены следующие основные результаты.

В работе рассмотрены различные варианты восстановления оксида графена (ОГ). Разработанная методика восстановления ОГ β -меркаптоэтанолом позволяет проводить реакцию при комнатной температуре. В условиях гидротермального синтеза получен восстановленный в воде ОГ. Методом термической активации трития получен восстановленный дейтерием и тритием ОГ. Показано, что химический состав поверхности восстановленного ОГ практически не влияет на количество связанного нелабильного трития.

Найдены условия получения ОГ с максимальным содержанием трития как с учетом только нелабильного трития, так и совокупный вклад лабильного трития и адсорбированной тритиевой воды. В первом случае удельная радиоактивность препарата составляет 0,66 Ки/мг, а во втором случае удельная радиоактивность препарата возрастает до 1,5 Ки/мг, что открывает перспективы использования меченного тритием ОГ в составе бета-вольтаических атомных батарей.

На примере изотопного обмена между атомарным тритием и олигопептидом даларгином, нанесенном на различные углеродные субстраты, установлено, что на распределение радиоактивной метки в аминокислотных остатках пептида влияет как механизм изотопного обмена, так и пространственное расположение даларгина на поверхности наноуглеродных материалов. С помощью метода молекулярного докинга показано, что на результат влияет формирование водородных связей между функциональными группами углеродных субстратов и даларгином.

Получены адсорбционные комплексы лизоцима с ОГ и восстановленным гидротермальным методом ОГ и определен их состав. Обнаружено изменение ферментативной активности лизоцима по отношению к *M. luteus* в растворе после контакта с ОГ и в составе комплекса. С помощью обработки атомарным тритием адсорбционных комплексов и молекулярного докинга установлена пространственная ориентация лизоцима на поверхности оксида графена и показано, что снижение ферментативной активности в комплексе с ОГ связано с тем, что активный центр фермента становится стерически недоступным.

Получены адсорбционные комплексы БСА с ОГ, определен их состав и распределение трития по типам аминокислотных остатков с помощью метода тритиевого зонда. Было установлено, что с уменьшением количества белка, адсорбированного на поверхности ОГ, увеличивается его удельная радиоактивность, что может быть объяснено увеличением доступности атомарному тритию аминокислотных остатков белка при образовании адсорбционного комплекса. Показано, что при обработке атомами трития адсорбционных комплексов БСА с ОГ удельная радиоактивность белка достигает величины 1500 Ки/ммоль. Приведено компьютерное моделирование по методу молекулярной динамики, в результате которого установлено, что при высокой концентрации белка предпочтительными адсорбционными центрами являются уже иммобилизованные на поверхности ОГ молекулы БСА.

Проведена адсорбционная модификация УНТ хитозаном и БСА и определен состав образующихся комплексов. Установлено, что порядок последовательной модификации УНТ не влияет на состав комплекса. Комплексы обладают высокой седиментационной устойчивостью в водных средах, повышенной гидрофильностью, и наблюдается изменение заряда поверхности при модификации противоположно заряженным вторым модификатором.

ВЫВОДЫ

1. При восстановлении ОГ аминокислотами ключевую роль играет взаимодействие α -аминогруппы с эпокси- и гидроксильными группами ОГ. Тиольная группа β -меркаптоэтанола участвует в химическом восстановлении ОГ при комнатной температуре. Способность связывать тритий мало зависит от изменения химического состава ОГ при восстановлении различными агентами.
2. Обработка атомами трития ОГ при 77 К позволяет получить препарат с максимальной активностью 1,5 Ки/мг и после удаления лабильного трития 0,66 Ки/мг. Препарат ОГ с таким содержанием трития обеспечивает энерговыделение 22,3 Вт/кг, что позволяет использовать его в качестве компонента атомной батареи.
3. На результат взаимодействия атомарного трития с даларгином, нанесенным на различные углеродные наноматериалы (ОГ и УНТ), влияет как природа подложки, так и расположение даларгина на поверхности. Поверхность углеродной подложки способствует изменению реакции изотопного обмена с радикального механизма на электрофильный, что подтверждается увеличением активности фенилаланина. При нанесении даларгина на УНТ наблюдалось более равномерное распределение трития по аминокислотным остаткам за счет образования внутримолекулярных водородных связей и уменьшения стерических затруднений для реакции с атомами трития.
4. Адсорбция лизоцима на ОГ линейно возрастает с увеличением концентрации белка в растворе до 1,2 мг/мл и одинакова для ОГ и восстановленного ОГ. В составе адсорбционного комплекса ферментативная активность лизоцима мало зависит от адсорбента и содержания лизоцима в комплексе в интервале 0,2 - 1,4 г/г, то есть в лизисе бактериальных клеток участвует только поверхностный слой фермента.
5. При обработке атомами трития адсорбционного комплекса БСА на ОГ можно получить меченный тритием белок с удельной активностью до 1500 Ки/ммоль. При увеличении содержания БСА в составе комплекса наблюдается предпочтительное взаимодействие БСА с уже адсорбированными молекулами белка, что объясняет снижение удельной активности БСА и подтверждается компьютерным моделированием.
6. Порядок последовательной модификации УНТ хитозаном и БСА не влияет на

состав комплекса, что может быть объяснено разными механизмами связывания биополимеров и отсутствием конкуренции за сайты связывания. Разработанный подход позволяет получить комплексы УНТ с хитозаном и альбумином с регулируемыми гидрофобными и агрегационными свойствами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- CVD - химическое осаждение из газовой фазы «Chemical Vapor Deposition»
- DLS - динамическое рассеяние света «Dynamic Light Scattering»
- NC - нитидин хлорид, $C_{21}H_{18}ClNO_4$
- PBS - натрий-фосфатный буфер «Phosphate Buffered Saline»
- D₂ - дейтерий
- H₂ - протий
- АБ - атомные батареи
- АСМ - атомно-силовая микроскопия
- БСА - бычий сывороточный альбумин
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- Да - Дальтон, а.е.м.
- ДМФА - N,N-Диметилформамид
- ЖСС - жидкостная сцинтилляционная спектрометрия
- ИК-Фурье - инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье
- Ки - Кюри, внесистемная единица активности радионуклида, равная $3.7 \cdot 10^{10}$ Бк
- МУНТ - многостенные углеродные нанотрубки
- ОВР - окислительно-восстановительные реакции
- ОГ – оксид графена
- ОГ_{восст} - восстановленный оксид графена
- ОУНТ - одностенные углеродные нанотрубки
- ПО - программное обеспечение
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия
- ПЭТ - позитронная эмиссионная томография
- РФА – рентгенофазовый анализ
- РФП - радиофармпрепараты
- РФЭС - рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
- СКР - спектроскопия комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия)
- СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

$T_{1/2}$ - период полураспада

T_2 , $^3\text{H}_2$ - тритий

ТАТ – термическая активация трития

ТГА - термогравиметрический анализ

ТГФ - тетрагидрофуран

УНТ - углеродные нанотрубки

УФ-спектроскопия - оптическая спектроскопия видимого диапазона

ФИТЦ - фенилизотиоцианат

ЧСА - человеческий сывороточный альбумин

ЭЗ - электронный захват

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Badun G.A. et al. Langmuir hydrogen dissociation approach in radiolabeling carbon nanotubes and graphene oxide // *Radiochim. Acta*. 2016. Vol. 104, № 8. P. 593–599.
2. Баратова Л.А. и др. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул. М.: Наука, 1999. 175 с.
3. Бадун Г.А., Чернышева М.Г. Метод термической активации трития. Особенности применения, современные достижения и дальнейшие перспективы развития // *Радиохимия*. 2023. Т. 65, № 2. С. 158-171.
4. Novoselov K.S. Electric field effect in atomically thin carbon films // *Science*. 2004. Vol. 306, № 5696. P. 666–669.
5. Geim A.K. Graphene: Status and Prospects // *Science*. 2009. Vol. 324, № 5934. P. 1530–1534.
6. Geim A.K., Novoselov K.S. The rise of graphene // *Nat. Mater.* 2007. Vol. 6, № 3. P. 183–191.
7. Balandin A.A. et al. Superior thermal conductivity of single-layer graphene // *Nano Lett.* 2008. Vol. 8, № 3. P. 902–907.
8. Bunch J.S. et al. Electromechanical resonators from graphene sheets // *Science*. 2007. Vol. 315, № 5811. P. 490–493.
9. Stankovich S. et al. Graphene-based composite materials // *Nature*. 2006. Vol. 442, № 7100. P. 282–286.
10. Verdejo R. et al. Functionalized graphene sheet filled silicone foam nanocomposites // *J. Mater. Chem.* 2008. Vol. 18, № 19. P. 2221–2226.
11. Eda G., Fanchini G., Chhowalla M. Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material // *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3, № 5. P. 270–274.
12. Mazza M. et al. Nanofiber-based delivery of therapeutic peptides to the brain // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, № 2. P. 1016–1026.
13. Barkauskas J. et al. Single-walled carbon nanotube based coating modified with reduced graphene oxide for the design of amperometric biosensors // *Mater. Sci. Eng.*

- C. 2019. Vol. 98. P. 515–523.
14. Zhang Q. et al. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application // *Mater. Sci. Eng. C*. 2017. Vol. 77. P. 1363–1375.
 15. Wang J. et al. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells // *Toxicol. Vitro*. 2011. Vol. 25, № 1. P. 242–250.
 16. Abdolmaleki A., Mallakpour S., Borandeh S. Amino acid-functionalized multi-walled carbon nanotubes for improving compatibility with chiral poly(amide-ester-imide)containing l-phenylalanine and l-tyrosine linkages // *Appl. Surf. Sci.* 2013. Vol. 287. P. 117–123.
 17. Bussy C., Methven L., Kostarelos K. Hemotoxicity of carbon nanotubes // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65, № 15. P. 2127–2134.
 18. Anzar N. et al. Carbon nanotube - A review on Synthesis, Properties and plethora of applications in the field of biomedical science // *Sensors Int.* 2020. Vol. 1, № 100003. P. 1–10.
 19. Tardani F., La Mesa C. Effects of single-walled carbon nanotubes on lysozyme gelation // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014. Vol. 121. P. 165–170.
 20. Liu Y. et al. Decoration of carbon nanotubes with chitosan // *Carbon*. 2005. Vol. 43, № 15. P. 3178–3180.
 21. Rastkari N. et al. Single-walled carbon nanotubes as solid-phase microextraction adsorbent for the determination of low-level concentrations of butyltin compounds in seawater // *Anal. Chim. Acta*. 2010. Vol. 662, № 1. P. 90–96.
 22. Augusto F. et al. New sorbents for extraction and microextraction techniques // *J. Chromatogr. A*. 2010. Vol. 1217, № 16. P. 2533–2542.
 23. Halouane F. et al. Magnetic reduced graphene oxide loaded hydrogels: Highly versatile and efficient adsorbents for dyes and selective Cr(VI) ions removal // *J. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 507. P. 360–369.
 24. Nomani M.W.K. et al. Highly sensitive and selective detection of NO₂ using epitaxial graphene on 6H-SiC // *Sensors Actuators, B Chem.* 2010. Vol. 150, № 1.

- P. 301–307.
25. Mandeep, Gulati A., Kakkar R. Graphene-based adsorbents for water remediation by removal of organic pollutants: Theoretical and experimental insights // *Chem. Eng. Res. Des.* 2020. Vol. 153. P. 21–36.
 26. Vicente-Martínez Y. et al. Graphene oxide and graphene oxide functionalized with silver nanoparticles as adsorbents of phosphates in waters. A comparative study // *Sci. Total Environ.* 2020. Vol. 709, № 136111. P. 1–10.
 27. Lan Z. et al. Synthetical catalysis of nickel and graphene on enhanced hydrogen storage properties of magnesium // *Int. J. Hydrogen Energy.* 2019. Vol. 44, № 45. P. 24849–24855.
 28. Bin X. et al. Preparation of graphene encapsulated copper nanoparticles from CuCl_2 -GIC // *J. Phys. Chem. Solids.* 2009. Vol. 70, № 1. P. 1–7.
 29. Fan Z. et al. Catalytic conversion of syngas into C_2 oxygenates over Rh-based catalysts-Effect of carbon supports // *Catal. Today.* 2009. Vol. 147, № 2. P. 86–93.
 30. Guo J. et al. The synthesis and synergistic catalysis of iron phthalocyanine and its graphene-based axial complex for enhanced oxygen reduction // *Nano Energy.* 2018. Vol. 46. P. 347–355.
 31. Ikram R., Jan B.M., Ahmad W. An overview of industrial scalable production of graphene oxide and analytical approaches for synthesis and characterization // *J. Mater. Res. Technol.* 2020. Vol. 9, № 5. P. 11587–11610.
 32. Rafiee J. et al. Superhydrophobic to superhydrophilic wetting control in graphene films // *Adv. Mater.* 2010. Vol. 22, № 19. P. 2151–2154.
 33. Ray S.C. Application and uses of graphene oxide and reduced graphene oxide // *Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials.* 2015. P. 39–55.
 34. Dreyer D.R. et al. The chemistry of graphene oxide // *Chem. Soc. Rev.* 2010. Vol. 39, № 1. P. 228–240.
 35. Елецкий А. В. и др. Графен: методы получения и теплофизические свойства // *Успехи Физ. Наук.* 2011. Т. 181, № 3. С. 233 - 268.

36. Brodie B.C. On the atomic weight of graphite // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 1983. Vol. 303, № 1113. P. 1–62.
37. Ojha K., Anjaneyulu O., Ganguli A.K. Graphene-based hybrid materials : synthetic approaches and properties // *Curr. Sci.* 2014. Vol. 107, № 3. P. 397–418.
38. Hummers W.S., Offeman R.E. Preparation of graphitic oxide // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. Vol. 80, № 6. P. 1339.
39. Dimiev A.M., Tour J.M. Mechanism of graphene oxide formation // *ACS Nano.* 2014. Vol. 8, № 3. P. 3060–3068.
40. Navarro D.A. et al. Mineralisation and release of ¹⁴C-graphene oxide (GO) in soils // *Chemosphere.* 2020. Vol. 238, № 124558. P. 1–7.
41. Peng L. et al. An iron-based green approach to 1-h production of single-layer graphene oxide // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 1–9.
42. Kovtyukhova N.I. Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations // *Chem. Mater.* 1999. Vol. 11, № 3. P. 771–778.
43. Berger C. et al. Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene // *Science.* 2006. Vol. 312. P. 1191–1196.
44. Winterlin J., Bocquet M.L. Graphene on metal surfaces // *Surf. Sci.* 2009. Vol. 603, № 10–12. P. 1841–1852.
45. Land T.A. et al. STM investigation of single layer graphite structures produced on Pt(111) by hydrocarbon decomposition // *Surf. Sci.* 1992. Vol. 264, № 3. P. 261–270.
46. Kim K.S. et al. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes // *Nature.* 2009. Vol. 457, № 7230. P. 706–710.
47. Yang S. et al. Preparation of graphene by exfoliating graphite in aqueous fulvic acid solution and its application in corrosion protection of aluminum // *J. Colloid Interface Sci.* 2019. Vol. 543. P. 263–272.
48. Becerril H.A. et al. Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors // *ACS Nano.* 2008. Vol. 2, № 3. P. 463–470.

49. Mangadlao J.D. et al. Photoreduction of graphene oxide and photochemical synthesis of graphene-metal nanoparticle hybrids by ketyl radicals // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 29. P. 24887–24898.
50. Jakhar R., Yap J.E., Joshi R. Microwave reduction of graphene oxide // *Carbon*. 2020. Vol. 170. P. 277–293.
51. Zhang T. et al. Ultrafast microwave reduction process for high-quality graphene foam with outstanding electromagnetic interference shielding and good adsorption capacity // *FlatChem*. 2019. Vol. 17, № 100117. P. 1–7.
52. Qiu H. et al. Microwave-irradiated preparation of reduced graphene oxide-Ni nanostructures and their enhanced performance for catalytic reduction of 4-nitrophenol // *Appl. Surf. Sci.* 2017. Vol. 407. P. 509–517.
53. Lavin-Lopez M.P. et al. Influence of the reduction strategy in the synthesis of reduced graphene oxide // *Adv. Powder Technol.* 2017. Vol. 28, № 12. P. 3195–3203.
54. Park S. et al. Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide // *Carbon*. 2011. Vol. 49, № 9. P. 3019–3023.
55. Hu J. et al. Ultrafast room-temperature reduction of graphene oxide by sodium borohydride, sodium molybdate and hydrochloric acid // *Chinese Chem. Lett.* 2021. Vol. 32, № 1. P. 543–547.
56. Thakur S., Karak N. Alternative methods and nature-based reagents for the reduction of graphene oxide: A review // *Carbon*. 2015. Vol. 94. P. 224–242.
57. Abdelhalim A.O.E. et al. Reduction and functionalization of graphene oxide with L-cysteine: Synthesis, characterization and biocompatibility // *Nanomedicine Nanotechnology*. 2020. Vol. 29, № 102284. P. 1–19.
58. Zhang J. et al. Reduction of graphene oxide with ascorbic acid // *Chem. Commun.* 2010. Vol. 46, № 7. P. 1112–1114.
59. Liu J. et al. Toward a universal “adhesive nanosheet” for the assembly of multiple nanoparticles based on a protein-induced reduction/decoration of graphene oxide // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132, № 21. P. 7279–7281.

60. Yang F. et al. pH-sensitive highly dispersed reduced graphene oxide solution using lysozyme via an in situ reduction method // *J. Phys. Chem. C*. 2010. Vol. 114, № 50. P. 22085–22091.
61. Gurunathan S., Han J.W., Kim J.H. Humanin: A novel functional molecule for the green synthesis of graphene // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013. Vol. 111. P. 376–383.
62. Pham T.A. et al. One-step reduction of graphene oxide with l-glutathione // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2011. Vol. 384, № 1–3. P. 543–548.
63. Zengin Kurt B., Durmus Z., Sevgi E. In situ reduction of graphene oxide by different plant extracts as a green catalyst for selective hydrogenation of nitroarenes // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2019. Vol. 44, № 48. P. 26322–26337.
64. Pei S., Cheng H.M. The reduction of graphene oxide // *Carbon*. 2012. Vol. 50, № 9. P. 3210–3228.
65. Ghorbani M., Abdizadeh H., Golobostanfard M.R. Reduction of graphene oxide via modified hydrothermal method // *Procedia Mater. Sci.* 2015. Vol. 11, № 2009. P. 326–330.
66. De Silva K.K.H. et al. Chemical reduction of graphene oxide using green reductants // *Carbon*. 2017. Vol. 119. P. 190–199.
67. Thakur S., Karak N. Green reduction of graphene oxide by aqueous phytoextracts // *Carbon*. 2012. Vol. 50, № 14. P. 5331–5339.
68. Wang J., Salihi E.C., Šiller L. Green reduction of graphene oxide using alanine // *Mater. Sci. Eng. C*. 2017. Vol. 72. P. 1–6.
69. Tran D.N.H., Kabiri S., Losic D. A green approach for the reduction of graphene oxide nanosheets using non-aromatic amino acids // *Carbon*. 2014. Vol. 76. P. 193–202.
70. Bose S. et al. Dual role of glycine as a chemical functionalizer and a reducing agent in the preparation of graphene: An environmentally friendly method // *J. Mater. Chem.* 2012. Vol. 22, № 19. P. 9696–9703.
71. Stankovich S. et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction

- of exfoliated graphite oxide // *Carbon*. 2007. Vol. 45, № 7. P. 1558–1565.
72. Qin E.C. et al. Graphene oxide substrates with N-cadherin stimulates neuronal growth and intracellular transport // *Acta Biomater.* 2019. Vol. 90. P. 412–423.
 73. Stobinski L. et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods // *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.* 2014. Vol. 195. P. 145–154.
 74. Kaniyoor A., Ramaprabhu S. A Raman spectroscopic investigation of graphite oxide derived graphene // *AIP Adv.* 2012. Vol. 2, № 3. P. 1–13.
 75. Lee A.Y. et al. Raman study of D* band in graphene oxide and its correlation with reduction // *Appl. Surf. Sci.* 2021. Vol. 536, № 147990. P. 1–7.
 76. Ferrari A.C., Robertson J. Origin of the 1150 – cm⁻¹ Raman mode in nanocrystalline diamond // *Physical Review B*. 2001. Vol. 63, № 121405. P. 1–4.
 77. Rattana T. et al. Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets // *Procedia Eng.* 2012. Vol. 32. P. 759–764.
 78. Țucureanu V., Matei A., Avram A.M. FTIR spectroscopy for carbon family study // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2016. Vol. 46, № 6. P. 502–520.
 79. Emiru T.F., Ayele D.W. Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production // *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* 2017. Vol. 4, № 1. P. 74–79.
 80. Khalil W.F. et al. Graphene oxide-based nanocomposites (GO-chitosan and GO-EDTA) for outstanding antimicrobial potential against some *Candida* species and pathogenic bacteria // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 164. P. 1370–1383.
 81. Gascho J.L.S. et al. Graphene oxide films obtained by vacuum filtration: X-ray diffraction evidence of crystalline reorganization // *J. Nanomater.* 2019. Vol. 2019. P. 12–16.
 82. Brahmayya M., Dai S.A., Suen S.Y. Sulfonated reduced graphene oxide catalyzed cyclization of hydrazides and carbon dioxide to 1,3,4-oxadiazoles under sonication // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
 83. Lock I.S.M. et al. Influence of palladium on Ni-based catalyst for hydrogen

- production via thermo-catalytic methane decomposition // *Chem. Eng. Trans.* 2017. Vol. 57. P. 343–348.
84. Leal G.F. et al. A thermogravimetric analysis (TGA) method to determine the catalytic conversion of cellulose from carbon-supported hydrogenolysis process // *Thermochim. Acta.* 2015. Vol. 616. P. 9–13.
85. Mirsoleimani-Azizi S.M. et al. Tetracycline antibiotic removal from aqueous solutions by MOF-5: Adsorption isotherm, kinetic and thermodynamic studies // *J. Environ. Chem. Eng.* 2018. Vol. 6, № 5. P. 6118–6130.
86. Ghaffar I. et al. Synthesis of chitosan coated metal organic frameworks (MOFs) for increasing vancomycin bactericidal potentials against resistant *S. aureus* strain // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. Vol. 105, № 110111. P. 1–10.
87. Nadizadeh Z., Naimi-Jamal M.R., Panahi L. Mechanochemical solvent-free in situ synthesis of drug-loaded $\{Cu_2(1,4-bdc)_2(dabco)\}_n$ MOFs for controlled drug delivery // *J. Solid State Chem.* 2018. Vol. 259. P. 35–42.
88. Najafi F., Rajabi M. Thermal gravity analysis for the study of stability of graphene oxide–glycine nanocomposites // *Int. Nano Lett.* 2015. Vol. 5, № 4. P. 187–190.
89. Whitby R.L.D. et al. Driving forces of conformational changes in single-layer graphene oxide // *ACS Nano.* 2012. Vol. 6, № 5. P. 3967–3973.
90. Kashyap S., Mishra S., Behera S.K. Aqueous colloidal stability of graphene oxide and chemically converted graphene // *J. Nanoparticles.* 2014. Vol. 2014. P. 1–6.
91. Azizighannad S., Mitra S. Stepwise reduction of Graphene Oxide (GO) and its effects on chemical and colloidal properties // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–8.
92. Wang L. et al. Designed graphene-peptide nanocomposites for biosensor applications: A review // *Anal. Chim. Acta.* 2017. Vol. 985. P. 24–40.
93. Choi H.S. et al. Development of Co-hemin MOF/chitosan composite based biosensor for rapid detection of lactose // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2020. Vol. 113. P. 1–7.
94. Eskandari S. et al. Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. Vol. 110–111. P. 169–187.

95. Singh R., Geetanjali. Metal organic frameworks for drug delivery // Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery. 2018. Vol. 25. P. 605–617.
96. Ren T. et al. Synthesis of antimicrobial peptide-grafted graphene oxide nanosheets with high antimicrobial efficacy // Mater. Lett. 2019. Vol. 235. P. 42–45.
97. Jun J.Y. et al. Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method // Food Chem. 2011. Vol. 127, № 4. P. 1892–1898.
98. Singh A.V. et al. Synthesis of gold, silver and their alloy nanoparticles using bovine serum albumin as foaming and stabilizing agent // J. Mater. Chem. 2005. Vol. 15, № 48. P. 5115–5121.
99. Liu P. et al. Preparation of carbon quantum dots with a high quantum yield and the application in labeling bovine serum albumin // Appl. Surf. Sci. 2016. Vol. 368. P. 122–128.
100. Hameed M.K. et al. Gold-carbon nanoparticles mediated delivery of BSA: Remarkable robustness and hemocompatibility // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2018. Vol. 558. P. 351–358.
101. JyothiKumar A. et al. BSA stabilized gold nanoparticles: Synthesis and characterization // Mater. Today Proc. 2019. Vol. 9. P. 111–115.
102. Xiao Y. et al. Graphene-based lysozyme binding aptamer nanocomposite for label-free and sensitive lysozyme sensing // J. Electroanal. Chem. 2013. Vol. 702. P. 49–55.
103. Broek L.A.M., Boeriu C.G., Stevens C.V. Chitin and chitosan: properties and applications. Wiley. 2020. 536 p.
104. Wang W., Xue C., Mao X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 164. P. 4532–4546.
105. Menazea A.A. et al. Chitosan/graphene oxide composite as an effective removal of Ni, Cu, As, Cd and Pb from wastewater // Comput. Theor. Chem. 2020. Vol. 1189, № 112980. P. 1–8.
106. Han Lyn F. et al. Effect of oxidation degrees of graphene oxide (GO) on the structure

- and physical properties of chitosan/GO composite films // *Food Packag. Shelf Life*. 2019. Vol. 21, № 100373. P. 1–9.
107. Erdem A., Eksin E., Muti M. Chitosan-graphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014. Vol. 115. P. 205–211.
 108. He L. et al. Chitosan/graphene oxide nanocomposite films with enhanced interfacial interaction and their electrochemical applications // *Appl. Surf. Sci.* 2014. Vol. 314. P. 510–515.
 109. Li J. et al. Adsorption of lysozyme by alginate/graphene oxide composite beads with enhanced stability and mechanical property // *Mater. Sci. Eng. C*. 2018. Vol. 89. P. 25–32.
 110. Smith S.C. et al. A comparative study of lysozyme adsorption with graphene, graphene oxide, and single-walled carbon nanotubes: Potential environmental applications // *Chem. Eng. J.* 2014. Vol. 240. P. 147–154.
 111. Bai Y. et al. Influence of graphene oxide and reduced graphene oxide on the activity and conformation of lysozyme // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017. Vol. 154. P. 96–103.
 112. Chakrabarty T., Kumar M., Shahi V.K. PH responsive hybrid zwitterionomer for protein separation: Smart nanostructured adsorbent // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012. Vol. 51, № 7. P. 3015–3022.
 113. Gao Y. et al. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide // *J. Colloid Interface Sci.* 2012. Vol. 368, № 1. P. 540–546.
 114. Nan Z. et al. Interaction of graphene oxide with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019. Vol. 210. P. 348–354.
 115. Zhang H. et al. Changing the activities and structures of bovine serum albumin bound to graphene oxide // *Appl. Surf. Sci.* 2018. Vol. 427. P. 1019–1029.
 116. Li Y. et al. Nitidine chloride-assisted bio-functionalization of reduced graphene

- oxide by bovine serum albumin for impedimetric immunosensing // *Biosens.* 2016. Vol. 79. P. 536–542.
117. Korzh E., Klymenko N. Kinetic adsorption modeling of pharmaceuticals on activated carbons // *Probl. Mod. Sci. Educ.* 2017. Vol. 87. P. 1–7.
 118. Zeng H. et al. Synthesis of various forms of carbon nanotubes by AC arc discharge // *Carbon.* 1998. Vol. 36, № 3. P. 259–261.
 119. Sumio Iijima. Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature.* 1991. Vol. 354. P. 56–58.
 120. Ajayan P.M., Ebbesen T.W. Nanometre-size tubes of carbon // *Reports Prog. Phys.* 1997. Vol. 60, № 10. P. 1025–1062.
 121. Chico L. et al. Pure carbon nanoscale devices: Nanotube heterojunctions // *Phys. Rev. Lett.* 1996. Vol. 76, № 6. P. 971–974.
 122. Saeedi M. et al. Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system // *Biomed. Pharmacother.* 2019. Vol. 111. P. 666–675.
 123. Eatemadi A. et al. Carbon nanotubes: Properties, synthesis, purification, and medical applications // *Nanoscale Res. Lett.* 2014. Vol. 9, № 1. P. 1–13.
 124. Wu S.L. et al. Synthesis of carbon nanotubes with controllable diameter by chemical vapor deposition of methane using Fe@Al₂O₃ core–shell nanocomposites // *Chem. Eng. Sci.* 2020. Vol. 217, № 115541. P. 1–10.
 125. Wang H. et al. Synthesis of (9,8) single-walled carbon nanotubes on CoSO₄/SiO₂ catalysts: The effect of Co mass loadings // *Carbon.* 2020. Vol. 169. P. 288–296.
 126. Paul S., Samdarshi S.K. A green precursor for carbon nanotube synthesis // *New Carbon Mater.* 2011. Vol. 26, № 2. P. 85–88.
 127. Atiyah M.R. et al. Low temperature growth of vertically aligned carbon nanotubes via floating catalyst chemical vapor deposition method // *J. Mater. Sci. Technol.* 2011. Vol. 27, № 4. P. 296–300.
 128. Zhang C. et al. Synthesis of single-walled carbon nanotubes in rich hydrogen/air flames // *Mater. Chem. Phys.* 2020. Vol. 254, № 123479. P. 1–8.

129. Terrones M., Grobert N., Terrones H. Synthetic routes to nanoscale B_xC_yN_z architectures // *Carbon*. 2002. Vol. 40, № 10. P. 1665–1684.
130. Bao J. et al. Nitrogen-doped carbon nanotubes synthesized on metal substrates from a single precursor // *Mater. Lett.* 2013. Vol. 113. P. 114–117.
131. Kukovecz Á., Kozma G., Kónya Z. Multi-walled carbon nanotubes. Chapter of *Springer Handbook of Nanomaterials*. Springer Nature. 2013. P. 147–188.
132. Golberg D. et al. Large-scale synthesis and HRTEM analysis of single-walled B- and N-doped carbon nanotube bundles // *Carbon*. 2000. Vol. 38, № 14. P. 2017–2027.
133. Mondal S., Ghosh S., Raj C.R. Unzipping of single-walled carbon nanotube for the development of electrocatalytically active hybrid catalyst of graphitic carbon and Pd nanoparticles // *ACS Omega*. 2018. Vol. 3, № 1. P. 622–630.
134. Du P. et al. Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on functionalized carbon nanotubes // *J. Phys. Chem. C*. 2014. Vol. 118, № 38. P. 22249–22257.
135. Niyomthai S.T., Pavasant P., Supaphol P. Adsorption study of bovine serum albumin onto multiwalled carbon nanotubes // *Mater. Today Proc.* 2020. Vol. 33, № 4. P. 1814–1818.
136. Zhou X. et al. Preparation and characterization of lysozyme@carbon nanotubes/waterborne polyurethane composite and the potential application in printing inks // *Prog. Org. Coatings*. 2020. Vol. 142, № 105600. P. 1–10.
137. Imamura K. et al. Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. Vol. 106, № 3. P. 273–278.
138. Imamura K. et al. Contribution of acidic amino residues to the adsorption of peptides onto a stainless steel surface // *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 267, № 2. P. 294–301.
139. Jorio A., Saito R. Raman spectroscopy for carbon nanotube applications // *J. Appl. Phys.* 2021. Vol. 129, № 021102. P. 1–28.
140. Okpalugo T.I.T. et al. High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs // *Carbon*. 2005. Vol. 43, № 1. P. 153–161.
141. Bokobza L., Bruneel J.L., Couzi M. Raman spectroscopic investigation of carbon-

- based materials and their composites. Comparison between carbon nanotubes and carbon black // *Chem. Phys. Lett.* 2013. Vol. 590. P. 153–159.
142. Bemaerts D. et al. Electron diffraction study of single-wall carbon nanotubes // *Solid State Commun.* 1998. Vol. 105, № 3. P. 145–149.
143. Futaba D.N. et al. Macroscopic wall number analysis of single-walled, double-walled, and few-walled carbon nanotubes by X-ray diffraction // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 15. P. 5716–5719.
144. Kahdum B.J., Lafta A.J., Johdh A.M. Synthesis and characterization of carbon nanotubes from Iraqi date palm seeds using chemical vapor deposition method // *Int. J. ChemTech Res.* 2016. Vol. 9, № 12. P. 705–714.
145. Rao A.M. et al. Raman spectroscopy of pristine and doped single wall carbon nanotubes // *Thin Solid Films.* 1998. Vol. 331, № 1–2. P. 141–147.
146. Botti S. et al. Surface-enhanced raman spectroscopy characterization of pristine and functionalized carbon nanotubes and graphene. Chapter of Raman Spectroscopy. IntechOpen. 2018. P. 203-220.
147. Tan W.H., Lee S.L., Chong C.T. TEM and XRD analysis of carbon nanotubes synthesised from flame // *Key Eng. Mater.* 2017. Vol. 723. P. 470–475.
148. Pang L.S.K., Saxby J.D., Chatfield S.P. Thermogravimetric analysis of carbon nanotubes and nanoparticles // *J. Phys. Chem.* 1993. Vol. 97, № 27. P. 6941–6942.
149. Yang F., Wang S., Zhang Y. Effects of laser power and substrate on the Raman shift of carbon-nanotube papers // *Carbon Trends.* 2020. Vol. 1, № 100009. P. 1–8.
150. Wepasnick K.A. et al. Chemical and structural characterization of carbon nanotube surfaces // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. Vol. 396, № 3. P. 1003–1014.
151. Abdolmaleki A., Mallakpour S., Borandeh S. The use of novel biodegradable, optically active and nanostructured poly(amide-ester-imide) as a polymer matrix for preparation of modified ZnO based bionanocomposites // *Mater. Res. Bull.* 2012. Vol. 47, № 5. P. 1123–1129.
152. Shobin L.R., Manivannan S. Enhancement of electrothermal performance in single-walled carbon nanotube transparent heaters by room temperature post treatment //

- Sol. Energy Mater. Sol. Cells. 2018. Vol. 174. P. 469–477.
153. Kavinkumar T., Manivannan S. Improved dielectric behaviour of graphene oxide-multiwalled carbon nanotube nanocomposite // *Vacuum*. 2018. Vol. 148. P. 149–157.
 154. Audi G. et al. The NUBASE2016 evaluation of nuclear properties // *Chinese Phys. C*. 2017. Vol. 41, № 3. P. 1–138.
 155. Luna-Guido M.L., Beltrán-Hernández R.I., Dendooven L. Dynamics of ¹⁴C-labelled glucose in alkaline saline soil // *Soil Biol. Biochem.* 2001. Vol. 33, № 6. P. 707–719.
 156. Loomans E.E.M.G. et al. Adsorption studies of tritium-labeled peptides on polystyrene surfaces // *J. Immunol. Methods*. 1998. Vol. 221, № 1–2. P. 131–139.
 157. Mantle P.G., Coleman M.J. Biosynthesis of radiolabelled alkaloids from ¹⁴C-tyrosine in *Erythrina crista-galli* // *Phytochemistry*. 1984. Vol. 23, № 8. P. 1617–1618.
 158. Meyer S.G.E., De Groot H. [¹⁴C]serine from phosphatidylserine labels ceramide and sphingomyelin in L929 cells: Evidence for a new metabolic relationship between glycerophospholipids and sphingolipids // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. Vol. 410, № 1. P. 107–111.
 159. Shamaev V.I. Radioanalytical methods based on the radioactive indicator principle // *J. Radioanal. Chem.* 1979. Vol. 51, № 2. P. 205–223.
 160. Ceska M., Hultman E., Ingelman B.G.A. A new method for determination of α -amylase // *Experientia*. 1969. Vol. 25, № 5. P. 555–556.
 161. Balek V., Dohnálek J. A new method for investigating cement hydration by radioactive indicators. // *Cement. Conc. Res.* 1983. Vol. 13, № 1. P. 1–6.
 162. Ohta T. et al. Optimization of a portable hollow-fiber-based device for extracting radiokrypton dissolved in deep groundwater and selection of ²²²Rn as an indicator of Kr extraction efficiency // *J. Hydrol.* 2019. Vol. 574. P. 476–485.
 163. Щепина Н.Е. и др. Влияние метильного заместителя на ход ядерно-химического синтеза , меченных тритием биологических маркеров хинолинииевого ряда // *Перспективные материалы*. 2013. № 14. С. 456–461.

164. Щепина Н.Е., Аврорин В.В. Изучение реакций фторзамещенных нуклеогенных фенил-катионов с производными бензопиридина // Радиохимия. 2020. Т. 62, № 1. С. 73–78.
165. Gourd E. New radiotracer shows impressive diagnostic potential // Lancet. Oncol. 2019. Vol. 20, № 7. P. 1-3.
166. Satterlee A.B., Yuan H., Huang L. A radio-theranostic nanoparticle with high specific drug loading for cancer therapy and imaging // J. Control. Release. 2015. Vol. 217. P. 170–182.
167. Kratochwil C., Haberkorn U., Giesel F.L. 225Ac-PSMA-617 for therapy of prostate cancer // Semin. Nucl. Med. 2020. Vol. 50, № 2. P. 133–140.
168. Nance M.E. et al. Chemorefractory liver metastasis from cervical cancer successfully treated with a combination of yttrium-90 and immunotherapy // Radiol. Case Reports. 2020. Vol. 15, № 8. P. 1359–1365.
169. Jeon J. Review of therapeutic applications of radiolabeled functional nanomaterials // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 2323. P. 1–17.
170. Amirmazlaghani M. et al. Betavoltaic battery based on reduced-Graphene-Oxide/Si heterojunction // Superlattices Microstruct. 2020. Vol. 145, № 106602. P. 1–9.
171. Spencer M.G., Alam T. High power direct energy conversion by nuclear batteries // Appl. Phys. Rev. 2019. Vol. 6, № 031305. P. 1–21.
172. Song Z. et al. Perovskite-betavoltaic cells: a novel application of organic-inorganic hybrid halide perovskites: research-article // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. Vol. 11, № 36. P. 32969–32977.
173. Bormashov V.S. et al. High power density nuclear battery prototype based on diamond Schottky diodes // Diam. Relat. Mater. 2018. Vol. 84. P. 41–47.
174. Ciarrocchi I.R. et al. The effect of radiation in the degradation of carbendazim and azoxystrobin in strawberry // Radiat. Phys. Chem. 2021. Vol. 179, № 109269. P. 1-33.
175. Gudkov S.V. et al. Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants // J. Environ. Radioact. 2019. Vol. 202. P. 8–24.

176. Audi G. et al. The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties // Nucl. Phys. A. 2003. Vol. 729, № 1. P. 3–128.
177. Himsworth J.M. et al. Day-case treatment with radioactive I-131 for thyroid cancer // Clin. Oncol. 2017. Vol. 29, № 7. P. 1-3.
178. Chen L. et al. Radionuclide ¹³¹I labeled reduced graphene oxide for nuclear imaging guided combined radio- and photothermal therapy of cancer // Biomaterials. 2015. Vol. 66. P. 21–28.
179. Guérin B. et al. Cyclotron Production of ^{99m}Tc: an approach to the medical isotope crisis // J. Nucl. Med. 2010. Vol. 51, № 4. P. 13-16.
180. Challan S.B., Massoud A. Radiolabeling of graphene oxide by Technetium-99m for infection imaging in rats // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2017. Vol. 314, № 3. P. 2189–2199.
181. Qaim S.M. et al. Positron emission intensities in the decay of ⁶⁴Cu, ⁷⁶Br and ¹²⁴I // Radiochim. Acta. 2007. Vol. 95, № 2. P. 67–73.
182. Shi S. et al. Chelator-free radiolabeling of nanographene: breaking the stereotype of chelation // Angew. Chemie. 2017. Vol. 56, № 11. P. 2889–2892.
183. Sadeghi M. et al. Production assessment of non-carrier-added ¹⁹⁹Au by (n,γ) reaction // Appl. Radiat. Isot. 2019. Vol. 154, № 108877. P. 1–5.
184. Novikov K. et al. Production and investigation of neutron-rich Osmium isotopes with and around N=126 using gas flow transport method // J. Phys. Conf. Ser. 2014. Vol. 515, № 012016. P. 1–8.
185. Fazaeli Y. et al. In vivo SPECT imaging of tumors by ^{198,199}Au-labeled graphene oxide nanostructures // Mater. Sci. Eng. C. 2014. Vol. 45. P. 196–204.
186. Worth R.N. et al. The distribution and selective decontamination of carbon-14 from nuclear graphite // J. Nucl. Mater. 2021. Vol. 556, № 153167. P. 1–11.
187. Darwish T.A. et al. Quantitative analysis of deuterium using the isotopic effect on quaternary ¹³C NMR chemical shifts // Anal. Chim. Acta. 2016. Vol. 927. P. 89–98.
188. Majumdar R. et al. Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry as an emerging analytical tool for stabilization and formulation development of

- therapeutic monoclonal antibodies // *J. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 104, № 2. P. 327–345.
189. Kerler B. et al. Continuous H/D exchange of aromatic hydrocarbons using near-critical deuterium oxide // *J. Supercrit. Fluids.* 2007. Vol. 39, № 3. P. 381–388.
190. Jankovský O. et al. Use of deuterium labelling - Evidence of graphene hydrogenation by reduction of graphite oxide using aluminium in sodium hydroxide // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5, № 24. P. 18733–18739.
191. Lindegren S. et al. Realizing clinical trials with Astatine-211: the chemistry infrastructure // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2020. Vol. 35, № 6. P. 425–436.
192. Hartman K.B. et al. $^{211}\text{AtCl}$ @US-tube nanocapsules: A new concept in radiotherapeutic-agent design // *Small.* 2007. Vol. 3, № 9. P. 1496–1499.
193. Uenomachi M. et al. Simultaneous multi-nuclide imaging via double-photon coincidence method with parallel hole collimators // *Sci Rep.* 2021. Vol. 11, № 13330. P. 1–11.
194. MacDonald N.S. et al. Methods for compact cyclotron production of indium-111 for medical use // *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1975. Vol. 26, № 10. P. 631–633.
195. Mulvey J.J. et al. Self-assembly of carbon nanotubes and antibodies on tumours for targeted amplified delivery // *Nat. Nanotechnol.* 2013. Vol. 8, № 10. P. 763–771.
196. Boll R.A., Malkemus D., Mirzadeh S. Production of actinium-225 for alpha particle mediated radioimmunotherapy // *Appl. Radiat. Isot.* 2005. Vol. 62, № 5. P. 667–679.
197. Matson M.L. et al. Encapsulation of α -particle-emitting $^{225}\text{Ac}^{3+}$ ions within carbon nanotubes // *J. Nucl. Med.* 2015. Vol. 56, № 6. P. 897–900.
198. Zimmerman B.E., Cessna J.T., Fitzgerald R. Standardization of ^{68}Ge / ^{68}Ga using three liquid scintillation counting // *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 2008. Vol. 113, № 5. P. 265–280.
199. Riga S. et al. Production of ^{68}Ga with a General Electric PETtrace cyclotron by liquid target // *Phys. Medica.* 2018. Vol. 55. P. 116–126.
200. Kazakov A.G. et al. Carbon nanomaterials for sorption of ^{68}Ga for potential using in positron emission tomography // *Nanomaterials.* 2020. Vol. 10, № 1090. P. 1–13.

201. Czarny B. et al. Carbon nanotube translocation to distant organs after pulmonary exposure: Insights from in situ ^{14}C -radiolabeling and tissue radioimaging // ACS Nano. 2014. Vol. 8, № 6. P. 5715–5724.
202. Rolf Voges, J. Richard Heys T.M. Preparation of compounds labeled with tritium and carbon-14. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. 664 p.
203. Nugent R.P., Filer C.N. Generation and use of tritiated borane in situ for formamide tritiation to an N-methyl- ^3H group // J. Label. Compd. Radiopharm. 2018. Vol. 61, № 10. P. 805–808.
204. Hesk D. et al. Synthesis of ^3H , $^2\text{H}_4$, and ^{14}C -MK 3814 (preladenant) // J. Label. Compd. Radiopharm. 2017. Vol. 60, № 4. P. 194–199.
205. Pozzi O.R., Sajaroff E.O., Edreira M.M. Influence of prosthetic radioiodination on the chemical and biological behavior of chemotactic peptides labeled at high specific activity // Appl. Radiat. Isot. 2006. Vol. 64, № 6. P. 668–676.
206. Pająk M. et al. The chemo- enzymatic synthesis of labeled l-amino acids and some of their derivatives // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2018. Vol. 317, № 2. P. 643–666.
207. Wilzbach K.E. Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas // J. Am. Chem. Soc. 1957. Vol. 79, № 4. P. 1013–1013.
208. Tadokoro T. et al. Tritium retention in CX-2002U and methods to reduce tritium inventory // J. Nucl. Mater. 1998. Vol. 258–263, № PART 1. P. 1092–1096.
209. Risseuw M.D.P. et al. Synthesis of tritium labeled KRN7000 // Tetrahedron Lett. 2006. Vol. 47, № 22. P. 3677–3679.
210. Шишков А.В., Нейман Л.А., Смоляков В.С. Получение меченых органических соединений действием атомарного трития // Успехи химии. 1984. Т. 7, № 53. С. 1125–1151.
211. Langmuir I. A chemically active modification of hydrogen // J. Am. Chem. Soc. 1912. Vol. 34, № 10. P. 1310–1325.
212. Langmuir I. Chemical reactions at low pressures // Ind. Eng. Chem. 1915. Vol. 7, № 4. P. 349–351.
213. Langmuir I. The dissociation of hydrogen into atoms // J. Am. Chem. Soc. 1912.

Vol. 428. P. 860–877.

214. Чернышева М.Г., Буняев В.А., Бадун Г.А. Влияние оксида графена и углеродных нанотрубок на реакцию атомов трития с даларгином // Радиохимия. 2020. Т. 62, № 2. С. 169–174.
215. Бадун Г.А. и др. Способ получения меченных тритием наноалмазов: пат. RU 2672741 С1. 2017.
216. Bunyayev V.A. et al. Comparison analysis of graphene oxide reduction methods // Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures. 2020. Vol. 28, № 3. P. 191–195.
217. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Алдобаев В.Н. Получение меченных тритием модифицированных одностенных углеродных нанотрубок для фармакокинетических исследований // Радиохимия. 2016. Т. 58, № 3. С. 264–268.
218. Вербецкий В.Н. и др. Влияние водорода на структуру пленок церия, полученных магнетронным напылением на полупроводниковые носители // Материаловедение. 2020. Т. 11, № 2. С. 8–11.
219. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Буняев В.А. Способ получения высокомеченного тритием оксида графена: пат. RU 2813551 С1, 2024.
220. Moshinsky M. How good is the Hartree-Fock approximation // Am. J. Phys. 1968. Vol. 36, № 1. P. 52–53.
221. Tinland B. A semiempirical LCAO MO SCF study of the electronic structure of photochromic anils with a variable β approximation // Tetrahedron. 1970. Vol. 26, № 20. P. 4795–4798.
222. Born M., Oppenheimer R. Zur quantentheorie der Molekein // Ann. Phys. 1927. Vol. 20, № 84. P. 457–484.
223. Leszczynski J. et al. Handbook of computational chemistry. Springer Cham. 2017. 2381 p.
224. Ritchie D.W. Protein docking using spherical polar Fourier correlations // Proteins Struct. Funct. Genet. 2000. Vol. 39, № 2. P. 178–194.
225. Wang Z. et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set

- of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, № 18. P. 12964–12975.
226. Белащенко Д.К., Скворцов Л. В. Молекулярно-динамическое исследование расплавов системы CaO-Al₂O₃ // *Неорг. материалы.* 2001. Т. 37, № 5. С. 571–576.
227. Singh P. et al. Molecular dynamics simulations of Ac-3Aib-Cage-3Aib-NHMe // *Mol. Simul.* 2010. Vol. 36, № 13. P. 1035–1044.
228. Zeng Q.H. et al. Molecular dynamics simulation of organic-inorganic nanocomposites: layering behavior and interlayer structure of organoclays // *Chem. Mater.* 2003. Vol. 15, № 25. P. 4732–4738.
229. Wang J., Hou T. Application of molecular dynamics simulations in molecular property prediction II: Diffusion coefficient // *J. Comput. Chem.* 2011. Vol. 32, № 16. P. 3505–3519.
230. Reza R. et al. Repurposing of anti-lung cancer drugs as multi-target inhibitors of SARS-CoV-2 proteins: An insight from molecular docking and MD-simulation study // *Microb. Pathog.* 2022. Vol. 169, № 105615. P. 1–10.
231. Bunyaev V.A., Sinolits A. V., Badun G.A. Study of carbon nanotube–bovine serum albumin interaction using the tritium radiotracer technique and supercomputer simulation // *Biol. Life Sci. Forum.* 2024. Vol. 35, № 5. P. 1–6.
232. Yang M., Koutsos V., Zaiser M. Interactions between polymers and carbon nanotubes: A molecular dynamics study // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109, № 20. P. 10009–10014.
233. Muraru S. et al. Molecular dynamics simulations of DNA adsorption on graphene oxide and reduced graphene Oxide-PEG-NH₂ in the presence of Mg²⁺ and Cl⁻ ions // *Coatings.* 2020. Vol. 10, № 289. P. 1–19.
234. Zeng S. et al. Molecular simulations of conformation change and aggregation of HIV-1 Vpr13-33 on graphene oxide // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, P. 1–7.
235. Brooks B.R. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30, № 10. P. 1545–1614.

236. Case D.A. et al. The Amber biomolecular simulation programs // J. Comput. Chem. 2005. Vol. 26, № 16. P. 1668–1688.
237. Van Der Spoel D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free // J. Comput. Chem. 2005. Vol. 26, № 16. P. 1701–1718.
238. Thompson A.P. et al. LAMMPS - a flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales // Comput. Phys. Commun. 2022. Vol. 271, № 108171. P. 1–34.
239. Shih C.J. et al. Understanding the pH-dependent behavior of graphene oxide aqueous solutions: A comparative experimental and molecular dynamics simulation study // Langmuir. 2012. Vol. 28, № 1. P. 235–241.
240. Willems N. et al. Biomimetic phospholipid membrane organization on graphene and graphene oxide surfaces: a molecular dynamics simulation study // ACS Nano. 2017. Vol. 11, № 2. P. 1613–1625.
241. Czechowska-Biskup R. et al. Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods // Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv. 2012. Vol. 17. P. 1–16.
242. Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method // Radiochim. Acta. 2012. Vol. 100, № 6. P. 401–408.
243. Gallyamov M.O. et al. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves // Mater. Sci. Eng. C. 2014. Vol. 37, № 1. P. 127–140.
244. Степанов К.В. и др. Получение фенилтиогидантоинов аминокислот для количественного анализа аминокислотного состава белков методом капиллярного электрофореза // Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия. 2005. Т. 46, № 6. С. 395–399.
245. Sedov S.A. et al. Lysis of Escherichia coli cells by lysozyme: Discrimination between adsorption and enzyme action // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2011. Vol. 88, № 1. P. 131–133.

246. Levashov P.A. et al. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82, № 5. P. 2161–2163.
247. Pettersen E.F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25, № 13. P. 1605–1612.
248. Halgren T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94* // *J. Comput. Chem.* 1996. Vol. 17. P. 490–519.
249. James J. P. Stewart. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 1990. Vol. 4. P. 1–103.
250. Mouhat F., Coudert F.-X., Bocquet M.-L. Structure and chemistry of graphene oxide in liquid water from first principles // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1566. P. 1–9.
251. Feicht P., Eigler S. Defects in graphene oxide as structural motifs // *ChemNanoMat.* 2018. Vol. 4, № 3. P. 244–252.
252. L DeLano W. Pymol: An open-source molecular graphics tool // *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* 2002. Vol. 40. P. 1–9.
253. Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Vol. 118, № 45. P. 11225–11236.
254. Bauer P., Hess B., Lindahl E. GROMACS Documentation Release 2022.4. GROMACS development team. 2022. 673 p.
255. Lemkul J. From proteins to perturbed hamiltonians: a suite of tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0] // *Living J. Comput. Mol. Sci.* 2019. Vol. 1, № 1. P. 1–53.
256. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31. P. 455–461.
257. Berendsen H.J.C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. Vol. 81, № 8. P. 3684–3690.
258. Nosé S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics

- methods // *J. Chem. Phys.* 1984. Vol. 81, № 1. P. 511–519.
259. Hoover W.G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions // *Phys. Rev. A.* 1985. Vol. 31, № 3. P. 1695–1697.
260. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method // *J. Appl. Phys.* 1981. Vol. 52, № 12. P. 7182–7190.
261. Rezwani K. et al. Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al_2O_3 particles: A new model based on zeta potential and UV-Vis measurements // *Langmuir.* 2004. Vol. 20, № 23. P. 10055–10061.
262. Chua C.K., Pumera M. Chemical reduction of graphene oxide: A synthetic chemistry viewpoint // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, № 1. P. 291–312.
263. Konkana B., Vasudevan S. Understanding aqueous dispersibility of graphene oxide and reduced graphene oxide through pKa measurements // *J. Phys. Chem. Lett.* 2012. Vol. 3, № 7. P. 867–872.
264. Babak F. et al. Preparation and mechanical properties of graphene oxide: Cement nanocomposites // *Sci. World J.* 2014. Vol. 2014. P. 1–10.
265. Niu Y. et al. Reduction and structural evolution of graphene oxide sheets under hydrothermal treatment // *Phys. Lett. Sect. A Gen. At. Solid State Phys.* 2016. Vol. 380, № 38. P. 3128–3132.
266. Acik M. et al. The role of oxygen during thermal reduction of graphene oxide studied by infrared absorption spectroscopy // *J. Phys. Chem. C.* 2011. Vol. 115, № 40. P. 19761–19781.
267. Moztahida M. et al. Effect of rGO loading on Fe_3O_4 : A visible light assisted catalyst material for carbamazepine degradation // *Sci. Total Environ.* 2019. Vol. 667, № 7. P. 741–750.
268. Tan T.L. et al. High-resolution FTIR spectrum of the ν_9 band of ethylene- d_4 (C_2D_4) // *J. Mol. Spectrosc.* 2000. Vol. 202, № 2. P. 249–252.
269. Aydin S., Kam E. Investigation of nickel-63 radioisotope-powered GaN betavoltaic nuclear battery // *International Journal of Energy Research.* 2019. Vol. 43, № 14. P. 8725–8738.

270. Savchenko A.V. et al. Efficiency analysis of betavoltaic elements // *Condens. matter Mater. Sci.* 2014. Vol. 111. P. 147–152.
271. Бадун Г.А., Буняев В.А., Чернышева М.Г. Получение высокоочищенного оксида графена с помощью метода термической активации трития для использования в бета-вольтаическом элементе ядерной батареи // *Радиохимия*. 2024. Т. 66, № 2. С. 165–170.
272. He H. et al. A new structural model for graphite oxide // *Chem. Phys. Lett.* 1998. Vol. 287, № 1–2. P. 53–56.
273. Amirmazlaghani M. et al. Betavoltaic battery based on reduced-Graphene-Oxide/Si heterojunction // *Superlattices Microstruct.* 2020. Vol. 145, № 106602. P. 1–9.
274. Тясто З.А. и др. Неравновесные процессы при взаимодействии горячих атомов трития с охлажденными твердыми мишенями. Ослабление потока атомов трития адсорбционными слоями бромидов алкилтриметиламмония // *Радиохимия*. 2007. Т. 49, № 2. С. 163–165.
275. Lian B. et al. Extraordinary water adsorption characteristics of graphene oxide // *Chem. Sci.* 2018. Vol. 9, № 22. P. 5106–5111.
276. Li X. et al. Analyses of time-related performance of betavoltaic batteries using TiT2 // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2020. Vol. 53, № 46. P. 1–6.
277. Разживина И.А. и др. Влияние подложек углеродных материалов на эффективность изотопного обмена между даларгином и тритием // *Радиохимия*. 2019. Т. 61, № 1. С. 56–62.
278. Zolotarev Y.A. et al. New development in the tritium labelling of peptides and proteins using solid catalytic isotopic exchange with spillover-tritium // *Amino Acids*. 2003. Vol. 24, № 3. P. 325–333.
279. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Гетерогенный каталитический синтез меченных изотопами водорода органических соединений без участия растворителей // *Радиохимия*. 2018. Т. 60, № 2. С. 97–127.
280. Филатов Э.С., Симонов Е.Ф., Орлова М.А. Реакционная способность атомов трития // *Успехи Химии*. 1981. Т. 50, № 12. С. 1134–1150.

281. Pham V.H. et al. A catalytic and efficient route for reduction of graphene oxide by hydrogen spillover // *J. Mater. Chem. A*. 2013. Vol. 1, № 4. P. 1070–1077.
282. Lipson A.G. et al. Hydrogen transport in single-walled carbon nanotubes encapsulated by palladium // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2012. Vol. 37, № 7. P. 5676–5685.
283. Prins R. Hydrogen spillover. Facts and fiction // *Chem. Rev.* 2012. Vol. 112, № 5. P. 2714–2738.
284. Silambarasan D. et al. Single walled carbon nanotube-metal oxide nanocomposites for reversible and reproducible storage of hydrogen // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2013. Vol. 5, № 21. P. 11419–11426.
285. James L.P. HyperChem release 3 for Windows // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1993. Vol. 33, № 6. P. 931–933.
286. Bunyaev V.A. et al. Structural peculiarities of lysozyme-graphene oxide adsorption complexes // *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2022. Vol. 30, № 1. P. 99–105.
287. Bera S. et al. Molecular features of interaction involving hen egg white lysozyme immobilized on graphene oxide and the effect on activity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 120. P. 2390–2398.
288. Chaudhary K. et al. Protein immobilization on graphene oxide or reduced graphene oxide surface and their applications: Influence over activity, structural and thermal stability of protein // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2021. Vol. 289, № 102367. P. 1–17.
289. Kao K.C., Lin T.S., Mou C.Y. Enhanced activity and stability of lysozyme by immobilization in the matching nanochannels of mesoporous silica nanoparticles // *J. Phys. Chem. C*. 2014. Vol. 118, № 13. P. 6734–6743.
290. Monopoli M.P. et al. Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 8. P. 2525–2534.
291. Tenzer S. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects

- nanoparticle pathophysiology // *Nat. Nanotechnol.* 2013. Vol. 8, № 10. P. 772–781.
292. Nel A.E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface // *Nat. Mater.* 2009. Vol. 8, № 7. P. 543–557.
293. Datta R. et al. How enzymes are adsorbed on soil solid phase and factors limiting its activity: A Review // *Int. Agrophysics.* 2017. Vol. 31, № 2. P. 287–302.
294. Pulingam T. et al. Graphene oxide exhibits differential mechanistic action towards Gram-positive and Gram-negative bacteria // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2019. Vol. 181. P. 6–15.
295. Lukashina E. et al. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions // *FEBS J.* 2009. Vol. 276, № 23. P. 7006–7015.
296. Chernysheva M.G. et al. Self-organization of lysozyme—Ionic surfactant complexes at the aqueous-air interface as studied by tritium bombardment // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2017. Vol. 520. P. 1–8.
297. Чернышева М.Г. и др. Метод тритиевого зонда в исследовании адсорбционных слоев лизоцима на поверхности детонационных наноалмазов // *Радиохимия.* 2020. Т. 63, № 2. С. 185–192.
298. Eckhart K.E. et al. Peptide- and protein-graphene oxide conjugate materials for controlling mesenchymal stem cell fate // *Regen. Eng. Transl. Med.* 2021. Vol. 7. P. 460–484.
299. Khan A. et al. Mechanistic insight into the binding of graphene oxide with human serum albumin: Multispectroscopic and molecular docking approach // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. Vol. 256, № 119750. P. 1–9.
300. Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications // *Acta Biomater.* 2013. Vol. 9, № 12. P. 9243–9257.
301. Lu N. et al. Adsorption of human serum albumin on functionalized single-walled carbon nanotubes reduced cytotoxicity // *Chem. Biol. Interact.* 2018. Vol. 295. P. 64–72.
302. Li L. et al. Construction and application of graphene oxide-bovine serum albumin

- modified extended gate field effect transistor chiral sensor // *Sensors*. 2021. Vol. 21, № 3921. P. 1–19.
303. Sumaryada T. et al. A molecular interaction analysis reveals the possible roles of graphene oxide in a glucose biosensor // *Biosensors*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–11.
304. Gao J. et al. Graphene oxide-graphene Van der Waals heterostructure transistor biosensor for SARS-CoV-2 protein detection // *Talanta*. 2022. Vol. 240, № 123197. P. 1–7.
305. Rozhkov S.P. et al. Protein interaction with hydrated C60 fullerene in aqueous solutions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 303, № 2. P. 562–566.
306. Bradac C. et al. Influence of surface composition on the colloidal stability of ultra-small detonation nanodiamonds in biological media // *Diam. Relat. Mater.* 2018. Vol. 83. P. 38–45.
307. Taneva S.G. et al. Insights into graphene oxide interaction with human serum albumin in isolated state and in blood plasma // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. Vol. 175. P. 19–29.
308. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2012. Vol. 68, № 10. P. 1278–1289.
309. Seredych M. et al. Adsorption of bovine serum albumin on carbon-based materials // *Carbon*. 2018. Vol. 4, № 3. P. 1–14.
310. Sun B. et al. New insights into the colloidal stability of graphene oxide in aquatic environment: Interplays of photoaging and proteins // *Water Res.* 2021. Vol. 200, № 117213. P. 1–9.
311. Togashi D.M., Ryder A.G. A fluorescence analysis of ANS bound to bovine serum albumin: Binding properties revisited by using energy transfer // *J. Fluoresc.* 2008. Vol. 18, № 2. P. 519–526.
312. Bapli A. et al. Interaction of a hydrophilic molecule with bovine serum albumin: A combined multi-spectroscopic, microscopic and isothermal calorimetric study in the presence of graphene oxide // *J. Mol. Liq.* 2021. Vol. 323, № 114618. P. 1–51.
313. Li H. et al. The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery

- systems // *Acta Biomater.* 2021. Vol. 129. P. 57–72.
314. Ali M.S., Altaf M., Al-Lohedan H.A. Green synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Solanum tuberosum* extract and their interaction with human serum albumin: Evidence of “corona” formation through a multi-spectroscopic and molecular docking analysis // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2017. Vol. 173. P. 108–119.
315. Harris R., Olson A.J., Goodsell D.S. Automated prediction of ligand-binding sites in proteins // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2007. Vol. 70, № 4. P. 1506–1517.
316. Холумудров Х.Т. Методы молекулярной динамики для моделирования физических и биологических процессов // *Физика элементарных частиц и атомного ядра.* 2003. Т. 34, № 2. С. 473–515.
317. Badun G.A. et al. Atomic tritium as a surface nanoprobe in a structural investigation of molecular assemblies // *Mater. Sci. Eng. C.* 2003. Vol. 23, № 6–8. P. 797–802.
318. Чернышева М.Г. и др. Метод тритиевого зонда в исследовании адсорбционных слоев лизоцима на поверхности детонационных наноалмазов // *Радиохимия.* 2021. Т. 63, № 2. С. 185–192.
319. Буняев В.А., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. Хитозан и сывороточный альбумин как модификаторы углеродных нанотрубок // *Журнал физической химии* 2024. Т. 98, № 7. С. 29–36.
320. Hampitak P. et al. Protein interactions and conformations on graphene-based materials mapped using quartz-crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) // *Carbon.* 2020. Vol. 165. P. 317–327.
321. Kuchlyan J. et al. Spectroscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy to probe the interaction of bovine serum albumin with graphene oxide // *Langmuir.* 2015. Vol. 31, № 51. P. 13793–13801.
322. Медведев Н.Н. Молекулярная динамика. Получение моделей. Москва: Юрайт, 2024. 168 с.
323. Hollingsworth S.A., Dror R.O. Molecular dynamics simulation for all // *Neuron.* 2018. Vol. 99, № 6. P. 1129–1143.

324. York D.M., Darden T.A., Pedersen L.G. The effect of long-range electrostatic interactions in simulations of macromolecular crystals: A comparison of the Ewald and truncated list methods // *J. Chem. Phys.* 1993. Vol. 99, № 10. P. 8345–8348.
325. Peters T. Serum Albumin // *Adv. Protein Chem.* 1985. Vol. 37. P. 161–245.
326. Bellissent-Funel M.-C. et al. Water determines the structure and dynamics of proteins // *Chem. Rev.* 2016. Vol. 116, № 13. P. 7673–7697
327. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // *Biopolymers.* 1983. Vol. 22, № 12. P. 2577–2637.
328. Petukhov M. et al. Local water bridges and protein conformational stability // *Protein Sci.* 1999. Vol. 8, № 10. P. 1982–1989.
329. Eisenhaber F. et al. The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies // *J. Comput. Chem.* 1995. Vol. 16, № 3. P. 273–284.
330. Xu D., Tsai C.J., Nussinov R. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces // *Protein Eng.* 1997. Vol. 10, № 9. P. 999–1012.
331. Ruoff R.S., Qian D., Liu W.K. Mechanical properties of carbon nanotubes: Theoretical predictions and experimental measurements // *Comptes Rendus Phys.* 2003. Vol. 4, № 9. P. 993–1008.
332. Mishra V., Heath R.J. Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 8411. P. 1–16.
333. Chen H. et al. Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions // *Prog. Polym. Sci.* 2008. Vol. 33, № 11. P. 1059–1087.
334. Kiradzhiyska D.D., Mantcheva R.D. Overview of biocompatible materials and their use in medicine // *Folia Med.* 2019. Vol. 61, № 1. P. 34–40.
335. Долгопятова Н.В. и др. Влияние условий деацетилирования на физико-химические свойства хитозана из панциря ракообразных // *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2022. Т. 65, № 5. С. 77–86.

336. Nilsen-Nygaard J. et al. Chitosan: Gels and interfacial properties // *Polymers*. 2015. Vol. 7, № 3. P. 552–579.
337. Zhang X., Meng L., Lu Q. Cell behaviors on polysaccharide-wrapped single-wall carbon nanotubes: A quantitative study of the surface properties of biomimetic nanofibrous scaffolds // *ACS Nano*. 2009. Vol. 3, № 10. P. 3200–3206.
338. Quemeneur F., Rinaudo M., Pépin-Donat B. Influence of molecular weight and pH on adsorption of Chitosan at the surface of large and giant vesicles // *Biomacromolecules*. 2008. Vol. 9, № 1. P. 396–402.
339. Hu H. et al. Influence of the zeta potential on the dispersability and purification of single-walled carbon nanotubes // *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, № 23. P. 11520–11524.
340. Хабашеску В.Н. Ковалентная функционализация углеродных нанотрубок // *Успехи Химии*. 2011. Т. 80, № 8. С. 739–760.
341. Aryaei A., Jayatissa A.H., Jayasuriya A.C. Mechanical and biological properties of chitosan/carbon nanotube nanocomposite films // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2014. Vol. 102, № 8. P. 2704–2712.
342. Gerasimenko A.Y. et al. The study of the interaction mechanism between bovine serum albumin and single-walled carbon nanotubes depending on their diameter and concentration in solid nanocomposites by vibrational spectroscopy // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. Vol. 227, № 117682. P. 1–10.
343. Fologea D. et al. Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore // *Appl. Phys. Lett.* 2007. Vol. 91, № 5. P. 1–9.
344. Li G. et al. Insight into the interaction between chitosan and bovine serum albumin // *Carbohydr. Polym.* 2017. Vol. 176. P. 75–82.
345. Rashad M.M. et al. Bovine serum albumin/chitosan-nanoparticle bio-complex; spectroscopic study and in vivo toxicological – Hypersensitivity evaluation // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. Vol. 253, № 119582. P. 1–13.
346. He N. et al. Fabrication, structure and surface charges of albumin-chitosan hybrids

// Sci. China Chem. 2012. Vol. 55, № 9. P. 1788–1795.

347. Voevodin V.V. et al. Supercomputer Lomonosov-2: Large scale, deep monitoring and fine analytics for the user community // Supercomput. Front. Innov. 2019. Vol. 6, № 2. P. 4–11.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Данные исполняемых *.mdp*-файлов

| Параметры | Значения параметров | | | | |
|-----------------|---------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| | minim.mdp | pr.mdp | npt.mdp | nvt.mdp | md.mdp |
| title | Minimization | Minimization | Protein-GO complex NVT equilibration | Protein-GO complex NPT equilibration | Protein-GO complex MD simulation |
| define | = -DFLEXIBLE | = -DPOSRES_4f5s -DPOSRES_GO ⁸ | = -DPOSRES_4f5s -DPOSRES_GO | = -DPOSRES_4f5s -DPOSRES_GO | = -DPOSRES_GO |
| tinit | = 0 | x ⁹ | x | x | = 0 |
| dt | =0.001 | = 0.001 | = 0.002 | = 0.002 | = 0.002 |
| nsteps | = 50000 | = 10000 (или 50000) ¹⁰ | = 50000 | = 50000 | = 50000000 |
| init-step | = 0 | x | x | x | x |
| simulation-part | = 1 | x | x | x | x |
| integrator | = steep | = md | = md | = md | = md |
| comm-mode | = Linear | x | x | x | x |
| nstcomm | = 100 | x | x | x | x |

⁸ Перечень и наименования жесткого положения молекул должен соответствовать названиям, указанным в нижней части файла главной топологии (topol.top)

⁹ Значение «x» в выбранном типе файла означает, что данный параметр не указывается в файле

¹⁰ Значения в скобках выбираются при использовании алгоритма термостата nose-hoover и алгоритма баростата Parrinello-Rahman

| | | | | | |
|------------------------|----------|--------------|---------------|---------------|--------------------|
| bd-fric | = 0 | x | x | x | x |
| ld-seed | = -1 | x | x | x | x |
| emtol | = 1.0 | x | x | x | x |
| emstep | = 0.01 | x | x | x | x |
| niter | = 20 | x | x | x | x |
| fcstep | = 0 | x | x | x | x |
| nstcgsteep | = 1000 | x | x | x | x |
| nbgscorr | = 10 | x | x | x | x |
| rtpi | = 0.05 | x | x | x | x |
| nstxout | = 0 | x | = 0 | = 0 (или 500) | = 50000 |
| nstvout | = 0 | x | = 0 | = 0 (или 500) | = 50000 |
| nstfout | = 0 | x | = 0 | = 0 | = 0 |
| nstlog | = 1000 | x | = 1 (или 500) | = 1 (или 500) | = 2500 (или 50000) |
| nstcalcenergy | = 100 | x | x | x | x |
| nstenergy | = 1 | = 1 | = 1 (или 500) | = 1 (или 500) | = 2500 (или 50000) |
| nstxtcout | x | x | = 0 | = 125 | = 2500 |
| xtc_precision | x | x | x | = 1000 | x |
| xtc-grps | x | x | x | = System | x |
| nstxout-compressed | = 0 | x | x (или 500) | x | x (или 50000) |
| compressed-x-precision | = 1000 | x | x | x | x |
| energygrps | = System | = Protein_GO | = Protein_GO | = Protein_GO | x |

| | | Water_and_ions ¹¹ | Water_and_ions | Water_and_ions | |
|-------------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| cutoff-scheme | = Verlet | x (или Verlet) | x (или Verlet) | x (или Verlet) | x (или Verlet) |
| nstlist | = 10 | x (или 10) | = 5 (или 20) | = 5 (или 10) | = 5 (или 20) |
| ns-type | = simple | x (или grid) | = Grid | = Grid | = Grid |
| pbcs | = xyz | x (или xyz) | = xyz | = xyz | = xyz |
| periodic-molecules | = no | x (или yes) | x (или yes) | x (или yes) | x (или yes) |
| verlet-buffer-tolerance | = 0.005 | x | x | x | x |
| rlist | = 1 | x | = 0.9 (или 1.2) | = 0.9 | = 0.9 (или 1.2) |
| coulombtype | = cut-off | = Reaction-Field (или PME) | = Reaction-Field (или PME) | = Reaction-Field (или PME) | = Reaction-Field (или PME) |
| coulomb-modifier | = Potential-shift-Verlet | x | x | x | x |
| rcoulomb-switch | = 0 | x | x | x | x |
| rcoulomb | = 1.0 | = 1.4 (или 1.0) | = 1.4 (или 1.2) | = 1.4 (или 1.0) | = 1.4 (или 1.2) |
| epsilon-r | = 1 | x | x | x | = 1 |
| epsilon-rf | = 0 | = 54 | = 54 | = 54 | = 54 |
| vdw-type | = Cut-off | = Cut-off | = Cut-off | = Cut-off | = Cut-off |
| vdw-modifier | = Potential-shift-Verlet | x | x (или force-switch) | x | x (или force-switch) |
| rvdw-switch | = 0 | x | x (или 1.0) | x | x (или 1.0) |
| rvdw | = 1.0 | = 1.4 (или 1.0) | = 1.4 (или 1.2) | = 1.4 (или 1.0) | = 1.4 (или 1.2) |
| DispCorr | = No | x (или EnerPres) | x (или No) | x (или EnerPres) | x (или No) |

¹¹ Название групп должны соответствовать группам, указанным в индекс-файле (*Complex_index.ndx*)

| | | | | | |
|-----------------|--------|---|--------------|--------------|--------------|
| table-extension | = 1 | x | x | x | x |
| fourierspacing | = 0.12 | x | x (или 0.16) | x (или 0.16) | x (или 0.16) |
| fourier-nx | = 0 | x | x | x | x |
| fourier-ny | = 0 | x | x | x | x |
| fourier-nz | = 0 | x | x | x | x |

Приложение 1 (продолжение)

| | | | | | |
|--------------------|-------------|---|-----------|-----------|-----------|
| pme-order | = 4 | x | x (или 4) | x (или 4) | x (или 4) |
| ewald-rtol | = 1e-05 | x | x | x | x |
| ewald-rtol-lj | = 0.001 | x | x | x | x |
| lj-pme-comb-rule | = Geometric | x | x | x | x |
| ewald-geometry | = 3d | x | x | x | x |
| epsilon-surface | = 0 | x | x | x | x |
| implicit-solvent | = No | x | x | x | x |
| gb-algorithm | = Still | x | x | x | x |
| nstgbradii | = 1 | x | x | x | x |
| rgbradii | = 1 | x | x | x | x |
| gb-epsilon-solvent | = 80 | x | x | x | x |
| gb-saltconc | = 0 | x | x | x | x |
| gb-obc-alpha | = 1 | x | x | x | x |
| gb-obc-beta | = 0.8 | x | x | x | x |
| gb-obc-gamma | = 4.85 | x | x | x | x |

| | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---|
| gb-dielectric-offset | = 0.009 | x | x | x | x |
| sa-algorithm | = Ace- approximation | x | x | x | x |
| sa-surface-tension | = -1 | x | x | x | x |
| pme-order | = 4 | x | x | x | x |
| tcoupl | = No | = V-rescale | = V-rescale (или nose- hoover) | = V-rescale | = Berendsen (или nose- hoover) |
| tc-grps | x | = Protein_GO Water_and_ions | = Protein_GO Water_and_ions | = Protein_GO Water_and_ions | = Protein_GO Water_and_ions |
| tau_t | x | = 0.1 0.1 | = 0.1 0.1 (или 0.5 0.5) | = 0.1 0.1 | = 0.1 0.1 (или 0.5 0.5) |
| ref_t | x | = 200 200 | = 300 300 | = 300 300 | = 300 300 |
| gen_temp | = 200 | = 200.0 | x | = 300.0 | x |
| gen-seed | = -1 | = 9999 (или -1) | x | = 1945 (или -1) | x |
| nsttcouple | = -1 | x | x | x | x |
| constraint_algorithm | = Lincs | x (или lincs) | x (или lincs) | x (или lincs) | = Lincs |
| nh-chain-length | = 10 | x | x | x | x |
| print-nose-hoover- chain-variables | = no | x | x | x | x |
| pcoupl | = No | x (или no) | = no (или Parrinello- Rahman) | = Berendsen (или no) | = Berendsen (или Parrinello- Rahman) |
| pcoupltype | = Isotropic | x | x (или Isotropic) | = Isotropic | = Isotropic |

| | | | | | |
|-----------------|------|---|----------------|----------|-----------------|
| compressibility | x | x | x (или 4.5e-5) | = 4.5e-5 | = 4.5e-5 |
| ref_p | x | x | x (или 1.0) | = 1.0 | = 1.0 |
| nstpcouple | = -1 | x | x | x | x |
| tau-p | = 1 | x | x (или 2.0) | = 1.0 | = 1.0 (или 2.0) |

Приложение 1 (продолжение)

| | | | | | |
|---------------------|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| refcoord-scaling | = No | x | x (или com) | x | x (или com) |
| QMMM | = no | x | x | x | x |
| QMMMScheme | = normal | x | x | x | x |
| MMChargeScaleFactor | = 1 | x | x | x | x |
| gen-vel | = no | x (или yes) | x (или no) | x (или yes) | = no |
| constraints | = none | = all-bonds (или h-bonds) |
| unconstrained-start | x | x | x | x | = yes |
| continuation | = no | x (или no) | x (или yes) | x (или no) | x (или yes) |
| Shake-SOR | = no | x | x | x | x |
| shake-tol | = 0.0001 | x | x | x | x |
| lincs-order | = 4 | x (или 4) | x (или 4) | x (или 4) | = 4 |
| lincs-iter | = 1 | x | x (или 1) | x (или 1) | = 1 |
| lincs-warnangle | = 30 | x | x | x | = 30 |

| | | | | | |
|-----------------|-------------------|---|---|---|---|
| morse | = no | x | x | x | x |
| nwall | = 0 | x | x | x | x |
| wall-type | = 9-3 | x | x | x | x |
| wall-r-linpot | = -1 | x | x | x | x |
| wall-ewald-zfac | = 3 | x | x | x | x |
| pull | = no | x | x | x | x |
| rotation | = no | x | x | x | x |
| disre | = No | x | x | x | x |
| disre-weighting | = Conservative | x | x | x | x |
| disre-mixed | = no | x | x | x | x |
| disre-fc | = 1000 | x | x | x | x |
| disre-tau | = 0 | x | x | x | x |
| nstdisreout | = 100 | x | x | x | x |
| orire | = no | x | x | x | x |

| | | | | | |
|-----------------------|---------|---|---|---|---|
| orire-fc | = 0 | x | x | x | x |
| orire-tau | = 0 | x | x | x | x |
| nstorireout | = 100 | x | x | x | x |
| free-energy | = no | x | x | x | x |
| couple-lambda0 | = vdw-q | x | x | x | x |
| couple-lambda1 | = vdw-q | x | x | x | x |
| couple-intramol | = no | x | x | x | x |
| init-lambda | = -1 | x | x | x | x |
| init-lambda-state | = -1 | x | x | x | x |
| delta-lambda | = 0 | x | x | x | x |
| nstdhdl | = 50 | x | x | x | x |
| calc-lambda-neighbors | = 1 | x | x | x | x |
| dhdl-print-energy | = no | x | x | x | x |
| sc-alpha | = 0 | x | x | x | x |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------|---|---|---|---|
| sc-power | = 1 | x | x | x | x |
| sc-r-power | = 6 | x | x | x | x |
| sc-sigma | = 0.3 | x | x | x | x |
| sc-coul | = no | x | x | x | x |
| separate-dhdl-file | = yes | x | x | x | x |
| dhdl-derivatives | = yes | x | x | x | x |
| dh_hist_size | = 0 | x | x | x | x |
| dh_hist_spacing | = 0.1 | x | x | x | x |
| cos-acceleration | = 0 | x | x | x | x |
| simulated-tempering | = no | x | x | x | x |
| simulated-tempering-scaling | = geometric | x | x | x | x |
| sim-temp-low | = 300 | x | x | x | x |
| sim-temp-high | = 300 | x | x | x | x |
| swapcoords | = no | x | x | x | x |

Приложение 2

Параметры квантово-химического расчета в программе MOPAC

| Параметры | Значения параметров | Примечание |
|-----------|---------------------|---|
| PM7 | | Используется полуэмпирический PM7 гамильтониан |
| T= | 7D | Максимальное время расчета 7 дней |
| GNORM= | 0.100 | Градиент снижения свободной энергии при оптимизации структуры ОГ до ≤ 0.100 кДж/моль |
| LBFGS | | Оптимизация структуры ОГ с большим количеством атомов |
| PDBOUT | | Сохранение итогового файла в <i>pdb</i> -формате |
| MULLIK | | Подсчет частичных зарядов на атоме по анализу заселённости по Малликену |
| CHARGE= | -2 | Параметр суммарного заряда структуры определен ключевым словом LEWIS |
| SHIFT= | 80 | Коэффициент демпфирования |

Приложение 3

Пример заполнения файла «atomname2type.n2t» в силовом поле OPLS-AA, необходимого для формирования файла топологии ОГ¹²

| Наименование центрального атома | Классификация по силовому полю | Заряд на центральном атоме (MOPAC 2016) | Атомная единица массы центрального атома | Количество элементов, образующих химическую связь с центральным атомом | Элемент и его межатомное расстояние (нм) с центральным атомом |
|---------------------------------|--------------------------------|---|--|--|---|
| C | opls_141 | -0.017 | 12.011 | 3 | C 0.140 C 0.154 C 0.133 |
| OE | opls_108 | -0.286 | 15.9994 | 2 | C 0.147 C 0.147 |
| C | opls_465 | 0.094 | 12.011 | 4 | C 0.163 C 0.163 C 0.163 OE 0.147 |
| O | opls_078 | -0.573 | 15.9994 | 2 | C 0.155 H 0.100 |
| H | opls_079 | 0.379 | 1.008 | 1 | O 0.100 |
| C | opls_159 | 0.260 | 12.011 | 4 | C 0.165 C 0.166 C 0.166 O 0.155 |
| C | opls_159 | 0.054 | 12.011 | 4 | C 0.165 C 0.166 H 0.110 O 0.155 |
| C | opls_159 | 0.550 | 12.011 | 4 | C 0.166 C 0.166 O 0.141 O 0.141 |
| OC | opls_268 | -0.612 | 15.9994 | 2 | CC 0.136 H 0.100 |
| H | opls_270 | 0.393 | 1.008 | 1 | OC 0.100 |
| CC | opls_267 | 0.676 | 12.011 | 3 | OC 0.136 C 0.150 O 0.123 |
| O | opls_269 | -0.477 | 15.9994 | 1 | CC 0.123 |
| C | opls_141 | -0.189 | 12.011 | 3 | C 0.140 C 0.154 CC 0.150 |
| H | opls_146 | 0.224 | 1.008 | 1 | C 0.108 |
| C | opls_141 | 0.000 | 12.011 | 3 | C 0.146 C 0.154 H 0.108 |
| C | opls_137 | 0.000 | 12.011 | 4 | C 0.163 C 0.163 C 0.163 H 0.111 |

¹² Классификация центрального атома приведены в файле «atomtypes.atp», расположенного в директории папки с силовым полем.

Приложение 4

Пример файла расчетной области «GridBoxParameter.txt» для «слепого» молекулярного докинга с помощью программы AutoDock Vina 1.2

| Параметры координат и размера расчетной области | Значения |
|---|----------|
| center_x = | -8.68 |
| center_y = | 9.58 |
| center_z = | 85.67 |
| size_x = | 156 |
| size_y = | 156 |
| size_z = | 156 |

Команда конструирования файла ОГ, окруженного гидратной оболочкой:

```
mk_prepare_ligand.py -i GrapheneOxide.sdf -o GrapheneOxide.pdbqt -- pH 7.4 -w
```

Команда по созданию параметризированной области:

```
python2 prepare_gpf.py -l GrapheneOxide.pdbqt -r 4f5s.pqbqt -y -p ligand_types=`A,NA  
C,HD,N,OA`
```

```
./autodrid4 -p 4f5s.gpf -l 4f5s.glg
```

Команда по добавлению модели растворителя:

```
python2 mapwater.py -r 4f5s.pdbqt -s 4f5s.W.map
```

Команда запуска моделирования в окне терминала в операционной среде Linux:

```
sudo ./vina --receptor 4f5s.pqbqt --ligand GrapheneOxide.pdbqt --config  
GridBoxParameter.txt --exhaustiveness 32 --out result.pdbqt
```

Приложение 5

Исполняемые команды в программе Gromacs 2020.3 на суперкомпьютере «Ломоносов-2» СКЦ МГУ

| Этап моделирования | Команда запуска расчета | Примечания |
|--|--|--|
| Подготовительный этап | <i>mpirun gmx_mpi editconf -f GO.pdb -o GO.gro -label GO</i> | Конвертация файла ОГ в .gro-формат |
| | <i>mpirun gmx_mpi x2top -f GO.gro -o GO.top -name GO -ff select</i> | Конструирование файла топологии ОГ |
| | <i>mpirun gmx_mpi pdb2gmx -f 4f5s.pdb -o 4f5s_processed.gro -water select</i> | Конструирование файла топологии белка |
| Ограничение положения ОГ | <i>mpirun gmx_mpi genrestr -f GO.gro -o GO_posre.itp</i> | Фиксация граничного положения ОГ |
| Определение области моделирования | <i>mpirun gmx_mpi editconf -f complex.gro -o complex_box.gro -c -d 1.0 -bt cubic</i> | Создание расчетной области ¹³ |
| Минимизация свободной энергии системы без растворителя | <i>mpirun gmx_mpi grompp -f minim.mdp -c complex_box.gro -p topol.top -o complex-EM-vacuum.tpr -maxwarn 2</i> | Процедура предварительной обработки перед оптимизацией структур БСА и ОГ |
| | <i>mpirun gmx mdrun -v -deffnm complex-EM-vacuum -c complex-EM-vacuum.gro -pin on -nb cpu -ntomp 4</i> | Оптимизация в вакууме |
| Добавление растворителя и буферного раствора | <i>mpirun gmx_mpi solvate -cp complex-EM-vacuum.gro -cs spc216.gro -p topol.top -o complex_solvate.gro</i> | Заполнение расчетной области растворителем |
| | <i>mpirun gmx_mpi grompp -v -f minim.mdp -c complex_solvate.gro -r complex_solvate.gro -p topol.top -o complex_ions.tpr</i> | Предварительная обработка перед добавлением буферного раствора |
| | <i>mpirun gmx_mpi genion -s complex_ions.tpr -o complex_solv_ions.gro -conc 0.15 -neutral -pname NA -nname CL -p topol.top</i> | Добавление 0.15М раствора NaCl |

¹³ Файл «*complex.gro*» получен совмещением содержимого файла структуры лиганда ОГ («*GO.gro*») и файла структуры БСА («*4f5s_processed.gro*»)

| | | |
|--|--|---|
| Минимизация свободной энергии системы с растворителем и буферным раствором | <i>mpirun gmx_mpi grompp -v -f minim.mdp -c complex_solv_ions.gro -r complex_solv_ions.gro -p topol.top -o complex-EM-solvated.tpr</i> | Процедура предварительной обработки перед оптимизацией всей системы |
| | <i>mpirun gmx mdrun -v -deffnm complex-EM-solvated -c complex-EM-solvated.gro -pin on -nb cpu -ntomp 4</i> | Оптимизация в растворе |
| Определение положения БСА-ОГ и вода-ионы | <i>mpirun gmx_mpi make_ndx -f complex-EM-solvated.gro -o Complex_index.ndx</i> | Фиксация положения координат систем «БСА-ОГ» и «вода-ионы» |
| Термостатирование и утряска растворителя | <i>mpirun gmx_mpi grompp -f pr.mdp -c complex-EM-solvated.gro -r complex-EM-solvated.gro -p topol.top -n Complex_index.ndx -o complex-PR.tpr</i> | Предварительная обработка и термостатирование до 200 К |
| | <i>mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm complex-PR -pin on -nb cpu -ntomp 4</i> | |
| | <i>mpirun gmx_mpi grompp -f nvt.mdp -c complex-PR.gro -r complex-PR.gro -p topol.top -n Complex_index.ndx -o nvt.tpr</i> | Предварительная обработка и термостатирование до 300 К |
| | <i>mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm nvt -pin on -nb cpu -ntomp 4</i> | |
| | <i>mpirun gmx_mpi grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -r nvt.gro -p topol.top -n Complex_index.ndx -o npt.tpr</i> | Предварительная обработка и утряска растворителя |
| | <i>mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm npt -pin on -nb cpu -ntomp 4</i> | |
| Основное моделирование | <i>mpirun gmx_mpi grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -r npt.gro -p topol.top -n Complex_index.ndx -o md_0_100.tpr</i> | Предварительная обработка и запуск основного расчета |
| | <i>mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm md_0_100 -pin on -nb gpu -ntomp 4</i> | |