

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н.С. КУРНАКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИОНХ РАН)

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

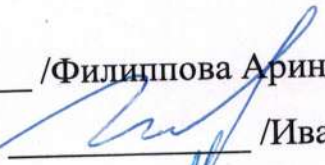
**об основных результатах подготовленной научно-квалификационной работы
(диссертации)**

Тема: *Энзимоподобная активность нанокристаллического диоксида церия*

Направление подготовки: *04.06.01 Химические науки*

Профиль (направленность): *1.4.15. (02.00.21) Химия твердого тела*

Форма обучения: очная

Аспирант  /Филиппова Арина Дмитриевна/
Научный руководитель  /Иванов Владимир Константинович, д.х.н.,
чл.-корр. РАН/
Зав. НОЦ-зав. аспирантурой  /Терехова Анна Николаевна/

Москва
2025 г.

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Известно, что в биологических системах ферменты выполняют функцию природных катализаторов, обладающих высокой активностью, селективностью и чувствительностью, однако относительно низкой температурной и pH стабильностью. Недавнее открытие схожей каталитической активности у неорганических наноматериалов (оксидов переходных металлов и благородных металлов) позволило выделить их в новый класс функциональных материалов, называемых «нанозимы» или «нанозимы». В отличие от ферментов нанозимы обладают более низкой чувствительностью к температуре и кислотности среды, однако проигрывают природным катализаторам в активности и селективности.

Одним из наиболее интересных материалов, проявляющих энзимоподобные свойства, является нанодисперсный диоксид церия, для которого надежно установлено наличие различных типов энзимоподобной активности: пероксидазной, каталазной, оксидазной, супероксиддисмутазной, глутатионпероксидазной, галопероксидазной, фосфатазной, липо- и фосфолипเปอร์оксидазной, фосфолипазной, дезоксирибонуклеазной, фотолиазной. Необходимо отметить, что диоксид церия обладает высокой биологической активностью, способствует пролиферации клеточных культур (мезенхимальных стволовых клеток) *in vitro* и проявляет селективную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам.

Биологическая активность наноматериалов может быть связана с процессами генерации активных форм кислорода (гидроксил-радикала, супероксидного анион-радикала) по реакциям Фентона или Габера-Вейса аналогично действию гемсодержащих ферментов (цитохрома P450, оксидазы и пероксидазы). Важно подчеркнуть, что генерация или инактивация свободных радикалов наноматериалами значительно зависит от их химического состава, микроструктуры, кислотности среды и присутствия в ней различных ионов и молекул, способных адсорбироваться на поверхности наночастиц. При этом, влияние условий синтеза, состава и структуры наноматериалов на их энзимоподобную активность изучено недостаточно.

Разработка новых природоподобных материалов требует достоверного анализа их энзимоподобной активности с использованием селективных,

экспрессных и чувствительных методик. В настоящее время методы исследования и количественного анализа энзимоподобных свойств ограничены рядом колориметрических методик с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, диаммониевой соли 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты), хлорида нитросинего тетразолия и др. Необходимо подчеркнуть, что в подавляющем большинстве работ анализ энзимоподобной активности наноматериалов проводят только в кислой среде, не учитывая возможность протекания процессов растворения наночастиц с высвобождением соответствующих ионов. В качестве альтернативы может быть использован хемилюминесцентный подход, обеспечивающий проведение анализа энзимоподобной активности в нейтральной и слабощелочной среде с помощью селективных хемилюминесцентных зондов (люминол, люцигенин, L-012).

Таким образом, установление особенностей энзимоподобной и антиоксидантной активности нанокристаллического диоксида церия с использованием надежных методов количественного анализа имеет важнейшее значение для определения природы биологической активности этого наноматериала.

Целью настоящего исследования является выявление ключевых факторов, определяющих особенности взаимодействия нанокристаллического диоксида церия с активными формами кислорода (пероксид водорода, алкилпероксильные радикалы, супероксидный анион-радикал), включая размер частиц CeO_2 и химический состав их поверхности, а также температуру синтеза, с использованием хемилюминесцентного метода.

Для достижения цели исследования поставлены следующие **задачи**:

1) Разработка методик получения коллоидных растворов диоксида церия, в том числе стабилизированных биосовместимыми лигандами (лимонная кислота, L-яблочная кислота) с различным мольным соотношением лиганд: CeO_2 , с контролируемым размером частиц дисперсной фазы и химическим составом поверхности.

2) Анализ состава, структуры и свойств (химический и фазовый состав, размер частиц и степень агрегации, электрокинетический потенциал) полученных дисперсных материалов с помощью комплекса физико-химических методов.

3) Разработка воспроизводимых методик количественного анализа энзимоподобной и антиоксидантной активности нанодисперсного диоксида церия хемилюминесцентным методом, в том числе в средах различного химического состава (фосфатный буферный раствор и буферный раствор Tris-HCl).

4) Анализ влияния температуры, размера частиц и химического состава поверхности (мольное соотношение лиганд:CeO₂) на энзимоподобную и антиоксидантную активность нанокристаллического диоксида церия.

Объекты и методы исследования

В качестве основных объектов исследования были выбраны стабильные водные коллоидные растворы (золи) диоксида церия, в том числе стабилизированные низкомолекулярными лигандами – лимонной и L-яблочной кислотой. Синтетические методики, использованные для получения золь-диоксида церия, являются воспроизводимыми, позволяют направленно изменять дисперсность и химический состав поверхности частиц. Применение коллоидных растворов обеспечивает точную дозировку основного компонента при проведении анализа энзимоподобной активности наноматериалов. Анализ полученных в ходе работы образцов был осуществлен с использованием комплекса взаимодополняющих физико-химических методов: рентгенофазового анализа (РФА), динамического рассеяния света (ДРС) и измерения электрокинетического потенциала, УФ-видимой и ИК- спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Анализ энзимоподобной активности нанокристаллического диоксида церия по отношению к биологически релевантным активным формам кислорода (пероксид водорода, алкилпероксильные радикалами и супероксидный анион-радикал) был проведен с использованием высокочувствительных и селективных хемилюминесцентных (ХЛ) методик. Для полученных материалов было проведено количественное сравнение свойств с активностью природных соединений – фермента пероксидазы из корней хрена и антиоксиданта аскорбата натрия.

Научная новизна работы может быть сформулирована в виде следующих положений:

1. Установлено влияние условий получения золь-нанокристаллического диоксида церия (температура, состав реакционной смеси и мольное соотношение

лиганд: CeO_2) на размер, характер агрегации и химический состав поверхности частиц дисперсной фазы.

2. Впервые продемонстрирована зависимость энзимоподобной активности нанокристаллического диоксида церия по отношению к пероксиду водорода и супероксид-анион радикалу от температуры синтеза зольей CeO_2 .

3. Установлено существенное влияние размера частиц диоксида церия и состава среды (буферного раствора) на пероксидазоподобную активность нанокристаллического диоксида церия.

4. Впервые показана зависимость пероксидазоподобной и антиоксидантной активности малат-стабилизированных зольей диоксида церия от мольного соотношения лиганд: CeO_2 .

Практическая значимость работы

На основе хемилюминесцентного подхода предложены воспроизводимые методики анализа энзимоподобной и антиоксидантной активности нанодисперсного диоксида церия в физиологически релевантных средах. Практическая значимость результатов исследования связана с тем, что биосовместимые материалы на основе диоксида церия являются перспективными компонентами препаратов для терапии и диагностики социально-значимых заболеваний (биосенсоры, компоненты противоопухолевых препаратов, регенерирующие и антибактериальные составы). Полученные результаты станут основой для создания новых биоматериалов на основе нанокристаллического диоксида церия с учетом особенностей их взаимодействия с активными формами кислорода.

Основные положения, выносимые на публичное представление:

1. Зависимость состава, микроструктуры и физико-химических свойств нанокристаллического диоксида церия от условий получения водных зольей (температура, состав реакционной смеси и мольное соотношение лиганд: CeO_2).

2. Методики количественного анализа энзимоподобной и антиоксидантной активности материалов на основе диоксида церия хемилюминесцентным методом.

3. Зависимость энзимоподобной активности диоксида церия от температуры синтеза и термической обработки, от размера частиц дисперсной фазы

в нестабилизированных золях CeO_2 и мольного соотношения лиганд: CeO_2 в малат-стабилизированных золях диоксида церия.

Апробация результатов

Основные результаты работы представлены на XII, XIII, XIV и XV

К

о

н

ф

е

р

е

н

ц

и

Публикации

я Основные результаты диссертационной работы представлены в 5 публикациях в рецензируемых международных и российских журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, Белом списке ВАК, и в 6 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

о

Личный вклад автора

л В основу научно-квалификационной работы (диссертации) положены результаты исследований, выполненных непосредственно автором в ИОНХ РАН в 2021-2025 гг. Личный вклад автора заключается в поиске и анализе литературных данных, реализации методов синтеза наноматериалов; в исследовании полученных материалов методами физико-химического анализа и обработке экспериментальных данных; в проведении РФА и полнопрофильного анализа дифрактограмм, динамического рассеяния света, УФ-видимой спектроскопии поглощения, ИК-спектроскопии, хемилюминесцентного анализа, в подготовке публикаций (статей и докладов на конференциях) по теме работы. Ряд исследований выполнен совместно с коллегами: просвечивающая электронная микроскопия (к.х.н. К.А. Чередниченко, ВГУ нефти и газа им. Губкина), КР-спектроскопия (м.н.с. М.А. Теплоногова, м.н.с. Е.Ю. Котцов, ИОНХ РАН), хемилюминесцентный анализ супероксиддисмутазаподобной активности (к.б.н. М.М. Созарукова, ИОНХ РАН).

п

о

Достоверность

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса взаимодополняющих методов физико-химического анализа с применением оборудования ЦКП ФМИ ИОНХ РАН, воспроизводимостью и согласованностью экспериментальных данных между собой.

Объем работы и структура

Научный доклад представлен на 22 страницах, содержит 8 иллюстраций и 2 таблицы. Доклад включает в себя краткую характеристику и основное содержание научно-квалификационной работы (диссертации).

Содержание работы

Во введении дано обоснование актуальности темы работы, сформулированы цели и задачи исследования, обоснован выбор объектов и методов исследования.

1. Обзор литературы

В первой главе приведен обзор литературы, который включает пять разделов. В первом разделе указаны особенности кристаллического строения и распространенные методы получения нанокристаллического диоксида церия. Второй раздел посвящен каталитической и биокаталитической активности наноматериалов на основе диоксида церия, основным механизмам и ключевым факторам, определяющие эту активность. В третьем разделе приведены основные методы изучения каталитической активности дисперсных материалов. В четвертом разделе представлены выводы, сделанные на основании обзора литературы.

2. Экспериментальная часть

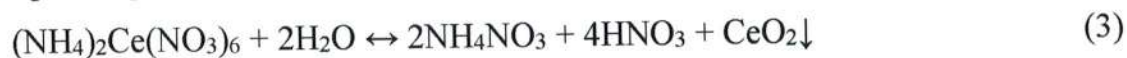
Вторая глава (экспериментальная часть) состоит из четырех разделов, в которых описаны подходы к получению нанокристаллического диоксида церия в виде водных коллоидных растворов, методы физико-химического анализа и методики хемилюминесцентного анализа энзимоподобной и антиоксидантной активности полученных материалов.

В первом разделе описан метод получения золя оксида церия(IV) низкотемпературным гидролизом 0.01 М нитрата церия(III) в водном растворе аммиака в присутствии лимонной кислоты, согласно реакциям (1-2):



Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение суток с доступом воздуха. Дальнейшую термическую обработку золя CeO_2 проводили при постоянном перемешивании при температурах 30, 40, 60, 80°C в течение 1 часа, поддерживая объем золя постоянным за счет добавления деионизованной воды.

Во втором разделе описан метод получения зольей диоксида церия гидротермальной обработкой 0.046, 0.092, 0.185, 0.277 и 0.370 М водных растворов гексанитратоцерата(IV) аммония в мягких условиях (95°C), согласно реакции (3):



В ходе предварительных экспериментов было обнаружено, что использование раствора гексанитратоцерата(IV) аммония с концентрацией 0.046 М не приводит к образованию золя CeO_2 , поскольку полученный раствор не демонстрировал эффекта Тиндаля. Осадки, полученные при нагревании 0.092-0.370 М водных растворов гексанитратоцерата(IV) аммония, отделяли от реакционной смеси центрифугированием, трижды промывали изопропиловым спиртом, повторно диспергировали в воде и кипятили в течение 2-3 часов для удаления остатков изопропилового спирта, поддерживая объем золя постоянным за счет добавления деионизованной воды.

В третьем разделе описана методика получения малат-стабилизированных коллоидных растворов диоксида церия. Золь диоксида церия (pH 2.3), полученный гидротермальной обработкой 0.185 М водного раствора гексанитратоцерата(IV) аммония, стабилизировали L-яблочной кислотой в диапазоне мольных соотношений лиганд: CeO_2 0:1–2:1. При этом образовывались сильно опалесцирующие коллоидные растворы, при добавлении к ним 3 М водного раствора аммиака до pH 7.3–7.5 золи становились прозрачными.

В четвертом разделе описаны методы физико-химического анализа, используемые для исследования полученных объектов. Описаны методики хемилюминесцентного анализа, используемого для изучения энзимоподобной и антиоксидантной активности полученных зольей диоксида церия. Анализ проводили в физиологически релевантных средах: в фосфатном буферном растворе или буферном растворе Tris-HCl с одинаковой концентрацией (100 мМ) и значением pH (7.4).

3. Результаты и их обсуждение

Третья глава состоит из четырех разделов. Первый, второй и третий раздел посвящены физико-химическим характеристикам полученных коллоидных растворов диоксида церия. Четвертый раздел включает результаты анализа энзимоподобной и антиоксидантной активности полученных наноматериалов.

3.1. Низкотемпературный гидролиз нитрата церия(III) в щелочной среде (20°C)

На первом этапе работы было изучено влияние температуры синтеза золя CeO_2 на структурные характеристики диоксида церия. Для этого была выбрана методика получения золя диоксида церия, не требующая нагрева реакционной смеси и обеспечивающая формирование нанокристаллического CeO_2 при комнатной температуре. Согласно результатам РФА, нагрев золя CeO_2 от 20°C до 80°C не оказывает значительного влияния на фазовый состав (однофазный диоксид церия (пр. гр. $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$, PDF2 00-034-0394)) и размер кристаллитов, который остается неизменным и составляет 2 нм. Результаты просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (рис. 1) позволили визуализировать в индивидуальных кристаллитах CeO_2 системы кристаллографических плоскостей с характеристическим межплоскостным расстоянием $\sim 3.1 \text{ \AA}$, которые могут быть отнесены к плоскостям (111) кристаллической решетки CeO_2 , что подтверждает данные РФА.

В спектрах поглощения в УФ-видимой области полученных золь CeO_2 наблюдается полоса поглощения в диапазоне длин волн 280–300 нм, характерная для диоксида церия, имеющего ширину запрещенной зоны $\sim 3.3 \text{ эВ}$. При нагревании золь CeO_2 положение полосы поглощения не меняется, что также указывает на постоянство размера частиц диоксида церия.

По данным динамического рассеяния света, увеличение температуры синтеза золя CeO_2 приводит к уменьшению гидродинамического диаметра индивидуальных частиц CeO_2 в два раза (от 8 до 4 нм). При этом размер агрегатов увеличивается практически в два раза (от 26 до 56 нм). Наблюдаемое уменьшение доли

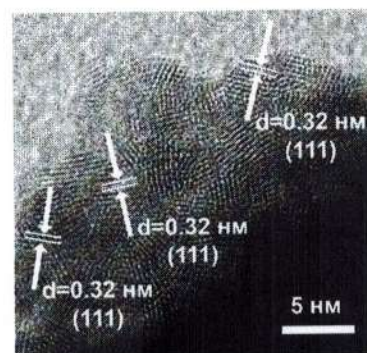


Рис. 1. Микрофотография ПЭМ наночастиц CeO_2 золя диоксида церия, полученного при 20°C.

индивидуальных частиц на 13% позволяет предположить, что увеличение размера агрегатов происходит за счет индивидуальных частиц CeO_2 . Абсолютное значение ζ -потенциала золей диоксида церия снижается с увеличением температуры синтеза от -35 ± 3 мВ (при 20°C) до -19 ± 2 мВ (при 80°C), что свидетельствует о снижении степени гидроксильности поверхности частиц CeO_2 .

3.2. Гидротермальный синтез в мягких условиях (95°C)

На втором этапе работы было изучено влияние концентрации реагентов в реакционной смеси на структуру нанокристаллического диоксида церия. Поскольку CeO_2 обладает низкой растворимостью в водной среде ($\lg \text{IP} -59.3 \pm 0.3$ при $\text{pH} > 6$ [1]), получение золей диоксида церия с различным размером частиц представляется сложной синтетической задачей. Для её решения использовали подход, основанный на термической обработке водных растворов гексанитратоцерата(IV) аммония, позволяющий получать частицы CeO_2 ультрамалого размера (табл. 1).

Таблица 1. Условия синтеза и основные параметры полученных золей CeO_2 .

Образец	$(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$, М	$\text{C}(\text{CeO}_2)$, М (г/л)	Выход, %	$D_{\text{ОКР}}$, нм	$D_{\text{ДРС}}$, нм	ζ -потенциал, мВ
$\text{CeO}_2_{2.5\text{нм}}$	0.092	0.09 (15.6)	85	2.5 ± 0.4	10	$+29.9 \pm 0.3$
$\text{CeO}_2_{2.8\text{нм}}$	0.185	0.15 (26.1)	89	2.8 ± 0.3	20	$+31.8 \pm 0.4$
$\text{CeO}_2_{3.9\text{нм}}$	0.277	0.15 (26.2)	90	3.9 ± 0.3	40	$+34.4 \pm 0.6$
$\text{CeO}_2_{5.1\text{нм}}$	0.370	0.15 (25.9)	86	5.1 ± 0.4	50	$+38.2 \pm 0.7$

По данным РФА, фазовый состав дисперсной фазы золей отвечает однофазному диоксиду церия (пр. гр. $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$, PDF2 00-034-0394). Ширина рефлексов уменьшается с увеличением концентрации $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$, что указывает на увеличение размера кристаллитов CeO_2 (рис. 2). Согласно расчетам по формуле Шеррера, размер кристаллитов диоксида церия увеличивается двукратно от 2.5 до 5.1 нм (табл. 1). Принимая во внимание низкую растворимость CeO_2 , наблюдаемое увеличение размера частиц вероятно связано с реализацией неклассического механизма роста частиц. Результаты ПЭМ высокого разрешения (рис. 1) позволили визуализировать в индивидуальных кристаллитах CeO_2 системы кристаллографических плоскостей с характеристическим межплоскостным расстоянием ~ 1.9 Å, которые могут быть отнесены к плоскостям (220) кристаллической решетки CeO_2 , что подтверждает данные РФА.

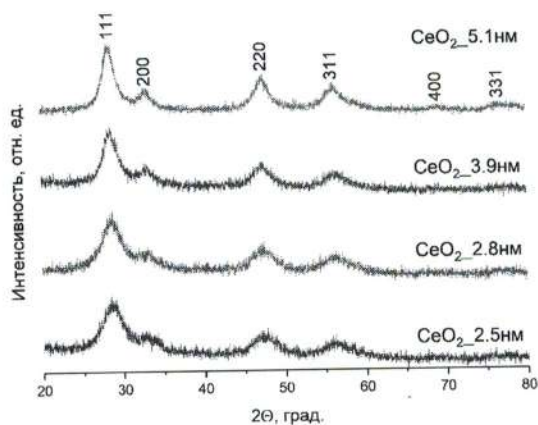


Рис. 2. Дифрактограммы порошков CeO_2 , полученных высушиванием золь диоксида церия, полученных из водных растворов $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$.

По данным динамического рассеяния света, с увеличением концентрации исходного раствора $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ меняется характер агрегации частиц в золях, что выражается в переходе от бимодального распределения частиц по размерам к мономодальному. При этом размер агрегатов также увеличивается от 10 до 50 нм. Полученные золи демонстрируют стабильность в течение как минимум трех месяцев за счет высокого значения ζ -потенциала частиц (табл. 1).

Таким образом, изменение концентрации водного раствора гексанитратоцерата(IV) аммония позволяет получать стабильные золи диоксида церия с заданным размером частиц дисперсной фазы.

3.3. Малат-стабилизированные золи диоксида церия

На третьем этапе работы было установлено влияние мольного соотношения лиганд: CeO_2 (0:1–2:1) на состав и структуру нанокристаллического диоксида церия, стабилизированного L-яблочной кислотой. По данным РФА, дисперсная фаза полученных золь представляет собой однофазный диоксид церия (пр. гр. $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$, PDF2 00-034-0394). Размеры областей когерентного рассеяния порошков CeO_2 , оцененные при проведении полнопрофильного анализа дифрактограмм, находятся в

В КР-спектрах всех полученных образцов диоксида церия (рис. 3) наблюдается интенсивный пик при 450 см^{-1} , отвечающий симметричным валентным колебаниям $\text{Ce}-\text{O}$. Уменьшение ширины пика от 54 до 47 см^{-1} согласуется с увеличением размера кристаллитов CeO_2 .

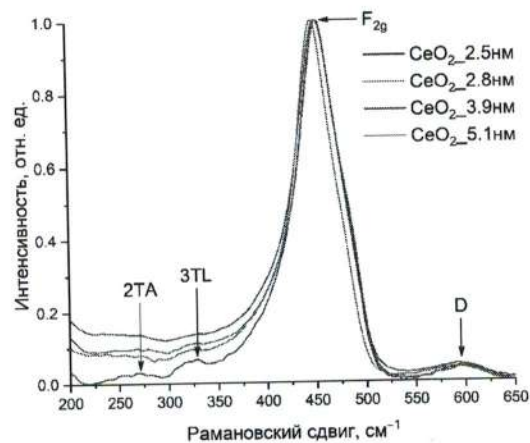


Рис. 3. КР-спектры порошков CeO_2 , полученных высушиванием золь диоксида церия, полученных из водных растворов $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$.

диапазоне 3.0–4.5 нм. Отметим, что стабилизация зольей CeO_2 L-яблочной кислотой не оказала влияния на фазовый состав дисперсной фазы. Результаты ПЭМ высокого разрешения позволили визуализировать в индивидуальных кристаллитах CeO_2 системы кристаллографических плоскостей с характеристическим межплоскостным расстоянием $\sim 3.1 \text{ \AA}$, которые могут быть отнесены к плоскостям (111) кристаллической решетки CeO_2 , что согласуется с данными РФА.

По результатам ИК-спектроскопии, образование карбоксилатных комплексов на поверхности нанокристаллического диоксида церия подтверждается отсутствием полос поглощения валентных (1690 см^{-1}) и деформационных (758 см^{-1}) колебаний связи $\text{C}=\text{O}$, характерных для индивидуальной яблочной кислоты, и наличием полос поглощения, отвечающих асимметричным ($1610\text{--}1550 \text{ см}^{-1}$), симметричным ($1450\text{--}1400 \text{ см}^{-1}$) валентным колебаниям $\nu(\text{COO}^-)$ и ножничным колебаниям $\sigma(\text{COO}^-)$. Аналогичные полосы поглощения, характерные для монозамещенных солей яблочной кислоты, наблюдаются в ИК-спектре малата аммония. Отметим, что в ИК-спектрах малат-стабилизированного диоксида церия положение полосы поглощения ножничных колебаний карбоксильной группы (830 см^{-1}) заметно смещено относительно ее положения в ИК-спектре малата аммония (790 см^{-1}).

По данным динамического рассеяния света, нестабилизированный золь диоксида церия характеризуется мономодальным распределением агрегатов по размерам со средним гидродинамическим диаметром 15 нм. При добавлении золя CeO_2 (рН 2.0) по каплям к водному раствору L-яблочной кислоты (рН 1.5–2.2) образовывались сильно опалесцирующие (почти непрозрачные) светло-желтые коллоидные растворы (рН ~ 1.3) с размером агрегатов CeO_2 более 100 нм. Необходимо отметить, что коллоидный раствор, содержащий CeO_2 и яблочную кислоту, имеет более низкий рН, чем его индивидуальные компоненты (чистый золь CeO_2 и растворы яблочной кислоты), что подтверждает химическое взаимодействие между малат-ионами и поверхностью CeO_2 . Для получения зольей диоксида церия с высокой седиментационной устойчивостью, стабилизированных L-яблочной кислотой, рН смесей довели до 7.4 с помощью водного раствора аммиака.

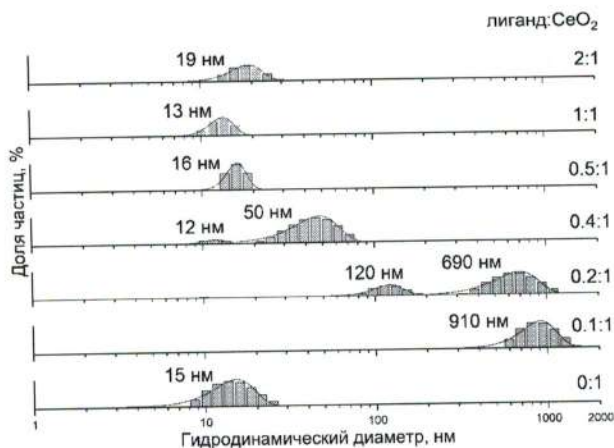


Рис. 4. Распределения частиц CeO_2 по размерам в золях диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой в мольных соотношениях лиганд: $\text{CeO}_2 = 0.1\text{--}2:1$.

При низком мольном соотношении лиганд: CeO_2 0.1:1 и 0.2:1 золи диоксида церия сохраняли тенденцию к агрегации частиц (рис. 4), что соответствует низким абсолютным значениям ζ -потенциала (-7 мВ и -13 мВ). Напротив, коллоидные растворы, стабилизированные малат-анионом при мольном соотношении лиганд: CeO_2 0.4:1–1:1, были прозрачными, что указывало на хорошую коллоидную стабильность зольей. Значения ζ -потенциала для этих

зольей находятся в диапазоне от -15 до -17 мВ, что подтверждает предположение о стабилизации поверхности частиц CeO_2 малат-анионами. Из рис. 4 видно, что при увеличении мольного соотношения лиганд: CeO_2 от 0.1:1 до 0.5:1 размер агрегатов в золях CeO_2 уменьшился от 910 нм до 16 нм. В золях диоксида церия, стабилизированных при мольных соотношениях лиганд: CeO_2 0.5:1–2:1, степень агрегации отличалась незначительно, и средний размер агрегатов составил ~ 15 нм. Отметим, что резкое изменение степени агрегации частиц CeO_2 происходило в диапазоне мольных соотношений лиганд: CeO_2 0.2:1–0.4:1. Наиболее вероятно, степень агрегации частиц зольей диоксида церия зависит от покрытия поверхности частиц CeO_2 яблочной кислотой. Оценка мольного соотношения лиганд: CeO_2 , необходимого для обеспечения полного покрытия частиц, выполненная из геометрических соображений в приближении жестких сфер (формула 4), привела к значению 0.18:1 (табл. 2), что согласуется с данными динамического рассеяния света (рис. 4).

$$\begin{aligned} \text{лиганд:CeO}_2 &= \frac{C_{\text{лиганд}}}{C_{\text{CeO}_2}} = \frac{N_{\text{лиганд}}}{N_A \cdot C_{\text{CeO}_2}} = \frac{S_{\text{частица}} \cdot N_{\text{частица}}}{S_{\text{лиганд}} \cdot N_A \cdot C_{\text{CeO}_2}} = \\ &= \frac{\pi \cdot D_{\text{XRD}}^2 \cdot C_{\text{CeO}_2} \cdot a^3 \cdot N_A \cdot 6}{\left(\frac{\text{TPSA}}{2}\right) \cdot N_A \cdot C_{\text{CeO}_2} \cdot 4 \cdot \pi \cdot D_{\text{XRD}}^3} = \frac{3 \cdot a^3}{\text{TPSA} \cdot D_{\text{XRD}}} \end{aligned} \quad (4)$$

Таблица 2. Оценка мольного соотношения лиганд:CeO₂, необходимого для обеспечения полного покрытия поверхности частиц с диаметром 2.8 нм.

$D_{XRD}, \text{\AA}$	$a, \text{\AA}$	TPSA*, $\text{\AA}^2$	лиганд:CeO ₂
28	5.441	94.8	0.18:1

*Топологическая площадь полярной поверхности (Topological Polar Surface Area (TPSA)) для L-яблочной кислоты составляет 94.8 $\text{\AA}^2$ [2].

При доведении pH нестабилизированного золя диоксида церия (pH 2.0) до нейтрального (pH~7) наблюдается потеря седиментационной устойчивости и выпадение желтого осадка. Таким образом, стабилизация коллоидного раствора CeO₂ малат-анионом, аналогично стабилизации цитрат- или оксалат-анионами позволила расширить диапазон pH стабильности золя [3].

3.4. Хемилюминесцентный анализ энзимоподобной активности полученных материалов

Анализ энзимоподобной активности нанокристаллического диоксида церия был проведен с использованием высокочувствительных и селективных хемилюминесцентных методик оценки взаимодействия полученных материалов с биологически значимыми активными формами кислорода – пероксидом водорода (пероксидазо- или каталазоподобная активность), супероксид-анион радикалом (супероксиддисмутазоподобная (СОД)) и алкилпероксильными радикалами (про- и антиоксидантная активность). Для корректного изучения влияния состава и микроструктуры материалов на их энзимоподобную активность были установлены условия (состав реакционной смеси, концентрации реагентов и температура), в которых удалось получить наиболее достоверный аналитический сигнал и воспроизводимость результатов. По результатам предварительных исследований, проведенных при термостатировании реакционных смесей при 20, 30 и 36°C, в качестве предпочтительной была выбрана температура проведения анализа энзимоподобной активности 36°C.

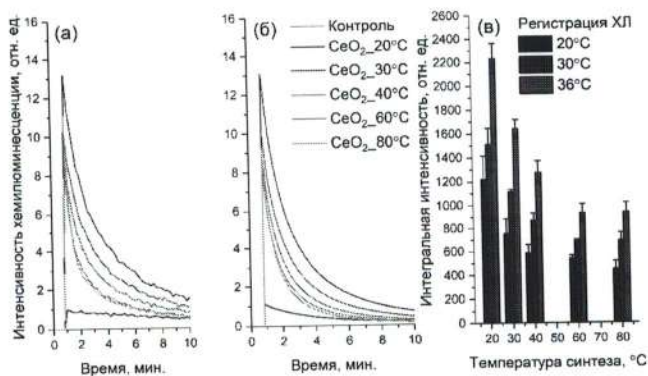


Рис. 5. Кривые хемилюминесценции (ХЛ) продукта окисления люминола (50 мкМ) пероксидом водорода (10 мМ) в фосфатном буферном растворе в присутствии водных золей диоксида церия (60 мкМ), полученных при температурах 20-80°C: экспериментальные при температуре анализа 36°C (а) и теоретические (б). Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции от температуры синтеза золей CeO_2 и от температуры анализа их энзимоподобной активности (в).

раза с увеличением температуры синтеза золей от 20 до 80°C.

Математическое моделирование кинетики окисления люминола в присутствии диоксида церия (рис. 5б) позволило оценить константы скорости (k) реакций разложения пероксида водорода (5), взаимодействия люминола с гидроксил-радикалом (6) и заключительной реакции хемилюминесценции (7).



С увеличением температуры синтеза золя диоксида церия от 20 до 80°C константа взаимодействия CeO_2 с пероксидом водорода k_5 снижается в 1.5 раза (с $9.01 \cdot 10^4$ до $5.90 \cdot 10^4$ мкМ/мин при 20°C), что согласуется с результатами количественного анализа (рис. 5в). Полученные результаты соответствуют тому, что, согласно квантово-химическим расчетам, адсорбция H_2O_2 на

гидроксильной поверхности диоксида церия энергетически более выгодна, чем на «чистой» поверхности CeO_2 , за счет формирования водородной связи между H_2O_2 и гидроксильной группой [4].

Зависимость энзимоподобной активности диоксида церия от температуры синтеза была также исследована в реакции люцигенина с первичной активной формой кислорода – супероксид-анион радикалом. Подавление хемилюминесценции люцигенина в присутствии золь CeO_2 указывает на СОД-подобную активность нанокристаллического диоксида церия (рис. 6а). Количественный анализ (расчет степени подавления ХЛ, $\% = \frac{S_0 - S}{S_0} \cdot 100\%$, где S – интегральная интенсивность ХЛ) показал, что супероксиддисмутазаподобная активность диоксида церия линейно увеличивается в 1.4 раза с ростом температуры. Увеличение температуры синтеза золь CeO_2 приводит к

разнонаправленному изменению пероксидазо- и супероксиддисмутазаподобной активности диоксида церия. Такое различие может быть связано с тем, что грани частиц диоксида церия, доступные для адсорбции субстрата и свободных радикалов, обладают различной реакционной способностью по отношению к активным формам кислорода. В частности, поверхности (111) и (110) имеют большее сродство к супероксид-анион радикалу, чем поверхность (100) [5,6]. При уменьшении степени гидроксильности частиц CeO_2 поверхность (111) становится более доступной для супероксид-анион радикала, что приводит к более выраженной супероксиддисмутазаподобной активности (рис. 6б).

Таким образом, показано, что энзимоподобная активность нанокристаллического диоксида церия крайне чувствительна даже к относительно

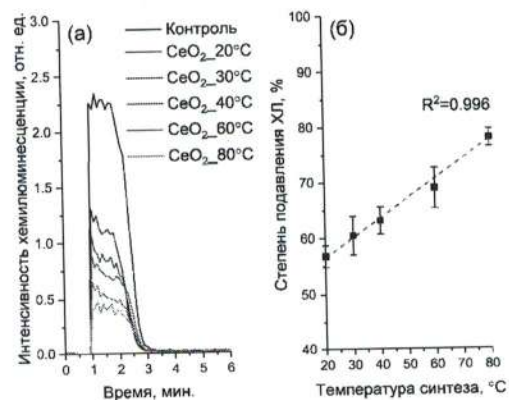


Рис. 6. Кинетические кривые хемилюминесценции (ХЛ) люцигенина в присутствии ксантина, ксантиноксидазы и золь CeO_2 (60 мкМ) в фосфатном буферном растворе при 36°C (а). Зависимость степени подавления хемилюминесценции люцигенина в присутствии золь CeO_2 от температуры синтеза (б).

малым изменениям температуры синтеза золей CeO_2 , что позволяет количественно регулировать его пероксидазо- и супероксиддисмутазоподобные свойства.

На втором этапе работы было проанализировано влияние размера частиц нанокристаллического диоксида церия на его энзимоподобную активность. Результаты хемилюминесцентного анализа показали, что все золи диоксида церия, полученные путем гидротермальной обработки водных растворов гексанитратоцерата(IV) аммония, проявляют пероксидазоподобную активность. Установлено, что с двукратным увеличением размера кристаллитов диоксида церия константа k_5 взаимодействия CeO_2 с пероксидом водорода (5) увеличивается от $8.9 \cdot 10^4$ до $1.0 \cdot 10^5$ мкМ/мин, а константа k_7 хемилюминесцентной реакции (7) увеличивается в 1.2 раза от $4.7 \cdot 10^{-5}$ до $5.5 \cdot 10^{-5}$ мкМ/мин (в фосфатном буферном растворе). Количественный анализ энзимоподобной активности полученных материалов показал, что с увеличением размера частиц CeO_2 пероксидазоподобная активность диоксида церия увеличивается в два раза в фосфатном буферном растворе.

Для того, чтобы исключить влияние фосфат-анионов на пероксидазоподобную активность диоксида церия, был проведен анализ энзимоподобной активности в буферном растворе Tris-HCl. Вид кривых хемилюминесценции люминола в Tris-HCl, содержащем диоксид церия, практически не отличался от кривых, зарегистрированных в фосфатном буферном растворе. Математическое моделирование показало, что значения k_7 в Tris-HCl были на порядок меньше, чем в фосфатном буферном растворе, и уменьшались от $2 \cdot 10^{-6}$ до $1.5 \cdot 10^{-6}$ мкМ/мин с увеличением размера частиц. В то же время, в растворе Tris-HCl значения константы взаимодействия CeO_2 с пероксидом водорода k_5 оказались на три порядка выше, чем в фосфатном буфере. Последнее наблюдение подтверждает критическое влияние фосфат-ионов на реакционную способность частиц CeO_2 . В отсутствие фосфат-ионов скорость взаимодействия CeO_2 с пероксидом водорода значительно выше. Количественный анализ энзимоподобной активности диоксида церия показал, что с двукратным увеличением размера частиц CeO_2 его пероксидазоподобная активность снижается в 1.7 раза в буферном растворе Tris-HCl.

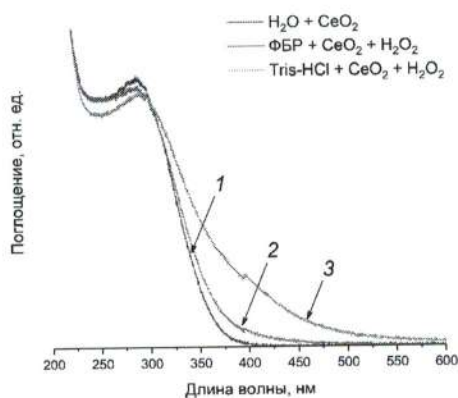


Рис. 7. Спектры поглощения в УФ-видимой области золей диоксида церия в воде (1), фосфатном буферном растворе (2) и буферном растворе Tris-HCl (3) после добавления пероксида водорода (10 мМ).

буферном растворе остался бесцветным после добавления H_2O_2 . В этом случае красный сдвиг полосы поглощения Ce^{4+} менее выражен, чем в Tris-HCl. Полученные результаты указывают на разницу в характере взаимодействия диоксида церия с пероксидом водорода в средах различного химического состава: фосфатном буферном растворе и буферном растворе Tris-HCl.

На третьем этапе работы было установлено влияние мольного соотношения лиганд: CeO_2 (0:1–2:1) на энзимоподобную активность диоксида церия, стабилизированного L-яблочной кислотой. Анализ проводили в буферном растворе Tris-HCl, чтобы избежать влияния фосфат-анионов на стабилизацию частиц CeO_2 яблочной кислотой. С помощью хемилюминесцентного анализа было установлено, что малат-стабилизированные золи CeO_2 обладают пероксидазоподобной активностью. Показано, что стабилизация золей диоксида церия L-яблочной кислотой приводит к снижению скорости реакции (7) в 3 раза, что соответствует более медленному затуханию хемилюминесценции реакционных смесей, содержащих малат-стабилизированные золи по сравнению со смесями, содержащими нестабилизированные коллоидные растворы CeO_2 .

По данным УФ-видимой спектроскопии (рис. 7), при добавлении пероксида водорода в золь CeO_2 в буферном растворе Tris-HCl наблюдается красный сдвиг полосы поглощения Ce^{4+} , который можно отнести к образованию пероксокомплексов на поверхности

диоксида церия. Возникновение плеча в спектре поглощения диоксида церия согласуется с тем, что коллоидный раствор CeO_2 приобретает желтый цвет, характерный для пероксо- и гидропероксокомплексов церия. Напротив, раствор диоксида церия в фосфатном

Количественный анализ
энзимоподобной активности полученных
материалов показал, что
пероксидазоподобная активность диоксида
церия уменьшается до 2 раз при увеличении
мольного соотношения лиганд: CeO_2 от 0.5:1
до 2:1. Сравнительный анализ активности
пероксидазы из корней хрена и CeO_2
показал, что активность диоксида церия,
стабилизированного при мольном
соотношении лиганд: CeO_2 0.2:1, в 12 раз
меньше, чем активность природного
фермента.

Установлено, что
нестабилизированный золь CeO_2 проявляет
прооксидантную активность по отношению
к алкилпероксильным радикалам,
образующимся при термоллизе 2,2'-азобис(2-
амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП)

при 36°C (рис. 8а). Количественный сравнительный анализ антиоксидантной
активности полученных золь диоксида церия был проведен путем определения
значений антиоксидантной или прооксидантной активности (емкости), которые
рассчитывали интегрированием области ингибирования хемилюминесценции на
кинетических кривых. Как видно из рис. 8б, антиоксидантная способность диоксида
церия возрастала с увеличением мольного соотношения лиганд: CeO_2 и достигла
почти постоянного уровня, когда соотношение лиганд: CeO_2 составляло 0.4:1. Из рис.
8 следует, что нестабилизированный золь CeO_2 , а также золь CeO_2 ,
стабилизированный яблочной кислотой при соотношении лиганд: CeO_2 0.1:1,
проявляют прооксидантные свойства, в то время как при более высоких
концентрациях лиганда, при соотношении лиганд: CeO_2 0.2:1 и выше, золи
проявляют антиоксидантные свойства. Этот результат согласуется с полным
покрытием частиц CeO_2 лигандами и изменением степени агрегации при мольном

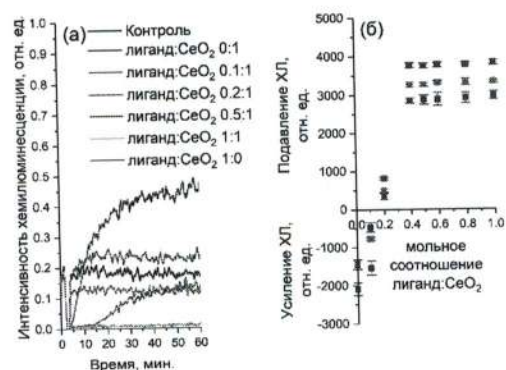


Рис. 8. Кривые
хемилюминесценции люминола в
фосфатном буферном растворе,
содержащем АБАП и водные золи
диоксида церия (1.1 мМ) (а).
Подавление или усиление
хемилюминесценции люминола в
присутствии малат-
стабилизированных золь диоксида
церия при различных мольных
соотношениях лиганд: CeO_2 (б).

соотношении 0.18:1 (рис. 4). Таким образом, антиоксидантная активность золя диоксида церия возрастает с увеличением содержания L-яблочной кислоты на поверхности частиц CeO_2 .

Сравнительный анализ антиоксидантных свойств диоксида церия и антиоксиданта аскорбата натрия показал, что антиоксидантная емкость 1 мМ малат-стабилизированного золя CeO_2 соответствует 0.012 ± 0.001 мМ аскорбата натрия. Таким образом, антиоксидантная активность диоксида церия, стабилизированного при мольном соотношении лиганд: CeO_2 0.2:1, оказалась в 80 раз ниже, чем активность аскорбата натрия.

4. Выводы

1. Впервые показано, что изменение концентрации гексанитратоцерата(IV) аммония в диапазоне позволяет направленно менять размер и степень агрегации частиц в водных золях диоксида церия. Определены условия получения (концентрация $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ от 0.092 до 0.37 М) стабильных коллоидных растворов диоксида церия с размером кристаллитов CeO_2 от 2.5 до 5.1 нм и размером агрегатов частиц от 10 до 50 нм.

2. Показано, что изменение мольного соотношения лиганд: CeO_2 в золях диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой, приводит к изменению степени агрегации частиц CeO_2 . Установлено, что монодисперсное распределение частиц по размерам (средний гидродинамический диаметр ~16 нм) достигается в диапазоне от мольных соотношений лиганд: CeO_2 0.2:1–0.4:1, что соответствует оценке мольного соотношения лиганд: CeO_2 , необходимого для обеспечения полного покрытия поверхности частиц.

3. Впервые показана зависимость энзимоподобной активности CeO_2 от температуры синтеза коллоидных растворов диоксида церия. Увеличение температуры синтеза золь CeO_2 в диапазоне 20–80°C приводит к уменьшению пероксидазоподобной активности диоксида церия примерно в 2.5 раза и увеличению супероксиддисмутазоподобной активности в 1.4 раза.

4. Анализ пероксидазоподобной активности полученных материалов показал, что особенности взаимодействия диоксида церия с активными формами кислорода определяются химическим составом среды (буферного раствора).

Установлено, что значения константы взаимодействия CeO_2 с пероксидом водорода в буферном растворе Tris-HCl на три порядка выше, чем в фосфатном буфере.

5. Впервые показано, что изменение мольного соотношения лиганд: CeO_2 в золях CeO_2 , стабилизированных L-яблочной кислотой, позволяет количественно регулировать энзимоподобную активность диоксида церия. С увеличением содержания малат-аниона в золях диоксида церия (выше мольного соотношения лиганд: CeO_2 0.2:1, соответствующего полному покрытию поверхности частиц CeO_2 лигандом) пероксидазоподобная активность снижается до 2 раз, а антиоксидантная – увеличивается в 6 раз.

Список публикаций аспиранта, в которых отражены основные научные результаты работы:

1. **Филиппова А.Д.**, Созарукова М.М., Баранчиков А.Е., Егорова А.А., Чередниченко К.А., Иванов В.К. (2022). Низкотемпературная инактивация ферментоподобной активности зольей нанокристаллического CeO_2 . *Журнал неорганической химии*, 67(12), 1948-1955.
2. **Filippova A.D.**, Sozarukova M.M., Baranchikov A.E., Kottsov S.Yu., Cherednichenko K.A., Ivanov V.K. (2023). Peroxidase-like activity of CeO_2 nanozymes: particle size and chemical environment matter. *Molecules*, 28(9), 3811.
3. Baranchikov A.E., Sozarukova M.M., Mikheev I.V., Egorova A.A., Proskurnina E.V., Poimenova I.A., Krasnova S.A., **Filippova A.D.**, Ivanov V.K. (2023). Biocompatible ligands modulate nanozyme activity of CeO_2 nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 47(44), 20388-20404.
4. **Филиппова А.Д.**, Баранчиков А.Е., Иванов В.К. (2023). Ферментоподобная активность коллоидных растворов диоксида церия, стабилизированных L-яблочной кислотой. *Коллоидный журнал*, 85(5), 782-794.
5. **Filippova A.D.**, Baranchikov A.E., Teplonogova M.A., Savintseva I.V., Popov A.L., Ivanov V.K. (2024). Ligand-to-Metal Ratio Governs Radical-Scavenging Ability of Malate-Stabilised Ceria Nanoparticles. *Nanomaterials*, 14(23), 1908.

Цитируемая литература

1. *Plakhova T. V., Romanchuk A.Y., Yakunin S.N., et al.* Solubility of Nanocrystalline Cerium Dioxide: Experimental Data and Thermodynamic Modeling // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016. V. 120. № 39. P. 22615–22626.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05650>.
2. Malic Acid [Electronic resource]. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malic-Acid#section=Chemical-and-Physical-Properties&fullscreen=true>.
3. *Shcherbakov A.B., Teplonogova M.A., Ivanova O.S., et al.* Facile Method for Fabrication of Surfactant-Free Concentrated CeO₂ Sols // *Materials Research Express*. 2017. V. 4. № 5. P. 055008. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa6e9a>.
4. *Brugnoli L., Urata S., Pedone A.* H₂O₂ Adsorption and Dissociation on Various CeO₂ (111) Surface Models: A First-Principles Study // *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2022. V. 34. № 16. P. 164006. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/ac5278>.
5. *Yang Y., Mao Z., Huang W., et al.* Redox Enzyme-Mimicking Activities of CeO₂ Nanostructures: Intrinsic Influence of Exposed Facets // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 35344. <https://doi.org/10.1038/srep35344>.
6. *Yuan B., Tan Z., Guo Q., et al.* Regulating the H₂O₂ Activation Pathway on a Well-Defined CeO₂ Nanozyme Allows the Entire Steering of Its Specificity between Associated Enzymatic Reactions // *ACS Nano*. 2023. V. 17. № 17. P. 17383–17393. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c05409>.