Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

На правах рукописи

Мясников Иван Юрьевич

Изучение свойств и поведения детонационных наноалмазов, модифицированных биологически-активными веществами, с применением трития

02.00.14 — «Радиохимия»

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук, доцент
Бадун Геннадий Александрович

Москва — 2019

Оглавление

Стр.

Введение 6

Глава 1. Обзор литературы 11
1.1 Общая характеристика наноалмазов детонационного синтеза . . . 11
1.2 Методы детекции и визуализации ДН в биологических объектах . 16
1.2.1 Метод радиоактивных индикаторов 19
1.3 Способы модификации свойств ДН 24
1.3.1 Диспергирование и стабилизация коллоидных растворов . 24
1.3.2 Химическая модификация поверхности 26

Глава 2. Экспериментальная часть 30
2.1 Реактивы и оборудование 30
2.1.1 Наноалмазы детонационного синтеза 30
2.1.2 Вещества для модификации ДН 31
2.2 Методы 34
2.2.1 Жидкостная сцинтилляционная спектрометрия 34
2.2.2 Спектрофотометрия 35
2.2.3 Метод динамического рассеяния света и определение электрокинетического потенциала 36
2.2.4 Инфракрасная спектроскопия 36
2.2.5 Тонкослойная хроматография 38
2.2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография 39
2.2.7 Эксклюзионная хроматография 39
2.2.8 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой 40
2.2.9 Просвечивающая электронная микроскопия 40
2.3 Синтез меченных тритием соединений 41
2.3.1 Общая методика 42
2.3.2 Наноалмазы детонационного синтеза 43
2.3.3 Определение концентрации меченных тритием наноалмазов 44
2.3.4 Производные пантотеновой кислоты 46

Стр.

2.3.5 Бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний-хлорид . . . 46
2.3.6 Плюроник P123 . . . 47
2.3.7 Олеиламин . . . 47
2.3.8 Гуминовые вещества . . . 48
2.4 Адсорбционные эксперименты . . . 49
2.4.1 Производные пантотеновой кислоты . . . 50
2.4.2 Бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний хлорид моногидрат . . . 50
2.4.3 Плюроник P123 . . . 52
2.4.4 Олеиламин . . . 52
2.4.5 Гуминовые вещества . . . 52
2.4.6 Коадсорбция плюроника P123 и мирамистина . . . 53
2.4.7 Коадсорбция гуминовых кислот угля и мирамистина . . . 53
2.5 Изучение поведения наноалмазов в системах, моделирующих биологические объекты . . . 55
2.5.1 Исследование распределения наноалмазов между водной и органической фазами . . . 55
2.5.2 Исследование распределения наноалмазов в композитных пленках . . . 55
2.5.3 Поглощение меченного тритием наноалмаза высшими растениями . . . 56
2.5.4 Изучение токсичности наноалмазов и их композитов с мирамистином на клеточной культуре аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 . . . 64
2.5.5 Изучение токсичности наноалмазов и их композитов с мирамистином на колонии патогенного гриба *Aspergilus niger* Tiegh. . . . 66

Глава 3. Результаты и их обсуждение . . . 67
3.1 Получение меченных тритием соединений . . . 67
3.1.1 Методика определения концентрации меченных тритием ДН . . . 67

Стр.

3.1.2 Реакция газообразного трития с наноалмазами детонационного синтеза 69
3.1.3 Получение меченных тритием органических соединений . 81
3.1.4 **Заключение по разделу 3.1** 83
3.2 Изучение адсорбционных характеристик детонационных наноалмазов 85
3.2.1 Адсорбция производных пантотеновой кислоты 85
3.2.2 Адсорбция гуминовых веществ 91
3.2.3 Адсорбция мирамистина 93
3.2.4 Адсорбция плюроника P123 95
3.2.5 Адсорбция олеиламина 96
3.2.6 Коадсорбция гуминовых кислот угля и мирамистина . . . 97
3.2.7 Коадсорбция плюроника P123 и мирамистина 101
3.2.8 **Заключение по разделу 3.2** 102
3.3 Изучение распределения ДН в системах вода/органическая жидкость и композитных пленках 104
3.3.1 Исследование распределения наноалмазов между водной и органической фазами 104
3.3.2 Исследование распределения наноалмазов в композитных пленках 106
3.3.3 **Заключение по разделу 3.3** 109
3.4 Влияние гуминовых веществ на поглощение наноалмазов растениями 110
3.4.1 Свойства суспензии [^{3}H]ДН до и после контакта с растениями 110
3.4.2 Определение содержания ДН в растениях методом авторадиографии 111
3.4.3 Определение содержания ДН в растениях по радиоактивности растворов, полученных разложением частей растений в азотной кислоте 112
3.4.4 Фитотоксичность ДН 118
3.4.5 **Заключение по разделу 3.4** 122

Стр.

3.5 Изучение токсичности наноалмазов и их композитов с мирамистином . . . 123
3.5.1 Влияние на клеточную культуру MCF-7 . . . 123
3.5.2 Влияние на рост колонии *Aspergilus niger* . . . 126
3.5.3 **Заключение по разделу 3.5** . . . 129

Заключение . . . 130

Выводы . . . 132

Список сокращений и условных обозначений . . . 134

Список литературы . . . 136

Список рисунков . . . 157

Список таблиц . . . 162

Приложение А. ИК-спектры образцов УДА-ТАН и ТАН-О . . . 164

Приложение Б. Условия проведения измерений ИСП-АЭС . . . 165

Приложение В. Коэффициенты уравнения 2.1 для спектров поглощения гидрозолей наноалмазов в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм . . . 166

Приложение Г. Радиохроматограммы меченных тритием соединений . . . 169

Приложение Д. Микрофотографии ПЭМ и распределение первичных частиц ДН по размеру . . . 171

Приложение Е. Авторадиограммы композитных пленок . . . 174

Введение

Благодаря уникальным физико-химическим свойствам и низкой стоимости производства, детонационные наноалмазы (ДН) обладают высоким потенциалом применения в различных областях, в том числе в качестве компонента покрытий, входят в состав смазочных материалов и масел. С ростом объемов производства увеличивается необходимость исследования последствий возможного попадания материала в окружающую среду. Потенциальная токсичность вещества связана со способностью усвоения его живыми организмами, распределением по органам и тканям, влиянием на протекающие биологические процессы. При моделировании поведения ДН в природе и их взаимодействия с растениями необходимо учитывать влияние природных органических соединений, основным компонентом которых являются гуминовые вещества.

С другой стороны, продолжается рост интереса к созданию на основе углеродных наноматериалов систем доставки биологически активных веществ. Применение таких систем направлено на снижение токсических эффектов, уменьшение дозировки и увеличение эффективности их применения. При изучении возможного применения ДН в медицинской и биохимической практике, помимо детального анализа сорбционных процессов, необходима возможность продолжительного исследования распределения материала по организму.

Изучение локализации ДН в системах, содержащих области различной полярности, необходимо для интерпретации данных о взаимодействии ДН с клеточными мембранами. Для таких исследований в качестве модельных служат системы, содержащие полярную и неполярную жидкости. В последние годы проведен ряд исследований, посвященных модификации поверхности ДН с целью получения стабильных дисперсных систем в различных средах, информация о распределении ДН между водной и органической фазами отсутствует.

Радионуклидные методы обладают огромными возможностями в исследовании поведения веществ в живых организмах и модельных системах. Применение радиоактивных индикаторов позволяет с высокой точностью и достоверностью определить содержание вещества в многокомпонентных системах, в том числе в живых организмах, а также в отдельных его органах. Тритий является удобным, недорогим и наиболее безопасным в работе радионуклидом,

поэтому получение меченных тритием ДН и их применение в качестве радиоактивных индикаторов представляется чрезвычайно перспективным. На данный момент известно два способа получения меченных тритием ДН, первый основан на применении микроволновой плазмы трития, во втором осуществляют генерацию реакционных атомов трития диссоциацией молекул трития на нагретой вольфрамовой проволоке (метод термической активации). Метод термической активации трития представляется более удобным, и согласно литературным данным, является более эффективным, однако подробный анализ влияния условий проведения реакции на удельную радиоактивность меченого продукта не проводился.

Цель настоящей работы – определить влияние биологически-активных веществ на свойства детонационных наноалмазов в модельных системах для прогнозирования их поведения в биологических объектах.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Определить влияние предварительной подготовки ДН (химический состав поверхности, гидродинамический диаметр агрегатов) на величину удельной радиоактивности.
2. С помощью меченных тритием соединений получить количественные характеристики адсорбции выборки веществ на ДН, агрегативной и седиментационной устойчивости образующихся конъюгатов, прочности удерживания веществ в их составе. Выбранные вещества различаются поверхностно-активными свойствами, а их конъюгаты с ДН могут быть интересны с точки зрения дальнейшего применения.
3. Использовать коэффициент распределения частиц в системах вода/органическая жидкость (ксилол, октан, октанол) для количественной оценки сродства ДН и их комплексов с биологически-активными веществами к гидрофобным средам.
4. Определить поглощение меченных тритием ДН проростками мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и их поступление в стебли и листья, выявить влияние на этот процесс гуминовых веществ.
5. Определить токсичность ДН и их конъюгатов по отношению к колонии патогенного гриба *Aspergilus niger* Tiegh. и клеточной культуре MCF-7. Оценить эффективность связывания ДН с клетками.

Научная новизна работы заключается в **положениях, выносимых на защиту**:

1. Методом термической активации трития получены меченные тритием ДН с удельной радиоактивность до 8 ТБк/г, что соответствует практически полному замещению водорода на тритий по связям С-Н на поверхности ДН. Показано, что увеличению удельной активности [^{3}H]ДН способствует ультразвуковая обработка, приводящая к уменьшению гидродинамического диаметра агрегатов ДН в водной суспензии, из которой готовят мишень для введения трития.

2. Усовершенствована методика определения концентрации [^{3}H]ДН в водных суспензиях, которая позволяет корректно определять концентрации [^{3}H]ДН с применением универсальной калибровочной зависимости, учитывающей изменение распределения агрегатов наночастиц по размеру.

3. Получены изотермы адсорбции на ДН поверхностно-активных веществ (мирамистин, плюроник P123, олеиламин), производных пантотеновой кислоты, гуминовых веществ (гуминовые кислоты угля и торфа, речные гуминовые и фульвокислоты).

4. Продемонстрировано влияние ζ-потенциала коллоидных растворов ДН на величину адсорбции веществ, удерживаемых за счет ионных взаимодействий (мирамистин, гуминовые кислоты угля). Установлено воздействие таких веществ на электрокинетический потенциал частиц в суспензии, что оказывает влияние на дальнейшую величину коадсорбции. Обнаружено, что адсорбционные слои гуминовых кислот на ДН способствуют увеличению последующей адсорбции мирамистина на ДН.

5. Найдено, что адсорбционные слои плюроника P123 и олеиламина эффективно гидрофибизируют поверхность ДН и значительно увеличивают коэффициент распределения ДН в системах органическая жидкость/вода.

6. Разработана методика определения меченных тритием наноалмазов в тканях растений. С помощью радионуклидных методов получены количественные характеристики поступления наноалмазов в корни и побеги мягкой пшеницы *Triticum aestivum*. Количество наноалмазов в корнях в 10^3 раз превышает его содержание в побегах. Показано неравномерное распределение наноалмазов в побегах растений: максимальная концентрация наноалмазов наблюдалась в апикальной части листьев. Обнаружено влияние природных гуминовых веществ на поглощение наноалмазов проростками пшеницы: адсорбция гуминовых веществ на ДН снижала их поглощение растениями.

7. Обнаружено различие в токсическом действии мирамистина, адсорбированного на наноалмазах, различающихся знаком ζ-потенциала. Комплекс мирамистина с наноалмазами, обладающими положительным ζ-потенциалом, не проявляет токсичности по отношению к колонии патогенного гриба *Aspergilus niger* и клеткам аденокарциномы человека MCF-7. Обработка ДН окислителями, а также при адсорбции гуминовых кислот, приводит к перезарядке ζ-потенциала, что увеличивает количество связываемого мирамистина с ДН, при этом не происходит полного подавления токсичности мирамистина в образовавшемся комплексе. Можно предположить, что это связано с различием механизма адсорбции на ДН, отличающихся знаком ζ-потенциала, либо в результате медленного высвобождения мирамистина в процессе эксперимента.

Практическая значимость. Полученные в рамках настоящей работы значения коэффициентов распределения ДН в системах двух несмешивающихся жидкостей и методы их изменения могут быть использованы для контроля локализации наночастиц в многофазных системах (в объеме полярной/неполярной жидкости или на границе раздела фаз), что может быть полезно при биомедицинском применении ДН и при разработке полимерных композитов с добавлением ДН.

Улучшенная методика спектрофотометрического определения концентрации [^{3}H]ДН позволяет сократить количество выполняемых процедур с радиоактивными препаратами для определения их концентрации и обладает универсальной калибровочной зависимостью для всех исследуемых в работе ДН. Предложенный в работе метод может быть использован для определения концентрации ДН, в том числе и в системах в которых происходит изменение размера частиц.

Разработанные методы увеличения удельной радиоактивности [^{3}H]ДН позволят понизить предел обнаружения ДН, что является важным параметром для применения [^{3}H]ДН в качестве радиоактивного индикатора. На основании проведенных исследований получен патент РФ № 2672741.

Апробация работы. Основной материал диссертации представлен на следующих конференциях: VIII и IX Всероссийских конференциях по радиохимии («Радиохимия-2015» Железногорск, 2015 и «Радиохимия-2018» Санкт-Петербург, 2018), The First Russian-Nordic Symposium on Radiochemistry (Москва, 2013), 10 и 11-ой Международных конференциях «Углерод: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, технология» (Троицк, 2016 и 2018

год), 27th International Conference on Diamond and Carbon Materials (Монпелье, 2016), III International Conference of CIS IHSS HIT-2014 «Humic Substances and Other Biologically Active Compounds in Agriculture». (Москва, 2014), XII International Conference on Nanostructured Materials (Москва, 2014), 13th International Conference Advanced Carbon NanoStructures – ACNS'2017 (Санкт-Петербург, 2017), Международной конференции «Химическая технология функциональных наноматериалов» (Москва, 2017), IX - XII Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», «Ломоносов-2014», «Ломоносов-2013», «Ломоносов-2012» (Москва, 2012 - 2015), VIII, IX, XI Всероссийских конференциях «СТРУКТУРА И ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ» (Яльчик, 2011, 2012, 2014).

Личный вклад. Все результаты получены, обработаны и представлены автором лично. Эксперименты с композитными пленками выполнены совместно с к.х.н. О.А. Соболевой, авторадиограммы получены совместно с к.х.н. М.Г. Чернышевой и к.х.н. В.И. Коробковым, хроматограммы меченных препаратов получены совместно с к.х.н. В.Н. Ташлицким и к.б.н Н.В. Федеровой, эксперименты с колониями патогенного гриба *Aspergilus niger* проведены совместно с к.б.н О.И. Кляйн; регистрация ИК-спектров выполнена к.х.н. А.Г. Поповым, анализ примесей металлов в ДН с помощью ИСП-АЭС И.В. Михеевым, фитотоксичность препаратов определена д.б.н. Н.А. Куликовой и д.б.н. Д.Н. Маториным, регистрация фотографий ПЭМ с высоким разрешением к.х.н. А.В. Егоровым, эксперименты по цитотоксичности и связыванию наноалмазов с MCF-7/R д.х.н. Н.С. Мелик-Нубаровым.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 8 печатных изданиях, в том числе 8 статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ, и 28 — тезисов докладов на международных и национальных научных конференциях, получен патент РФ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения и приложения. Полный объём диссертации составляет 176 страниц, включая 50 рисунков и 27 таблиц. Список литературы содержит 222 наименования.

Глава 1. Обзор литературы

В обзорах [1; 2] приведены исторические этапы развития методик синтеза алмазоподобных структур начиная с 50-х годов прошлого века. Наиболее важными и нашедшими широкое применение на практике являются высокотемпературный синтез при высоком давлении [3], CVD-метод (Chemical vapor deposition – химическое парофазное осаждение) получения алмазных поликристаллических пленок [4] и получение ультрадисперсных алмазов методом детонации в закрытой камере [5]. Именно детонационные алмазы (ДН) имеют большие перспективы массового использования из-за относительно невысокой стоимости их производства.

Детонация происходит в закрытой камере, заполненной инертным газом или водой в качестве хладагента. Детонационное превращение бризантных взрывчатых веществ с содержанием кислорода ниже стехиометрического в неокислительной среде приводит к образованию конденсированных фаз углерода наряду с другими аллотропными модификациями углерода, содержание наноалмазов может составлять до 75%, а выход ДН от массы взрывчатого вещества составляет 4-10% [6]. Температура и давление в детонационной волне соответствует условиям термодинамической стабильности алмаза ($P > 10$ ГПа, $T > 3000$ K). Первичные частицы диаметром 4 нм образуют фрактальные кластерные структуры размером 30-40 нм. Из них формируются более крупные агрегаты [7]. В отличие от синтеза алмаза из графита, не требуется расходовать энергию на разрушение или перестройку исходной кристаллической решетки графита [5].

1.1 Общая характеристика наноалмазов детонационного синтеза

Порошки ДН детонационного синтеза можно рассматривать как композиционный алмазосодержащий материал, состоящий из различных форм углерода (80 - 89%, из них 3 - 10% неалмазные), азота (2 - 3%), водорода (0.5 - 1.5%), кислорода (до 10%) и несгораемого остатка (0.5 - 8.0%) [8]. Структуру ДН образует химически инертное алмазное ядро, на поверхности которого находятся

различные функциональные группы, наличие которых определяется условиями синтеза ДН и дальнейшей его очистки [9]. Удельная поверхность материала при этом составляет от 250 до 400 м^2/г [7; 10].

Для изучения структуры и морфологии ДН применяют просвечивающую электронную микроскопию [1; 11—13]. Как правило, на таких снимках отличимы не только первичные кристаллиты размером ≈5 нм, но и плоскости (111) кристаллической решетки, расстояние между которыми соответствует кубической структуре алмаза и составляет 0.2 Å. В совокупности с компьютерным моделированием было показано наличие {111} пространственных структур (угол между (111) плоскостями составляет 109°) [12]. На краях кристаллита часто наблюдается графитизированная оболочка, что исследователи обычно относят к sp^2-гибридизированному углероду или аморфным структурам. Авторы работы [14] отмечают, что данное наблюдение не является характерным для всех ДН. Кроме того, было показано, что при долгой выдержке в пучке электронов края кристаллитов могут обрастать подобной оболочкой.

По данным рентгеноструктурного анализа порошков ДН размер первичных кристаллитов 4-5 нм [15; 16], что согласуется с наблюдаемыми размерами на микрофотографиях. В работах [17; 18] использовали ДН полученные из разных источников, отличающихся условиями синтеза и очистки. Дифрактограммы всех исследуемых ДН оказались идентичны. Параметры кристаллической решетки ДН сопоставимы с природным алмазом и соответствуют кристаллической решетке типа алмаза. Отсутствие дальнего порядка у наночастиц накладывает ограничение на привычные методы анализа структуры, поэтому при изучении таких систем применяют компьютерное моделирование. Моделирование формы агрегатов [18] по данным малоуглового рентгеновского рассеяния предсказывает существование пространственных структур, построенных из 9-10 кластеров и состоящих из 4-5 кристаллитов алмаза.

Авторами работы [10] был исследована возможность уменьшения размера первичных частиц наноалмазов нагреванием на воздухе с целью увеличения удельной поверхности материала. В эксперименте применяли детонационные наноалмазы, произведенные в «Центре алмазных технологий» (г. Снежинск), «Алмазных технологиях и материалах» (г. Красноярск), «Алмаз-центре» (г. Санкт-Петербург). Процесс изучали путем непрерывного взвешивания в процессе нагревания. Было установлено, что выдерживание ДН при температуре 730 К приводит к уменьшению массы образцов. При дальнейшем повышении

температуры скорость выгорания значительно увеличивается. Из приведенного в работе расчета следует, что удельная поверхность возрастает с увеличением степени выгорания ДН, однако значение размера частиц не опускается ниже 4.4 нм. Авторы статьи объясняют это быстрым сгоранием частиц при достижении порогового минимального размера.

Для анализа поверхности ДН наиболее часто применяют метод ИК-Фурье спектрометрии [19—23]. На поверхности ДН преимущественно находятся двойные C=C связи (2972 $см^{-1}$), метильные (2927 $см^{-1}$) и метиленовые группы (2855.5 $см^{-1}$). Если ДН не подвергался дополнительной обработке, то в ИК-спектре наблюдается широкий пик в области 3500-3300 $см^{-1}$, который относится к присутствию адсорбированной на поверхности воды (3430-3420 $см^{-1}$, колебания O-H связи, -NH_2, =NH и –CONH- сольватов). Полоса в области 2068 $см^{-1}$ относится к поверхностным >C=O (1700–1865 $см^{-1}$ кето-группы) и –CO-CR=N^+=N^-. О наличии -NO_2 групп может свидетельствовать пик с максимумом при 1257 $см^{-1}$, совпадающий с колебаниями групп -OH. Колебания карбонильных групп наблюдаются при 1727 и 1099 $см^{-1}$. Колебания групп R–C(=O)O наблюдаются в области 1556 $см^{-1}$. Адсорбированные на поверхности молекулы воды могут быть обнаружены при 1115 и 1632 $см^{-1}$, совпадая по положению со связями C=C и >NH. Следовые количества нитратов металлов, которые образуются в процессе детонации, наблюдаются в виде острого пика при 1384 $см^{-1}$. Образовавшиеся при взрыве примеси C-Cl определяются в виде небольшого пика с центром в области 581 $см^{-1}$. Наличие некоторых пиков в ИК-спектре ДН может быть объяснено его дополнительной очисткой и обработкой (ковалентной модификацией). После очистки наноалмазов серной и хлорной кислотами в ИК-спектре появляются пики: 1124 и 623 $см^{-1}$ (очистка серной кислотой); 1117 и 612 $см^{-1}$ (очистка хлорной кислотой) [20]. Для более полного представления об особенностях поверхности ДН полезно сопоставление ИК-спектров наноалмазов различного генезиса. Так, в работе [24] проведен сравнительный анализ ИК-спектров природных и искусственных наноалмазов. Показано, что полосы поглощения в диапазонах 3420-3370 и 1635-1608 $см^{-1}$ характерны для всех исследуемых образцов, обусловленные валентными и деформационными колебаниями O–H связей в адсорбированных молекулах воды. Интенсивность сигнала при этом выше для искусственных алмазов, что может быть связано с меньшей удельной поверхностью природных образцов и, как

следствие, меньшим вкладом поверхностных групп в общее поглощение. Наличие карбонильных групп было обнаружено только у образца, очистку которого проводили в азотной кислоте при нагревании до 500 K и давлении 10 МПа. У остальных исследуемых образцов наноалмазов, очистка которых проводилась в окислительных смесях ($CrO_3 + H_2SO_4$; HCl, $CrO_3 + H_2SO_4$; HNO_3 + HCl, NaOH; HCl + HF + H_2SO_4), было показано полное отсутствие карбонильных групп на поверхности ДН. При очистке с использованием азотной кислоты наблюдаются полосы поглощения 1070-872 $см^{-1}$ валентных колебаний C-N. Авторы отмечают, что полосы поглощения 2923-2854 $см^{-1}$, характерные для sp^3-гибридизованного углерода в C-H группах, наблюдаются не у всех образцов наноалмазов.

В последнее время для исследования ДН все чаще применяют спектроскопию комбинационного рассения (Рамановская спектроскопия) [25]. Метод чувствителен к размеру частиц наноалмазов [26; 27], химическому составу поверхности [28] и к аллотропным модификациям углерода [29—31]. Спектр комбинационного рассеяния ДН является суперпозицией полос, характерных для различных наноуглеродных фрагментов [29; 31]. Для разных фаз углерода характерна отличительная зависимость интенсивности сигнала от длины волны облучения, что позволяет определить относительный состав углеродного материала [28; 29; 31]. Основными наблюдаемыми полосами в спектре комбинационного рассеяния ДН являются:

1) полоса D (от «Diamond») объемного кристалла алмаза при 1332 $см^{-1}$, для наноалмазов пик в этой области расположен при 1290-1350 $см^{-1}$, причем положение и ширина зависит от размера кристаллитов;

2) полоса G (от «Graphite») при 1560^{-1} характерна для графеноподобного углерода, частично накладывается на полосу 1640 $см^{-1}$ воды [28]. Дефекты кристаллической решетки алмаза наблюдаются при 1630 $см^{-1}$ [31].

3) плечо в области 1100-1350 $см^{-1}$ характерно для неупорядоченного углерода, форма пика соответствует плотности состояний; пик при 1150 $см^{-1}$ относят к транс-полиацетилену на поверхности алмаза [31; 32];

В растворах ДН, как правило, существуют в виде агрегатов. Ведутся исследования по стабилизации дезагрегированных ДН в растворах [33], в том числе и в органических растворителях [34]. В растворах агрегаты ДН традиционно характеризуют методом динамического рассеяния света (ДРС) [35; 36]. Для оценки размера ДН используют метод дифференциальной сканирующей

калориметрии (ДСК) [37], основанной на изменении температуры фазового перехода воды, находящейся в порах агломератов ДН. Особенности свойств воды, адсорбированной в агрегатах ДН, наблюдаются также и на термодесорбционных спектрах ДН. В работе [38] получены с применением масс-спектрометрии термодесорбционные спектры ДН в диапазоне температур от 290 до 1170 K и давлении 10^{-6} Па. Для исследованных ДН характерно наличие трех максимумов при десорбции воды. Первый при 350 K авторы объясняют десорбцией воды, связанной с поверхностью ДН физически; второй при 490–530 K с десорбцией воды из мезо- и нанопор агрегатов ДН; при 820–870 K с образованием воды при распаде кислородосодержащих функциональных групп, что подтверждается соответствием максимума термодесорбции воды и активного кислорода. Похожие данные были получены и в другом исследовании [13].

Наиболее чувствительными методами анализа неорганических примесей ДН являются масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой и атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС). Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой [39; 40] позволяет обнаружить более 30 элементов в 14 исследуемых коммерческих образцах, предел обнаружения при этом составляет 10^{-8} масс. %. Основные загрязнения ($>$ 10^{-2} масс. %): ^{54}Cr, ^{42}Ca, ^{47}Ti, ^{28}Si, ^{32}S, ^{27}Al, ^{56}Fe, ^{24}Mg, ^{23}Na, ^{39}K. В работе [41] описана методика определения 68 элементов с содержанием в ДН более 10^{-4} масс. % методом ИСП-АЭС. При анализе 20 коммерческих образцов основными обнаруженными примесями являются ($> 10^{-2}$ масс. %): Cr, Ca, Ti, Si, S, Al, Fe, Na, Cu, Zn, B.

Для определения примесей в ДН применяют также активационные методы исследования. В работе [42] с помощью гамма-активационного анализа обнаружили содержание в ДН следующих элементов: Cl, Ti, Cr, Fe, Ni, Zr, Mo, Sb, Sr, Mn, U и Eu. Предел обнаружения метода составляет от 10^{-4} до 10^{-7}. Общее содержание примесей элементов в исследуемых образцах составляло от 0.3 до 1.4%, наиболее распространенные – Cl, Ti, Cr, Fe, Ni. Впервые обнаружено содержание Eu и U.

1.2 Методы детекции и визуализации ДН в биологических объектах

Определение наноаматериалов в органах и биологических тканях обычно связано с разработкой их применения в качестве доставщиков лекарственных средств, изучения потенциальной токсичности, применением в качестве визуализирующих агентов. Визуализация ДН в биологических объектах крайне важна для поиска их потенциального применения. Методы визуализации наночастиц осуществляются двумя основными способами [43; 44]. Первый подход реализуется применением уникальных свойств ДН (различные виды индуцированной флуоресценции, наличие парамагнитных дефектов кристаллической решетки, высокая оптическая плотность материала и т.д.) или созданием таких свойств модификацией материала. Второй основан на иммобилизации визуализирующего агента на поверхности наноматериала.

Одним из самых распространенных и быстроразвивающихся методов являются методы, основанные на флуоресценции NV-центров (nitrogen vacancy). При наличии NV-центров ДН (фДН) способны флуоресцировать в диапазоне длин волн 600-800 нм. Вакансии могут быть получены обработкой частицами высоких энергий (такими, как электроны, протоны, нейтроны, ионы гелия или гамма-фотоны) и последующим отжигом при повышенных температурах (900 K и выше). Метод требует очень сложную и дорогостоящую технику, что препятствует доступности фДН. Поскольку NV-центры расположены в кристаллической решетке, модификация поверхности ДН и изменение pH раствора не оказывает влияние на флуоресценцию [45]. Флуоресценция NV-центров обладает достаточной проникающей способностью сквозь биологические ткани. Первые работы о применении фДН для визуализации в биологических объектах появились в 2005 году. Тогда же было показана их биосовместимость [46]. Основные успехи достигнутые в развитии этого метода за последние годы описаны в обзорах [47; 48].

В работе [49] модификацию ДН проводили ковалентным связыванием с флуоресцеином. С помощью полученного комплекса была исследована цитотоксичность ДН по отношению к клеткам яичников китайского хомячка (Kun Ming mice). Способность полученных частиц проникать в клетки установлена с помощью конфокальной, светоотражающей и флуоресцентной микроскопии.

Показано, что ДН, после проникновения в клетки, локализуются в основном в цитоплазме и встраиваются в актин цитоскелета. Поскольку за время контакта (от 24 до 72 часов) токсического воздействия выявлено не было, авторы предлагают ДН в качестве перспективного кандидата для доставки биологически активных соединений, а для изучения их распределения внутри клетки использовать модифицированные флуоресцеином ДН. Однако авторы отмечают, что визуализации распределения ДН внутри клетки мешает накопление наноалмазов на поверхности клетки. Следует отметить, что определение количественных характеристик взаимодействия ДН с живыми организмами при использовании флуоресцентных меток затруднено.

Флуоресценция в ближней инфракрасной области (NIR) один из самых важных и применяемых методов визуализации в фундаментальных исследованиях и клинической практике [50; 51]. Отличительными особенностями NIR являются широкий диапазон испускаемого спектра (от 700 до 1700 нм) и проникающая способность сквозь ткани. Таким образом, возможно проводить измерения в глубине тканей до ≈3 см [52—54]. Облучение проводят лазером или LED-диодом, затем детектируют оптический сигнал. Прививка NIR-флуорисцирующего агента к ДН осуществляется ковалентным [55; 56] или нековалентным [57; 58] связыванием. Полученные ДН и наноалмазы, синтезированные в камерах высокого давления при высокой температуре (HPHT наноалмазы) были использованы в доклинических исследованиях при внутривенном введении [59].

Фотоакустическая визуализация (ФАВ) еще один тип фотоиндуктивного способа визуализации *in vivo* применяемый в доклинических исследованиях [60]. По сравнению с NIR, ФАВ обладает большей проникающей способностью (≈8 см) и разрешением (≈100 мкм) [61; 62]. Подобно NIR, принцип ФАВ основан на возбуждении лазером, однако детекция происходит на основе фотоакустических эффектов [63]. ДН поглощает энергию неионизирующих лазерных импульсов и конвертирует энергию в тепло, что приводит к термоупругому расширению и ультразвуковым волнам. Ультразвуковые волны улавливаются с помощью ультразвуковых преобразователей [64]. Высокая оптическая плотность ДН способствует чувствительности метода [65; 66].

Благодаря наличию у ДН парамагнитных дефектов решетки, а также при прививке к поверхности ДН контрастных агентов, ДН можно детектировать методом ядерного магнитного резонанса [67; 68]. Преимуществами трехмерной

магнитно-резонансной томографии (МРТ) являются неинвазивность и высокое разрешение – от нескольких миллиметров до нескольких микрометров [69; 70]. Существуют два типа контрастных агентов МРТ, первый тип уменьшает время спин-решеточной релаксации (T1), другой тип уменьшает время спин-спиновой релаксации (T2) [71; 72]. Первый тип агентов обладают парамагнитной природой (Gd (III) и Mn (II)), второй тип представляют собой суперпарамагнитные материалы (оксид железа, железо-платина [73]). В последнее время все больше внимания привлекают контрастные агенты, видимые в T1 и T2-взвешенных изображениях [72; 74]. Такие агенты могут быть созданы на основе углеродных наночастиц, в том числе на основе ДН [70].

Наличие парамагнитных центров в ДН позволяет применять также и методы электронного парамагнитного резонанса. Количественное определение ДН в крови и гомогенатах органов возможна методом ЭПР-спектрометрии [75]. В работе использовали ДН производства «Реал-Дзержинск», для которых разработана методика определения концентраций в диапазоне от 1.6 до 200 мг/л. Тем не менее, в образцах крови и гомогенатах печени может происходит увеличение свободного гемоглобина за счет разрушения эритроцитов, что приводит к образованию дополнительных парамагнитных центров и наложению их сигнала на сигнал от ДН.

Алмаз обладает самым высоким показателем преломления $n = 2.42$ среди всех диэлектрических материалов [76]. Поскольку это почти вдвое больше, чем показатель преломления внутриклеточного вещества, методы микроскопии могут применяться для детектирования ДН. В работе [77] на оптическом микроскопе продемонстрировано с применением методов для создания контраста: микроскопии Норманского и Хоффмановской модуляции (Hoffman modulation contrast microscopy), что сигнал от 55 нм наноалмазов в 300 раз ярче, чем у клеточных органелл такого же размера. При внутривенном введении в больших количествах (8 инъекций в течение 4 недель по 4 мг/кг тела) ДН могут быть обнаружены в органах и тканях с помощью цифрового фотоаппарата [78]. После разложения биологического материала количественно определяют ДН спектрофотометрически в УФ и видимых областях спектра [79].

Ранее упомянутая Рамановская спектроскопия применяется в качестве неинвазивного метода для определения ДН в биологических объектах. В работах [80—82] продемонстрировано определение наноалмазов в бактериях Escherichia coli и в клетках аденокарциномы A549. Детекцию проводили по D

моде при 1332 $см^{-1}$. В другой работе [83] методом когерентной антистоксовской рамановской микроскопии определяли наноалмазы в клетках HeLa.

1.2.1 Метод радиоактивных индикаторов

Альтернативный подход основан на применении радиоактивных индикаторов. Получение наночастиц, меченных радионуклидами, осуществляют добавлением радионуклидов на стадии синтеза наночастиц, облучением нейтронами, посредством изотопного обмена или физической адсорбции, а также ковалентного связывания [84]. На данный момент в литературе описано множество способов синтеза меченных углеродных наноматериалов [85]. Для этих целей наиболее распространенно использование ^{99m}Tc [86], ^{125}I [87; 88] и ^{131}I [89], ^{18}F [84], ^{64}Cu [90], ^{14}C [91]. Литературы по получению меченных ДН значительно меньше.

Получение ДН, содержащих радиоактивную метку, облучением ДН нейтронами (флюенс $1.4{\cdot}10^{19}$ нейтронов/$см^2$) описан в работе [92]. Основной целью для активации являются металлические примеси в ДН, такие как Na, Ca, Ti, Fe, Al, W, V, Cu. После выдержки в течение 7 суток по завершению облучения, основной вклад в радиоактивность (более 98%) ДН вносит ^{51}Cr. Авторы предполагают также наличие ^{181}Hf, ^{122}Sb, ^{124}Sb, ^{95}Zr. Удельная радиоактивность полученных ДН составила 0.12 ГБк/г.

В работе [93] ^{188}Re был применен для исследования клеточного поглощения углеродных нанотрубок, оксида графена и ДН. Ранее [94], биораспределение ДН в мышах Kun Ming после интратрахеального введения было исследовано с применением ^{188}Re. В гистологических срезах печени, почек и селезенки патологических изменений найдено не было, а 63% от введенного ДН накапливалось в легких. На основании этого авторы цитируемой работы прогнозируют патологические изменения в бронхах и отмечают необходимость изучения долгосрочного токсического эффекта. Благодаря γ–излучению (155 кэВ) можно отслеживать распределение [^{188}Re]ND с помощью γ–счетчика. Однако короткий период полураспада ($T_{1/2}$ = 17 часов) не позволяет проводить длительное исследование.

^{99m}Tc [95] и ^{125}I [79], которые иммобилизовали на поверхности ДН посредством физической адсорбции, были использованы в качестве радиоактивной метки для исследования биораспределения ДН в мышах после внутривенного введения. Это позволило определить количество ДН в органах и тканях. Результаты обоих исследований показали значительное содержание ДН в печени. Авторы подчеркивают необходимость проведения исследования токсичности в долгосрочной перспективе. ПЭТ радионуклиды, такие как ^{18}F, также применяют для введения метки в ДН с последующим изучением их распределения [96].

Применение трития в исследованиях наноструктур

В сравнении с упомянутыми радионуклидами, тритий обладает значительно большим периодом полураспада (4500 сут), следовательно, с меченными тритием соединениями можно проводить долгосрочные исследования. Благодаря низкой энергии излучения (E_{max} = 18.6 кэВ) во время работы не требуется специальных мер предосторожности. Соединение, молекулы которого содержат один атом трития, имеют удельную радиоактивность 1.072 ПБк/моль. Такая величина удельной радиоактивности достаточна для проведения исследований в области химии, биологии и медицины. Слабой стороной использования тритиевой метки в биохимических испытаниях является сложность детектирования трития. Единственный надежный способ количественного определения трития – жидкостная сцинтилляционная спектрометрия [97].

Разработано множество способов получения меченных тритием соединений, благодаря этому практически для любого соединения можно подобрать удобный метод и условия введения тритиевой метки [98]. Совокупность данных свойств объясняет широкую популярность трития в научных исследованиях. Тритий был успешно применен для введения в углеродные наноматериалы [99—102]. Удельная радиоактивность полученного [^{3}H]графена составила 3.96 ТБк/г, [^{3}H]одностенных углеродных нанотрубок – 1.00 ТБк/г. При этом в результате реакции с тритием значительной модификации поверхности наноматериала не наблюдается. Полученные меченные тритием углеродные нанотрубки были применены для изучения их фармокинетики при внутривенном введении. С высоким уровнем достоверности (среднее квадратичное отклонение

меньше 4%) определено содержание нанотрубок в органах крыс. Самое высокое содержание [^{3}H]нанотрубок обнаружено в почках 0.2 мкг/г и печени 0.06 мкг/г.

Методы введения трития в органические молекулы можно разделить на несколько групп: (1) химический синтез; (2) биосинтез; (3) физико-химический синтез. Метод термической активации трития, основанный на взаимодействии атомов трития с мишенью вещества, относится к третьей группе. Удобным способом генерации реакционных атомов трития является диссоциация молекул трития на вольфрамовой проволоке, нагретой электрическим током до высокой температуры (1500-2200 K). Вольфрам выступает не только в роли поставщика энергии для диссоциации молекул трития, но и является катализатором. Основы метода термической активации трития были заложены на кафедре радиохимии химического факультета МГУ [103].

Метод термической активации основан на бомбардировке мишени потоком образующихся атомов трития. Низкое давление молекулярного трития в системе (менее 1 Па) позволяет практически без потери энергии достигать активированным атомам стенок реакционного сосуда и вступить во взаимодействие с молекулами мишени. Для отделения побочных продуктов, отличных от материнского соединения, обычно используют методы диализа и разные типы хроматографии. Результат введения тритиевой метки зависит от многих параметров: температуры вольфрамовой проволоки, давления молекулярного трития в реакционном сосуде, расстояния от вольфрамовой проволоки до мишени, способа приготовления мишени и, наконец, от времени воздействия атомарного трития на мишень [104]. И, несомненно, результаты введения трития зависят от природы объекта, в который вводится метка. Таким образом, необходимо подбирать оптимальные параметры для введения метки, в зависимости от соединения.

Реакция проходит, прежде всего, с молекулами поверхностного слоя. Неравномерность распределения трития при обработке атомами биологических макромолекул было использовано для их исследования (метод тритиевой планиграфии [105—108]). Суть данного метода заключается в определении распределения радиоактивности после бомбардировки атомарным тритием исследуемого объекта. Например, белки можно подвергнуть секвенированию или ферментативному гидролизу с последующим разделением пептидов и их полным гидролизом. Аминокислотный анализ фрагментов с измерением радиоактивности позволяет построить профиль изменения содержания трития в

аминокислотных остатках белка. С помощью полученных данных и компьютерного моделирования можно воссоздать структуру белка, а также найти места межмолекулярных контактов.

На данный момент описано два способа введения трития в ДН [101; 102]. В первом [101], получение [^{3}H]ДН проводили методом термической активации трития. В работе использовали ДН производства СКТБ «Технолог» двух типов: ТАН-Н и УДА-ТАН, который является прекурсором при получении ТАН-Н в реакции с водородом при 1100 K. В работе описано два способа подготовки мишени при высушивании: 1) растворителя из суспензии ДН в ацетоне, 2) стабилизированной суспензии ДН в воде. В первом случае 7-8 мг ДН в 3-4 мл ацетоне распределили по стенкам реакционного сосуда и высушили растворитель при нагревании до 320 K. Удельная радиоактивность [^{3}H]ТАН-Н и [^{3}H]УДА-ТАН, полученная при реакции с четырьмя порциями трития по 10 с активации W-проволокой с каждой, составила 0.46 и 0.094 ТБк/г. Если представить эти значения в содержании трития на поверхности, то они составят 9.5×10^{17} и 2.2×10^{17} атомов на м^2 для ТАН-Н и УДА-ТАН соответственно; поскольку, удельная поверхность ТАН-Н и УДА-ТАН составляет 240 и 272 нм^2.

Второй способ подготовки мишени позволяет значительно увеличить удельную радиоактивность продукта. Объем наносимой суспензии при этом составил 0.8-1.0 мл, содержание ДН от 0.17 до 0.6 мг. В таком случае ДН удается нанести на стенки реакционного сосуда более равномерно по сравнению с нанесением ДН из суспензии в ацетоне. При нанесении ДН таким способом удается закрепить на стенках реакционного сосуда не более 1 мг ДН. Уменьшение массы ДН в мишени с 0.6 до 0.17 мг не приводит к росту удельной радиоактивности продукта. При времени реакции 80 с удельная радиоактивность продукта составляет 2.6 ТБк/г, достигнув при этом максимальной полученной величины.

Другой описанный в литературе метод [102], осуществляется с применением микроволновой плазмы трития и является адаптацией метода гидрирования ДН, описанного в работах [109; 110]. Такой метод гидрирования применим как для детонационных наноалмазов, так и для HPHT-наноалмазов. Для получения меченных тритием ДН помещали 17 мг ДН в кварцевую пробирку и откачивали воздух. Напускали тритий до давления 0.9 кПа, что соответствует 6×10^{-6} моль. Нагрев микроволновым излучением мощностью 140 Вт проводили в течение 5 мин, затем заменяли газ в системе на новую порцию трития и проводили обработку в течение еще 12 мин. Удаление трития из лабильных

положений осуществляли многократным растворением в метаноле с последующим упариванием образца. Полученная удельная радиоактивность образца составила 0.34 ТБк/г, что соответствует включению 22% трития из газа. Проводили двухступенчатый термодесорбционный анализ - 20 ч при 430 K, затем 20 ч при 670 K. На первой стадии происходит удаление 10% радиоактивности с [^{3}H]ДН, на второй эта величина достигает 93%. На основании полученных данных авторы делают вывод о включении атомов трития в ядро ДН в количестве 7% от общего содержания. При удельной поверхности ДН 350 м^2/г оценивают содержание трития в 5×10^{17} атомов на м^2. При этом проводят сопоставление с содержанием водорода на алмазных поверхностях, синтезированных методом CVD, которое составляет 3×10^{19} атомов на м^2 [111]. То есть, в описанных методах получения [^{3}H]ДН не удалось достичь полной замены водорода на тритий.

На синтез [^{3}H]ДН методом термической активации расходуется значительно меньше трития, требуется меньше времени и количества ДН для проведения реакции. Метод термической активации трития позволяет достичь большей удельной радиоактивности продукта. Следовательно, потенциал практического применения метода значительно выше. Как было отмечено ранее, на удельную радиоактивность продукта в значительной степени влияют условия подготовки мишени и проведения реакции. Оказывает влияние и сама природа соединения, в данном случае химический состав поверхности наноалмазов. Благодаря легкости модифицирования поверхности ДН и их особым коллоидно-химическим свойствам, ДН являются интересным объектом для исследования взаимодействия с тритием в методе термической активации, полученные данные могут быть полезны также и для развития метода. По радиоактивности препарата на всех стадиях синтеза и очистки, а также удельной радиоактивности можно получить информацию о строении и химическом составе поверхности ДН.

1.3 Способы модификации свойств ДН

Перед применением ДН, полученные от производителя, как правило, подвергают очистке и/или подготовке, в том числе для достижения необходимого размера агрегатов и устойчивости коллоидных растворов. Кроме того, ряд исследователей стремится достичь подобными манипуляциями унификации свойств ДН, полученных из разных источников. Однако исследовательские группы выдвигают разные требования к характеристикам ДН связанные с спецификой области исследования. Поэтому, на данный момент существует несколько распространенных подходов, применяемых исследовательскими группами по всему миру.

Для характеристики коллоидных систем до и после модификации поверхности ДН полезным инструментом является метод ДРС в комбинации с измерением ζ-потенциала. Дисперсии считаются устойчивыми если ζ-потенциала больше 30 мВ по модулю. Известно, что ДН способны образовывать коллоидные растворы с ζ-потенциалом от -40 до +40 мВ, в зависимости от функционального состава поверхности ДН [112]. В водных растворах ДН образуют гидрозоли, седиментационная и агрегативная устойчивость которых зависит от размера частиц, их заряда, наличия на поверхности функциональных групп [113]. При этом наблюдается [23; 114] отсутствие зависимости удельной поверхности ДН от размера их агрегатов в коллоидных растворах, что может быть объяснено наличием большого количества пор и полостей в ДН.

1.3.1 Диспергирование и стабилизация коллоидных растворов

При диспергировании ДН повсеместно применяется обработка ультразвуком [115]. Ультразвуковая обработка излучателем погружного типа является весьма эффективной методикой дробления агрегатов наночастиц и даже может индуцировать протекание химических реакции [116]. Как правило после ультразвуковой обработкой применяют фракционирование для создания устойчивых дисперсий ДН [117]. Известны комбинации методов ультразвуковой обработки

с добавлением мелющих шаров (bead assisted sonic disintegration, BASD), впервые описанная в работе [34]. Для этого применяли 7 г Zr размером 50 мкм на 5 мл растворителя и 50-500 мг ДН с средним размером частиц 200 нм. За два часа обработки с мощностью 400 Вт удалось достичь размера частиц 10 нм. В работе [118] описана методика ультразвуковой обработки в присутствии NaCl. Метод позволяет достичь стабильные коллоидные растворы первичных частиц ДН, не подверженных образованию агрегатов (single-digit) в широком диапазоне pH. Вводимая мощность составила 150 Вт, время обработки – 60 минут. Состав обрабатываемого раствора – 10 г NaCl, 0.25 г окисленных ДН, 5 мл H_2O. Недостатком описанных методик является большое количества примесей в конечном продукте, преимущественно Ti (материал ультразвукового излучателя) и Zr (материал мелющих шаров), очистка от которых осуществима только агрессивными химическими реагентами. Кроме того, такие способы являются сложно масштабируемыми, хотя и могут удовлетворять лабораторные нужды.

Для измельчения агрегатов ДН применяются различные виды мельниц. Мельницы очень распространены благодаря простоте и доступности метода, эффективности и низкой стоимости, к недостатком стоит отнести внесение примесей и нагрев системы. Размер мелющих шаров варьируется от 50 мкм до нескольких мм, материал – Zn, WC, нержавеющая сталь и т.д. Метод применим как для порошка, так и для коллоидных растворов ДН [36; 119]. Зачастую длительная обработка в мельнице приводит к обратному эффекту – агрегации частиц [120].

Как правило, после дезагргеации наноалмазов применяют фракционирование, поскольку достичь узкого распределения частиц с высоким выходом удается редко [36]. Фракционирование обычно проводят диспергированием ДН в растворителе с применением ультразвукового воздействия с последующим центрифугированием и отделением необходимой фракции ДН. Ультрацентрифугирование позволяет [121] достичь узкого распределения частиц по размеру и является распространенным, доступным лабораторным и производственным методом. Все перечисленные способы применяют иногда в комбинации между собой. Также следует отметить, что в последнее время доступны коммерческие препараты стабилизированных описанными методами ДН.

1.3.2 Химическая модификация поверхности

Наряду с наноалмазами полученными методом HPHT или CVD, ДН всегда загрязнены sp^2 атомами углерода. Для удаления этих и других примесей, в том числе примесей металлов, распространено использование сильных окислителей [122], кислорода воздуха [123] и озона [13; 123]. Методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье удается зафиксировать изменения в химическом составе до и после модификации поверхности ДН [124]. Химическая модификация поверхности приводит либо к уменьшению интенсивности пиков, например при дегидрировании, или появлению новых пиков, свидетельствующих об образовании новых химических связей [20—23]. Применение окислителей приводит к преобладанию кислородсодержащих функциональных групп на поверхности ДН, включая карбоновые и карбонильные группы, в дополнению к различным спиртовым (третичным, вторичным, первичным) и эфирным группам и т.д. Гидроксильные группы удаляются при увеличении температуры и времени обработки.

Для модификации химического состава поверхности ДН проводят также высокотемпературную обработку в присутствии различных газов. Например, нагревание ДН в среде аммиака приводит к образованию на поверхности азотосодержащих функциональных групп (NH_2, C≡N, C=N). Для галогенирования используют соответствующие газы галогенов. Гидрирование ДН позволяет провести восстановление >COOH до >C-OH и даже >C-H [125]. При высокотемпературных обработках отмечается, что вода прочно удерживается на поверхности ДН и полное ее удаление происходит только при температуре 250°C в случае гидрированных ДН и 300°C в случае окисленных ДН [114].

Отжиг в инертной среде (N_2, Ar), а также в вакууме, при высоких температурах приводит к разрушению кристаллической решетки алмаза и образованию луковичных структур углерода (onion-like carbon). Сохранение структуры и морфологии, как правило, проверяют электронной микроскопией. Обзорная работа [126] посвящена подробному описанию методов химической обработки и функционализации поверхности ДН.

Описанные методы применяют и в комбинации, например в работе [127] описано газофазное и последующее жидкофазное окисление ДН. Полученные ДН центрифугировали, отобрали супернатант и вновь ресуспендировали.

Циклы осаждения/ресуспендирования повторяли до тех пор пока pH супернатанта не достиг нейтрального. В результате были получены гидрозоли ДН с ζ–потенциалом -52 мВ и с максимумом в 32 нм в распределении частиц по размеру, по данным ДРС.

Модификация гидрофобными веществами позволяет стабилизировать суспензии ДН в органических растворителях [128] и присутствия в системе поверхностно-активных компонентов, способных, адсорбируясь на поверхности частиц, ДН менять ζ-потенциал и, следовательно, оказывать влияние на устойчивость системы [20; 129]. В работе [130] на примере окисленных ДН показана возможность стабилизации суспензий в растворах с ионной силой физиологического раствора. Для этого рекомендуется применение анионных или неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ), применение же цвиттерионных и катионных ПАВ для суспензий ДН с отрицательным ζ–потенциалом приводит к их дестабилизации.

Определение количественных характеристик взаимодействия биологически-активных веществ (БАВ) с ДН связано с изучением их потенциальных применений, в последнее время большое внимание уделяется проблеме создания нано- или микроконтейнеров, предназначенных для транспортировки лекарственных средств в очаг поражения. Создание систем доставки биологически активных веществ направлено на снижение токсических эффектов, уменьшение дозировки и увеличение эффективности их применения. Для применения в медицинской и биохимической практике необходим детальный анализ сорбционных процессов, протекающих на подобных образованиях. В частности, при разработке таких контейнеров одной из основных становится проблема диагностики взаимодействия лекарственного средства с материалом контейнера (сорбция), а также возможность управляемого выхода (десорбция) лекарственного средства в очаг поражения [131—133].

В зависимости от условий синтеза и последующей химической обработки поверхность ДН может быть обогащена многообразием функциональных групп. Функциональные группы на поверхности ДН способны изменять их свойства, оказывая влияние на реакционную способность, а также и на токсичность ДН. Образование конъюгатов ДН с биомолекулами может быть достигнуто путем физической адсорбции посредством нековалентных взаимодействий, либо ковалентным связыванием в результате образования связей с функциональными

группами. Более распространены исследования, в которых основное внимание уделяется физической адсорбции [134; 135].

Различные органические и биологические молекулы были иммобилизованы на ДН: препараты для химиотерапии [136—138], углеводы [139; 140], пептиды [49; 122], белки [141—143], РНК [144; 145] и ДНК [146; 147]. Отмечается, что адсорбционные слои альбумина на поверхности наночастиц способствуют стабилизации коллоидных систем ДН в буферных растворах [148; 149]. Исследуются методы иммобилизации лекарственных препаратов на ДН посредством химического связывания [150; 151]. При иммобилизации БАВ на поверхности ДН, необходимо уделять внимание функциональности молекул. Например, наблюдается уменьшение активности лизоцима при адсорбции на поверхности HPHT-наноалмазов [141]. Следует отметить, что при коадсорбции лизоцима с цитохромом С удается достичь восстановления сниженной активности лизоцима с 60 до 70%. Помимо иммобилизации непосредственно на поверхности ДН, применяется подготовка поверхности ДН посредством модификации полимерных молекул, что помимо прочего позволяет стабилизировать ДН в буферных системах и биологических средах [152; 153] .

В работе [154] смоделировано применение ДН в качестве энтеросорбента. Микотоксин афлатоксин B1 был выбран в качестве адсорбата. Эксперимент проводили в водной среде при pH раствора от 2 до 9. В нейтральной среде оценивали влияние на величину адсорбции соотношения афлатоксина и ДН. Изменение концентрации фиксировали по УФ-спектрам, после осаждения ДН центрифугированием. Величину адсорбции рассчитывали по изменению концентрации на спектральном максимуме 362-364 нм. Показана высокая скорость достижения адсорбционного равновесия, которое составило 3 минуты. Адсорбционная способность практически не зависит от pH раствора. В щелочной среде происходит изменение спектра поглощения в диапазоне длин волн от 220 до 470 нм, что может быть вызвано деградацией афлатоксина. Обнаружена зависимость величины адсорбции от соотношения адсорбент–адсорбат.

Продемонстрировано [155], что ДН способны адсорбировать линейные молекулы ДНК, в то время как практически не взаимодействуют с кольцевыми. Концентрацию ДНК в образцах оценивали полуколичественно проводя электрофорез. Применяли две фракции ДН с размером частиц 30–250 нм и 250–500 нм. Величина адсорбции линейной молекулы ДНК на наноалмазах меньшего размера адсорбировалась значительно лучше.

В работе [127] проведена направленная модификация поверхности ДН с целью придания селективности адсорбции по отношению к гликопротеинам в смеси белков. Для этого проводили предварительную прививку аминофенилборной кислоты (АФБК), цель добавления звена посредника – нивелировать стерический фактор, затрудняющий адсорбцию гликопротеина, а также снизить неспецифичную адсорбцию белков на поверхности наноалмазов. В работе изучали адсорбцию бычьего сывороточного альбумина (БСА), альбумин куриного яичного белка (овальбумин) и фетуина. Для всех белков максимальная исследуемая концентрация составила 0.1 мМ. В результате модификации наноалмазов АФБК величина адсорбции фетуина вырастает от 0.3 г/г до 0.8 г/г, тогда как для овальбумина не изменяется и составляет 0.35 г/г. ДН модифицированные последовательно (3-аминопропил)триметоксиланом и АФБК способны связывать фетуин в количестве 1.3 г/г, а овальбумин 0.35 г/г. При изучении конкурентной адсорбции БСА и гликопротеинов было установлено, что модификация ДН исследуемыми веществами посредниками способствует увеличению доли БСА в адсорбционном слое.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Реактивы и оборудование

2.1.1 Наноалмазы детонационного синтеза

Общие сведения о наноалмазах, используемых в работе, приведены в таблице 1. Образцы наноалмазов ТАН-Н и ТАН-О были получены к.х.н. Р.Ю. Яковлевым из образца УДА-ТАН посредством отжига в токе водорода (1070 K, 5 ч) и на воздухе (720 K, 2 ч) соответственно. Образец ДН-С-О был получен посредством отжига на воздухе при 720 K в течение 2 часов из образца ДН-С. Из порошков наноалмазов готовили водные суспензии 5 г/л в деионизированной воде, очищенной способом Milli-Q. Затем проводили ультразвуковую обработку (ультразвуковая ванна ГРАД 28-35, 110 Вт) в течение 2 часов и термостатировали суспензию сутки при 277 K. Верхнюю часть суспензии (90% объема, исключая осадок) отбирали в колбу и высушивали на роторном испарителе, фиксируя массу сухого остатка. Добавляли воду и подвергали ультразвуковой обработке 4 часа. Приготовленная таким образом суспензия стабильна в течение недели минимум. Наноалмазы производителя «СКН», Снежинск представляли собой суспензии трех фракций по размеру частиц, охарактеризованных производителем как 15, 30 и 100 нм (ДН-15, ДН-30 и ДН-100 соответственно), использовали без дополнительной обработки. Концентрацию в этих образцах определили гравиметрически – высушиванием аликвоты коллоидного раствора.

В данном исследовании мы использовали два типа ультразвуковой обработки. Первый тип осуществляли в ультразвуковой ванне и применяли для всех типов гидрозолей. Этот тип обработки проводили в течение 20 минут непосредственно перед применением гидрозолей ДН. Второй вид обработки проводили с помощью ультразвукового излучателя погружного типа. В 10–20 мл коллоидного раствора с концентрацией 0.15 г/л вводили акустическую мощность 30–60 Вт с частотой 22 кГц в течение 2–6 минут. Из образцов ДН-С, ДН-100 и ДН-15 в

Таблица 1 — Общие сведения о наноалмазах, использованных в работе

обозначение	описание	производитель
УДА-ТАН ТАН-Н ТАН-О	порошок наноалмазов синтез из УДА-ТАН синтез из УДА-ТАН	СКТБ «Технолог», Санкт-Петербург, РФ
ДН-С ДН-С-ША ДН-С-О	порошок наноалмазов алмазосодержащая шихта синтез из ДН-С	НП ЗАО «Синта», Беларусь
ДН-100 ДН-30 ДН-15	гидрозоль	ООО «СКН», Снежинск, РФ
ДН-100-УЗ ДН-15-УЗ ДН-С-УЗ	получен из ДН-100 получен из ДН-15 получен из ДН-С	
RUDDM-150	порошок наноалмазов	ООО «Реал-Дзержинск», РФ

результате ультразвуковой обработки излучателем погружного типа были получены образцы ДН-С-УЗ, ДН-15-УЗ и ДН-100-УЗ соответственно. Окончание «УЗ» в названии образцов означает их обработку УЗ-излучателем погружного типа. Образцы ДН-С, ДН-С-УЗ, ДН-100-УЗ и ДН-100-УЗ анализировали на содержание примесей (§ 2.2.8*Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой*).

2.1.2 Вещества для модификации ДН

В работе использовали вещества для модификации ДН, которые можно условно разделить на следующие группы:

- производные пантотеновой кислоты (ППК)
- поверхностно-активные вещества (ПАВ)
- гуминовые вещества (ГВ)

Адсорбцию этих веществ на наноалмазах изучали с помощью метода радиоактивных индикаторов, получение и очистка меченных тритием веществ описана в разделе § 2.3*Синтез меченных тритием соединений.*

Производные пантотеновой кислоты. Производные пантотеновой кислоты – натриевая соль пантотеновой кислоты (ПК), натриевая соль гопантеновой кислоты (ГПК), кальциевая соль 4-D-фосфопантотеновой кислоты (ФПК) производства «МИР-ФАРМ» (Обнинск, РФ) были предоставлены Институтом фармакологии и биохимии НАН Беларуси.

Пантотеновая кислота (по номенклатуре ИЮПАК 3-[(2,4-дигидрокси--3,3-диметил-1-оксобутил)амино]пропановая кислота) представляет собой амид 3-аминопропановой и пантоевой кислот и содержит в своем составе карбоксильную и гидроксильные группы (HO—R_p—COOH, R_p=$C_8H_{15}NO_2$), рисунок 2.1. 4'-фосфо-пантотеновая кислота ($(HO)_2P(=O)$—O—R_p—COOH) образуется при фосфорилировании пантотеновой кислоты на первом этапе биосинтеза CoA [156]. Третье производное – гопантеновая кислота (HO—R_p—CH_2—COOH) относительно пантотеновой кислоты обладает дополнительным звеном в углеводородной цепочке (4-аминомасляная кислота).

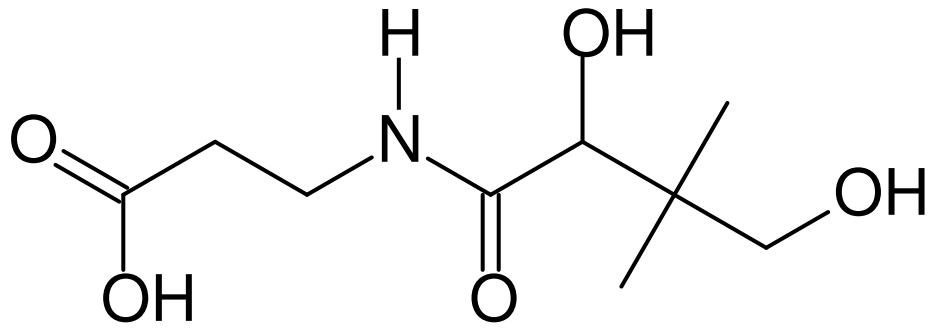


Рисунок 2.1 — Структурная формула пантотеновой кислоты

Поверхностно-активные вещества. Неионогенный ПАВ – блок сополимер плюроник P123, рисунок 2.2. Производитель – Sigma Aldrich, средняя молекулярная масса $5.8{\cdot}10^3$ г/моль.

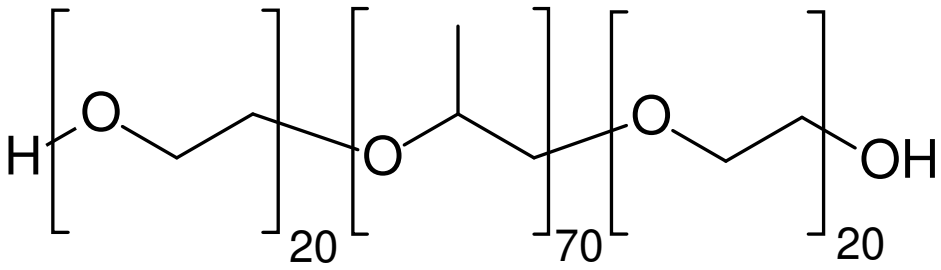


Рисунок 2.2 — Структурная формула плюроника P123

Катионный ПАВ – бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний-хлорид моногидрат, рисунок 2.3. Производитель «Инфамед» РФ, торговое название «Мирамистин».

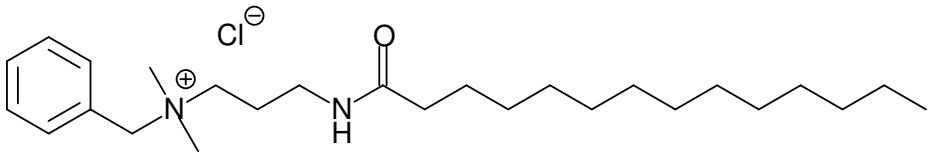


Рисунок 2.3 — Структурная формула
бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммонийхлорида моногидрата

Олеиламин – ненасыщенный жирный амин цис-1-амино-9-октадецен, рисунок 2.4. Производитель Sigma Aldrich, 70% раствор в октане.

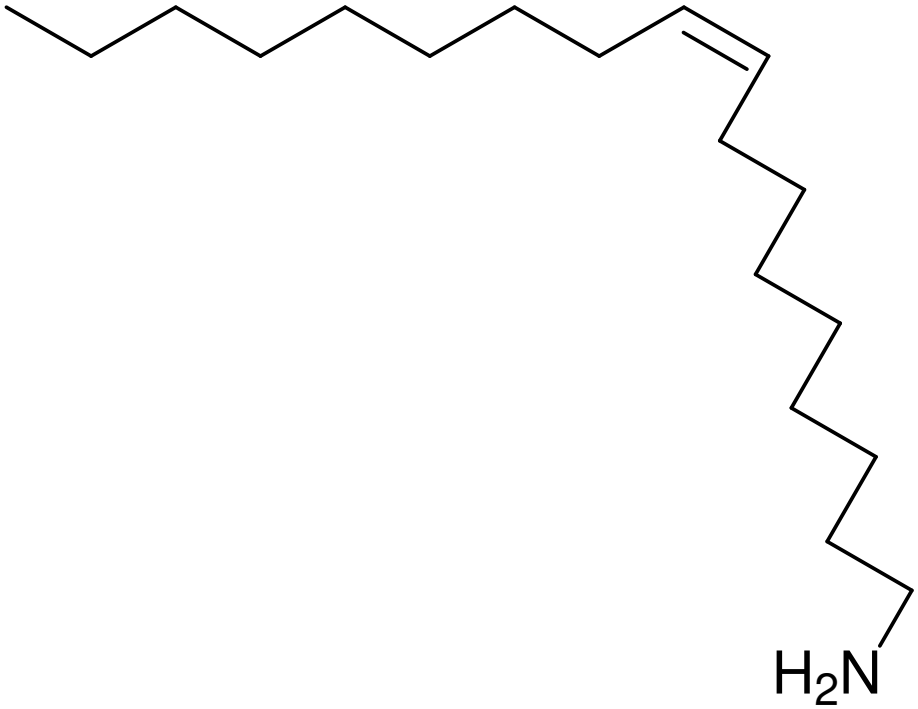


Рисунок 2.4 — Структурная формула цис-1-амино-9-октадецена

Гуминовые вещества. В работе использовали фульво- и гуминовые кислоты выделенные из торфа, угля и воды. Гуминовые вещества и их характеристики предоставлены научной группой координатора российского отделения Международного гуминового общества профессора И.В. Перминовой, таблица 2. Фульво- (SRFA) и гуминовые кислоты (SRHA), выделенные из речной воды Suwannee River, рекомендованы Международным гуминовым обществом в качестве стандартов.

Таблица 2 — Свойства гуминовых веществ, использованных в работе

Вещество	Соотношение элементов			M, кДа	Содержание углерода в структурном фрагменте, %			
	H/C	O/C	C/N		$\sum C_{C=O}$	$\sum C_{COO}$	$\sum C_{Ar}$	$\sum C_{Alk}$
Гуминовые кислоты угля (CHA)	0.87	0.50	53	9.9	5.7	19.0	62.7	12.5
Речные фульвокислоты (SRFA)	0.99	0.62	91	6.9	7.4	19.6	33.2	39.8
Речные гуминовые кислоты (SRHA)	0.97	0.60	52	10	8.5	18.1	36.1	37.3
Фульвокислоты торфа (PFA)	1.02	0.67	28	32	3.0	15.2	32.4	49.4
Гуминовые кислоты торфа (PHA)	0.93	0.50	57	33	2.3	12.8	38.9	46.0

2.2 Методы

2.2.1 Жидкостная сцинтилляционная спектрометрия

Радиоактивность препарата находили по измерению скорости счета, смешивая препараты со сцинтилляционной жидкостью Opti Phase (PerkinElmer), на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1215 (LKB Wallac). При измерении хроматографических пластинок на сканере радиоактивности БетаХром (опытный образец, Институт Молекулярной Генетики РАН) использовали сцинтилляционную жидкость ScintiVerse^{TM} BD Cocktail (Fisher Scientific).

Измерение скорости счета азотнокислых растворов, полученных при разложении растений §3.4.3*Определение содержания ДН в растениях по радиоактивности растворов, полученных разложением частей растений в*

азотной кислоте, проводили в следующих сцинтилляционных жидкостях: Opti Phase, ScintiVerse Bio-HP, и самостоятельно приготовленной жидкости, состав: диоксан, содержащий нафталин 60 г/л, 2.5-дифенилоксазол (PPO) 4 г/л, 5-фенил-2-[4-(5-фенил-1,3-оксазол-2-ил)фенил]-1,3-оксазол (POPOP) 0.2 г/л. Для определения условий корректного измерения проводили следующие операции. Готовили золь [^{3}H]ДН-С в HNO_3 (54%) с удельной радиоактивностью 139 МБк/л. Аликвоты раствора, объемом 10, 20 и 30 мкл и растворили в 1 мл сцинтилляционной жидкости. Кроме того, пробы объемом 10, 20, 30 мкл разбавили в 100 мкл воды и добавили в 1 мл сцинтилляционной жидкости. Измерили скорость счета полученных препаратов. Измерения проводили сразу, через 1 час 40 минут и на следующие сутки, таблица 3.

Таблица 3 — Эффективность регистрации скорости счета азотнокислых растворов в сцинтилляторе Opti Phase

Объем аликвоты, мкл	Радиоактивность аликвоты, кБк	Измерено, кБк	Зарегистрировано, %
9.6±0.1	1.33±0.01	1.33±0.02	100
18.5±0.1	3.95±0.01	3.36±0.02	85
30.3±0.1	4.20±0.01	3.16±0.02	75
10.1±0.1*	1.40±0.01	1.35±0.02	96
22.1±0.1*	3.07±0.01	2.00±0.02	65
30.8±0.1*	4.27±0.01	2.31±0.02	54

*разбавление в 100 мкл воды

2.2.2 Спектрофотометрия

Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне регистрировали на однолучевом спектрофотометре u-5100 (Hitachi). Измерения проводили в кварцевых кюветах (l = 10.00 мм). Оптическую плотность измеряли с шагом 1 нм, время экспозиции 2 секунды на каждое измерение.

2.2.3 Метод динамического рассеяния света и определение электрокинетического потенциала

Распределение частиц по размеру, ζ–потенциал частиц ДН и их агрегатов в дистиллированной воде был получен с помощью системы для характеризации наночастиц Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., UK). Для исследования коллоидные растворы разбавляли до концентрации 0.01 г/л. Измерения проводили при угле детектирования 173° и температуре 298 K. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Интенсивность распределения по размеру была получена из анализа корреляционной функции с использованием алгоритма программного обеспечения инструмента.

2.2.4 Инфракрасная спектроскопия

ИК-Фурье спектры регистрировали с помощью спектрометра Nicolet Protege 460 в диапазоне волновых чисел от 400 до 4000 $см^{-1}$ при оптическом разрешении 4 $см^{-1}$. Для проведения количественной оценки, брали навеску порошка наноалмаза 1 мг, которую смешивали с порошком KBr, прессовали в таблетку и помещали в прибор. Расшифровку спектров проводили на основании работ [8; 128; 157—167]. ИК-Фурье спектры в средней ИК области приведены на рисунке 2.5.

Для всех образцов ДН характерна широкая полоса с максимумом в районе 3400 $см^{-1}$, относящаяся к колебаниям поверхностных ОН-групп, адсорбированной воды и водородных связей [157; 158]. Полосы в области 2800-3000 $см^{-1}$ отвечают валентным колебаниям CH_x. На рисунке 2.6 выделена, так называемая, «область отпечатков пальцев».

Пик при 1631 $см^{-1}$, наиболее интенсивно выраженный для образцов ДН-С и ДН-15, обусловлен наличием адсорбированной воды и ОН-групп [159—161], которая остается даже после вакуумирования при 373 K. Во всех исследуемых образцах присутствует полоса с максимумом при 1723 $см^{-1}$ обусловленная колебаниями связи С=О в любой возможной группе [161]. Для наноалмазов

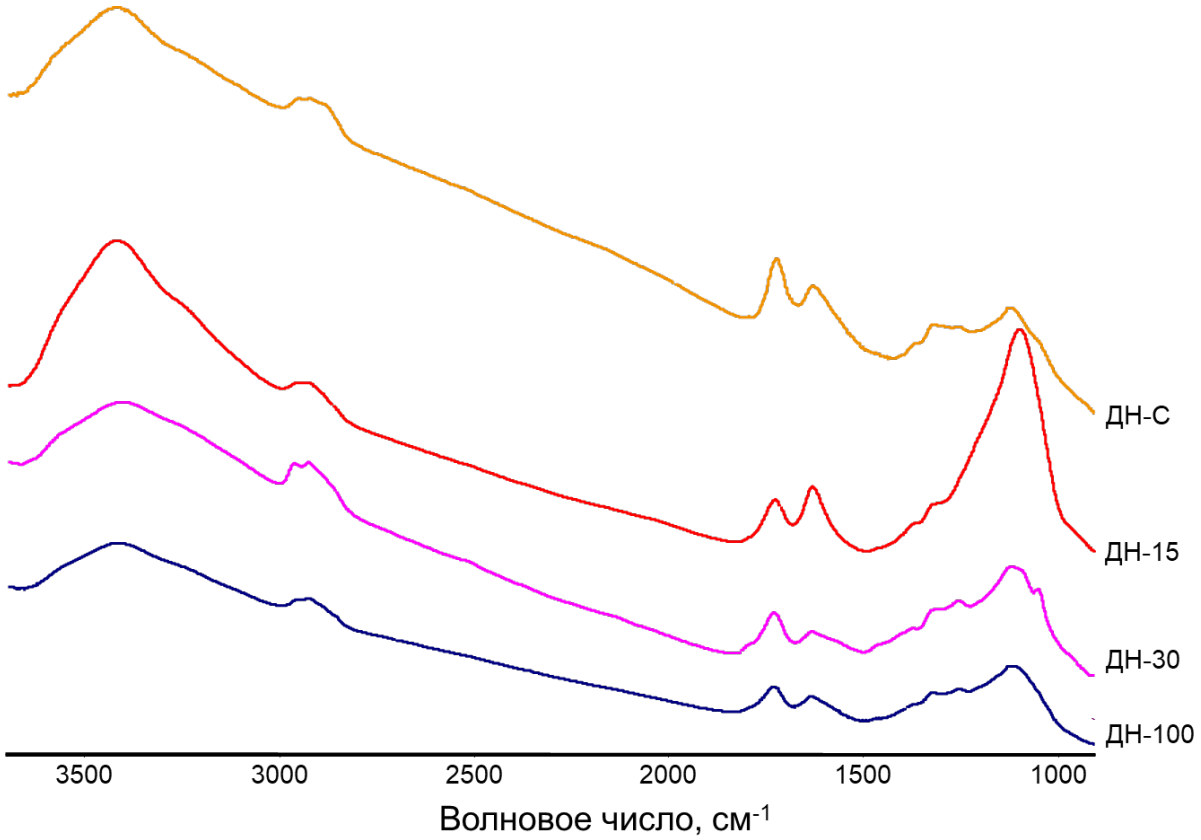


Рисунок 2.5 — Спектры поглощения в средней ИК области (400-4000 см$^{-1}$) наноалмазов производства НП ЗАО «Синта» и ООО «СКН»

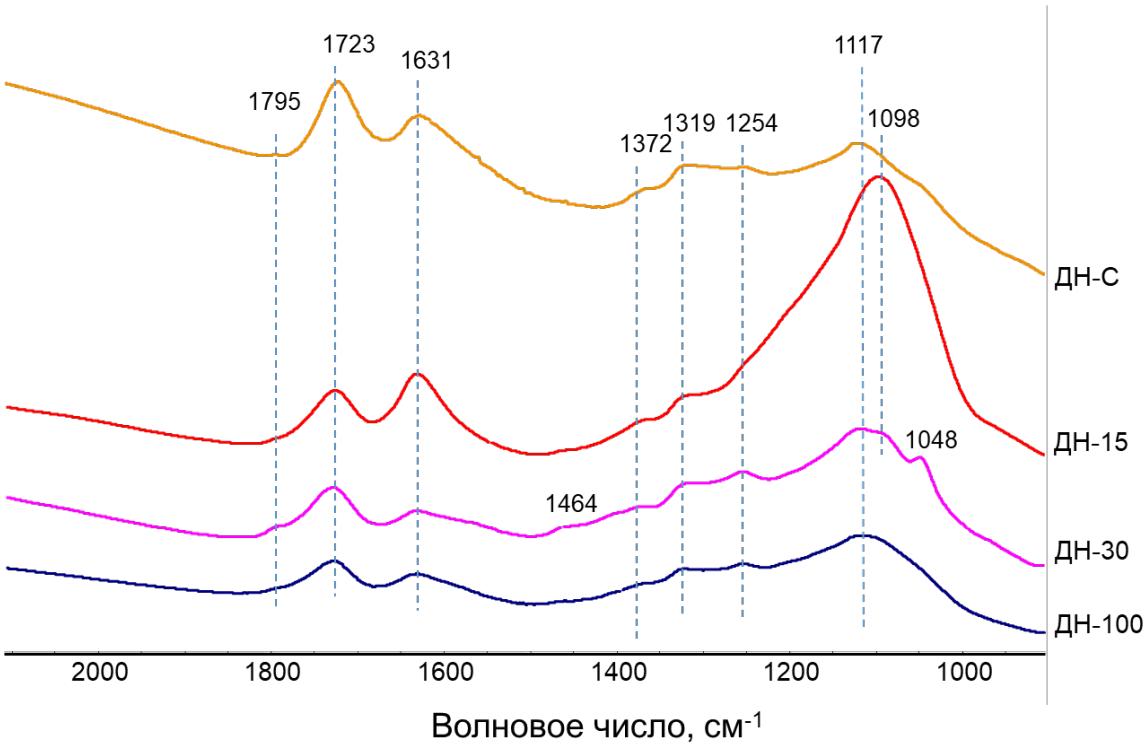


Рисунок 2.6 — ИК-спектры наноалмазов в области 400-2000 см$^{-1}$

производства ООО «СКН» можно выделить слабый сигнал 1795 $см^{-1}$ карбоксильных групп [128] или структур –C(O)-O-C(O)– [8; 128; 162]. Слабая полоса при 1464 $см^{-1}$ связана с колебаниями C-H связей в CH_x-группах [163]. Пик с максимум при 1372 $см^{-1}$ относится к колебаниям нитрогруппы [164; 165], которая появляется на стадии выделения наноалмазов из алмазной шихты и их очистке. Авторы работы [160] относят сигнал при 1370 $см^{-1}$ к колебаниям эфирных и эпоксидных связей, а в работе [161] сигналы в диапазоне 1320-1370 $см^{-1}$ относят к σ (C-O^-), а в области 1100-1110 $см^{-1}$ относят к σ (C-O-C). О присутствии на поверхности эпоксидных и эффирных групп свидетельствует сигнал при 1254 $см^{-1}$ [159]. В работе [164; 166] относят пик в области 1110-1130 $см^{-1}$ к колебаниям CH-связей. Сигнал при 1048 $см^{-1}$ относится к σ (C-OH) [159; 167]. В приложении А представлены ИК-спектры образцов УДА-ТАН и ТАН-О.

2.2.5 Тонкослойная хроматография

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol и Silica Gel on Aluminum (Sigma-Aldrich). Положение веществ на пластинках фиксировали в иодной камере и под ультрафиолетом, а также сканированием узкой полоски хроматограммы меченого соединения на сканере БетаХром. При очистке методом препаративной тонкослойной хроматографии препарат меченого соединения растворяли в 0.2 мл H_2O или C_2H_5OH, наносили на стартовую линию по всей ширине пластинки и проводили хроматографию. Положение вещества на пластинке определяли с помощью хроматографии исходного соединения в тех же условиях, а также сканированием узкой полоски хроматограммы меченого соединения на сканере радиоактивности БетаХром. Затем силикагель из области пластинки с препаратом перенесли во флакон и проводили элюирование вещества.

2.2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Анализ меченного тритием мирамистина проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1200 HPLC, колонка 0.46×15 см Eclipse XDB-C8 (5 μm), 298 K. В качестве подвижной фазы использовали линейный градиент воды, ацетонитрила и 1% трифторуксусной кислоты, скорость потока 1.5 мл/мин. Регистрацию проводили по УФ-поглощению при длине волны 260 нм, время удерживания мирамистина составило 3.4 мин, сбор фракций по 30 с.

Анализ очищенного с помощью ТСХ препарата [^{3}H]ГПК проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Millichrome-5» HPLC chromatograph. Использовали колонку Nucleosil 120-5 C4 2x75 мм, dp 5 мм при температуре 308 K. Применяли градиентный режим: элюент A 0.1% трифторуксусная кислота в воде, элюент B ацетонитрил и 0.1% трифторуксусная кислота, скорость потока 0.1 мл/мин, детекция при 220 нм, сбор фракций по 30 с. Время удерживания 10.2 минуты определили по немеченому стандарту ГПК.

2.2.7 Эксклюзионная хроматография

Анализ меченных тритием гуминовых веществ проводили с помощью гель-фильтрации (SEC) на хроматографической системе Abimed по методике [168]. Система состоит из ВЭЖХ насоса, автосэмплера, стеклянной колонки (25 мм×25 см) и снабжена спектрофотометрическим УФ-детектором. Использовали колонку, заполненную гелем «Toyopearl» TSK HW-55S (Toso-Haas, Япония). В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буфер (состав: Na_2HPO_4 8.0 мМ, K_2HPO_4 2.0 мМ, NaN_3 8.0 мМ, pH 6.8). УФ-поглощение элюата детектировали при 254 нм.

2.2.8 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

Измерения проводили на аксиальном спектрометре ICP-AES 720-ES (Agilent Technologies) с кварцевой горелкой с внутренним диаметром инжектора 2.3 мм (Glass Expansion) двухходовой циклонической распылительной камерой (Agilent Technologies), концентрическим небулайзером (распылителем) Seaspray (Glass Expansion) и набором международных стандартов Trident (Glass Expansion). Отбор проб в спектрометр проводился вручную без использования автосэмплера с помощью перистальтического насоса с поливиниловыми трубками (маркировка белая/белая, на подачу образца; маркировка голубая/голубая, для дренажа камеры). Внутренний стандарт скандия (Sc, 10 ppm) добавляли (маркировка трубки оранжевая/голубая) для увеличения точности измерения. Условия измерений ICP-AES представлены в приложении Б. Все данные собирались и обрабатывались при помощи программного обеспечения ICP Expert версии 2.0.5 (Agilent Technologies). Все линии измеряли одновременно, калибровку строили в режиме MultiCal, используя только линейные функции.

2.2.9 Просвечивающая электронная микроскопия

Для изучения структуры частиц наноалмазов был использован метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Анализ проводили на просвечивающем электронном микроскопе ультравысокого разрешения марки JEM-2100 F (JEOL, Япония). Изображения получены к.х.н. Егоровым А.В.

2.3 Синтез меченных тритием соединений

В таблице 4 приведены общие сведения полученных меченных тритием соединений.

Таблица 4 — Свойства полученных меченных тритием соединений, использованных в методе радиоактивных индикаторов

Вещество	Метод очистки	Метод анализа	$A^1_{уд}$, ТБк/г	Радиохимическая чистота, %
ПК[а]	ТСХ	ТСХ	0.57	95
ПК[б]	ТСХ	ТСХ	0.98	93
ГПК[а]	ТСХ	ТСХ	0.33	94
ГПК[б]	ТСХ	ВЭЖХ	0.67	95
ФПК[а]	ТСХ	ТСХ	0.24	96
ФПК[б]	ТСХ	ТСХ	0.17	93
мирамистин	ТСХ	ВЭЖХ	0.24	95
P123	ТСХ	ТСХ	0.06	93
олеиламин	экстракция	–	0.10	–
CHA	диализ[2]	SEC	0.33	–
SRFA	диализ[2]	SEC	0.22	–
SRHA	диализ[2]	SEC	0.05	–
PFA	диализ[2]	SEC	0.18	–
PFA	диализ[3]	SEC	0.18	–
PHA	диализ[2]	SEC	0.28	–
PHA	диализ[3]	SEC	0.26	–

[1]Удельная радиоактивность

[2]Мембрана 2 кДа

[3]Мембрана 12 кДа

[а]Температура мишени в время реакции 77 K

[б]Температура мишени в время реакции 298 K

2.3.1 Общая методика

Методику введения трития методом термической активации можно условно разделить на следующие этапы:

- подготовка образца
- подготовка мишени
- проведение реакции
- сбор продукта
- очистка и анализ продукта

Для ДН подготовка образца состояла в получении стабильных суспензий. Для ряда образцов проводили дополнительную обработку ультразвуком согласно описанному в разделе § 2.1.1 *Наноалмазы детонационного синтеза.* Для остальных веществ, из которых получали меченые соединения, подготовка заключалась в приготовлении раствора с необходимой концентрацией. На рисунке 2.7 представлена схема расположения сосуда и охладителя при температуре мишени 77 и 295 K.

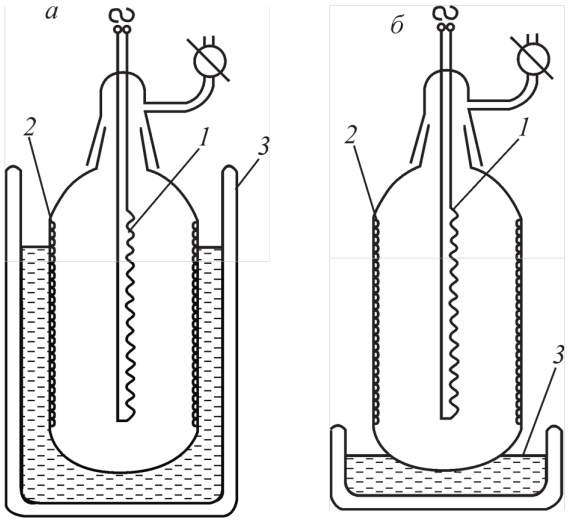


Рисунок 2.7 — Схема расположения реакционного сосуда и охладителя для экспериментов с температурой мишени, а – 77 K и б – 295 K. 1 – вольфрамовая нить, 2 – вещество на стенках реакционной колбы, 3 – емкость с жидким азотом [169]

Подготовку мишени проводили следующим образом: наносили вещество на стенки реакционного сосуда и распределяли равномерно, замораживали в

жидком азоте, затем лиофилизовали. Реакционный сосуд присоединяли к установке для работы с газообразным тритием [170] и вакуумировали до давления 0.01 Па. Затем, пропуская через Pd–фильтр, наполняли тритий-протиевой смесью до давления 1.3 Па (в случае если охлаждали дно сосуда жидким азотом) или 0.5 Па (если охлаждали весь реакционный сосуд жидким азотом). В работе использовали смесь газообразного трития и протия (ПО «Маяк», РФ), соотношение изотопов водорода определяли в контрольных экспериментах как описано в работе [104]. Все данные по радиоактивности представлены в пересчете на 100% трития в газовой смеси. Реакцию проводили при нагревании вольфрамовой проволоки электрическим током в течение 10 с. В случае, если процедуру повторяли, то перед каждым воздействием остаточный газ удаляли и систему наполняли новой порцией газовой смеси. Анализ и очистка продукта подробно описаны в соответствующих разделах.

2.3.2 Наноалмазы детонационного синтеза

Сухое количество ДН, взятое на мишень, составило от 0.2 до 0.6 мг в объеме 0.8-1.0 мл коллоидного раствора. После вакуумирования систему наполняли тритий-протиевой смесью до давления 1.3 Па, содержание трития составляло от 10 до 62%. Реакцию проводили в течение 10 с при температуре вольфрамовой проволоки 2000 K. Дно реакционного сосуда охлаждали жидким азотом. Процедуру проводили от 2 до 16 раз.

Продукт реакции растворяли в 4 мл (2 порции по 2 мл) деионизированной воды. Определили скорость счета аликвоты препарата. Через 24 ч при комнатной температуре проводили высушивание на роторном испарителе для удаления трития из лабильных положений. К остатку добавили 2 мл воды и определили скорость счета аликвоты препарата. Концентрацию полученного коллоидного раствора ДН определяли спектрофотометрически как описано в разделе § 2.3.3 *Определение концентрации меченных тритием наноалмазов.*

2.3.3 Определение концентрации меченных тритием наноалмазов

Для получения калибровочных зависимостей использовали наноалмазы отличающиеся по происхождению и химическому составу поверхности (УДА-ТАН, ТАН-Н, ТАН-О, ДН-С, ДН-15, ДН-30, ДН-100). В приложении В приведены спектры поглощения суспензий наноалмазов. Каждый полученный спектр описали уравнением 2.1:

$$A = k \times \lambda^{-n} \tag{2.1}$$

где A – оптическая плотность, k – коэффициент, λ – длина волны, n – показатель степени [171]. Представим коэффициент k в виде функции от концентрации

$$k(c) = B \times c \tag{2.2}$$

где c – концентрация, B – коэффициент. Вне зависимости от типа наноалмазов коэффициент B имеет экспоненциальную зависимость от показателя n, рисунок 2.8.

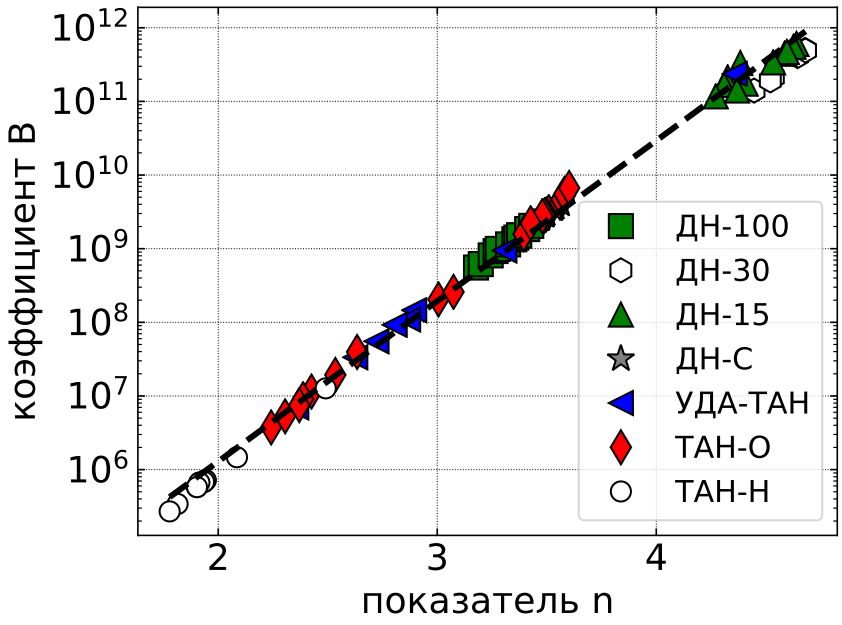


Рисунок 2.8 — Зависимость B от n для наноалмазов разных серий; пунктирная линия – аппроксимация экспоненциальной функцией; символы – значения коэффициентов полученные по уравнениям (2.1) и (2.2)

Концентрацию меченных тритием ДН в суспензии определяли следующим образом:

- получили спектр поглощения образца в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм;
- спектр описали уравнением 2.1 и определили коэффициенты k и n для образца;
- по калибровочной зависимости вычислили коэффициент B, рисунок 2.8, уравнение 3.1;
- рассчитали концентрацию по уравнению $c = k/B$.

2.3.4 Производные пантотеновой кислоты

Количество вещества, взятое на мишень, составило 0.3 мг. Содержание трития в газовой смеси 20%, температура вольфрамовой проволоки 1800 К. Использовали два режима введения трития, отличающиеся температурой мишени – 77 К и 295 К. В первом случае охлаждали жидким азотом весь реакционный сосуд, во втором – охлаждали только дно колбы. После реакции вещество со стенок колбы смывали водой (2 порции по 2 мл), переносили в круглодонную в колбу объемом 10 мл и измеряли скорость счета аликвоты препарата. Затем для удаления лабильной метки раствор полностью осушили на роторном испарителе, растворили в 1 мл воды, снова измеряли скорость счета аликвоты препарата. Анализ и очистку меченых препаратов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol. Хроматографическую систему аммиак:этанол в соотношении 1:1 по объему применяли для ГПК и ГК, аммиак:вода:изопропанол в соотношении 1:2:7 для ФПК. Положение веществ на пластинках фиксировали в иодной камере, а также сканированием узкой полоски хроматограммы меченного соединения на сканере БетаХром, приложение Г. После очистки для [^{3}H]ГПК провели ВЭЖХ анализ.

2.3.5 Бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммонийхлорид

Количество мирамистина, взятое на мишень, составило 0.8 мг. Содержание трития в газовой смеси составило от 27% до 84%, температура вольфрамовой проволоки 1800 К. Весь реакционный сосуд охлаждали жидким азотом. После реакции мирамистин со стенок колбы смывали водой (2 порции по 2 мл), переносили в круглодонную в колбу объемом 10 мл и измеряли скорость счета аликвоты препарата. Затем для удаления лабильной метки раствор полностью осушили на роторном испарителе, растворили в 1 мл воды, снова измеряли скорость счета аликвоты препарата. Анализ [^{3}H]мирамистина проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silica Gel Sigma Aldrich в системе хлороформ:этанол:аммиак в соотношении 11:21:6 по объему. Положение вещества на пластинке фиксировали под ультрафиолетом, а также сканированием

узкой полоски хроматограммы меченного соединения на сканере БетаХром, приложение Г.

Радиохимическая чистота составила 95% по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии. Удельная радиоактивность препарата [^{3}H]мирамистина составила 0.51 ТБк/ммоль.

2.3.6 Плюроник P123

Раствор 1.0 мг P123 в этаноле нанесли равномерно на стенки реакционного сосуда и высушили на воздухе. Содержание трития в реакционной смеси составило 30%, температура вольфрамовой проволоки – 1890 K. Весь реакционный сосуд охлаждали жидким азотом. После реакции вещество со стенок колбы смывали этанолом (2 порции по 2 мл), переносили в круглодонную в колбу объемом 10 мл и измеряли скорость счета аликвоты препарата. Раствор через сутки полностью осушили на роторном испарителе, растворили в 1 мл этанола, снова измерили скорость счета аликвоты препарата. Анализ препарата [^{3}H]P123 проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках *Silufol*, система хлороформ:метанол в соотношении 13:1 по объему. Положение вещества на пластинке фиксировали в иодной камере, $R_f = 0.18$. Очистку проводили препаративной тонкослойной хроматографией. Вещество с силикагеля элюировали в 3 мл метанола. Радиохроматография очищенного препарата показала, что его радиохимическая чистота составляет 93%. Удельная радиоактивность препарата [^{3}H]P123 составила 0.36 ТБк/ммоль.

2.3.7 Олеиламин

Раствор, содержащий 0.6 мг олеиламина в октане, нанесли равномерно на стенки реакционного сосуда и удалили октан испарением в токе газа при непрерывном вращении сосуда. Содержание трития в реакционной смеси составило 46%, температура вольфрамовой проволоки – 1850 K. Весь реакционный сосуд охлаждали жидким азотом. После реакции вещество со стенок колбы смывали

октаном (2 порции по 2 мл), переносили в круглодонную в колбу объемом 10 мл и измеряли скорость счета аликвоты препарата. Раствор через сутки полностью осушили на роторном испарителе, растворили в 1 мл октана, снова измерили скорость счета аликвоты препарата. Очистку препарата [^{3}H]олеиламина проводили экстракцией примесей в воду. Коэффициент распределения определяли по отношению радиоактивности растворителей. Воду в системе заменяли и повторяли экстракцию до постоянства коэффициента распределения. Удельная радиоактивность препарата [^{3}H]олеиламина составила 0.10 ТБк/г.

2.3.8 Гуминовые вещества

Получение меченных тритием гуминовых веществ описано на примере гуминовых кислот СНА. Для этого 1 мл раствора гуминовой кислоты (0.3 г/л) в 0.5 мМ NaOH равномерно наносили на стенки цилиндрического реакционного сосуда и лиофилизовали. Реакционный сосуд с мишенью ГК подключали к установке для работы с газообразным тритием и вакуумировали, затем наполняли сосуд тритием до давления 0.5 Па. Вольфрамовую нить, расположенную в центре сосуда, электрическим током нагревали до температуры 1950 К. При этом весь реакционный сосуд охлаждали жидким азотом. Остаточный газ удаляли, мишень смывали порциями по 2 мл фосфатного буфера. Для удаления трития из лабильных положений (OH-, COOH-, NH_n- и др.) проводили диализ при 277 К через диализные мембраны 2 и 12 кДа против фосфатного буфера. Удельная радиоактивность [^{3}H]СНА после очистки с помощью гельфильтрации составила 1.25 ТБк/г, выход – 84%. По такой же методике получали гуминовые кислоты торфа, речные фульво- и гуминовые кислоты, таблица 4.

2.4 Адсорбционные эксперименты

Описание эксперимента. Изучение адсорбции всех веществ на ДН проводили по следующей схеме. Подготовили и охарактеризовали суспензии наноалмазов. Приготовили раствор исследуемого вещества, добавили радиоактивный индикатор. Получение меченных тритием исследуемых веществ описано в §2.3 *Синтез меченных тритием соединений*. Затем проводили смешение суспензии с раствором и термостатирование до достижения системой равновесия. Время, необходимое для достижения системой равновесия, определили в ряде экспериментов проводя термостатирование в течение от 1 до 7 дней. Эксперименты проводили в полипропиленовых микроцентрифужных пробирках типа Eppendorf, объемом 2.0 мл. Количество наноалмазов в системе составляло 1 мг, концентрацию адсорбируемого вещества варьировали. В таблице 5 общие сведения об исследуемых системах. Проводили центрифугирование и измеряли скорость счета аликвоты раствора над осадком, по уравнению 2.3 определяли равновесную концентрацию исследуемого вещества. Рассчитывали величину адсорбции согласно уравнению 2.4. Маточный раствор удаляли и заменяли новой порцией растворителя. Цикл центрифугирование – замена надосадочного раствора проводили несколько раз, контролируя скорость счета аликвоты промывного раствора. Затем к осадку добавляли жидкий сцинтиллятор и проводили измерение скорости счета препарата каждые сутки до постоянства скорости счета препарата. Рассчитывали величину необратимой адсорбции по уравнению 2.5. Для определения прочности удерживания адсорбированного вещества эксперимент по адсорбции повторяли полностью и, вместо добавления жидкого сцинтиллятора, к осадку наноалмазов добавляли раствор, в котором после достижения системой равновесия определяли величину остаточной адсорбции.

$$c = \frac{I}{\varepsilon \cdot V \cdot a_{\text{уд}}} \tag{2.3}$$

$$\Gamma_\infty = \frac{(c_0 - c) \cdot V_o}{m} \tag{2.4}$$

$$\Gamma = \frac{I_{\text{р-ра}}/\varepsilon - a_{\text{ост}}}{m \cdot a_{\text{уд}}} \tag{2.5}$$

где Γ_∞ и Γ равновесная и необратимая адсорбция соответственно, $a_{\text{ост}}$ - радиоактивность раствора после отбора промывного раствора, $a_{\text{уд}}$-удельная радиоактивность исходного раствора, m-масса навески наноалмаза, I и $I_{\text{р-ра}}$ - скорость счета β-излучения трития аликвоты и всего объема раствора соответственно, ε-эффективность регистрации, V-объем аликвоты, c_0 - начальная концентрация, V_o - объем раствора.

2.4.1 Производные пантотеновой кислоты

Изотермы адсорбции были получены в диапазоне концентраций от 0.1 до 15.7 г/л (ГПК); от 0.15 до 10.8 г/л (ПК); от 0.01 до 4.1 г/л (ФПК). Ряд экспериментов проводили в 0.9% растворе NaCl (физиологический раствор). Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток. Определили влияние температуры на величину адсорбции ГПК и ПК, для этого эксперимент проводили при 277, 297 и 310 K. Адсорбцию ГПК изучили на порошке наноалмазов ДН-С, навеска наноалмазов составляла 15 мг. На наноалмазах ДН-100, ДН-30, ДН-15 адсорбцию определили при концентрациях 10 г/л для ГПК, 5 г/л для ПК и 5 г/л для ФПК. Прочность удерживания меченых соединений в составе композитов определяли в десорбционных экспериментах. Десорбцию изучали в раствор соляной кислоты, бычьего сывороточного альбумина 40 г/л (БСА), физиологический раствор и воду в течение 15 суток при температуре 310±1 K.

2.4.2 Бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний хлорид моногидрат

Адсорбцию мирамистина на ДН-С изучили в диапазоне концентраций от 0.15 до 13 мМ. На ДН-С, модифицированных гуминовыми кислотами угля, адсорбцию изучали в диапазоне концентраций от 0.15 до 6 мМ, §2.4.7 *Коадсорбция мирамистина и гуминовых кислот угля.* Для определения кинетики адсорбции мирамистина проводили определение адсорбции через 6 часов, 2 и 6 суток, при

Таблица 5 — Общие сведения об исследуемых системах

Адсорбат	Адсорбент	Условия эксперимента		
		T, K	концентрация	среда
ГПК	порошок ДН-С	297	от 0.2 до 9.7 г/л	вода
ГПК	ДН-С	297	от 0.10 до 15.7 г/л	вода; 0.9% NaCl
ПК		297	от 0.15 до 10.8 г/л	
ФПК		297	от 0.01 до 4.1 г/л	
ГПК	ДН-С, ДН-100, ДН-30, ДН-15	297	9 г/л	вода
ПК		297	5 г/л	
ФПК		297	1.7 г/л	
мирамистин	ДН-С	297	от 0.15 до 13 мМ	вода
	ДН-С-СНА	297	от 0.15 до 6 мМ	
	ДН-С-Р123	297	от 0.15 до 6 мМ	
	ДН-С-О	297	4 мМ	
Р123	ДН-С	297	0.1 мкМ до 0.6 мМ	вода
олеиламин	ТАН-О	297	0.3 до 19.1 мМ	октан
СНА	ДН-С	297	от 0.03 до 0.20 г/л	фосфатный буфер
SRFA		297		
SRHA		297		
PFA		297		
PHA		297		
СНА	ДН-С-ША	297	от 0.03 до 0.20 г/л	фосфатный буфер
СНА	ДН-С	297	от 0.03 до 0.20 г/л	вода
СНА	ДН-С-О	297		
СНА	RUDDM-150	297		

концентрации мирамистина 3.4 мМ. Оказалось, что значения адсорбции составили 26 и 63 ммоль/г после 6 часов и 2 суток выдерживания соответственно. Более продолжительное выдерживание систем не приводило к изменениям величины адсорбции. Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток. Десорбцию изучали в воду, фосфатный буфер, натрий-фосфатный буфер (PBS, pH 6.8, состав: Na_2HPO_4 8.0 мМ, K_2HPO_4 2.0 мМ, NaN_3 8.0 мМ, NaCl 15.5 мМ), БСА 40 г/л в течение 5 суток при температуре 297±2 K.

2.4.3 Плюроник P123

Адсорбцию плюроника P123 на ДН-С изучили в диапазоне концентраций от 0.1 мкМ до 0.6 мМ. Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток. Десорбцию изучали в воду, фосфатный буфер, натрий-фосфатный буфер PBS, БСА 40 г/л, мирамистин от 0.04 до 8.0 мМ в течение 5 суток при температуре 297±2 K.

2.4.4 Олеиламин

Адсорбцию олеиламина на ТАН-О в октане изучили в диапазоне концентраций от 0.3 мкМ до 19.1 мМ. Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток.

2.4.5 Гуминовые вещества

Эксперимент проводили в фосфатном буфере для гуминовых кислот торфа и угля, речных и фульво- и гуминовых кислот на наноалмазах ДН-С. Для гуминовых кислот угля СНА (раствор натриевой соли) был проведен дополнительный эксперимент в дистиллированной воде при отсутствии буфера. Дополнительно адсорбцию СНА изучали на наноалмазах RUDDM-150 в воде, на

порошке алмазосодержащей шихты ДН-С-ША в фосфатном буфере. Навеска ДН-С-ША составляла 15 мг. Адсорбцию ГВ изучали в диапазоне концентраций от 30 до 200 мкг/мл. Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток. Десорбцию СНА изучали в воду, фосфатный буфер, БСА 40 г/л, мирамистин 8.0 мМ, KOH 3.0 М в течение 2 суток при температуре 297±2 K. Десорбцию остальных ГВ изучали в фосфатный буфер.

2.4.6 Коадсорбция плюроника P123 и мирамистина

Изучение адсорбции мирамистина на наноалмазах ДН-С, модифицированных плюроником P123 (ДН-С-P123), проводили в диапазоне концентраций от 0.15 до 5 мМ. Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток. Десорбцию изучали в воду, фосфатный буфер, натрий-фосфатный буфер PBS, БСА 40 г/л в течение 5 суток при температуре 297±2 K. Получение композита ДН-С-P123 осуществляли следующим образом: приготовили суспензию, содержащую 1 мг ДН-С, в растворе плюроника P123 с концентрацией 0.4 мМ; термостатировали двое суток при температуре 297±2 K, затем раствор центрифугировали 15 минут при 13 400 об/мин и заменили надосадочный раствор дистиллированной водой; повторили цикл центрифугирование – замена надосадочной жидкости еще два раза. Количество плюроника P123 в системе определяли расчетом по данным адсорбции плюроника P123 на ДН-С, полученным с применением [^{3}H]P123.

2.4.7 Коадсорбция гуминовых кислот угля и мирамистина

Изучение адсорбции мирамистина на наноалмазах ДН-С, модифицированных гуминовыми кислотами СНА (ДН-С-СНА), проводили в диапазоне концентраций от 0.15 до 5 мМ. Термостатирование проводили при температуре 297±2 K в течение двух суток. Десорбцию изучали в воду, фосфатный буфер, натрий-фосфатный буфер, БСА 40 г/л в течение 5 суток при температуре 297±2 K. Получение композита ДН-С-СНА осуществляли следующим

образом: приготовили суспензию, содержащую 1 мг ДН-С, в растворе натриевой соли СНА с концентрацией 60 мг/л; термостатировали двое суток при температуре 297±2 К, затем раствор центрифугировали 15 минут при 13 400 об/мин и заменили надосадочный раствор дистиллированной водой; повторили цикл центрифугирование – замена надосадочной жидкости еще два раза. Количество СНА в системе определяли расчетом по данным адсорбции СНА на ДН-С, полученным с применением [^{3}H]СНА.

2.5 Изучение поведения наноалмазов в системах, моделирующих биологические объекты

2.5.1 Исследование распределения наноалмазов между водной и органической фазами

Суспензии [^{3}H]ДН-С (исходных, или модифицированных ДН-С-Р123, ДН-С-СНА, ДН-С-мирамистин, ДН-С-Р123-мирамистин, ДН-С-СНА-мирамистин) или [^{3}H]ТАН-О готовили с концентрацией 0.2 г/л. Добавляли 1 мл органической жидкости (октан, октанол или п-ксилол) и интенсивно перемешивали в течение 5 минут. Термостатировали сутки при 297±2 К. Определили скорость счета аликвоты водной и органической фазы. Коэффициент распределения D определяли по соотношению содержания наноалмазов в органической фазе к водной. Композиты ДН-С-Р123-мирамистин и ДН-С-СНА-мирамистин получали при последовательной коадсорбции плюроника Р123 или гуминовых кислот и мирамистина на наноалмазах. При этом проводили отделение образующихся композитов от маточного раствора тремя циклами центрифугирования (15 минут при 13 400 об/мин) – заменой надосадочной жидкости. При изучения распределения [^{3}H]ТАН-О эксперимент проводили в двух вариациях: прямой ввод – гидрозоль [^{3}H]ТАН-О приводили в контакт с октаном и обратный – готовили золь [^{3}H]ТАН-О в октане, стабилизируя олеиламином.

2.5.2 Исследование распределения наноалмазов в композитных пленках

С помощью авторадиографии определили распределение наноалмазов [^{3}H]ТАН-О и [^{3}H]ТАН-О-олеиламин в композитных пленках. Пленку помещали между двумя детекторами Kodak. Провели две серии экспериментов: в одном тритий содержался в исходных ДН, в другом – в модифицированных ДН. После обработки авторадиограмм рассчитывали количество исходных и модифицированных ДН в поверхностных слоях пленки. Композитные пленки готовили из

водной дисперсии ДН и поливинилового спирта (ПВС) при ультразвуковой обработке. Для этого помещали суспензию ДН в растворе 3% ПВС в чашку Петри и высушивали при 313 K в течение двух дней до постоянной массы, затем нагревали до 383 K и выдерживали в течение двух часов. Содержание ДН в пленке составляло 0.5, 1.0 или 2.0% от массы ПВС.

2.5.3 Поглощение меченного тритием наноалмаза высшими растениями

Готовили коллоидный раствор ДН-С с концентрацией 15 мг/л и удельной радиоактивностью 37 ГБк/г (240 ГБк/г для дополнительного контрольного эксперимента и смесей с SRFA и SRHA, авторадиография на детекторах Kodak). К гидрозолю [^{3}H]ДН-С добавили ГВ до концентрации 50 мг/л. Состав полученных растворов приведен в таблице 6. Полученные гидрозоли характеризовали с помощью динамического рассеяния света и определили ζ-потенциал. Для проведения экспериментов в качестве тест-объектов использовали проростки мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. линии Л-15. Семена пшеницы проращивали в дистиллированной воде в темноте в течение 72 часов при температуре 297 K. Трёхдневные проростки пшеницы переносили в пол-литровые пластиковые вегетационные сосуды, содержащие питательную среду Кнопа (pH 5.5, состав: H_2PO_4 0.14 г/л, KCl 0.1 г/л, KNO_3 0.14 г/л, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 1.42 г/л, $Ca(NO_3)_2{\cdot}12H_2O$ 4.88 г/л, $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ 0.05 г/л;), и помещали для дальнейшего роста в климатическую камеру (температура 297 K, фотопериод 12 часов). Через 5 дней выращивания восьмидневные проростки пшеницы вынимали из вегетационных сосудов и переносили в пластиковые пробирки, содержащие раствор ДН с ГВ (таблица 6) на 24 часа. По окончании экспонирования растения вынимали из пробирок и проводили учёт биомассы. В оставшихся растворах измерили скорость счета аликвоты, провели анализ размера частиц методом ДРС и определили ζ-потенциал.

Контроль поглощения ДН проростками пшеницы осуществляли: (а) по изменению радиоактивности золя [^{3}H]ДН до и после контакта с растениями,

Таблица 6 — Состав коллоидных растворов ДН для экспонирования растений

№	Гуминовые вещества	Концентраций ГВ, мг/л	Концентрация ДН, мг/л
1	PFA	49	15
2	SRFA*	49	15
3	PFA(<12 кДа)**	49	15
4	PHA(<12 кДа)**	51	15
5	PHA	51	15
6	SRHA*	51	15
7	CHA	50	15
8	–	–	15
9	–	–	14
10	–	–	13

*Повторили эксперимент при удельной радиоактивности [^{3}H]ДН-С 240 ГБк/г

**Фракция, выделенная через диализные мембраны 12 кДа

(б) по изображениям корней и побегов проростков, полученных методом авторадиографии, (в) по радиоактивности растворов, полученных разложением частей растений в азотной кислоте.

Авторадиография проростков пшеницы

Для проведения авторадиографии и определения содержания наноалмазов в растениях растения высушивали: удаляли излишек влаги с корней с помощью фильтровальной бумаги, разделяли на корни и побеги и помещали под пресс на 7 суток.

Рисунок 2.9 — Изображение черно-белой части стандартной пленки IT8 calibration target.

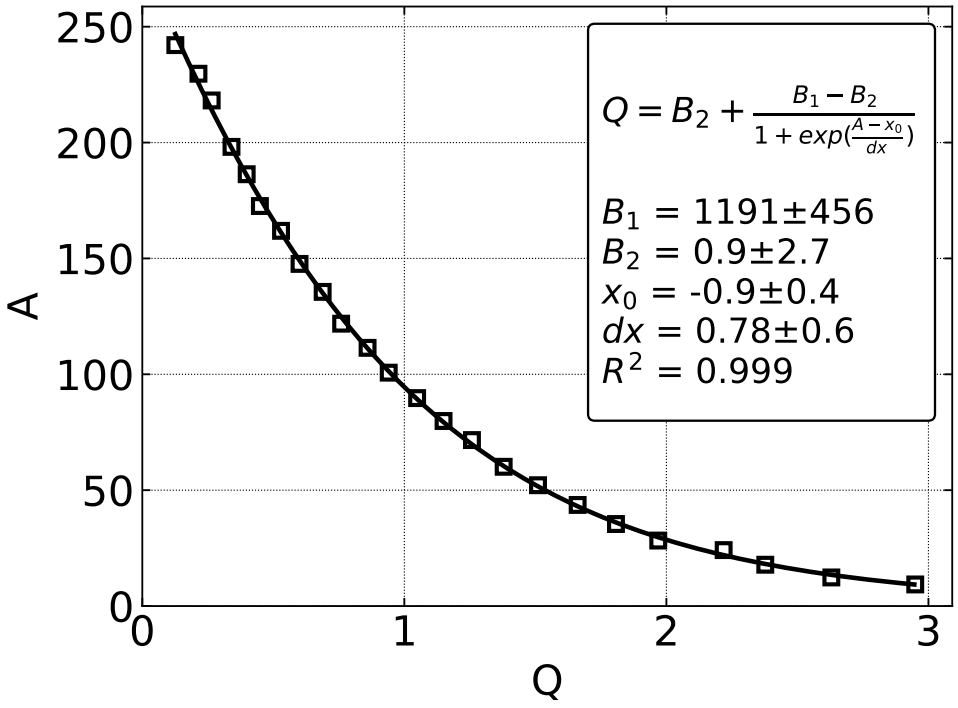


Рисунок 2.10 — Зависимость отклика сканера (Q) от оптической плотности (A) для сканера Epson professional V700.

Применяли следующие растворы для проявления авторадиограмм:
(1) метол 2.2 г/л, Na_2SO_4 (б/в) 72 г/л, гидрохинон 8.8 г/л, Na_2CO_3 (б/в) 48 г/л, KBr 4 г/л (для детектора Retina XBE);
(2) метол 2 г/л, Na_2SO_4 (б/в) 75 г/л, гидрохинон 8 г/л, Na_2CO_3 (б/в) 40 г/л, KBr 5 г/л (для детектора Kodak).

Сухие образцы растений помещали на рентгеновскую пленку Retina XBE. Время экспонирования для получения четкого изображения подбирали экспериментально. При проведении дополнительного контрольного эксперимента, когда удельная радиоактивность наноаламаза составляла 240 ГБк/г, авторадиографию проводили на детекторах Kodak. Время экспонирования корней составило 2 часа, а побегов 21 сутки. После получения изображений пленки сканировали с помощью сканера Epson professional V700. Для определения оптической плотности использовали калибровочную шкалу IT8 calibration target, рисунок 2.9.

Градуировочная зависимость отклика сканера (Q) от оптической плотности авторадиограммы (A) аппроксимировали сигмоидальной зависимостью

вида [172]:

$$Q = B_2 + \frac{B_1 - B_2}{1 + exp(\frac{A - x_0}{dx})} \tag{2.6}$$

где B_1, B_2, x_0, dx – параметры уравнения. Для сканера Epson professional V700 градуировочная зависимость приведена на рисунке 2.10. В программе Adobe Photoshop выбирали область 100×100 пикс авторадиограммы, определяли значение Q из гистограммы и с помощью градуировочной зависимости, приведенной на рисунке 2.10, определяли значение оптической плотности.

Подбор условий экспонирования образцов при авторадиографии

Определение времени экспонирования проводили на детекторах Retina. На рисунке 2.11 приведены фото- и авторадиографические изображения корня после контакта с гидрозолем меченных тритием ДН с удельной радиоактивностью 37 ГБк/г. Для получения авторадиограмм экспонирование проводили 2 и 6 часов. Было показано, что изображение, полученное при экспонировании 6 часов, более четкое, при этом нет «размытых» областей, которые получаются, когда время экспонирования слишком велико. Таким образом, при удельной радиоактивности суспензии ДН 37 ГБк/г для корней было выбрано время экспонирования 6 часов.

Для побегов, радиоактивность которых предполагалась ниже, чем корней [173], время экспонирования при той же удельной радиоактивности наноалмаза было увеличено до 50 и 92 суток, полученные результаты приведены на рисунке 2.12.

По результатам сравнения полученных изображений для побегов растений оптимальным временем экспонирования при удельной радиоактивности суспензии [^{3}H]ДН 37 ГБк/г было выбрано 92 суток. Дальнейшие эксперименты проводили в выбранных условиях или делали поправку на удельную радиоактивность, исходя из принципа – чем больше удельная радиоактивность, тем меньше время экспонирования.

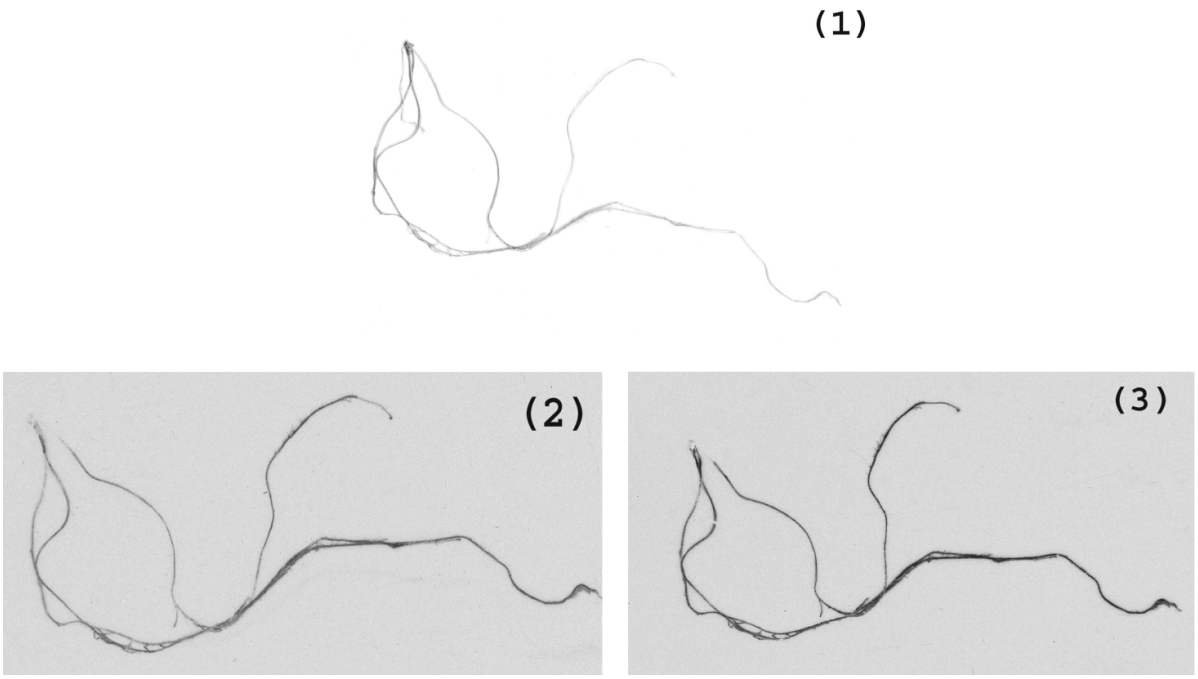


Рисунок 2.11 — Изображения корня после контакта с гидрозолем [^{3}H]ДН-С (37 ГБк/г, Retina): (1) фото, (2) экспонирование 2 часа, (3) экспонирование 6 часов

Определение количества поглощенных растением наноалмазов

Разложение растений проводили в стеклянных флаконах (20 мл), на горлышко флакона надевали полиэтиленовую пленку для защиты крышки от паров азотной кислоты. Высушенные побеги делили на две части – стебли и листья. Взвесив и мелко нарезав, части растений помещали во флакон и добавляли HNO_3 (54%) в количестве 0.6 мл для разложения побегов и 0.8 мл для разложения корней. Чередовали нагревание флаконов на плитке в течение 30 минут и их охлаждение до получения прозрачного раствора. Как правило, для этого было необходимо 3-5 циклов нагревания/охлаждения. Потери жидкости за счет испарения контролировались с помощью весов и составляли 10-30% по массе. Измеряли скорость счета аликвоты полученного раствора. По уравнению 2.7 рассчитывали содержание наноалмазов в частях растения мг/г.

$$m_{\text{ДН/р}} = \frac{I - I_{\text{фон}}}{\varepsilon \times a_{\text{уд}} \times V_1 \times m_p} \times V_2 \tag{2.7}$$

где I и $I_{\text{фон}}$ – скорость счета препарата и фона соответственно, имп/с, ε – эффективность регистрации β-излучения трития, $a_{\text{уд}}$ – удельная радиоактивность

Рисунок 2.12 — Изображения побегов после контакта с гидрозолем [^{3}H]ДН-С (37 ГБк/г, Retina): (1) и (3) фото, (2) экспонирование 50 суток, (4) экспонирование 92 суток.

ДН Бк/г, V_1 – объем измеряемой аликовты л, m_p – масса части растения г, V_2 – объем раствора л.

Изучение фитотоксичности наноалмазов

Восьмилетние проростки пшеницы помещали в флаконы объемом 10 мл, содержащие суспензию ДН (15 мг/л) и ГВ (50 мг/л). Каждый флакон содержал 3 растения. После экспозиции в течение 24 ч фотосинтетическая активность растений были измерена по методологии быстрых световых кривых (Rapid light curves, RLCs). RLCs флуоресценции хлорофилла, а именно относительная скорость электронного транспорта при заданной интенсивности света (rETR), регистрировали на расстоянии 1 см от кончика листа используя флуориметр Imaging-PAM M-Series Chlorophyll Fluorometer (Heinz Walz GmbH, Germany), перед этим проводя адаптацию растения в темноте в течение 2 часов. RLCs были построены по 12 уровням света (4, 14, 24, 59, 204, 334, 414, 504, 604, 714, 834 и 964 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$). RLCs были смоделированы аппроксимацией по уравнению, предложенному в работе [174]:

$$rETR = \frac{E}{\frac{E^2}{\alpha \cdot E_k^2} + \frac{E}{rETR_{max}} - \frac{2 \cdot E}{\alpha \cdot E_k} + \frac{1}{\alpha}} \tag{2.8}$$

где E – плотность потока фотонов, α – коэффициент максимальной утилизации световой энергии, $rETR_{max}$ – максимальная относительная скорость электронного транспорта, E_k – насыщающая интенсивность света. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Для более детального изучения влияния ДН на фотосинтез растений в присутствии SRFA и SRHA определили при одновременной регистрации кинетику быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла, комбинируя с анализом сигнала рассеивания света длиной волны 820 нм. Измерения проводили на

многофункциональном анализаторе M-PEA-2 (Hansatech Instruments, UK). Характеристика прибора и протоколы сбора данных на аппарате M-PEA были подробно описаны в работах [175; 176].

Для этих экспериментов листья проростков пшеницы фиксировали в зажиме, помещали в верхнюю часть измерительной камеры и перед измерением флуоресценции выдерживали в темноте в течение 30 минут. Изменение флуоресценции (OJIP-переходы) было вызвано насыщением образцов красным светом (680 нм, 5000 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$). Анализ переходов OJIP выполняли с применением JIP-теста, который позволяет вычислять набор структурных, конформационных и функциональных параметров, которые определяют количественную эффективность фотосистем II (ФСII) [175].

Для расчета выбранных параметров JIP-теста использовались следующие данные: начальная флуоресценция F_O, измеренная при 20 мкс (на этом этапе все реакционные центры доступны); интенсивность флуоресценции F_J, при 2 мс; интенсивность флуоресценции F_I, при 30 мс; максимальная интенсивность флуоресценции F_M (равна F_P, поскольку использовали насыщающий импульс). Были рассчитаны следующие параметры JIP-теста:

– V_J – относительная переменная флуоресценции на J-стадии, которая отражает долю Q_B не восстанавливающих реакционных центров в ФСII, который не имеет контакта между основным акцептором хинона Q_A и вторичным акцептором хинона Q_B;

– V_I – симбатно уменьшению пула пластохинона;

– PI_{ABS} – отношение энергии фотонов, поглощенных ФСII, к восстановлению межсистемных акцепторов электронов, что характеризует способность растения эффективно осуществлять фотосинтез.

Описанные параметры были рассчитаны по следующим уравнениям:

$$V_J = \frac{F_J - F_O}{F_M - F_O} \tag{2.9}$$

$$V_I = \frac{F_I - F_O}{F_M - F_O} \tag{2.10}$$

$$PI_{ABS} = \frac{1 - F_O/F_M}{M_O - V_J} \cdot \frac{F_M - F_O}{F_O} \cdot \frac{1 - V_J}{V_J} \tag{2.11}$$

где коэффициент M_O – начальный наклон кривой кинетики флуоресценции и может быть рассчитан как:

$$M_O = 4 \cdot (F_{300\mu s} - F_O)/(F_M - F_O) \quad (2.12)$$

Замедленную флуоресценцию измеряли при 0.1 – 0.9 мс, что было выбрано из-за чувствительности параметра к возбуждению мембраны [177—179]. Все эксперименты проводили в пятикратной повторности.

2.5.4 Изучение токсичности наноалмазов и их композитов с мирамистином на клеточной культуре аденокарциномы молочной железы человека MCF-7

В экспериментах применяли композит ДН-С-мирамистин, содержащий тритий или в наноалмазах или в мирамистине. Получение композита проводили выдерживанием 0.7 мг ДН-С в растворе мирамистина с концентрацией 4 мМ в течение двух суток. Отделение образующегося композита от маточного раствора семью циклами центрифугирования (15 минут при 13 400 об/мин) – заменой надосадочной жидкости. Полученный материал использовали в экспериментах с культурой клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Данную клеточную линию культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 50 мг/л стрептомицина и 50 ед./мл пенициллина, в инкубаторе (NAPCO, США) при 310 K в атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO_2. Клетки высевали в пластиковые 96-луночные планшеты в плотности 10000 клеток $см^{-2}$ (3500 клеток на лунку) за сутки до эксперимента. Исследуемые вещества: мирамистин, наноалмазы ДН-С и комплекс ДН-С-мирамистин суспендировали в бессывороточной среде DMEM, добавляли к клеткам по 0.2 мл в лунку и инкубировали в течение 1 часа в атмосфере CO_2. К контрольным образцам добавляли бессывороточную среду без добавок. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. После инкубации среду удаляли, клетки помещали в среду, содержащую 10% сыворотки и культивировали в течение еще 3 суток в стандартных условиях. Выживаемость клеток определяли с помощью МТТ-теста [180]. Долю выживших клеток рассчитывали, как отношение средней фракции выживших клеток в тестовом образце к соответствующему

значению в контрольных образцах. Цитотоксичность оценивали, как концентрацию образца, соответствующую выживаемости 50% клеток (IC_{50}), которую определяли нелинейной аппроксимацией экспериментальных данных с помощью логистической функции.

$$\text{Выживших, \%} = \frac{100\%}{1 + (\frac{IC_{50}}{C})^p} \tag{2.13}$$

где C – концентрация образца, p – параметр, показывающий наклон кривой.

Для определения эффективности связывания исследуемых веществ с клетками [^{3}H]ДН-С, [^{3}H]мирамистин и комплексы [^{3}H]ДН-С-мирамистин, ДН-С-[^{3}H]мирамистин суспендировали в среде DMEM, содержащей 4 мМ глутамина, затем обработали ультразвуком в течение 2 часов. Концентрации и удельные радиоактивности суспензий приведены в таблице 7.

Таблица 7 — Концентрации и удельные радиоактивности препаратов при исследовании связывания с клеточной мембраной

препарат	концентрация ДН-С, мг/л	концентрация мирамистина, мкМ	удельная радиоактивность, МБк/л
ДН-С-[^{3}H]мирамистин	37.9	2.2	71.0
[^{3}H]ДН-С-мирамистин	51.0	2.9	99.9
[^{3}H]мирамистин	-	1.0	39.2
[^{3}H]ДН-С	29.1	-	54.8

Для определения эффективности связывания 0.9 мл суспензии добавляли к клеткам линии MCF7/R, помещенные в 12-луночные планшеты. Количество клеток варьировали от 0 (контрольный эксперимент) до 0.68 млн. Образцы инкубировали в течение часа при 310 K в атмосфере CO_2. Затем монослои клеток аккуратно отмывали в PBS (5 раз по 1 мл) и лизировали в 0.25 мл 1 M NaOH (в течение ночи). Отбирали 0.1 мл лизата для определения концентрации белка по методу Лоури. Полученные значения затем пересчитывали на количество клеток в каждом образце из калибровочных кривых построенных в том же эксприменте [181]. Количество связавшегося вещества определяли по радиоактивности лизата и нормировали на количество клеток.

2.5.5 Изучение токсичности наноалмазов и их композитов с мирамистином на колонии патогенного гриба *Aspergilus niger* Tiegh.

Оценку токсичности исследуемых препаратов наноалмазов и мирамистина, сорбированного на наноалмазах, осуществляли путем введения препаратов в агаризованную питательную среду. В качестве питательной среды использовали 4% пивное сусло и 2% агар, который остужали до 323 K с последующим внесением необходимого количества анализируемого препарата. Полученную среду с исследуемым препаратом в количестве 5 мл быстро и тщательно перемешивали, затем переносили в стерильные чашки Петри диаметром 6 см. Далее на агаризованную среду помещали суспензию спор гриба *Aspergillus niger* в количестве 20 мкл, приготовленную при помощи смыва спор стерильной водой. Количество спор в 20 мкл составило 10^6 единиц. Рост культуры проводили при 300 K в течение 4 сут. Скорость роста оценивали при помощи линейки в миллиметрах, от края капли внесенного инокулята споровой суспензии. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Получение меченных тритием соединений

3.1.1 Методика определения концентрации меченных тритием ДН

Крайне трудно определить количество [^{3}H]ДН гравиметрическими или другими методами, в связи тем, что масса образца ДН в мишени не превышает 0.6 мг. Проведение дополнительных процедур унификации оптических свойств [^{3}H]ДН будет приводить к дополнительным потерям продукта, что может повлиять на интерпретацию механизма взаимодействия ДН с тритием. Для определения удельной радиоактивности продукта был разработан метод определения концентрации гидрозолей ДН, основанный на спектрофотометрическом методе, предложенном авторами работы [182].

В диапазоне длин волн от 200 до 400 нм характерен рост оптической плотности при уменьшении длины волны наблюдения и увеличении концентрации гидрозоля. Спектры поглощения изученных ДН отличаются главным образом углом наклона обратной степенной функции. Было обнаружено, что при постоянном n коэффициент k линейно зависит от концентрации. В изученном диапазоне длин волн спектры [^{3}H]ДН можно описать уравнением 2.1 с коэффициентом детерминации, близким к единице. Однако с хорошей предсказательной способностью спектры поглощения [^{3}H]ДН могут быть описаны только в более узком диапазоне. Вероятно, это связано с уширением распределения частиц по размеру в суспензии в результате процедур приготовления мишени и очистке продукта. Это предположение подтверждается данными из литературы об изменении размера агрегатов ДН при высушивании или центрифугировании коллоидных растворов [183]. Диапазон длин волн от 240 до 300 нм был выбран, поскольку с уменьшением длины волны аналитический сигнал увеличивается, но становится слишком интенсивным при длинах волн 200-220 нм. Для всех образцов [^{3}H]ДН полученный показатель степени оказался меньше 3.5.

Таким образом, для получения калибровочной зависимости спектры поглощения суспензий ДН с известной концентрацией в диапазоне длин волн от

240 до 300 нм описали уравнением 2.1. Определили зависимость B от n в области значений n до 3.5 уравнением:

$$B = 22.676 \times \exp(5.327 \cdot n) \tag{3.1}$$

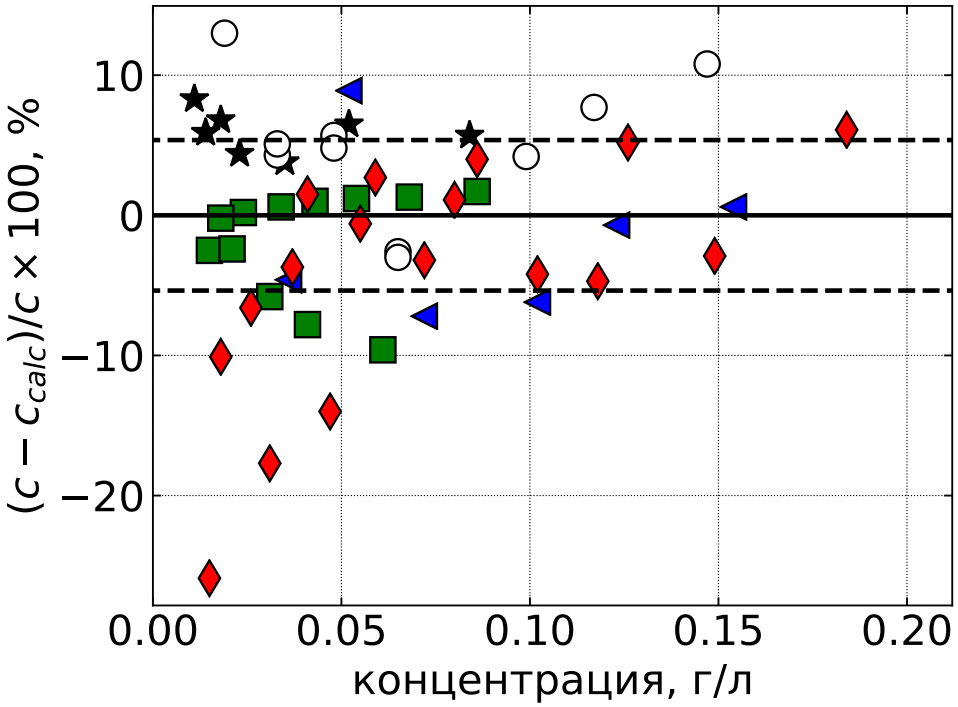


Рисунок 3.1 — Относительное отклонение при определении концентрации ДН по предложенной модели; символы относятся к экспериментальным данным для следующих препаратов наноалмазов: ДН-С (★), ДН-100 (□), УДА-ТАН (◁), ТАН-О (◊), ТАН-Н (○); сплошная линия – модель, пунктир – среднее относительное отклонение

Оценили точность определения концентрации, на рисунке 3.1 показано относительное отклонение при определении концентрации образцов, использованных для получения калибровки. Среднее относительное отклонение составило 5.4%, только для ТАН-О при концентрации менее 0.02 г/л наблюдались существенно большее отклонение (максимально 26%). Следует отметить, что точность спектрофотометрического метода [182], в котором для каждого типа ДН необходимо получить и применять свою калибровочную зависимость, значительно выше. Однако модификация методики для определения концентрации меченых ДН оправдана тем, что она становится универсальной, уменьшает количество процедур с радиоактивными препаратами, а иногда является

единственно возможной (нельзя получить индивидуальную калибровочную зависимость из-за малого количества материала).

Концентрация [^{3}H]ДН, вычисленная по методу [182], монотонно растет с увеличением длины волны, при которой производят расчет. Этот эффект менее выражен для ДН, обладающими отрицательным знаком ζ–потенциала, подвергнутых окислению поверхности кислородом воздуха при нагревании. Также для этих препаратов характерно значительно меньше потерь при выделении и очистке продукта. Попытка определения концентрации [^{3}H]ДН приводит к большому разбросу значений, полученных при разных длинах волн. Сравнение рассчитанных концентраций этими методами в серии экспериментов с ДН, отличающихся по химическому составу поверхности, приведены в таблице 8. Погрешность концентрации оценивали из доверительного интервала коэффициентов уравнения 2.1, полученного при решении ковариационной матрицы.

3.1.2 Реакция газообразного трития с наноалмазами детонационного синтеза

В настоящей работе изучали влияние свойств ДН на эффективность реакции с атомами трития, полученными при диссоциации на вольфрамовой проволоке при 2000 K. Различие образцов ДН фиксировали по следующим параметрам: удельная поверхность, химический состав поверхности по данным ИК-спектроскопии, размер агрегатов в растворах, ζ-потенциал, оптическая плотность коллоидного раствора.

Для определения времени достижения максимальной удельной радиоактивности ДН изучили кинетику процесса взаимодействия с тритием в экспериментах на образце ДН-С при времени реакции 20, 40, 80, 120 и 160 секунд. Влияние химического состава поверхности ДН на специфику взаимодействия с тритием изучали в ряду образцов УДА-ТАН, ТАН-Н и ТАН-О. Различие химического состава поверхности образцов было подтверждено ИК-спектроскопией и изменением знака ζ-потенциала. Влияние размера агрегатов

Таблица 8 — Сравнение концентраций, рассчитанных предложенным в этой работе методом и способом описанным в работе [182]

Образец	длина волны, нм	концентрация, г/л	
		по методу [182]	по разработанному методу
УДА-ТАН	200	0.030	0.041±0.003
	220	0.038	
	240	0.050	
	250	0.054	
	300	0.070	
	350	0.084	
ТАН-Н	200	0.039	0.043±0.002
	220	0.046	
	240	0.051	
	250	0.055	
	300	0.066	
	350	0.074	
ТАН-О	200	0.101	0.110±0.007
	220	0.116	
	240	0.128	
	250	0.133	
	300	0.165	
	350	0.192	

в растворе, из которого готовили мишень, на эффективность реакции с тритием изучали в ряду образцов ДН-100, ДН-15, ДН-С и ДН-100-УЗ, ДН-15-УЗ, ДН-С-УЗ. У всех образцов в этой серии знак электрокинетического потенциала был положительным. Следует отметить, что различие в ИК-спектрах образцов ДН-100, ДН-15, ДН-С незначительно.

Способ подготовки мишени препарата и очистки меченого продукта были одинаковы для всех образцов ДН. Условия реакции (температура W-проволоки 2000 К, охлаждение дна сосуда до 77 К жидким азотом, давление реакционной смеси в системе 1.3 Па, время однократной активации трития 10 с нагреванием W-проволоки), признанные в работе [101] оптимальными для получения

[^{3}H]ДН, были фиксированы во всех экспериментах. Данные по радиоактивности препаратов приведены в пересчете на содержание трития в реакционной смеси 100%.

Установлено, что при увеличении времени реакции от 20 до 40 с удельная радиоактивность [^{3}H]ДН-С возрастает с 0.81±0.08 до 1.9±0.2 ТБк/г, рисунок 3.2. Затем, рост удельной радиоактивности с увеличением времени реакции замедляется и при 160 с достигает значения 2.82±0.16 ТБк/г. Следует отметить, что в работе [101] была получена близкая по значению удельная радиоактивность ДН при меньшем времени реакции благодаря предварительному восстановлению ДН в токе водорода. Совпадает при этом и вид зависимости удельной радиоактивности продукта от времени реакции. Поэтому далее, при изучении взаимодействия трития с образцами ДН, исходили из предположения, что за 80 секунд реакции происходит близкое к полному насыщение материала тритием.

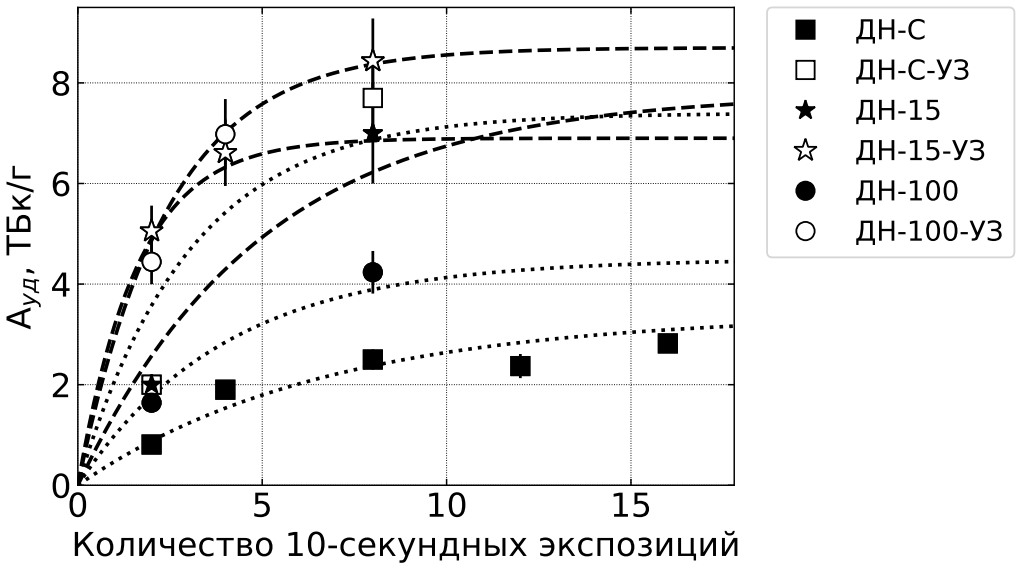


Рисунок 3.2 — Зависимость удельной радиоактивности ДН от количества 10-секундных циклов активаций трития. Символы относятся к полученным экспериментальным данным: черные символы – исходные ДН, белые символы – ДН обработанные ультразвуком. Пунктирной линией и точечным пунктиром показаны результаты расчета по уравнению 3.11 для образцов ДН обработанных ультразвуком и исходных соответственно.

Изучение влияния химического состава поверхности ДН на эффективность реакции с тритием проводили, используя 2 цикла активации реакции

(время обработки атомами трития 20 с). Установлено, что отжиг ДН в токе водорода при 1070 K перед введением трития способствует увеличению удельной радиоактивности продукта. Так, удельная радиоактивность [^{3}H]ТАН-Н составила 2.7±0.2 ТБк/г, когда [^{3}H]УДА-ТАН – 0.95±0.15 ТБк/г, при тех же условиях реакции. Эти данные хорошо коррелируют с результатами, полученными в работе [101] по введению трития методом термической активации в подвергнутые предварительному гидрированию ДН. Наименьшая удельная радиоактивность в исследуемой группе получена для препарата [^{3}H]ТАН-О, которая составила 0.50±0.06 ТБк/г, таблица 9. При этом для [^{3}H]ТАН-О характерен самый высокий выход продукта – 76±5%, тогда как у других наноалмазов в этой серии выход составил 30±2%. По-видимому, большее количество потерь ДН, обладающими положительным знаком ζ-потенциала, связано с тем, что поверхность стекла заряжена отрицательно.

Таблица 9 — Характеристика продукта реакции ДН с тритием в методе термической активации

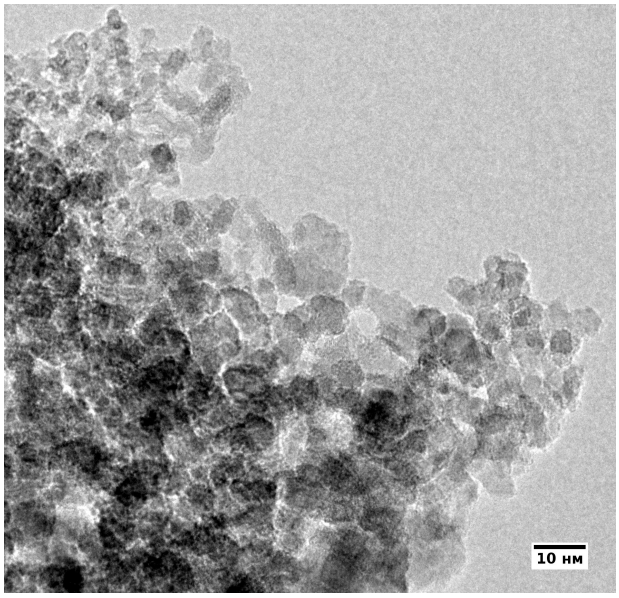
Образец	Начальная радиоактивность, ГБк	Радиоактивность после очистки, ГБк (% от начальной)	Удельная радиоактивность, ТБк/г
УДА-ТАН	0.83	0.14 (17%)	0.95±0.15
ТАН-Н	0.59	0.34 (58%)	2.7±0.2
ТАН-О	0.79	0.13 (16%)	0.50±0.06
ТАН-О*	1.12	0.48 (43%)	0.8±0.2
ДН-С	1.02	0.12 (12%)	0.81±0.08
ДН-100	0.99	0.14 (14%)	1.6±0.2
ДН-15	0.65	0.11 (17%)	2.0±0.2
ДН-С-УЗ	0.54	0.12 (22%)	2.1±0.2
ДН-100-УЗ	0.62	0.11 (18%)	4.4±0.4
ДН-15-УЗ	1.40	0.35 (23%)	5.0±0.5

В литературе нет данных об изучении введения трития в ДН, обладающие отрицательным знаком электрокинетического потенциала или подвергнутых модификации в окислительных средах. Поэтому было решено провести изучение накопление трития в образцах ТАН-О при увеличении времени реакции.

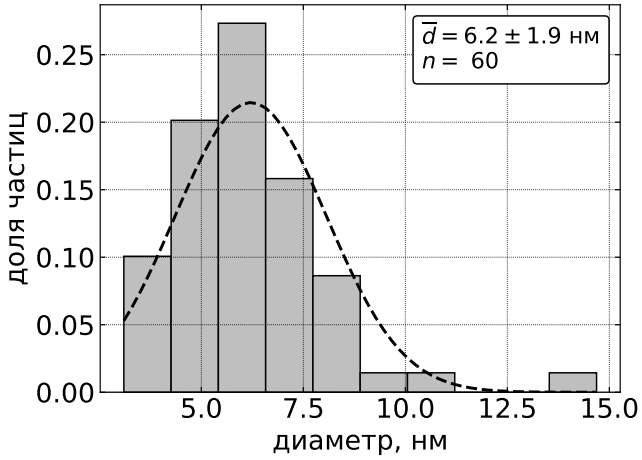
В этом случае использовали ТАН-О* полученные из следующей партии ДН, которые отличались меньшим, по сравнению с получением ТАН-О временем обработки, что согласно литературным данным позволяет сохранить С-Н связи на поверхности ДН. Удельная радиоактивность [^{3}H]ТАН-О* при 80-секунд реакции составила 3.1±0.1 ТБк/г, рисунок 3.2.

Изучение влияния размера агрегатов ДН в растворе на эффективность протекания реакции проводили при активации трития W-проволокой в течение 20, 40 и 80 с. В таблице 10 приведены размеры агрегатов ДН в суспензиях по данным ДРС. Многие исследователи отмечают, что размер агрегатов в распределении по объему частиц и интенсивности, определенный методом ДРС, является завышенным по значению [184; 185]. Поэтому далее в работе сравнение размеров частиц ДН в коллоидных растворах проводили в распределении по количеству частиц. Как видно из таблицы 10, обработка ультразвуковым излучателем погружного типа приводит к значительному уменьшению размера агрегатов ДН в коллоидных растворах. Значение электрокинетического потенциала при этом не изменялось. Применение методики обработки ультразвуком ограничено объемом и концентрацией обрабатываемого раствора – в нашем случае обработка коллоидных растворов объемом более 500 мл и концентрацией более 1 г/л не приводила к изменению размера частиц. Фактически размер частиц в ДН препаратов ДН-15 и ДН-30 не отличался, именно поэтому в экспериментах по изучению влияния размера агрегатов на удельную радиоактивность продукта ДН препарат ДН-30 в дальнейшем не использовали. Удельная поверхность препаратов ДН-С и ДН-30 составила 265 м^2/г и 280 м^2/г соответственно, при этом гидродинамический радиус частиц ДН-30 в растворе почти в три раза меньше, чем у ДН-С, таблица 10. При этом размер первичных частиц среди всех препаратов различался незначительно, на рисунке 3.3 и в приложении Д представлены ПЭМ изображения и распределение первичных частиц ДН по размеру. Следует отметить, что размер агрегатов ДН в препаратах ДН-С-УЗ, ДН-15-УЗ и ДН-100-УЗ после высушивания и ресуспендирования возвращался к размеру в соответствующих суспензиях-предшественниках – ДН-С, ДН-15 и ДН-100.

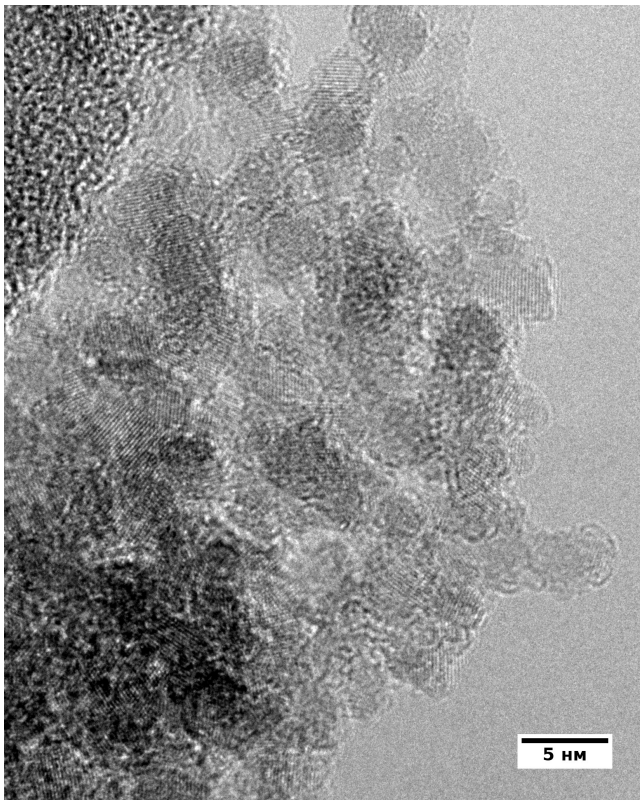
В отличие от других способов дробления ДН [35; 118], обработка ультразвуком не приводит к внесению примесей в систему, которые могли бы



а)



б)



в)

Рисунок 3.3 — ПЭМ изображения (а),(в) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-30 по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением.

Таблица 10 — Размер агрегатов ДН в распределении по количеству частиц по данным ДРС

образец ДН	мода, нм	полуширина на $h/2$, нм	ζ, мВ
ДН-С	95	от 70 до 140	27±5
ДН-100	65	от 50 до 95	27±5
ДН-30	35	от 30 до 50	25±5
ДН-15	35	от 30 до 50	31±5
ДН-С-УЗ	30	от 25 до 35	
ДН-100-УЗ	45	от 35 до 60	
ДН-15-УЗ	20	от 15 до 35	

повлиять на результат введения трития. Это было подтверждено анализом ДН на содержание примесей металлов методом ИСП-АЭС. Установлено, что после ультразвуковой обработки излучателем погружного типа в ДН возрастало содержание Na (0.9%), Si (0.8%), Ti (0.3%), тогда как в ДН перед обработкой содержание этих элементов было менее 0.1%. Необходимо отметить, что упомянутые выше элементы являются распространенными примесями в ДН [41]. Среди примесей, обнаруженных в обработанных ультразвуком ДН, только титан может приводить к образованию гидридов и таким образом увеличивать эффективность введения трития. Расчет показывает, что при содержании 0.3% Ti из-за образования гидрида (тритида) титана увеличение удельной радиоактивности материала не превысит 0.14 ТБк на г ДН.

Таблица 11 — Содержание металлических примесей в ДН

Образец ДН	элемент, мг/г									
	B	Ca	Cr	Cu	Fe	Mg	Na	Si	Ti	Zn
ДН-С	0.55	0.27	1.45	0.10	20.23	0.04	0.89	1.48	0.85	0.05
ДН-С-УЗ	2.51	1.51	0.75	0.08	13.61	0.12	9.35	9.17	3.10	0.33
ДН-100	0.23	0.80	1.51	0.04	3.94	0.12	0.25	0.86	0.15	0.02
ДН-100-УЗ	6.30	0.30	1.13	0.03	2.99	0.09	8.96	6.91	2.85	0.16

Оказалась, что при максимальном времени реакции доля трития в лабильных положениях для ДН, подвергнутых дополнительной обработке ультразвуком, составила 14%, 11% и 15%, для ДН-С, ДН-100 и ДН-15 соответственно. Для материалов без дополнительной обработки ультразвуком это отношение составило 55%, 27%, и 20% соответственно. Такое наблюдение можно объяснить особенностью образования мишени-пленки. ДН подвергнутые дополнительной обработке ультразвуком, состоят в растворе из частичек меньшего размера и при лиофилизации образуют на стенках реакционного сосуда пленку с более развитой поверхностью, обеспечивающую более полное удаление воды во время лиофилизации. Подобный эффект был продемонстрирован в экспериментах с ДМСО [186].

Из полученных данных можно оценить разницу в содержании адсорбированной воды в мишенях, приготовленных из ДН с дополнительной ультразвуковой обработкой и без нее. Предположим, что при ультразвуковой обработке ДН разнообразие функциональных групп не изменяется. Тогда C {Бк/г} – удельная радиоактивность лабильного трития в препарате [^{3}H]ДН:

$$C = \frac{A_0 - A_1}{m_{\text{ДН}}} \tag{3.2}$$

где A_0 и A_1 {Бк} радиоактивность ДН до и после удаления трития из лабильных положений; $m_{\text{ДН}}$ {г} масса навески ДН. Таким образом разница в содержании лабильного трития в пересчете на воду будет составлять:

$$\omega_{T_2O}(\%) = \frac{C(\text{ДН}(0)) - C(\text{ДН}(\text{«УЗ»}))}{\lambda \cdot N_A \cdot 2 \cdot M_{H_2O}} \times 100 \tag{3.3}$$

где $C(\text{ДН}(0)) - C(\text{ДН}(\text{«УЗ»}))$ относится к разнице в удельной радиоактивности лабильного трития в ДН до $C(\text{ДН}(0))$ и после $C(\text{ДН}(\text{«УЗ»}))$ обработки ультразвуком; $\lambda = ln(2)/T_{1/2}$, $T_{1/2}$ {с} период полураспада трития [187]; N_A – постоянная Авагадро; M_{H_2O} {моль/г} молярная масса H_2O.

Рассчитанные таким образом $\omega_{T_2O}(\%)$ для образцов ДН-С и ДН-100 равны 2.4%, таблица 12. Необходимо отметить, что несмотря на меньший размер частиц в образце ДН-15-УЗ, чем в ДН-15, значение $\omega_{T_2O}(\%)$ различается всего на 0.2%. По-видимому, обработка ультразвуком препарата ДН-15 не приводит к

Таблица 12 — Удельная радиоактивность лабильного трития в ДН и оценка содержания воды в мишени

тип ДН	Параметр C, ТБк/г	Параметр ω_{T_2O}, %
ДН-С	4.8	2.4
ДН-С-УЗ	1.9	
ДН-100	10.6	2.4
ДН-100-УЗ	7.6	
ДН-15	5.7	0.2
ДН-15-УЗ	5.4	

улучшению удаления адсорбированной воды, либо для этих образцов в условиях реакции происходит практически полное ее удаление. Оценка максимальной остаточной воды таким образом для образцов ДН-С, ДН-100 и ДН-15 составила 4.8, 10.6 и 5.7 % соответственно. Такая оценка приводит к завышенному значению, поскольку на поверхности ДН присутствуют функциональные группы содержащие лабильный водород (COOH-, OH- и т.д.). Тем не менее, рассчитанные значения близки к литературным данным о содержании воды в ДН при их высушивании. Согласно работе [114] для ДН, обладающих положительным и отрицательным знаком ζ-потенциала, характерно содержание воды 4.4% и 3.1% соответственно. Поскольку вода является хорошим акцептором атомов трития, дополнительная обработка ультразвуком приводит к уменьшению содержания воды в препарате и значительному увеличению удельной радиоактивности ДН за счет меньшего вклада лабильной метки. На рисунке 3.2 показана зависимость удельной радиоактивности ДН от числа 10 с экспозиций.

Данные по удельной радиоактивности были аппроксимированы моделью, предложенной в работах [99; 101]. Получение меченых соединений методом термической активации основано на атомизации трития на поверхности W-проволоки и последующей заменой протия в органических молекулах диссоциированными атомами трития. Таким образом взаимодействие трития с углеродным материалом можно свести к реакции изотопного обмена [188].

$$T_2 + RH \rightleftarrows RT + HT \tag{3.4}$$

Тогда, используя следующие обозначения:

$$a = [RH] + [RT] \tag{3.5}$$

$$b = [T_2] + [TH] \tag{3.6}$$

$$x = [RT] \tag{3.7}$$

$$y = [T_2] \tag{3.8}$$

скорость образования меченого продукта:

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot \frac{ay - bx}{ab} \tag{3.9}$$

Решение уравнения приводит к следующему выражению:

$$ln\Big(1 - \frac{dx}{x_\infty}\Big) = kt \cdot \frac{a+b}{ab} \tag{3.10}$$

где x_∞ значение x при $t = \infty$, то есть равновесие. Так как газовую фазу обновляли после каждой 10-секундной активации W-проволокой, a $\gg$ b, то зависимость радиоактивности продукта от времени реакции описывается дифференциальным уравнением первого порядка, решение которого:

$$A = A_{max} \cdot (1 - exp(-k_{eff} \cdot t)) \tag{3.11}$$

где A_{max} – предельное значение радиоактивности, которое определяется количеством активных центров или позиций, доступных для связывания с тритием; k_{eff} – константа, характеризующая скорость связывания трития с углеродным материалом; t - время реакции (или количество экспозиций, умноженное на 10). Рассчитанные значения A_{max} и k_{eff} приведены в таблице 13. На рисунке 3.4 показана зависимость рассчитанного значения A_{max} от диаметра частиц ДН в водных суспензиях.

Результаты, полученные в работе, можно сопоставить с литературными данными о взаимодействии атомарного трития с углеродными материалами [99]. По рассчитанным значениям A_{max} ДН, подвергнутые дополнительной

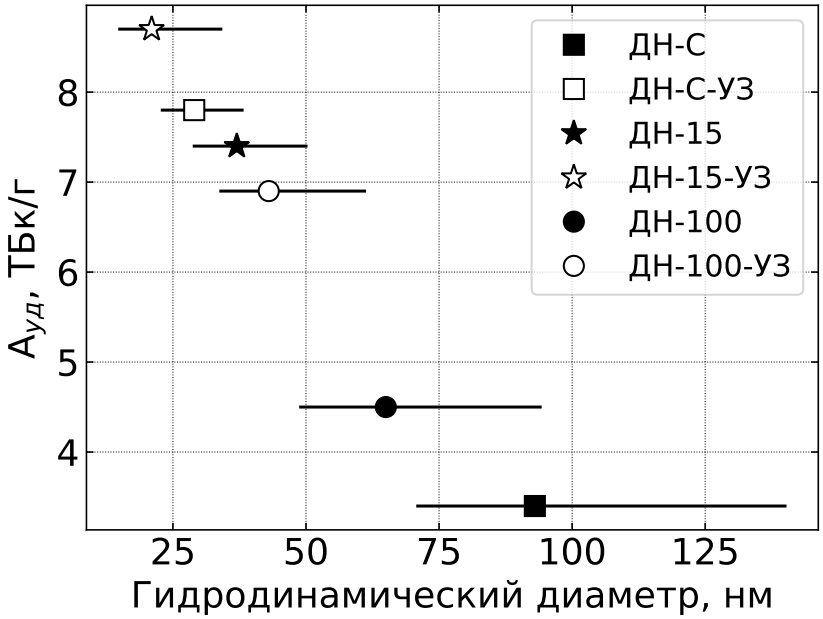


Рисунок 3.4 — Зависимость максимальной удельной радиоактивности ДН от гидродинамического диаметра агрегатов в суспензиях (мода распределения по числу частиц). Символы относятся к полученным экспериментальным данным: черные символы – исходные ДН, белые символы – ДН обработанные ультразвуком; линии отображают ширину пика на полувысоте.

Таблица 13 — Параметры уравнения 3.11

ДН	A_{max}, ТБк/г	k_{eff}, $с^{-1}$	R^2
ТАН-О	3.6	0.013	0.77
ДН-С	3.4	0.015	0.82
ДН-С-УЗ	7.8	0.020	0.85
ДН-100	4.5	0.025	0.96
ДН-100-УЗ	6.9	0.062	0.80
ДН-15	7.4	0.033	0.80
ДН-15-УЗ	8.7	0.041	0.96

ультразвуковой обработки, достигают значения A_{max} восстановленного оксида графена (ВОГ), но ниже, чем у однослойного оксида графена (ООГ), которые составляют 8.88 и 11.84 ТБк/г соответственно.

По абсолютным значениям, при времени реакции 20 и 80 секунд, удельная радиоактивность ВОГ и ООГ близки по значению с необработанными ДН. Удельная радиоактивность дополнительно обработанных ультразвуком ДН при этом значительно выше. Удельная радиоактивность ДН достигает значения параметра A_{max} для углеродных нанотрубок уже при времени реакции с тритием 20 секунд.

Отжиг ДН в токе водорода и обработка ультразвуком позволяет ускорить процесс насыщения материала тритием в методе термической активации. Дробление агрегатов ДН меньше 100 нм ультразвуковой обработкой, при уменьшении диаметра частиц в два и более раз, приводит к увеличению максимальной удельной радиоактивности [^{3}H]ДН, полученных методом термической активации трития. При использовании ДН, обладающих отрицательным электрокинетическим потенциалом, наблюдается значительно меньше потерь продукта при его выделении и очистке. В работе получены [^{3}H]ДН с удельной радиоактивностью, близкой по значению к полной замене водорода, содержащегося на поверхности ДН, на тритий. Предложена модель, объясняющая увеличение удельной радиоактивности продукта при уменьшении размера агрегатов в суспензиях ДН. Выдвинуто предположение, что адсорбированная на поверхности ДН вода оказывает решающее на удельную радиоактивность продукта при введении трития в материал методом термической активации.

3.1.3 Получение меченных тритием органических соединений

Важным фактором, который влияет на удельную радиоактивность и радиохимический выход меченых соединений, получаемых с помощью метода термической активации трития, является температура мишени [104]. В этой работе рассмотрено влияние температуры мишени на скорость образования меченых производных пантотеновой кислоты, поэтому использовали минимальное время активации реакции 10 с. Выбор давления трития и температуры атомизатора сделан на основании результатов экспериментов с близкими по химической природе соединениями [189; 190].

В таблице 14 приведены данные по радиоактивности меченых препаратов ПК, ГПК и ФПК. Установлено, что введение в состав молекулы пантотеновой кислоты фосфатной группы сильно изменяет результат реакции с атомарным тритием: происходит снижение удельной радиоактивности при одинаковых условиях проведения реакции. К тому же если для ПК и ГПК увеличение температуры мишени от 77 до 295 К приводит к двукратному увеличению удельной радиоактивности, то для ФПК наоборот наблюдалось уменьшение удельной радиоактивности. Известно, что фосфатная группа является хорошим акцептором термализованных атомов трития, что приводит к увеличению количества трития в лабильных положениях молекулы и снижению удельной радиоактивности препарата. Однако аномальное увеличение содержания трития в лабильных положениях молекулы с увеличением температуры мишени позволяет предположить, что фосфатная группа также оказывает дезактивирующее действие на скорость изотопного обмена атомарного трития с пантотеновой кислотой. Сложность механизма взаимодействия трития с пантотеновой кислотой проявилось также в уменьшении удельной радиоактивности гопантеновой кислоты, которая содержит в своем составе на одну группу -CH_2- больше.

В работе [104] было показано, что при увеличении температуры мишени до 295 К, не удается получить меченный тритием плюроник Р123. Вероятно, это связано с образованием неустойчивых промежуточных соединений с последующей фрагментации макромолекул и рекомбинацией радикалов. При

Таблица 14 — Параметры реакции и свойства препаратов, полученных методом термической активации трития

вещество	температура мишени, K	радиоактивность, ГБк[1] A_0	A_1	удельная радиоактивность [^{3}H]препарата, ТБк/г
ПК	77	0.38	0.24	0.57
	295	0.56	0.39	0.98
ГПК	77	0.31	0.17	0.33
	295	0.49	0.29	0.67
ФПК	77	0.30	0.18	0.25
	295	0.39	0.25	0.17

[1] A_0 – радиоактивность препарата после проведения реакции

[1] A_1 – радиоактивность препарата после удаления лабильного трития

температуре мишени 77 K наибольшую молярную радиоактивность среди исследуемых веществ удалось получить для плюроника P123, которая составила 0.36 ТБк/ммоль. Близкими по значению молярной радиоактивности продукта обладают препараты [^{3}H]ПК и [^{3}H]мирамистина – 0.14 и 0.10 ТБк/ммоль соответственно, близкими являются и их молекулярные массы. В исследуемом ряду веществ [^{3}H]олеиламин обладает самой низкой молярной радиоактивностью – 0.03 ТБк/ммоль. Вероятно, это связано с особенностью нанесения вещества на мишень из раствора октана, что может влиять на равномерность образующейся пленки-мишени.

3.1.4 Заключение по разделу 3.1

Впервые исследовано влияние размера агрегатов ДН в суспензиях на эффективность введения трития в ДН методом термической активации. На основе экспериментов с предварительной обработкой ультразвуковым излучателем погружного типа выявили увеличение удельной радиоактивности получаемых [^{3}H]ДН при уменьшении гидродинамического радиуса частиц в растворе из которого готовили мишень. Мы предполагаем, что суспензии с агрегатами меньшего размера при приготовлении мишени образуют пленку с большей доступностью для взаимодействия с тритием.

Установить влияние условий подготовки мишени на удельную радиоактивность [^{3}H]ДН удалось благодаря усовершенствованию методики спектрофотометрического определения концентрации ДН в суспензиях. Предложенный в работе метод отличается универсальной калибровочной зависимостью, построенной из 7 марок ДН различного происхождения и химического состава поверхности. Калибровочная зависимость позволяет связать размер частиц в растворе с его оптической плотностью при одинаковых весовых концентрациях ДН, что уменьшает количество процедур с радиоактивными препаратами при определении их концентрации. Процедуры подготовки мишени и выделении продукта [^{3}H]ДН включают высушивание и ультрацентрифугирование суспензий в результате которых невозможно избежать изменение распределения размера частиц. Мы считаем, что разработанный метод применим не только для определения концентрации меченных ДН, но и для других систем, в которых возможно изменение размера частиц или их весовое содержание. Например, при изучении устойчивости коллоидных растворов ДН.

Меченные тритием ДН далее в работе применяли для изучения возможных последствий при загрязнении ДН окружающей среды, а именно, для определения способности растений поглощать ДН корневой системой и транспортировать их в листья. Ввиду необходимости учитывать наличие ГВ в природе, с помощью [^{3}H]ГВ определили количественные характеристики взаимодействия ГВ с ДН. Другим важным аспектом работы являлось применение [^{3}H]ДН в исследованиях ДН для адресной доставки биологически-активных веществ. В связи с этим изучали сохранение активности препаратов при адсорбции на ДН и влияние этого процесса на поведение ДН в различных системах,

в том числе моделирующих взаимодействие с клеточной мембраной. Комбинация экспериментов с поочередным содержанием радиоактивного индикатора в каждом компоненте позволила выявить взаимовлияние веществ на изучаемые процессы.

3.2 Изучение адсорбционных характеристик детонационных наноалмазов

3.2.1 Адсорбция производных пантотеновой кислоты

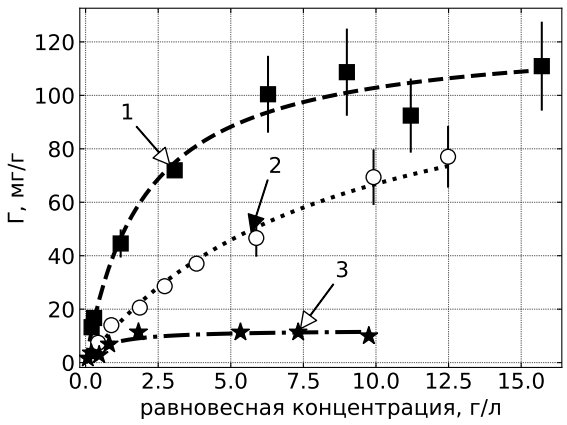
Изотермы адсорбции ПК, ГПК и ФПК на суспензиях ДН-С в воде и в 0.9% растворе NaCl, полученные при температуре 297±2 K, представлены на рис. 3.5. Изотермы адсорбции описаны уравнением 3.12, аналогичным уравнению Ленгмюра:

$$\Gamma = \Gamma_{\text{макс}} \times \frac{A \cdot c}{1 + A \cdot c} \tag{3.12}$$

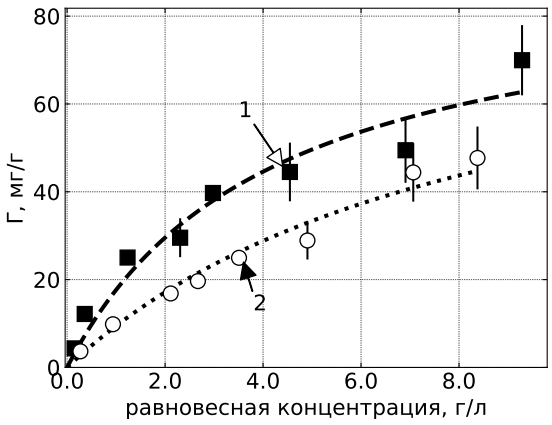
где Г — адсорбция мг/г, $\Gamma_{\text{макс}}$ — максимальная адсорбция, мг/г, c — концентрация адсорбата г/л, A — адсорбционная активность л/г. Полученные параметры адсорбции представлены в таблице 15. Изотермы адсорбции производных пантотеновой кислоты на наноалмазах оказались типичными для веществ, не образующих мицеллы в растворе: адсорбция плавно возрастала до предельной величины, и далее мало менялась с увеличением концентрации раствора. Однако количественные характеристики адсорбции зависели от типа соединения и ионной силы раствора. Предельная величина адсорбции 110 мг/г была достигнута только для ГПК при концентрации выше 10 г/л. Однако форма изотермы адсорбции ПК позволяет предположить, что предельная величина адсорбции ПК также близка к этой величине.

Эксперимент по адсорбции гопантената проводили на предварительно приготовленной суспензии ДН-С, согласно описаному в *§ 2.1.1 Наноалмазы детонационного синтеза*, и на исходном порошке ДН-С. Установленно, что при адсорбции ГПК на порошке ДН-С максимальная адсорбция составляет 12±1 мг/г [191], что в 10 раз ниже, чем на суспензии ДН-С. Исходя из этого, было решено все последующие эксперименты проводить на свежеприготовленной суспензии ДН.

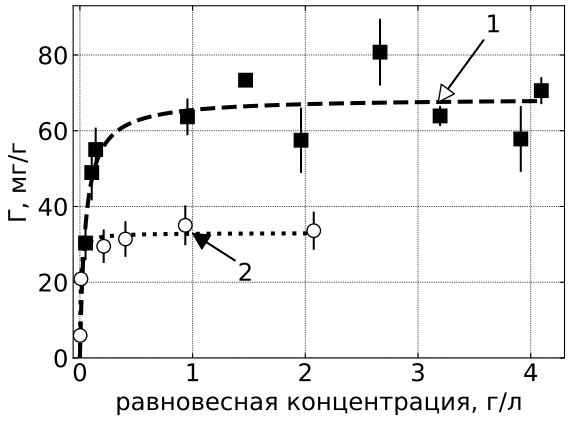
Эти результаты находятся, на первый взгляд, в противоречии с данными по удельной поверхности материалов, найденными с помощью метода БЭТ. Для



а)



б)



в)

Рисунок 3.5 — Изотермы адсорбции ППК на наноалмазах: а – ГПК, б – ПК, в – ФПК; 1 – водная суспензия, 2 – в физиологическом растворе, 3 – адсорбция на порошке ДН-С (для ГПК); линии – расчет по уравнению 3.12.

препарата, полученного высушиванием водной суспензии, приготовленной по описанной в *§ 2.1.1 Наноалмазы детонационного синтеза* методике, удельная поверхность была равна 265 м^2/г, причем удельная поверхность микропор не превышала 28 м^2/г, тогда как удельная поверхность исходного порошка ДН-С составляла 310 м^2/г. Различие в способности адсорбировать ГПК связана с разной доступностью поверхности материалов к адсорбатам (молекулярный азот и ГПК). Известно, что в исходном порошке ДН-С присутствует аморфный углерод, который имеет высокую удельную поверхность по азоту, однако из-за своей гидрофобности препятствует поступлению водных растворов в поры материала. Похожий эффект наблюдали при адсорбции белка лизоцима на активированном угле и графитовой фольге [192].

Таблица 15 — Параметры адсорбции производных пантотеновой кислоты на наноалмазах детонационного синтеза

вещество	$\Gamma_{макс}$, мг/г	A, л/г	R^2
ГПК[а]	12±1	1.6±0.6	0.88
ГПК	123±6	0.5±0.1	0.98
ГПК[б]	123±11	0.12±0.02	0.99
ПК	91±14	0.24±0.08	0.95
ПК[б]	91±17	0.12±0.04	0.97
ФПК	69±3	21±7	0.91
ФПК[б]	33±1	155±33	0.96

[а]Адсорбция на порошке ДН-С
[б]Суспензия в физиологическом растворе

При получении устойчивых водных суспензий наноалмазов происходит разрушение агрегатов порошка по мезо- и макропорам и отделение аморфного углерода. Это приводит к тому, что удельная поверхность частиц ДН в водной суспензии становится меньше, чем в исходном порошке, однако она полностью доступна адсорбируемому веществу. Исходя из данных по $\Gamma_{макс}$ и доступной поверхности суспензии ДН-С удельное покрытие поверхности молекулами ПК или ГПК находится в интервале от 1.1 до 1.3 молекул/нм^2, то есть близко к мономолекулярному слою.

Таким образом, для достижения максимальной адсорбции веществ из растворов на частицах ДН требуется обеспечение максимальной доступности поверхности, что достигается в результате предварительного получения устойчивых гидрозолей. При подготовке суспензий ДН следует уделять должное внимание приданию необходимых коллоидно-химических свойств, включая минимальный размер частиц и седиментационную устойчивость при хранении длительное время [21; 193].

Для выявления влияния размера агрегатов наноалмазов, стабилизированных в водных растворах, на адсорбцию исследуемых веществ использовали суспензии ДН производства «СКН». В соответствии с характеристиками производителя наночастицы в суспензии первоначально отличались по размерам: средний размер частиц 15, 30 и 100 нм зафиксирован в их обозначениях ДН-15, ДН-30 и ДН-100. Эксперимент проводили при концентрации веществ 8.9, 4.9

и 1.7 г/л для ГПК, ПК и ФПК соответственно. В таблице 16 представлены значения адсорбции этих веществ на суспензиях четырех типов наноалмазов. Установлено, что адсорбция всех веществ мало зависела от первоначального размера агрегатов наноалмазов производства «СКН» и была близка к величинам, полученным для ДН-С. Было также обнаружено, что размер агрегатов наноалмазов увеличивается после контакта с исследуемыми веществами. Предположительно это связано с тем, что при адсорбции исследуемых веществ из-за компенсации заряда уменьшается стабильность наночастиц. Уменьшение электрокинетического потенциала частиц приводит к их слипанию. Установлено, что адсорбция ПК и ГПК на наноалмазах способствует увеличению размера частиц в 2-3 раза (размер наноалмазов ДН-100 и ДН-С возрастает с 70 и 90 до 190 нм, ДН-30 и ДН-15 с 40 до 140 нм по сравнению с немодифицированными суспензиями). Наиболее сильные изменения происходили при добавке ФПК. Частицы, модифицированные ФПК, имели средний размер порядка нескольких сотен нанометров, а суспензия полностью теряла устойчивость и образовывала осадок.

Таблица 16 — Сравнение адсорбции производных пантотеновой кислоты на наноалмазах детонационного синтеза производства «Синта» и «СКН»

наноалмазы	адсорбция ППК		
	ГПК 9 г/л	ПК 5 г/л	ФПК 1.7 г/л
ДН-100	82±9	39±5	84±10
ДН-30	108±12	40±5	85±9
ДН-15	97±10	44±4	83±8
ДН-С	101±15	50±7	67±10

Небольшое различие в адсорбции для наноалмазов производства «СКН» и «Синта» может быть связано с разницей химического состава, который зависит от способа выделения и очистки препаратов после их получения. Как было показано в работе [194] различие в степени очистки наноалмазов (ДН марок «УДА-ВК» и «УДА-ГО» производства «Синта») приводит к разной адсорбции метиленового голубого.

Подтверждением участия ионных взаимодействий в адсорбции ППК является значительное уменьшение адсорбции в экспериментах при повышенной

ионной силе. Оказалось, что в 0.9% растворе NaCl существенно снижался коэффициент A в уравнении (3.12), описывающем изотерму адсорбции, а величина $\Gamma_{макс}$ для ПК и ГПК мало отличалась. Практически двукратное снижение $\Gamma_{макс}$ было найдено только для ФПК. Вероятно, это связано с тем, что в присутствии NaCl наночастицы агрегируют гораздо быстрее, что приводит к уменьшению доступной для адсорбции поверхности. Так молекула ФПК вместе с противоионами занимает достаточно большой объем, и проникновение таких молекул в поры агрегатов становится затрудненным, что и отражается на общей величине адсорбции. Гидрофобная составляющая адсорбции также играет важную роль, что наблюдается в сопоставлении результатов для ПК и ГПК. При этом величина адсорбции при термостатировании в диапазоне 277-310 K различается незначительно, рисунок 3.6. При примерно одинаковой величине максимальной адсорбции параметр A выше у ГПК как при адсорбции в воде, так и в 0.9% NaCl. В работе [195] на примере адсорбции хлоридов децил-, додецил- и гексадецилпиридиния на ДН было показано, что гидрофобные взаимодействия усиливаются при удлинении углеводородной цепи молекул.

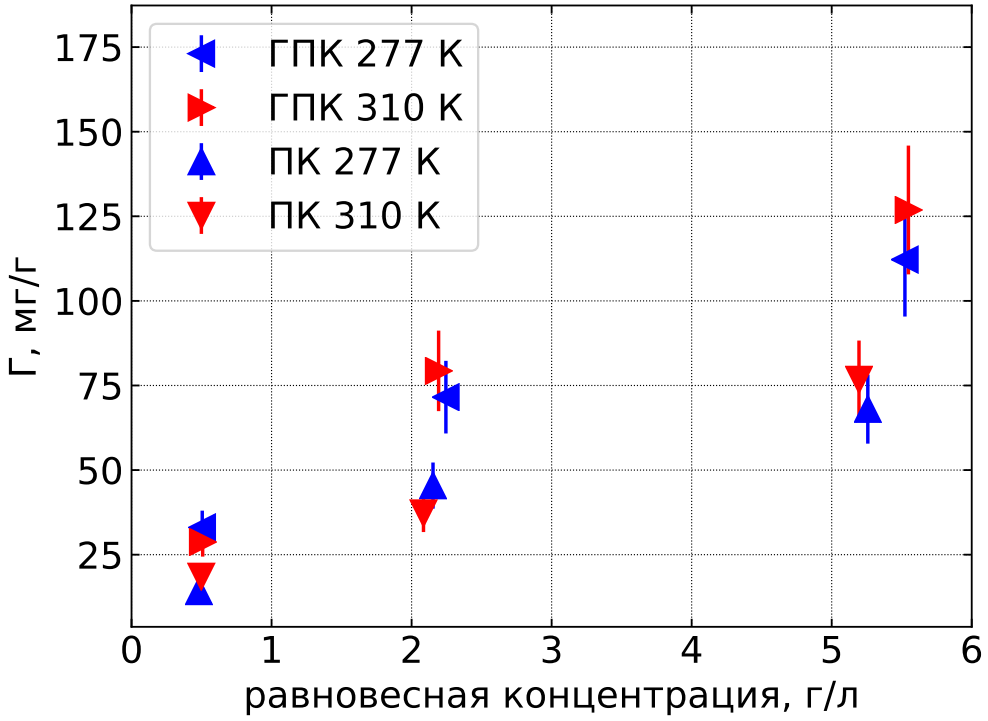


Рисунок 3.6 — Изотермы адсорбции ГПК и ПК при температурах 277 и 310 K.

Для определения прочности удерживания сорбированных соединений провели эксперимент по десорбции в воде, 0.01 M соляной кислоте, растворе БСА

концентрации 40 г/л и в 0.15 М растворе NaCl, для чего препараты наноалмазов отмывали от сорбата в надосадочной жидкости, повещали в указанные выше растворы и выдерживали 15 суток при 310±1 К. Значительная десорбция (до 90%) наблюдалась в присутствии альбумина, что подтверждает высокую способность этого белка связывать различные вещества. Такое поведение адсорбата в растворе с концентрацией, эквивалентной содержанию БСА в плазме крови, является благоприятным для разработки систем доставки биологически-активных веществ с помощью препаратов на основе ДН. В остальных средах величина остаточной адсорбции после 15 суток контакта оказалась близкой к адсорбции в физиологическом растворе (см. таблица 17), что является дополнительным подтверждением двух механизмов удерживания адсорбата на поверхности ДН. Удерживание веществ наночастицами за счет ионных взаимодействий обратимо и снижается с увеличением ионной силы раствора. Адсорбция за счет гидрофобных взаимодействий гораздо прочнее, и удаление связанных молекул возможно только в присутствии акцепторов с более высокими коэффициентами связывания, например, в присутствии белков-транспортеров.

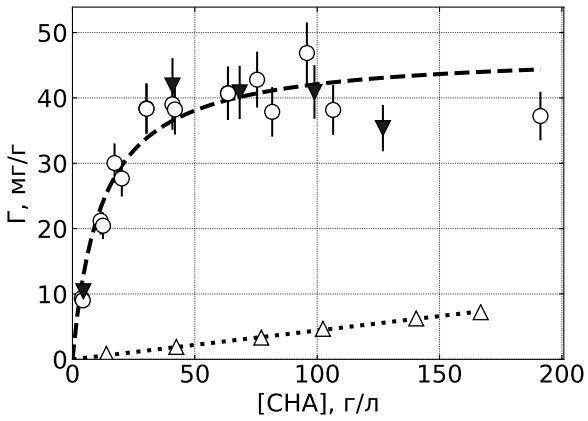
Таблица 17 — Остаточная адсорбция производных пантотеновой кислоты на наноалмазах ДН-С в различных средах

	остаточная адсорбция мг/г		
среда	ГПК 5 г/л*	ПК 5 г/л*	ФПК 1.7 г/л*
вода	33±5	16±2	36±5
0.9% NaCl	39±6	16±2	40±6
альбумин	10±2	8±1	7±1
HCl	35±5	20±3	35±5

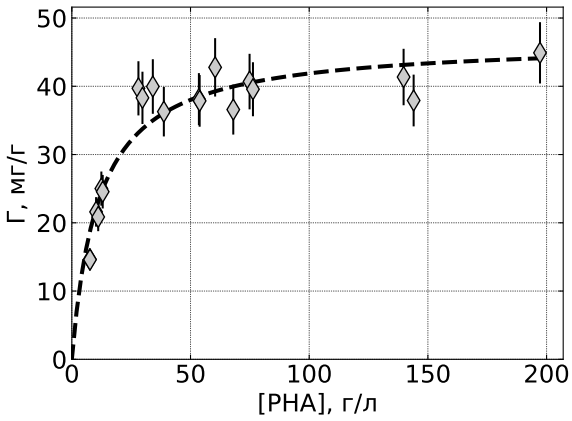
*равновесная концентрация маточного раствора

3.2.2 Адсорбция гуминовых веществ

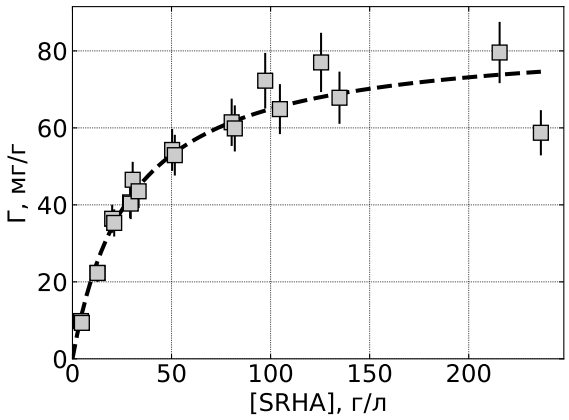
На рисунке 3.7 приведены изотермы адсорбции ГВ: гуминовые кислоты угля (а), торфа (б), речные гуминовые (в) и фульвокислоты (г). Изотермы адсорбции ГВ на наноалмазах описали уравнением 3.12. Результаты расчета показаны пунктирными линиями. Полученные коэффициенты уравнения представлены в таблице 18.



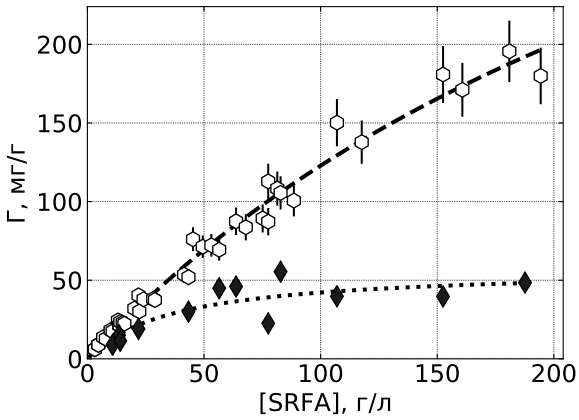
а)



б)



в)



г)

Рисунок 3.7 — Изотермы адсорбции гуминовых веществ на наноалмазах ДН-С: а – гуминовые кислоты угля, круги – система в буфере, треугольники вершиной вниз – система в воде, треугольники вершиной вверх – адсорбция на наноалмазах ДН-С-О; б – гуминовые кислоты торфа; в – речные гуминовые кислоты; г – речные фульвокислоты, шестиугольники – обратимая и необратимая составляющие адсорбции, ромбы – необратимая адсорбция.

Таблица 18 — Параметры адсорбции гуминовых веществ на наноалмазах

адсорбент	адсорбат	$\Gamma_{макс}$, мг/г	A, л/мг	R^2
ДН-С	CHA	47±2	0.084±0.016	0.93
	PHA	47±2	0.088±0.013	0.93
	SRHA	84±4	0.034±0.005	0.95
	SRFA*	58±10	0.027±0.014	0.78
	SRFA	539±61	0.0030±0.0004	0.98
ДН-С-О	CHA	$\Gamma = 0.044 \cdot c_{[CHA]}$		0.997

*необратимая составляющая адсорбции

Адсорбция гуминовых кислот в изученных системах (в фосфатном буфере pH = 6.8 и в воде pH = 8, используя раствор аммиака для поддержания pH) возрастала с увеличением концентрации вещества в растворе и достигала предельного значения при концентрации 50 мг/л. Адсорбция гуминовых кислот на наноалмазах ДН-С-О значительно ниже и в исследуемом диапазоне концентраций возрастает линейно. Адсорбция фульвокислот на наноалмазах продолжала возрастать вплоть до концентрации раствора 200 мг/л. Было обнаружено, что в условиях эксперимента (фосфатный буфер pH 6.8; 298 K) гуминовые кислоты необратимо сорбируются на поверхности наноалмазов: десорбция гуминовых кислот фосфатным буфером была менее 10%, что согласуется с полученными ранее данными для порошка наноалмаза [196]. В случае гуминовых кислот угля адсорбированных из водного раствора остаточная адсорбция в всех изученных средах составила 20±1 мг/г.

Абсолютное значение адсорбции гуминовых кислот угля практически совпало с полученным в цитируемой работе [196], а значение для фульвокислот оказалось в 17 раз выше. В отличие от результата, полученного на порошке наноалмазов, когда десорбция в буферном растворе практически отсутствовала, десорбция фульвокислот с золя достигала 85%. Необратимая составляющая адсорбции SRFA на гидрозолях ДН-С почти в 2 раза превышала результат, полученный на порошке. Вероятно, это связано с тем, что обработка наноалмазов ультразвуком в присутствии фульвокислот, как это делалось в работе [196], не позволяет получить частицы с развитой поверхностью.

Зависимость адсорбции от типа ГВ можно объяснить с точки зрения структурных особенностей ГВ при нейтральных значениях pH и низкой ионной силе. Фульвокислоты имеют большое количество кислородсодержащих функциональных групп, что делает их поведение менее чувствительным к присутствию электролитов в водном растворе. Натриевые соли фульво- и гуминовых кислот проявляют схожие более слабые адсорбционные свойства на заряженной поверхности, чем фульвокислоты [197]. Поскольку наноалмазы обладают положительным зарядом, то адсорбция фульвокислот превышает значения, полученные для гуматов, независимо от их источника. Из-за возможности образования полислоев фульвокислотами большой вклад вносит обратимая составляющая адсорбции – часть молекул, которая непосредственно не связана с поверхностью наноалмаза. Необратимая составляющая по абсолютному значению близка к значению, полученному для гуматов. Следует отметить, что при адсорбции всех изученных ГВ на ДН происходит изменение знака ζ–потенциала на отрицательный и некоторое увеличение среднего диаметра частиц в суспензии. Для ГВ при концентрации 50 мг/л ζ–потенциал составляет -40$\pm$5 мВ, средний диаметр частиц более 1 мкм, при этом индекс полидисперсности близок к 1, из-за этого и сильной флуоресценции образцов результат недостоверный и требует большого числа повторных измерений. Как следует из таблицы 19, гуминовые вещества образуют комплекс с ДН, размеры которых соизмеримы с размерами частиц в исходных гидрозолях. Причем размер частиц не зависит ни от типа, ни от размера фракций, ни от источника гуминовых веществ. Однако исходя из полученных значений ζ–потенциала можно предположить, что для фульвокислот устойчивость системы к коагуляции ниже, чем для гидрозолей индивидуальных ДН-С и в присутствии гуминовых кислот.

3.2.3 Адсорбция мирамистина

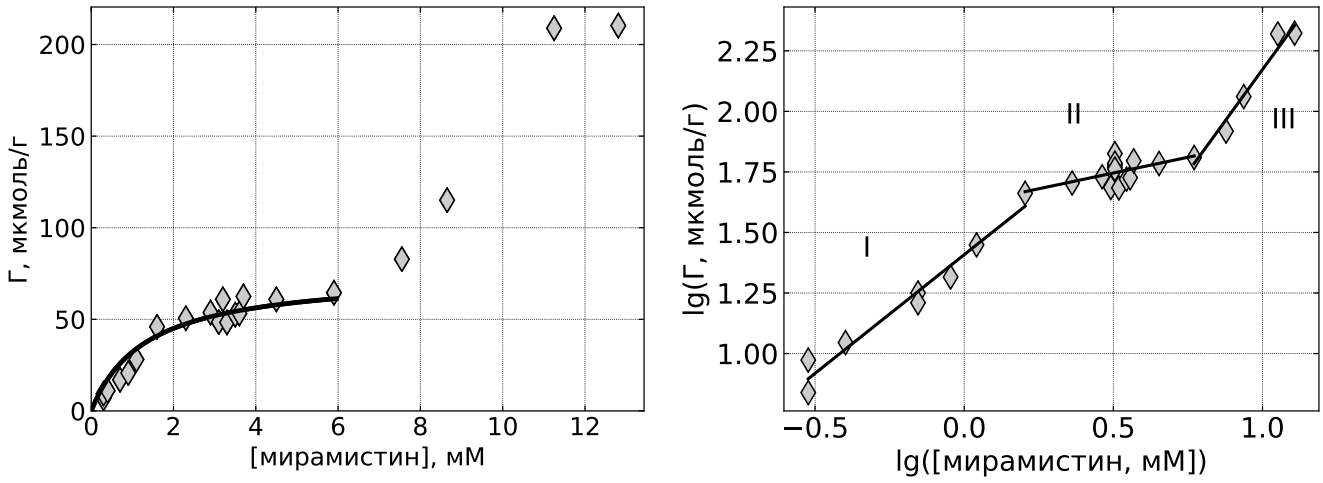
На рисунке 3.8 представлена изотерма адсорбции мирамистина на ДН-С. Изотерма адсорбции имеет S-образный вид в диапазоне концентраций от 0.3 до

Таблица 19 — Гидродинамический диаметр и ζ-потенциал частиц ДН в присутствии ГВ

образец	диаметр, нм	ζ-потенциал, мВ
ДН-С	90±9	+31±4
ДН-С-СНА	140±1	−42±3
ДН-С-SRFA	148±3	−28±1
ДН-С-SRHA	133±1	−39±2
ДН-С-PFA	142±4	−22±2
ДН-С-PHA	145±2	−36±1
ДН-С-PFA*	164±5	−30±1
ДН-С-PHA *	150±6	−35±2

*Фракция после диализа через мембрану 12 кДа

13 мМ. В области концентраций от 0.3 до 2 мМ адсорбция мирамистина возрастает с увеличением равновесной концентрации. При концентрациях от 2 до 6 мМ наблюдается плато, значение адсорбции в котором составляет 57±6 мкмоль/г.



а) б)

Рисунок 3.8 — а) изотерма адсорбции мирамистина на наноалмазах ДН-С, линия – расчет по уравнению 3.12; б) изотерма адсорбции мирамистина на наноалмазах ДН-С в логарифмических координатах, I – область Генри, II – участок насыщения монослоя, III – полислойная адсорбция.

Адсорбцию в области концентраций ниже 5 мМ можно описать уравнением Лэнгмюра ($R^2 = 0.89$), результаты аппроксимации показаны на рисунке 3.8 а) сплошной линией. Из уравнения Лэнгмюра следует, что значение максимальной

Таблица 20 — Параметры адсорбции ПАВ на наноалмазах

адсорбент	адсорбат	$\Gamma_{макс}$, мкмоль/г	A, л/г	R^2
ДН-С	мирамистин	75±7	0.75±0.21	0.89
	плюроник P123	11.6±0.9	12±4	0.85
ТАН-О	олеиламин	460±60	0.21±0.07	0.93
ДН-С-СНА	мирамистин	94±3	2.8±0.4	0.99
ДН-С-Р123		45±9	0.41±0.16	0.92

адсорбции мирамистина на наноалмазах составляет 75±7 мкмоль/г, а константа адсорбции составляет 0.75±0.21, таблица 20.

Если предположить, что агрегаты наноалмазов имеют сферическую форму, то исходя из максимальной адсорбции 75 мкмоль/г, одна молекула мирамистина занимает площадь поверхности 30 нм^2, что соответствует плотному адсорбционному слою. На рисунке 3.8 приведена изотерма адсорбции в логарифмическом масштабе. Прямая II соответствует области насыщения монослоя. По-видимому, при более высоких концентрациях происходит полислойная адсорбция. При модификации ДН-С мирамистином значение ζ-потенциала в пределах стандартного отклонения не изменяется, и соответствует умеренной устойчивости системы.

3.2.4 Адсорбция плюроника P123

Рассчитанная по уравнению 3.12 максимальная адсорбция плюроника P123 на ДН-С составляет 11.6 ± 0.9 мкмоль/г, таблица 20. Причем изотерма адсорбции достигает плато при концентрации 0.2 мМ. Адсорбционные слои плюроника P123 при концентрации меньше 0.1 мМ мало влияют на размер частиц и устойчивость дисперсии наноалмазов: в течение недели сохраняется исходное распределение частиц по размерам. При более высокой концентрации плюроника P123 (1 мМ) система через 1–2 дня теряет агрегативную и седиментационную

устойчивость – формируются агрегаты диаметром более 100 нм, которые выпадают в осадок. Добавки плюроника P123 практически не влияют на величины ζ-потенциала ДН-С: в растворах плюроника P123 с концентрацией от 0.1 до 20 мкМ среднее значение ζ-потенциала составляет $+33 \pm 3$ мВ.

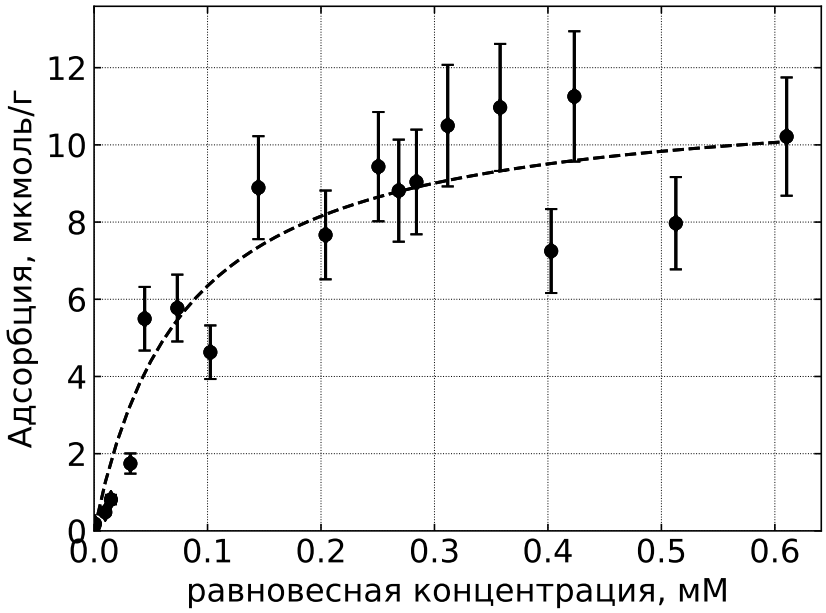


Рисунок 3.9 — Изотерма адсорбции плюроника P123 на наноалмазах ДН-С. Пунктир - расчет по уравнению 3.12.

Значительной десорбции прочно связанных молекул с поверхности ДН-С в воде не происходит. Остаточная адсорбция после выдерживания в растворе бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 40 г/л составляет около 10%, таблица 21. В присутствии мирамистина с поверхности ДН-С десорбируется плюроник P123. Количество десорбируемого плюроника P123 растет с увеличением концентрации мирамистина до 2 мМ и не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации, достигнув величины 72±2%, рисунок 3.10.

3.2.5 Адсорбция олеиламина

Приготовление устойчивой суспензии ТАН-О в октане возможно только в присутствии олеиламина концентрации не менее 8 мМ (или 0.3%), что

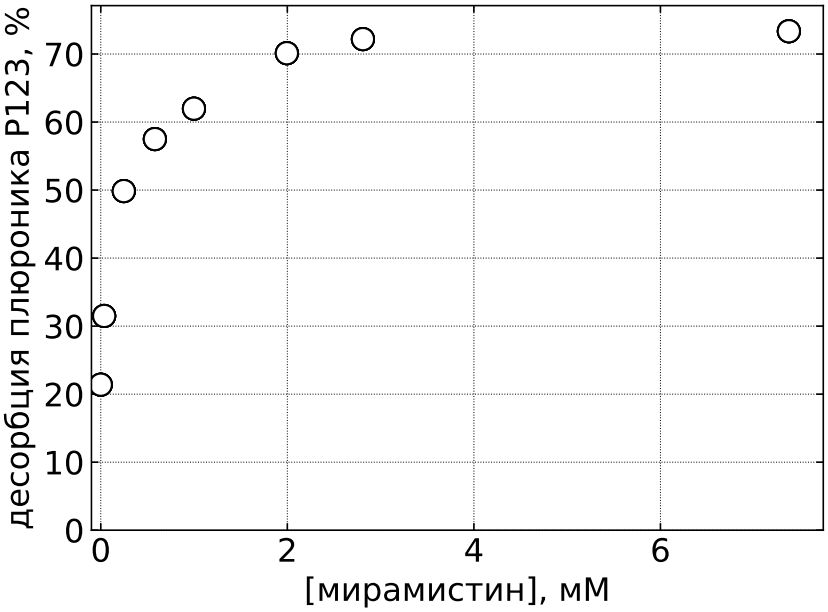


Рисунок 3.10 — Количество десорбированного плюроника P123 с ДН в присутствии мирамистина.

согласуется с рекомендациями, выработанными в работах [128; 198] по приготовлению устойчивых дисперсий ДН в неполярных растворителях. При этой же концентрации изотерма адсорбции олеиламина на наноалмазах ТАН-О достигает плато, рисунок 3.11. Далее с увеличением равновесной концентрации до 19 мМ адсорбция олеиламина значимо не увеличивается. Рассчитанные параметры уравнения 3.12 представлены в таблице 16.

3.2.6 Коадсорбция гуминовых кислот угля и мирамистина

Величина адсорбции мирамистина на ДН-С-СНА значительно выше, чем на не модифицированных наноалмазах, в области концентраций до 1 мМ. Причем количество адсорбированного мирамистина на ДН-С-СНА с увеличением концентрации до 1 мМ растет быстрее, чем на ДН-С, и достигает плато при концентрации 2 мМ. С увеличением концентрации до 5 мМ разница между величиной адсорбции мирамистина на ДН-С и ДН-С-СНА сглаживается, рисунок 3.12. На рисунке для сравнения приведена изотерма адсорбции мирамистина на наноалмазах, описанная раннее в *§ 3.2.3 Адсорбция мирамистина.*

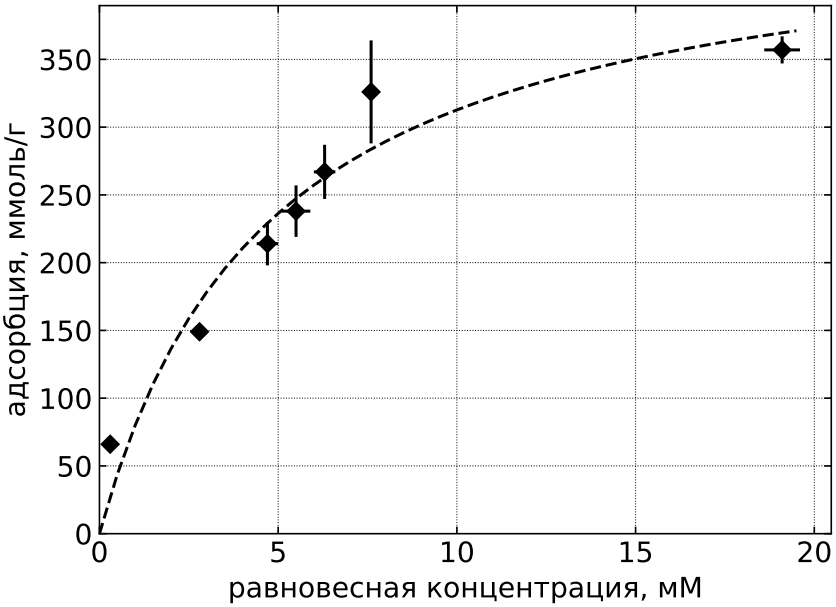


Рисунок 3.11 — Изотерма адсорбции олеиламина на наноалмазах ТАН-О. Пунктирной линией представлены результаты расчета по уравнению 3.12.

Полученные изотермы описаны уравнением 3.12. При адсорбции мирамистина на ДН-СНА знак ζ–потенциала изменяется с отрицательного на положительный и происходит уширение сигнала, но при этом полностью находится в области положительных значений.

Коэффициент равновесия, который используют для оценки обратимости адсорбции при разработке доставщиков лекарственных средств [199], больше при адсорбции мирамистина на ДН-С-СНА, чем при адсорбции на ДН-С, рисунок 3.13. Также следует отметить, что композит ДН-С-СНА-мирамистин образует устойчивые водные дисперсии. Такие тенденции является благоприятными для потенциального применения полученных композитов в качестве систем для доставки лекарственных средств. В таблице 21 представлены величины остаточной адсорбции мирамистина в различных средах.

Можно предположить, что причиной большей адсорбции мирамистина на ДН-С-СНА является различие ДН-С и ДН-С-СНА по знаку электрокинетического потенциала. Молекула мирамистина в условиях эксперимента несет положительный заряд, что способствует усилению взаимодействия с ДН-С-СНА, обладающими отрицательным знаком ζ–потенциала. Подобный эффект был обнаружен при адсорбции мирамистина на ДН-С-О, обладающих отрицательным ζ–потенциалом, величина которой составила 190±30 мкмоль/г при

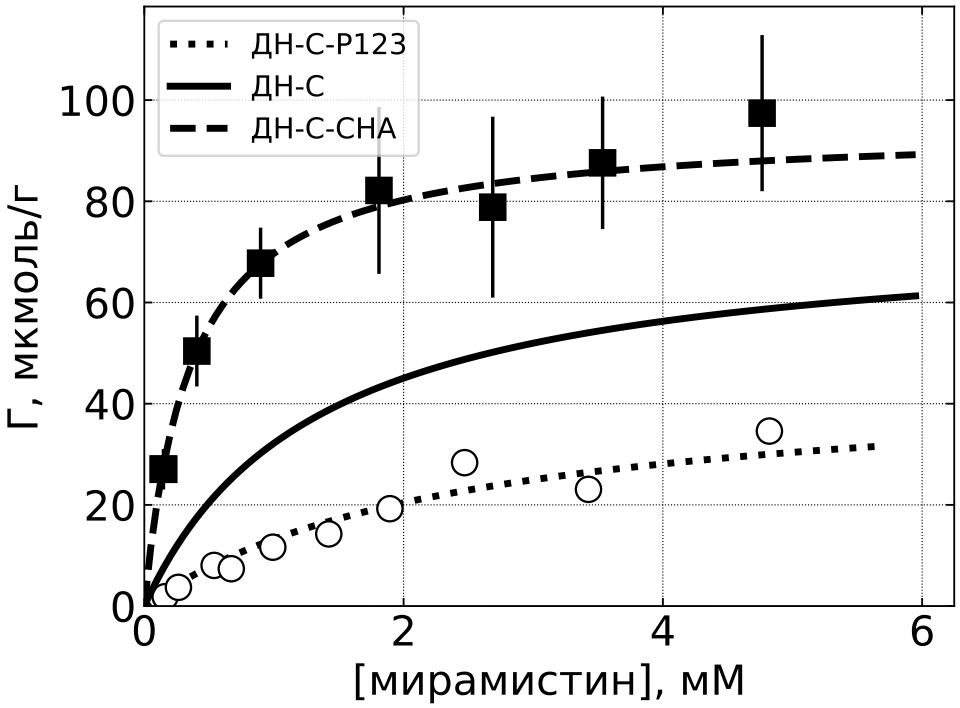


Рисунок 3.12 — Изотермы адсорбции мирамистина на ДН. Линии – расчет адсорбции мирамистина по уравнению 3.12: сплошная – ДН-С, штриховой пунктир – ДН-СНА, точечный пунктир – ДН-Р123. Квадраты и круги – экспериментальные данные по адсорбции мирамистина на ДН–СНА и ДН-Р123.

равновесной концентрации мирамистина 3 мМ. А также и для гуминовых кислот СНА при их адсорбции на ДН-С и ДН-С-О *§ 3.2.2 Адсорбция гуминовых веществ*. Такое предположение подтверждается результатами работы [200], в которой продемонстрирована зависимость адсорбции пропидиум иодида от заряда поверхности ДН. Было показано, что в случае отрицательно заряженной поверхности ДН активнее взаимодействуют и связывают молекулы исследуемого вещества. В другой работе [201] показано, что с увеличением молекулярной массы адсорбируемого вещества вклад электростатического взаимодействия снижается. Так, адсорбция молекулы лизоцима на ДН, различающихся по знаку заряда ζ–потенциала, отличалась в два раза. А молекулы БСА при pH 7.0 адсорбировались с одинаковой эффективностью. Этим результатам несколько противоречат данные по адсорбции БСА при разных pH раствора (до и после изоэлектрической точки белка), полученные в работе [202], где было показано, что величина удельной адсорбции максимальна в изоэлектрической точке

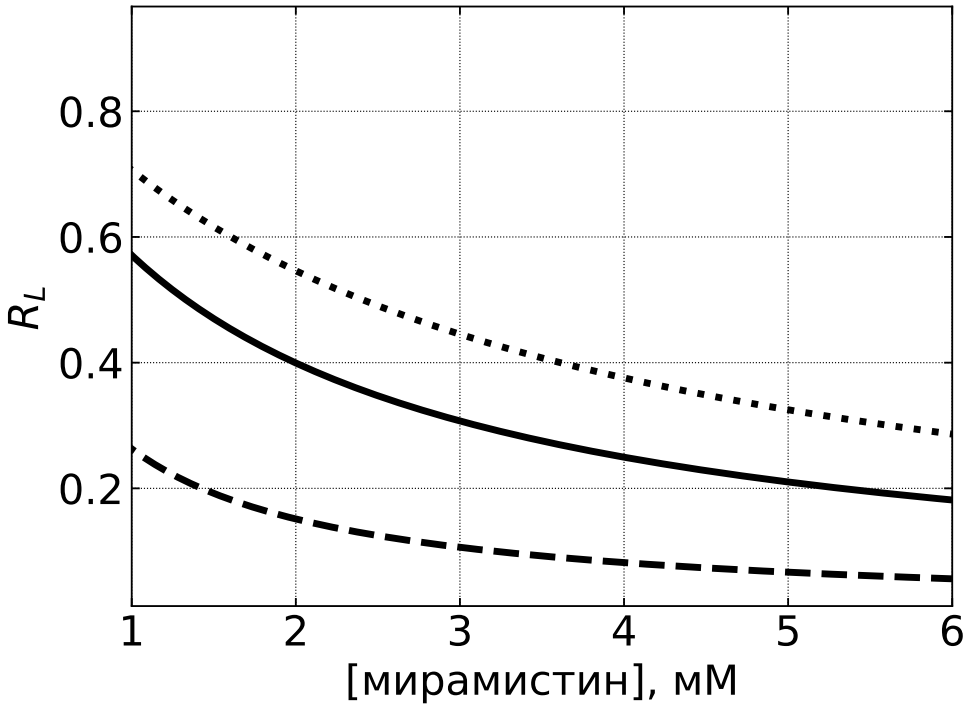


Рисунок 3.13 — Изменение параметра равновесия R в зависимости от концентрации мирамистина. Сплошная линия – при адсорбции мирамистина на наноалмазах; штриховой – на наноалмазах, модифицированных СНА; точечный – на наноалмазах, модифицированных Р123.

Таблица 21 — Десорбция мирамистина с поверхности наноалмазов в различных средах

	ДН-С	ДН-С-СНА	ДН-С-Р123
Величина остаточной адсорбции после 4-х суток, %			
H_2O	71±1	78±4	95±5
фосфатный буфер	70±1	76±1	50±3
PBS	70±1	70±2	55±3
БСА 40 г/л	20±5	15±5	15±5

pH 4.0. При этом как сами ДН, так и агрегаты ДН с БСА в диапазоне pH от 0 до 9 обладают отрицательным знаком заряда ζ–потенциала.

3.2.7 Коадсорбция плюроника P123 и мирамистина

Величина адсорбции мирамистина на ДН-С-Р123 значительно ниже, чем на не модифицированных наноалмазах ДН-С. В таблице 20 представлены результаты расчета по уравнению 3.12. Если предположить, что агрегаты наноалмазов с адсорбированным мирамистином имеют сферическую форму и удельная поверхность наноалмазов составляет 265 м^2/г, то исходя из максимальной адсорбции, соответствующей плотному адсорбционному слою, доступная поверхность для одной молекулы составляет 7.0 нм^2; тогда как при адсорбции мирамистина на модифицированные плюроником Р123 наноалмазы 4.4 нм^2. Рассчитанное значение является слишком большим для такой молекулы как мирамистин, и следовательно плотного адсорбционного слоя не происходит. Следует напомнить, что при адсорбции ППК на ДН было показано, что не вся поверхность 265 м^2/г доступна для адсорбции подобных молекул. Значение коэффициента равновесия R_L при адсорбции мирамистина на ДН-С-Р123 ниже, чем при адсорбции на ДН-С, рисунок 3.13.

Адсорбционные слои мирамистина на композите ДН-С-Р123 мало влияют на размер частиц, рисунок 3.14, при этом ζ-потенциал остается положительным. В таблице 22 приведены общие характеристики коллоидных растворов модифицированных наноалмазов ДН-С.

Таблица 22 — Характеристики гидрозолей наноалмазов

	мода, нм	полуширина, нм	ζ, мВ
ДН-С	35	от 20 до 45	+34±7
ДН-С-СНА	70	от 55 до 100	−42±3
ДН-С-СНА-мирамистин	50	от 40 до 70	+ζ*
ДН-С-Р123	50	от 40 до 70	+33±3
ДН-С-Р123-мирамистин	35	от 30 до 45	+27±6

*Уширение сигнала, пояснения в тексте

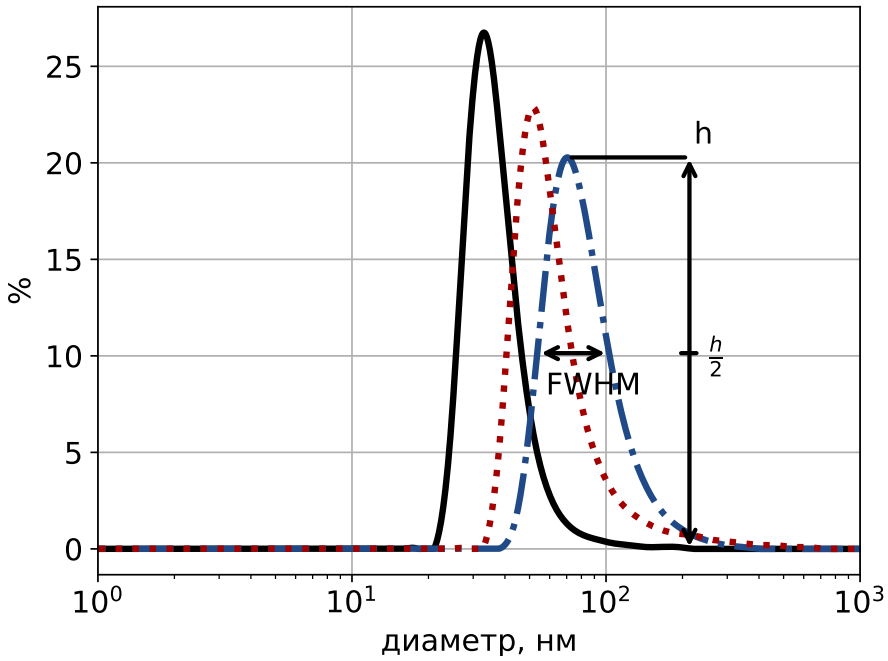


Рисунок 3.14 — Распределение агрегатов наноалмазов по размеру: сплошная линия – ДН-С, штрихпунктирная линия – ДН-С-СНА и точечный пунктир – ДН-С-СНА-мирамистин; стрелочками показан расчет полуширины распределения.

3.2.8 Заключение по разделу 3.2

С помощью меченных тритием соединений получены количественные характеристики адсорбции производных пантотеновой кислоты, низкомолекулярных и полимерных ПАВ, гуминовых веществ из различных источников. Применение метода радиоактивных индикаторов позволило наблюдать адсорбцию при малых концентрациях, в смеси веществ и изучить влияние адсорбционного слоя вещества на последующую коадсорбцию. Определить изменение концентрации при адсорбции ГВ другими методами является затруднительным. Прочность удерживания веществ оценивали в воде, буферных системах, в том числе изотонических, и в присутствии альбуминов. При изучении коадсорбции определяли прочность удерживания в среде коадсорбируемого адсорбтива. Агрегативную и седиментационную устойчивость полученных комплексов определяли визуально, методом ДРС и по изменению ζ-потенциала.

Структурные особенности исследуемых веществ позволили выявить закономерности их взаимодействия с ДН. На примере ППК и ФК показано, что величина адсорбции зависит от устойчивости коллоидных растворов ДН и с образованием стабильных суспензий, размер агрегатов в которых меньше 100 нм, не зависит от размера частиц. В диапазоне от 277 до 310 K не оказывает влияние на адсорбцию и температура эксперимента. На примере катионного ПАВ мирамистина и ГК продемонстрировано влияние ζ-потенциала величину адсорбции этих веществ. Мирамистин значительно лучше адсорбируется на ДН с -ζ, ГК на ДН с +ζ. Адсорбционные слои ГК изменяют знак +ζ-потенциала ДН на отрицательный и увеличивают адсорбцию мирамистина на образовавшемся комплексе ДН с ГК.

Детальное изучение процессов сорбции исследуемых веществ было проведено для анализа поведения ДН в модельных системах. Взаимодействие ДН с растениями исследовали при моделировании попадания ДН в окружающую среду, поэтому необходим был учет влияния ГВ. ПАВ традиционно используют для изменения распределения наночастиц в различных средах, что может быть полезно при моделировании взаимодействия с клеточной мембраной в системах вода–органическая жидкость. ППК были выбраны для изучения влияния структурных особенностей веществ на параметры иммобилизации на ДН.

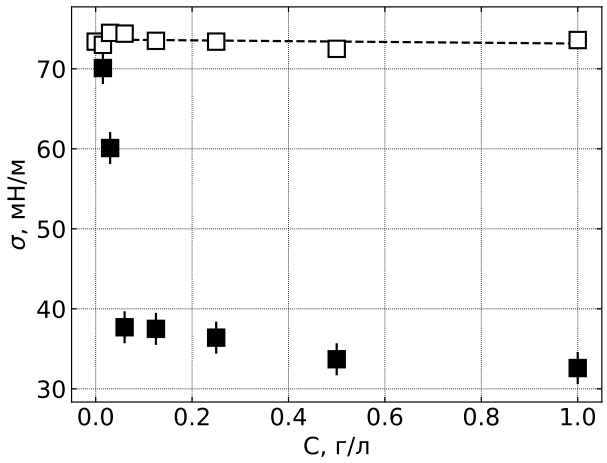
3.3 Изучение распределения ДН в системах вода/органическая жидкость и композитных пленках

3.3.1 Исследование распределения наноалмазов между водной и органической фазами

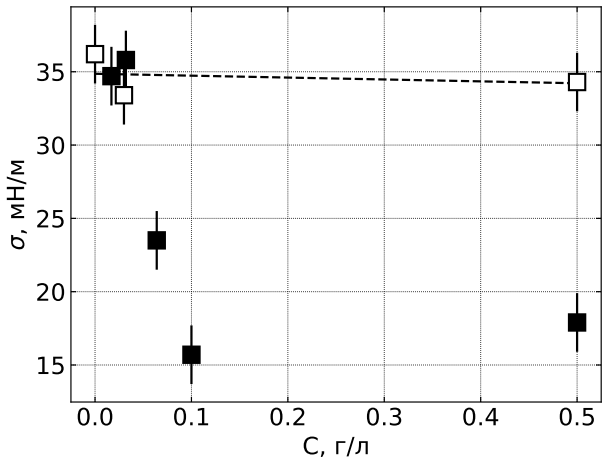
В системах вода/органическая жидкость наноалмазы находятся преимущественно в водной фазе, их содержание в органических фазах разной природы в 10-100 раз меньше, чем в воде, таблица 23. При модифицировании поверхности неионогенным ПАВ плюроником Р123 сохраняется агрегативная устойчивость дисперсии в воде и при условии необратимого связывания плюроника Р123 на поверхности ДН повышается в несколько раз концентрация наноалмазов ДН-С в органической фазе. По-видимому, адсорбционные слои плюроника Р123 на наноалмазах приводят к частичной гидрофобизации поверхности, что было подтверждено данными межфазной тензиометрии, рисунок 3.15.

Коэффициент распределения наноалмазов ТАН-О в системе октан–вода составляет 0.016, содержание в поверхностном слое не превышает 10%. Добавление олеиламина в органическую фазу системы октан – гидрозоль наноалмазов ТАН-О приводит к увеличению коэффициента распределения ДН в три раза – до значения 0.047 $\pm$ 0.009, при этом 30% ДН концентрируется на границе раздела фаз. При диспергировании в октане высушенного порошка наноалмазов ТАН-О получить стабильные суспензии удается только при добавлении в систему олеиламина при концентрациях от 0.3% и выше. Приготовление системы в обратном порядке – золь ТАН-О стабилизированный в октане олеиламином/вода способствует увеличению коэффициента распределения ДН до значения 1.2 $\pm$ 0.1, при этом 70% ДН концентрируется на границе раздела фаз.

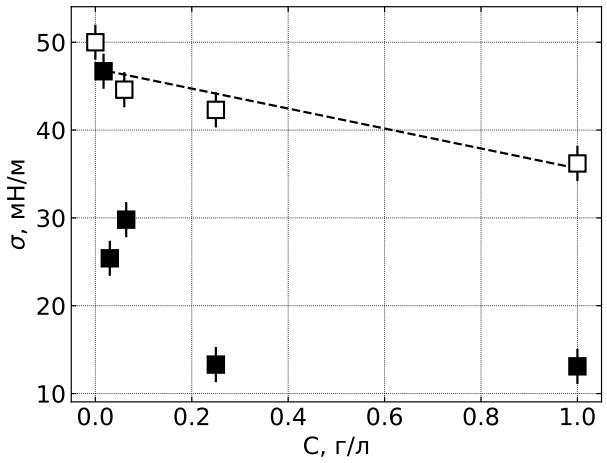
Модификация наноалмазов гуминовыми кислотами угля снижает коэффициент распределения ДН-С в системах вода – октанол и вода – п-ксилол, таблица 23. После взаимодействия ДН-С-СНА с мирамистином, коэффициент распределения в системе вода – октанол увеличивается и достигает значения исходного ДН-С. Гидрозоль комплекса ДН-С-О-мирамистин, отделенный от маточного раствора мирамистина, нестабилен – происходит увеличение размера агрегатов и быстрая седиментация. При этом в системе вода–октанол комплекс



а)



б)



в)

Рисунок 3.15 — Поверхностное натяжение на границе водной дисперсии ДН-С с воздухом (а), п-ксилолом (б) и октаном (в) в зависимости от концентрации ДН. Белые символы – наноалмазы ДН-С, черные символы композит ДН-С-Р123.

ДН-С-О-мирамистин концентрируется в органической фазе значительно лучше других изученных комплексов и коэффициент распределения составляет 3.2 ± 0.1.

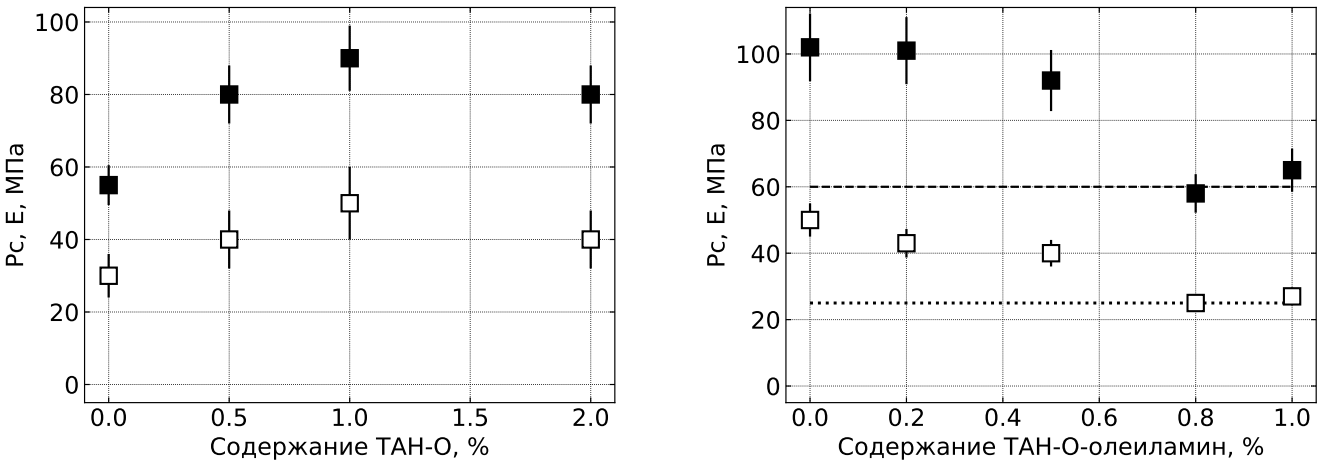
Таблица 23 — Коэффициенты распределения наноалмазов в системе вода–органическая жидкость

перераспределяемое вещество	Органическая жидкость		
	октан	октанол	п-ксилол
ДН-С	0.009 ± 0.002	0.13 ± 0.01	0.026 ± 0.002
ДН-С-СНА	0.006 ± 0.002	0.023 ± 0.003	0.003 ± 0.002
ДН-С-СНА-мирамистин	0.005 ± 0.002	0.15 ± 0.01	0.005 ± 0.002
ДН-С-Р123	0.02 ± 0.01	0.3 ± 0.1	0.13 ± 0.02
ДН-С-Р123-мирамистин	0.024 ± 0.001	0.170 ± 0.014	0.001<

3.3.2 Исследование распределения наноалмазов в композитных пленках

Обнаружено, что добавление ТАН-О значительно улучшает механические характеристики композитных пленок на основе поливинилового спирта. Модуль Юнга и предел прочности увеличивается на 80 и 50% соответственно 3.16 (а). По-видимому, взаимодействие гидроксильных групп ПВС с поверхностью ДН приводит к эффективному сшиванию полимера в процессе создания композитной пленки, что увеличивает прочность материала. На рисунке 3.17 и в приложении Е приведены фотографии и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ДН.

Добавление ТАН-О-олеиламин в состав композитных пленок снижает как модуль эластичности так и предел прочности материала, эффект усиливается с увеличением содержания модифицированных ДН в пленке. По-видимому,



а) б)

Рисунок 3.16 — Модуль упргуости E (белые квадраты) и предел прочности P_c (черные квадраты) композитных пленок при различном содержании ТАН-О (а) и ТАН-О, модифицированных олеиламином (б); линии относятся к характеристикам пленок без добавления ДН.

гидрофобизация ДН олеиламином приводит к ослабеванию взаимодействия наночастиц с полимерной матрицей и в результате добавление ТАН-О-олеиламин не улучшает механических свойств материала.

Использование меченных тритием ДН позволило определить их распределение в полимерных пленках. С помощью метода авторадиографии обнаружено, что наноалмазы ТАН-О, добавленные в поливиниловый спирт при синтезе композитных пленок, распределены в полученных композитных пленках равномерно, рисунок 3.17. Концентрация ДН на поверхности составляет 1.9 ± 0.3 мг/см^2.Добавление ТАН-О-олеиламин приводит к неравномерному распределению наночастиц в пленке: общее содержание в нижней части пленки (контактирующая с поверхностью чашкой Петри) составляет 2.9 ± 0.2 мг/см^2, что в 10 раз больше, чем в верхней части пленки (контактирующая с воздухом), которое составляет 0.3 ± 0.2 мг/см^2.

Гидрофобизация поверхности ДН иммобилизацией олеиламина приводит к концентрированию наноалмазов ТАН-О в нижней части пленки, что происходит вследствие агрегации и последующей седиментации гидрофобизированного комплекса ТАН-О-олеиламин в растворе поливинилового спирта.

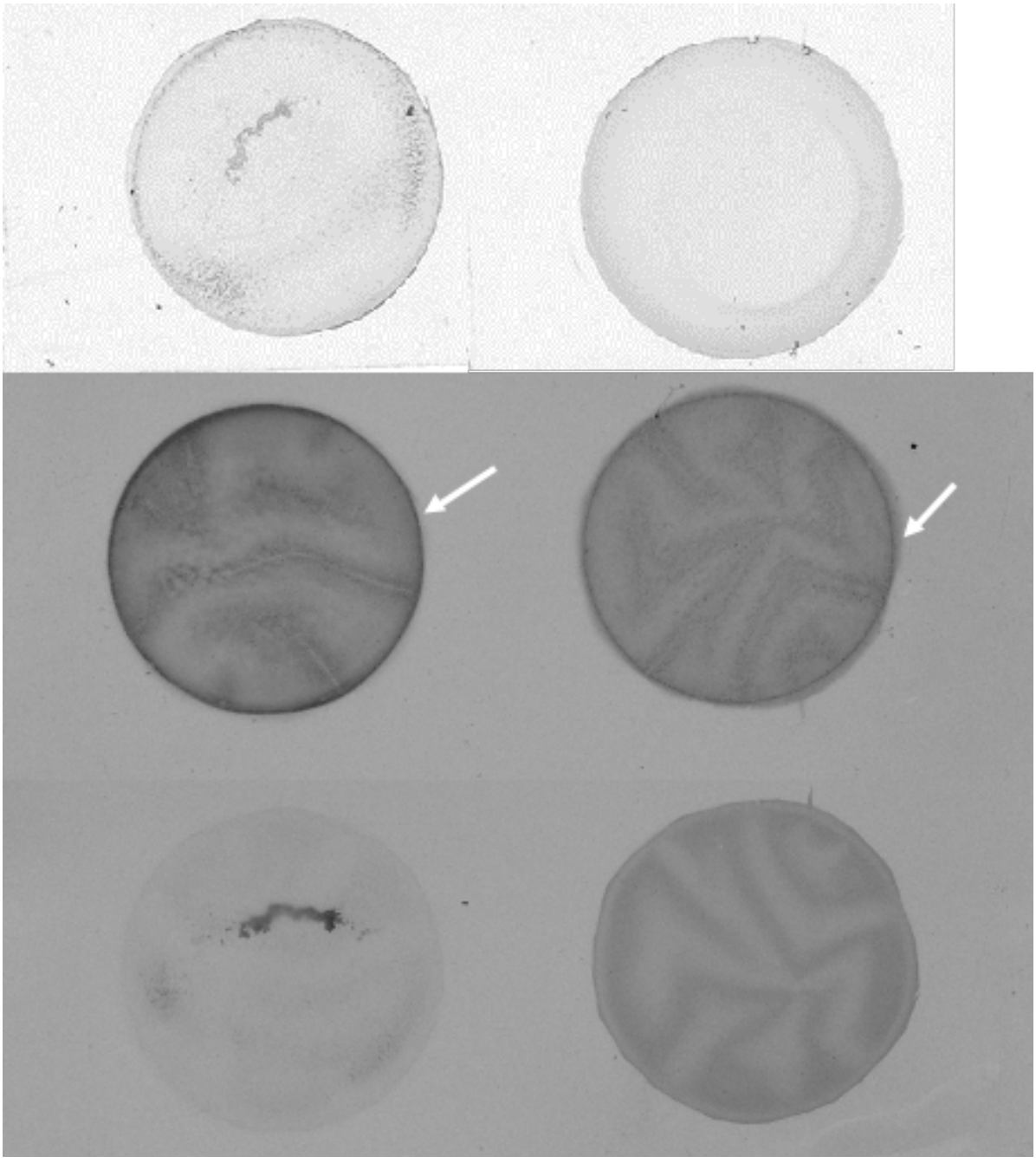


Рисунок 3.17 — Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин (слева) и [^{3}H]ТАН-О (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%.

3.3.3 Заключение по разделу 3.3

Впервые предложен метод оценки гидрофобности ДН на основании данных о распределении в системах двух несмешивающихся жидкостей. В системах вода/органическая жидкость ДН находятся преимущественно в водной фазе, их содержание в органических фазах разной природы в 10-100 раз меньше, чем в воде. Значительная часть ДН концентрируется на границах раздела фаз.

Полученные данные об увеличении коэффициента распределения ДН при модификации поверхности плюроником P123 и олеиламином свидетельствуют о гидрофобизации ДН. Эти данные согласуются с результатами межфазной тензиометрии (показано уменьшение поверхностного натяжения растворов в присутствии комплекса ДН с плюроником P123) и смачивания (уменьшение краевого угла смачивания ДН раствором плюроника P123). Особо эффективное модифицирование поверхности ДН и, соответственно, наибольший рост коэффициента распределения наночастиц, происходит при непосредственном введении ДН в раствор ОЛА в октане с последующим приведением в контакт полученного золя с водой. Адсорбция мирамистина на ДН способствует увеличению коэффициента распределения образующихся комплексов в системе вода–октанол, что может свидетельствовать об увеличении их сродства к клеточной мембране. Коэффициенты распределения зависят от порядка смешения фаз: предварительная стабилизация олеиламином суспензий ДН в октане приводит к увеличению содержания ДН на границе раздела фаз и коэффициента распределения в октан.

Продемонстрировано влияние гидрофобизации поверхности ДН на равномерность распределения ДН в композитных пленках и на механические свойства материала. Добавление модифицированных газофазным окислением ДН способствует увеличению прочности композитных пленок на основе ПВС, при этом их распределение в объеме материала равномерное. Гидрофобизация ДН олеиламином приводит к неравномерному распределению наночастиц в пленках и уменьшению прочности материала.

3.4 Влияние гуминовых веществ на поглощение наноалмазов растениями

3.4.1 Свойства суспензии [^{3}H]ДН до и после контакта с растениями

На рисунке 3.18 на примере гидрозоля ДН-С и ДН-С с добавкой речных фульво- и гуминовых кислот показано изменение концентрации ДН в гидрозоле при контакте с растениями. Из рисунка 3.18 видно, что концентрация ДН быстро уменьшается в течение первых 300 минут и достигает минимального значения к времени экспозиции 1400 мин. Все остальные эксперименты проводили без контроля кинетики и концентрации коллоидного раствора, выдерживая растения в контакте с [^{3}H]ДН-С в течение суток.

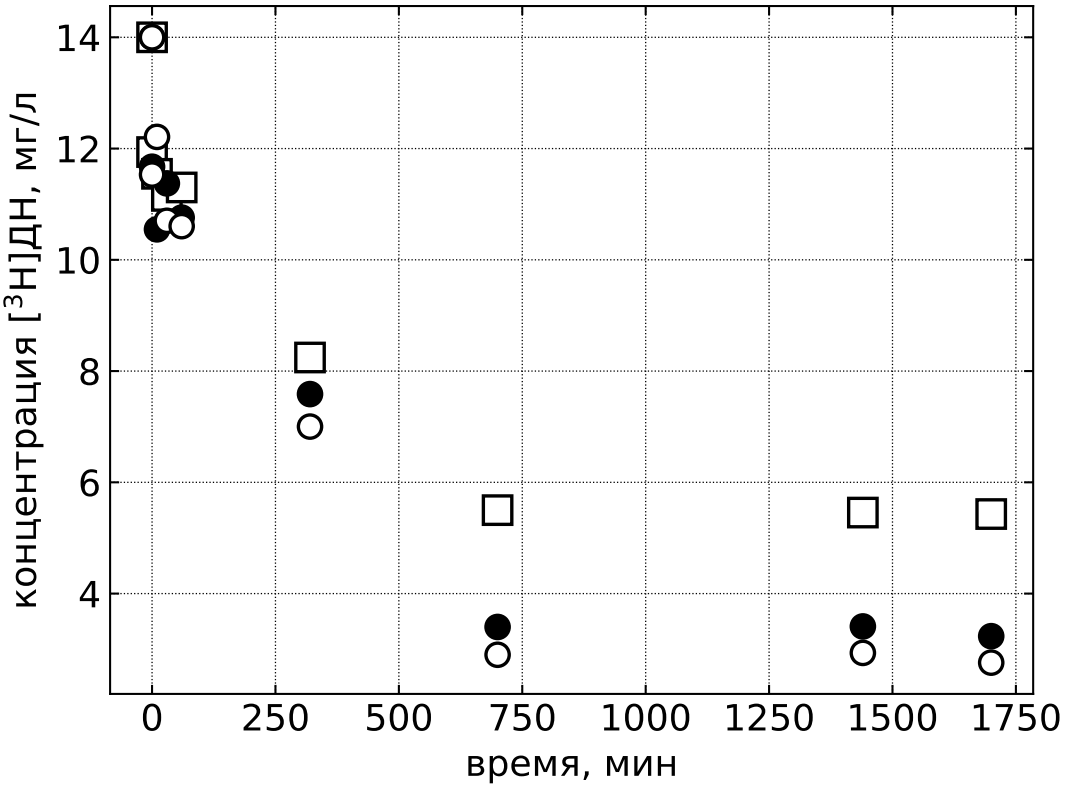


Рисунок 3.18 — Изменение концентрации [^{3}H]ДН-С в суспензии при контакте с растениями: □ – ДН + SRHA; • – ДН + SRFA; ○ – ДН без ГВ.

Поскольку ультразвуковая обработка флакона с остатками гидрозоля после контакта с растениями мало влияла на ее радиоактивность, то можно

предположить, что при контакте ДН с растениями происходит их адсорбция на корнях растений, поглощение ДН растениями, а также возможна необратимая адсорбция ДН на стенках пробирок, в которых проводили эксперимент.

После взаимодействия с растениями суспензии ДН теряют устойчивость и средний диаметр частиц в суспензии увеличивается. Особенно сильно проявились изменения свойств суспензии наноалмазов ДН-С при отсутствии ГВ – средний диаметр частиц достигает 0.5 мкм. Вероятно, изменение агрегационной устойчивости ДН происходило из-за взаимодействия с веществами, которые выделяются в результате жизнедеятельности растения. По-видимому, эти вещества адсорбируются на поверхность ДН и способствуют агрегации частиц. Для ДН, модифицированных ГВ, агрегация частиц не столь сильная, однако модуль ζ–потенциала значительно снижается.

3.4.2 Определение содержания ДН в растениях методом авторадиографии

По данным авторадиографии величина адсорбции ДН на поверхности корня определяется, прежде всего, размером корня, а не составом золя. На рисунке 3.19 приведены фотографии и авторадиографические изображения корней и побегов растений. По изображениям АРГ нельзя определить содержание [^{3}H]ДН-С в растениях количественно, поскольку детектировать излучение трития в растениях возможно только с приповерхностного слоя.

Радиоактивность [^{3}H]ДН в нижней части стебля (черные участки на АРГ, рисунок 3.19) была в 100 раз больше, чем в соседнем верхнем участке стебля (золь ДН), для смеси ДН+ГВ также найдено превышение в 7 раз (золь ДН+ГК) и в 3,5 раза (золь ДН+ФК). Следовательно распределение ДН в листьях растений гетерогенное. В целом, в всем остальном листе происходит постепенное увеличение содержания ДН от базального до апикального части листового лезвия.

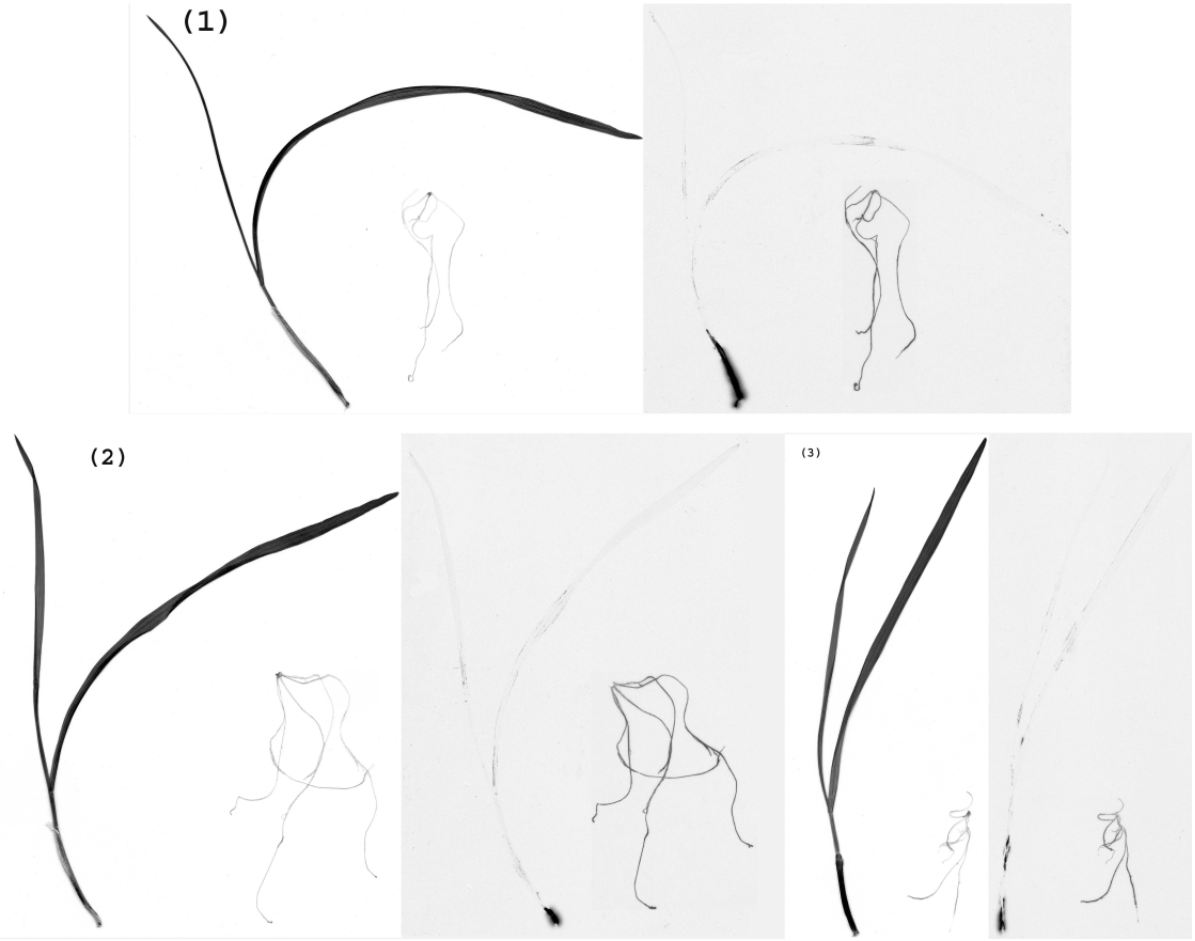


Рисунок 3.19 — Фотография (слева) и авторадиограмма (справа) побегов и корней растениий: (1) – ДН, (2) – ДН + SRFA, (3) - ДН + SRHA.

3.4.3 Определение содержания ДН в растениях по радиоактивности растворов, полученных разложением частей растений в азотной кислоте

Подбор условий измерения азотнокислых растворов, полученных при окислительном разложении проростков пшеницы

С помощью препаратов [^{3}H]ДН-С известной радиоактивности нашли оптимальные условия регистрации скорости счета препаратов, полученных в результате окислительного разложения растений с помощью 54% HNO_3. Установлено, что для определения радиоактивности полученных растворов с помощью жидкостного сцинтилляционного счета лучше всего подходит сцинтилляционная жидкость OptiPhase. Добавление $\leqslant 10$ мкл измеряемого раствора

в 1 мл сцинтиллятора не приводит к значительному снижению эффективности регистрации и разрушению сцинтиллятора. Измерение флакона с внесенной пробой сразу после смешивания и через 1 час 40 минут позволяет корректно определить радиоактивность внесенного [^{3}H]ДН-С из скорости счета препарата и параметра гашения. Внесение $\geqslant$ 20 мкл приводит к разрушению сцинтиллятора, образованию эмульсии. Параметр гашения B/A не отражал при этом ухудшение условий регистрации, что могло приводить к ошибке в расчете радиоактивности растворов с использованием калибровочной кривой гашения. В таблице 3 приведены расчетные значения радиоактивности растворов с использованием стандартной калибровочной кривой гашения. Видно, что избыточный объем добавленного азотнокислого раствора приводит к ошибке в определении радиоактивности [^{3}H]ДН-С до 25%. Разбавление водой азотнокислого препарата перед смешением со сцинтилляционной жидкостью ухудшает условия регистрации и ошибка возрастает до 50%.

Хранение полученной смеси азотнокислого раствора в смеси с сцинтиллятором OptiPhase в соотношении 1 к 100 приводит к снижению эффективности регистрации и увеличению ошибки определения радиоактивности. Использование других сцинтилляционных жидкостей оказалось малоэффективным. В жидкости (2) на основе диоксана эффективность регистрации снижалась до 10% при добавлении 10 мкл азотнокислого раствора к 1 мл сцинтиллятора. Применение сцинтилляционной жидкости ScintiVerse Bio-HP для измерения скорости счета азотнокислого раствора при объемных соотношениях 1 к 100 при кажущейся высокой эффективности регистрации приводило к сильно заниженному значению радиоактивности, по-видимому, из-за образования двухфазной системы.

Для доказательства того, что при разложении растений азотной кислотой (54%) вся радиоактивная метка из [^{3}H]ДН переходила в тритиевую воду провели центрифугирование раствора, полученного при разложении растения, и измерили скорость счета препарата. Установлено, что центрифугирование препарата в течение 2 часов при 13500 об./мин не приводит к значимому изменению скорости счета раствора. Поскольку в таких условиях происходит полное осаждение ДН, то можно сделать вывод о количественном удалении трития из ДН и, следовательно, для корректного измерения радиоактивности препарата достаточно отбирать часть раствора, полученного при разложении растения.

Таким образом, для корректного измерения радиоактивности азотнокислых растворов, полученных при разложении растений, лучше использовать сцинтилляционную жидкость OptiPhase, смешивать 100-150 мкл раствора с 12-18 мл сцинтиллятора, а измерение проводить в течение первого часа после добавки раствора к сцинтиллятору.

Количество ДН в корнях и стеблях растения

В таблице 24 приведены результаты определения содержания ДН в проростках пшеницы по радиоактивности растворов, полученных разложением частей растений в азотной кислоте. Содержание ДН в корнях растения в 10^3 раз больше, чем в стеблях. Адсорбция ДН на поверхности корня может быть тесно связана с устойчивостью суспензии ДН, которая можно косвенно оценить по ζ-потенциалу ДН в присутствии ГВ, таблица 19.

Таблица 24 — Содержание [^{3}H]ДН в частях растений *Triticum aestivum*, мг/г

	содержание [^{3}H]ДН мг/г		
образец	в корнях	в стеблях	в листьях
ДН-С	1720 ± 720	1.2 ± 0.7	0.6 ± 0.4
ДН-С + СНА	680 ± 130	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.2
ДН-С + SRFA	1170 ± 400	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.1
ДН-С + SRHA	850 ± 290	1.5 ± 1.1	0.9 ± 0.5
ДН-С + PFA	1810 ± 940	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3
ДН-С + PHA	750 ± 300	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
ДН-С + PFA >12кДа	1570 ± 580	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
ДН-С + PHA >12кДа	1130 ± 200	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2

Установлена корреляция между содержанием ДН в корнях растения и ζ-потенциалом коллоидных растворов ДН в присутствии ГВ, рисунок 3.20. Коэффициент корреляции $r = 0.90$, что указывает на важную роль ζ-потенциала в процессе ассоциации ДН с корнями растений [203]. Наблюдаемое явление может быть объяснено тем, что отрицательно заряженная поверхность корня

предотвращает адсорбцию отрицательно заряженных частиц ДН, модифицированных ГВ. В отсутствии ГВ в системе частицы ДН обладают положительным ζ-потенциалом, при этом содержание ДН в корнях существенно не отличалось от системы с наличием фульвокислот. Следовательно, наряду с знаком электрокинетического потенциала важна коллоидная стабильность суспензии при ассоциации ДН с растениями.

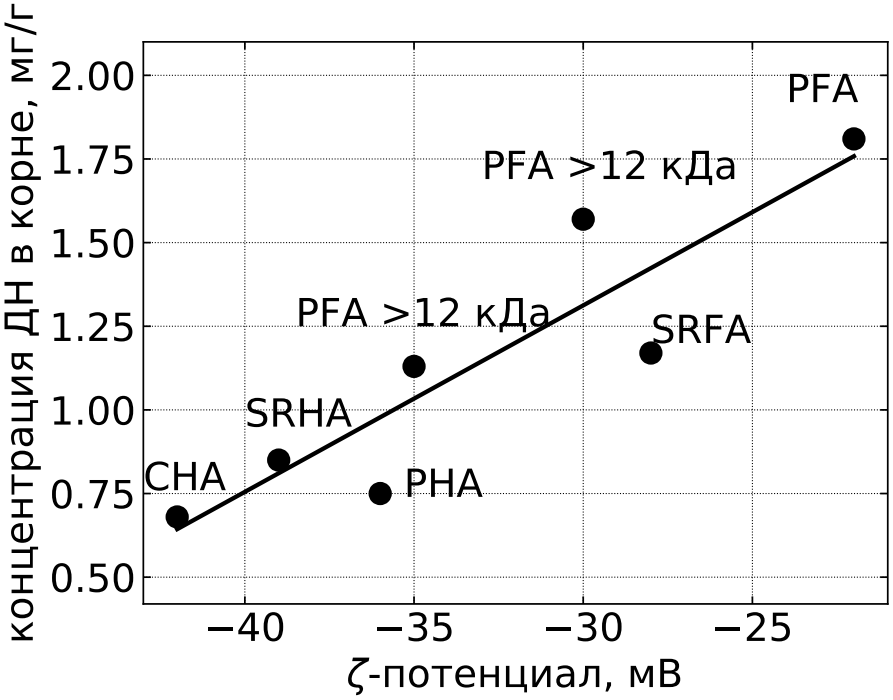


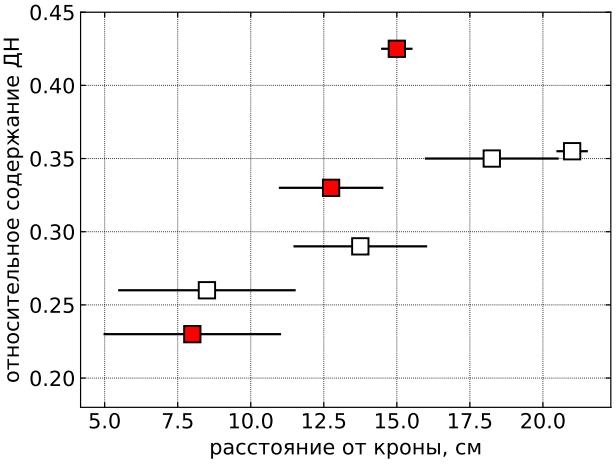
Рисунок 3.20 — Зависимость содержания наноалмазов ДН-С в корнях растения от ζ-потенциала образующихся комплексов наноалмазов с гуминовыми веществами.

Гуминовые кислоты сильнее препятствуют поступлению ДН в корни по сравнению с фульвокислотами. Так фульвокислоты независимо от молекулярно-массового распределения практически не изменяли количество ДН в корнях. Поступление наноалмазов в побеги, напротив, усиливается в присутствии ГВ. Исключение составили гуминовые кислоты торфа, которые характеризуются наименьшей среди ГВ адсорбцией на ДН. Особенно сильный эффект наблюдался для речных гуминовых кислот SRHA, проявляющих наибольшую способность к адсорбции на поверхности ДН ($\Gamma_{max} = 84$ мг/г).

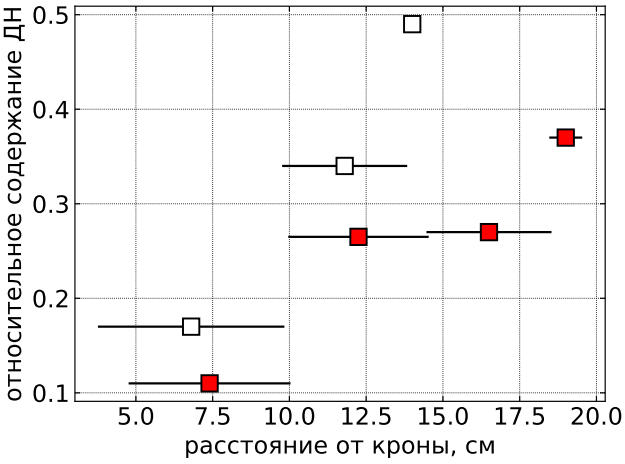
Фульвокислоты препятствуют поступлению ДН в надземные части растения. При сравнении физико-химических характеристик ГВ и изменением

электрокинетического потенциала ДН в их присутствии обнаружена положительная корреляция между ζ-потенциалом и соотношением атомов H/C ($r = 0.86$) и O/C ($r = 0.81$). По всей видимости снижению коллоидной стабильности ДН способствуют ГВ, обогащенные алифатическими фрагментами и кислородсодержащими группами. Кроме того, может быть обнаружена закономерность: чем выше максимальная адсорбция ГВ на ДН, тем выше их поглощение корнями растений. Исходя из параграфа 3.2.2 *Адсорбция гуминовых веществ* можно сделать предположение, что адсорбция ГВ на ДН происходит как по электростатическому так и гидрофобным взаимодействиям. По электростатическому механизму происходит связывание между карбоксильными группами ГВ и положительно заряженными поверхностными группами ДН [166]. Кроме того, происходит отталкивание между карбоксильными группами как ГВ, так и ДН, что приводит к уменьшению адсорбции фульвокислот, которые обладают более высоким отношением O/C. Таким образом, модификация поверхности ДН фульвокислотами приводит к уменьшению общего поверхностного заряда. По всей видимости более высокая адсорбция гуминовых кислот на ДН обеспечивается за счет гидрофобных взаимодействий, что подтверждается более высокой адсорбцией гуминовых кислот на поверхности водно-органической жидкости [204]. Не смотря на то, что происходят процессы электростатического притяжения и отталкивания, благодаря высокой по величине адсорбции общий заряд поверхности (по модулю) увеличивается.

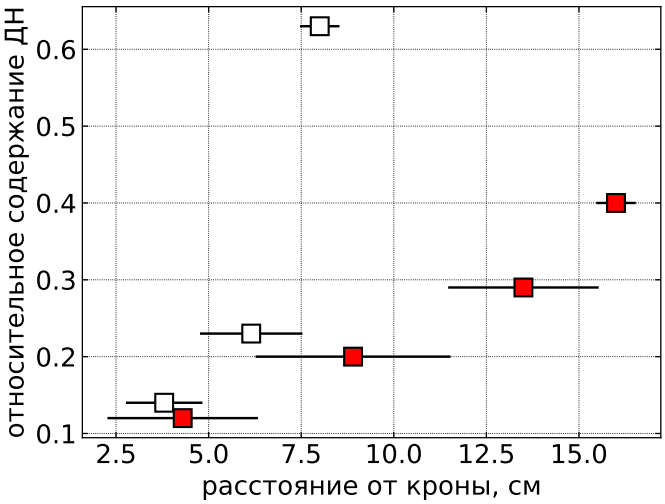
Для оценки зависимости содержания ДН от удаленности от места соединения корня с побегом для некоторых растений провели более детальный анализ распределения [^{3}H]ДН. Для этого стебель и листья разрезали на 2-4 части в разных участках первого листа, включая основную, среднюю и апикальную части листового лезвия, затем провели разложение частей азотной кислотой. Максимальное содержание ДН произошло в нижней части побегов, Что согласуется с данными АРГ. Было обнаружено, что количество ДН в листе возрастает от его нижней части к апексу. Содержание ДН в разных листьях одного растения в большинстве случаев также меняется одинаковым образом от основания листа к апексу. До 40% [^{3}H]ДН концентрируется в апикальной зоне. Аналогичное накопление вещества в апикальной области было отмечено для ГВ в работе [173]. Локализация ДН в кончике побега может быть связана с замедлением ДН в верхних частях продольных вен вследствие увеличения концентрации ДН в соке ксилемы из-за испарения воды. Поэтому накопление ДН в апикальных частях



а)



б)



в)

Рисунок 3.21 — Распределение ДН вдоль листа. Красные и белые символы относятся к разным листам растения, горизонтальные линии соответствуют длине участка листа: (а) ДН + SRFA, (б) ДН + SRHA, (в) ДН.

листьев можно объяснить высокими уровнями васкуляризации в этом регионе в однодольных [205]. Измерение частей стебля в сцинтилляционной жидкости на основе толуола до разложения азотной кислотой показали, что толуолом смывается не более 10% вещества с поверхности.

3.4.4 Фитотоксичность ДН

Влияние наноматериалов на растения зависит как от химической природы, концентрации и размера наночастиц, так и от вида растений [206]. В диапазоне концентраций от 10 до 500 мг/л наночастицы, такие как углеродные нанотрубки [207], TiO_2 [208], Al_2O_3 [209] не проявляют фитотоксических эффектов. Однако в работе [210] продемонстрировано положительное влияние наночастиц TiO_2 на фотосинтез в листьях томата при небольшом тепловом стрессе. Авторы работы отмечают, что наночастицы TiO_2 значительно уменьшают минимальную флуоресценцию хлорофилла и относительный перенос электронов в листьях.

Влияние ДН и ГВ на основные параметры фотосинтеза оцениваемого по флуоресценции хлорофилла представлены в таблице 25. Наноалмазы ДН-С не оказывали существенного влияния на фотосинтез пшеницы. Максимальная относительная скорость электронного транспорта $rETR_{max}$, которая является основным параметром эффективности фотосинтеза, полученная из RLCs-анализа, не зависит от присутствия ГВ в изученных системах. Обнаружено, что в присутствии ДН-С снижается коэффициент максимальной утилизации световой энергии α и коэффициент насыщения светом E_k. Снижение коэффициента E_k свидетельствует о небольшой токсичности ДН-С, выражающейся в отрицательном влиянии на фотосинтез растений при высоком уровне освещения, что указывает на возможное ухудшение транспорта электронов в фотосинтетической цепи. Похожие зависимости были ранее обнаружены для тяжелых металлов при высоких интенсивностях света [211].

Влияние ДН-С на фотосинтез растений зависит от наличия и свойств ГВ в системе. Присутствие в системе ФК приводит к частичному возрастанию α (РНА и фракция РНА $>$ 12 кДа) или E_k (SRFA), а присутствие ГК полностью

Таблица 25 — Влияние ДН и ГВ на основные параметры RLCs флуоресценции хлорофилл проростков пшеницы

образец	α	$rETR_{max}$, %	E_k, мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$
контроль	0.31 ± 0.01	23 ± 3	294 ± 7
ДН-С	0.27 ± 0.01	26 ± 4	260 ± 5
ДН-С + CHA	0.34 ± 0.01	49 ± 5	431 ± 6
ДН-С + SRFA	0.25 ± 0.01	27 ± 3	313 ± 11
ДН-С + SRHA	0.29 ± 0.01	26 ± 3	300 ± 5
ДН-С + PFA	0.33 ± 0.02	32 ± 4	199 ± 5
ДН-С + PHA	0.32 ± 0.02	54 ± 5	437 ± 15
ДН-С + PFA >12кДа	0.3 ± 0.1	32 ± 4	201 ± 5
ДН-С + PHA >12кДа	0.34 ± 0.02	36 ± 4	393 ± 6

нивелирует воздействие ДН-С на растения. При этом наибольший эффект характерен для CHA и PHA, в присутствии которых коэффициент насыщения светом E_k увеличивается с 260 до 431 или 437 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, превышая величину контрольного измерения. Таким образом, показано, что ДН-С несколько ингибируют фотосинтез растений, а ГВ способны смягчать этот эффект. Следует отметь, что ГК сильнее снижают негативный эффект ДН на растения, чем ФК. Поэтому провели сравнительное исследование гуминовых кислот и фульвокислот, а именно SRFA и SRHA, с целью определения первичных фотосинтетических событий путем одновременной регистрации кинетики быстрой и замедленной флуоресценции и окислительно-восстановительных переходов (коэффициент рассеивания при 820 нм) после изменения интенсивности света.

Исследуемые ДН-С приводят к существенным изменениям формы кривой OJIP, рисунок 3.22, таблица 26. Снижался вклад фотохимической фазы JIP, что указывает на частичное нарушение электронного потока от ФСII до пула пластохинона [175; 212]. Относительная переменная флуоресценция V_J увеличивалась с 0.38 до 0.42 при добавлении в систему ДН, что свидетельствует об увеличении доли Q_B не восстанавливающих реакционных центров в ФСII. Подобный эффект ранее наблюдали в присутствии гербицида диурона, который является специфическим ингибитором переноса электронов между

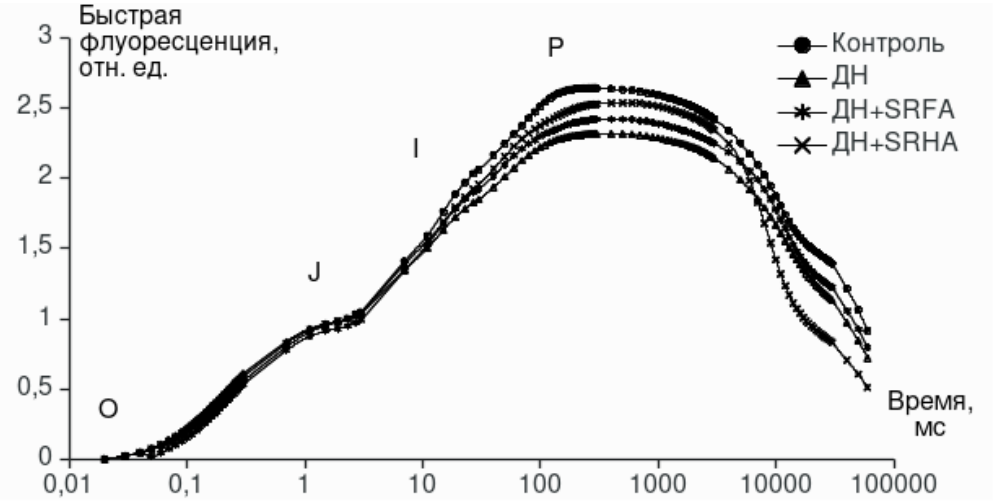


Рисунок 3.22 — Влияние ДН и ГВ на кинетику быстрой флуоресценции хлорофилла проростков пшеницы. Интенсивность флуоресценции нормализована на интенсивность при 2 мс.

Q_A и Q_B [213], при высоких концентрациях фенолов [214] или в присутствии наночастиц серебра [215; 216]. Наблюдаемое ингибирование переноса электронов между Q_A и Q_B в присутствии ДН-С должно уменьшать коэффициент E_k, что было показано ранее, при изучении влияния ДН-С на переменную флуоресценцию, таблица 25. Следует отметить, что присутствие в системе SRHA приводило к уменьшению негативного влияния ДН-С, тогда как присутствие SRFA не приводило к статистически значимым изменениям, таблица 26.

Таблица 26 — Параметры JIP-теста для проростков пшеницы в присутствии ДН и ГВ

образец	V_J	V_I	PI_{ABS}
контроль	0.38 ± 0.01	0.79 ± 0.01	2.2 ± 0.2
ДН-С	0.42 ± 0.02	0.77 ± 0.02	1.7 ± 0.4
ДН-С + SRFA	0.44 ± 0.03	0.82 ± 0.02	1.7 ± 0.2
ДН-С + SRHA	0.41 ± 0.04	0.77 ± 0.02	1.9 ± 0.2

В отличие от V_J, ни ДН-С, ни ГВ не влияли на величину V_I, таблица 26. Так как V_I является хорошим индикатором окислительно-восстановительного состояния пула пластохинона в темноте [217], можно сделать вывод, что ни ДН, ни ГК не влияли на доступность окисленных молекул пластохинона для Q_B. Далее оценили влияние ДН-С по параметру PI_{ABS}. Значение PI_{ABS} зависит от нескольких факторов, а именно: (1) плотности реакционных центров,

(2) эффективности переноса электронов по электронотранспортной цепи за пределами Q_A и (3) вероятности того, что поглощенный фотон будет захвачен реакционным центром.

Установлено, что PI_{ABS} значительно ниже для систем в присутствии ДН-С, что подтверждает отрицательный эффект ДН-С на растения. Аналогично, в случаях с E_k или V_J не наблюдалось смягчающего эффекта SRFA, тогда как в присутствии SRHA было продемонстрировано снижение токсичности ДН-С. Однако отрицательное влияние ДН на PI_{ABS} наблюдается при насыщении образца излучением света красной области спектра чрезвычайно высокой интенсивности (5000 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$), таблица 25, тогда как при фотосинтетически активном излучении до 1000 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ не наблюдалось значительного влияния ДН-С на $rETR_{max}$, таблица 26. Следовательно, отрицательные эффекты ДН на фотосинтез пшеницы следует ожидать только в условиях чрезмерного освещения.

Образование электрохимического протонного градиента через тилакоидную мембрану оценивали по изменению замедленной флуоресценции в течение периода индуцирования [218]. Наличие в системе ДН-С приводило к уменьшению на 25% величины быстрых фаз кинетики замедленной флуоресценции от 10 до 100 мс, рисунок 3.23. Этот результат указывает на уменьшение образования трансмембранного потенциала тилакоидной мембраны в присутствии ДН-С. Введение как SRHA, так и SRFA уменьшало ингибирующее действие ДН-С.

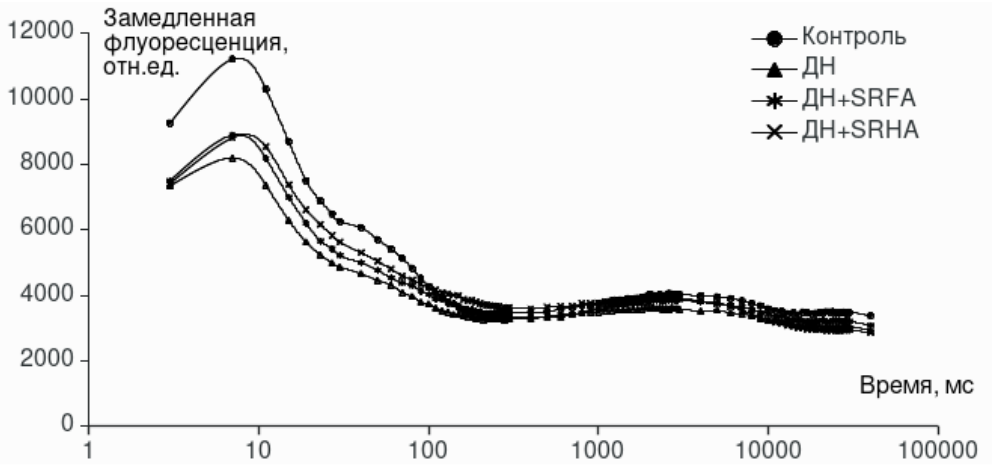


Рисунок 3.23 — Влияние ДН и ГВ на кинетику замедленной флуоресценции хлорофилла проростков пшеницы.

3.4.5 Заключение по разделу 3.4

После взаимодействия с растениями суспензии ДН теряют устойчивость, средний диаметр частиц в суспензии увеличивается и ζ-потенциал значительно снижается. Присутствие в системе ГВ снижает величину этих эффектов. Методом авторадиографии впервые установлено поступление ДН через корни в листья растений. Разложение частей растений в азотной кислоте позволило определить содержание ДН количественно. Выявлена корреляция содержания ДН в корнях растения с ζ-потенциалом суспензии в присутствии ГВ. Чем выше значение максимальной адсорбции ГК на ДН, тем лучше их комплекс приникает в стебли и листья растений. ФК препятствуют поступлению ДН в надземные части растений. Распределение содержания ДН по листу увеличивается от его основания к апикальной зоне. Факт попадания ДН через корни в надземную часть растения обуславливает интерес к фитотоксичности ДН, которую целесообразно изучать и в присутствии ГВ. Отрицательный эффект ДН на фотосинтез пшеницы проявляется только в условиях чрезмерного освещения. Выявлено снижение негативного эффекта ДН на фитотоксичность в присутствии ГК.

3.5 Изучение токсичности наноалмазов и их композитов с мирамистином

3.5.1 Влияние на клеточную культуру MCF-7

Используемые в работе наноалмазы ДН-С обладали положительным ζ-потенциалом (+30 мВ) в водной суспензии, что позволяло предположить их цитотоксичность, поскольку в большинстве случаев взаимодействие катионных частиц с отрицательно заряженными компонентами мембранами приводит к развитию токсических эффектов [219]. Диспергирование наноалмазов ДН-С в среде DMEM (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко) приводит к изменению знака электрокинетического потенциала – ζ-потенциал становится -10 ± 3 мВ из-за сорбции анионов среды на поверхности. Адсорбция мирамистина на ДН-С не приводит к заметному изменению размера агрегатов и величины ζ-потенциала, что указывает на образование тонкого адсорбционного слоя на поверхности. Отрицательный заряд наноалмазов в среде DMEM приводит к его незначительной цитотоксичности при концентрациях вплоть до 0.52 г/л. Эти данные хорошо согласуются с результатами, приведенными в работе [220], где было показано, что ДН с различными поверхностными группами проявляли низкую токсичность по отношению к разным типам клеток. Мирамистин проявлял очень высокую цитотоксичность, значение IC_{50} рассчитанное по уравнению 2.13 составило 28 ± 0.9 мкМ. Максимально допустимая концентрация мирамистина составила около 14 мкМ. Цитотоксичность мирамистина, адсорбированного на поверхности наноалмазов ДН-С, значительно снижается рисунок 3.24.

Для исследуемых препаратов определили изотермы связывания, которые показывают зависимость доли связавшегося вещества от количества клеток. Изотермы связывания имели линейный вид и пересекали ось ординат выше нуля. Отсекаемые на оси ординат значения оказались одинаковыми и относительно высокими для всех образцов, содержащих наноалмазы ДН-С, что говорит о значительном вкладе седиментации ДН в наблюдаемое значение связывания, рисунок 3.25. В тоже время, адсорбция мирамистина на наноалмазах ДН-С не оказывала влияние на их седиментацию. В отличие от ДН изотерма

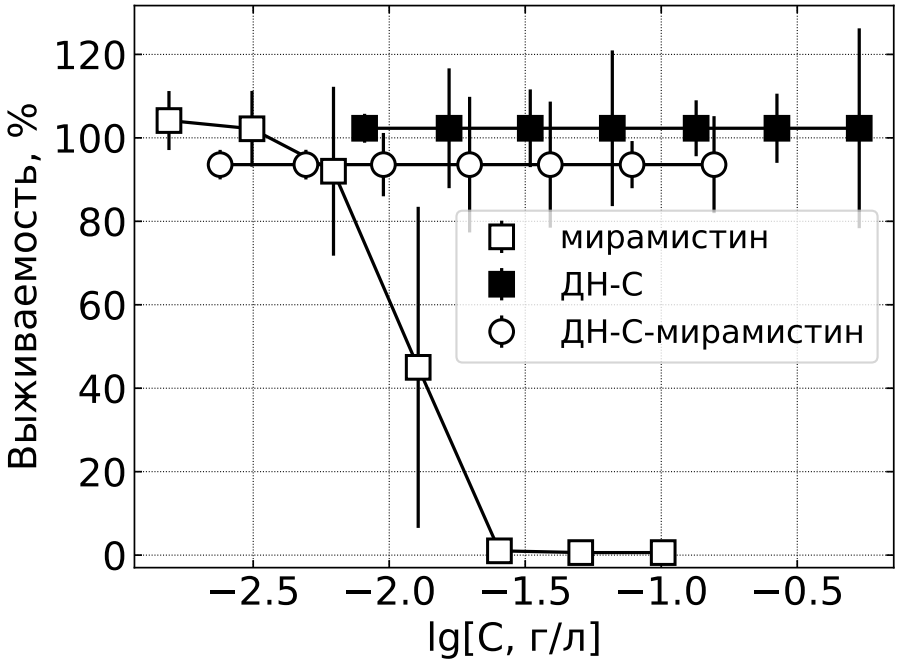


Рисунок 3.24 — Выживаемость клеток MCF-7 в присутствии мирамистина (черный квадрат), ДН-С (белый квадрат), ДН-С-мирамистина (белый круг)

связывания мирамистина выходила практически из нуля, что может быть связано с нарушением устойчивости дисперсии ДН в среде DMEM.

С увеличением плотности монослоя клеток увеличивалось количество связанного вещества, хотя и в разной степени. Эффективность связывания (ЭС) вещества с клетками определяли по углу наклона изотерм связывания. Полученные результаты показали, что наноалмазы характеризуются очень большим значением ЭС (ЭС=0.035 $\pm$ 0.007 миллион клеток$^{-1}$), что на два порядка выше, чем полученные ранее значения для амфифильных сополимеров полипропиленоксида и гиперразветвленного полиглицерина [181] и плюроников [221] при тех же условиях. Экстремально высокие значения эффективности связывания ДН, вероятно связаны с их осаждением и концентрированием на клеточном монослое при инкубации. Адсорбция мирамистина снижала связывание наноалмазов ДН-С с клетками (ЭС=0.017 $\pm$ 0.003 миллион клеток$^{-1}$), по-видимому, адсорбционный слой мирамистина на ДН препятствует поглощению комплекса ДН-С-мирамистин. Эксперимент с комплексом ДН-С-[^{3}H]мирамистин показал значительное накопление комплекса в клетках (ЭС=0.127 $\pm$ 0.007 миллион клеток$^{-1}$), однако взаимодействие с клеткой не приводит к значительному

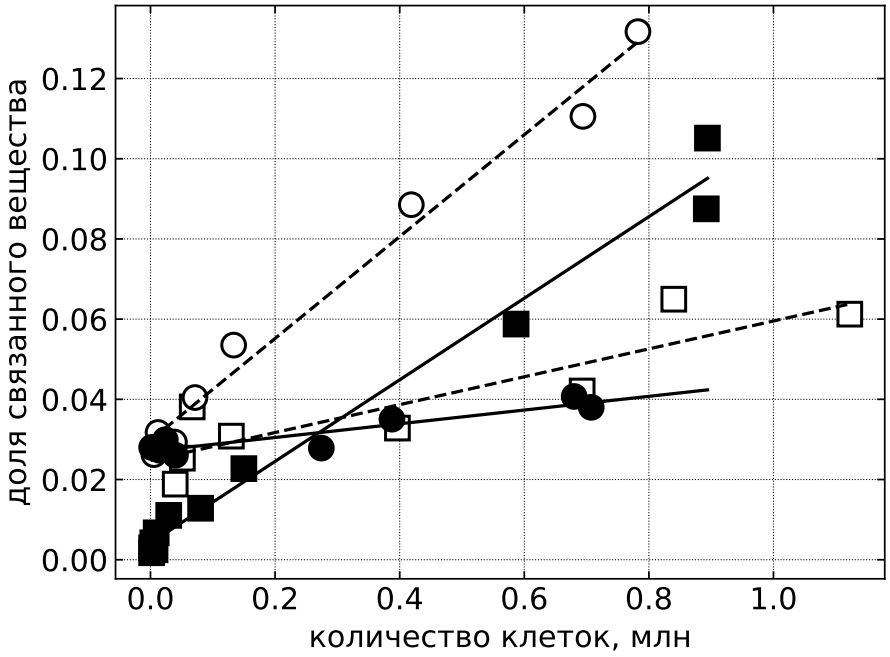
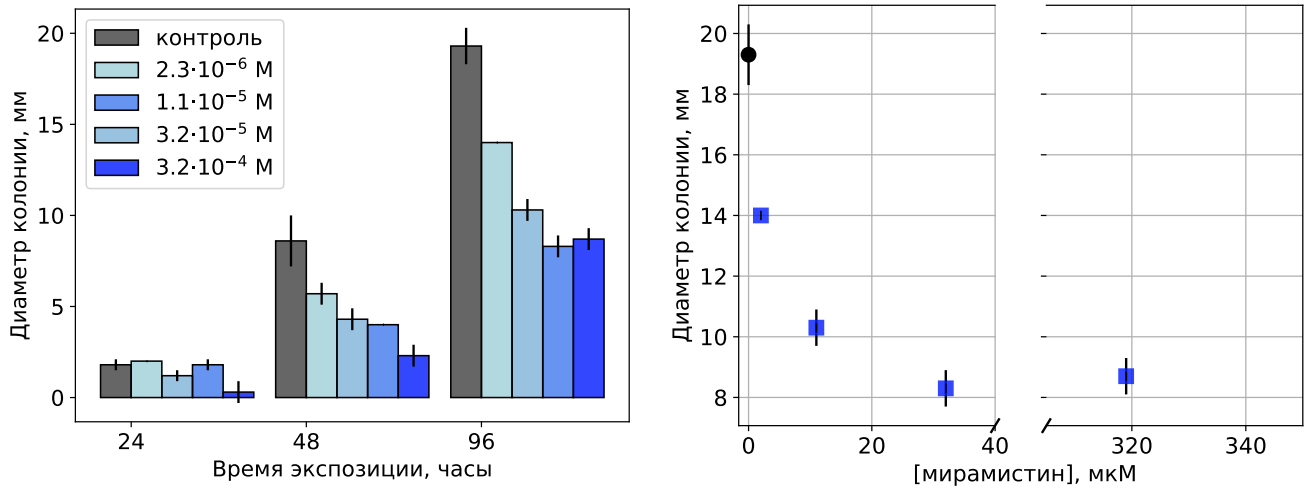


Рисунок 3.25 — Эффективность связывания мирамистина (белый квадрат); ДН-С (черный квадрат); мирамистина, адсорбированного на ДН-С (белый круг); наноалмазов ДН-С связанных с мирамистином (черный круг)

высвобождению мирамистина из комплекса, на что указывает низкая цитотоксичность комплекса. При этом значение ЭС комплекса ДН-С-[^{3}H]мирамистин выше, чем соответствующее значение [^{3}H]мирамистина (ЭС=0.102 $\pm$ 0.004 миллион клеток$^{-1}$).

3.5.2 Влияние на рост колонии *Aspergilus niger*

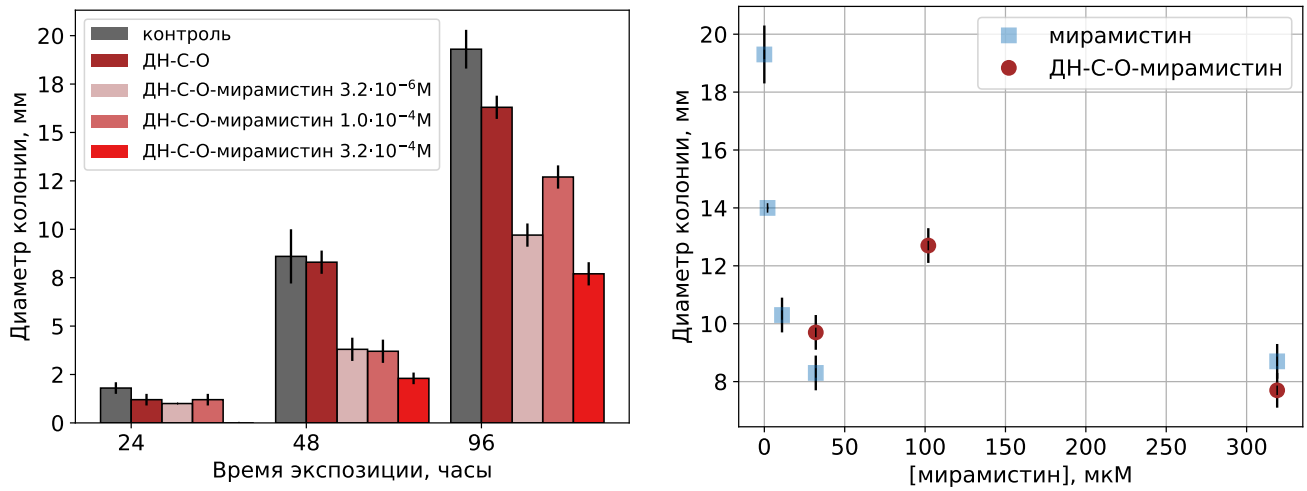
Образцы исследуемых наноалмазов ДН-С и ДН-С-О не токсичны для исследуемого гриба при концентрациях от 1 до 4 г/л. Также не токсичен мирамистин, сорбированный на наноалмазах ДН-С при концентрациях, в пересчете на свободный мирамистин, до 0.3 мМ. Такие результаты согласуются с полученными данными на клеточной линии MCF-7 аденокарциномы человека *§ 3.5.1 Влияние на клеточную культуру MCF-7* для наноалмазов ДН-С и комплекса ДН-С-мирамистин [222]. При этом следует отметить, что максимальный эффект подавления роста колонии свободный мирамистин проявляет при концентрации 32 мкМ и, с ростом концентрации до 0.32 мМ, эффект не усиливается, рисунок 3.26.



а) б)

Рисунок 3.26 — Оценка токсичности мирамистина на колонии гриба *Aspergilus niger*, зависимость размера колонии от: а) времени экспозиции, б) концентрации мирамистина при времени экспозиции 96 часов.

Исследуемый образец ДН-С в всем изученном диапазоне концентраций в первые 24 часа замедляет рост, причем эффект соизмерим с воздействием свободного мирамистина при концентрации 32 мкМ. При дальнейшем анализе видно, что затем колония адаптируется к наличию высокой концентрации ДН в среде и рост мицелия усиливается, но при этом к завершению экспозиции размер колонии остается ниже контрольного образца.



а) б)

Рисунок 3.27 — Оценка токсичности ДН-С-О и ДН-С-О-мирамистин на колонии гриба *Aspergilus niger*, зависимость размера колонии от: а) времени экспозиции, б) концентрации мирамистина при времени экспозиции 96 часов.

Мирамистин, адсорбированный на наноалмазах ДН-С-О, по токсическому эффекту близок к эффекту свободного мирамистина, рисунок 3.27. Гуминовые вещества при концентрации в системе 5 и 15 мг/л, что соответствует концентрации гуминовых веществ при оценке токсичности комплекса ДН-С-СНА-мирамистин, несколько увеличивают рост и развитие гриба. Мирамистин, адсорбированный на наноалмазах, модифицированных гуминовыми кислотами угля, подавляет рост колонии патогенного гриба *Aspergillus niger*, однако в меньшей степени, чем свободный мирамистин.

Различие в токсическом действии комплексов мирамистина с различными наноалмазами вероятно связано с разными механизмами адсорбции мирамистина и прочностью его удерживания. По-видимому, образование комплекса мирамистина с наноалмазами ДН-С происходит в основном за счет гидрофобных взаимодействий, что приводит к прочному удерживанию мирамистина, и снижению его токсичности в составе комплекса. Можно предположить, что при адсорбции мирамистина на ДН, обладающих отрицательным знаком электрокинетического потенциала, реализуется другой механизм адсорбции, который позволяет иммобилизованному мирамистину сохранять свою токсичность. Либо происходит медленное высвобождение мирамистина в процессе эксперимента

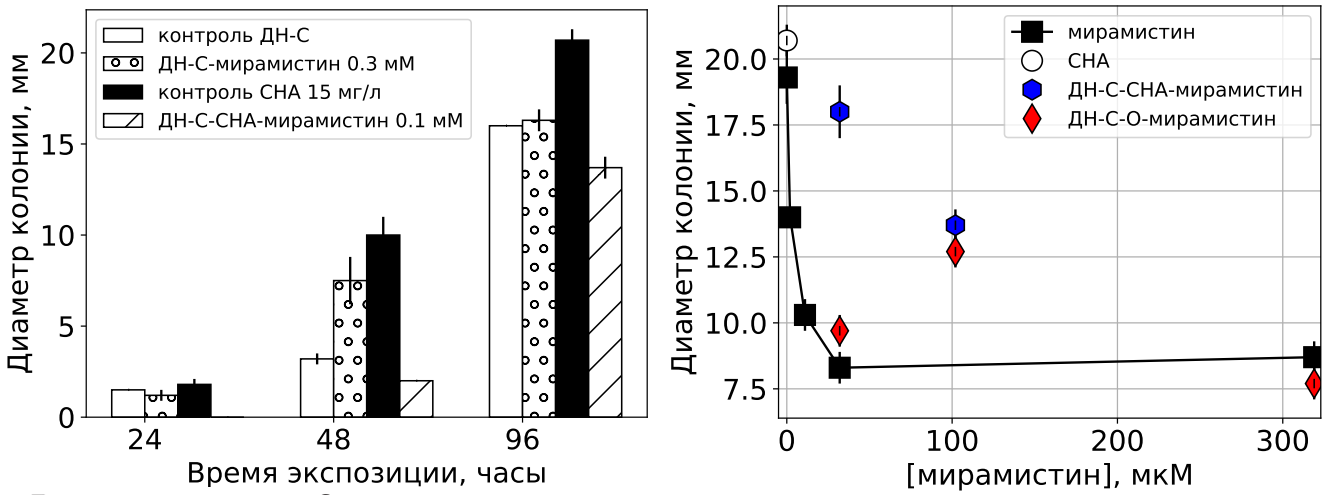


Рисунок 3.28 — Оценка токсичности мирамистина, гуминовых кислот угля (СНА), наноалмазов ДН-С, комплексов ДН-С-мирамистин, ДН-С-О-мирамистин и ДН-С-СНА-мирамистин на колонии гриба *Aspergilus niger*, зависимость размера колонии от: а) времени экспозиции; б) концентрации мирамистина при времени экспозиции 96 часов

с колониями гриба *Aspergillus niger*, что приводит к подавлению роста колонии, а гидрофобизация агрегатов ДН способствует их связыванию с клеточной мембраной.

3.5.3 Заключение по разделу 3.5

В продолжение исследования ДН для применения в качестве адресной доставки веществ изучали взаимодействие комплекса ДН-мирамистин с клеточной культурой аденокарциномы человека MCF-7 и колонией патогенного гриба *Aspergilus niger*. Определение токсичности мирамистина в комплексе с различными ДН проводили с целью изучения изменения активности веществ при их иммобилизации на ДН. Применение меченных тритием соединений позволило установить накопление комплекса ДН с мирамистином в клетках. Установлено влияние ζ-потенциала ДН на токсичность образуемых комплексов с ДН. Полное подавление токсичности мирамистина происходит при адсорбции на $+\zeta$ ДН. Адсорбция мирамистина на -ζ ДН, полученных как газофазным окислением поверхности, так и в результате адсорбции ГК, не приводит к полному подавлению токсичности мирамистина.

Заключение

Метод радиоактивных индикаторов успешно применяется в исследованиях перераспределения веществ в различных процессах. Визуализация наночастиц крайне полезна при исследованиях их потенциального применения. Наибольшее распространение получили флуоресцентные методы визуализации и детектирования, над которыми метод радиоактивных индикаторов обладает неоспоримыми преимуществами. Введение трития методом термической активации осуществимо в практически любую органическую молекулу, возможно применение трития в качестве радиоактивного индикатора для визуализации углеродных наноматериалов. Однако влияние свойств материала на удельную радиоактивность продукта при получении меченных тритием наноматериалов изучено мало.

В работе впервые установлено влияние размера агрегатов ДН в суспензиях на эффективность введения трития в ДН методом термической активации. Увеличение удельной радиоактивности продукта [^{3}H]ДН наблюдается при уменьшении гидродинамического радиуса частиц в результате ультразвуковой обработки раствора из которого готовили мишень. Исследование влияния условий подготовки мишени на удельную радиоактивность [^{3}H]ДН стало возможным благодаря усовершенствованию методики спектрофотометрического определения концентрации ДН в суспензиях. Универсальная калибровочная зависимость для ДН из разных источников позволяет связать размер частиц в растворе с его оптической плотностью при одинаковых весовых концентрациях ДН. Поскольку процедуры подготовки мишени и выделении продукта [^{3}H]ДН неизбежно ведут к изменению распределения размера частиц, разработанный метод позволяет сократить количество процедур с радиоактивными препаратами при определении их концентрации. Разработанный метод применим не только для определения концентрации меченных ДН, но и для других систем, в которых возможно изменение размера частиц или их весовое содержание. Например, при изучении устойчивости коллоидных растворов ДН.

Полученные меченные тритием соединения применяли для моделирования двух принципиальных задач: поведения ДН в результате попадания в природу и возможность применения [^{3}H]ДН в исследованиях адресной доставки

БАВ. В первом случае изучали влияние ГВ на свойства ДН и их взаимодействие с растениями мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Впервые установлено поступление ДН через корни в листья растений. Определено количество ДН в разных частях растения, установлено концентрирование ДН в апикальной зоне листа. Содержание ДН в корнях растений в тысячу раз превышает их содержание в надземной части и определяется в первую очередь устойчивостью суспензий – выявлена корреляция содержания ДН в корнях от ζ-потенциала суспензии в присутствии ГВ. ГК способствуют поступлению ДН в растения, эффект коррелирует с максимальной адсорбцией ГК на ДН. ФК напротив, способствуют уменьшению количества ДН в надземной части растения. В присутствии ГК наблюдается снижение негативного эффекта фитотоксичности ДН.

Адсорбционная емкость ДН зависит от устойчивости коллоидных растворов в присутствии адсорбата и с образованием стабильных суспензий, размер агрегатов в которых меньше 100 нм, не зависит от размера частиц. В диапазоне температур от 277 до 310 K величина адсорбции значительно не изменяется. ДН значительно лучше адсорбируют ионы с зарядом, противоположным знаку ζ-потенциала ДН, при этом следует уделять внимание коллоидной устойчивости образующихся комплексов и сохранению активности иммобилизованного препарата. Адсорбционные слои веществ способны существенным образом изменять свойства ДН. Плюроник P123 и олеиламин эффективно гидрофибизируют поверхность ДН и значительно увеличивают коэффициент распределения ДН в системах органическая жидкость/вода. Мирамистин, адсорбированный на наноалмазах ДН-С-О значительно увеличивает коэффициент распределения в системе вода–октанол, что может быть показателем увеличения сродства к клеточной мембране.

Выводы

1. Впервые получены меченные тритием детонационные наноалмазы с удельной радиоактивностью 8 ТБк/г, что соответствует практически полному замещению водорода на тритий по связям C-H.
2. Определены параметры адсорбции и прочности связывания на детонационных наноалмазах меченных тритием производных пантотеновой кислоты (пантотеновая, фосфопантотеновая, гопантеновая кислоты), поверхностно-активных веществ (мирамистин, плюроник P123 и олеиламин), гуминовых веществ (гуминовые кислоты угля и торфа, речные гуминовые и фульвокислоты).
3. Показано, что с помощью адсорбционного модифицирования можно регулировать свойства суспензий детонационных наноалмазов: изменять знак электрокинетического заряда наночастиц, гидрофибизировать их поверхность, что можно использовать для получения композитов с другими биологически активными соединениями. Найдено, что модифицирование наноалмазов неионогенным ПАВ плюроник P123 уменьшает адсорбцию мирамистина. Для увеличения эффективности связывания мирамистина предложено использовать модифицирование наноалмазов гуминовыми кислотами.
4. Впервые определены коэффициенты распределения наноалмазов и их конъюгатов с модифицирующими соединениями между водой и органической жидкостью (ксилол, октан, октанол). Коэффициенты распределения отражают сродство наноалмазов к гидрофобным средам и могут быть использованы для прогнозирования их поведения в живых организмах.
5. Обнаружено изменение антисептической активности мирамистина в конъюгате с наноалмазами по отношению к клеткам аденокарциномы человека MCF-7 и патогенного гриба Aspergilus Niger. Антисептическая активность мирамистина полностью подавляется в составе конъюгата с наноалмазами, имеющими положительный ζ-потенциал, тогда как при адсорбции мирамистина на детонационных наноалмазах с отрицательным ζ-потенциалом полного подавления антисептической активности активности мирамистина не происходит. Предполагается, что различие в токсичности конъюгатов мирамистина с наноалмазами связано с разным строением поверхностного адсорбционного слоя и прочностью его удерживания. Обнаруженные закономерности могут

быть использованы при создании средств доставки на основе детонационных наноалмазов.

Список сокращений и условных обозначений

CHA	гуминовые кислоты угля
DMEM	модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
HPHT-наноалмазы	наноалмазы, синтезированные в камерах высокого давления при высокой температуре
NIR	флуоресценция в ближней инфракрасной области
MCF-7	клеточная культура аденокарциномы человека (Michigan Cancer Foundation-7)
PBS	натрий-фосфатный буфер pH 6.8, состав: Na_2HPO_4 8.0 мМ, K_2HPO_4 2.0 мМ, NaN_3 8.0 мМ, NaCl 15.5 мМ
PFA	фульвокислоты торфа
PHA	гуминовые кислоты торфа
POPOP	5-фенил-2-[4-(5-фенил-1,3-оксазол-2-ил)фенил]-1,3-оксазол
PPO	2.5-дифенилоксазол
SEC	гель-фильтрация
SRFA	речные фульвокислоты
SRHA	речные гуминовые кислоты
$T_{1/2}$	период полураспада
АФБК	аминофенилборная кислота
БАВ	биологически-активные вещества
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВОГ	восстановленный оксид графен
ГВ	гуминовые вещества
ГК	гуминовые кислоты
ГПК	гопантеновая кислота
ДН	детонационные наноалмазы
ДРС	метод динамического рассеяния света
ДСК	метод дифференциальной сканирующей калориметрии
ИСП-АЭС	атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
ИК	инфракрасная спектроскопия
мирамистин	бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний-хлорид моногидрат

МРТ	магнитно-резонансная томография
овальбумин	альбумин куриного яичного белка
олеиламин	цис-1-амино-9-октадецен
ООГ	однослойный оксид графена
ПАВ	поверхностно-активные вещества
ПВС	поливиниловый спирт
ПК	пантотеновая кислота
плюроник P123	триблок-сополимер полиэтиленоксида и полипропиленоксида
ППК	производные пантотеновой кислоты
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
ФАВ	фотоакустическая визуализация
фДН	флуоресцентные ДН
ФК	фульвокислоты
фосфатный буфер	pH 6.8, состав: Na_2HPO_4 8.0 мМ, K_2HPO_4 2.0 мМ, NaN_3 8.0 мМ
ФПК	4-D-фосфопантотеновая кислота
ЭС	эффективность связывания

Список литературы

1. *Shenderova O.* Carbon nanostructures / O. Shenderova, V. Zhirnov, D. Brenner // Critical reviews in solid state and material sciences. — 2002. — Vol. 27, no. 3/4. — P. 227—356.
2. *Sung J.* Diamond Nanotechnology: Synthesis and Applications / J. Sung, J. Lin. — Pan Stanford Publishing, 2010. — P. 252.
3. Man-made diamonds / F. Bundy [et al.] // Nature. — 1955. — Vol. 176, no. 4471. — P. 51.
4. *Angus J. C.* Low-pressure, metastable growth of diamond and "diamond-like" phases / J. C. Angus, C. C. Hayman // Science. — 1988. — Vol. 241, no. 4868. — P. 913—921.
5. *Даниленко В. В.* Из истории открытия синтеза наноалмазов / В. В. Даниленко // Физика твердого тела. — 2004. — Т. 46, № 4. — С. 581—584.
6. The properties and applications of nanodiamonds / V. Mochalin [et al.] // Nature nanotechnology. — 2012. — Vol. 7, no. 1. — P. 11.
7. *Долматов В. Ю.* Детонационные наноалмазы: синтез, строение, свойства и применение / В. Ю. Долматов // Успехи химии. — 2007. — Т. 76, № 4. — С. 375—397.
8. *Долматов В. Ю.* Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза: свойства и применение / В. Ю. Долматов // Успехи химии. — 2001. — Т. 70, № 7. — С. 687—708.
9. *Krueger A.* New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials / A. Krueger // Chemistry-a European Journal. — 2008. — Vol. 14, no. 5. — P. 1382—1390.
10. *Гордеев С. К.* Бывают ли наноалмазы "маленькими"? / С. К. Гордеев, С. Б. Корчагина // Сверхтвердые материалы. — 2004. — № 6. — С. 34—40.
11. Protein-functionalized hairy diamond nanoparticles / S. A. Dahoumane [et al.] // Langmuir. — 2009. — Vol. 25, no. 17. — P. 9633—9638.

12. *Chang L.-Y.* Confirmation of the electrostatic self-assembly of nanodiamonds / L.-Y. Chang, E. Ōsawa, A. Barnard // Nanoscale. — 2011. — Vol. 3, no. 3. — P. 958—962.

13. Surface chemistry and properties of ozone-purified detonation nanodiamonds / O. Shenderova [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. — 2011. — Vol. 115, no. 20. — P. 9827—9837.

14. *Iakoubovskii K.* High-resolution electron microscopy of detonation nanodiamond / K. Iakoubovskii, K. Mitsuishi, K. Furuya // Nanotechnology. — 2008. — Vol. 19, no. 15. — P. 155705.

15. *Baidakova M.* Ultradisperse-diamond nanoclusters. Fractal structure and diamond–graphite phase transition / M. Baidakova, V. Siklitsky, A. Y. Vul // Chaos, Solitons & Fractals. — 1999. — Vol. 10, no. 12. — P. 2153—2163.

16. *Верещагин А. Л.* Структура детонационных наноалмазов / А. Л. Верещагин, Г. С. Юрьев // Неорганические материалы. — 2003. — Т. 39, № 3. — С. 312—318.

17. *Юрьев Г. С.* Рентгеноструктурный анализ детонационных наноалмазов / Г. С. Юрьев, В. Ю. Долматов // Сверхтвердые материалы. — 2010. — № 5. — С. 29—50.

18. Исследование структуры наноалмазов детонационного синтеза методами рентгеновской дифракции / А. Н. Озерин [и др.] // Структура неорганических соединений. — 2008. — Т. 53, № 1. — С. 61—68.

19. *Grichko V.* Nanodiamond bullets and their biological targets / V. Grichko, V. Grishko, O. Shenderova // NanoBiotechnology. — 2006. — Vol. 2, no. 1/2. — P. 37—42.

20. Effect of sodium oleate adsorption on the colloidal stability and zeta potential of detonation synthesized diamond particles in aqueous solutions / X. Xu [et al.] // Diamond and related materials. — 2005. — Vol. 14, no. 2. — P. 206—212.

21. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / N. Gibson [et al.] // Diamond and Related materials. — 2009. — Vol. 18, no. 4. — P. 620—626.

22. Direct functionalization of nanodiamond particles using dopamine derivatives / A. Barras [et al.] // Langmuir. — 2011. — Vol. 27, no. 20. — P. 12451—12457.

23. Dual reaction capacity of hydrogenated nanodiamond / V. Korolkov [et al.] // Diamond and Related Materials. — 2007. — Vol. 16, no. 12. — P. 2129—2132.

24. Инфракрасные спектры алмазов различного генезиса и способов очистки / В. Ю. Долматов [и др.] // Сверхтвердые материалы. — 2016. — № 1. — С. 75—84.

25. Carbon structure in nanodiamonds elucidated from Raman spectroscopy / V. I. Korepanov [et al.] // Carbon. — 2017. — Vol. 121. — P. 322—329.

26. Raman scattering from nanometer-sized diamond / M. Yoshikawa [et al.] // Applied Physics Letters. — 1995. — Vol. 67, no. 5. — P. 694—696.

27. *Sun K. W.* Optical properties of a single free standing nanodiamond / K. W. Sun, C. Y. Wang. — 2007.

28. *Mochalin V.* Contribution of functional groups to the Raman spectrum of nanodiamond powders / V. Mochalin, S. Osswald, Y. Gogotsi // Chemistry of Materials. — 2008. — Vol. 21, no. 2. — P. 273—279.

29. *Ferrari A. C.* Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond–like carbon, and nanodiamond / A. C. Ferrari, J. Robertson // Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. — 2004. — Vol. 362, no. 1824. — P. 2477—2512.

30. Surface modifications of detonation nanodiamonds probed by multiwavelength Raman spectroscopy / M. Mermoux [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. — 2014. — Vol. 118, no. 40. — P. 23415—23425.

31. The Raman spectrum of nanocrystalline diamond / S. Prawer [et al.] // Chemical Physics Letters. — 2000. — Vol. 332, no. 1/2. — P. 93—97.

32. *Ferrari A.* Origin of the 1 1 5 0- cm- 1 Raman mode in nanocrystalline diamond / A. Ferrari, J. Robertson // Physical Review B. — 2001. — Vol. 63, no. 12. — P. 121405.

33. *Ōsawa E.* Recent progress and perspectives in single-digit nanodiamond / E. Ōsawa // Diamond and Related Materials. — 2007. — Vol. 16, no. 12. — P. 2018—2022.

34. Preparation and behavior of brownish, clear nanodiamond colloids / M. Ozawa [et al.] // Advanced Materials. — 2007. — Vol. 19, no. 9. — P. 1201—1206.

35. Deaggregation of nanodiamond powders using salt-and sugar-assisted milling / A. Pentecost [et al.] // ACS applied materials & interfaces. — 2010. — Vol. 2, no. 11. — P. 3289—3294.

36. Unusually tight aggregation in detonation nanodiamond: identification and disintegration / A. Krüger [et al.] // Carbon. — 2005. — Vol. 43, no. 8. — P. 1722—1730.

37. *Коробов М. В.* Исследование наноалмазов детонационного синтеза методами дифференциальной сканирующей калориметрии и адсорбции / М. В. Коробов, Н. В. Авраменко, Л. А. Беляева // Вестник Казанского технологического университета. — 2010. — № 2.

38. Влияние условий синтеза детонационных наноалмазов на состояние их поверхностного слоя / А. Н. Панова [и др.] // Сверхтвердые материалы. — 2015. — № 3. — С. 77—88.

39. Direct sector field ICP-MS determination of metal impurities in detonation nanodiamond / D. P. Mitev [et al.] // Carbon. — 2013. — Vol. 60. — P. 326—334.

40. Screening of elemental impurities in commercial detonation nanodiamond using sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry / D. P. Mitev [et al.] // Journal of materials science. — 2014. — Vol. 49, no. 10. — P. 3573—3591.

41. *Volkov D. S.* Elemental analysis of nanodiamonds by inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy / D. S. Volkov, M. A. Proskurnin, M. V. Korobov // Carbon. — 2014. — Vol. 74. — P. 1—13.

42. Determination of impurities in detonation nanodiamonds by gamma activation analysis method / R. Y. Yakovlev [et al.] // Diamond and Related Materials. — 2015. — Vol. 55. — P. 77—86.

43. Nanodiamonds for in vivo applications / K. van der Laan [et al.] // Small. — 2018. — P. 1703838.

44. Nanodiamond-mediated drug delivery and imaging: challenges and opportunities / V. Vaijayanthimala [et al.] // Expert opinion on drug delivery. — 2015. — Vol. 12, no. 5. — P. 735—749.

45. Fluorescence lifetime imaging microscopy of nanodiamonds in vivo / Y. Kuo [et al.] // Advances in Photonics of Quantum Computing, Memory, and Communication VI. Vol. 8635. — International Society for Optics, Photonics. 2013. — P. 863503.

46. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity / S.-J. Yu [et al.] // Journal of the American Chemical Society. — 2005. — Vol. 127, no. 50. — P. 17604—17605.

47. Fluorescent nanodiamond: A versatile tool for long-term cell tracking, super-resolution imaging, and nanoscale temperature sensing / W. W.-W. Hsiao [et al.] // Accounts of chemical research. — 2016. — Vol. 49, no. 3. — P. 400—407.

48. Nitrogen-vacancy centers in diamond: nanoscale sensors for physics and biology / R. Schirhagl [et al.] // Annual review of physical chemistry. — 2014. — Vol. 65. — P. 83—105.

49. Peptide-Grafted Nanodiamonds: Preparation, Cytotoxicity and Uptake in Cells / S. Vial [et al.] // ChemBioChem. — 2008. — Vol. 9, no. 13. — P. 2113—2119.

50. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence / A. L. Vahrmeijer [et al.] // Nature reviews Clinical oncology. — 2013. — Vol. 10, no. 9. — P. 507.

51. *Hong G.* Near-infrared fluorophores for biomedical imaging / G. Hong, A. L. Antaris, H. Dai // Nature Biomedical Engineering. — 2017. — Vol. 1, no. 1. — P. 0010.

52. *Henderson T. A.* Near-infrared photonic energy penetration: can infrared phototherapy effectively reach the human brain? / T. A. Henderson, L. D. Morries // Neuropsychiatric disease and treatment. — 2015. — Vol. 11. — P. 2191.

53. Near-infrared fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools engineered from phytochromes / K. G. Chernov [et al.] // Chemical reviews. — 2017. — Vol. 117, no. 9. — P. 6423—6446.

54. *Smith A. M.* Bioimaging: second window for in vivo imaging / A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie // Nature nanotechnology. — 2009. — Vol. 4, no. 11. — P. 710.

55. Selective Photothermal Tumor Therapy Using Nanodiamond-Based Nanoclusters with Folic Acid / T.-K. Ryu [et al.] // Advanced Functional Materials. — 2016. — Vol. 26, no. 35. — P. 6428–6436.

56. Synthesis of novel nanodiamonds–gold core shell nanoparticles / L. Minati [et al.] // Diamond and Related Materials. — 2015. — Vol. 53. — P. 23–28.

57. Diamond-Lipid Hybrids Enhance Chemotherapeutic Tolerance and Mediate Tumor Regression / L. Moore [et al.] // Advanced materials. — 2013. — Vol. 25, no. 26. — P. 3532–3541.

58. Two-step Assembling of Near-Infrared "OFF-ON" Fluorescent Nanohybrids for Synchronously Tumor Imaging and MicroRNA Modulation-based Therapy / D. Xiongwei [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. — 2017. — Vol. 9. — P. 3294–3305.

59. *Man H. B.* Diamond as a nanomedical agent for versatile applications in drug delivery, imaging, and sensing / H. B. Man, D. Ho // physica status solidi (a). — 2012. — Vol. 209, no. 9. — P. 1609–1618.

60. *Jiang Y.* Advanced Photoacoustic Imaging Applications of Near-Infrared Absorbing Organic Nanoparticles / Y. Jiang, K. Pu // Small. — 2017.

61. *Weber J.* Contrast agents for molecular photoacoustic imaging / J. Weber, P. C. Beard, S. E. Bohndiek // Nature methods. — 2016. — Vol. 13, no. 8. — P. 639.

62. Photoacoustic imaging platforms for multimodal imaging / J. Kim [et al.] // Ultrasonography. — 2015. — Vol. 34, no. 2. — P. 88.

63. *Zackrisson S.* Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging / S. Zackrisson, S. Van De Ven, S. Gambhir // Cancer research. — 2014. — Vol. 74, no. 4. — P. 979–1004.

64. Theranostic applications of carbon nanomaterials in cancer: Focus on imaging and cargo delivery / D. Chen [et al.] // Journal of controlled release. — 2015. — Vol. 210. — P. 230–245.

65. In vivo photoacoustic imaging of breast cancer tumor with HER2-targeted nanodiamonds / T. Zhang [et al.] // Nanoimaging and Nanospectroscopy. Vol. 8815. — International Society for Optics, Photonics. 2013. — P. 881504.

66. Photoacoustic contrast imaging of biological tissues with nanodiamonds fabricated for high near-infrared absorbance / T. Zhang [et al.] // Journal of biomedical optics. — 2013. — Vol. 18, no. 2. — P. 026018.

67. Nanodiamond-Manganese dual mode MRI contrast agents for enhanced liver tumor detection / W. Hou [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. — 2017. — Vol. 13, no. 3. — P. 783—793.

68. Gd(III)-nanodiamond conjugates for MRI contrast enhancement / L. M. Manus [et al.] // Nano letters. — 2009. — Vol. 10, no. 2. — P. 484—489.

69. Trial of minocycline in a clinically isolated syndrome of multiple sclerosis / L. M. Metz [et al.] // New England Journal of Medicine. — 2017. — Vol. 376, no. 22. — P. 2122—2133.

70. Nanodiamond-Gadolinium (III) Aggregates for Tracking Cancer Growth In Vivo at High Field / N. Rammohan [et al.] // Nano letters. — 2016. — Vol. 16, no. 12. — P. 7551—7564.

71. T1-T2 dual-modal MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles with surface attached gadolinium complexes / A. Szpak [et al.] // Journal of Nanoparticle Research. — 2014. — Vol. 16, no. 11. — P. 2678.

72. T1–T2 dual-modal MRI of brain gliomas using PEGylated Gd-doped iron oxide nanoparticles / N. Xiao [et al.] // Journal of colloid and interface science. — 2014. — Vol. 417. — P. 159—165.

73. *Ho D.* Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications / D. Ho, X. Sun, S. Sun // Accounts of chemical research. — 2011. — Vol. 44, no. 10. — P. 875—882.

74. *Martinez Gonzalez R.* Liposomes loaded with hydrophobic iron oxide nanoparticles: suitable T2 contrast agents for MRI / R. Martinez Gonzalez, J. Estelrich, M. A. Busquets // International journal of molecular sciences. — 2016. — Vol. 17, no. 8. — P. 1209.

75. Детекция наноалмазов в биологических образцах методом ЭПР спектроскопии / Е. В. Инжеваткин [и др.] // Доклады Академии наук. — 2017. — Т. 477, № 6. — С. 738—741.

76. *Philipp H.* Handbook of optical constants of solids. Vol. 749 / H. Philipp. — Academic Press, 1985. — P. 74.

77. Transfection and imaging of diamond nanocrystals as scattering optical labels / B. R. Smith [et al.] // Journal of Luminescence. — 2007. — Vol. 127, no. 1. — P. 260—263.

78. Biodistribution of a high dose of diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles after multiple intraperitoneal injections in rats / N. Kurantowicz [et al.] // Nanoscale research letters. — 2015. — Vol. 10, no. 1. — P. 398.

79. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo / Y. Yuan [et al.] // Diamond and related materials. — 2009. — Vol. 18, no. 1. — P. 95—100.

80. The interaction of the protein lysozyme with bacteria E. coli observed using nanodiamond labelling / E. Perevedentseva [et al.] // Nanotechnology. — 2007. — Vol. 18, no. 31. — P. 315102.

81. Direct and in vitro observation of growth hormone receptor molecules in A549 human lung epithelial cells by nanodiamond labeling / C.-Y. Cheng [et al.] // Applied physics letters. — 2007. — Vol. 90, no. 16. — P. 163903.

82. Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling / J.-I. Chao [et al.] // Biophysical journal. — 2007. — Vol. 93, no. 6. — P. 2199—2208.

83. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy of single nanodiamonds / I. Pope [et al.] // Nature nanotechnology. — 2014. — Vol. 9, no. 11. — P. 940.

84. *Zhao Y.* Toxicology of Nanomaterials / Y. Zhao, Z. Zhang, W. Feng. — Wiley-VCH Verlag GmbH, 2016. — P. 432.

85. Diagnostic and Therapeutic Nuclear Medicine for Neuroendocrine Tumors / ed. by K. Pacak, D. Taieb. — Springer, 2016. — P. 484.

86. Biodistribution of 99mTc-C60(OH)x in Sprague–Dawley rats after intratracheal instillation / J.-Y. Xu [et al.] // Carbon. — 2007. — Vol. 45, no. 9. — P. 1865—1870.

87. Radioiodination of C60 derivative C60 (OH) xOy / L. Yuguo [et al.] // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. — 2001. — Vol. 250, no. 2. — P. 363—364.

88. Preparation and biodistribution of radiolabeled fullerene C60 nanocrystals / N. Nikolic [et al.] // Nanotechnology. — 2009. — Vol. 20, no. 38. — P. 385102.

89. Radionuclide 131 I labeled reduced graphene oxide for nuclear imaging guided combined radio-and photothermal therapy of cancer / L. Chen [et al.] // Biomaterials. — 2015. — Vol. 66. — P. 21—28.

90. In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene / H. Hong [et al.] // ACS Nano. — 2012. — Vol. 6, no. 3. — P. 2361—2370.

91. Biological uptake and depuration of radio-labeled graphene by Daphnia magna / X. Guo [et al.] // Environmental science & technology. — 2013. — Vol. 47, no. 21. — P. 12524—12531.

92. Радиоактивные наноалмазы / В. Ю. Долматов [и др.] // Сверхтвердые материалы. — 2013. — № 4. — С. 74—80.

93. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond / X. Zhang [et al.] // Toxicology Research. — 2012. — Vol. 1, no. 1. — P. 62—68.

94. Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation / X. Zhang [et al.] // Toxicology Letters. — 2010. — Vol. 198, no. 2. — P. 237—243.

95. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and nanodiamonds in mice / Q. Wei [et al.] // Nanoscale research letters. — 2012. — Vol. 7, no. 1. — P. 473.

96. Biodistribution of amino-functionalized diamond nanoparticles. In vivo studies based on 18F radionuclide emission / S. Rojas [et al.] // ACS nano. — 2011. — Vol. 5, no. 7. — P. 5552—5559.

97. *Бадун Г. А.* Меченные тритием соединения / Г. А. Бадун. — Москва: Химический факультет МГУ, 2008. — С. 38.

98. *Шевченко В. П.* Меченные тритием липофильные соединения / В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Н. Ф. Мясоедов. — Москва: Химический факультет МГУ, 2003. — С. 246.

99. Langmuir hydrogen dissociation approach in radiolabeling carbon nanotubes and graphene oxide / G. Badun [et al.] // Radiochimica Acta. — 2016. — Vol. 104, no. 8. — P. 593—599.

100. *Badun G.* Preparation of tritium-labeled modified single-walled carbon nanotubes for pharmacokinetic studies / G. Badun, M. Chernysheva, V. Aldobaev // Radiochemistry. — 2016. — Vol. 58, no. 3. — P. 305—310.

101. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method / G. Badun [et al.] // Radiochimica Acta. — Germany, 2014. — Vol. 102, no. 10. — P. 941—946.

102. Tritium labeling of detonation nanodiamonds / H. Girard [et al.] // Chemical Communications. — 2014. — Vol. 50, no. 22. — P. 2916—2918.

103. *Филатов Э. С.* Физико-химические и ядерно-химические способы получения меченых органических соединений и их идентификация / Э. С. Филатов, Е. Ф. Симонов. — Москва: Энергоатомиздат, 1987. — С. 142.

104. *Badun G.* Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method / G. Badun, M. Chernysheva, A. Ksenofontov // Radiochimica Acta. — 2012.

105. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул / Л. А. Баратова [и др.]. — Москва : Москва, 1999. — 175 с.

106. Особенности структуры белка M1 вируса гриппа а в растворе. Метод тритиевой планиграфии / Е. Н. Богачева [и др.] // Перспективные материалы. — М., 2010. — № 8. — С. 148—154.

107. Диагностика неструктурированных участков белков атомарным тритием / Е. Н. Богачева [и др.] // Перспективные материалы. — М., 2011. — № 10. — С. 332—338.

108. ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ. Отличия в пространственной структуре белка M1 вируса гриппа в кристалле,растворе и вирионе / Е. Н. Богачева [и др.] // Биоорганическая химия. — М., 2012. — Т. 38, № 1. — С. 70—77.

109. Hydrogenation of nanodiamonds using MPCVD: A new route toward organic functionalization / H. Girard [et al.] // Diamond and Related Materials. — 2010. — Vol. 19, no. 7—9. — P. 1117—1123.

110. Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation / H. Girard [et al.] // Physical chemistry chemical physics. — 2011. — Vol. 13, no. 24. — P. 11517—11523.

111. *Yagi H.* Surface hydrogen densities of variously treated CVD diamond surfaces / H. Yagi, A. Hatta, T. Ito // Applied Surface Science. — 1999. — Vol. 137, no. 1. — P. 50—56.

112. *Sattler K. D.* Carbon Nanomaterials Sourcebook: Graphene, Fullerenes, Nanotubes, and Nanodiamonds. Vol. 1 / K. D. Sattler. — CRC Press, 2016. — P. 608.

113. Water-soluble nanodiamond / O. Kuznetsov [et al.] // Langmuir. — 2012. — Vol. 28, no. 11. — P. 5243—5248.

114. Water interaction with hydrogenated and oxidized detonation nanodiamonds — Microscopic and spectroscopic analyses / S. Stehlik [et al.] // Diamond and Related Materials. — 2016. — Vol. 63. — P. 97—102. — 9th International Conference on New Diamond and Nano Carbons – {NDNC} 2015.

115. Nanodiamonds: Advanced Material Analysis, Properties and Applications / ed. by J.-C. Arnault. — William Andrew, 2017. — P. 487.

116. Disaggregation and surface modification of nano-size diamond by ultrasound exposure: Relationships among acoustic intensity, disaggregation, and surface modification / T. Uchida [et al.] // Electronics and Communications in Japan (Part III: Fundamental Electronic Science). — 2007. — Vol. 90, no. 12. — P. 10—18.

117. Polydispersed Detonation Nanodiamond and Approaches for its Fractioning / I. Petrov [et al.] // NSTI. — 2006. — Vol. 1. — P. 150.

118. Salt-assisted ultrasonic deaggregation of nanodiamond / K. Turcheniuk [et al.] // ACS applied materials & interfaces. — 2016. — Vol. 8, no. 38. — P. 25461—25468.

119. *Shenderova O. A.* Science and engineering of nanodiamond particle surfaces for biological applications / O. A. Shenderova, G. E. McGuire // Biointerphases. — 2015. — Vol. 10, no. 3. — P. 030802.

120. *Suryanarayana C.* Mechanical alloying and milling / C. Suryanarayana // Progress in materials science. — 2001. — Vol. 46, no. 1/2. — P. 1—184.

121. A Facile and Scalable Process for Size-Controllable Separation of Nanodiamond Particles as Small as 4 nm / Y. Morita [et al.] // Small. — 2008. — Vol. 4, no. 12. — P. 2154—2157.

122. *Huang L.-C. L.* Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds / L.-C. L. Huang, H.-C. Chang // Langmuir. — 2004. — Vol. 20, no. 14. — P. 5879—5884.

123. Control of sp2/sp3 carbon ratio and surface chemistry of nanodiamond powders by selective oxidation in air / S. Osswald [et al.] // Journal of the American Chemical Society. — 2006. — Vol. 128, no. 35. — P. 11635—11642.

124. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications / A. Krüger [et al.] // Journal of Materials Chemistry. — 2006. — Vol. 16, no. 24. — P. 2322—2328.

125. Подход к унифицированию физико-химических свойств детонационных наноалмазов промышленного производства / Р. Ю. Яковлев [и др.] // Российский химический журнал. — 2013. — Т. 57, № 52. — С. 86—96.

126. *Krueger A.* Functionality is key: recent progress in the surface modification of nanodiamond / A. Krueger, D. Lang // Advanced Functional Materials. — 2012. — Vol. 22, no. 5. — P. 890—906.

127. *Yeap W. S.* Using detonation nanodiamond for the specific capture of glycoproteins / W. S. Yeap, Y. Y. Tan, K. P. Loh // Analytical chemistry. — 2008. — Vol. 80, no. 12. — P. 4659—4665.

128. *Li C.-C.* Preparation of clear colloidal solutions of detonation nanodiamond in organic solvents / C.-C. Li, C.-L. Huang // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2010. — Vol. 353, no. 1. — P. 52—56.

129. Dynamics of diamond nanoparticles in solution and cells / F. Neugart [et al.] // Nano letters. — 2007. — Vol. 7, no. 12. — P. 3588—3591.

130. *Соболева О. А.* Устойчивость гидрозолей детонационных наноалмазов в присутствии солей и поверхностно-активных веществ / О. А. Соболева // Коллоидный журнал. — 2018. — Т. 80, № 3. — С. 338—343.

131. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов / В. Н. Постнов [и др.] // Биотехносфера. — 2013. — Т. 6, № 30.

132. *Chen X.* Diamond nanostructures for drug delivery, bioimaging, and biosensing / X. Chen, W. Zhang // Chemical Society Reviews. — 2017. — Vol. 46, no. 3. — P. 734—760.

133. Comprehensive evaluation of carboxylated nanodiamond as a topical drug delivery system / D. G. Lim [et al.] // International journal of nanomedicine. — 2016. — Vol. 11. — P. 2381.

134. Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics / M. Chen [et al.] // Acs Nano. — 2009. — Vol. 3, no. 7. — P. 2016—2022.

135. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment / E. Chow [et al.] // Science translational medicine. — 2011. — Vol. 3, no. 73. — 73ra21—73ra21.

136. Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery / H. Huang [et al.] // Nano letters. — 2007. — Vol. 7, no. 11. — P. 3305—3314.

137. Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug / J. Li [et al.] // Biomaterials. — 2010. — Vol. 31, no. 32. — P. 8410—8418.

138. *Liu Y.* Protein functionalized nanodiamond arrays / Y. Liu, K. Sun // Nanoscale research letters. — 2010. — Vol. 5, no. 6. — P. 1045.

139. Glycan-functionalized diamond nanoparticles as potent E. coli anti-adhesives / A. Barras [et al.] // Nanoscale. — 2013. — Vol. 5, no. 6. — P. 2307—2316.

140. Saccharide-modified nanodiamond conjugates for the efficient detection and removal of pathogenic bacteria / M. Hartmann [et al.] // Chemistry–A European Journal. — 2012. — Vol. 18, no. 21. — P. 6485—6492.

141. *Nguyen T.-T.-B.* Adsorption and hydrolytic activity of lysozyme on diamond nanocrystallites / T.-T.-B. Nguyen, H.-C. Chang, V. W.-K. Wu // Diamond and related materials. — 2007. — Vol. 16, no. 4—7. — P. 872—876.

142. Nanodiamond–insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R. A. Shimkunas [et al.] // Biomaterials. — 2009. — Vol. 30, no. 29. — P. 5720—5728.

143. Highly fluorescent nanodiamonds protein-functionalized for cell labeling and targeting / B.-M. Chang [et al.] // Advanced Functional Materials. — 2013. — Vol. 23, no. 46. — P. 5737—5745.

144. Nanodiamond vectors functionalized with polyethylenimine for siRNA delivery / M. Chen [et al.] // The Journal of Physical Chemistry Letters. — 2010. — Vol. 1, no. 21. — P. 3167—3171.

145. Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells / A. Alhaddad [et al.] // Small. — 2011. — Vol. 7, no. 21. — P. 3087—3095.

146. Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery / X.-Q. Zhang [et al.] // ACS nano. — 2009. — Vol. 3, no. 9. — P. 2609—2616.

147. Lysine-functionalized nanodiamonds: synthesis, physiochemical characterization, and nucleic acid binding studies / R. Kaur [et al.] // International journal of nanomedicine. — 2012. — Vol. 7. — P. 3851.

148. Superresolution imaging of albumin-conjugated fluorescent nanodiamonds in cells by stimulated emission depletion / Y.-K. Tzeng [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. — 2011. — Vol. 50, no. 10. — P. 2262—2265.

149. Preparation of non-aggregated fluorescent nanodiamonds (FNDs) by noncovalent coating with a block copolymer and proteins for enhancement of intracellular uptake / J. W. Lee [et al.] // Molecular BioSystems. — 2013. — Vol. 9, no. 5. — P. 1004—1011.

150. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy / K.-K. Liu [et al.] // Nanotechnology. — 2010. — Vol. 21, no. 31. — P. 315106.

151. Nanodiamond mediated delivery of chemotherapeutic drugs / Y. Li [et al.] // Journal of Materials Chemistry. — 2011. — Vol. 21, no. 41. — P. 16406—16412.

152. Chromatographic separation of highly soluble diamond nanoparticles prepared by polyglycerol grafting / L. Zhao [et al.] // Angewandte Chemie. — 2011. — Vol. 123, no. 6. — P. 1424—1428.

153. Fluorescent nanodiamonds with bioorthogonally reactive protein-resistant polymeric coatings / I. Rehor [et al.] // ChemPlusChem. — 2014. — Vol. 79, no. 1. — P. 21—24.

154. Адсорбция афлатоксина B1 наноалмазами детонационного синтеза / А. П. Пузырь [и др.] // Доклады Академии наук. — 2007. — Т. 417, № 1. — С. 117—120.

155. The interaction of linear and ring forms of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation / K. Purtov [et al.] // Nanotechnology. — 2008. — Vol. 19, no. 32. — P. 325101.

156. Биосинтез кофермента А–универсальный механизм сопряжения экзогенности и множественности функций пантотеновой кислоты / А. Г. Мойсеенок [и др.] // Украинский биохимический журнал. — 2004. — Т. 76, № 4. — С. 68—81.

157. Influence of surface modification adopting thermal treatments on dispersion of detonation nanodiamond / X. Xu [et al.] // Journal of Solid State Chemistry. — 2005. — Vol. 178, no. 3. — P. 688—693.

158. *Волков Д. С.* Комплексные подходы к характеризации наноалмазов детонационного синтеза и их коллоидных растворов. Дисс. ... канд.хим.наук. / Д. С. Волков. — Москва, 2015. — 237 с.

159. *Jiang T.* FTIR study of ultradispersed diamond powder synthesized by explosive detonation / T. Jiang, K. Xu // Carbon. — 1995. — Vol. 33, no. 12. — P. 1663—1671.

160. Hydroxylated detonation nanodiamond: FTIR, XPS, and NMR studies / O. Shenderova [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. — 2011. — Vol. 115, no. 39. — P. 19005—19011.

161. Improving the dispersity of detonation nanodiamond: differential scanning calorimetry as a new method of controlling the aggregation state of nanodiamond powders / M. V. Korobov [et al.] // Nanoscale. — 2013. — Vol. 5, no. 4. — P. 1529—1536.

162. *Кулакова И. И.* Модификация поверхности и физико-химические свойства наноалмазов / И. И. Кулакова // Физика твердого тела. — 2004. — Т. 46, № 4. — С. 621—628.

163. Properties of individual fractions of detonation nanodiamond / I. Larionova [et al.] // Diamond and related materials. — 2006. — Vol. 15, no. 11/12. — P. 1804—1808.

164. IR spectra of detonation nanodiamonds modified during the synthesis / V. Dolmatov [et al.] // Journal of Superhard Materials. — 2014. — Vol. 36, no. 5. — P. 344—357.

165. Cold plasma functionalization of nanodiamond particles / M. Ray [et al.] // Diamond and related materials. — 2006. — Vol. 15, no. 11/12. — P. 1809—1812.

166. Colloidal properties and behaviors of 3 nm primary particles of detonation nanodiamonds in aqueous media / N. Mchedlov-Petrossyan [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2015. — Vol. 17, no. 24. — P. 16186—16203.

167. Chemical mechanical modification of nanodiamond in an aqueous system / Y. Zhu [et al.] // Physics of the Solid State. — 2004. — Vol. 46, no. 4. — P. 681—684.

168. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances / I. V. Perminova [et al.] // Water Research. — 1998. — Vol. 32, no. 3. — P. 872—881.

169. Исследование эффективности изотопного обмена между 4-фенилбензоатом натрия и активированным тритием / В. П. Шевченко [и др.] // Радиохимия. — 2015. — Т. 57, № 3. — С. 264—271.

170. Preparation of tritium-labeled biologically active compounds / A. Shishkov [et al.] // Doklady Akademii nauk SSSR. — 1976. — Vol. 228, no. 5. — P. 1237.

171. *Heller W.* Tyndall spectra, their significance and application / W. Heller, E. Vassy // The Journal of Chemical Physics. — 1946. — Vol. 14, no. 9. — P. 565—566.

172. *Гроздов Д. С.* Цифровая гамма-активационная авторадиография для анализа в условиях неравномерного поля тормозного излучения микротона. Дис. . . .канд. хим. наук. / Д. С. Гроздов. — Москва, 2012. — 126 с.

173. *Куликова Н. А.* Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов: дис. ... док. биол. наук. / Н. А. Куликова. — Москва, 2008. — 302 с.

174. *Herlory O.* Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms / O. Herlory, P. Richard, G. Blanchard // Marine Biology. — 2007. — Vol. 153, no. 1. — P. 91—101.

175. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant Haberlea rhodopensis / R. J. Strasser [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. — 2010. — Vol. 1797, no. 6/7. — P. 1313—1326.

176. Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished ΔpH and Δφ components of the proton motive force / A. A. Bulychev [et al.] // Journal of bioenergetics and biomembranes. — 2013. — Vol. 45, no. 1/2. — P. 37—45.

177. *Wraight C. A.* Delayed fluorescence and the high-energy state of chloroplasts / C. A. Wraight, A. R. Crofts // European Journal of Biochemistry. — 1971. — Vol. 19, no. 3. — P. 386—397.

178. *Tyystjarvi E.* Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence / E. Tyystjarvi, I. Vass // Chlorophyll a Fluorescence. — Springer, 2004. — P. 363—388.

179. Delayed fluorescence in photosynthesis / V. Goltsev [et al.] // Photosynthesis research. — 2009. — Vol. 101, no. 2/3. — P. 217—232.

180. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // Journal of immunological methods. — 1983. — Vol. 65, no. 1/2. — P. 55—63.

181. Cytotoxicity and Chemosensitizing Activity of Amphiphilic Poly (glycerol)–Poly (alkylene oxide) Block Copolymers / T. V. Demina [et al.] // Biomacromolecules. — 2014. — Vol. 15, no. 7. — P. 2672—2681.

182. Quantification of nanodiamonds in aqueous solutions by spectrophotometry and thermal lens spectrometry / D. Volkov [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. — 2012. — Vol. 67, no. 10. — P. 842—850.

183. Оптические свойства гидрозолей детонационных наноалмазов / А. Е. Алексенский [и др.] // Физика твердого тела. — 2012. — Т. 54, № 3. — С. 541—548.

184. *Коняхин С. В.* Маркировка суспензий детонационных наноалмазов оптическими методами / С. В. Коняхин, Л. В. Шаронова, Е. Д. Эйдельман // Письма в Журнал технической физики. — 2013. — Т. 39, № 5. — С. 33—40.

185. Absorption and scattering of light in nanodiamond hydrosols / A. Vul [et al.] // Diamond and Related Materials. — Netherlands, 2011. — Vol. 20. — P. 279—284.

186. *Shenderova O.* Seeding slurries based on detonation nanodiamond in DMSO / O. Shenderova, S. Hens, G. McGuire // Diamond and Related Materials. — 2010. — Vol. 19, no. 2/3. — P. 260—267.

187. *Lucas L. L.* Comprehensive review and critical evaluation of the half-life of Tritium / L. L. Lucas, M. P. Unterweger // Journal of research of the National Institute of Standards and Technology. — 2000. — Vol. 105, no. 4. — P. 541.

188. *Choppin G. R.* Radiochemistry and nuclear chemistry / G. R. Choppin, J.-O. Liljenzin, J. Rydberg. — Butterworth-Heinemann, 2002. — P. 239—283.

189. Неравновесные процессы при взаимодействии горячих атомов трития с охлажденными твердыми мишенями. Ослабление потока атомов трития адсорбционными слоями бромидов алкилтриметиламмония / З. А. Тясто [и др.] // Радиохимия. — 2007. — Т. 49, № 2. — С. 163—165.

190. Неравновесные процессы при взаимодействии горячих атомов трития с охлажденными твердыми мишенями. Влияние температуры атомизатора на образование меченых веществ / М. Г. Чернышева [и др.] // Радиохимия. — 2007. — Т. 49, № 2. — С. 166—169.

191. *Chernysheva M.* Radionuclide diagnostics of biologically active substances adsorption on detonated nanodiamonds / M. Chernysheva, I. Myasnikov, G. Badun // Mendeleev Communications. — 2012. — Vol. 22. — P. 290—291.

192. *Бадун Г. А.* Использование меченного тритием лизоцима для исследования его адсорбции на пористых углеродных материалах / Г. А. Бадун, М. Г. Чернышева, И. А. Разживина // Радиохимия. — СПб., 2017. — Т. 59, № 3. — С. 255—259.

193. *Aleksenskiy A.* Deagglomeration of detonation nanodiamonds / A. Aleksenskiy, E. Eydelman, A. Y. Vul // Nanoscience and Nanotechnology Letters. — 2011. — Vol. 3, no. 1. — P. 68—74.

194. *Скорик Н. А.* Адсорбция некоторых веществ из водных растворов на наноалмазе / Н. А. Скорик, Е. В. Томилова, Н. М. Берендеев // Известия высших учебных заведений. — 2014. — Т. 57, № 7/2. — С. 142—147.

195. Влияние хлоридов алкилпиридиния на устойчивость водных дисперсий наноалмазов детонационного синтеза / О. А. Соболева [и др.] // Коллоидный журнал. — 2017. — Т. 79, № 1. — С. 83—89.

196. *Chernysheva M.* Tritium label in studying sorption of humic substances by carbon-based nanomaterials / M. Chernysheva, G. Badun // European Journal of Chemistry. — 2011. — Vol. 2, no. 1. — P. 61—64.

197. Effect of sodium chloride on interactions of fulvic acid and fulvate with montmorillonite / E. Tombácz [et al.] // Applied Clay Science. — 1990. — Vol. 5, no. 2. — P. 101—112.

198. *Khalilnezhad P.* Effect of nanodiamond surface functionalization using oleylamine on the scratch behavior of polyacrylic/nanodiamond nanocomposite / P. Khalilnezhad, S. A. Sajjadi, S. M. Zebarjad // Diamond and Related Materials. — 2014. — Vol. 45. — P. 7—11.

199. Adsorption of drugs on nanodiamond: toward development of a drug delivery platform / V. Mochalin [et al.] // Molecular pharmaceutics. — 2013. — Vol. 10, no. 10. — P. 3728—3735.

200. Electrostatically mediated adsorption by nanodiamond and nanocarbon particles / N. M. Gibson [et al.] // Journal of Nanoparticle Research. — 2012. — Vol. 14, no. 3. — P. 700.

201. Surface charge effects in protein adsorption on nanodiamonds / M. Aramesh [et al.] // Nanoscale. — 2015. — Vol. 7, no. 13. — P. 5726—5736.

202. Study on protein conformation and adsorption behaviors in nanodiamond particle–protein complexes / H.-D. Wang [et al.] // Nanotechnology. — 2011. — Vol. 22, no. 14. — P. 145703.

203. Humic substances alter the uptake and toxicity of nanodiamonds in wheat seedlings / M. G. Chernysheva [et al.] // Journal of Soils and Sediments. — 2018. — Vol. 18, no. 4. — P. 1335—1346.

204. Estimation of uptake of humic substances from different sources by Escherichia coli cells under optimum and salt stress conditions by use of tritium-labeled humic materials / N. A. Kulikova [et al.] // Applied and environmental microbiology. — 2010. — Vol. 76, no. 18. — P. 6223—6230.

205. *Beck C. B.* An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century / C. B. Beck. — Cambridge University Press, 2010.

206. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation / X. Ma [et al.] // Science of the total environment. — 2010. — Vol. 408, no. 16. — P. 3053—3061.

207. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth / M. Khodakovskaya [et al.] // ACS nano. — 2009. — Vol. 3, no. 10. — P. 3221—3227.

208. Accumulation, translocation and impact of TiO2 nanoparticles in wheat (Triticum aestivum spp.): influence of diameter and crystal phase / C. Larue [et al.] // Science of the total environment. — 2012. — Vol. 431. — P. 197—208.

209. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to Arabidopsis thaliana / C. W. Lee [et al.] // Environmental Toxicology and Chemistry. — 2010. — Vol. 29, no. 3. — P. 669—675.

210. *Qi M.* Nano-TiO2 improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress / M. Qi, Y. Liu, T. Li // Biological trace element research. — 2013. — Vol. 156, no. 1—3. — P. 323—328.

211. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in Chlorella pyrenoidosa / D. Vavilin [et al.] // Journal of plant physiology. — 1995. — Vol. 146, no. 5/6. — P. 609—614.

212. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer / T. Antal [et al.] // Photosynthesis research. — 2009. — Vol. 102, no. 1. — P. 67—76.

213. *Lazar D.* Modelling of light-induced chlorophyll a fluorescence rise (OJIP transient) and changes in 820 nm-transmittance signal of photosynthesis / D. Lazar // Photosynthetica. — 2009. — Vol. 47, no. 4. — P. 483—498.

214. The effect of phenols on the parameters of chlorophyll fluorescence and reactions of P 700 in green algae Scenedesmus quadricauda / D. Matorin [et al.] // Biophysics. — 2014. — Vol. 59, no. 3. — P. 374—379.

215. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P 700 reaction in the green alga Chlamydomonas reinhardtii / D. Matorin [et al.] // Microbiology. — 2013. — Vol. 82, no. 6. — P. 809—814.

216. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, Chlorella vulgaris and Dunaliella tertiolecta / A. Oukarroum [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2012. — Vol. 78. — P. 80—85.

217. *Штирбет А.* Моделирование кинетики флуоресценции хлорофилла a: связь с фотосинтезом (обзор) / А. Штирбет, Г. Ризниченко, А. Рубин // Биохимия. — 2014. — Т. 79, № 4. — С. 379—412.

218. *Strasser R. J.* The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples / R. J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael // Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. — 2000. — P. 445—483.

219. The role of surface functionality in determining nanoparticle cytotoxicity / S. T. Kim [et al.] // Accounts of chemical research. — 2013. — Vol. 46, no. 3. — P. 681—691.

220. Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanomaterials / A. M. Schrand [et al.] // Safety of Nanoparticles. — Springer, 2009. — P. 159—187.

221. Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers / N. Melik-Nubarov [et al.] // FEBS letters. — 1999. — Vol. 446, no. 1. — P. 194—198.

222. Reduction of cytotoxicity of Myramistin by adsorption on nanodiamonds / M. Chernysheva [et al.] // Mendeleev Communications. — 2017. — Vol. 27, no. 4. — P. 421—423.

Список рисунков

2.1 Структурная формула пантотеновой кислоты 32
2.2 Структурная формула плюроника P123 32
2.3 Структурная формула бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммонийхлорида моногидрата 33
2.4 Структурная формула цис-1-амино-9-октадецена 33
2.5 Спектры поглощения в средней ИК области (400-4000 $см^{-1}$) наноалмазов производства НП ЗАО «Синта» и ООО «СКН» 37
2.6 ИК-спектры наноалмазов в области 400-2000 $см^{-1}$ 37
2.7 Схема расположения реакционного сосуда и охладителя для экспериментов с температурой мишени, а – 77 K и б – 295 K. 1 – вольфрамовая нить, 2 – вещество на стенках реакционной колбы, 3 – емкость с жидким азотом [169] 42
2.8 Зависимость B от n для наноалмазов разных серий; пунктирная линия – аппроксимация экспоненциальной функцией; символы – значения коэффициентов полученные по уравнениям (2.1) и (2.2) . . 44
2.9 Изображение черно-белой части стандартной пленки IT8 calibration target. 57
2.10 Зависимость отклика сканера (Q) от оптической плотности (A) для сканера Epson professional V700. 58
2.11 Изображения корня после контакта с гидрозолем [^{3}H]ДН-С (37 ГБк/г, Retina): (1) фото, (2) экспонирование 2 часа, (3) экспонирование 6 часов 60
2.12 Изображения побегов после контакта с гидрозолем [^{3}H]ДН-С (37 ГБк/г, Retina): (1) и (3) фото, (2) экспонирование 50 суток, (4) экспонирование 92 суток. 61

3.1 Относительное отклонение при определении концентрации ДН по предложенной модели; символы относятся к экспериментальным данным для следующих препаратов наноалмазов: ДН-С (★), ДН-100 (□), УДА-ТАН (◁), ТАН-О (◊), ТАН-Н (○); сплошная линия – модель, пунктир – среднее относительное отклонение 68

3.2 Зависимость удельной радиоактивности ДН от количества 10-секундных циклов активаций трития. Символы относятся к полученным экспериментальным данным: черные символы – исходные ДН, белые символы – ДН обработанные ультразвуком. Пунктирной линией и точечным пунктиром показаны результаты расчета по уравнению 3.11 для образцов ДН обработанных ультразвуком и исходных соответственно. 71
3.3 ПЭМ изображения (а),(в) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-30 по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением. 74
3.4 Зависимость максимальной удельной радиоактивности ДН от гидродинамического диаметра агрегатов в суспензиях (мода распределения по числу частиц). Символы относятся к полученным экспериментальным данным: черные символы – исходные ДН, белые символы – ДН обработанные ультразвуком; линии отображают ширину пика на полувысоте. 79
3.5 Изотермы адсорбции ППК на наноалмазах: а – ГПК, б – ПК, в – ФПК; 1 – водная суспензия, 2 – в физиологическом растворе, 3 – адсорбция на порошке ДН-С (для ГПК); линии – расчет по уравнению 3.12. 86
3.6 Изотермы адсорбции ГПК и ПК при температурах 277 и 310 К. . . . 89
3.7 Изотермы адсорбции гуминовых веществ на наноалмазах ДН-С: а – гуминовые кислоты угля, круги – система в буфере, треугольники вершиной вниз – система в воде, треугольники вершиной вверх – адсорбция на наноалмазах ДН-С-О; б – гуминовые кислоты торфа; в – речные гуминовые кислоты; г – речные фульвокислоты, шестиугольники – обратимая и необратимая составляющие адсорбции, ромбы – необратимая адсорбция. 91
3.8 а) изотерма адсорбции мирамистина на наноалмазах ДН-С, линия – расчет по уравнению 3.12; б) изотерма адсорбции мирамистина на наноалмазах ДН-С в логарифмических координатах, I – область Генри, II – участок насыщения монослоя, III – полислойная адсорбция. 94
3.9 Изотерма адсорбции плюроника Р123 на наноалмазах ДН-С. Пунктир - расчет по уравнению 3.12. 96

3.10 Количество десорбированного плюроника P123 с ДН в присутствии мирамистина. 97
3.11 Изотерма адсорбции олеиламина на наноалмазах ТАН-О. Пунктирной линией представлены результаты расчета по уравнению 3.12. 98
3.12 Изотермы адсорбции мирамистина на ДН. Линии – расчет адсорбции мирамистина по уравнению 3.12: сплошная – ДН-С, штриховой пунктир – ДН-СНА, точечный пунктир – ДН-Р123. Квадраты и круги – экспериментальные данные по адсорбции мирамистина на ДН–СНА и ДН-Р123. 99
3.13 Изменение параметра равновесия R в зависимости от концентрации мирамистина. Сплошная линия – при адсорбции мирамистина на наноалмазах; штриховой – на наноалмазах, модифицированных СНА; точечный – на наноалмазах, модифицированных Р123. 100
3.14 Распределение агрегатов наноалмазов по размеру: сплошная линия – ДН-С, штрихпунктирная линия – ДН-С-СНА и точечный пунктир – ДН-С-СНА-мирамистин; стрелочками показан расчет полуширины распределения. 102
3.15 Поверхностное натяжение на границе водной дисперсии ДН-С с воздухом (а), п-ксилолом (б) и октаном (в) в зависимости от концентрации ДН. Белые символы – наноалмазы ДН-С, черные символы композит ДН-С-Р123. 105
3.16 Модуль упргуости E (белые квадраты) и предел прочности P_c (черные квадраты) композитных пленок при различном содержании ТАН-О (а) и ТАН-О, модифицированных олеиламином (б); линии относятся к характеристикам пленок без добавления ДН. 107
3.17 Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин (слева) и [^{3}H]ТАН-О (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%. 108
3.18 Изменение концентрации [^{3}H]ДН-С в суспензии при контакте с растениями: □ – ДН + SRHA; • – ДН + SRFA; ∘ – ДН без ГВ. 110
3.19 Фотография (слева) и авторадиограмма (справа) побегов и корней растениий: (1) – ДН, (2) – ДН + SRFA, (3) - ДН + SRHA. 112

3.20 Зависимость содержания наноалмазов ДН-С в корнях растения от ζ-потенциала образующихся комплексов наноалмазов с гуминовыми веществами. 115
3.21 Распределение ДН вдоль листа. Красные и белые символы относятся к разным листам растения, горизонтальные линии соответствуют длине участка листа: (а) ДН + SRFA, (б) ДН + SRHA, (в) ДН. 117
3.22 Влияние ДН и ГВ на кинетику быстрой флуоресценции хлорофилла проростков пшеницы. Интенсивность флуоресценции нормализована на интенсивность при 2 мс. 120
3.23 Влияние ДН и ГВ на кинетику замедленной флуоресценции хлорофилла проростков пшеницы. 121
3.24 Выживаемость клеток MCF-7 в присутствии мирамистина (черный квадрат), ДН-С (белый квадрат), ДН-С-мирамистина (белый круг) . 124
3.25 Эффективность связывания мирамистина (белый квадрат); ДН-С (черный квадрат); мирамистина, адсорбированного на ДН-С (белый круг); наноалмазов ДН-С связанных с мирамистином (черный круг) 125
3.26 Оценка токсичности мирамистина на колонии гриба *Aspergilus niger*, зависимость размера колонии от: а) времени экспозиции, б) концентрации мирамистина при времени экспозиции 96 часов. . . 126
3.27 Оценка токсичности ДН-С-О и ДН-С-О-мирамистин на колонии гриба *Aspergilus niger*, зависимость размера колонии от: а) времени экспозиции, б) концентрации мирамистина при времени экспозиции 96 часов. 127
3.28 Оценка токсичности мирамистина, гуминовых кислот угля (СНА), наноалмазов ДН-С, комплексов ДН-С-мирамистин, ДН-С-О-мирамистин и ДН-С-СНА-мирамистин на колонии гриба *Aspergilus niger*, зависимость размера колонии от: а) времени экспозиции; б) концентрации мирамистина при времени экспозиции 96 часов 128

Г.1 Радиохроматограмма препарата [^{3}H]ПК. 169
Г.2 Радиохроматограмма препарата [^{3}H]ГПК. 169
Г.3 Радиохроматограмма препарата [^{3}H]ФПК. 170
Г.4 Радиохроматограмма препарата [^{3}H]мирамистина. 170

Д.1 ПЭМ изображения (а,(в) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-100 по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением. 171
Д.2 ПЭМ изображения (а),(в) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-15 по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением. 172
Д.3 ПЭМ изображение (а) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-С по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением. 173

Е.1 Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин и ТАН-О в соотношении 4:1 (слева), ТАН-О-олеиламин и [^{3}H]ТАН-О в соотношении 4:1 (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%. . . . 174
Е.2 Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин и ТАН-О в соотношении 1:1 (слева), ТАН-О-олеиламин и [^{3}H]ТАН-О в соотношении 1:1 (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%. . . . 175
Е.3 Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин и ТАН-О в соотношении 1:4 (слева), ТАН-О-олеиламин и [^{3}H]ТАН-О в соотношении 1:4 (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%. . . . 176

Список таблиц

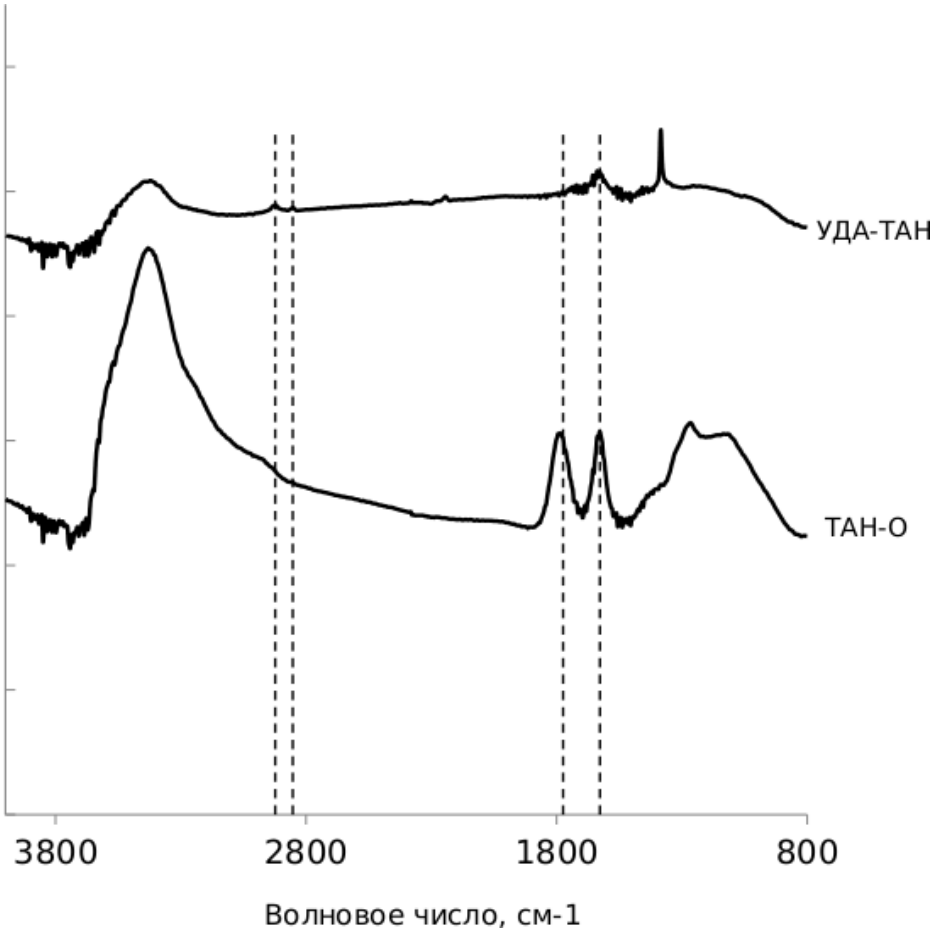
1 Общие сведения о наноалмазах, использованных в работе 31
2 Свойства гуминовых веществ, использованных в работе 34
3 Эффективность регистрации скорости счета азотнокислых растворов в сцинтилляторе Opti Phase 35
4 Свойства полученных меченных тритием соединений, использованных в методе радиоактивных индикаторов 41
5 Общие сведения об исследуемых системах 51
6 Состав коллоидных растворов ДН для экспонирования растений . . 57
7 Концентрации и удельные радиоактивности препаратов при исследовании связывания с клеточной мембраной 65
8 Сравнение концентраций, рассчитанных предложенным в этой работе методом и способом описанным в работе [182] 70
9 Характеристика продукта реакции ДН с тритием в методе термической активации 72
10 Размер агрегатов ДН в распределении по количеству частиц по данным ДРС 75
11 Содержание металлических примесей в ДН 75
12 Удельная радиоактивность лабильного трития в ДН и оценка содержания воды в мишени 77
13 Параметры уравнения 3.11 79
14 Параметры реакции и свойства препаратов, полученных методом термической активации трития 82
15 Параметры адсорбции производных пантотеновой кислоты на наноалмазах детонационного синтеза 87
16 Сравнение адсорбции производных пантотеновой кислоты на наноалмазах детонационного синтеза производства «Синта» и «СКН» 88
17 Остаточная адсорбция производных пантотеновой кислоты на наноалмазах ДН-С в различных средах 90
18 Параметры адсорбции гуминовых веществ на наноалмазах 92
19 Гидродинамический диаметр и ζ-потенциал частиц ДН в присутствии ГВ 94

20 Параметры адсорбции ПАВ на наноалмазах 95
21 Десорбция мирамистина с поверхности наноалмазов в различных средах 100
22 Характеристики гидрозолей наноалмазов 101
23 Коэффициенты распределения наноалмазов в системе вода–органическая жидкость 106
24 Содержание [^{3}H]ДН в частях растений *Triticum aestivum*, мг/г 114
25 Влияние ДН и ГВ на основные параметры RLCs флуоресценции хлорофилл проростков пшеницы 119
26 Параметры JIP-теста для проростков пшеницы в присутствии ДН и ГВ 120

27 Условия проведения измерений ИСП-АЭС 165

Приложение А

ИК-спектры образцов УДА-ТАН и ТАН-О



Приложение Б

Условия проведения измерений ИСП-АЭС

Таблица 27 — Условия проведения измерений ИСП-АЭС

Условия регистрации линий	
Мощность, кВ	1.40
Поток плазмы, л/мин	15
Осевой поток, л/мин	1.50
Поток распылителя, Л/мин	0.70
Реплика время чтения, с	5
Время стабилизации плазмы, с	10
Повторения	3
Настройки введения образца	
Мертвое время, с	15
Частота насоса, об/мин	15
Линии испускания, нм	
Ti	337.280(I)
	368.520(I)
Sc	335.372(II)

Приложение В

Коэффициенты уравнения 2.1 для спектров поглощения гидрозолей наноалмазов в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм

Марка ДН	с, г/л	n	B	R^2	
УДА-ТАН	0.010	4.36±0.09	$(2\pm1)\cdot10^{11}$	0.946	$B = 45.05exp(5.14 \cdot n)$
	0.021	3.31±0.06	$(9\pm3)\cdot10^{8}$	0.955	$R^2 = 0.999$
	0.036	2.89±0.04	$(1.5\pm0.3)\cdot10^{8}$	0.970	
	0.052	2.87±0.04	$(1.1\pm0.2)\cdot10^{8}$	0.970	
	0.072	2.81±0.04	$(9\pm2)\cdot10^{7}$	0.970	
	0.102	2.63±0.03	$(3.4\pm0.5)\cdot10^{7}$	0.981	
	0.123	2.72±0.05	$(6\pm1)\cdot10^{7}$	0.952	
	0.154	2.36±0.04	$(7\pm1)\cdot10^{6}$	0.959	
ТАН-Н	0.009	2.49±0.03	$(1.3\pm0.2)\cdot10^{7}$	0.953	$B = 23.87exp(5.30 \cdot n)$
	0.019	2.09±0.02	$(1.5\pm0.1)\cdot10^{6}$	0.975	$R^2 = 0.997$
	0.033	1.94±0.01	$(7.2\pm0.4)\cdot10^{5}$	0.989	
	0.033	1.94±0.01	$(7.1\pm0.4)\cdot10^{5}$	0.989	
	0.048	1.94±0.01	$(6.8\pm0.4)\cdot10^{5}$	0.991	
	0.048	1.94±0.01	$(6.8\pm0.4)\cdot10^{5}$	0.991	
	0.065	1.91±0.01	$(6.7\pm0.4)\cdot10^{5}$	0.988	
	0.065	1.91±0.01	$(6.6\pm0.4)\cdot10^{5}$	0.988	
	0.099	1.90±0.01	$(5.8\pm0.3)\cdot10^{5}$	0.991	
	0.099	1.90±0.01	$(5.8\pm0.3)\cdot10^{5}$	0.991	
	0.117	1.81±0.01	$(3.4\pm0.1)\cdot10^{5}$	0.994	
	0.147	1.78±0.01	$(2.7\pm0.1)\cdot10^{5}$	0.992	
ТАН-О[1]	0.008	3.60±0.02	$(6.7\pm0.7)\cdot10^{9}$	0.995	$B = 2.72exp(5.96 \cdot n)$
	0.012	3.58±0.02	$(5.5\pm0.6)\cdot10^{9}$	0.996	$R^2 = 0.993$
	0.016	3.43±0.02	$(2.2\pm0.2)\cdot10^{9}$	0.996	
	0.018	3.58±0.02	$(5.3\pm0.5)\cdot10^{9}$	0.996	
	0.026	3.57±0.02	$(4.7\pm0.4)\cdot10^{9}$	0.997	
	0.028	3.48±0.02	$(2.8\pm0.3)\cdot10^{9}$	0.997	
	0.037	3.57±0.02	$(4.6\pm0.4)\cdot10^{9}$	0.997	

продолжение следует

(продолжение)					
Марка ДН	с, г/л	n	B	R^2	
	0.041	3.49±0.02	$(2.9\pm0.2)\cdot10^9$	0.997	
	0.055	3.56±0.02	$(4.2\pm0.3)\cdot10^9$	0.997	
	0.059	3.50±0.01	$(2.9\pm0.2)\cdot10^9$	0.997	
	0.080	3.51±0.01	$(3.1\pm0.2)\cdot10^9$	0.998	
	0.086	3.48±0.01	$(2.7\pm0.2)\cdot10^9$	0.998	
	0.126	3.39±0.01	$(1.58\pm0.07)\cdot10^9$	0.999	
	0.184	3.07±0.03	$(2.6\pm0.4)\cdot10^8$	0.989	
ТАН-О[2]	0.010	3.01±0.04	$(2.1\pm0.4)\cdot10^8$	0.977	$B = 28.29exp(5.29 \cdot n)$
	0.015	2.63±0.02	$(4.0\pm0.5)\cdot10^7$	0.987	$R^2 = 0.993$
	0.031	2.43±0.01	$(1.15\pm0.07)\cdot10^7$	0.996	
	0.047	2.39±0.01	$(9.0\pm0.6)\cdot10^6$	0.996	
	0.072	2.37±0.01	$(7.5\pm0.5)\cdot10^6$	0.996	
	0.102	2.31±0.01	$(5.3\pm0.3)\cdot10^6$	0.997	
	0.118	2.24±0.01	$(3.7\pm0.2)\cdot10^6$	0.997	
	0.149	2.5±0.1	$(2\pm1)\cdot10^7$	0.688	
ДН-С	0.011	3.56±0.02	$(4.0\pm0.4)\cdot10^9$	0.996	$B = 44.97exp(5.14 \cdot n)$
	0.014	3.54±0.02	$(3.6\pm0.4)\cdot10^9$	0.996	$R^2 = 0.992$
	0.018	3.53±0.02	$(3.5\pm0.4)\cdot10^9$	0.996	
	0.023	3.53±0.02	$(3.6\pm0.4)\cdot10^9$	0.996	
	0.035	3.50±0.02	$(3.0\pm0.3)\cdot10^9$	0.996	
	0.052	3.49±0.02	$(2.8\pm0.3)\cdot10^9$	0.996	
	0.084	3.47±0.02	$(2.5\pm0.2)\cdot10^9$	0.996	
ДН-100	0.015	3.18±0.02	$(5.5\pm0.5)\cdot10^8$	0.996	$B = 66.16exp(5.02 \cdot n)$
	0.018	3.43±0.01	$(2.0\pm0.1)\cdot10^9$	0.998	$R^2 = 0.995$
	0.021	3.20±0.01	$(6.2\pm0.5)\cdot10^8$	0.997	
	0.024	3.41±0.01	$(1.9\pm0.1)\cdot10^9$	0.998	
	0.031	3.24±0.01	$(8.1\pm0.6)\cdot10^8$	0.997	
	0.034	3.37±0.01	$(1.5\pm0.1)\cdot10^9$	0.998	
	0.041	3.27±0.01	$(9.3\pm0.7)\cdot10^8$	0.998	
	0.043	3.37±0.01	$(1.5\pm0.1)\cdot10^9$	0.998	
	0.054	3.36±0.01	$(1.42\pm0.01)\cdot10^9$	0.998	
продолжение следует					

(продолжение)					
Марка ДН	с, г/л	n	B	R^2	
	0.061	3.28±0.01	$(9.9\pm0.6)\cdot10^8$	0.998	
	0.068	3.35±0.01	$(1.34\pm0.09)\cdot10^9$	0.998	
	0.086	3.32±0.01	$(1.14\pm0.07)\cdot10^9$	0.998	
ДН-30	0.025	4.37±0.02	$(1.4\pm0.2)\cdot10^{11}$	0.996	$B = 11.01exp(5.33 \cdot n)$
	0.032	4.41±0.03	$(1.7\pm0.3)\cdot10^{11}$	0.995	$R^2 = 0.999$
	0.044	4.53±0.03	$(3.4\pm0.5)\cdot10^{11}$	0.995	
	0.054	4.60±0.03	$(4.7\pm0.7)\cdot10^{11}$	0.995	
	0.067	4.59±0.03	$(4.4\pm0.7)\cdot10^{11}$	0.995	
	0.082	4.63±0.03	$(5.5\pm0.9)\cdot10^{11}$	0.995	
	0.103	4.64±0.03	$(6\pm1)\cdot10^{11}$	0.995	
ДН-15	0.014	4.38±0.04	$(3.3\pm0.7)\cdot10^{11}$	0.989	$B = 15 \cdot 10^5 exp(2.68 \cdot n)$
	0.019	4.33±0.04	$(2.1\pm0.4)\cdot10^{11}$	0.991	$\mathrm{R}^2 = 0.68$
	0.026	4.52±0.02	$(1.9\pm0.2)\cdot10^{11}$	0.998	
	0.029	4.32±0.03	$(1.9\pm0.3)\cdot10^{11}$	0.992	
	0.035	4.53±0.02	$(2.1\pm0.2)\cdot10^{11}$	0.997	
	0.037	4.31±0.03	$(1.7\pm0.3)\cdot10^{11}$	0.992	
	0.048	4.45±0.03	$(1.4\pm0.2)\cdot10^{11}$	0.995	
	0.060	4.68±0.03	$(4.9\pm0.7)\cdot10^{11}$	0.997	
	0.069	4.27±0.03	$(1.2\pm0.2)\cdot10^{11}$	0.993	
	0.074	4.65±0.03	$(4.1\pm0.6)\cdot10^{11}$	0.996	
	0.092	4.68±0.03	$(5.0\pm0.8)\cdot10^{11}$	0.996	
	0.115	4.67±0.03	$(4.9\pm0.8)\cdot10^{11}$	0.995	

Приложение Г

Радиохроматограммы меченных тритием соединений

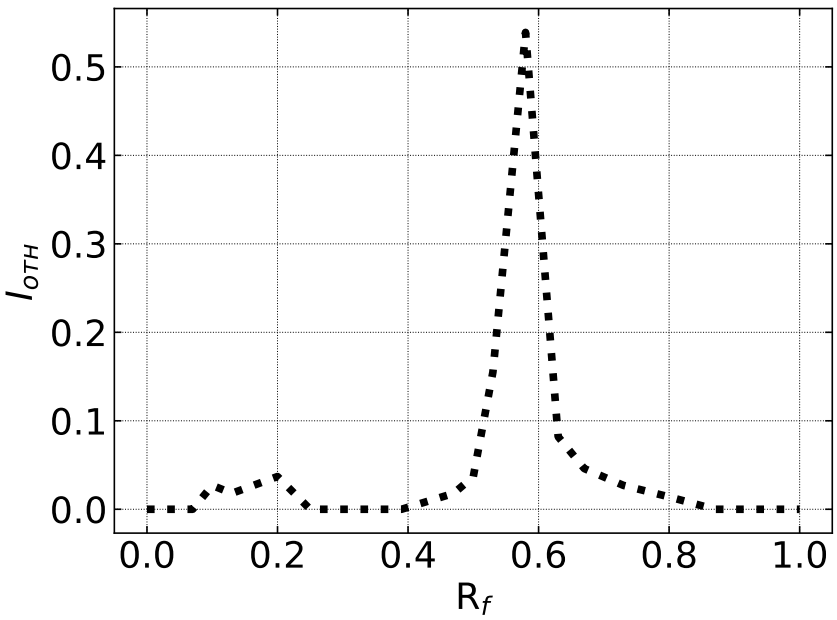


Рисунок Г.1 — Радиохроматограмма препарата [^{3}H]ПК.

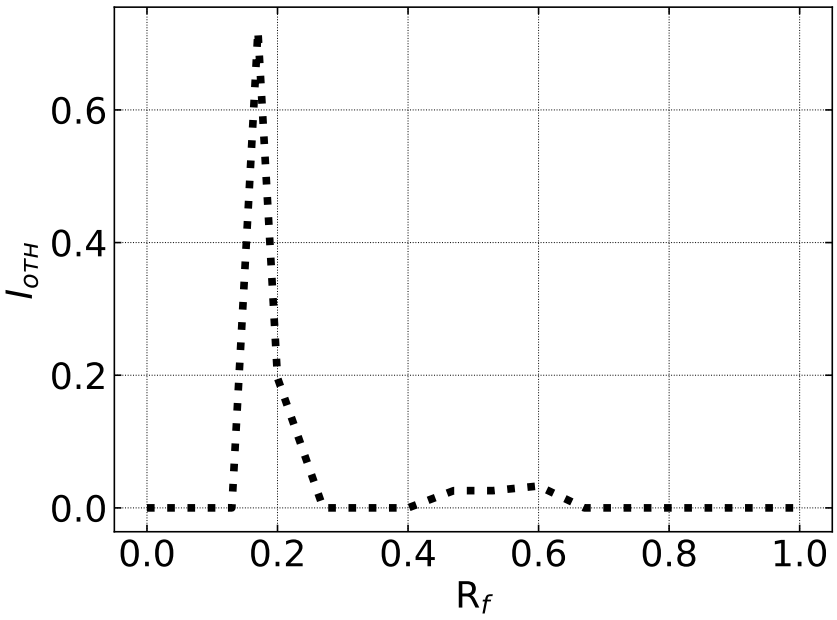


Рисунок Г.2 — Радиохроматограмма препарата [^{3}H]ГПК.

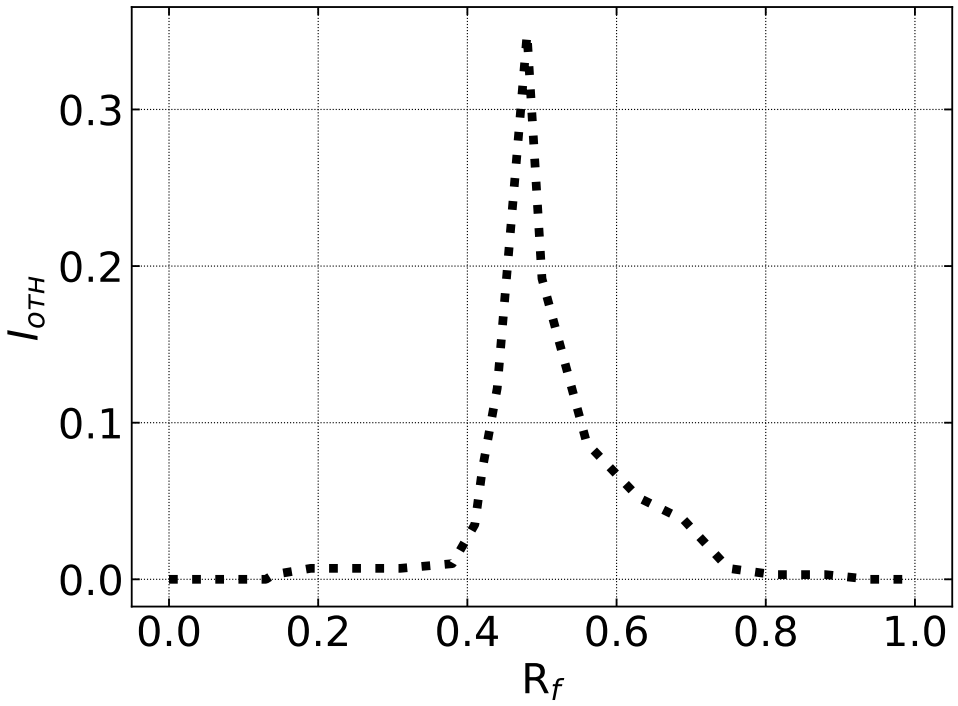


Рисунок Г.3 — Радиохроматограмма препарата [^{3}H]ФПК.

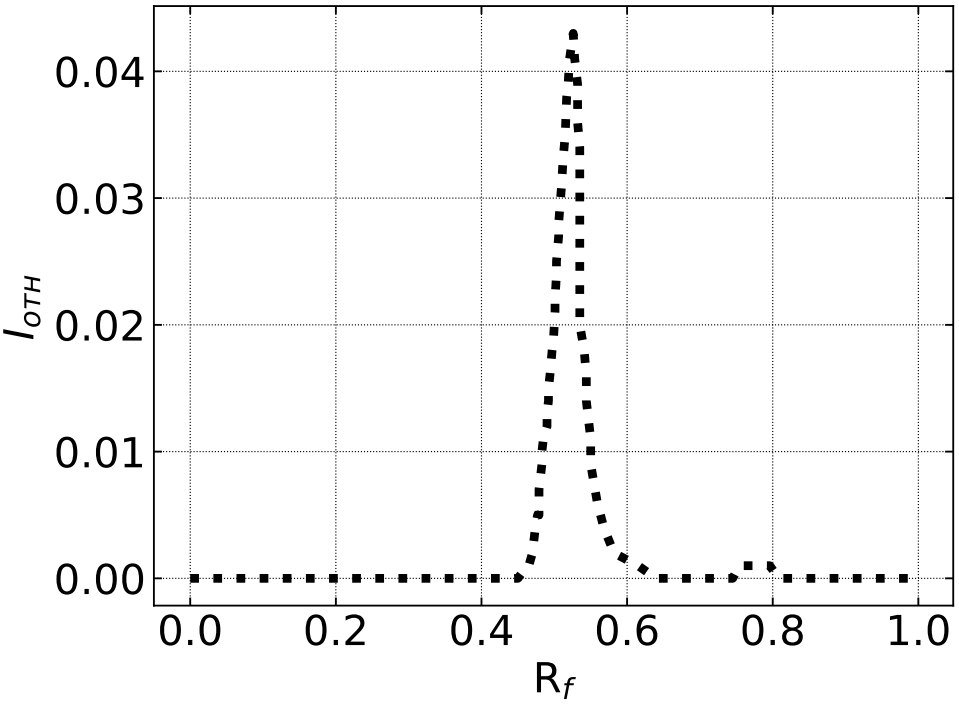
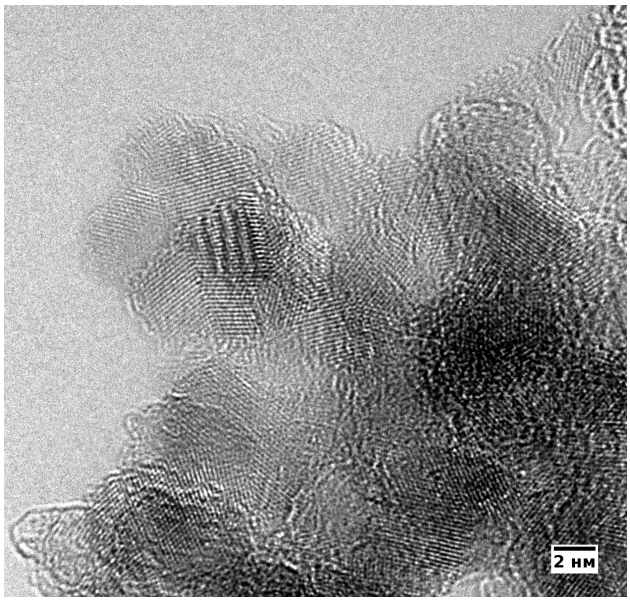


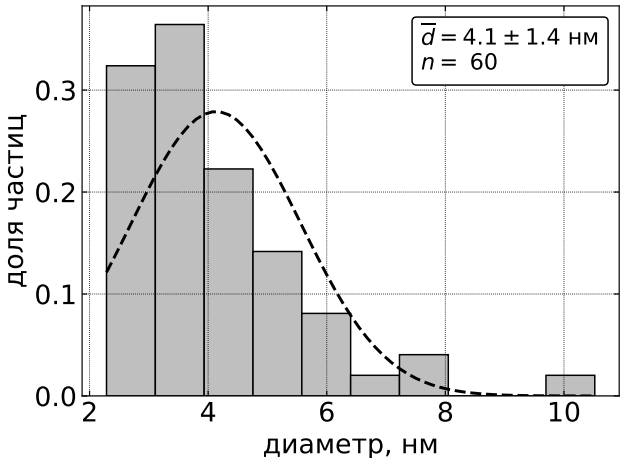
Рисунок Г.4 — Радиохроматограмма препарата [^{3}H]мирамистина.

Приложение Д

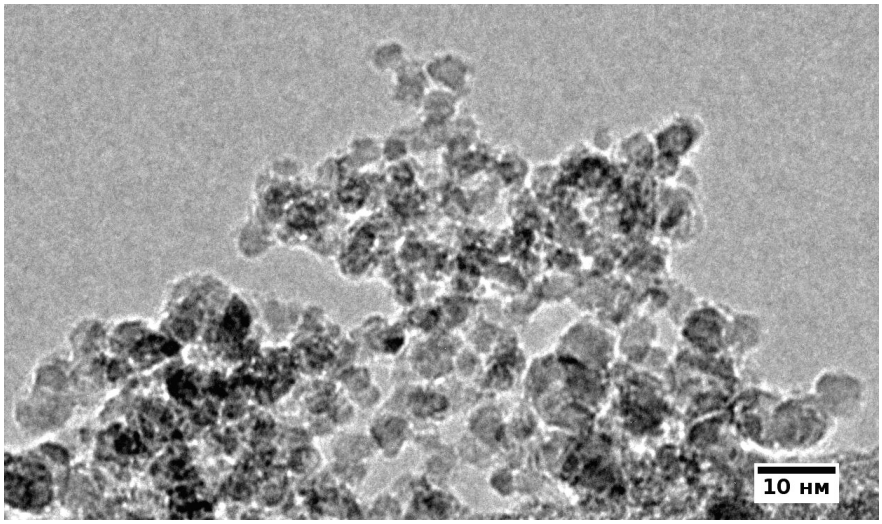
Микрофотографии ПЭМ и распределение первичных частиц ДН по размеру



а)

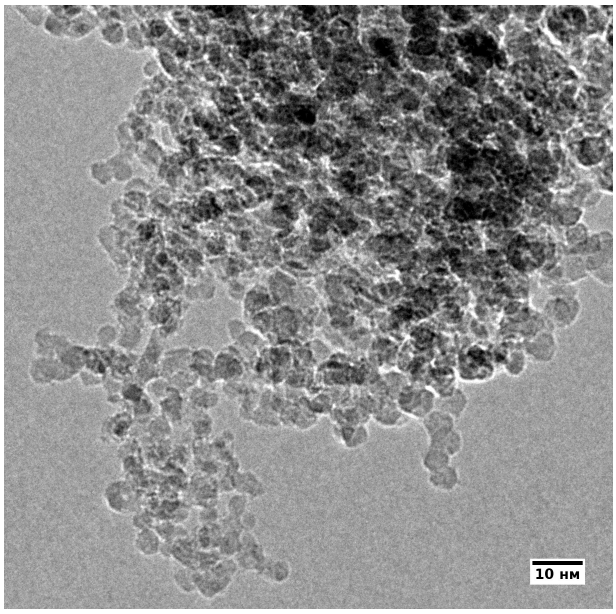


б)

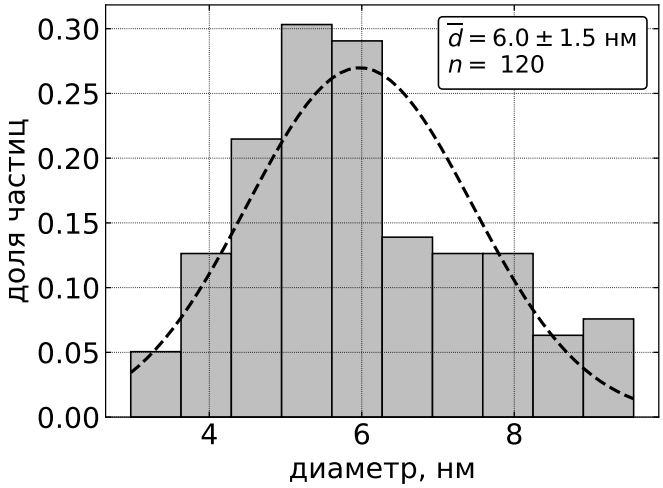


в)

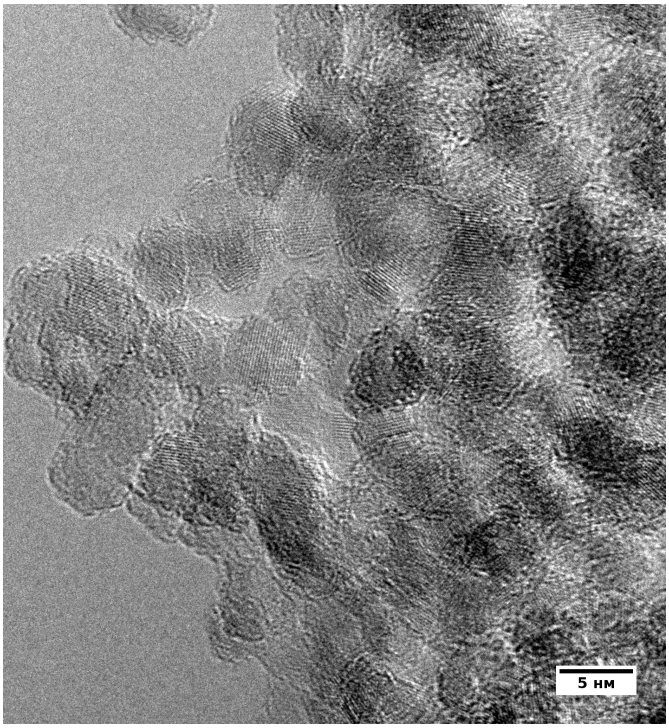
Рисунок Д.1 — ПЭМ изображения (а,(в) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-100 по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением.



а)

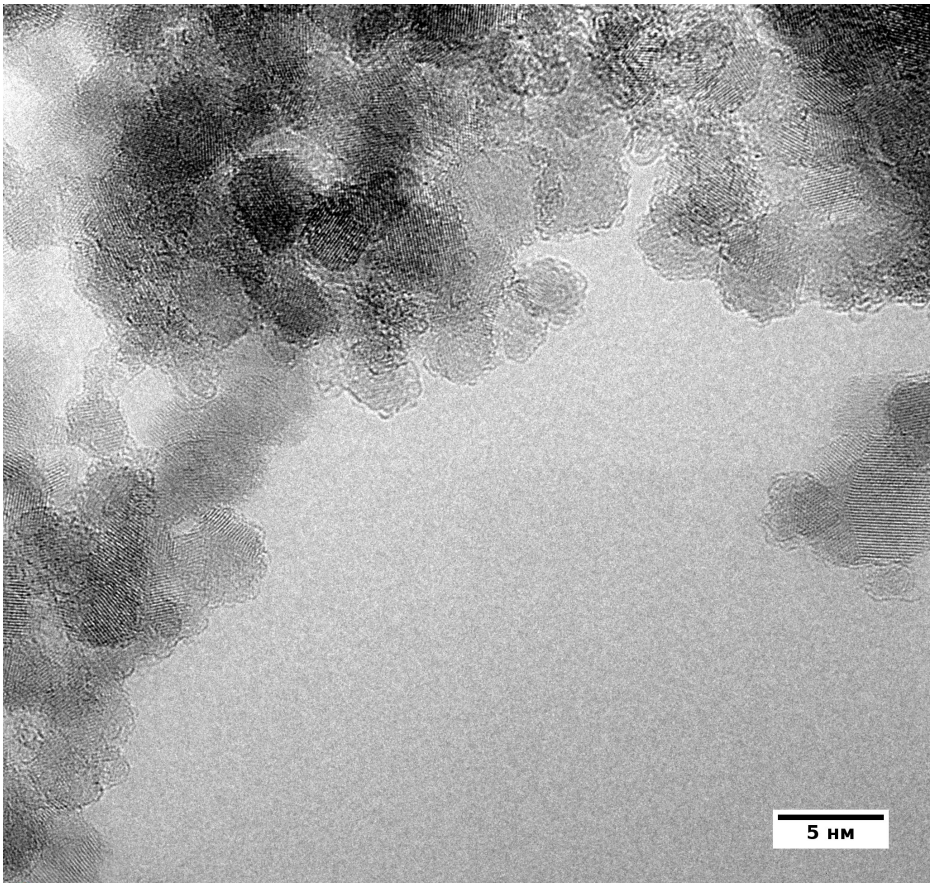


б)

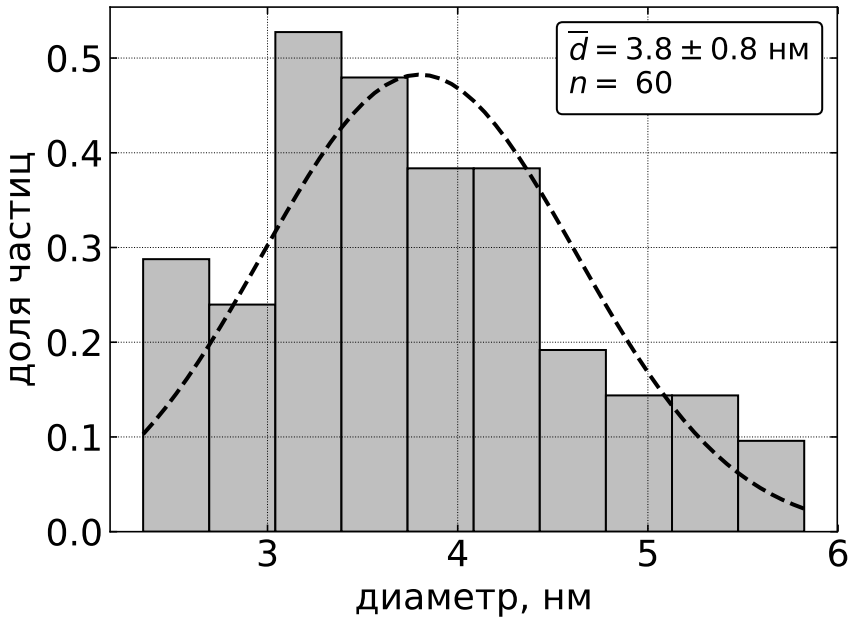


в)

Рисунок Д.2 — ПЭМ изображения (а),(в) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-15 по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением.



а)



б)

Рисунок Д.3 — ПЭМ изображение (а) и гистограмма (б) распределения первичных частиц ДН-С по размерам, пунктирная линия – аппроксимация нормальным распределением.

Приложение Е

Авторадиограммы композитных пленок

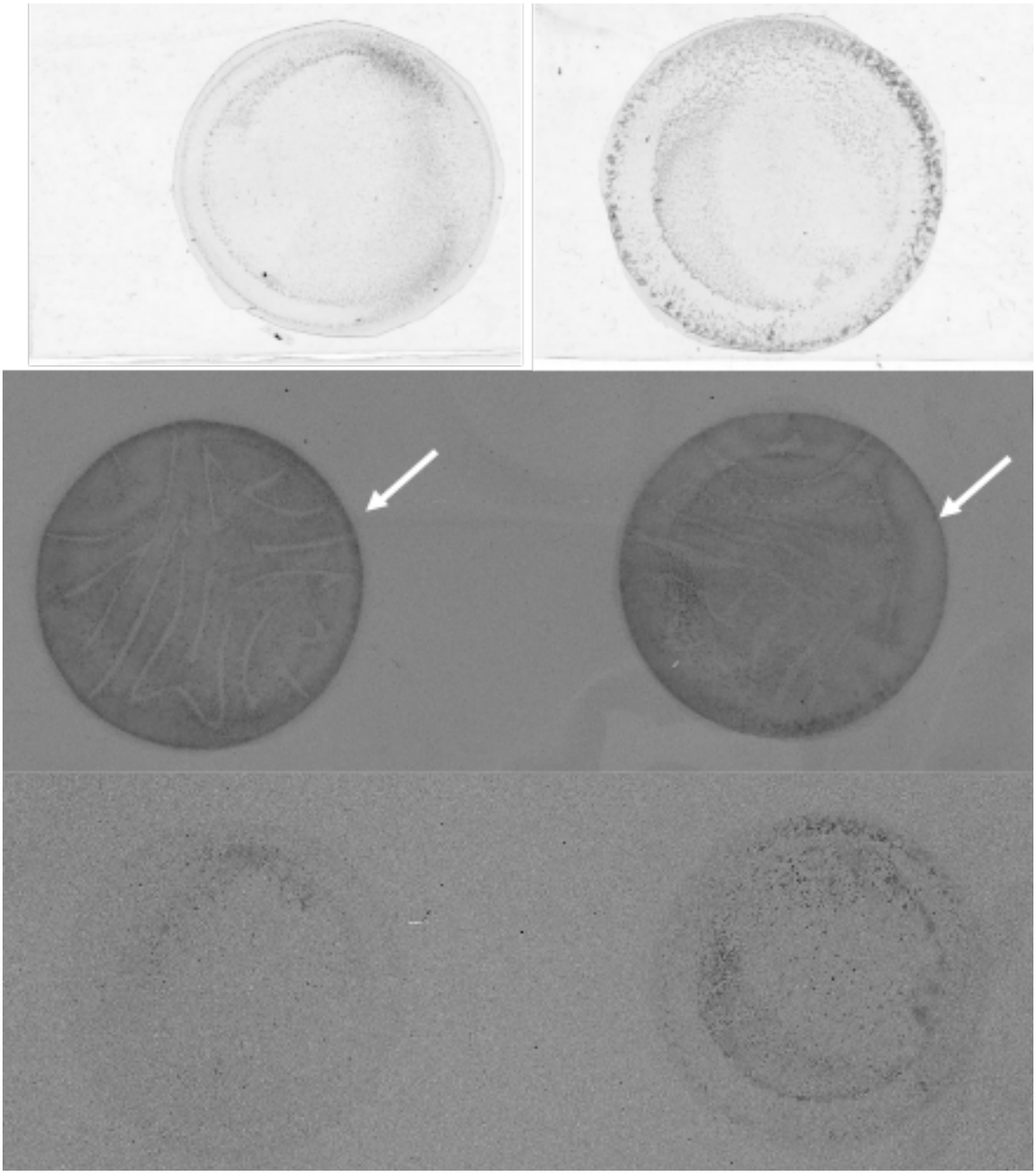


Рисунок Е.1 — Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин и ТАН-О в соотношении 4:1 (слева), ТАН-О-олеиламин и [^{3}H]ТАН-О в соотношении 4:1 (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%.

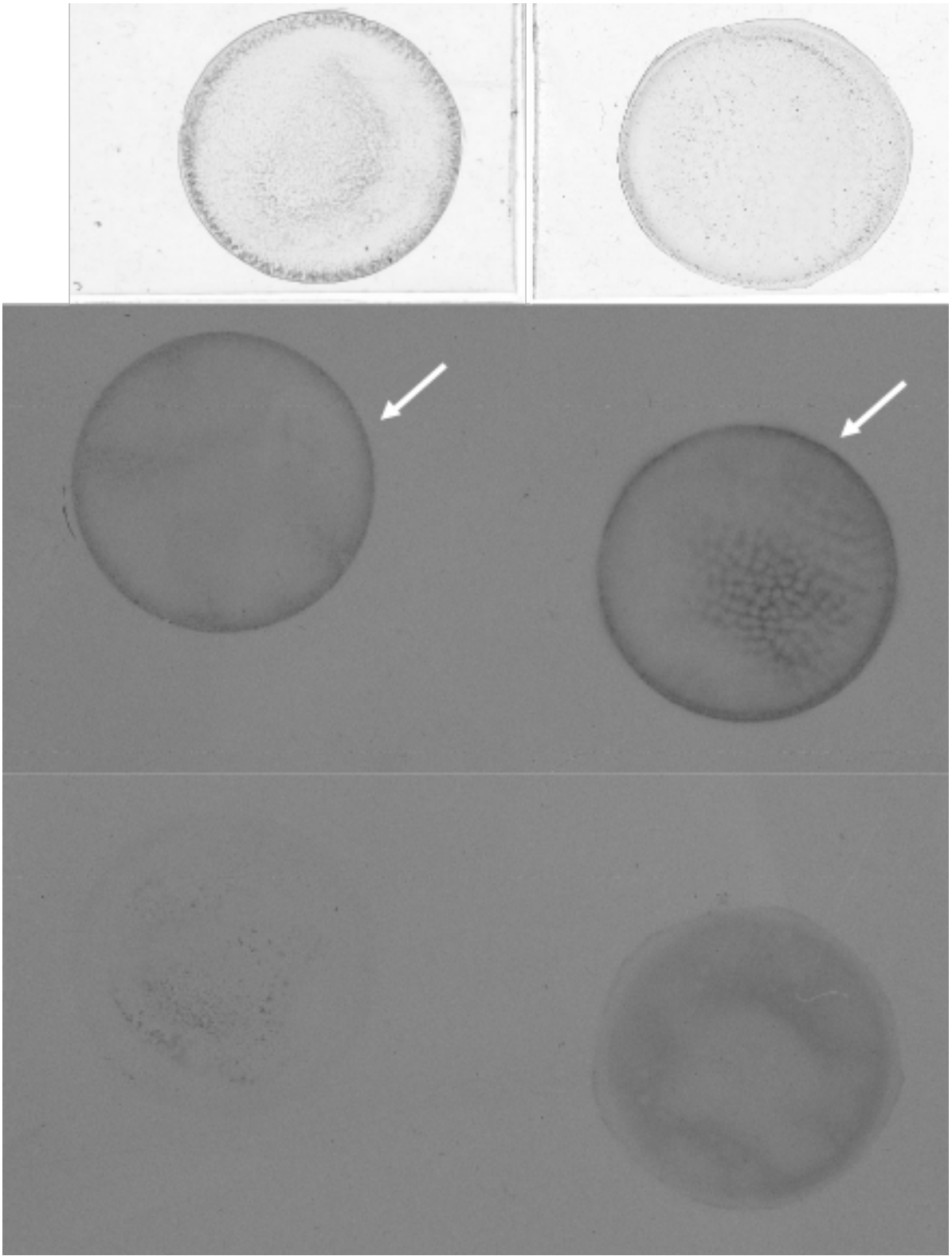


Рисунок Е.2 — Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин и ТАН-О в соотношении 1:1 (слева), ТАН-О-олеиламин и [^{3}H]ТАН-О в соотношении 1:1 (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%.

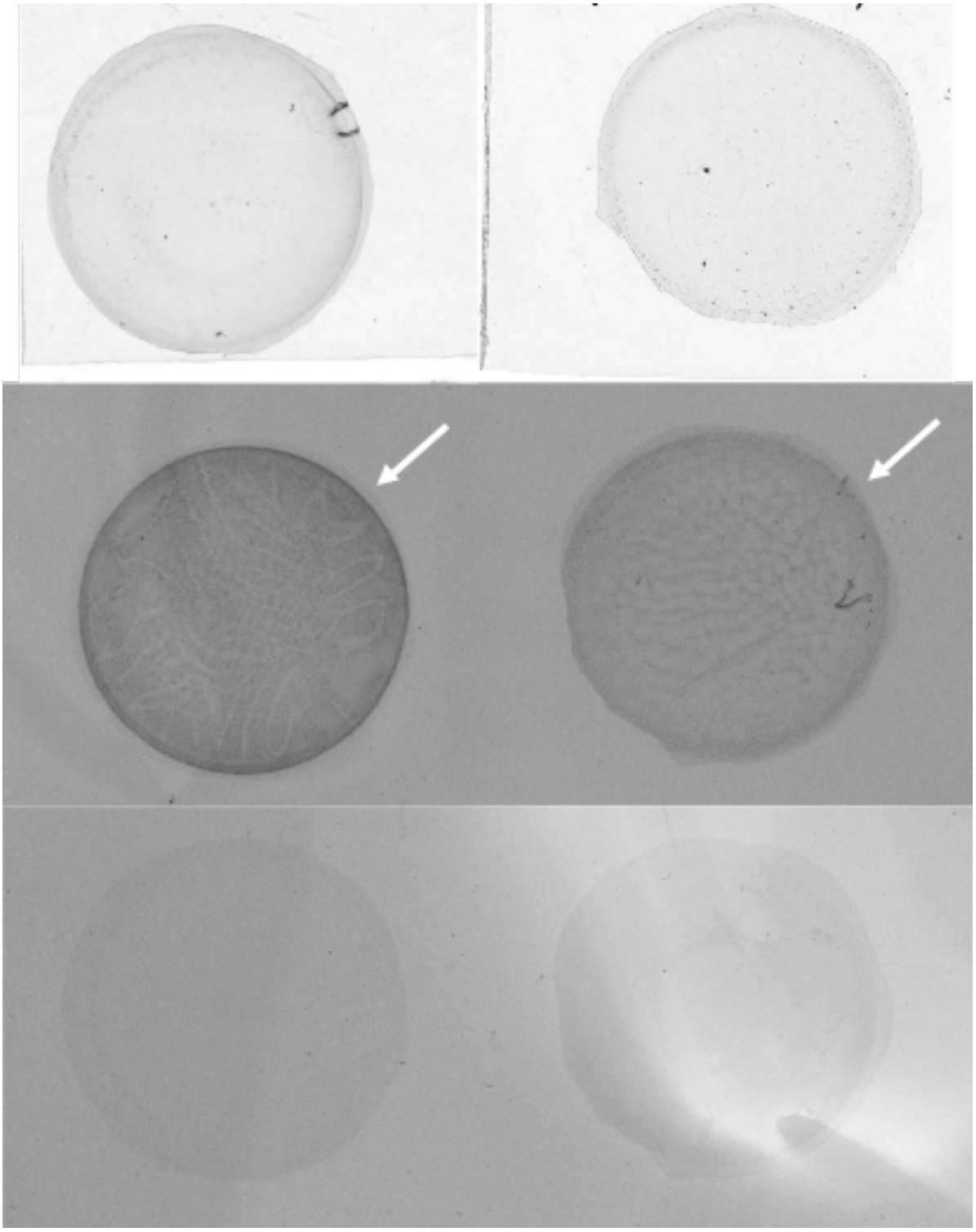


Рисунок Е.3 — Фотографии (первый ряд) и авторадиограммы композитных пленок, содержащих [^{3}H]ТАН-О-олеиламин и ТАН-О в соотношении 1:4 (слева), ТАН-О-олеиламин и [^{3}H]ТАН-О в соотношении 1:4 (справа). Стрелками показана сторона пленки, контактирующая с чашкой. Общее содержание ДН в пленке 1%.