НАНОСИСТЕМЫ: ФИЗИКА, ХИМИЯ, МАТЕМАТИКА, 2013, 4 (1), С. 83–89

УДК 546.655.4-31

СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЗОЛЕЙ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ЦИТРАТ-ИОНОМ

Т. О. Шекунова[1], Д. О. Гиль[1], О. С. Иванова[2], В. К. Иванов[1,2], Ю. Д. Третьяков[1]

[1]Факультет наук о материалах, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва, Россия

taisia.shekunova@yandex.ru, gildima2@gmail.com, runetta05@mail.ru, van@igic.ras.ru

PACS 82.70.Dd, 87.85.Rs

Диоксид церия — уникальный материал, обладающий значительным потенциалом применения в области биологии и медицины. Подавляющее большинство существующих на сегодняшний день методов синтеза приводит к получению диоксида церия в форме нанодисперсных порошков. Вместе с тем, такие порошки малопригодны для применения в составе лекарственных препаратов, поскольку их точная дозировка практически невозможна. В настоящей работе предложена простая методика синтеза стабильных водных золей диоксида церия и проведено исследование влияния концентрации и мольного соотношения исходных реагентов на размеры частиц диоксида церия. Проанализирована токсичность полученных золей диоксида церия с использованием биолюминесцентных микроорганизмов *Vibrio fischeri* и *Escherichia Coli*. Проведены сравнительные исследования фотокаталитической активности золей диоксида церия.

Ключевые слова: Диоксид церия, коллоидные растворы, биологическая и фотокаталитическая активность.

1. Введение

Диоксид церия и материалы на его основе находят широкое применение в промышленности, в том числе в производстве топливных элементов [1], сенсоров [2], трехмаршрутных катализаторов [3] и т.д. В последнее десятилетие CeO_2 привлекает внимание исследователей в качестве неорганического антиоксиданта, способного эффективно защищать живые системы от окислительного стресса [4]. В частности, ранее нами было показано, что нанодисперсный диоксид церия, вследствие низкой фотокаталитической активности и ярко выраженных антиоксидантных свойств способен выступать в качестве основного компонента солнцезащитной косметики [5]. Для медико-биологических применений требуются препараты диоксида церия в форме, удобной для дозирования, в качестве которых могут выступать агрегативно-устойчивые золи CeO_2, стабилизированные биосовместимыми лигандами [6]. В настоящей работе предложена простая методика синтеза стабильных водных золей диоксида церия и исследовано влияние концентрации и мольного соотношения исходных реагентов на размеры частиц CeO_2. С использованием биолюминесцентных микроорганизмов *Vibrio fischeri* и *Escherichia Coli* показано, что полученные золи являются нетоксичными. Проведены сравнительные исследования фотокаталитической активности золей CeO_2.

2. Экспериментальная часть

2.1. Синтез золей диоксида церия

В качестве исходных использовали смешанные растворы $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (х.ч.) и лимонной кислоты (х.ч.). Концентрация растворов по церию составляла 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 М, молярные соотношения $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ и лимонной кислоты — 1:1, 1:2, 1:4, 2:1. Для синтеза золей указанные растворы добавляли при постоянном перемешивании в 100 мл 3М раствора аммиака (ч.) и выдерживали в течении 3 ч.

2.2. Методы физико-химического анализа

Полученные золи CeO_2 были проанализированы методами УФ-видимой спектроскопии, рентгенофазового анализа (РФА), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и динамического светорассеяния (ДСР). Спектры оптического поглощения регистрировали с использованием спектрометра OceanOptics QE-65000 в диапазоне длин волн от 280 до 900 нм. Перед съемкой образцы разбавляли дистиллированной водой. Регистрацию спектров для каждого золя проводили в течение суток, начиная с момента синтеза. РФА твердофазных образцов проводили на дифрактометре Rigaku D/MAX 2500 (CuK_λ-излучение) при скорости вращения гониометра $2°2\theta$/мин. Идентификацию дифракционных максимумов осуществляли с использованием банка данных JCPDS. Микроструктуру образцов изучали методом ПЭМ на электронном микроскопе Leo912 AB Omega при ускоряющем напряжении 100 кВ. Перед съемкой образцы помещали на покрытые полимерной пленкой медные сетки диаметром 3,05 мм. Изображения в просвечивающем режиме получали при увеличениях до 500000×, при получении изображений электронной дифракции применяли ограничивающую диафрагму диаметром 0,4 мкм. Анализ распределения частиц по размерам в золях диоксида церия проводили методом ДСР на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS.

2.3. Исследование токсичности золей CeO_2 с использованием бактерий Vibrio fischeri

Токсичность золей диоксида церия по отношению к биолюминесцентным бактериям *Vibrio fischeri* оценивали по интенсивности люминесценции (I) последних с использованием люминометра Kikkoman Lumitester. Для проведения экспериментов использовали два золя, синтезированные по указанной выше методике, из растворов с концентрацией Ce^{3+} 0,025 и 0,1 М и молярным соотношением церия к лимонной кислоте, равным 1:1. Перед проведением измерений золи осаждали при подкислении до pH$\sim$2, промывали и редиспергировали в дистиллированной воде, доводя до pH=7. Затем добавляли к золям рассчитанное количество NaCl таким образом, чтобы массовое содержание NaCl составило 2%. После этого каждый золь разводили в два, четыре или восемь раз. Таким образом, итоговые концентрации диоксида церия в растворах составили $6{,}3 \cdot 10^{-4}$, $1{,}3 \cdot 10^{-3}$, $2{,}5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$ для первого золя, и $2{,}5 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$ 0,01 и 0,02 М для второго. Параллельно проводили регидратацию лиофилизированных бактерий *Vibrio fischeri* 2% раствором NaCl при +4 °С в течение 30 мин и далее при +15 °С в течение того же времени. Контрольный образец представлял собой 2% раствор NaCl. Интенсивность биолюминесценции измеряли сразу после приготовления образцов и далее через каждые 20 мин в течение 2–2,5 ч. Продолжительность каждого измерения составляла 10 сек. Дополнительно была изучена токсичность цитрата аммония с использованием той же методики. Концентрация лимонной кислоты в растворах составляла 0,1; 0,05; 0,025 и $1{,}3 \cdot 10^{-2}$ М.

2.4. Исследование токсичности золей CeO_2 с использованием бактерий Escherichia Coli

Дополнительные исследования токсичности золей CeO_2 были проведены с использованием бактерий генно-инженерного штамма *Escherichia Coli* TG1 (сенсор Эколюм-9), биолюминесценция которых вызвана клонированным полным lux-опероном. Регидратацию лиофилизированных бактерий проводили дистиллированной водой в течение 30 мин при +7 °C и далее в течение такого же времени при комнатной температуре. Золи CeO_2 предварительно очищали по описанной выше методике. Анализируемые образцы готовили непосредственно в кварцевых кюветах добавлением к 1 мл полученных золей 50 мкл бактерий, контрольные — добавлением к 1 мл дистиллированной воды 50 мкл бактерий. Анализ каждого образца проводили трижды с последующим усреднением результатов. Интенсивность биолюминесценции измеряли сразу после приготовления образцов и далее через каждые 15–30 мин в течение 5–6 ч. Продолжительность каждого измерения составляла 10 с. Дополнительно анализировали токсичность цитрата аммония (концентрация 0,09 М).

2.5. Анализ фотокаталитической активности золей CeO_2

Для анализа фотокаталитической активности золей диоксида церия была выбрана модельная реакция фотодеградации красителя кристаллического фиолетового в водной среде. Выбор этого красителя обусловлен, прежде всего, наличием интенсивных полос поглощения в видимой области, а также его неустойчивостью при облучении белым светом. Исследование ФКА CeO_2 проводили в три этапа:

1. *Подготовка образцов.* Аликвоту промытого и редиспергированного золя диоксида церия, синтезированного из 0,1 М раствора $Ce(NO_3)_3$ и 0,1 М раствора $C_6H_8O_7$, (pH=7) (1 мл) помещали в кюветный отсек спектрофотометра. Кюветный отсек термостатировали при температуре проведения эксперимента (37 °C). Аналогичные измерения проводили с использованием золей, разбавленных в 4 и 10 раз.
2. *Адсорбция красителя на поверхности фотокатализатора.* После установления постоянной температуры к золю диоксида церия добавляли 200 мкл водного раствора кристаллического фиолетового (концентрация раствора 400 мг/л). Полученный раствор интенсивно перемешивали в темноте в течение 2 ч для установления равновесия адсорбции-десорбции.
3. *Измерение фотокаталитической активности.* После установления равновесия адсорбции–десорбции раствор облучали с помощью ксеноновой лампы Ocean Optics HPX-2000 (35 Вт). Непосредственно в ходе облучения раствора проводили спектрофотометрический анализ с использованием спектрофотометра Ocean Optics QE65000. Измерения проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,99 см, в интервале 200–900 нм с последующим усреднением результатов. Концентрацию красителя рассчитывали по величине оптической плотности в максимуме поглощения (λ=589 нм) с учетом положения базовой линии при λ=702 нм.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Физико-химические свойства синтезированных образцов

Согласно данным УФ-видимой спектроскопии, непосредственно при добавлении смешанного раствора нитрата церия (III) и лимонной кислоты к раствору аммиака происходит образование CeO_2, о чем свидетельствует появление полосы поглощения, край которой располагается при $\sim$400 нм. Интенсивность поглощения по мере протекания процесса увеличивается вследствие увеличения концентрации и размеров наночастиц диоксида церия в золе. Полученные нами результаты свидетельствует о том, что в выбранных условиях формирование фазы CeO_2 полностью завершается через 1,5–2 ч. Ширина запрещенной зоны (Eg) для полученных в итоге золей составляет 3,4–3,5 эВ, что заметно превосходит величину для крупнокристаллического CeO_2 ($\sim$3,2 эВ) и свидетельствует о малом размере частиц CeO_2. Ширина запрещенной зоны CeO_2 была повторно измерена спустя месяц; ее неизменность свидетельствует о стабильности полученных золей. По данным рентгенофазового анализа, все синтезированные образцы представляют собой однофазный диоксид церия со структурой флюорита. Размеры областей когерентного рассеяния (ОКР), рассчитанные из уширения дифракционного максимума (111) лежат в пределах 2,8–3,5 нм. Данные просвечивающей электронной микроскопии хорошо согласуются с данными РФА. Согласно полученным результатам, синтезированные золи состоят из частиц CeO_2 размером 2,0–3,6 нм, имеющих форму, близкую к изотропной (рис. 1).

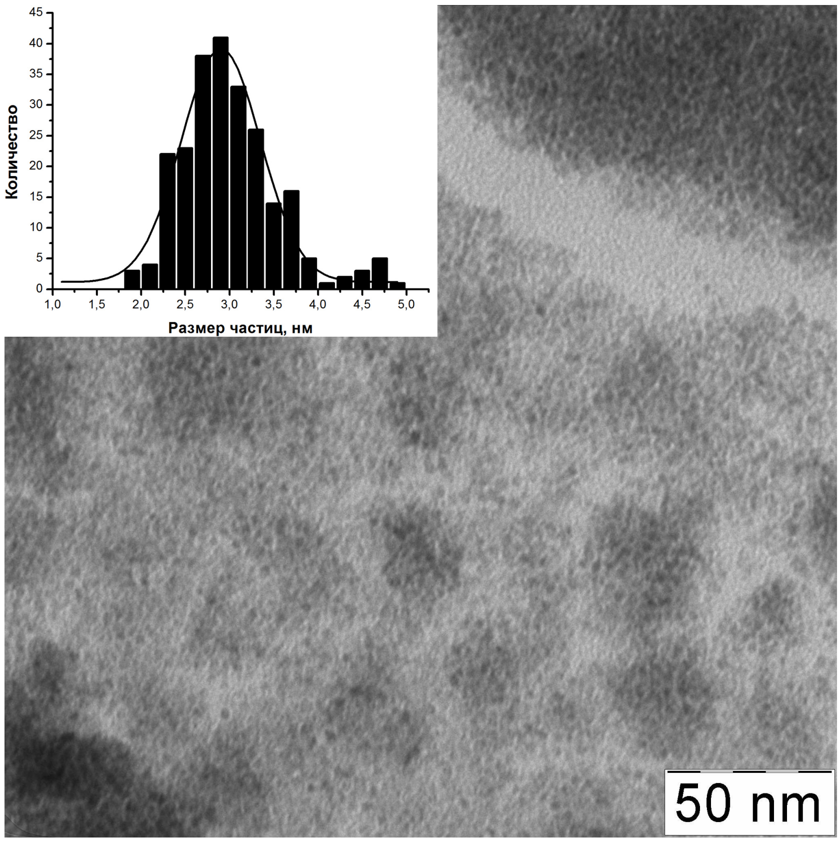

Рис. 1. Микрофотография наночастиц золя CeO_2, синтезированного из 0,1 М раствора $Ce(NO_3)_3$ и 0,1 М раствора $C_6H_8O_7$, и их распределение по размерам

Для всех образцов были построены диаграммы распределения частиц по размерам. При их сравнительном анализе было показано, что увеличение концентрации лимонной кислоты не приводит к существенным изменениям размеров частиц и вида кривой распределения.

Данные, полученные методом динамического светорассеяния, свидетельствуют о том, что гидродинамические диаметры частиц диоксида для различных образцов составляют интервал от 3,0 до 6,7 нм. Относительно небольшие величины гидродинамических диаметров в целом свидетельствуют о слабой агрегированности наночастиц диоксида церия. Установлено, что при увеличении мольного соотношения $Ce(NO_3)_3/C_6H_8O_7$ (1:1, 1:2, 1:4) происходит уменьшение размера частиц CeO_2. Кроме того, из данных ДСР можно сделать вывод о том, что при постоянном мольном соотношении исходных реагентов увеличение концентраций нитрата церия (III) и лимонной кислоты также приводит к уменьшению размера частиц.

3.2. Биологическая активность золей CeO_2

В экспериментах, проведенных с использованием бактерий *Vibrio fischeri*, было выявлено, что интенсивность люминесценции данного биосенсора в растворе NaCl (2%) через 20 мин после начала измерений составляет не более 60–70% от начального значения, что обусловлено естественным ингибированием ферментативной активности бактерий. При контакте бактерий с золями диоксида церия, стабилизированными цитрат-ионом, не происходит дополнительного снижения их ферментативной активности; напротив, интенсивность биолюминесценции *Vibrio fischeri* в присутствии CeO_2 возрастает. Также было показано, что цитрат-ионы сами по себе снижают интенсивность биолюминесценции этих бактерий (см. рис. 2).

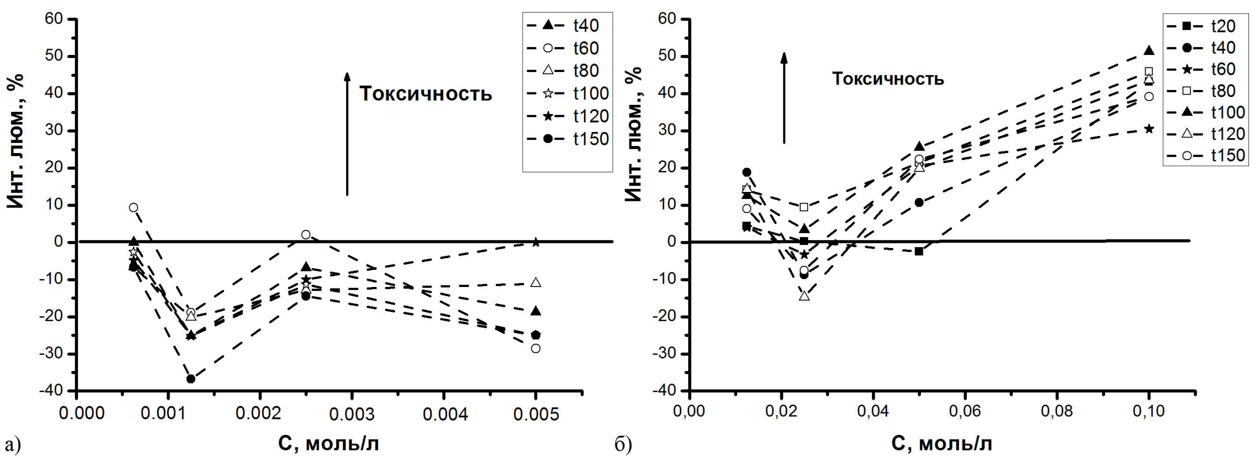

Рис. 2. Интенсивность люминесценции бактерий *Vibrio fischeri* в присутствии а) золя CeO_2, синтезированного из 0,025 М раствора $Ce(NO_3)_3$ и 0,025 М раствора $C_6H_8O_7$; б) 0,1 М раствора цитрата аммония

В опытах с бактериями *Escherichia Coli* было показано, что интенсивность их биолюминесценции в дистиллированной воде снижается в соответствии с экспоненциальным законом. В свою очередь, интенсивность люминесценции бактерий *Escherichia Coli* в золях CeO_2, синтезированных из растворов $Ce(NO_3)_3$ (0,025 и 0,1 М) и лимонной кислоты (0,025 и 0,1 М) соответственно, приблизительно в 2 раза выше чем в дистиллированной воде. Следует отметить, что интенсивность люминесценции бактерий *Escherichia Coli* в золе с концентрацией 0,005 М несколько выше, чем в золе с концентрацией 0,02 М (см. рис. 3).

Дополнительно было показано, что интенсивность биолюминесценции *Escherichia Coli* в растворе цитрата аммония в первые 2,5–3 ч значительно ниже, чем в дистиллированной воде.

3.3. Фотокаталитическая активность золей CeO_2

При исследовании закономерностей фотодеградации кристаллического фиолетового в присутствии золей диоксида церия различной концентрации (0,02; 0,005; 0,002 М)

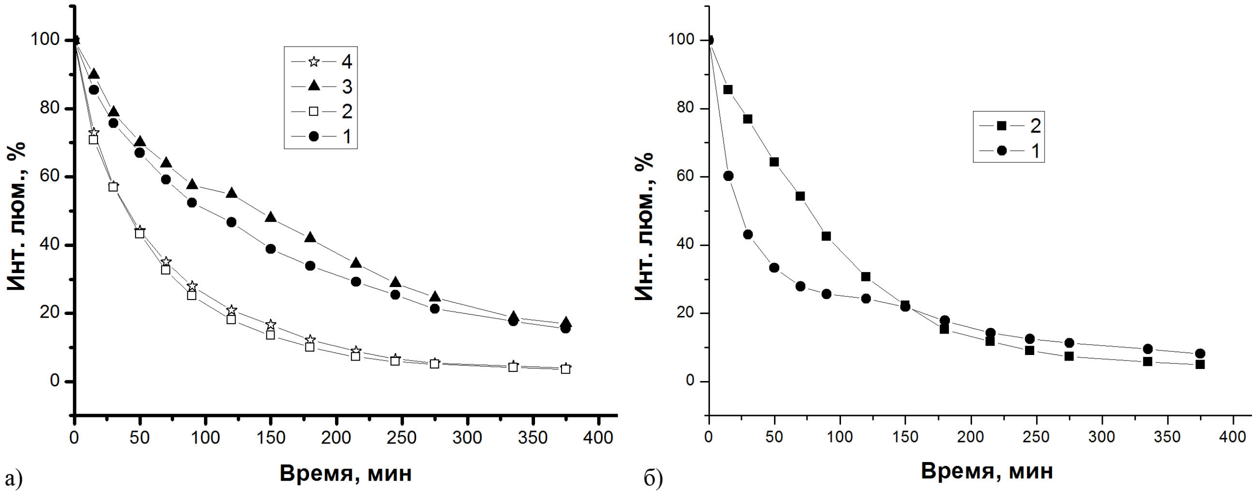

Рис. 3. Интенсивность люминесценции бактерий *Escherichia Coli* в присутствии а) золей CeO_2 с концентрациями 1 — 0,02 М (2 — контроль) и 3 — 0,005 М (4 — контроль); б) 1 — раствора цитрата аммония (2 — контроль)

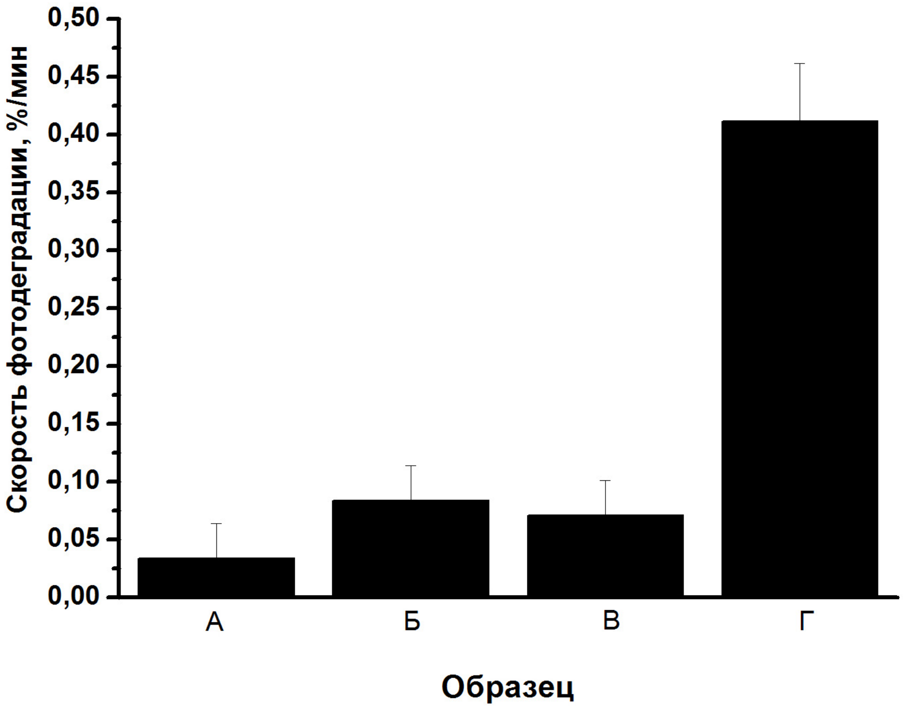

Рис. 4. Зависимость скорости реакции фотодеградации кристаллического фиолетового в цитратном золе диоксида церия (0,02 М) от степени его предварительного разбавления. А — неразбавленный золь (0,02 М); Б — золь, разбавленный в 4 раза (0,005 М); В — золь, разбавленный в 10 раз (0,002 М); Г — образец сравнения (Evonik Aeroxide TiO2 P25)

было установлено, что скорость фотодеструкции красителя в золях CeO_2 достаточно мала (0,03–0,08 %/мин), что увеличивает погрешность их определения. Можно констатировать, что скорость реакции фотодеградации кристаллического фиолетового в золях диоксида церия с различной концентрацией (0,002; 0,005; 0,02 М) примерно на порядок меньше, чем в присутствии контрольного образца TiO_2 (см. рис. 4).

4. Выводы

В данной статье предложен простой метод синтеза золей диоксида церия, стабилизированных цитратом аммония, с контролируемым размером частиц. Установлено, что золи диоксида церия не обладают токсичностью по отношению к бактериям *Vibrio fisceri* и *Escherichia Coli.* Показано, что золи диоксида церия обладают крайне незначительной фотокаталитической активностью по сравнению с TiO_2, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных компонентов солнцезащитной косметики.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ фундаментальных исследований Президиума РАН и РФФИ (11-02-01103).

Литература

[1] Killbourn B.T. Cerium: a guide to its role in chemical technology. — NY: Molycorp, 1992.

[2] Mihaiu S., Marta L., Zaharescu M. SnO_2 and CeO_2-doped SnO_2 materials obtained by sol-gel alkoxide route // J. Eur. Ceram. Soc. — 2007. — V. 27, No. 2–3. — P. 551–555.

[3] Антонова А.А., Жилина О.В., и др. Синтез и некоторые свойства гидрозолей диоксида церия // Коллоидный журнал. — 2001. — Т. 63, № 6. — С. 728–734.

[4] Иванов В.К., Щербаков А.Б., Усатенко А.В. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия // Успехи химии. — 2009. — Т. 78, № 9. — С. 924–937.

[5] Zholobak N.M., Ivanov V.K., et al. UV-shielding property, photocatalytic activity and photocytotoxicity of ceria colloid solutions // J. Photochem. Photobiol. B. — 2011. — V. 102. — P. 32–38.

[6] Иванов В.К., Полежаева О.С., и др. Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // Журн. неорган. химии. — 2010. — V. 55, No. 3. — P. 368–373.

SYNTHESIS, BIOACTIVITY AND PHOTOCATALYTIC ACTIVITY OF CITRATE-STABILIZED CERIA SOLS

T. O. Shekunova[1], D. O. Gil[1], O. S. Ivanova[2], V. K. Ivanov[1,2], Yu.D. Tretyakov[1]

[1]Department of Materials Science, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
[2]N. S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Cerium dioxide is a unique material which is promising for biomedical applications. The vast majority of currently existing methods of synthesis results in CeO_2 formation in the form of nanopowders. However such powders are useless as biomedical preparations because their exact dosage is nearly impossible. In this paper, we have offered a facile method of ceria stable sols synthesis and investigated the effect of varying concentrations and molar ratio of initial reagents on the CeO_2 particle size. The toxicity of ceria sols has been analyzed using *Vibrio fischeri* and *Escherichia Coli* bioluminescent microorganisms. Comparative studies of photocatalytic activity of ceria sols has been also performed.

Keywords: Cerium dioxide, sols, biological activity, photocatalytic activity.