

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи

Цюпка Дарья Владиславовна

**Тушение люминесценции квантовых точек
митоксантроном:
закономерности и аналитическое применение**

1.4.2. Аналитическая химия

1.4.4. Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Горячева Ирина Юрьевна

Саратов 2026

Работа выполнена на кафедре общей и неорганической химии
Института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Квантовые точки: синтез и люминесцентные свойства	12
1.1.1 Классификация квантовых точек по архитектуре и химическому составу	13
1.1.2 Тройные квантовые точки AgInS	14
1.1.3 Сплавные квантовые точки CdZnSeS	17
1.2 Модификация поверхности квантовых точек	18
1.3 Тушение люминесценции	20
1.3.1 Механизмы тушения люминесценции в присутствии тушителя	22
1.3.2 Применение квантовых точек для определения аналитов на основе тушения люминесценции	33
1.4 Характеристика митоксантрона как объекта анализа	36
1.4.1 Спектральные характеристики митоксантрона: поглощение и люминесценция	37
1.4.2 Взаимодействие митоксантрона с биологическими макромолекулами	41
1.4.3 Методы определения митоксантрона	42
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	53
2.1 Реагенты и материалы	53
2.2 Оборудование	53
2.3 Методики проведения экспериментов	54
ГЛАВА 3. Исследование влияния состава и размера квантовых точек на тушение люминесценции при определении митоксантрона	64
3.1 Характеризация квантовых точек и митоксантрона	65
3.1.1 Свойства квантовых точек AgInS/ZnS	65
3.1.2 Свойства квантовых точек CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS	67
3.1.3 Свойства митоксантрона	68
3.2 Тушение люминесценции квантовых точек в стационарном режиме	69
3.3 Тушение люминесценции квантовых точек во время-разрешенном режиме	72
3.4 Связывание квантовых точек с митоксантроном	75
3.5 Влияние матричного компонента на тушение люминесценции квантовых точек	83
ГЛАВА 4. Исследование влияния поверхностных лигандов на тушение люминесценции квантовых точек при определении митоксантрона	88
4.1 Характеризация квантовых точек CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами	89
4.2 Тушение люминесценции квантовых точек в присутствии митоксантрона в воде	91
4.2.1 Тушение люминесценции квантовых точек в стационарном режиме	91

4.2.2 Тушение люминесценции квантовых точек во время-разрешенном режиме.....	92
4.3 Тушение люминесценции квантовых точек в присутствии митоксантрона в плазме крови	95
4.3.1 Тушение люминесценции квантовых точек в стационарном режиме	95
4.3.2 Тушение люминесценции квантовых точек во время-разрешенном режиме.....	97
ГЛАВА 5. Оценка аналитических характеристик и практическое применение люминесцентной методики определения митоксантрона	102
5.1 Аналитические характеристики методики	103
5.2 Определение митоксантрона в образцах плазмы крови человека	106
5.3 Оценка цитотоксичности квантовых точек	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	113

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ-УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием

ДГЛК — дигидролипоевая кислота

КВ — квантовый выход

КТ — квантовые точки

МИТ — митоксантрон

МПК — меркаптопропионовая кислота

ОК — олеиновая кислота

ПКО — предел количественного определения

ПО — предел обнаружения

ППЭ — поверхностный перенос энергии

ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

ТГК — тиогликолевая кислота

ФПЭ — фотоиндуцированный перенос электрона

ФРПЭ — Ферстеровский резонансный перенос энергии

ФСБ — фосфатно-солевой буфер

ЧСА — человеческий сывороточный альбумин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Аналитические решения, основанные на явлении тушения люминесценции, представляют собой мощный инструмент современной аналитической химии. Их ключевые преимущества — высокая чувствительность, обусловленная регистрацией изменения сигнала на фоне низкого шума, экспрессность и простота технической реализации. Это открывает перспективы для определения широкого круга соединений, особенно в системах с предсказуемой матрицей, где влияние конкурентных процессов тушения может быть учтено или исключено.

Существенного повышения эффективности методик люминесцентного детектирования удастся достичь за счет использования полупроводниковых нанокристаллов — квантовых точек (КТ). КТ обладают комплексом фотофизических свойств, по многим параметрам превосходящих характеристики традиционных органических люминофоров. Широкополосное поглощение, узкое симметричное испускание, исключительная фотостабильность и высокий квантовый выход (КВ) люминесценции позволяют значительно повысить чувствительность, воспроизводимость и надежность анализа на основе тушения люминесценции.

Практическая значимость разработки таких высокочувствительных методик ярко проявляется в задаче определения различных классов соединений. Митоксантрон (МИТ) — синтетический цитостатический препарат из группы антрациклиновых антибиотиков, разработанный как аналог доксорубина со схожим механизмом действия, но потенциально меньшей кардиотоксичностью. Однако, как и многие цитостатики, МИТ вызывает серьезные побочные эффекты из-за воздействия на здоровые клетки и вариабельности фармакокинетики у разных пациентов. Высокая стоимость и трудоемкость хроматографии — «золотого стандарта» — ограничивают ее применение для персонализации терапии. Это создает потребность в альтернативных методах, одним из которых может стать подход на основе тушения люминесценции КТ.

Таким образом, проведение систематического исследования, направленного на установление механизма тушения люминесценции КТ под действием МИТ, является актуальной междисциплинарной задачей. Полученные фундаментальные знания о природе и закономерностях данного взаимодействия станут основой для целенаправленной разработки селективной и чувствительной аналитической методики, применимой в реальных условиях. Решение этой задачи позволит не только углубить фундаментальные знания о механизмах взаимодействия «наноматериал-лекарство» на стыке физической и аналитической химии, но и создать практический инструмент для определения МИТ в биологических средах с высокой чувствительностью и небольшим временем анализа.

Цель диссертационной работы состояла в выявлении закономерностей тушения люминесценции квантовых точек (КТ) митоксантроном (МИТ) и разработка способа его определения в плазме крови человека. Для достижения поставленной цели решены следующие **задачи**:

— Установить количественные характеристики и закономерности тушения люминесценции КТ (тройные AgInS/ZnS , сплавные CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами) в присутствии МИТ путем изучения кинетики в стационарном и время-разрешенном режимах;

— Исследовать влияние химической природы поверхностного лиганда КТ CdZnSeS/ZnS (тиогликолевая (ТГК), меркаптопропионовая (МПК) и дигидролипоевая (ДГЛК) кислоты) на эффективность тушения люминесценции в присутствии МИТ в водной среде и плазме крови;

— Сравнить количественные характеристики тушения люминесценции различных типов КТ в присутствии МИТ и определить наиболее перспективные КТ для последующего применения в анализе;

— Разработать и апробировать методику определения МИТ в образцах плазмы крови, валидировать методику высокоэффективной жидкостной хроматографией с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ).

Методы исследования. Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс физико-химических и биологических методов исследования:

люминесцентную спектроскопию (стационарную и время-разрешенную), абсорбционную спектрофотометрию, метод динамического и электрофоретического рассеяния света, ВЭЖХ-УФ для валидации методики на реальных образцах, цитотоксический анализ для оценки биобезопасности наночастиц, а также другие методы, например, просвечивающую электронную (ПЭМ) и оптическую микроскопию.

Научная новизна исследования состоит в следующем:

— Проведено сравнительное исследование механизма тушения люминесценции КТ (тройных AgInS/ZnS , сплавных CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами) в присутствии МИТ. Установлены количественные характеристики взаимодействия (константы связывания, тушения), выявлены ключевые закономерности влияния химического состава ядра и природы лиганда на эффективность тушения; оценены вклады статического и динамического тушения;

— Изучено влияние биологической матрицы (плазмы крови человека) на процесс тушения люминесценции КТ МИТ. Установлен характер и степень матричных эффектов, разработаны подходы к их учету и нивелированию, что позволило обеспечить определение МИТ без трудоемкой пробоподготовки;

— Установлена корреляция «структура-свойство» для КТ различного химического состава, что позволяет целенаправленно выбирать и проектировать наноматериалы для создания методик определения других биологически активных молекул.

Практическая значимость работы:

— Разработана и валидирована люминесцентная методика определения МИТ в плазме крови человека с высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью на основе тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS , стабилизированных ДГЛК; показана сопоставимость результатов с референтным методом ВЭЖХ-УФ;

— Продемонстрирована возможность прямого определения МИТ в сложной биологической матрице (плазме крови человека) с минимальной пробоподготовкой,

что упрощает и ускоряет процедуру анализа по сравнению с хроматографическими методами;

— Оценена цитотоксичность КТ и продемонстрирована возможность их безопасного применения в качестве аналитических реагентов в клинической лабораторной диагностике, что является необходимым этапом для дальнейшего внедрения разработанного метода в практику;

— Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике для мониторинга концентрации МИТ в крови пациентов, получающих химиотерапию, а также в научных исследованиях для изучения взаимодействия лекарственных препаратов с наноматериалами.

На защиту автор выносит:

I. Результаты сравнительного исследования тушения люминесценции КТ (AgInS/ZnS и CdZnSeS , CdZnSeS/ZnS) МИТ, установленные количественные характеристики их взаимодействия (константы связывания, тушения) и предложенную схему взаимодействия КТ и МИТ.

II. Критерии выбора перспективных КТ для определения МИТ на основе влияния химической природы поверхностного лиганда (МПК, ДГЛК, ТКК) КТ CdZnSeS/ZnS на эффективность тушения их люминесценции МИТ, а также результаты оценки влияния плазмы крови на аналитический сигнал.

III. Разработанную и валидированную методику определения МИТ в плазме крови человека на основе тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS с поверхностным лигандом ДГЛК, аналитические характеристики и результаты апробации на реальных образцах и сравнения с референтным методом ВЭЖХ-УФ, подтверждающие применимость методики.

Личный вклад соискателя заключается в: постановке основных целей и задач исследования; планировании и непосредственном проведении экспериментов, включая получение, обработку и интерпретацию спектроскопических данных (стационарная и время-разрешенная люминесценция, УФ-видимая спектроскопия); построении графических зависимостей (Штерна-Фольмера и др.), расчете констант связывания и тушения; обработке кинетических

данных; изучении взаимодействия КТ и МИТ в модельных средах и плазме крови; оценке цитотоксичности; разработке и валидации люминесцентной методики определения МИТ; статистической обработке аналитических данных; обобщении и анализе всех полученных результатов, формулировании выводов; представлении результатов на всероссийских и международных конференциях; написании текста диссертации и подготовке научных публикаций по теме работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ в изданиях, входящих в перечень ВАК, библиографические базы данных Web of Science и Scopus, ряд материалов конференций.

Достоверность полученных результатов подтверждается применением комплекса современных физико-химических и аналитических методов исследования, соответствием между полученными результатами, а также отсутствием противоречий с литературными данными, апробацией полученных данных на всероссийских и международных конференциях, публикацией основных положений диссертационного исследования в профильных высокорейтинговых реферируемых журналах.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования были доложены на всероссийских и международных конференциях: Saratov Fall Meeting-23,25: «International Symposium Optics and Biophotonics» (Россия, Саратов, 2023 и 2025); Всероссийская конференция с международным участием «Биохимия человека 2024» (Россия, Москва, 2024); VII Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Россия, Краснодар, 2025); Ежегодная Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2025» (Россия, Саратов, 2025).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения (3 главы), заключения и списка литературных источников. В тексте содержатся таблицы, схемы, диаграммы и графические

иллюстрации. Работа представлена на 136 страницах, включает 33 рисунка и 9 таблиц.

Финансовая поддержка осуществлялась в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований «Углеродные наночастицы и материалы на их основе» (№ 16–13–10195), «Разработка методов определения концентрации цитостатических препаратов в биологических жидкостях и системах контролируемого высвобождения» (№ 21–73–10046), «Аналитические люминесцентные методы для отслеживания релиза инкапсулированного доксорубина» (№ 23–13–00380), и стипендии Президента Российской Федерации для аспирантов и адъютантов (SPN.2024.01080).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Квантовые точки: синтез и люминесцентные свойства

Полупроводниковые квантовые точки (КТ) представляют собой нанокристаллы полупроводников, в которых носители заряда (электроны и дырки) ограничены в пространстве по трем измерениям. Ключевым параметром, определяющим возникновение квантово-размерных эффектов, является физический размер нанокристалла, который должен быть меньше радиуса экситона Бора для объемного полупроводника. Это пространственное ограничение приводит к квантованию энергетических уровней экситона, что кардинально меняет электронную структуру материала. Типичный размер КТ лежит в диапазоне 2–10 нм, что соответствует содержанию от 10^3 до 10^5 атомов в одной частице [1].

Квантово-размерные эффекты играют детерминирующую роль в формировании уникальных оптических и электронных свойств КТ. В отличие от объемных полупроводников, имеющих непрерывные зоны энергетических уровней, пространственное ограничение приводит к дискретизации энергетических уровней носителей заряда по аналогии с частицей в потенциальной яме. Квантово-размерные эффекты проявляются в ряде ключевых особенностей, определяющих уникальные свойства КТ. Уменьшение размера нанокристалла приводит к увеличению ширины запрещенной зоны (ΔE_g), что позволяет точно регулировать положение максимума люминесценции в широком спектральном диапазоне от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области — исключительно за счет контроля размеров нанокристалла при фиксированном химическом составе [2]. Пространственное ограничение носителей заряда приводит к дискретизации энергетических уровней, что обуславливает узкие и симметричные полосы люминесценции. КТ характеризуются чрезвычайно высокими значениями коэффициентов молярной экстинкции (порядка 10^5 – $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), обеспечивающими высокую эффективность поглощения света [3]. КТ демонстрируют высокие КВ люминесценции и устойчивость к фотодеградациии по сравнению с молекулярными флуорофорами [4].

Благодаря сочетанию регулируемых оптических характеристик, высокой фотостабильности и способности к эффективному поглощению света, КТ нашли применение в различных областях науки и технологий: в оптоэлектронных устройствах, фотовольтаике и биомедицинской визуализации [5]. Особый интерес КТ представляют для разработки высокочувствительных методов, основанных на люминесцентном детектировании, что определяет перспективность их использования в аналитической химии.

1.1.1 Классификация квантовых точек по архитектуре и химическому составу

Химический состав и внутренняя архитектура (гетероструктура) нанокристалла служат основой для классификации коллоидных КТ, поскольку именно эти параметры детерминируют их оптические характеристики и, как следствие, потенциал для использования в практических приложениях [6,7].

По химическому составу выделяют следующие группы КТ:

Бинарные: полупроводники, состоящие из двух элементов. Классическими примерами являются CdSe, CdS, CdTe, PbS, ZnSe. Бинарные КТ демонстрируют выраженные квантово-размерные эффекты, при отсутствии внешних оболочек широкозонных полупроводников они часто имеют низкий КВ из-за высокой плотности поверхностных дефектов, выступающих в роли центров безызлучательной рекомбинации [8].

Тройные и четверные (сплавные): более сложные системы, представляющие собой твердые растворы на основе трех или более элементов. В сплавных нанокристаллах атомы различных компонентов распределены по всему объему, что позволяет гибко управлять шириной запрещенной зоны не только размером, но и составом, стехиометрией [9].

Тип I–III–VI₂: КТ на основе AgInS₂, CuInS₂, ZnCuInS. Их люминесценция преимущественно обусловлена рекомбинацией через внутрizaпрещенные дефектные уровни.

Тип $A_2B_xC_{1-x}$ (катионные сплавы): $Cd_xZn_{1-x}Se$, $ZnCdS$. Позволяют плавно регулировать положение максимума испускания за счет варьирования соотношения катионов.

Тип AB_xC_{1-x} (анионные сплавы): $CdSe_xS_{1-x}$. Позволяют тонко настраивать свойства за счет изменения соотношения анионов.

Четверные сплавы (катионно-анионные): наиболее сложные системы, такие как $Cd_xZn_{1-x}Se_yS_{1-y}$, которые предоставляют максимальную степень свободы для точной настройки оптических свойств за счет независимого варьирования как катионного, так и анионного составов.

По внутренней архитектуре КТ различают:

Простые ядра: Нанокристаллы без оболочки (например, $CdSe$). Характеризуются высокой чувствительностью к окружающей среде и, как правило, низкими КВ.

Гетероструктуры «ядро-оболочка»: Архитектура, при которой ядро из одного полупроводника окружено оболочкой из другого с большей шириной запрещенной зоны (например, $CdSe/ZnS$). Оболочка эффективно пассивирует поверхностные дефекты ядра, локализуя носители заряда в его объеме, что приводит к повышению КВ (до 80–90%) и значительному увеличению фотостабильности [10].

Сплавные ядра с оболочкой: наиболее совершенная и современная архитектура, которая сочетает преимущества сплавного ядра и пассивирующей оболочки.

1.1.2 Тройные квантовые точки $AgInS$

КТ на основе тройных соединений I–III–VI групп представляют собой значительный интерес как перспективные бескадмиевые люминофоры с регулируемыми оптическими свойствами. К данному классу относятся нанокристаллы на основе $CuInS_2$, $CuInSe_2$, $AgInS_2$, $AgInSe_2$, а также их катионно-замещенные аналоги типа $(Cu,Zn)InS_2$, $(Ag,Zn)InS_2$ и четверные системы $CuInZnS$, $AgInZnS$ [11,12].

Общей особенностью данной группы КТ является прямой характер запрещенной зоны и механизм люминесценции, преимущественно обусловленный рекомбинацией через внутривозбужденные дефектные уровни (донорно-акцепторные пары), что проявляется в широких спектрах испускания со значительным стоксовым сдвигом (~100–200 нм). Состав и стехиометрия данных материалов позволяют гибко управлять их электронной структурой и оптическими характеристиками.

Методы синтеза данных КТ включают несколько основных подходов, среди которых следует выделить высокотемпературный органометаллический синтез в органических растворителях. Альтернативой выступает коллоидный синтез в водной среде с применением тиолсодержащих стабилизаторов (например, ТГК, МПК, меркаптоянтарная кислота). Также применяются методы гидротермального и сольвотермального синтеза, осуществляемые в автоклавах при повышенных температуре и давлении, и, так называемые, «зеленые» методы синтеза с использованием биогенных восстановителей, например, экстрактов растений [11,13,14].

Перспективность водного синтеза тройных КТ обусловлена рядом факторов. Важнейшим преимуществом является биосовместимость получаемых нанокристаллов, которые демонстрируют стабильность в физиологических средах. Существенную роль играет простая модификация поверхности биолигандами, что открывает возможности для создания гибридных материалов. Немаловажное значение имеет экологическая безопасность процесса, исключающая использование токсичных органических растворителей.

КТ на основе AgInS_2 выделяются рядом особенностей в группе тройных КТ. В отличие от CuInS_2 , характеризующихся большим содержанием дефектов и сложностью контроля стехиометрии, КТ AgInS_2 демонстрируют более воспроизводимый синтез и лучшую контролируемость оптических свойств.

Покрытие КТ AgInS_2 оболочкой из ZnS обеспечивает эффективную пассивацию поверхностных дефектов ядра, что приводит к значительному повышению КВ люминесценции (до 40–70%). Одновременно происходит

стабилизация ядра от окислительной деградации, существенно увеличивающая стабильность нанокристаллов. Кроме того, наличие оболочки создает возможность дальнейшей модификации поверхности КТ. Формирование гетероструктуры типа «ядро-оболочка» также способствует увеличению фотостабильности нанокристаллов и улучшает их коллоидную стабильность в водных растворах [15,16].

Синтез $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ в водной среде в присутствии тиолсодержащих стабилизаторов (МПК, 1-тиоглицерин) позволяет получать высокостабильные коллоидные растворы. Сочетание регулируемых спектральных характеристик, высокого КВ люминесценции и отсутствие токсичных элементов определяет перспективность применения данных наноматериалов в качестве чувствительных элементов в люминесцентных методах анализа.

Важным аспектом синтеза тройных КТ является возможность их последующего фракционирования. Благодаря особенностям кинетики роста и рекристаллизации Оствальда, продукты синтеза часто представляют собой полихромную смесь нанокристаллов с различным размером и, соответственно, различным положением максимума люминесценции. Для разделения данной смеси на монодисперсные фракции успешно применяется метод ступенчатого осаждения (разделение по размерам с использованием неполярных растворителей, например, метанола или пропанола-1). Данный подход позволяет из одной реакционной смеси выделить несколько фракций КТ с узким размерным распределением (полуширина пика испускания $\sim 40\text{--}60$ нм) и ступенчато сдвинутыми максимумами люминесценции в диапазоне от 500 до 750 нм [15,17,18].

Возможность получения фракций с различными оптическими характеристиками особенно перспективна для решения ряда научных и практических задач. Данный подход открывает возможность мультиплексного анализа, позволяя разрабатывать аналитические системы для одновременного определения нескольких аналитов благодаря использованию КТ с различными, но перекрывающимися спектрами возбуждения и хорошо разделяемыми максимумами люминесценции. Кроме того, получаемые фракции предоставляют

уникальные возможности для фундаментальных исследований влияния размера нанокристаллов и поверхностных дефектов на люминесцентные свойства, что способствует углублению понимания физико-химических процессов в наноструктурированных материалах [18]. Способность разделения на фракции также важна для оптимизации условий проведения аналитических измерений и разработки новых методик количественного определения различных соединений.

1.1.3 Сплавные квантовые точки CdZnSeS

Четверные сплавные КТ CdZnSeS и их гетероструктуры CdZnSeS/ZnS представляют собой следующее поколение люминофоров с расширенными возможностями управления оптическими свойствами. Их разработка стала логическим продолжением исследований тройных КТ, направленным на достижение еще более точного контроля над электронной структурой.

Данные нанокристаллы характеризуются четырехкомпонентным составом, позволяющим независимо варьировать как катионную ($\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$), так и анионную ($\text{Se}^{2-}/\text{S}^{2-}$) подрешетки. Эта особенность предоставляет возможности для тонкой настройки ширины запрещенной зоны и абсолютных положений энергетических уровней без существенного изменения размера частиц. По сравнению с классическими бинарными КТ (CdSe) и даже тройными аналогами (CdZnSe), четверные системы демонстрируют расширенный диапазон спектральной регуляции (500–650 нм), лучшую воспроизводимость оптических характеристик, повышенную термическую и фотохимическую стабильность, меньшую чувствительность к изменению параметров синтеза.

Ключевым отличием от классических методов синтеза является использование единого прекурсорного раствора, содержащего все четыре компонента в строго контролируемых соотношениях, что позволяет осуществлять рост гомогенного сплавного нанокристалла вместо сегрегированных структур. Формирование гетероструктуры CdZnSeS/ZnS усиливает преимущества данных материалов: оболочка ZnS эффективно пассивирует поверхностные дефекты, повышая КВ люминесценции до 80–90%, и обеспечивает дополнительную защиту ядра от окислительной деградации.

Области применения четверных КТ CdZnSeS/ZnS охватывают биомедицину, оптоэлектронику, фотовольтаику и квантовые технологии. В биомедицине они служат высокочувствительными люминесцентными маркерами для диагностики и визуализации. В оптоэлектронике используются при создании светодиодов и дисплеев с улучшенной цветопередачей. Для фотовольтаики важны расширенным поглощением солнечного спектра, повышающим эффективность элементов. В квантовых технологиях применяются как источники одиночных фотонов и высокочувствительные сенсоры. Современные исследования подтверждают растущий интерес к практическому использованию этих материалов. [19–22].

1.2 Модификация поверхности квантовых точек

Для использования КТ в аналитических системах и других биомедицинских применений необходима высокая коллоидная стабильность в водных средах. Несмотря на существование методов синтеза в водной фазе [23,24], высокотемпературный металлоорганический синтез остается предпочтительным благодаря способности обеспечивать узкое размерное распределение частиц и воспроизводимые оптические свойства. Процессы сплавления полупроводников и отжига для устранения дефектов кристаллической структуры требуют температур выше точки кипения воды, что ограничивает применение гидротермальных методов.

Модификация поверхности КТ позволяет не только адаптировать их к различным средам, но и придавать специфические химические свойства за счет введения функциональных групп. Этот процесс также влияет на фотоэлектрические характеристики наночастиц. Таким образом, целенаправленная модификация поверхности представляет собой ключевой инструмент для управления коллоидной стабильностью и оптическими свойствами КТ, расширяя возможности их практического применения.

Методы модификации поверхности КТ в основном систематизируются на четыре группы:

— Инкапсуляция — заключение КТ в защитную оболочку из полимерных или неорганических материалов, обеспечивающую стабильность и биосовместимость [25].

— Силанизация — обработка поверхности силановыми реагентами с образованием ковалентных связей, придающих КТ специфические химические свойства [26].

— Покрытие амфифильными молекулами — использование поверхностно-активных веществ, обеспечивающих стабилизацию КТ в различных средах [27].

— Лигандный обмен — замена исходных лигандов на функциональные молекулы, придающие КТ целевые свойства для конкретных применений.

Модификация поверхности КТ методом лигандного обмена

Наиболее распространенным методом модификации поверхности КТ является лигандный обмен, основанный на замене исходных гидрофобных лигандов (например, олеиновой кислоты (ОК)) бифункциональными молекулами. Эти молекулы содержат группу с высоким сродством к поверхности наночастицы и полярную группу, обеспечивающую коллоидную стабильность в водных средах [28,29].

Лиганды классифицируют на три типа по механизму связывания: L-тип — нейтральные двухэлектронные доноры (нейтральные основания Льюиса: амины, фосфины); X-тип — доноры одного электрона, но действуют как анионы (карбоксилаты, тиолаты); Z-тип — электрон-акцепторные соединения (нейтральные кислоты Льюиса: $\text{Pb}(\text{OOCR})_2$, CdCl_2) [30,31].

Процедуры лигандного обмена включают гомогенные и гетерогенные подходы. Гомогенные методы проводят в одном растворителе с последующим осаждением продукта, гетерогенные — с переносом частиц между фазами растворителей [29].

Поверхностные лиганды существенно влияют на электронную структуру КТ. Прочное ковалентное связывание смещает энергии орбиталей, устраняя состояния ловушки в запрещенной зоне и повышая люминесценцию. Однако некоторые

лиганды (например, алкантиолы) могут создавать новые ловушки, снижая КВ люминесценции [28,32].

Наибольшее применение находят тиольные лиганды благодаря высокому сродству к поверхности полупроводников и вариативности модификации [33,34,12]. Высокое сродство тиольной группы ($-SH$) к поверхности полупроводниковых материалов обусловлено образованием прочных координационных связей с атомами металлов ядра. Это обеспечивает стабильное связывание лигандов на поверхности нанокристаллов.

Ключевые преимущества тиольных лигандов: универсальность применения для различных типов КТ (CdSe, CdTe, PbS, InP); простота проведения реакций лигандного обмена; возможность тонкой настройки гидрофильности за счет варьирования длины алкильной цепи; наличие функциональных групп для последующей конъюгации.

Типичные представители включают меркаптопропионовую кислоту, тиогликолевую кислоту, дигидролипоевую кислоту и цистеамин. Бидентатные лиганды, такие как дигидролипоевая кислота, демонстрируют повышенную стабильность за счет хелатного эффекта [33,35].

Тиольные лиганды эффективно пассивируют поверхностные дефекты, повышая КВ люминесценции. Однако некоторые тиолы могут выступать в качестве ловушек для дырок, что требует тщательного подбора лиганда для конкретного типа КТ.

Модифицированные тиолами КТ успешно применяются в различных областях: аналитических применениях, медицинской диагностике, катализе и фотонике, оптоэлектронных устройствах [36–39]. Универсальность и простота модификации делают тиольные лиганды перспективным инструментом для создания наноматериалов с заданными свойствами.

1.3 Тушение люминесценции

Тушение люминесценции представляет собой физико-химический процесс уменьшения КВ или интенсивности люминесценции под влиянием различных

факторов, таких как концентрация люминофора, температура и присутствие посторонних веществ (тушителей) [40].

Концентрационное тушение проявляется при достижении определенной «пороговой» концентрации люминофора (c_0) и описывается экспоненциальной зависимостью:

$$\Phi = \Phi_0 e^{-\vartheta(c-c_0)} \quad (1)$$

где Φ и Φ_0 — КВ люминесценции при концентрации c и при бесконечном разбавлении, соответственно, ϑ — константа специфичная для вещества, c_0 — пороговая концентрация начала тушения.

Снижение КВ при увеличении концентрации обусловлено двумя основными процессами: ассоциацией молекул люминофора с образованием нелюминесцирующих агрегатов (димеров, олигомеров), миграцией энергии возбуждения от излучающих молекул к невозбужденным молекулам или образовавшимся агрегатам.

Таким образом, концентрационное тушение может возникать как вследствие прямой потери энергии при столкновениях возбужденных молекул с агрегатами, так и вследствие резонансного переноса энергии на безызлучательные центры [41].

Температурное тушение.

Повышение температуры приводит к снижению КВ как флуоресценции, так и фосфоресценции. Данное явление обусловлено усилением безызлучательной дезактивации возбужденных состояний вследствие увеличения частоты соударений между молекулами, которая в растворах прямо пропорциональна температуре. Обратный эффект наблюдается при охлаждении: выходы обоих типов люминесценции увеличиваются. В области комнатных температур уменьшение температуры на 1°C приводит к увеличению КВ флуоресценции на несколько процентов.

По мере охлаждения раствора рост КВ флуоресценции продолжается до достижения температурно-вязкостных условий, благоприятных для испускания квантов фосфоресценции. При дальнейшем снижении температуры КВ флуоресценции стабилизируется, тогда как выход фосфоресценции продолжает

возрастать. Суммарный выход люминесценции приближается к единице при охлаждении, когда безызлучательные процессы практически полностью подавлены [41].

Тушение посторонними веществами. Выход люминесценции может уменьшаться в присутствии посторонних веществ — тушителями.

1.3.1 Механизмы тушения люминесценции в присутствии тушителя

Люминесценция возникает, когда молекулы вещества поглощают энергию и переходят в возбужденное состояние, а затем излучают эту энергию в виде света при возвращении в основное состояние. Тушитель может вмешиваться в этот процесс, приводя к потере энергии без излучения света вследствие различных взаимодействий [40,42].

Эффект внутреннего фильтра

Эффект внутреннего фильтра относится к поглощению (или оптической дисперсии) света на длине волны возбуждения или испускания соединениями, присутствующими в растворе. Обычно оптика коммерческих флуориметров фокусирует возбуждающий свет и собирает излучение из центра кюветы. Следовательно, когда поглощение на длине волны возбуждения значительно, меньше света достигает центра образца, и, таким образом, люминесценция снижается, в то время как поглощение на длине волны испускания уменьшает количество испускаемого света, достигающего детектора. Это является проблемой, когда тушитель, поглощает на длинах волн возбуждения и/или испускания. Также необходимо корректировать любое разбавление люминофора при тушении. Из-за нелинейной природы эффекта внутреннего фильтра это может потребовать особого внимания. Если геометрия прибора такова, что собираемая интенсивность исходит точно из центра кюветы, то эффект внутреннего фильтра можно оценить по формуле:

$$I_{\text{изм.}} = I_{\text{пр.}} \cdot 10^{-\frac{A_{\text{возб.}} \cdot d_{\text{возб.}}}{2} - \frac{A_{\text{исп.}} \cdot d_{\text{исп.}}}{2}} \quad (2)$$

где $I_{\text{изм.}}$ — измеренная люминесценция, $I_{\text{пр.}}$ — правильная интенсивность люминесценции, которая была бы измерена при отсутствии эффектов внутреннего фильтра, $d_{\text{возб.}}$ и $d_{\text{исп.}}$ — длина пути кюветы в направлении возбуждения и

испускания (в см) соответственно, а $A_{\text{возб.}}$ и $A_{\text{исп.}}$ — измеренное изменение значения поглощения на длине волны возбуждения и испускания соответственно, вызванное добавлением тушителя (в кювете с длиной пути 1 см) [40].

Важно отметить, что уравнение 2 предполагает, что люминесценция исходит точно из середины кюветы. Это может быть справедливо для некоторых спектрометров, но, безусловно, не для всех. В статье Gu и Kenny [43] обсуждаются несколько методов коррекции и потенциально важные факторы, зависящие от прибора. Как обсуждалось в этой статье, отклонения, даже при использовании более продвинутых методов коррекции, будут возникать, в частности, при высоких значениях поглощения. Вместо того, чтобы корректировать эффект внутреннего фильтра, может быть более целесообразным минимизировать его простыми практическими соображениями, такими как уменьшение толщины кюветы или выбор длин волн возбуждения и испускания, минимизирующих поглощение тушителя. Однако это не всегда возможно на практике, и в таких случаях можно использовать метод коррекции, но с оговоркой, что он не обязательно полностью корректирует влияние эффекта внутреннего фильтра. В качестве альтернативы можно использовать более сложные подходы к коррекции [43,44].

Количественная оценка значимости увеличения поглощения имеет критическое значение при интерпретации данных тушения люминесценции. Как показано в работе [45], даже незначительное изменение оптической плотности на 0,03 приводит к статистически значимому снижению интенсивности люминесценции на 3%. Для систематической оценки влияния эффекта внутреннего фильтра было проведено математическое моделирование системы люминофор-тушитель при отсутствии специфического связывания. Результаты моделирования демонстрируют, что при достижении оптической плотности в диапазоне 0,1–4 на длине волны возбуждения наблюдается существенное снижение люминесценции. Важно отметить, что уже при минимальном увеличении поглощения до 0,1 регистрируется падение люминесцентного сигнала приблизительно на 10%, что подтверждает значимость эффекта внутреннего фильтра даже при незначительных изменениях оптических параметров системы [45].

Особую проблему представляет возможность ошибочной интерпретации данных. Яркой иллюстрацией данной проблемы является повторный анализ системы азулен-фуллерен, выполненный L. Stella и соавт. [46]. Показано, что заявленная константа связывания 76000 M^{-1} [47] фактически полностью обусловлена артефактами, связанными с направленной коррекцией на эффект внутреннего фильтра.

Анализ литературных данных свидетельствует, что во многих исследованиях [48,49] увеличение поглощения на рабочих длинах волн превышает 0,1, а в некоторых случаях достигает 1 [50]. Таким образом, эффект внутреннего фильтра представляет собой существенный источник систематической ошибки, который необходимо учитывать при интерпретации данных тушения люминесценции.

Важно отметить, что эффект внутреннего фильтра может быть вызван также непоглощающими лигандами, если они вызывают значительное рассеяние света, как в случае исследований взаимодействия белок-мембрана, в которых титрование проводится с использованием суспензии липосом. В этом случае коррекция с помощью уравнения 2 проблематична, и более целесообразны контрольные эксперименты [51–53].

Динамическое тушение

Динамическое тушение люминесценции (тушение при столкновениях) представляет собой физический процесс деактивации электронно-возбужденных молекул люминофора при их диффузионных соударениях с частицами тушителя в растворе. Данный механизм преобладает в жидкостях с низкой вязкостью, где вероятность столкновений между возбужденными молекулами и тушителями существенно возрастает. Процесс описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{I_0}{I} \left(\frac{\tau_0}{\tau} \right) = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3)$$

где I_0 (τ_0) и I (τ) — интенсивность люминесценции и среднее время жизни [с] в отсутствие и в присутствии тушителя, соответственно, $[Q]$ — концентрация тушителя [М], а K_{SV} — константа тушения Штерна–Фольмера [M^{-1}].

Если тушение происходит по динамическому механизму, K_{SV} определяется выражением:

$$K_{SV} = k_q \tau_0 \quad (4)$$

где k_q — бимолекулярная константа скорости тушения [$M^{-1} \cdot s^{-1}$] [40].

Механизм динамического тушения включает три последовательные стадии:

- фотофизическое возбуждение люминофора: $L + h\nu \rightarrow L^*$;
- диффузионное столкновение возбужденной молекулы с тушителем:
 $L^* + Q \rightarrow [L^* \cdots Q]$;
- последующую безызлучательную деактивацию комплекса с выделением тепловой энергии: $[L^* \cdots Q] \rightarrow L + Q + \text{тепло}$.

Температурная зависимость процесса характеризуется увеличением K_{SV} с ростом температуры, что обусловлено возрастанием скорости диффузии, увеличением частоты столкновений и снижением вязкости растворителя.

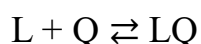
Ключевыми особенностями динамического тушения являются: пропорциональное уменьшение времени жизни возбужденного состояния, линейная зависимость в координатах Штерна-Фольмера, выраженная зависимость от вязкости растворителя и отсутствие значимых изменений в спектрах поглощения системы [40,54].

Изменение времени жизни люминесценции представляет собой наиболее достоверный критерий установления механизма тушения люминесценции, что обусловлено фундаментальными физическими принципами различных процессов тушения. Ключевое преимущество данного параметра заключается в его способности однозначно дифференцировать динамическое и статическое тушение. При динамическом тушении, происходящем через столкновения во время жизни возбужденного состояния, наблюдается характерное укорочение времени жизни ($\tau < \tau_0$), в то время как статическое тушение, связанное с образованием комплексов в основном состоянии, не влияет на время жизни оставшихся свободных молекул ($\tau = \tau_0$). Важнейшим преимуществом времени жизни как параметра является его независимость от различных артефактов измерения: в отличие от интенсивности, он не зависит от концентрации люминофора, не чувствителен к эффекту внутреннего фильтра и не подвержен влиянию фотодеградации и флуктуаций источника возбуждения [45].

Статическое тушение

Тушение люминесценции, обусловленное связыванием с тушителем, при котором образование стабильного комплекса между люминофором и тушителем приводит к эффективному подавлению люминесценции. Данное явление относится к категории статического тушения и принципиально отличается от динамического механизма, связанного с диффузионными столкновениями.

Физическая сущность процесса заключается в образовании комплекса в основном состоянии по схеме:



где L — люминофор, Q — тушитель, LQ — образующийся комплекс.

Описание статического тушения выражается фундаментальным уравнением Штерна-Фольмера (уравнение 3), где K_{SV} представляет константу статического тушения, количественно характеризующую сродство тушителя к люминофору. Особенностью данного типа тушения является неизменность времени жизни возбужденного состояния для свободных молекул люминофора, что служит важным критерием для идентификации механизма. Одновременно наблюдается изменение спектральных характеристик системы, проявляющееся в модификации спектров поглощения и/или испускания, что свидетельствует о образовании нового химического соединения.

Ключевыми отличительными признаками тушения через связывание являются наличие строгой стехиометрии в образовании комплекса, независимость процесса от вязкости растворителя и сохранение степени тушения при разбавлении системы. Для надежной идентификации данного механизма применяют комплекс методов, включающий сравнение времен жизни люминесценции, детальный анализ спектров поглощения, изучение температурной зависимости процесса и определение стехиометрии образующегося комплекса [40, 42,45].

Ферстеровский резонансный перенос энергии

Ферстеровский резонансный перенос энергии (ФРПЭ) представляет собой безызлучательный перенос энергии возбуждения от донора к акцептору посредством диполь-дипольного взаимодействия. Этот механизм тушения

люминесценции обладает рядом характерных особенностей, отличающих его от других видов тушения. Ключевым условием реализации ФРПЭ является наличие спектрального перекрытия между спектром испускания донора и спектром поглощения акцептора, что обеспечивает резонансный характер переноса энергии [55,56].

Эффективность ФРПЭ (E) описывается уравнением:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (5)$$

где r — расстояние между донором и акцептором, R_0 — характеристическое расстояние Ферстера, при котором эффективность переноса составляет 50%. Зависимость от шестой степени расстояния делает ФРПЭ исключительно чувствительным к изменению межмолекулярных расстояний в диапазоне 1–10 нм, что сравнимо с размерами большинства биологических макромолекул [55].

Кинетика процесса ФРПЭ характеризуется уменьшением времени жизни возбужденного состояния донора и соответствующим снижением интенсивности его люминесценции, при этом происходит увеличение интенсивности люминесценции акцептора (если акцептор является люминесцентным). Важной особенностью является отсутствие столкновений между донором и акцептором - перенос энергии происходит на расстоянии через пространство.

Отличительными признаками ФРПЭ являются: строгая зависимость эффективности переноса от расстояния, необходимость спектрального перекрытия, ориентационная зависимость (определяемая параметром ориентации дипольных моментов), уменьшение времени жизни донора и соответствие между степенью тушения донора и усилением акцептора.

Методы идентификации ФРПЭ включают: измерение времени жизни донора, анализ спектров испускания, определение анизотропии флуоресценции, измерение эффективности переноса при варьировании расстояния. В современных исследованиях широко применяются методы флуоресцентной микроскопии на основе времени жизни и одночастичного детектирования ФРПЭ [57].

Корректный анализ ФРПЭ требует соблюдения двух критических условий, часто не учитываемых на практике. Во-первых, ФРПЭ должен быть единственным механизмом тушения. Однако изменения микроокружения и прямое образование комплексов в основном состоянии могут вносить дополнительный вклад в тушение, что систематически игнорируется. Во-вторых, необходимо обеспечить полное насыщение системы, однако часто используемые концентрации компонентов близки или ниже константы диссоциации, что делает анализ некорректным из-за вклада негасящихся молекул[45].

Таким образом, интерпретация данных исключительно через ФРПЭ без контроля альтернативных механизмов тушения и условий насыщения приводит к существенным ошибкам в определении параметров переноса энергии.

Фотоиндуцированный перенос электрона

Фотоиндуцированный перенос электрона (ФПЭ) представляет собой механизм тушения люминесценции, при котором поглощение кванта света инициирует безызлучательный перенос электрона от возбужденного донора (люминофора) к акцептору (тушителю). Данный процесс приводит к образованию радикальных ионов или зарядово-разделенных состояний, не способных к люминесценции, что проявляется в значительном снижении интенсивности и времени жизни люминесценции [58–60].

Механизм:

1. Фотовозбуждение донора: $D + h\nu \rightarrow D^*$;
2. Перенос электрона на акцептор: $D^* + A \rightarrow D^+ + A^-$;
3. Тушение люминесценции: $D^+ + A^- \rightarrow$ нет излучения (безызлучательная рекомбинация);
4. Рекомбинация радикальных ионов:
 - С выделением тепла: $D^+ + A^- \rightarrow D + A + \text{тепло}$;
 - С образованием исходных молекул: $D^+ + A^- \rightarrow D + A$;
 - С образованием новых продуктов: $D^+ + A^- \rightarrow \text{продукты реакции}$

Кинетика процесса описывается уравнением Маркуса, где скорость переноса электрона (k_{ET}) зависит от электронной матричной связи (H_{DA}), реорганизационной

энергии (λ) и свободной энергии реакции (ΔG^0). Эффективность тушения определяется термодинамическими факторами (отрицательное значение ΔG^0), расстоянием между донором и акцептором (до 20 Å), их относительной ориентацией и полярностью растворителя, стабилизирующей зарядово-разделенное состояние [58].

Экспериментально ФПЭ идентифицируется по уменьшению интенсивности и времени жизни люминесценции, появлению характерных полос поглощения радикальных ионов, а также зависимости тушения от полярности среды. Интерпретация данных осложняется возможной конкуренцией с другими механизмами тушения (ФРПЭ, динамическое тушение), влиянием среды на стабильность радикальных ионов и сложностью точного предсказания параметров ΔG^0 и λ в многокомпонентных системах [60,61].

Обменный механизм Декстера

Обменный механизм Декстера представляет собой процесс безызлучательного переноса энергии, при котором происходит одновременный обмен электронами между донором и акцептором. Данный механизм требует прямого перекрытия волновых функций взаимодействующих частиц и реализуется при расстояниях 10–20 Å между донором и акцептором, что обусловлено необходимостью прямого перекрытия электронных орбиталей и соблюдения условий для спино-разрешенных переходов [62]. Кинетика процесса описывается уравнением:

$$k_{DET} = KJe^{-\frac{2R}{L}} \quad (6)$$

где K — константа, зависящая от орбитального перекрытия, J — интеграл спектрального перекрытия, R — расстояние между донором и акцептором, L — характеристическая длина.

Особенностями механизма являются возможность переноса на триплетные уровни, требование близкого расположения молекул и высокая чувствительность к спиновым состояниям.

Важным аспектом подтверждения является демонстрация экспоненциальной зависимости скорости переноса от расстояния (уравнение 6), что достигается

использованием модельных систем с жесткими молекулярными мостиками, фиксирующими расстояние между донором и акцептором. Этот механизм отличается от ФРПЭ отсутствием требования спектрального перекрытия и возможностью тушения триплетных состояний, что может быть подтверждено сравнением спектров возбуждения и методами электронной парамагнитной резонансной спектроскопии для детекции парамагнитных состояний [63].

Температурная зависимость процесса проявляется как в гомогенных растворах (где перенос диффузионно-контролируем), так и в иммобилизованных системах (где преобладает термоактивируемое туннелирование). Современное подтверждение включает квантово-химическое моделирование для расчета электронных матричных элементов и интегралов спектрального перекрытия [63,64].

Для однозначной идентификации механизма необходимо исключить альтернативные процессы: отсутствие изменений в спектрах поглощения свидетельствует против статического тушения, а отсутствие корреляции между спектром возбуждения акцептора и поглощения донора — против механизма ФРПЭ. Комплексный подход, сочетающий кинетические, спектральные и вычислительные методы, позволяет надежно установить преобладание обменного механизма Декстера в процессе тушения люминесценции.

Поверхностный перенос энергии

Поверхностный перенос энергии (ППЭ) представляет собой специализированный механизм тушения люминесценции, при котором эффективность переноса энергии определяется взаимодействием между дипольными моментами люминофора и поверхностными состояниями материала. В отличие от классического механизма ФРПЭ, ППЭ не требует спектрального перекрытия между донором и акцептором и демонстрирует более сильную зависимость от расстояния, описываемую степенной зависимостью $\sim 1/R^4$ [65].

Кинетика процесса характеризуется уравнением:

$$k_{\text{ППЭ}} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^4 \quad (7)$$

где R_0 — характеристическое расстояние для 50% эффективности переноса, R — расстояние до поверхности, а τ_D — время жизни донора. Ключевыми особенностями ППЭ являются выраженная зависимость от диэлектрических свойств поверхности, сильная ориентационная зависимость дипольных моментов и отсутствие требований к спектральному перекрытию, что отличает его от других механизмов тушения.

Экспериментальное исследование ППЭ включает прецизионные измерения времени жизни люминесценции вблизи поверхности, анализ зависимости эффективности тушения от расстояния, контроль диэлектрических свойств поверхности и изучение ориентационных эффектов. Теоретические модели описывают процесс в рамках приближения непрерывной среды с учетом диэлектрической неоднородности и морфологии поверхности [65–67].

Практическое применение ППЭ включает разработку высокочувствительных сенсорных систем, исследование поверхностных свойств материалов, молекулярную динамометрию и создание нанопотонных устройств. Важным аспектом является отличие ППЭ от других механизмов: меньшая дальность действия по сравнению с ФРПЭ, отсутствие переноса заряда в отличие от ФПЭ и более дальнотействующий характер по сравнению с механизмом Декстера [67].

Многообразие механизмов тушения люминесценции составляет теоретическую основу для понимания фотофизических процессов и разработки современных аналитических методов. Каждый механизм обладает характерными особенностями, определяющими его применение и методы идентификации. Важным аспектом является корректное различение этих механизмов на основе комплекса экспериментальных данных: измерения времени жизни возбужденного состояния, анализа температурных зависимостей, изучения кинетических параметров и спектральных характеристик.

Практическая значимость исследования механизмов тушения проявляется в их использовании для разработки высокочувствительных аналитических систем, создания инновационных фотонных материалов, изучения межмолекулярных взаимодействий и усовершенствования излучающих устройств. Глубокое

понимание данных процессов обеспечивает не только интерпретацию экспериментальных наблюдений, но и целенаправленное проектирование материалов с программируемыми характеристиками.

Важным аспектом при изучении тушения люминесценции является понимание того, что идеализированные модели механизмов тушения (ФРПЭ, динамическое, статическое и т.д.) преимущественно наблюдаются в строго контролируемых условиях для простых молекулярных систем. При переходе к сложным люминесцентным наноматериалам, таким как КТ, в большинстве случаев наблюдается совместное проявление нескольких механизмов тушения, причем их относительный вклад может существенно варьироваться в зависимости от экспериментальных условий [68].

Для КТ характерна сложная многокомпонентная природа тушения люминесценции, обусловленная поверхностной гетерогенностью, потенциальным наличием разнотипных центров безызлучательной рекомбинации, возможной конкуренцией процессов ФРПЭ и ФПЭ, влиянием диэлектрического окружения и межчастичных взаимодействий в коллоидных системах, а также зависимостью от химической функционализации поверхности и природы стабилизирующих лигандов.

В таких условиях обычно можно идентифицировать лишь доминирующий механизм тушения люминесценции или количественно оценить относительный вклад нескольких основных процессов. Для достоверной интерпретации данных необходимо применение комплекса экспериментальных методик, например, анализ кинетики затухания люминесценции, температурно-зависимые измерения, многопараметрический спектральный анализ и теоретическое моделирование методом молекулярной динамики с квантово-химическими расчетами.

Особую сложность представляет изучение тушения в реальных условиях, таких как биологические системы или сложные матрицы, где множественные факторы могут одновременно влиять на процессы деактивации возбужденного состояния.

1.3.2 Применение квантовых точек для определения аналитов на основе тушения люминесценции

Методы анализа, основанные на явлении тушения люминесценции, представляют собой мощный инструмент современной аналитической химии, обладающий рядом существенных преимуществ по сравнению с другими аналитическими подходами. Высокая чувствительность, достигаемая за счет регистрации изменений интенсивности испускания, селективность, обусловленная специфичностью взаимодействия люминофора с целевым аналитом, и простота реализации делают эти методы особенно перспективными для решения широкого круга аналитических задач.

КТ как люминесцентные материалы занимают особое место в разработке таких аналитических систем. Благодаря своим оптическим свойствам КТ превосходят традиционные органические люминофоры по основным аналитическим характеристикам. Использование КТ позволяет значительно повысить чувствительность анализа за счет увеличения сигнала и снижения фона, увеличить стабильность аналитических систем при длительных измерениях и многокомпонентной детекции.

Особую практическую значимость приобретают методы на основе тушения люминесценции КТ для анализа сложных объектов — биологических жидкостей, природных вод, пищевых продуктов, — где требуется высокая селективность и низкие пределы обнаружения (ПО) целевых соединений.

Явление тушения люминесценции КТ демонстрирует универсальность в отношении определения широкого спектра аналитов — от неорганических ионов металлов до сложных органических соединений, включая фармакологически активные вещества и компоненты нефтепродуктов. Возможность детектирования столь разнообразных по химической природе аналитов обусловлена вариабельностью ядер КТ и их модификации поверхности. Различные типы КТ обладают различными электронными и оптическими свойствами, определяющими их селективность к определенным классам соединений.

Ключевую роль в специфичности детектирования играет модификация поверхности нанокристаллов. Путем направленного модифицирования лигандами различной химической природы (тиолы, карбоновые кислоты, амины, биомолекулы) создаются условия для избирательного взаимодействия с целевыми аналитами.

Высокая чувствительность методик позволяет достигать ПО на уровне наномолей и даже пикомолей, что делает их особенно перспективными для аналитической химии и смежных областей.

Исследование взаимодействия ионов металлов с КТ берет начало в 1987 году, когда Henglein с соавторами [69] установили, что добавление ионов Cd^{2+} увеличивает эффективность люминесценции наночастиц CdS приблизительно на 50% в водно-основных растворах. Этот эффект был объяснен образованием пассивирующей оболочки $\text{Cd}(\text{OH})_2$ на поверхности ядра CdS , которая эффективно подавляла безызлучательную рекомбинацию носителей заряда. В последующих исследованиях аналогичные эффекты пассивации были продемонстрированы при добавлении ионов Zn^{2+} и Mn^{2+} к коллоидным растворам CdS и ZnS [70,71]. Группа Chen [72] показали, что последовательное добавление Zn^{2+} и Mn^{2+} приводит к усилению, а затем тушению люминесценции КТ ZnS легированных Mn . Эти эффекты были обусловлены устранением поверхностных дефектов (оборванных связей S^{2-}) и образованию пар Mn-Mn , способствующих миграции энергии на короткие расстояния.

Аналитический потенциал КТ для детекции ионов металлов был группами Chen and Rosenzweig [73]. В работах было показано, что КТ CdS , стабилизированные тиоглицерином, могут служить высокоселективными сенсорами для определения Cu^{2+} даже в присутствии ионов Zn^{2+} в водных растворах. Ключевой вклад работ заключался в установлении роли поверхностных лигандов в процессах селективного связывания ионов металлов. Было показано, что специфические лиганды не только стабилизируют КТ в растворе, но и избирательно взаимодействующих с целевыми ионами.

КТ находят широкое применение в детекции органических загрязнителей, включая пестициды и промышленные химикаты. КТ и иммунологические методы были объединены для обнаружения и количественного определения гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Фермент щелочная фосфатаза был конъюгирован с гербицидом, после чего следовало образование амидной связи между карбоксильной группой КТ CdTe, стабилизированных МПК и аминок группой фермента. Затем был выполнен количественный анализ на основе тушения люминесценции. Таким образом, удалось обнаружить гербицид в концентрациях до 250 пг/мл с линейным диапазоном концентраций 250–1000 пг/мл [74].

КТ CdSe/ZnS, стабилизированные МПК, электростатически конъюгированные с органофосфорной гидролазой, использовался для обнаружения параоксона с ПО 10^{-6} М. Авторы предполагают, что тушение люминесценции КТ связано с изменениями вторичной структуры фермента при связывании пестицида [75].

Чувствительность КТ к перекиси водорода (H_2O_2) стимулировала разработку универсальных люминесцентных подходов определения с использованием КТ, потенциально применимых к ряду оксидаз, которые биокатализируют образование H_2O_2 [76]. Ингибирование ацетилхолинэстеразы карбаматом неостигмином является примером такой системы. В этом гибридном методе ацетилхолинэстераза отвечает за гидролиз ацетилхолина до холина, а холиноксидаза впоследствии окисляет холин до бетаина с сопутствующим образованием H_2O_2 и тушением люминесценции КТ CdSe/ZnS. В присутствии ингибитора биокаталитический каскад прерывается, и люминесценция КТ не изменяется [76].

Прогресс в понимании поверхностной химии КТ способствовал разработке высокочувствительных методик для определения аналитов промышленного и военного назначения. Исследования продемонстрировали, что люминесценция КТ обратимо модулируется при взаимодействии с нитроароматическими соединениями и диаминами, что создало основу для создания новых аналитических платформ для определения этих классов соединений [77,78].

Инновационным подходом стала самосборка рекомбинантных антител к 2,4,6-тринитротолуолу на поверхности КТ через гистидиновые якоря, что позволило реализовать высокоселективное обнаружение данного взрывчатого вещества методом конкурентного иммуноанализа [79]. Систематические исследования тушения люминесценции КТ детергентами выявили ключевую роль поверхностного заряда в процессах тушения, которое объясняется через механизмы безызлучательной рекомбинации с участием глубоких ловушек, снижения подвижности дырок и стабилизации электронов в поверхностных состояниях [80,81]. Практическая значимость разработанных систем подтверждена успешным применением КТ CdTe, стабилизированных ТГК для определения катионных поверхностно-активных веществ в реальных образцах с демонстрацией высокой чувствительности и селективности [81].

1.4 Характеристика митоксантрона как объекта анализа

Митоксантрон (МИТ, $C_{22}H_{28}N_4O_6$, 1,4-дигидрокси-5,8-бис[2-(2-гидроксиэтиламино)этиламино]антрацен-9,10-дион) является синтетическим цитостатическим препаратом класса антрацендионов. Его молекулярная структура отличается от классических антрациклиновых антибиотиков (таких как доксорубицин, даунорубицин, идарубицин) отсутствием аминосахарного фрагмента и наличием двух основных боковых цепей этилендиаминового типа (рис. 1). МИТ был разработан в 1980-х годах как аналог доксорубицина в рамках исследований по поиску новых препаратов со схожим механизмом действия, но с меньшей кардиотоксичностью [82–84]. Многочисленные исследования показали, что МИТ является эффективной и лучше переносимой альтернативой другим антрациклинам при большинстве злокачественных новообразований, таких как рак молочной железы, рак печени или яичников, неходжкинская лимфома, острый нелимфобластный лейкоз и хронический миелогенный лейкоз при бластном кризе [84–87]. Кроме того, МИТ используется при лечении вторично-прогрессирующего или рецидивирующего рассеянного склероза для снижения неврологической инвалидности или частоты рецидивов [88–90].

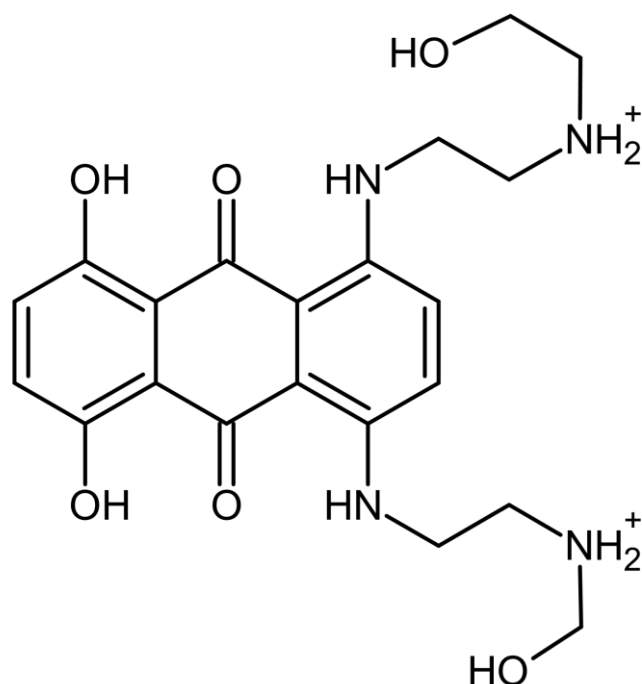


Рисунок 1. Структурная формула МИТ.

Ключевой особенностью МИТ, определяющей его оптические свойства и механизм действия, является его способность существовать в различных формах в зависимости от условий среды. Молекула сочетает в себе плоский ароматический хромофор антрахинона, ответственный за интенсивное поглощение в УФ- и видимой областях спектра, с основными и кислотными функциональными группами. Наличие двух сильноосновных третичных аминогрупп (расчетные значения $pK_a \sim 9-11$) и двух кислых фенольных гидроксильных групп ($pK_a \sim 6-8$) придает соединению амфотерный характер и способность к ступенчатому протонированию/депротонированию в зависимости от pH среды. Это свойство определяет существование МИТ в виде катионных, нейтральных или анионных форм в физиологическом диапазоне pH, что способствует множественным протонно-обменным реакциям и существенно влияет на его растворимость, липофильность и взаимодействие с биологическими макромолекулами.

1.4.1 Спектральные характеристики митоксантрона: поглощение и люминесценция

МИТ демонстрирует сложные и варьируемые спектральные свойства, которые зависят от его химической структуры, условий среды (pH, температура, микроокружение) и взаимодействия с различными соединениями. Эти

характеристики являются ключевыми для его аналитического определения, изучения механизмов действия и разработки терапевтических применений.

МИТ характеризуется сложными спектрами поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях, обусловленными π - π^* переходами в системе связей антрахинонового хромофора.

В водных растворах (нейтральный pH) в длинноволновой области спектра проявляет два характерных максимума поглощения: $\lambda_1 \sim 608\text{--}612$ нм ($\varepsilon \sim 3,5\text{--}4,5 \times 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) — димерная/агрегированная форма, $\lambda_2 \sim 658\text{--}662$ нм ($\varepsilon \sim 4,5\text{--}5,5 \times 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) — мономерная форма. Полоса поглощения при 660 нм относят к мономеру (М), а полосу при 610 нм — к димеру (Д). Полоса около 560 нм относят к образованию более сложных агрегатов, т.е. тримеров [91].

Концентрация. В растворах с высокой концентрацией МИТ наблюдается явление агрегации, приводящее к нелинейности зависимости оптической плотности от концентрации (отклонение от закона Бугера-Ламберта-Бера) и тушению люминесценции за счет эффекта внутреннего фильтра и образования нелюминесцирующих димеров.

При очень низких концентрациях ($< 6,58 \times 10^{-6}$ М) интенсивность обоих максимумов поглощения одинакова, но с ростом концентрации полоса при 610 нм становится более интенсивной, чем при 660 нм. При концентрациях МИТ в диапазоне $10^{-6}\text{--}10^{-5}$ М, преобладающими видами в растворе являются мономер и димер. При более высоких концентрациях наблюдается вклад тримеров более 10% (рис. 2).

pH среды. Изменение кислотности среды вызывает ступенчатое депротонирование функциональных групп молекулы. В сильнокислой среде (pH < 2) молекула полностью протонирована. При повышении pH последовательно происходит депротонирование фенольных гидроксильных групп ($pK_a \sim 6\text{--}8$) и аминогрупп боковых цепей ($pK_a \sim 9\text{--}11$), что сопровождается значительными батохромными сдвигами полос поглощения и изменениями спектров люминесценции [91].

Влияние pH на равновесие димеризации иллюстрируется спектрами на рисунке 2 и данными в таблице 1.

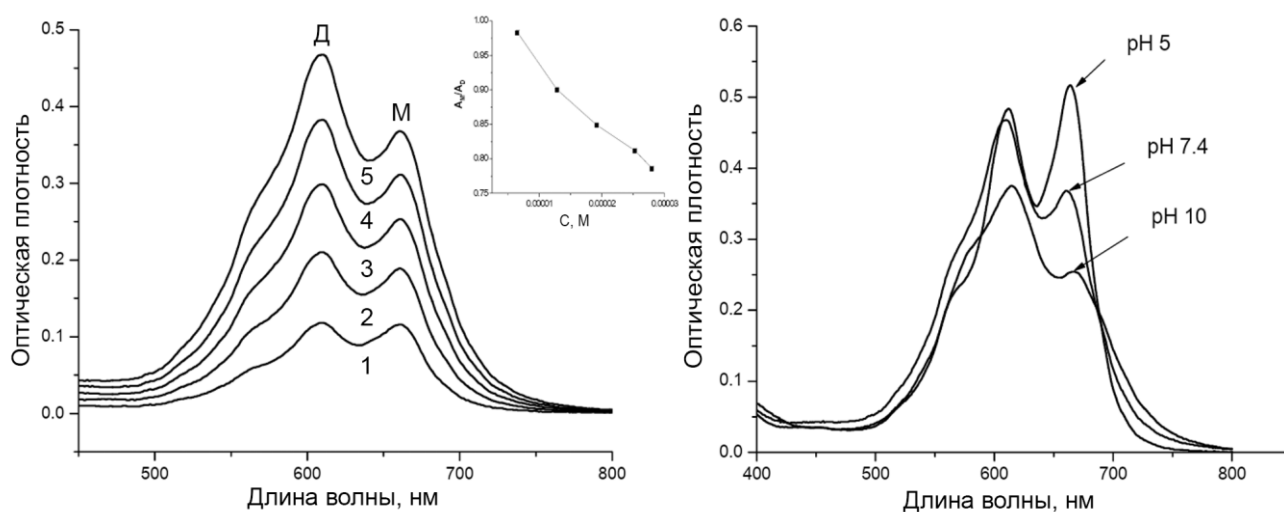


Рисунок 2. Спектры поглощения МИТ в ФСБ pH 7,4 в зависимости от концентрации: 1 – $6,58 \times 10^{-6}$, 2 – $1,29 \times 10^{-5}$, 3 – $1,92 \times 10^{-5}$, 4 – $2,53 \times 10^{-5}$, 5 – $2,80 \times 10^{-5}$ М; вставка – изменение соотношения A_M/A_D в зависимости от концентрации МИТ. (б) Спектры поглощения МИТ ($2,80 \times 10^{-5}$ М) при различных значениях pH [91].

Таблица 1. Константа димеризации (K_d), молярный коэффициент поглощения димера (ϵ_d), максимум поглощения димера и мономера (λ_d и λ_m) и их соотношение (A_M/A_D) для МИТ при различном pH [91].

	pH 5,0	pH 7,4	pH 10
K_d, M^{-1}	$(2,44 \pm 0,18) \times 10^4$	$(0,75 \pm 0,37) \times 10^5$	$(2,76 \pm 0,21) \times 10^5$
$\epsilon_d, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	14427 ± 190	7750 ± 550	608 ± 181
λ_d, nm	611	610	616
λ_m, nm	663	660	666
A_M/A_D	1,07	0,79	0,68

С ростом pH уменьшается оптическая плотность полосы мономера с изобестической точкой при 688 нм. При pH 10 максимумы поглощения смещаются в красную область, а соотношение A_M/A_D (табл. 1) уменьшается с 0,79 для МИТ ($2,80 \times 10^{-5}$ М) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7,4 до 0,68. Это указывает на преобладание процесса димеризации в щелочной среде. Димеризация оказалась обратимой и, вероятно, связана с депротонированием $-NH_2$ группы боковых цепей при основном pH. При pH 5 положение максимумов поглощения изменяется меньше, а соотношение A_M/A_D увеличивается с 0,79 в ФСБ до 1,07, что

свидетельствует о диссоциации димеров (табл. 1). С увеличением pH константа димеризации увеличивается, а молярный коэффициент поглощения димера уменьшается.

Температура. При комнатной температуре в водных растворах МИТ склонен к образованию агрегатов (димеров и высших агрегатов). При повышении температуры происходит диссоциация агрегатов, что приводит к увеличению соотношения оптических плотностей A_M/A_D , батохромному сдвигу полос поглощения и изменению интенсивности люминесценции. При температуре от 20°C до 60°C наблюдается обратимое разрушение агрегатов, что связано с ослаблением π - π стэкинга и гидрофобных взаимодействий. Эти изменения полностью обратимы при охлаждении, что указывает на термодинамическую равновесность процесса агрегации.

Микроокружение. Зависимость спектральных характеристик МИТ от микроокружения обусловлена высокой чувствительностью его электронной структуры к внешним условиям. Наблюдаются батохромные сдвиги полос поглощения на 20–30 нм при уменьшении полярности среды вследствие стабилизации возбужденного состояния, а также гипсохромные сдвиги в полярных протонных растворителях в результате сольватации функциональных групп. Интенсивность поглощения изменяется через гиперхромный эффект в гидрофобных микроокружениях и гипсохромный эффект для агрегированных форм [92].

При связывании, например, с ДНК или сывороточными альбуминами — молекула МИТ переходит из полярной водной среды в более гидрофобное окружение. Это вызывает смещение спектров, увеличение молярного коэффициента экстинкции и, часто, усиление люминесценции (эффект гиперхромного сдвига) [93–96].

Люминесцентные свойства МИТ также зависят от ряда параметров. Люминесцирует преимущественно мономерная форма молекулы, в то время как димерные и агрегированные формы проявляют значительно меньшую

люминесценцию из-за процессов тушения (потери энергии) при межмолекулярных взаимодействиях [97,98].

Спектр возбуждения МИТ включает максимумы при 610 и 660 нм, соответствующие димерной и мономерной формам, причем основной вклад в люминесценцию вносит возбуждение мономерной формы при 660 нм [99]. Максимум испускания наблюдается при 685 нм в водных растворах. МИТ имеет низкий КВ люминесценции в воде ($KV \sim 0,01-0,05$). [97,100].

Изменение pH среды вызывает существенные изменения спектров испускания вследствие протонирования/депротонирования функциональных групп. В кислой среде ($pH < 3$) люминесценция ослабляется вследствие протонирования аминогрупп и усиления агрегации, тогда как в щелочной среде ($pH > 9$) депротонирование фенольных гидроксильных групп способствует стабилизации мономерной формы, что усиливает интенсивность испускания и вызывает батохромный сдвиг [97].

1.4.2 Взаимодействие митоксантрона с биологическими макромолекулами

МИТ проявляет высокое сродство к биологическим макромолекулам, что определяет его фармакологическую активность и токсикологический профиль. Взаимодействие с ДНК происходит преимущественно путем интеркаляции - внедрения плоской хромофорной системы антрахинона между парами оснований двойной спирали [101]. Этот процесс стабилизируется дополнительными электростатическими взаимодействиями между протонированными аминогруппами препарата и отрицательно заряженными фосфатными группами сахаро-фосфатного остова ДНК [102].

При интеркаляции наблюдаются характерные изменения спектральных свойств: батохромный сдвиг полосы поглощения на 15–20 нм и гиперхромный эффект с увеличением молярного коэффициента экстинкции на 20–40% [98,103]. Люминесценция МИТ значительно усиливается при связывании с ДНК вследствие перехода в более жесткую и менее полярную среду, что снижает безызлучательную релаксацию.

МИТ обладает умеренной липофильностью в своей нейтральной форме, однако при физиологическом pH (~7,4) он существует преимущественно в виде катиона благодаря протонированию аминогрупп, что обеспечивает его хорошую растворимость в воде. Сильное взаимодействие с белками плазмы крови, в первую очередь с сывороточным альбумином, обусловлено преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий и водородных связей [95,96]. Молекула МИТ связывается в гидрофобных карманах белка, в частности в домене ПА альбумина.

Константа связывания МИТ с ДНК составляет $K_{св.} \sim 10^5\text{--}10^6 \text{ М}^{-1}$, с белками $\sim 10^5 \text{ М}^{-1}$ демонстрируя высокое сродство [93, 95,103]. Эти взаимодействия имеют важные биологические последствия: связывание с ДНК приводит к ингибированию топоизомеразы II, вызывая разрывы двойной спирали и запуская апоптоз опухолевых клеток [101,104]. Взаимодействие с белками плазмы определяет распределение и элиминацию препарата, влияя на его терапевтическую эффективность и токсичность.

Исследования методами кругового дихроизма и ЯМР-спектроскопии подтверждают, что МИТ вызывает конформационные изменения как в ДНК (раскручивание и удлинение двойной спирали) [102], так и в белках (изменение вторичной и третичной структуры) [95,96]. Эти структурные модификации играют ключевую роль в механизме цитотоксического действия препарата и его побочных эффектов. Понимание молекулярных основ взаимодействия МИТ с биологическими макромолекулами важно для оптимизации режимов дозирования, прогнозирования лекарственных взаимодействий.

Таким образом, присутствие МИТ в биологических средах в виде множества равновесных форм (катионной, нейтральной, а также в комплексах с белками) создает серьезную проблему для разработки валидированных методов количественного анализа и требует детальных исследований.

1.4.3 Методы определения митоксантрона

Необходимость мониторинга концентрации МИТ обусловлена его высокой цитотоксичностью и узким терапевтическим окном. Как и другие препараты антрациклинового ряда, МИТ требует точного поддержания концентрации в

целевом диапазоне для достижения максимальной эффективности при минимальных побочных эффектах.

В современной клинической практике дозирование МИТ осуществляется на основе стандартных протоколов, учитывающих тип онкологического заболевания и площадь поверхности тела пациента. Однако такой подход не учитывает индивидуальные особенности опухоли, наличие метастазов, функциональное состояние органов детоксикации (печени и почек), а также фармакокинетические параметры препарата у конкретного пациента. Это может приводить к неоптимальным концентрациям препарата: субтерапевтическим, снижающим эффективность лечения, или токсическим, вызывающим тяжелые побочные эффекты.

Одной из наиболее серьезных проблем является дозозависимая кардиотоксичность МИТ, а также его способность вызывать угнетение костномозгового кроветворения (миелосупрессию). Кроме того, неселективное действие препарата на быстро пролиферирующие клетки приводит к повреждению здоровых тканей, что проявляется алопецией, мукозитом и нарушениями в работе органов желудочно-кишечного тракта.

Отсутствие доступных, быстрых и чувствительных методов мониторинга свободной (не связанной с белками плазмы) фракции МИТ в биологических жидкостях существенно затрудняет персонализацию терапии. Разработка таких методов является актуальной задачей современной аналитической химии и фармации, направленной на повышение безопасности и эффективности химиотерапии. Внедрение методов терапевтического мониторинга для МИТ позволит оптимизировать режимы дозирования, снизить частоту и тяжесть побочных эффектов и улучшить протоколы лечения онкологических заболеваний в рамках стратегии персонализированной медицины.

Таким образом, создание аналитических платформ для определения концентрации МИТ в биологических образцах представляет собой важный шаг в развитии высокотехнологичного здравоохранения и повышении качества жизни пациентов, получающих химиотерапию.

Спектрометрические методы

Сложное и лабильное поведение молекулы МИТ в растворе, ее способность к изменению заряда, агрегационному состоянию, низкий КВ люминесценции и сильному взаимодействию с компонентами биологических матриц являются основными причинами, затрудняющими его прямое количественное определение традиционными спектрометрическими методами. Их использование может приводить к значительным погрешностям при количественном определении препарата в сложных биологических матрицах, таких как плазма крови или моча.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Методы ВЭЖХ находят широкое применение для определения МИТ и изучения его различных форм [105,106]. Разработанные в 1980-х годах, эти методы успешно используются для количественного анализа МИТ плазме крови, тканях [105] и моче [107]. Несмотря на высокую точность и воспроизводимость, методы ВЭЖХ требуют трудоемкой пробоподготовки, включающей стадии депротеинизации, экстракции и концентрирования, а также использования дорогостоящего оборудования. Эти факторы существенно ограничивают их применение для рутинного мониторинга в клинических лабораториях.

Современное развитие хроматографических методов определения МИТ осуществляется по нескольким направлениям: совершенствование методик пробоподготовки и состава подвижных фаз, использование масс-спектрометрии в качестве детектора, исследование метаболитов и продуктов деградации МИТ.

Применение ион-парных реагентов в подвижной фазе требует особого внимания к контролю воспроизводимости анализа и увеличивает продолжительность процедур подготовки колонок и очистки системы [105].

В настоящее время ВЭЖХ с УФ-детектированием остается рутинным методом для изучения взаимодействий МИТ с клетками и системами доставки лекарств. Однако существенным ограничением является узкий диапазон линейности из-за склонности МИТ к образованию димеров и более сложных ассоциатов. Использование масс-спектрометрического детектирования (ВЭЖХ-МС) значительно расширяет аналитические возможности, позволяя проводить

одновременное определение различных форм препарата и изучать его метаболиты [108].

Для пробоподготовки биологических образцов применяются различные подходы: осаждение белков плазмы с использованием сульфосалициловой кислоты и ацетонитрила [105], экстракция дихлорметаном с последующим центрифугированием [109], твердофазная экстракция и экстракция жидкость-жидкость [105,106].

Несмотря на превосходную селективность и возможность разделения матричных эффектов, методы ВЭЖХ требуют значительных временных затрат на подготовку образцов, использования больших объемов токсичных органических растворителей [49, 50] и наличия специально оборудованной лаборатории, что ограничивает их применение в рутинной клинической практике.

Несмотря на высокую точность и воспроизводимость, методы ВЭЖХ требуют трудоемкой пробоподготовки (депротеинизация, экстракция, концентрирование) и использования дорогостоящего оборудования, что ограничивает их применение для рутинного мониторинга в клинических лабораториях.

Электрохимические методы

Электрохимические методы анализа МИТ основаны на регистрации электрических токов, возникающих при окислительно-восстановительных реакциях молекулы [110]. Эти методы представляют собой перспективный инструмент для обнаружения и мониторинга МИТ, обладая такими преимуществами, как высокая чувствительность, селективность, возможность миниатюризации и анализа малых объемов проб [111]. Среди электрохимических подходов наибольшее распространение получили потенциометрические и амперометрические (вольтамперометрические) методы [112].

Электрохимическое поведение МИТ характеризуется сложным многостадийным процессом окисления. Исследования показали, что первый обратимый пик окисления соответствует окислению гидроксильных заместителей в положениях 5 и 8 антрахинонового ядра, а второй пик связан с окислением

аминоалкильных боковых цепей после таутомеризации молекулы [113]. Серьезной проблемой при электрохимическом анализе является сильная адсорбция МИТ и продуктов его окисления на поверхности электродов, что приводит к их "отравлению" и ограничивает определение низкими концентрациями [83,114].

Для решения этой проблемы разработаны различные стратегии модификации электродов: молекулярно-импринтированные полимеры, имеющие специфические полости для распознавания МИТ [115,116]; нанокомпозиты на основе наночастиц серебра и политиофена на углеродных нанотрубках [117]; электроды, модифицированные двухцепочечной ДНК, использующие способность МИТ к интеркаляции [118]; ультрамикроэлектроды из углеродного волокна, имплантированные ионами кобальта [119].

Электрохимические методы также успешно сочетаются с ВЭЖХ для детектирования МИТ в биологических образцах. Например, электрохимическое обнаружение при потенциале +0,75 В относительно электрода Ag/AgCl позволяет определять МИТ в плазме пациентов [109,120].

Несмотря на преимущества, включая простоту применения, низкую стоимость и возможность анализа биообразцов, электрохимические методы требуют использования чистых образцов и регулярной очистки электродов от адсорбированных продуктов окисления, что ограничивает их применение в рутинном клиническом мониторинге.

Методы поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии

Поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия демонстрирует высокую чувствительность (ПО до 1 нМ) и позволяет детектировать МИТ непосредственно на плазменной мембране живых клеток. Использование золотых наноструктур для плазмонного усиления сигнала открывает новые возможности для изучения внутриклеточной динамики препарата [121].

Метод находит применение для исследования взаимодействия МИТ с ДНК [122,123], мониторинга кинетики высвобождения в системах доставки лекарств [124] и количественного определения в биологических жидкостях [125]. Анализ основан на усилении сигнала (до 10^5 – 10^7 раз) молекул, адсорбированных на

поверхности плазмонных наноструктур. Важным преимуществом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии является подавление автофлуоресценции биологических компонентов, что повышает точность анализа [125].

Характерные пики рамановского спектра МИТ расположены в областях 400–500 и 1200–1400 см^{-1} [122]. Дискуссионным остается вопрос выбора оптимальной длины волны возбуждения. Исследования показывают различные результаты: С. McLaughlin и соавт. [125] сообщают о преимуществе длины волны 632,8 нм, тогда как F. Tian и соавт. [126] отмечают лучшие результаты при 785 нм. Однако в этих работах не учитывалась нормализация интенсивности сигнала к плотности мощности лазера. Таким образом, превосходство конкретных длин волн требует дополнительного изучения. Ключевым критерием выбора остается минимизация фоновой люминесценции и максимизация отношения сигнал/шум.

Люминесцентные методы на основе тушения

МИТ широко применяется в качестве эффективного тушителя люминесценции благодаря своей способности взаимодействовать с различными молекулами через электростатические и гидрофобные взаимодействия. Основные механизмы тушения включают ФРПЭ, ФПЭ и эффект внутреннего фильтра [127–129].

Механизмы тушения люминесценции в присутствии МИТ остаются недостаточно изученными в большинстве работ. Исследователи часто ограничиваются общими ссылками на механизмы, предложенные для хиноновых соединений, или выдвигают предположения на основе ограниченного набора экспериментальных данных.

Лишь в единичных исследованиях проводится систематический анализ механизмов тушения с использованием комплекса физико-химических методов. Большинство авторов не проводят измерений времени жизни люминесценции, температурных зависимостей кинетики тушения, детального анализа спектральных характеристик. Вместо этого механизмы тушения часто постулируются на основе косвенных данных о перекрывании спектров, изменений интенсивности люминесценции, электростатических соображений.

Отсутствие глубоких исследований механизмов тушения существенно ограничивает возможность целенаправленной разработки высокочувствительных систем. Необходимы систематические исследования, сочетающие спектроскопические, кинетические и вычислительные методы для установления точных механизмов взаимодействия МИТ с люминесцентными метками.

МИТ демонстрирует высокую эффективность тушения люминесценции человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), образуя комплексы в двух центрах связывания с константой связывания порядка 10^6 M^{-1} . Значение константы тушения составила $3,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. В работе авторы предполагают статический механизм тушения.

Люминесценция органических красителей также может тушиться молекулами МИТ. Эозин Y (динатриевая соль 2,4,5,7-тетрабромфлуоресцеина) использовался для определения МИТ. Образование ион-парного комплекса с эозином Y позволяет детектировать препарат в биологических образцах в диапазоне концентраций 0,3–2,0 мкг/мл при pH=4 [130]. Красная эмиссия сферических углеродных точек размером 10 нм может быть потушена в присутствии МИТ из-за эффекта внутреннего фильтра. Линейная зависимость в тушении люминесценции наблюдается в диапазоне концентраций МИТ от 0,096 до 30 мкМ с небольшим батохромным сдвигом эмиссии углеродных точек [129].

Перспективным направлением является разработка гибридных материалов на основе металл-органических каркасов. Полученная система (европиум-содержащие металл-органические каркасные структуры и альгинатный гидрогель) обеспечивает определение МИТ в сыворотке с ПО ~13,4 нг/мл посредством ФРПЭ-механизма [131].

ФРПЭ-методы также находят применение для изучения взаимодействий МИТ с биологическими мишенями, в частности с ДНК, а также для обнаружения структурно близких соединений антрахинонового ряда, таких как доксорубицин. Эти подходы позволяют не только определять концентрации, но и исследовать механизмы молекулярных взаимодействий.

Современные люминесцентные методы анализа МИТ все чаще используют наноразмерные частицы, которые демонстрируют значительные преимущества по сравнению с традиционными органическими красителями. Наноструктуры обладают повышенной химической и фотостабильностью, меньшей чувствительностью к внешним воздействиям и уникальными оптическими свойствами, что делает их перспективными для создания высокочувствительных аналитических систем.

В работе [132] были использованы КТ CdTe, стабилизированные меркаптоянтарной кислотой. Предполагаемый механизм тушения люминесценции включает как статическое, так и динамическое тушение, что подтверждается нелинейным графиком Штерна-Фольмера. Электростатическое взаимодействие между положительно заряженными молекулами МИТ и отрицательно заряженной поверхностью КТ способствует эффективной адсорбции аналита. ПО составил 0,025 мкМ, а линейный диапазон определения — 0,0675–0,337 мкМ ($R^2 = 0,961$) в водных растворах.

Авторы также продемонстрировали возможность применения системы для tandemного определения МИТ и РНК, а также для мониторинга их взаимодействия. Наблюдаемое тушение люминесценции объясняется специфическим связыванием комплекса МИТ-КТ с структурными элементами РНК — аденином, урацилом и фосфатно-сахарным остовом [132,133].

Группа под руководством J. Zhang [134] разработала ратиометрический люминесцентный зонд на основе зеленых и красных КТ CdTe с молекулярным импринтингом для селективного определения МИТ. Оптимальные условия определения были достигнуты при pH 6,5. Зонд демонстрировал два четких пика испускания при 524 и 624 нм при возбуждении 365 нм. Добавление МИТ вызывало тушение зеленой люминесценции (524 нм), в то время как испускание красных КТ (624 нм) оставалось неизменным, что позволило провести ратиометрическое детектирование. Линейный диапазон составил 0,2–2,0 мкМ с ПО 0,067 мкМ. Фактор импринтинга достиг 30,02, что свидетельствует о высокой селективности. Зонд показал исключительную селективность к МИТ по сравнению с

структурными аналогами (доксорубицином, даунорубицином) и устойчивость к влиянию матричных эффектов биологических образцов. Валидация метода на пробах крови и мочи человека продемонстрировала хорошую воспроизводимость (S_r 2,03–5,96%) и точность (извлечение 91,5–102,2%). Важным преимуществом являлась возможность многократного использования данных зондов (до 5 циклов) без значительной потери эффективности. Предложенная система представляет перспективную платформу для мониторинга МИТ в клинической практике, сочетая высокую селективность молекулярного импринтинга с точностью ратиометрического детектирования.

Y. Zhong и соавторы [129] разработали методику с использованием красных углеродных точек для определения МИТ в сыворотке крови. В основе метода лежит эффект внутреннего фильтра — при увеличении концентрации MITX интенсивность люминесценции углеродных точек при 655 нм снижалась, а максимум испускания смещался до 661 нм. Методика продемонстрировала широкий линейный диапазон 0,096–30 мкМ и низкий ПО 0,032 мкМ. Метод успешно апробирован на образцах сыворотки крови, показав высокую точность, воспроизводимость и низкую стоимость анализа.

В работе [135] Wang и соавторы разработали методику с использованием золотых нанокластеров, стабилизированных глутатионом, для одновременного определения МИТ и ДНК. В системе МИТ выступает как тушитель люминесценции нанокластеров через механизм ФПЭ. При добавлении в систему ДНК происходит связывание МИТ с поверхности нанокластеров и восстановление люминесценции нанокластеров. Метод показал линейный отклик в диапазоне 0,1–6 мкМ для МИТ (ПО 20 нМ) и 0,5–8 мкг/мл для ДНК (ПО 0,1 мкг/мл). Методика успешно применена для анализа реальных образцов с высокой точностью и воспроизводимостью.

Заключения по главе 1

Из проведенного в рамках диссертационного исследования анализа литературных источников следует, что КТ, в особенности тройные AgInS/ZnS и сплавные CdZnSeS/ZnS, представляют собой высокоперспективный материал для

использования в разработке люминесцентных методик анализа. Их уникальный комплекс фотофизических свойств — регулируемый спектр испускания, высокий КВ, исключительная фотостабильность и возможность направленной модификации поверхности — обеспечивает значительные преимущества перед традиционными органическими люминофорами для аналитических применений.

Многообразие механизмов тушения люминесценции (ФРПЭ, ФПЭ, статическое и динамическое тушение) составляет теоретический фундамент для создания высокочувствительных аналитических методик. В частности, МИТ, обладая выраженными электрон-акцепторными свойствами и склонностью к электростатическим и гидрофобным взаимодействиям, является эффективным тушителем люминесценции для широкого круга наноматериалов.

Однако, несмотря на обилие исследований, выявлен ряд ключевых проблем, требующих решения. В большинстве работ механизм тушения люминесценции наноматериалов в присутствии МИТ либо не исследуется вовсе, либо постулируется на основе косвенных данных без комплексной экспериментальной проверки. Недостаточно систематизированных данных о влиянии химического состава, архитектуры (ядро/оболочка) и поверхности КТ на эффективность и механизм тушения. Кроме того, остро стоит проблема селективности в сложных матрицах: существующие методы, включая "золотой стандарт" ВЭЖХ, зачастую требуют трудоемкой пробоподготовки и не всегда применимы для быстрого анализа в условиях клиники. Существующие люминесцентные методики, как правило, демонстрируют хорошую чувствительность в модельных растворах, но их работоспособность в таких сложных средах, как плазма крови, изучена недостаточно, где влияние неспецифического тушения и белкового окружения может быть критичным.

Таким образом, проведение систематического исследования механизмов тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ является актуальной фундаментальной задачей. Полученные знания позволят целенаправленно разработать селективную и высокочувствительную методику анализа, пригодную

для прямого определения МИТ в биологических жидкостях, что важно для задач терапевтического мониторинга и повышения безопасности лечения.

Обобщение и критический анализ литературных данных, представленные в данной главе, легли в основу обзорных статей автора и подробно изложены в [136,137].

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реагенты и материалы

Реагенты

Митоксантрона дигидрохлорид (МИТ, $\geq 97\%$), Родамин 6 Ж, Кумарин 153, бычий сывороточный альбумин (БСА) ($\geq 98.0\%$), ЧСА (≥ 98.0) — «Sigma», США. Все аминокислоты (глицин, лейцин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, треонин, лизин, метионин, гистидин, триптофан, изолейцин, аланин, фенилаланин, серин, цистеин) — «Acros Organics», Бельгия. Лекарственные препараты: «Цефтриаксон-АКОС» (действующее вещество: цефтриаксон натрия, порошок для приготовления раствора, ОАО «Синтез», Россия); «Меронем» (действующее вещество: меропенем тригидрат, порошок для приготовления раствора, Pfizer Inc., США); «Ванкомицин» (действующее вещество: ванкомицина гидрохлорид, порошок для приготовления раствора, ПАО «Красфарма», Россия); «Бортезомиб» (действующее вещество: бортезомиб, лиофилизат для приготовления раствора, АО «РАФАРМА», Россия). Питательная среда DMEM, 0,5% трипсин-ЭДТА, фетальная бычья сыворотка, раствор антибиотика («PenStrep»: пенициллин и стрептомицин) — «Gibco BRL», США. AlamarBlue (реагент для определения жизнеспособности клеток) — «Invitrogen» (США). Все остальные химические вещества, использованные в экспериментах, имели квалификацию не ниже ч.д.а.

Для приготовления растворов использовали воду (электропроводность $\sim 18,2 \text{ МОм} \cdot \text{см}^{-1}$ при 25°C), подготовленную с помощью системы очистки воды Milli-Q Plus185 (Millipore). ФСБ (10 мМ, $\text{pH} = 7,4$) готовили из стандартизированных таблеток («Реахим», Россия).

Материалы

96-луночные микропланшеты из оптически прозрачного полистирола (Aptaca, Италия). 96-луночные микропланшеты, поверхность лунок обработанная Nunclon Delta (NuncTM, Thermo Scientific, США)

2.2 Оборудование

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV-1800» (Shimadzu, Япония), спектры люминесценции

регистрировали на многофункциональном флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse («Agilent Technologies», Австралия) в кварцевой кювете (длина оптического пути 1 см). Спектры поглощения и люминесценции в лунках микропланшета регистрировали в гибридном ридере Synergy H1 («BioTek», США). Оценку времени жизни люминесценции осуществляли при помощи модульного аппаратно-программного комплекса Horiba DeltaPro («Horiba Scientific», Британия) с диодным источником излучения 359 нм NanoLED («Horiba Scientific», Британия), и нейтральным отражающим фильтром из кварцевого стекла OD2 («Thorlabs», США) для обработки данных и расчетов использовали программное обеспечение EzTime, кривые затухания фотолюминесценции КТ аппроксимировали трехэкспоненциальной функцией. Оптические микроскопические изображения были получены на инвертированном микроскопе Olympus IX73 (Olympus Corp., Япония) с объективом 20х/0,40 нм, камерой DP73 и системой освещения со световодом U-HGLGPS (возбуждение при 360–370 нм; интенсивность была установлена на 50%).

Гидродинамический диаметр, ζ -потенциал и концентрацию наноструктур измеряли с использованием комплекса оборудования Zetasizer Advance Ultra («Malvern Panalytical», Великобритания). Изображения КТ для оценки морфологии и размера получали при помощи просвечивающего электронного микроскопа LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия).

Математические расчеты проводили с использованием программного обеспечения Origin Pro 2022 (OriginLab Co., США).

2.3 Методики проведения экспериментов

2.3.1 Синтез и гидрофилизация КТ

В работе использовали два типа полупроводниковых КТ, синтезированных по методикам, ранее разработанным в нашей лаборатории [18,138,139].

Синтез КТ AgInS¹

Гидрофильные КТ AgInS/ZnS синтезированы методом «однореакторного» неинжекционного синтеза в водном растворителе в соответствии с процедурой, адаптированной из работы Раевской и др. [15].

Синтез КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS²

Синтез и гидрофилизацию ядер КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS осуществляли согласно методике высокотемпературного металлоорганического инъекционного синтеза, опубликованного в работах [138,139].

2.3.2 Расчет квантового выхода люминесценции КТ

КВ люминесценции исследуемых КТ определялся относительным методом, используя в качестве эталона стандартный флуорофор по методике, описанной в работе [140]. Для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS в качестве стандарта использовался кумарин 153 в этаноле (КВ = 53±3% [140]). Для фракций КТ AgInS/ZnS — Родамин 6Ж в этаноле (КВ = 95±3% [141]). Для минимизации ошибок, связанных с нелинейностью детектирования, оптическая плотность всех измеренных растворов не превышала 0,05 на длине волны возбуждения. Погрешность определения относительного квантового выхода для измерений, оцененная на основе пяти независимых экспериментов, составила 2–5%, что согласуется с данными литературных источников по данной методике [142].

Расчет проводили по формуле:

$$\Phi_x = \Phi_{ст.} \cdot \frac{F_x}{F_{ст.}} \cdot \frac{A_{ст.}^\lambda}{A_x^\lambda} \cdot \frac{n_x^2}{n_{ст.}^2} \quad (8)$$

где Φ_x , $\Phi_{ст.}$ — КВ исследуемого образца и стандарта соответственно; A_x^λ , $A_{ст.}^\lambda$ — оптическая плотность на длине волны возбуждения для исследуемого образца и стандарта соответственно; F_x , $F_{ст.}$ — интегральная интенсивность на диапазоне длин волн для исследуемого образца и стандарта соответственно; n_x , $n_{ст.}$ —

¹ Автор выражает благодарность за предоставленные образцы КТ AgInS/ZnS Пономаревой Т.С. и Оломской В.В.

² Автор выражает благодарность за предоставленные образцы КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS к.х.н. Дрозду Д.Д.

показатель преломления растворителя для исследуемого образца и стандарта соответственно.

2.3.3 Тушение люминесценции квантовых точек в присутствии митоксантрона в стационарном режиме

Тушение люминесценции КТ в присутствии МИТ проводили в воде и плазме крови человека, разбавленной водой в 50 раз (полное разбавление в системе плазма-МИТ-КТ). Подробное описание пробоподготовки плазмы крови человека представлено в разделе «2.3.8 Работа с плазмой крови человека». Изучали тушение люминесценции различных типов КТ (AgInS/ZnS, CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS) и с различными стабилизаторами поверхности КТ CdZnSeS/ZnS: ТГК, МПК и ДГЛК. Все образцы КТ нормировали по оптической плотности (не более $0,100 \pm 0,002$) при длине волны 360 нм для оптимального сравнения. Смешивали равные объемы КТ и МИТ, затем инкубировали при перемешивании в течении 15 мин. Конечную концентрацию МИТ варьировали от 1 до 5000 нМ (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нМ). Измерения проводили в 96-луночном микропланшете ($n=3$). Длину волны возбуждения использовали для всех КТ при 360 нм.

2.3.4 Измерение времени жизни люминесценции квантовых точек

Измерение времени жизни люминесценции КТ в присутствии МИТ проводили для КТ различного состава и размера. Для этого использовались фракции (кроме первой) КТ AgInS/ZnS, а также КТ и CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS. Образцы КТ были нормированы по оптической плотности как при изучении тушения в стационарном режиме. Смешивали равные объемы КТ и МИТ, затем инкубировали при перемешивании в течении 15 мин. Конечную концентрацию МИТ варьировали от 1 до 100 нМ (1, 5, 10, 25, 50 и 100 нМ). Измерение проводили в стандартной 10-миллиметровой кварцевой кювете, без оптических фильтров и монохроматора, при поляризации регистрируемого излучения $54,7^\circ$. Функцию отклика прибора регистрировали из рассеивающей кварцевой кюветы, заполненной водой. Измерение проводили до 800 нс для КТ CdZnSeS, CdZnSeS/ZnS и 3 мкс для КТ AgInS/ZnS. Кривые затухания аппроксимировали тремя экспонентами в зависимости от функции отклика прибора с помощью программного обеспечения

Horiba EzTime. Общее средневзвешенное время жизни люминесценции рассчитывали с использованием уравнения:

$$\langle \tau_{\text{ср.}} \rangle = \sum a_i \tau_i^2 / \sum a_i \tau_i \quad (9)$$

где $\tau_{\text{ср.}}$ — среднее время жизни люминесценции [с], τ — соответствующее время жизни люминесценции [с], a — относительная амплитуда.

2.3.5 Тушение люминесценции митоксантаона в присутствии квантовых точек и спектрофотометрическая оценка их взаимодействия

Тушение люминесценции МИТ КТ исследовали на третьей фракции КТ AgInS/ZnS и КТ CdZnSeS/ZnS. Концентрация МИТ была фиксированной и составила 5000 нМ.

Концентрацию КТ измеряли с помощью прибора Zetasizer Advance Ultra в единицах частицы/мл (шт/мл). Для пересчета в молярную концентрацию (моль/л) использовали число Авогадро ($N_A \approx 6,022 \times 10^{23}$ моль⁻¹), по формуле:

$$C \text{ (моль/л)} = \frac{C \text{ (шт/мл)} \cdot 1000}{N_A} \quad (10)$$

где C (шт/мл) — концентрация наночастиц, полученная на ZetaSizer; 1000 — коэффициент перевода миллилитров в литры; N_A — число Авогадро.

Концентрацию третьей фракции КТ AgInS/ZnS для тушения люминесценции МИТ варьировали от 15 до 207 нМ (15, 19, 26, 39, 44, 52, 62, 77, 103, 124, 155 и 207 нМ). Концентрацию КТ CdZnSeS/ZnS — от 6 до 145 нМ (6, 7, 10, 14, 29, 58 и 145 нМ). Измерения проводили в стандартной 10-миллиметровой кварцевой кювете. Использовали длину волны возбуждения при 610 нм.

Взаимодействие МИТ с КТ изучали методом абсорбционной спектроскопии в видимой области (500—800 нм) в диапазоне концентраций КТ, аналогичном тушению люминесценции МИТ. Измерения проводили в стандартной 10-миллиметровой кварцевой кювете.

2.3.6 Тушение люминесценции бычьего сывороточного альбумина митоксантроном и спектрофотометрическая оценка их взаимодействия

Тушение люминесценции БСА в присутствии МИТ проводили при фиксированной концентрации БСА 2,5 мкМ (водный раствор). Концентрации МИТ для тушения люминесценции БСА варьировали от 0,5 до 80 мкМ (0,5, 1, 2,5, 5, 10,

20, 30, 40, 50, 60, 80 мкМ). Измерения проводили в стандартной 10-миллиметровой кварцевой кювете. Длину волны возбуждения использовали при 280 нм.

Взаимодействие МИТ с БСА изучали методом абсорбционной спектроскопии в видимой области (500—800 нм) в диапазоне концентраций БСА от 0,5 до 500 мкМ (0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500 мкМ). Измерения проводили в стандартной 10-миллиметровой кварцевой кювете.

2.3.7 Оценка влияния бычьего сывороточного альбумина на люминесценцию квантовых точек

Исследование влияния БСА на люминесцентные свойства КТ проводили на третьей фракции КТ AgInS/ZnS и КТ CdZnSeS/ZnS. Концентрация БСА была фиксированной и составила 3×10^{-3} М (водный раствор). Смешивали равные объемы КТ и БСА, затем инкубировали при перемешивании в течении 15 мин. Измерения проводили в 96-луночном микропланшете. Длину волны возбуждения использовали для всех КТ при 360 нм.

2.3.8 Работа с плазмой крови человека

Все исследования проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее более поздних поправках. Исследования одобрены этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского (г. Саратов), протокол № 3 от 3 октября 2023 г. Каждый участник исследования предоставил добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснения о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

Для получения плазмы, цельную кровь отбирали в пробирки с цитратным буфером (0,129 М) и центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин. Перед использованием мочи, ее центрифугировали 15 мин при 1500 g для осаждения белков. Полученные образцы хранили при температуре -20°C .

В образцы крови и плазмы вносили различное количество МИТ (конечные концентрации варьировали от 0,75 до 5,6 мкг/мл) и тщательно перемешивали. Для

анализа образец плазмы разбавляли в 50 раз в воде. Образцы с различным количеством МИТ обрабатывали одинаково, а номинальное содержание МИТ определяли с помощью соответствующего уравнения регрессии.

2.3.9 Методика определения митоксантрона ВЭЖХ-УФ

Определение МИТ в образцах крови проводили с использованием ВЭЖХ-УФ (LC–20AD Shimadzu, Япония) на колонке Waters Spherisorb ODS2 C18 Column (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) (Waters, США), в режиме термостатирования (25 °С) со скоростью потока 0,5 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали раствор H_3PO_4 pH 2,3 (0,1% водн.) и ацетонитрил в соотношении 81:19 об. %, элюирование осуществляли в изократическом режиме. Время удерживания МИТ составило 9 мин 35 с. Сигнал поглощения регистрировали в одноканальном режиме (максимальное поглощение мономера МИТ в плазме крови при 675 нм) [105]. Для анализа ВЭЖХ-УФ была выделена плазма крови по методике, описанной в разделе «2.3.8 Работа с плазмой крови человека»

2.3.10 Расчет параметров тушения люминесценции и аналитических характеристик

Расчет константы Штерна-Фольмера

Для описания изменения интенсивности люминесценции КТ в зависимости от концентрации МИТ использовали обобщенное уравнение Штерна-Фольмера (уравнение 3, рассмотренное в «1.3.1 Механизмы тушения люминесценции в присутствии тушителя»). В случае если тушение происходит по динамическому механизму, K_{SV} определялась с использованием уравнения 4.

k_q связана с частотой столкновений следующим уравнением:

$$k_q = \gamma k_0 \quad (10)$$

где γ – вероятность тушения при столкновении, а k_0 – диффузионно-контролируемая константа скорости тушения [$\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$].

Расчет диффузионно-контролируемой константы скорости тушения

Уравнение Смолуховского описывает константу скорости столкновений, ограниченную диффузией, k_0 :

$$k_0 = \frac{4\pi RDN}{1000} = \frac{4\pi N}{1000} (R_f + R_q)(D_f + D_q) \quad (11)$$

где R — радиус столкновения [см]; D — сумма коэффициентов диффузии флуорофора (D_f) и тушителя (D_q) [$\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$]; N_A — число Авогадро. Радиус столкновения обычно принимается равным сумме радиусов флуорофора (R_f) и тушителя (R_q). Радиусы КТ и МИТ составляли 3,5 нм и 0,9 нм, соответственно. Коэффициент 1000 необходим для соблюдения размерности в тех случаях, когда концентрация выражена в молях на литр. При умножении на $(N/1000)$ молярность пересчитывали в молекулы/ см^3 .

Коэффициенты диффузии рассчитывались с использованием уравнения Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (12)$$

где k — постоянная Больцмана [$\text{Дж} \cdot \text{К}^{-1}$]; η — вязкость растворителя [$\text{Па} \cdot \text{с}$]; T — температура [К]; R — радиусы компонентов (КТ и МИТ) [см].

Расчетные значения D в воде составили: $D_{\text{МИТ}} = 2,7 \times 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, $D_{\text{КТ}} = 7,0 \times 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, в плазме крови, разбавленной в 50 раз, — $D_{\text{МИТ}} = 2,4 \times 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, $D_{\text{КТ}} = 6,2 \times 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$.

Расчет константы связывания

Константа связывания была получена путем построения зависимости $\log[(I_0 - I)/(I - I_s)]$ от координат $\log[Q]$. Интенсивность люминесценции зависит от концентрации тушителя в соответствии со следующим уравнением:

$$\frac{I_0 - I}{I - I_s} = \left(\frac{[Q]}{K_{\text{дисс.}}} \right)^n \quad (13)$$

где I_0 , I_s и I — интенсивности люминесценции люминофора в отсутствие тушителя, в насыщенном растворе тушителя и в присутствии тушителя соответственно; $[Q]$ — концентрация тушителя [М]; $K_{\text{дисс.}}$ — константа диссоциации, обратная константе связывания $K_{\text{св.}}$ [М^{-1}]; n — число эквивалентных мест связывания.

Наклон полученного графика в двойных логарифмических координатах представляет собой число эквивалентных мест связывания (n), а значение $\log [Q]$ при $\log[(I_0 - I)/(I - I_s)] = 0$ равно логарифму константы диссоциации. Константа связывания равна обратной константе диссоциации:

$$K_{\text{св.}} = \frac{1}{K_{\text{дисс.}}} \quad (14)$$

Константа связывания также была определена по данным спектров поглощения с помощью модифицированного подхода, описанного выше, согласно которому уравнение принимает вид:

$$\frac{A_0 - A}{A - A_S} = \left(\frac{[Q]}{K_{diss}} \right)^n \quad (15)$$

где A_0 , A_S и A — оптические плотности люминофора в отсутствие тушителя, в насыщенном растворе тушителя и в присутствии тушителя соответственно; $[Q]$ — концентрация тушителя $[M]$; K_{diss} — константа диссоциации, обратная константе связывания $K_{св}$ $[M^{-1}]$; n — число эквивалентных мест связывания.

Расчет аналитических характеристик

Для подтверждения соответствия методики установленным критериям ее аналитические характеристики были оценены согласно требованиям к валидации аналитических процедур [143].

ПО и предел количественного определения (ПКО) являются важными параметрами для оценки чувствительности разработанного метода. ПО рассчитывали как отношение трехкратного стандартного отклонения (3σ) к наклону калибровочной кривой S для низких концентраций: $ПО = 3\sigma/S$. ПКО был рассчитан как десятикратное отношение ($ПКО = 10\sigma/S$).

Линейный динамический диапазон (динамический диапазон) — интервал концентраций от порога чувствительности до концентрации с заметным отклонением от прямой пропорциональности ($\geq 3-5\%$).

Для выражения воспроизводимости результатов анализа рассчитывали относительное стандартное отклонение (S_r), которое представляет собой отношение стандартного отклонения выборки S к среднему значению $\bar{x}$: $S_r = \frac{S}{\bar{x}}$.

Для статистической оценки значимости различий между результатами, полученными разработанным методом на основе тушения люминесценции КТ и референсным методом ВЭЖХ-УФ, использовали t -критерий Стьюдента. Критерий применялся для сравнения средних значений концентраций МИТ, определенных двумя методами в идентичных образцах.

Для вычисления t -критерия применяли формулу:

$$t = \sqrt{\frac{n}{2}} \cdot \frac{|x_{cp1} - x_{cp2}|}{S_{cp}} \quad (16)$$

где n — количество параллельных определений, S_{cp} — среднее стандартное отклонение, рассчитанное по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{f_1 \cdot S_1^2 + f_2 \cdot S_2^2}{f_1 + f_2}} \quad (17)$$

где S_1 и S_2 — стандартное отклонение результатов, полученных разработанным и независимым методом, соответственно, f_1 и f_2 — числа степеней свободы для разработанного и независимого метода ($f = n - 1$, где n — количество измерений в серии).

Оценка цитотоксичности КТ *in vitro*

Цитотоксичность оценивали по методике, описанной в работе [144]. Для оценки биобезопасности синтезированных КТ исследование их цитотоксичности проводилось на двух клеточных линиях мыши: фибробластах L929 (нормальная клеточная линия) и клетках карциномы молочной железы 4T1 (опухолевая клеточная линия). Клеточные линии культивировали в среде DMEM, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой и 1% раствором антибиотика, при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Для экспериментов по цитотоксичности суспензию клеток высевали в 96-луночные микропланшеты с плотностью 5×10^3 клеток на лунку и предварительно инкубировали в течение 12 часов. После адгезии клеток в лунки вносили КТ CdZnSeS/ZnS в различных конечных концентрациях: $\sim 5 \times 10^{-8}$ М (1:200), $\sim 1 \times 10^{-7}$ М (1:100), $\sim 2 \times 10^{-6}$ М (1:10). Планшеты инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов.

Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью реагента AlamarBlue. После инкубации с КТ культуральную среду заменяли на свежую (90 мкл) с добавлением 10 мкл реагента и инкубировали дополнительно 4 часа. В качестве контролей использовали: положительный контроль (клетки без добавления КТ); отрицательный контроль (холостой образец, содержащий только культуральную среду и реагент).

Интенсивность люминесценции регистрировали на микропланшетном ридере при возбуждении 560 нм и испускании 590 нм с сканированием площади 5×5 точек на лунку. Все эксперименты выполнены в пятикратной повторности.

ГЛАВА 3. Исследование влияния состава и размера квантовых точек на тушение люминесценции при определении митоксантрона

Разработка высокочувствительных и селективных методов детекции низкомолекулярных биологически активных соединений, таких как МИТ, является актуальной задачей аналитической химии и биомедицины. Одним из наиболее перспективных подходов является использование люминесцентных коллоидных КТ в качестве сенсорных платформ, работа которых основана на явлении тушения люминесценции при связывании с аналитом. Ключевыми факторами, определяющими эффективность обнаружения, являются состав и строение люминесцентного ядра КТ, а также природа поверхностных лигандов, которые модулируют заряд, реакционную способность и селективность нанокристаллов. В связи с этим сравнительное изучение механизмов тушения люминесценции различных типов КТ (тройных AgInS/ZnS и сплавных CdZnSeS/ZnS) в присутствии МИТ представляет значительный фундаментальный и практический интерес.

Целью данной главы является установление закономерностей и количественных характеристик взаимодействия МИТ с КТ различного химического состава и строения, всестороннее исследование механизма тушения люминесценции и оценка влияния белкового компонента на аналитический отклик для выявления наиболее перспективной системы для применения в сложных биологических матрицах.

Основным задачами данной главы явились:

1. Характеризация свойств МИТ и КТ различного состава: тройных AgInS/ZnS и сплавных CdZnSeS , CdZnSeS/ZnS .
2. Исследование кинетики тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ в стационарном и время-разрешенном режимах, построение и анализ зависимости Штерна-Фольмера, определение КТ с наибольшей эффективностью тушения люминесценции в присутствии МИТ.
3. Исследование механизма тушения на основе данных, полученных в стационарном и время-разрешенном режимах, оценка вклада динамических и статических процессов.

4. Расчет константы связывания комплексов КТ-МИТ тремя подходами: по тушению люминесценции КТ, по тушению люминесценции МИТ и по изменению спектров поглощения МИТ, предложить схему взаимодействия МИТ и КТ.

5. Изучение взаимодействия МИТ с БСА и оценка влияния БСА на процесс тушения люминесценции различных типов КТ для прогнозирования их поведения в биологических средах.

3.1 Характеризация квантовых точек и митоксантрона

В данной работе исследованы два типа полупроводниковых КТ:

(1) Тройные AgInS/ZnS КТ, синтезированные двухступенчатым одnoreакторным водным методом, демонстрирующие широкий спектр испускания, длительное время жизни люминесценции и высокий КВ.

(2) Сплавные CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS КТ, полученные одnoreакторным высокотемпературным металлоорганическим методом, характеризующиеся узким спектром испускания, коротким временем жизни и высоким КВ.

Нанесение оболочки ZnS на исходные полупроводниковые ядра (AgInS и CdZnSeS) способствует улучшению пассивации люминесцентного ядра. В качестве поверхностных лигандов использовали ТГК, содержащую тиоловые группы для связывания с поверхностью КТ, карбоксильные группы для стабилизации в водной среде, формирующую монослойное гидрофильное покрытие. КТ AgInS/ZnS и CdZnSeS/ZnS обладают высокой коллоидной стабильностью и отрицательным зарядом (табл. 2).

3.1.1 Свойства квантовых точек AgInS/ZnS

Тройные КТ AgInS/ZnS синтезировали непосредственно в водной среде без дополнительной стадии гидрофилизации, согласно ранее разработанной нашей научной группой методике [18,145]. ТГК вводили *in situ* в процессе синтеза. Покрытие ядер AgInS оболочкой ZnS привело к батохромному смещению максимума испускания на 40 нм и увеличению интенсивности люминесценции на ~70%. Усиление люминесценции может быть обусловлено усилением электронно-дырочного взаимодействия в ядре за счет широкозонного слоя ZnS , а также образованием дополнительных рекомбинационных центров излучения.

Таблица 2. Характеристики КТ AgInS/ZnS, CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS

Образец КТ	Размер ^а , нм	ζ-потенциал ^б , мВ	λ _{исп.} ^в , нм	КВ ^г , %	E _г ^д , эВ
AgInS/ZnS					
1 ^е	7±0.3	-35 ± 6	630	28	2.40
3	7±0.3	-41 ± 5	606	32	2.44
4	6±0.3	-43 ± 7	592	38	2.48
6	4±0.2	-55 ± 5	578	43	2.51
8	4±0.2	-60 ± 7	558	18	2.61
CdZnSeS	6 ± 0.4	-30 ± 10	538	42	5.25
CdZnSeS/ZnS	7 ± 0.2	-32 ± 11	532	57	5.30

Примечания:

а — на основе данных изображений ПЭМ;

б — на основе данных электрофоретического рассеяния света;

в — λ_{возб.} = 360 нм;

г — относительный КВ рассчитан с использованием кумарина 153 (КВ = 0,53) в качестве стандарта;

д — оптическая ширина запрещенной зоны;

е — номер фракции AgInS/ZnS.

Для получения узкого распределения по размерам и варьирования максимума люминесценции проведено фракционирование КТ AgInS/ZnS методом многократного осаждения и центрифугирования в 2-пропанол, обеспечивая селективное по размеру разделение и дополнительную очистку. В процессе более крупные частицы осаждались быстрее. Это позволило выделить 8 фракций КТ (введено сокращение для фракций: AgInS/ZnS_1...AgInS/ZnS_8) с различающимися оптическими свойствами, спектры поглощения и испускания для всех фракций показаны на рисунке 3а. Диаметр КТ составил 4–7 нм и люминесценция находилась в диапазоне от красного до желто-зеленого (λ_{исп.} = 558–630 нм). КВ люминесценции составил от 18% (AgInS/ZnS_8) до 43% (AgInS/ZnS_6) (табл. 2).

Оптическая ширина запрещенной зоны (E_г) КТ AgInS/ZnS определена из графиков Тауца:

$$\alpha \cdot h\nu^\gamma = A \cdot (h\nu - E_g) \quad (18)$$

где α — коэффициент поглощения; hν — энергия фотона (h — постоянная Планка, ν — частота света); γ обозначает природу электронных переходов (γ = 0,5 для непрямых разрешенных электронных переходов); A — константа пропорциональности.

Значения E_г увеличивались от 2,40 эВ (AgInS/ZnS_1) до 2,61 эВ (AgInS/ZnS_8), что коррелирует с батохромным сдвигом излучения при

уменьшении размера КТ. AgInS/ZnS_1 демонстрирует широкий спектр испускания, который частично перекрывается со спектром AgInS/ZnS_3 и AgInS/ZnS_4, что предполагает высокое распределение частиц по размеру. Несмотря на фракционирование образцов, первая фракция может содержать примеси, что может влиять на интерпретацию данных.

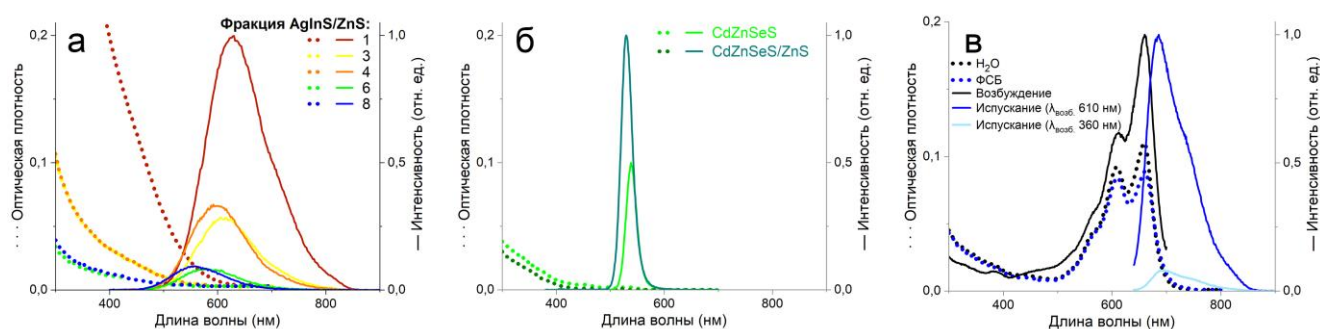


Рисунок 3. Спектры поглощения и испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) (а) фракций КТ AgInS/ZnS; (б) сплавных КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS; (в) спектры поглощения в воде и ФСБ, испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ и 610 нм) и возбуждения ($\lambda_{\text{исп.}} = 685$ нм) МИТ. Пунктирная линия — спектры поглощения, сплошная — испускания и возбуждения.

3.1.2 Свойства квантовых точек CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS

Сплавные КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS синтезировали одностадийным высокотемпературным металлоорганическим методом с последующей гидрофилизацией. Гидрофилизация КТ с помощью ТКК выполнена как отдельный шаг с помощью метода обмена лигандами, согласно ранее разработанной нашей научной группой методике [138,139]. Спектры поглощения и испускания полученных гидрофильных КТ показаны на рисунке 3б. Нанесение оболочки ZnS привело к гипсохромному смещению максимума люминесценции на 6 нм (538 $\rightarrow$ 532 нм) и увеличению КВ с 42% (CdZnSeS) до 57% (CdZnSeS/ZnS) (рис. 3б, табл. 2). Этот эффект является общим для оболочки КТ ZnS [138,146,147]. Средний размер, полученных CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS составил 6 и 7 нм (рис. 4, табл. 2), соответственно. E_g , рассчитанная для $\gamma=2\gamma=2$ (прямые разрешенные переходы) по уравнению 18, составила 5,25 эВ (CdZnSeS) и 5,30 эВ (CdZnSeS/ZnS), что согласуется с гипсохромным сдвигом спектра испускания.

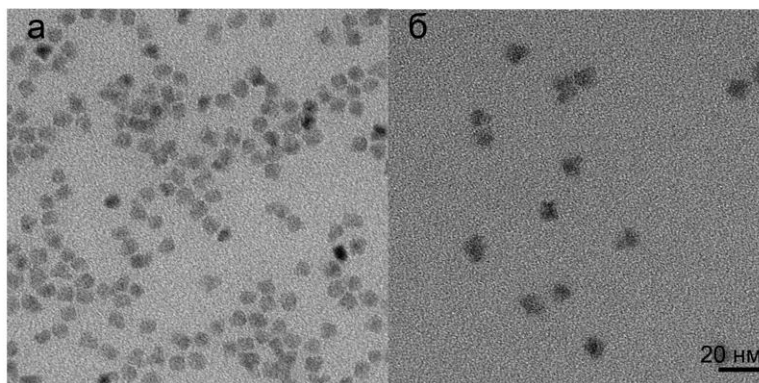


Рисунок 4. Изображения ПЭМ для КТ (а) CdZnSeS и (б) CdZnSeS/ZnS (величина размерной шкалы 20 нм).

3.1.3 Свойства митоксантрона

При изучении взаимодействия МИТ с КТ ключевое внимание уделено анализу изменений оптических характеристик обоих компонентов системы. На рисунке 3в представлены спектры поглощения, испускания и возбуждения МИТ (5 мкМ) в воде и ФСБ (рН 7,4). Спектры поглощения МИТ имеют две характерные полосы, которые связаны с замещением антрахинонового кольца электронодонорными заместителями, такими как amino- и гидроксильные группы [97]. Соотношение интенсивностей этих полос поглощения сильно зависит от концентрации препарата, рН и микроокружения [91, 103, 133, 148]. Эту зависимость обычно связывают со способностью МИТ к самоассоциации [149]. Полоса поглощения в области 660 нм соответствует мономерной форме МИТ, а при 610 нм — ассоциирована с димерной конфигурацией молекулы. Дополнительное плечо при ~560 нм свидетельствует о наличии высших ассоциатов (тримеров и других ассоциатов).

В работе использовали растворы МИТ с концентрацией ≤ 5 мкМ для минимизации образования димеров и высших ассоциатов. Для раствора МИТ в воде оптическая плотность максимума поглощения мономера выше, чем димера (рис. 3в). В ФСБ оптическая плотность обеих полос поглощения уменьшается и слегка смещается в область более длинных волн (рис. 3в). Данный эффект связан с депротонированием функциональных групп молекулы МИТ. Отношение оптической плотности мономера к димеру МИТ в воде и ФСБ составляет 1,2 и 1,0 соответственно.

Спектры возбуждения и испускания МИТ показаны на рисунке 3в. Спектр возбуждения МИТ в водном растворе имеет несколько максимумов возбуждения: при 280 нм ($\pi\text{—}\pi^*$ переходы), 390 нм ($n\text{—}\pi^*$ переходы), 610 и 660 нм (соответствуют полосам поглощения). Максимум люминесценции локализован при 685 нм (стоксов сдвиг 25 нм). Важно отметить, что люминесцирует только мономерная форма молекулы [99], интенсивность испускания нелинейно зависит от концентрации и pH [97,99], сильное перекрытие полос возбуждения и испускания осложняет детектирование при $\lambda_{\text{возб.}} = 660$ нм. В связи с этим для возбуждения люминесценции МИТ выбрана $\lambda_{\text{возб.}}$ при 610 нм, обеспечивающая оптимальное соотношение сигнал/шум.

Учитывая широкий спектр возбуждения МИТ (280–660 нм), проведена оценка его потенциального вклада в результирующую люминесценцию системы КТ-МИТ. Для всех исследуемых КТ предпочтительно использовать $\lambda_{\text{возб.}}$ люминесценции при 360 нм. Спектр люминесценции МИТ при возбуждении на 610 и 360 нм показан на рисунке 3в. По сравнению с использованием более эффективного возбуждения МИТ (610 нм) интенсивность люминесценции при $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм уменьшается более чем на 90%. Кроме того, МИТ имеет низкий КВ люминесценции (около 1–5%) [97,100], что позволяет оценить испускание только КТ при $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм.

Таким образом, при $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм позволяет минимизировать вклад МИТ в общий сигнал (<2% от интенсивности КТ) и корректно анализировать люминесцентные характеристики КТ в системе КТ-МИТ.

3.2 Тушение люминесценции квантовых точек в стационарном режиме

В данной работе для изучения процесса тушения люминесценции КТ выбраны концентрации МИТ от 1 до 5000 нМ. Спектры люминесценции и УФ-фотография микропланшета с фракциями КТ AgInS/ZnS, CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS в присутствии различных концентраций МИТ представлены на рисунках 5 и 6. Увеличение концентрации МИТ вызывает постепенное уменьшение интенсивности люминесценции для всех КТ, при этом форма спектра и длина волны максимума испускания остаются неизменными. Это свидетельствует о том, что структура

нанокристаллов КТ не изменяется. Для КТ CdZnSeS при низких концентрациях МИТ (1–10 нМ) наблюдается увеличение интенсивности люминесценции, а затем (>10 нМ) уменьшение (рис. 6). Тот факт, что максимум люминесценции и форма спектра не зависят от концентрации МИТ, исключает образование новых поверхностных состояний. Аналогичный эффект был описан для КТ CdSe в присутствии некоторых аминов [77,150,151] и объяснен образованием комплексов КТ–амин, что приводит к пассивации поверхности КТ, подавляя безызлучательную рекомбинацию на поверхностных вакансиях, но механизм данного явления до конца не изучен. Наличие вторичных аминогрупп в структуре МИТ может вызывать аналогичные эффекты, при которых наблюдается увеличение интенсивности люминесценции при низких концентрациях МИТ. Данный эффект также может быть связан с возможным смещением равновесия лигандов ТГК L-типа и X-типа [152].

На основе полученных данных построены профили тушения люминесценции КТ. Для этого интенсивность люминесценции КТ в присутствии МИТ нормализована на интенсивность КТ в отсутствие МИТ. Максимальная концентрация МИТ (5000 нМ) приводит к полному тушению люминесценции всех фракций КТ AgInS/ZnS (рис. 5). Для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS концентрация МИТ, приводящая к полному тушению люминесценции КТ, составила 1000 нМ (рис. 6). Профили тушения проанализированы в диапазоне концентраций МИТ от 1 до 1000 нМ (рис. 7а). Тушение было различным для фракций КТ AgInS/ZnS, что, предположительно, связано с изменением размера КТ и количества молекул лигандов ТГК на их поверхности. Полученные профили тушения для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS (рис. 7б) практически идентичны, что свидетельствует о том, что наличие оболочки ZnS не оказывает значительного влияния тушение люминесценции КТ в присутствии МИТ.

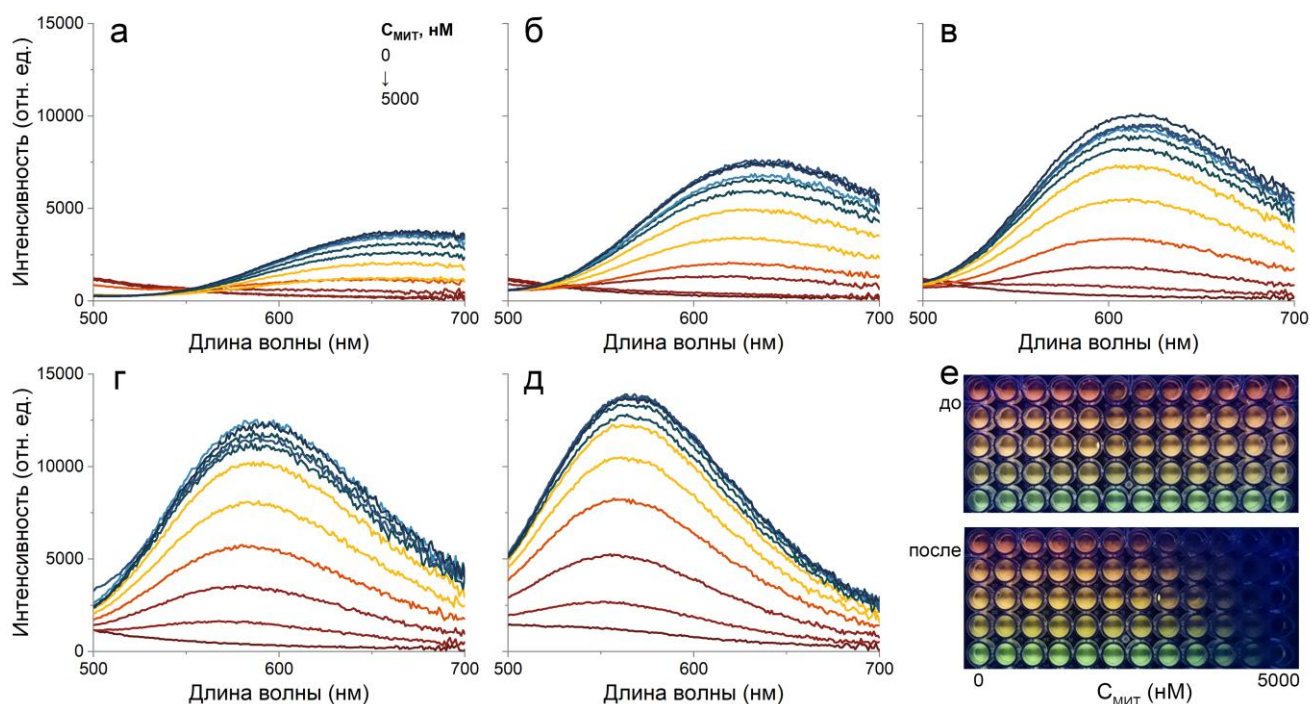


Рисунок 5. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) (а–д) и фото лунок планшета в УФ-свете (е) с фракциями КТ AgInS/ZnS до и после добавления МИТ.

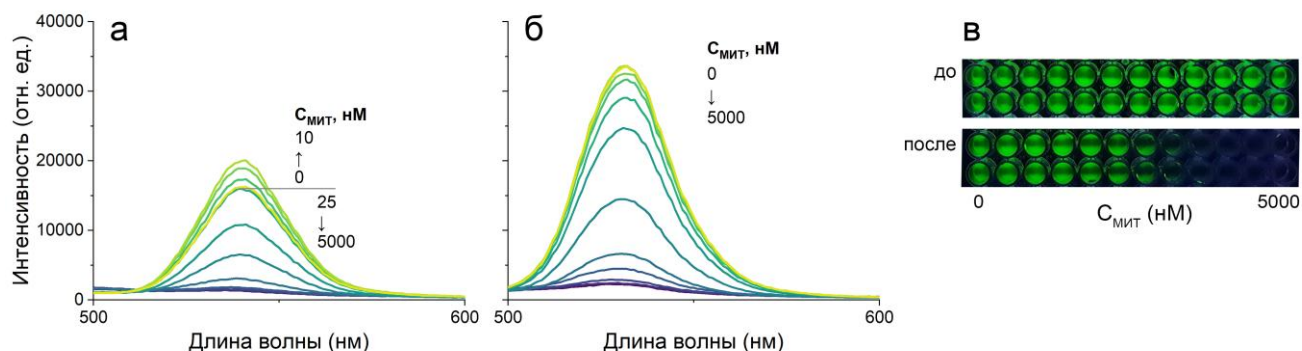


Рисунок 6. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) КТ CdZnSeS (а) и CdZnSeS/ZnS (б), фото лунок планшетов в УФ-свете (в) с до и после добавления МИТ.

В исследованном диапазоне концентраций МИТ графики Штерна–Фольмера не были линейными для всех КТ (рис. 7 в, г). Отклонения вниз от линейности графика Штерна–Фольмера показывают, что механизм тушения люминесценции КТ МИТ является сложным и может сочетать несколько видов тушения (например, динамическое и статическое). Взаимодействие КТ в возбужденном состоянии с тушителем приводит к безызлучательной дезактивации КТ в основное состояние в случае динамического тушения [153,154] и к образованию электростатического комплекса [155] в случае статического тушения.

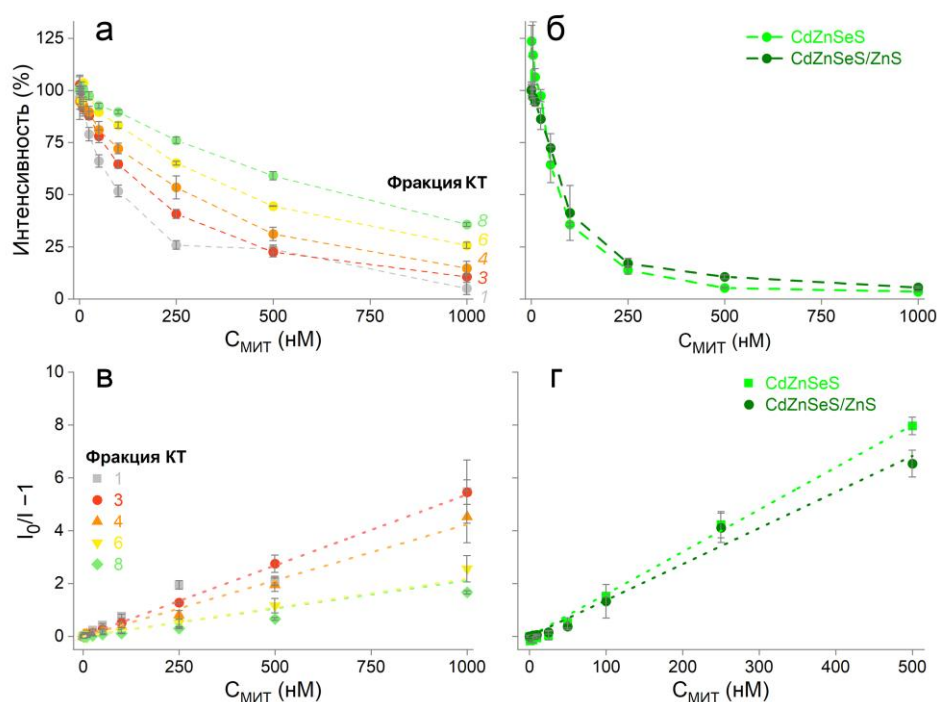


Рисунок 7. Профили тушения люминесценции (а, б), графики Штерна-Фольмера (в, г) фракций КТ AgInS/ZnS (слева), CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS (справа) в присутствии МИТ.

Для определения достоверных K_{SV} выбраны диапазоны концентраций МИТ 1–1000 нМ для фракций КТ AgInS/ZnS и 1–500 нМ для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS ($R^2 > 0,97$), поскольку при более высоких концентрациях МИТ наблюдаются отклонения от линейности. K_{SV} зависит от номера фракции (размера) КТ AgInS/ZnS, за исключением AgInS/ZnS_1 (табл. 3). K_{SV} уменьшается с увеличением размера КТ AgInS/ZnS и имеют одинаковый порядок (10^6 M^{-1}). K_{SV} для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS (табл. 3) имеют более высокие значения ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$), чем для КТ AgInS/ZnS ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$), следовательно данные КТ потенциально более чувствительны к присутствию МИТ.

Таблица 3. Константы Штерна-Фольмера ($K_{SV} \times 10^{-7}, \text{M}^{-1}$)

Фракция AgInS/ZnS						CdZnSeS	CdZnSeS/ZnS
1	3	4	6	8			
$0,54 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	$0,160 \pm 0,002$		$1,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$

3.3 Тушение люминесценции квантовых точек во время-разрешенном режиме

Измерение времени жизни люминесценции при различных концентрациях тушителя является надежным методом различения статического и динамического

тушения. В случае статического тушения время жизни люминесценции в присутствии тушителя не изменяется ($\tau_0/\tau = 1$), а зависимость I_0/I от $[Q]$ линейна во всем диапазоне $[Q]$. В случае динамического тушения K_{SV} определяется уравнением 4.

Для аналитически значимого диапазона концентраций МИТ (1–100 нМ) проведен детальный анализ кинетики затухания люминесценции (рис. 8). Для всех фракций КТ AgInS/ZnS изменения времени жизни в отсутствие и присутствии МИТ оказались статистически незначимыми (рис. 9а). Например, для AgInS/ZnS_3 $\tau_0 = (576 \pm 10)$ нс в отсутствие МИТ, $\tau = (522 \pm 10)$ нс при МИТ 100 нМ. Во всем диапазоне концентраций МИТ отношение τ_0/τ составило $1,03 \pm 0,04$, что указывает на незначительные изменения времени жизни люминесценции КТ. Эти данные указывают на преимущественно статический механизм тушения для всех фракций КТ AgInS/ZnS.

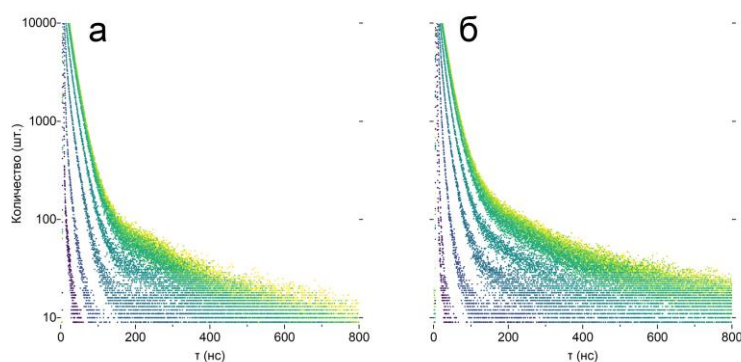


Рисунок 8. Кривые затухания люминесценции при добавлении МИТ (0–100 нМ) для КТ CdZnSeS (а) и CdZnSeS/ZnS (б).

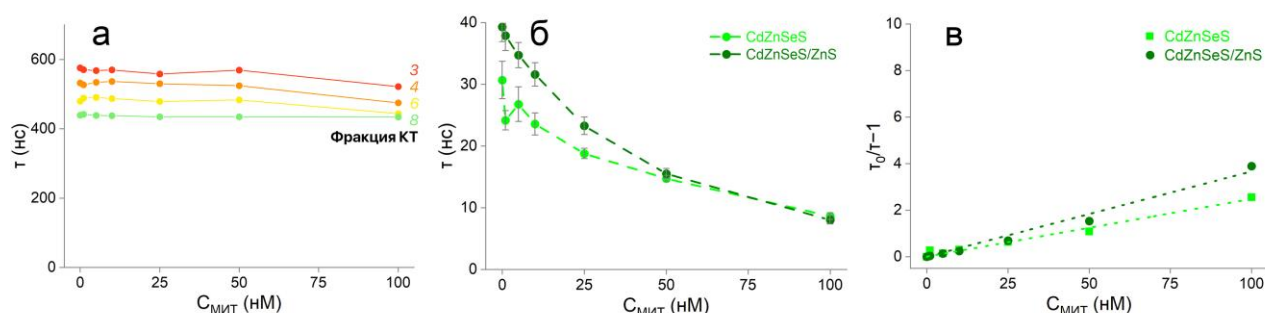


Рисунок 9. Изменение времени жизни люминесценции (а) для фракций КТ AgInS/ZnS, (б) КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS в присутствии МИТ и (в) графики Штерна-Фольмера.

Для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS изменения времени жизни люминесценции наблюдались во всем диапазоне концентраций МИТ (рис. 9б). Для КТ CdZnSeS при

5 нМ МИТ наблюдается увеличение времени жизни люминесценции (аналогично интенсивности испускания), а затем (>10 нМ МИТ) уменьшение (рис. 9б). Графики Штерна-Фольмера (рис. 9в) в выбранном диапазоне были линейными с $R^2 = 0,98$. Значения K_{SV} составили $(2,48 \pm 0,05) \times 10^7$ и $(3,66 \pm 0,07) \times 10^7$ M^{-1} , рассчитанные k_q , согласно уравнению 4 составили $(8,1 \pm 0,2) \times 10^{14}$ и $(9,3 \pm 0,2) \times 10^{14}$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$ для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, соответственно. Эти кажущиеся значения k_q слишком велики, чтобы быть физически обоснованными и надежно описывать процесс тушения. В водном растворе верхний предел k_q составляет порядка 10^{10} $M^{-1} \cdot c^{-1}$. k_q связана с частотой столкновений уравнением 10. Согласно которому, когда $\gamma = 1$, то k_0 является верхним пределом k_q . Используя уравнение Смолуховского (уравнение 11) для оценки k_0 [156], был рассчитан верхний предел $k_q = k_0$ для системы КТ-МИТ, который составил $3,5 \times 10^{10}$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$ и $4,0 \times 10^{10}$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$ для CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, соответственно. Анализ Штерна-Фольмера в режиме-разрешенном режиме дает кажущееся значение k_q , которое более чем в 10^4 раз превышает верхний предел. Это свидетельствует о том, что вклад динамического тушения минимален. Таким образом, тушение люминесценции всех КТ в присутствии МИТ происходит преимущественно по статическому механизму.

На основании анализа литературных данных и полученных экспериментальных результатов можно сделать вывод, что доминирующим механизмом тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ является ФПЭ, а не ФРПЭ. Это подтверждается несколькими ключевыми наблюдениями. Во-первых, МИТ, являясь хиноновым антибиотиком с выраженными окислительно-восстановительными свойствами, действует как эффективный акцептор электронов. Высшая занятая молекулярная орбиталь и низшая вакантная молекулярная орбиталь МИТ позволяют ему принимать возбужденный электрон с поверхности КТ. Во-вторых, решающим аргументом против механизма ФРПЭ является отсутствие необходимого (достаточного) спектрального перекрытия: МИТ не имеет четких полос поглощения (610–660 нм) в спектральной области люминесценции КТ AgInS/ZnS ($\lambda_{исп.} = 558$ –606 нм) и CdZnSeS/ZnS ($\lambda_{исп.} = 525$ нм). В-третьих, кинетика процесса, а именно наблюдаемый статический характер

тушения, подтверждаемый линейностью зависимости Штерна-Фольмера, и высокие константы скорости тушения ($k_q > 10^{10} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), являются классическими критериями механизма ФПЭ, который происходит значительно быстрее излучательной рекомбинации.

Механизм тушения люминесценции в сложных системах с участием наноструктур часто многогранен и может включать комбинацию нескольких конкурирующих процессов (статическое и динамическое тушение, образование нековалентных комплексов и другие пути безызлучательной релаксации). Экспериментальное разделение и количественная оценка вклада каждого из этих процессов представляют собой отдельную и методически сложную задачу. Таким образом, на основании совокупности имеющихся экспериментальных данных и литературных источников мы приходим к выводу о преобладании механизма ФПЭ в исследуемой системе в данных условиях.

3.4 Связывание квантовых точек с митоксантроном

3.4.1 Исследование по тушению люминесценции квантовых точек

Для количественной оценки взаимодействия между КТ и МИТ были рассчитаны константы связывания ($K_{св.}$), используя метод люминесцентного тушения (двойное логарифмическое уравнение Штерна-Фольмера), описанный для биомолекулярных систем [157]. В последние годы данный подход применяется для изучения связывания наноматериалов, включая КТ, с низкомолекулярными соединениями [158–160]. Следует отметить, что применение к наноразмерным объектам, может иметь определенные ограничения, связанные с их структурными особенностями.

Следует отметить, что $K_{св.}$ для КТ с МИТ значительно выше, чем сообщаемые в литературе $K_{св.}$ для МИТ с ЧСА ($\sim 2 \times 10^5 \text{ М}^{-1}$) [95] и с ДНК ($\sim 4 \times 10^5 \text{ М}^{-1}$) [94,103]. То есть, между КТ и МИТ может образоваться более сильный комплекс. Предположительно МИТ может преимущественно связываться с КТ, что потенциально будет ингибировать взаимодействие с ЧСА, ДНК и другими компонентами биологических жидкостей. Данный эффект открывает перспективы

определения МИТ в сложных матрицах, например, плазме крови без необходимости трудоемкой пробоподготовки.

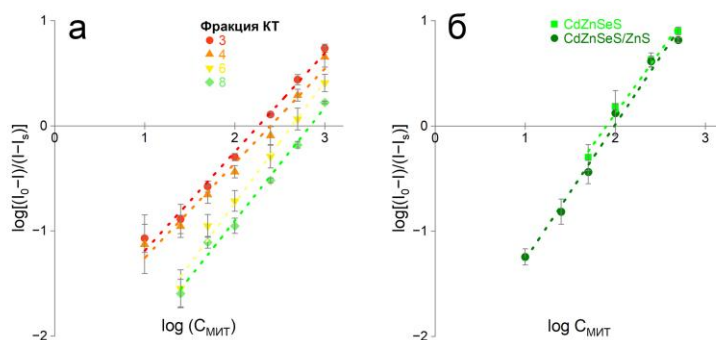


Рисунок 10. Двойной логарифмический график тушения люминесценции (а) для фракций КТ AgInS/ZnS, (б) КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS в присутствии МИТ.

Число эквивалентных сайтов связывания (n) для всех изученных КТ близко к 1, что формально соответствует стехиометрии 1:1. Это позволяет предположить, что один нанокристалл КТ связан с одной молекулой МИТ независимо от размера и состава. Важно отметить, что использованный подход предполагает упрощенную модель взаимодействия, в рамках которой считается, что одна молекула тушителя связывается с одним сайтом (лигандом) на поверхности КТ. В реальности, многоцентровой характер поверхности КТ может допускать более сложные взаимодействия, например, возможно связывание нескольких молекул МИТ на поверхности одной КТ и наличие вклада объемных эффектов и неоднородности поверхности нанокристалла. Для более точного описания взаимодействия МИТ с КТ требуются дополнительные исследования, включая молекулярное моделирование и методы прямого определения стехиометрии комплексов.

Таблица 4. Константы связывания ($K_{св.} \times 10^{-7}$, M^{-1}) и число эквивалентных сайтов связывания (n).

	Фракция AgInS/ZnS				CdZnSeS	CdZnSeS/ZnS
	3	4	6	8		
$K_{св.}$	$0,670 \pm 0,006$	$0,548 \pm 0,008$	$0,480 \pm 0,011$	$0,250 \pm 0,004$	$1,25 \pm 0,09$	$1,03 \pm 0,09$
n	1,05	1,02	0,86	0,92	1,19	1,28

3.4.2 Исследование по тушению люминесценции митоксантрона

Тушение люминесценции молекул МИТ в присутствии КТ изучалось при стационарном возбуждении КТ AgInS/ZnS_3 и CdZnSeS/ZnS, показавших наибольшую эффективность тушения. КТ CdZnSeS не были рассмотрены в

дальнейших экспериментах в следствии наблюдаемых отклонений при низких концентрация МИТ, которые затруднительно интерпретировать. Спектры испускания МИТ (5 мкМ) в присутствии различных концентраций КТ показаны на рисунке 11 (а, г). Увеличение концентрации КТ приводит к постепенному уменьшению интенсивности испускания МИТ, при этом форма спектра и длина волны максимума остаются неизменными.

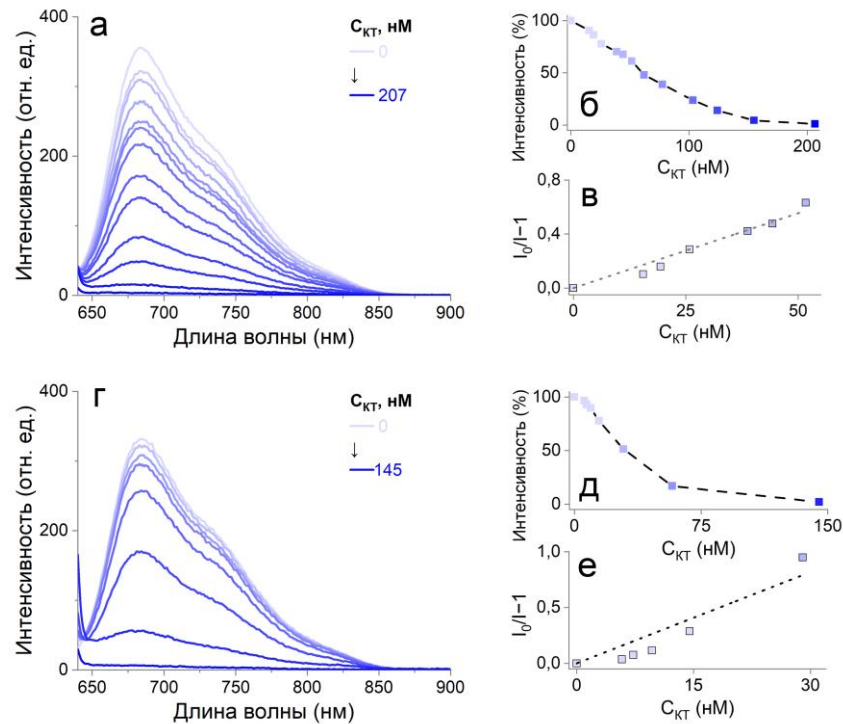


Рисунок 11. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 610 \text{ нм}$) (а, г) МИТ и профили тушения люминесценции МИТ (б, д), графики Штерна-Фольмера (в, е) в присутствии третьей фракции КТ AgInS/ZnS (сверху) и CdZnSeS/ZnS (снизу).

На основе полученных данных были построены профили тушения люминесценции МИТ. Для этого интенсивность люминесценции МИТ в присутствии КТ была нормирована на интенсивность люминесценции МИТ в отсутствие КТ (рис. 11 б, д). Максимальные концентрации КТ AgInS/ZnS_3 (207 нМ) и КТ CdZnSeS/ZnS (145 нМ) привели к тушению люминесценции МИТ более чем на 98%. Тушение люминесценции МИТ на 50% наблюдалось при ~60 нМ КТ AgInS/ZnS и ~30 нМ КТ CdZnSeS/ZnS (рис. 11 б, д). Следует отметить, что 50% тушение люминесценции КТ под действием МИТ достигалось при концентрациях МИТ ~200 и ~100 нМ для КТ AgInS/ZnS и КТ CdZnSeS/ZnS, соответственно. В

исследованном диапазоне концентраций КТ графики Штерна-Фольмера не были линейными для всех КТ. Отклонение от линейности вверх также подтверждает сложный механизм тушения (сочетает динамическое и статическое тушение). Для расчета K_{SV} были выбраны концентрации КТ 15–52 нМ (для КТ AgInS/ZnS) и 6–29 нМ (для КТ CdZnSeS/ZnS) (рис. 11 в, е). R^2 для КТ AgInS/ZnS составляет 0,96, а для КТ CdZnSeS/ZnS — 0,86, в выбранных диапазонах концентраций. Рассчитанные значения K_{SV} по тушению люминесценции МИТ (табл. 5) имеют одинаковый порядок.

Для определения $K_{св.}$ МИТ с КТ был построен двойной логарифмический график Штерна-Фольмера (рис. 13а). R^2 для всех КТ превышает 0,95, что подтверждает линейную зависимость. Рассчитанные значения $K_{св.}$ (табл. 5) имеют одинаковый порядок для КТ AgInS/ZnS и КТ CdZnSeS/ZnS.

Различия в полученных K_{SV} и $K_{св.}$ при тушении люминесценции КТ и тушении люминесценции МИТ могут быть обусловлены тем, что в процессе тушения люминесценции КТ участвуют молекулы МИТ, которые могут находиться в виде мономеров, димеров и других ассоциатов. При тушении люминесценции МИТ учитывается только мономер, поскольку только он обладает значимой люминесценцией [99]. Для всех КТ n близко по значению и равно примерно 2. Это предполагает, что одна молекула МИТ формально связана с двумя КТ, независимо от их размера и состава.

3.4.3 Исследование по изменению спектров поглощения митоксантрона

Для исследования взаимодействия МИТ с КТ с использованием данных по поглощению в том же диапазоне концентраций КТ, что и для тушения люминесценции МИТ (раздел «3.4.2 Исследование по тушению люминесценции МИТ»). Концентрация МИТ была зафиксирована на уровне 5 мкМ. Закономерности изменения спектров поглощения МИТ были исследованы с использованием КТ AgInS/ZnS_3 и CdZnSeS/ZnS (рис. 12, 13). Индивидуальные молекулы ТК, несвязанные с КТ, не оказывают влияния на оптические свойства МИТ (данные не представлены). Следовательно, возможное присутствие поверхностного лиганда в коллоиде КТ не способствует изменению полос поглощения МИТ.

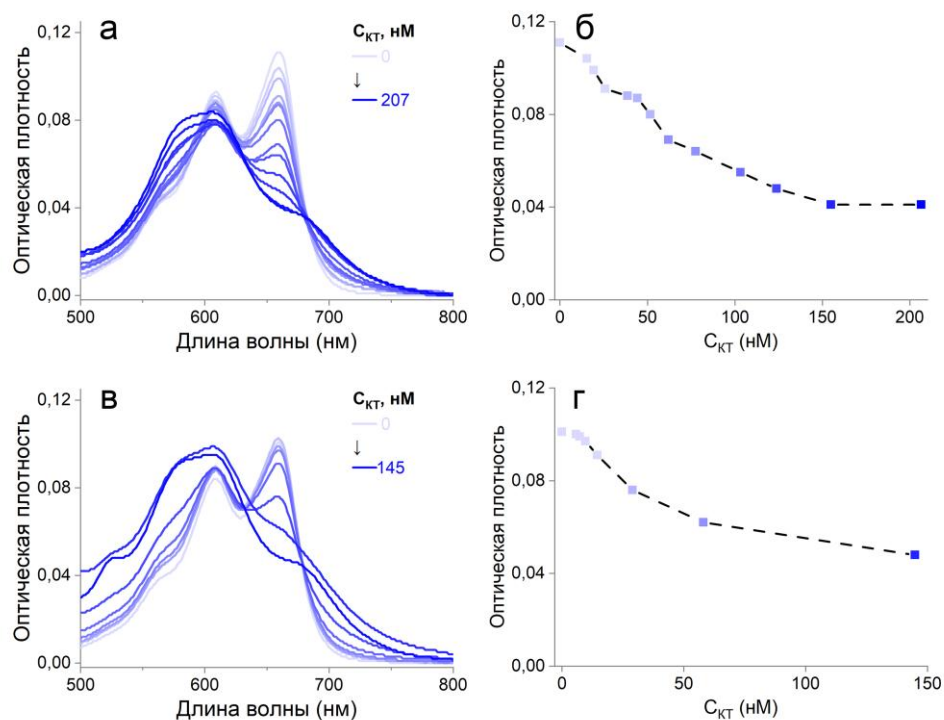


Рисунок 12. Спектры поглощения (а, в) МИТ и изменение оптической плотности при 660 нм (б, г) в присутствии фракции КТ AgInS/ZnS_3 (сверху) и CdZnSeS/ZnS (снизу).

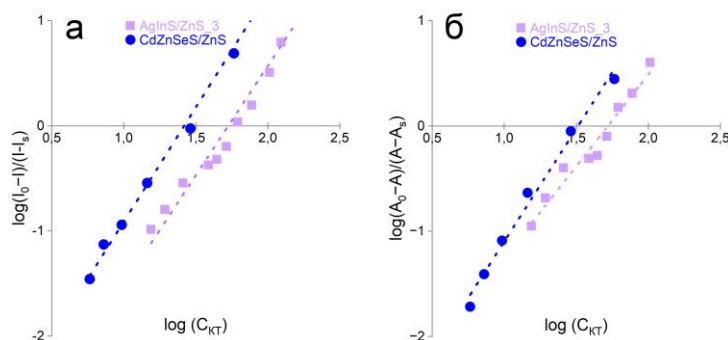


Рисунок 13. Двойной логарифмический график тушения люминесценции (а) и изменения спектров поглощения (б) МИТ в присутствии фракции КТ AgInS/ZnS_3 и CdZnSeS/ZnS .

В присутствии КТ AgInS/ZnS изменяется соотношение полос мономера и димера в спектрах поглощения МИТ, для КТ CdZnSeS/ZnS эти изменения были менее выражены (рис. 12 а, в). При увеличении концентрации КТ AgInS/ZnS_3 наблюдается гипохромный эффект на мономерных и димерных полосах поглощения МИТ, вплоть до концентрации КТ около 77 нМ (рис. 12а). При дальнейшем увеличении концентрации КТ AgInS/ZnS оптическая плотность полосы мономера уменьшается, а полоса димера уширяется и появляется плечо при 560 нм. При постепенном добавлении КТ CdZnSeS/ZnS гипохромный эффект

наблюдается только на мономерной полосе поглощения МИТ (рис. 12в), оптическая плотность полосы димера увеличивается и появляется плечо при 560 нм. Добавление более 30 нМ КТ приводит к значительному уширению полосы димера без выраженного плеча при 560 нм. Описанные изменения могут быть связаны с самоассоциацией МИТ и образованием комплекса МИТ-КТ. Изменение оптической плотности при 660 нм с ростом концентрации КТ показано на рисунке 12 (б, г). Увеличение концентрации КТ выше 140–150 нМ приводит к насыщению (оптическая плотность не изменяется).

Таблица 5. Константы Штерна-Фольмера (K_{SV}) и константы связывания ($K_{св.}$) и число эквивалентных сайтов связывания (n).

Образец КТ	$K_{SV} \times 10^7, M^{-1}$	$K_{св.} \times 10^7, M^{-1}$	n
<i>По тушению люминесценции</i>			
AgInS/ZnS_3	1,1	1,88	2,08
CdZnSeS/ZnS	2,7	3,81	2,17
<i>По спектрам поглощения</i>			
AgInS/ZnS_3	–	2,00	1,90
CdZnSeS/ZnS	–	3,08	2,14

На основании полученных данных и модифицированного подхода, описанного выше, были определены $K_{св.}$ МИТ с КТ. Двойной логарифмический график Штерна-Фольмера представлен на рисунке 13б. R^2 для всех КТ превышает 0,95 в выбранном диапазоне концентраций МИТ, что подтверждает линейную зависимость. Рассчитанные значения $K_{св.}$ для МИТ с КТ (табл. 5) имеют одинаковый порядок.

Следует отметить, что значения $K_{св.}$, полученные по тушению люминесценции МИТ и изменению полосы поглощения мономера МИТ, близки. Для всех КТ значения n близки ($n \approx 2$). Это предполагает, что одна молекула МИТ может быть связана с двумя КТ, независимо от их размера и состава.

3.4.4 Схема взаимодействия квантовых точек с митоксантроном

В водном растворе молекула МИТ в форме гидрохлорида подвергается диссоциации с образованием двух хлорид-анионов (Cl^-) и двухвалентного катиона, что обусловлено протонированием двух атомов азота в боковых цепях молекулы (рис. 1). Вследствие частичной диссоциации ТКК на поверхности КТ, они имеют

отрицательный заряд (табл. 2). Это обеспечивает условия для формирования устойчивых комплексов МИТ-КТ, стабилизированных за счет электростатических взаимодействий между противоположно заряженными частицами, а также гидрофобных сил.

Результаты показали, что число эквивалентных сайтов связывания одной молекулы МИТ с КТ составляет приблизительно 2 независимо от их размерных характеристик и химического состава. Это свидетельствует о том, что каждая молекула МИТ способна взаимодействовать одновременно с двумя нанокристаллами КТ. В то же время, расчеты демонстрируют, что количество эквивалентных сайтов связывания КТ с МИТ составляет около 1, что подразумевает связывание нанокристалла КТ с одной молекулой МИТ.

На основании полученных данных предложена схема образования комплекса МИТ-КТ (рис. 14). МИТ может взаимодействовать с двумя нанокристаллами КТ посредством электростатических сил. Параллельно возможно протекание процесса самоассоциации молекул МИТ, обусловленного формированием межмолекулярных водородных связей. Как продемонстрировано в работе В. Davis с соавторами [149], подобные взаимодействия могут возникать между вторичными аминогруппами боковых цепей МИТ и гидроксильными фрагментами хромофорной части молекулы антибиотика, находящимися в пространственной близости. Стабилизация межмолекулярных водородных связей дополнительно усиливается за счет образования протяженной сети водородных связей между соседними молекулами МИТ.

Важно отметить, что процесс самоассоциации МИТ не препятствует образованию комплексов между его димерными, тримерными или более высокоагрегированными формами и частицами КТ (рис. 14). В результате такого взаимодействия формируются крупные агрегаты МИТ-КТ, размеры которых достигают микронного диапазона. Наличие данных агрегатов подтверждается методами оптической микроскопии, что иллюстрируется микрофотографиями коллоидных растворов КТ после добавления МИТ (рис. 15).

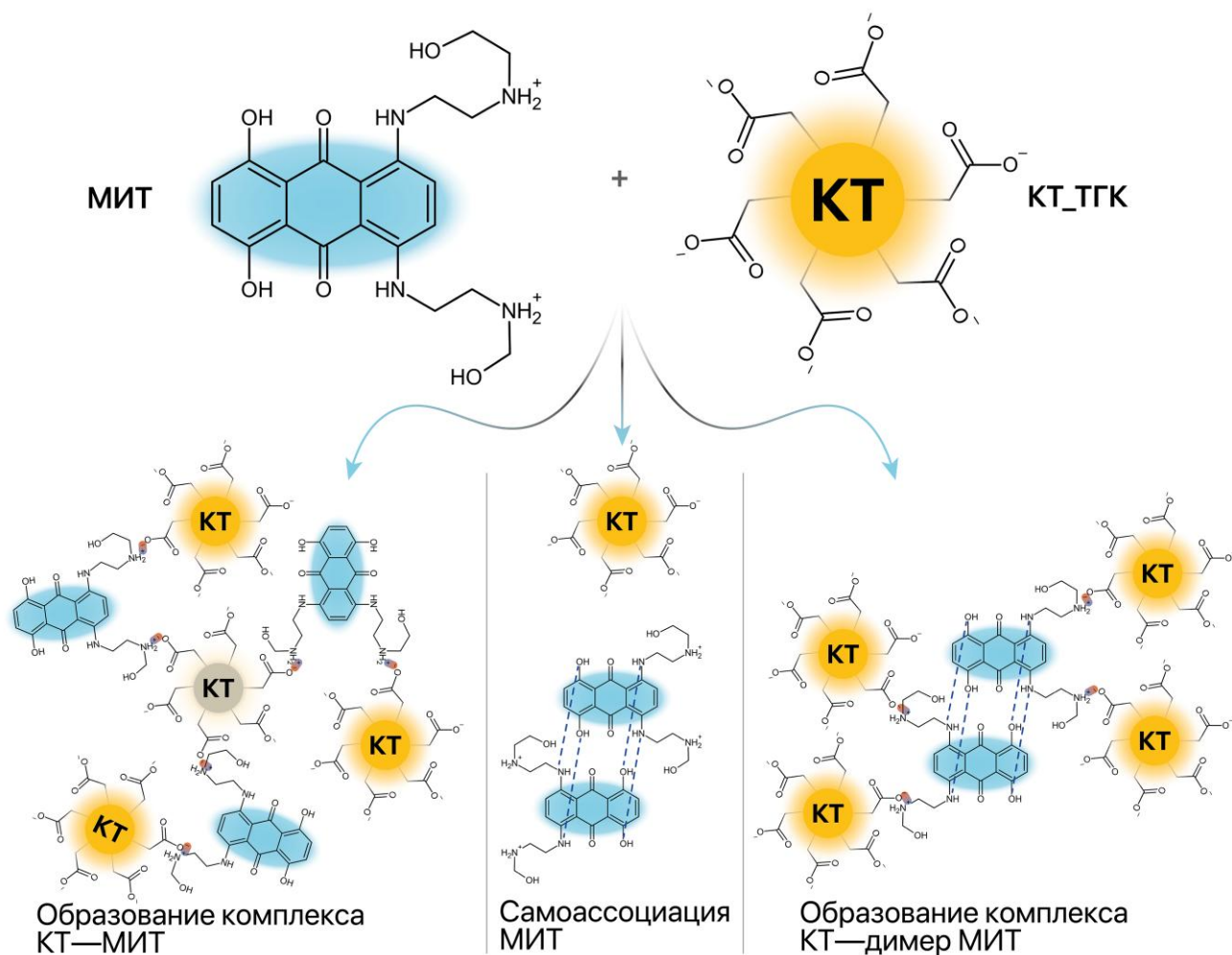


Рисунок 14. Схема взаимодействия МИТ с КТ.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод о сложном характере взаимодействия МИТ с КТ, включающем как электростатические и гидрофобные эффекты, так и процессы молекулярной ассоциации.

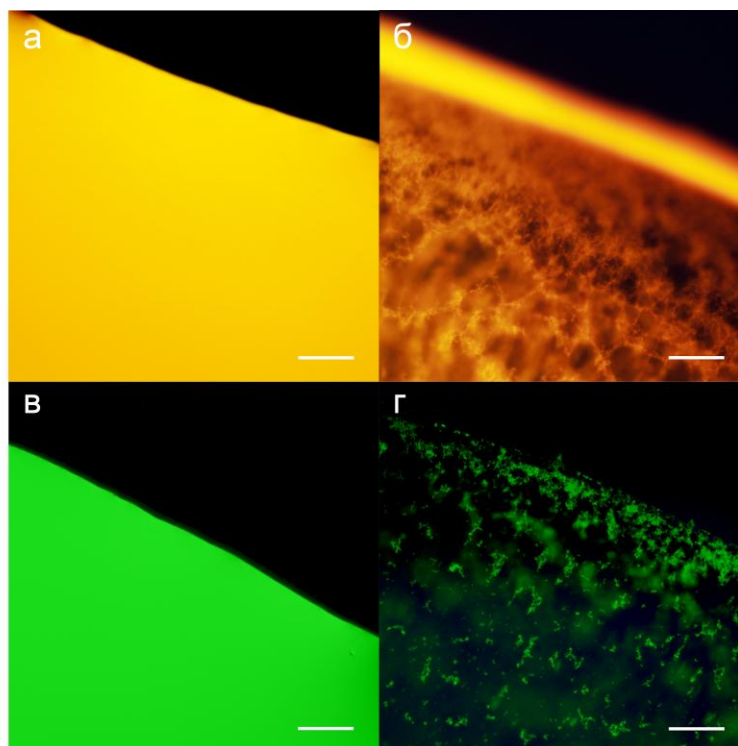


Рисунок 15. Изображения оптической микроскопии края капли фракции КТ AgInS/ZnS_3 (сверху) и CdZnSeS/ZnS (снизу) до (а, в) и после (б, г) добавления МИТ (величина размерной шкалы 50 мкм).

3.5 Влияние матричного компонента на тушение люминесценции квантовых точек

Перед изучением кинетических закономерностей взаимодействия МИТ с КТ в биологических средах (таких как кровь, плазма, моча) необходимо изучить потенциальное влияние компонентов биологической матрицы на исследуемый процесс. Биологические жидкости представляют собой сложные многокомпонентные системы, содержащие белки, липиды, электролиты и другие соединения, которые могут существенно влиять на протекание реакций.

Для корректной интерпретации данных целесообразно проведение предварительных исследований с использованием модельных систем, имитирующих состав биологических сред. Такой подход позволяет оценить вклад отдельных матричных компонентов в процесс тушения люминесценции КТ; оптимизировать условия проведения анализа; учесть возможные артефакты, связанные с неспецифическим связыванием аналита с компонентами матрицы.

Среди матричных макромолекул наибольший интерес представляют белки плазмы крови, в частности сывороточные альбумины, благодаря их высокой концентрации и выраженной способности к связыванию низкомолекулярных соединений. Для исследования влияния матричного компонента крови на процесс тушения люминесценции КТ в качестве модельного белка крови был использован БСА. Учитывая высокое связывание МИТ с белками [96,161], предварительно было изучено их взаимодействие и оценена константа связывания.

Для исследования влияния МИТ на люминесцентные свойства белка был выбран диапазон концентраций МИТ от 0,5 до 80 мкМ, концентрация БСА составила 2,5 мкМ. Показано, что при увеличении концентрации МИТ происходит тушение люминесценции БСА (рис. 16 а, б). Рассчитанное значение K_{SV} составило $5,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Полученные значения (рис. 17а) $K_{св.}$ и n ($K_{св.} = 4,76 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 1,08$) согласуются с литературными данными [158].

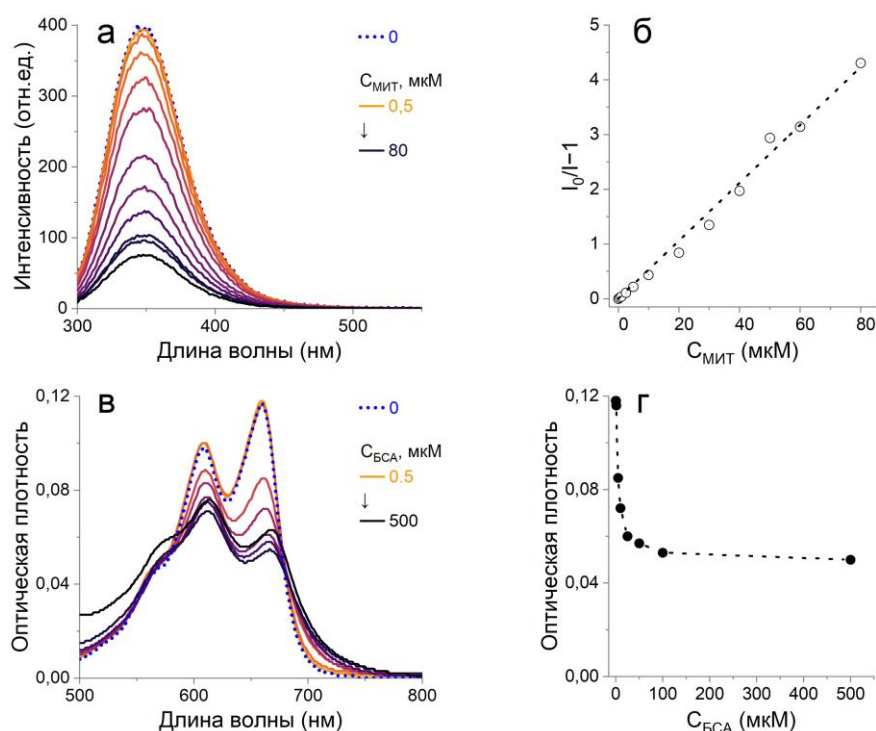


Рисунок 16. Спектры испускания БСА (2,5 мкМ) (а), графики Штерна-Фольмера (б) в присутствии МИТ. Спектры поглощения МИТ (5 мкМ) (в), изменение поглощения при 660 нм (г) в присутствии БСА.

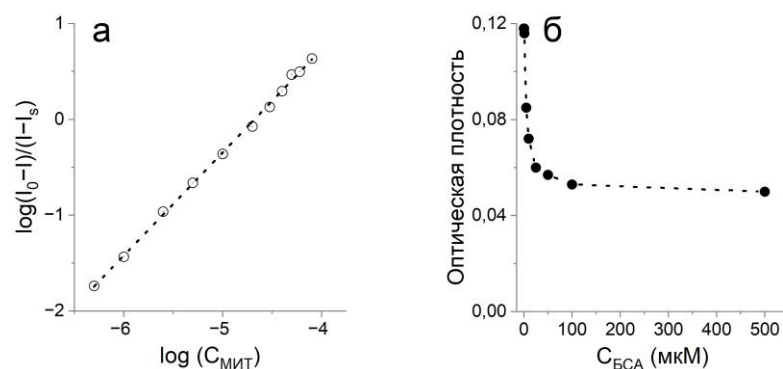


Рисунок 17. Двойной логарифмический график тушения люминесценции БСА (а) и изменения поглощения МИТ (б).

Для исследования взаимодействия БСА и МИТ были проанализированы спектры поглощения МИТ (5 мкМ) в присутствии БСА различной концентрации (от 1 до 500 мкМ) (рис. 16 в, г). При увеличении концентрации БСА происходит уменьшение оптической плотности полосы поглощения мономера МИТ, что указывает на образование комплекса БСА-МИТ. Полученные значения $K_{св.}$ и n составили $K_{св.} = 1,23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 1,36$ (рис. 17б). Завышенное значение $K_{св.}$ может быть связано с высокой концентрации белка, которая приводит к значительному рассеиванию в области поглощения МИТ (660 нм). В связи с этим, анализировать эти данные некорректно.

Для изучения влияния БСА на процесс тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ были проанализированы КТ AgInS/ZnS_3 и CdZnSeS/ZnS, стабилизированных ТКК. Для исследования была выбрана концентрация БСА приближенная к концентрации общего белка в крови ($\sim 1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Было установлено, что в присутствии БСА интенсивность люминесценции КТ AgInS/ZnS_3 уменьшается на $\sim 45\%$ (рис. 18а). В присутствии МИТ в системе КТ-БСА наблюдается уменьшение интенсивности люминесценции КТ и изменение положения максимума (рис. 18б). Присутствие БСА приводит к снижению K_{SV} примерно в 5 раз, значение составило $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (в воде $\sim 5,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (рис. 18в). Учитывая данные изменения в оптических свойствах КТ AgInS/ZnS_3 использование тушения их люминесценции для детектирования МИТ в биологических жидкостях нецелесообразно.

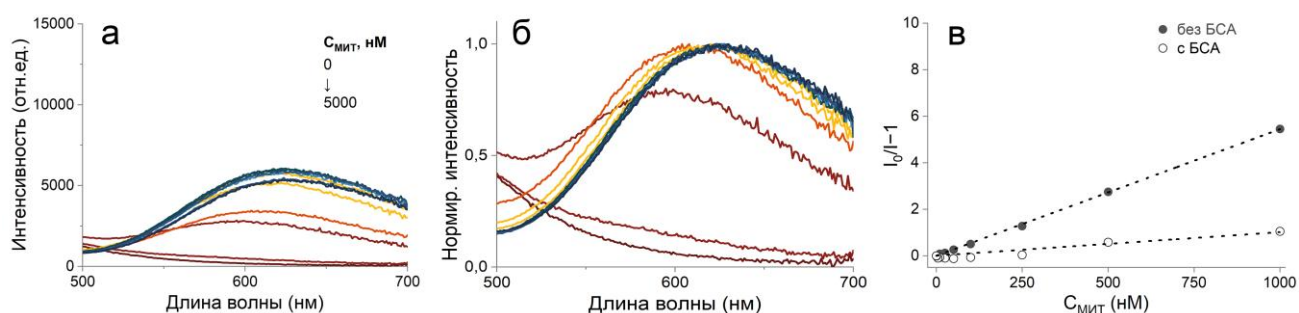


Рисунок 18. Спектры люминесценции ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) КТ AgInS/ZnS_3 в присутствии МИТ и БСА графики Штерна-Фольмера без и присутствии БСА.

Для КТ CdZnSeS/ZnS исходная интенсивность люминесценции и положение максимума в присутствии БСА уменьшается на 25% (рис. 19а). Присутствие БСА приводит к снижению K_{SV} в меньшей степени, чем для КТ AgInS/ZnS, значение составило $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (в воде $\sim 1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (рис. 19б).

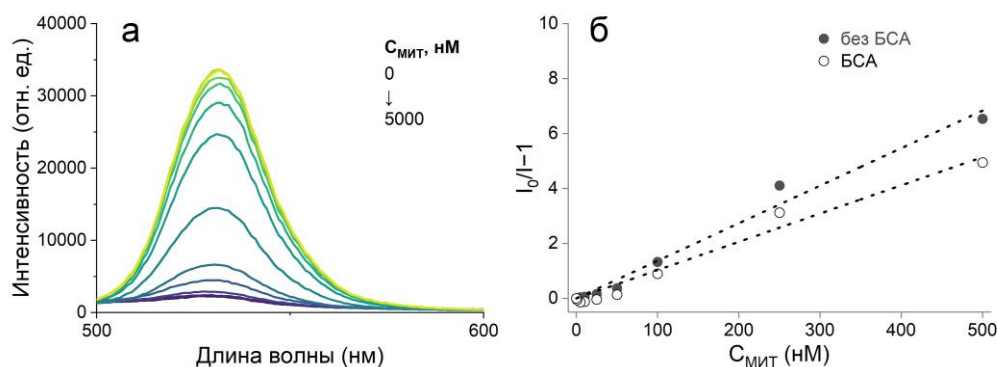


Рисунок 19. Спектры люминесценции ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) КТ CdZnSeS/ZnS в присутствии МИТ и БСА, графики Штерна-Фольмера без и присутствии БСА.

Таким образом, КТ на основе CdZnSeS/ZnS демонстрируют преимущества перед AgInS/ZnS для детекции МИТ в биологических средах, такие как: высокая стабильность люминесцентного сигнала, меньшая чувствительность к матричным эффектам, сохранение чувствительности в присутствии белка.

Заключения по 3 главе:

Установлены закономерности и механизм тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ. Сравнительный анализ двух типов нанокристаллов (AgInS/ZnS и CdZnSeS/ZnS) позволил выявить более перспективные КТ для дальнейшего анализа в сложных средах. Установлено, что тушение люминесценции всех исследованных КТ в присутствии МИТ носит концентрационно-зависимый

характер без изменения формы спектров испускания, что исключает изменения в ядре КТ. Эффективность тушения зависит от типа и размера КТ: для КТ AgInS/ZnS $K_{SV} \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ (снижается с уменьшением размера), для КТ CdZnSeS/ZnS $K_{SV} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$. Установлено, что преобладает механизм ФПЭ с образованием комплексов ($K_{св.} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$).

Исследование влияния присутствия БСА показало, что КТ CdZnSeS/ZnS демонстрируют существенные преимущества перед AgInS/Zn для аналитического применения. Они проявляют высокую стабильность люминесцентного сигнала, меньшую чувствительность к матричным эффектам и сохраняют чувствительность в присутствии белка, в то время как для КТ AgInS/ZnS наблюдается значительное уменьшение интенсивности люминесценции и снижение K_{SV} в 5 раз. Полученные данные обосновывают возможность применения методики с использованием КТ CdZnSeS/ZnS для прямого определения МИТ в биологических жидкостях.

Основные результаты главы подробно изложены в [145,162].

ГЛАВА 4. Исследование влияния поверхностных лигандов на тушение люминесценции квантовых точек при определении митоксантрона

Ключевым фактором, определяющим эффективность взаимодействия КТ с аналитом, является природа поверхностных лигандов. Они не только обеспечивают коллоидную стабильность нанокристаллов, но и влияют на их заряд, реакционную способность и селективность в отношении целевых молекул. В связи с этим изучение влияния различных стабилизаторов на процессы тушения люминесценции КТ представляет значительный интерес для разработки высокочувствительных систем анализа.

Целью данной главы являлось установление корреляции между химической структурой поверхностных лигандов КТ CdZnSeS/ZnS: ТГК, МПК и ДГЛК, и эффективностью тушения люминесценции МИТ, а также оценка влияния плазмы крови на взаимодействие и аналитические характеристики системы.

Основным задачами данной главы явились:

1. Характеризация свойств КТ CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами для подтверждения сопоставимости дальнейшего изучения их тушения люминесценции.
2. Исследование кинетики тушения люминесценции КТ, стабилизированных различными лигандами в присутствии МИТ в водном растворе в стационарном и время-разрешенном режимах, построение и анализ зависимости Штерна-Фольмера.
3. Проанализировать механизм тушения на основе полученных данным в стационарном и время-разрешенном режимах, оценить вклад столкновительных и статических процессов.
4. Изучение влияние матричных эффектов плазмы крови человека на процесс тушения люминесценции КТ, сравнительный анализ чувствительности и стабильности КТ с различными лигандами и выявление наиболее перспективных КТ для определения МИТ в биологических средах.

4.1 Характеризация квантовых точек CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами

Использование одного типа полупроводниковых КТ (CdZnSeS/ZnS) позволило оценить только влияние стабилизирующего лиганда на эффективность тушения люминесценции.

Спектры поглощения и испускания КТ представлены на рисунке 20 (а). Для всех рассмотренных КТ значения КВ люминесценции различались минимально (табл. 6). После гидрофилизации КТ положение максимума люминесценции оставалось неизменным, что свидетельствует о сопоставимости сравнения лигандов с точки зрения поверхностных свойств самих нанокристаллов КТ. Для КТ_ДГЛК характерно большее время жизни люминесценции, что, предположительно, обусловлено бидентатным характером координации молекулы лиганда (рис. 20б). Значения ζ -потенциала для всех КТ находятся в области -30 мВ, что свидетельствует о коллоидной стабильности образцов. Незначительные отклонения значений могут быть обусловлены образованием динамических ассоциатов за счет водородных связей между поверхностными карбоксильными группами лигандов. Данные характеристики подтверждают сопоставимость физико-химических характеристик модифицированных КТ, что обеспечивает корректность последующего сравнительного анализа.

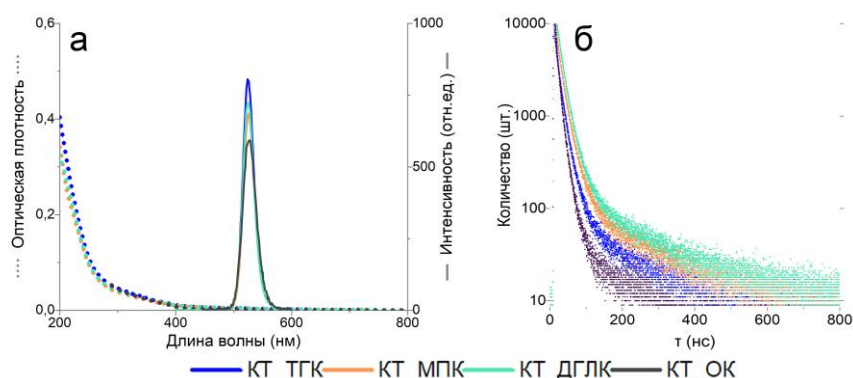


Рисунок 20. Спектры поглощения и испускания (а) и кривые затухания люминесценции (б) для КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ОК (в толуоле), ТГА, МПА и ДГЛА (в воде).

Таблица 6. Характеристики КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ОК (в толуоле), ТГА, МПА и ДГЛА (в воде): размер, ζ -потенциал, максимум испускания, КВ и среднее время жизни люминесценции.

Образец КТ	Размер ^а , нм	ζ - потенциал, мВ	$\lambda_{\text{исп.}}^{\text{б}}$, нм	КВ ^в , %	$\tau_{\text{ср.}}^{\text{г}}$, нс
КТ_ОК	$7,0 \pm 0,2$	—	525	46	29 ± 6
КТ_ТГК		-30 ± 11		57	23 ± 1
КТ_МПК		-27 ± 6		51	27 ± 2
КТ_ДГЛК		-21 ± 4		53	43 ± 4

Примечания:

а — значения диаметра по данным ПЭМ (рис. 21);

б — $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм;

в — относительный КВ рассчитан с использованием кумарина 153 (КВ = 0,53) в качестве стандарта;

г — среднее время жизни люминесценции.

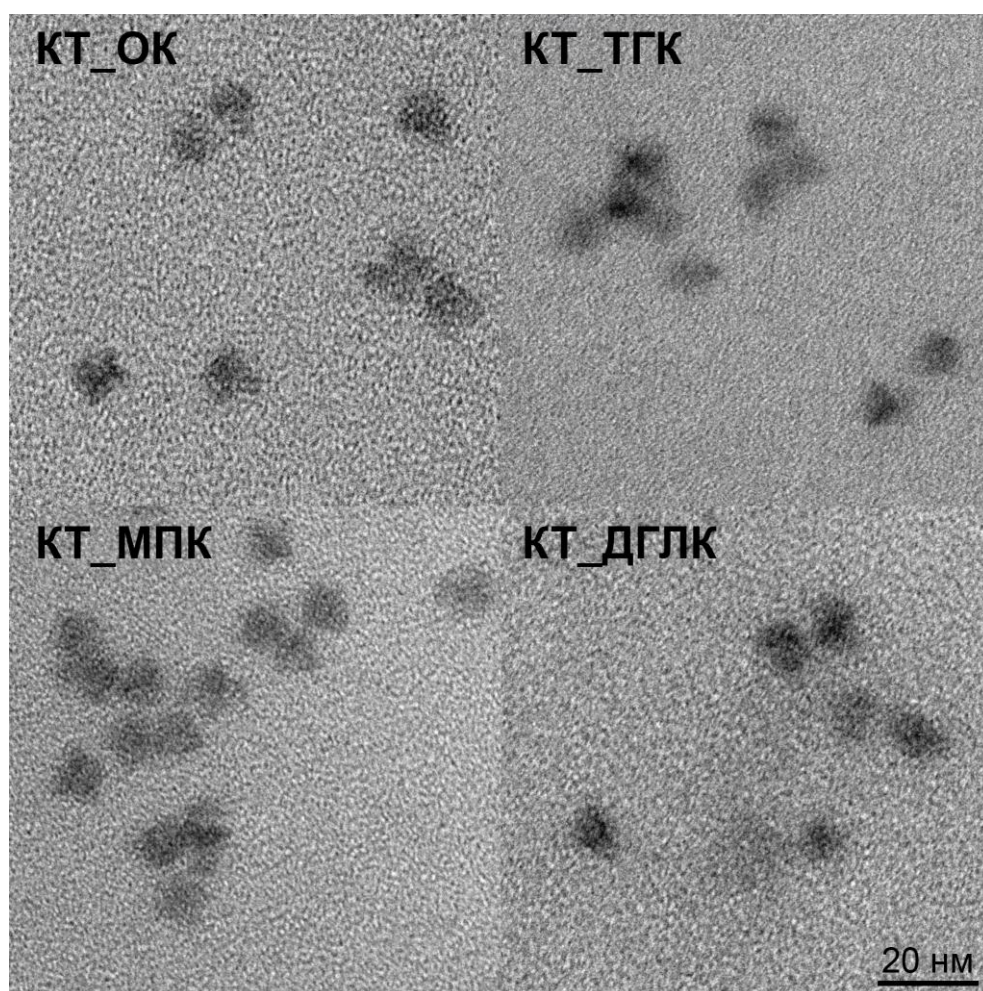


Рисунок 21. Изображения ПЭМ КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ОК, ТГК, МПК и ДГЛК (величина размерной шкалы 20 нм).

4.2 Тушение люминесценции квантовых точек в присутствии митоксантрона в воде

4.2.1 Тушение люминесценции квантовых точек в стационарном режиме

При изучении процессов тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS, стабилизированных различными лигандами, был выбран диапазон концентраций МИТ от 1 до 500 нМ. Данный интервал концентраций обеспечивает минимальный вклад процессов самоассоциации молекул аналита и наименьшие отклонения от линейности в зависимостях Штерна-Фольмера. При более высоких концентрациях МИТ наблюдается полное тушение люминесценции КТ (детальное обсуждение этих эффектов представлено в разделе «3.2 Тушение люминесценции КТ в стационарном режиме»).

Установлено, что увеличение концентрации МИТ вызывает постепенное уменьшение интенсивности люминесценции всех КТ, при этом форма спектра и длина волны максимума испускания остаются неизменными (рис. 22). Это свидетельствует о том, что структура нанокристаллов КТ остается неизменной. Максимальная концентрация МИТ (500 нМ) приводит к полному тушению люминесценции КТ_ТГК и КТ_ДГЛК (рис. 23а), тогда как для КТ_МПК регистрируется снижение интенсивности люминесценции на 85% (рис. 23а).

Анализ процессов тушения в выбранном диапазоне концентраций МИТ (1–500 нМ) демонстрирует линейный характер зависимостей Штерна-Фольмера ($R^2 > 0,96$) (рис. 23б), подтверждает применимость данного подхода для аналитических целей. Несмотря на одинаковый порядок K_{SV} (10^7 M^{-1}), наблюдаются различия в чувствительности КТ в зависимости от природы стабилизирующего лиганда (табл. 7). Полученные данные позволяют предположить влияние стерических факторов на взаимодействия между лигандами КТ и молекулами МИТ. Установлен следующий ряд возрастания K_{SV} : МПК < ДГЛК < ТГК (табл. 7).

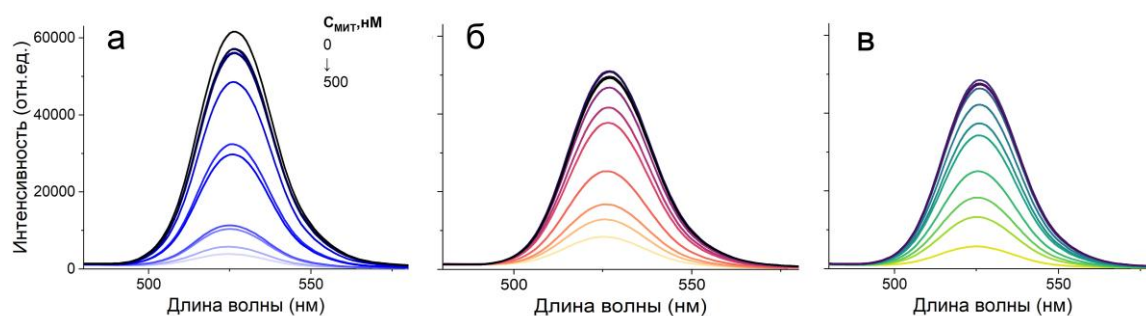


Рисунок 22. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в воде.

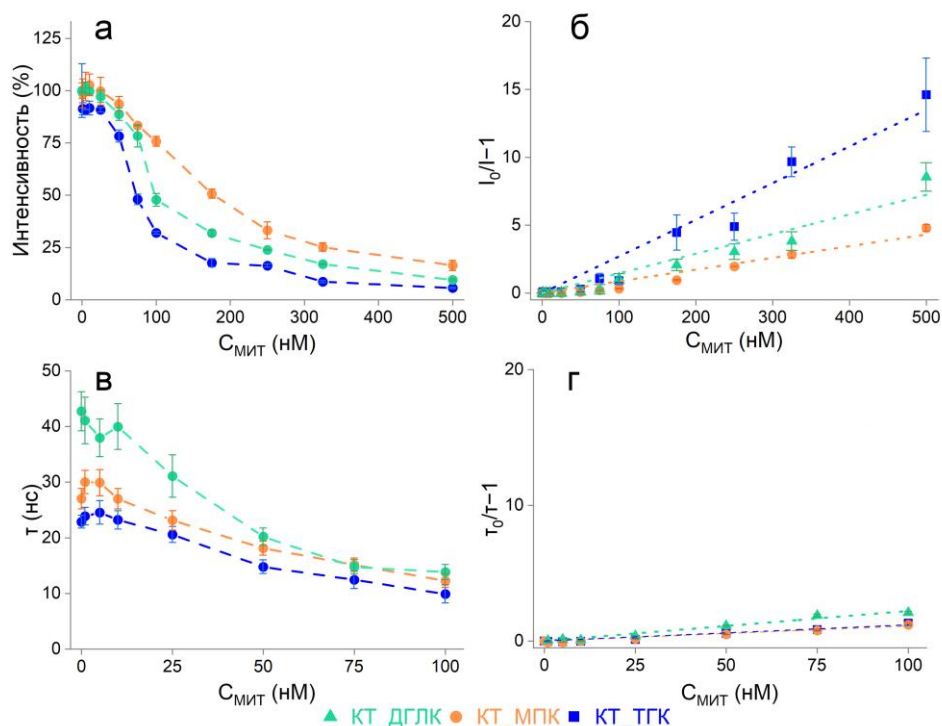


Рисунок 23. Профили тушения люминесценции (а) и изменение времени жизни люминесценции (в) КТ в присутствии МИТ; графики Штерна–Фольмера для интенсивности люминесценции (б) и времени жизни люминесценции (г). КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (синий), МПК (оранжевый) и ДГЛК (зеленый) в воде.

4.2.2 Тушение люминесценции квантовых точек во время-разрешенном режиме

Для более детального изучения влияния лигандов КТ было проведено исследование кинетики затухания люминесценции КТ в присутствии МИТ. Характерная гетерогенность возбужденных состояний КТ приводит к многоэкспоненциальному профилю затухания люминесценции, который можно выразить уравнением:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (19)$$

где n – число компонент, а a_i и τ_i – амплитуда и время затухания i -й компоненты соответственно. Амплитуды компонент отражают суммарный вклад каждой компоненты времени жизни в среднее время жизни. Полученное среднее время жизни люминесценции было аппроксимировано трехэкспоненциальной моделью. Предполагается, что каждая компонента затухания связана с определенным процессом. Быстрая компонента (τ_1) связана с рекомбинацией экситонов на краю зоны КТ. Средняя компонента (τ_2) обусловлена влиянием электронных или дырочных ловушек, сопровождающимся локализацией одного из носителей заряда. Медленная компонента (τ_3) связана с поверхностными эффектами, включая процессы переноса энергии на границе раздела наночастица-лиганд-окружающая среда [163,164].

Исходное среднее время жизни люминесценции в отсутствие тушителя далее обозначено как τ_0 . Кривые затухания (рис. 24) показывают, что все КТ демонстрируют уменьшение времени жизни с увеличением концентрации МИТ вплоть до 100 нМ (рис. 23а). Дальнейший рост концентрации не приводит к значимым изменениям временных характеристик (данные не представлены). Для отдельных компонентов времени жизни люминесценции КТ (τ_1 , τ_2 и τ_3) отмечаются изменения с ростом концентрации МИТ (рис. 25). Наибольшие изменения наблюдаются для медленной компоненты τ_3 , что предположительно связано с изменением поверхностных состояний вследствие электростатического взаимодействия [164,165].

Сравнение стационарных (I_0/I) и разрешенных во времени (τ_0/τ) зависимостей Штерна–Фольмера показывает их близкое соответствие при низких концентрациях МИТ (<100 нМ), демонстрируя доминирование столкновительного процесса. Однако при более высоких концентрациях МИТ (>100 нМ) наблюдается расхождение зависимостей, причем I_0/I демонстрирует более выраженный рост по сравнению с τ_0/τ (рис. 23 а, в). Это отражает возрастающий вклад за счет образования электростатического комплекса между МИТ и КТ. Отсутствие

изменения времени жизни люминесценции с ростом концентрации МИТ (>100 нМ) также можно объяснить ограниченной диффузией тушителя к поверхности КТ.

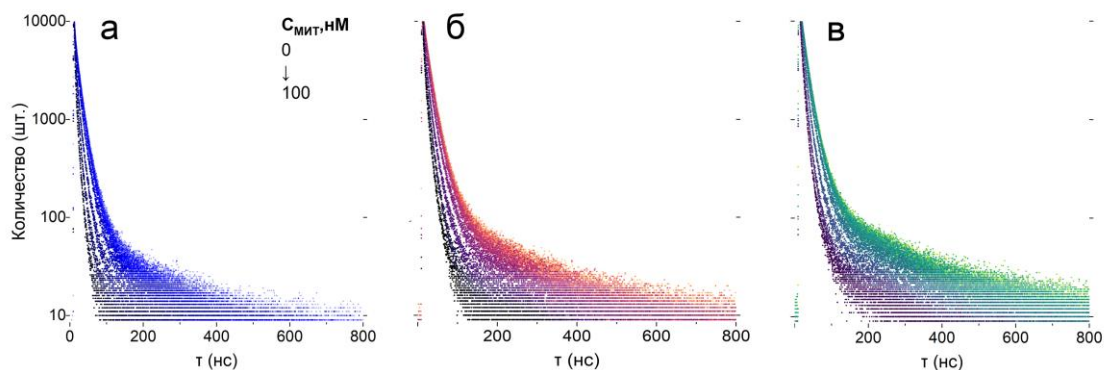


Рисунок 24. Кривые затухания люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в воде.

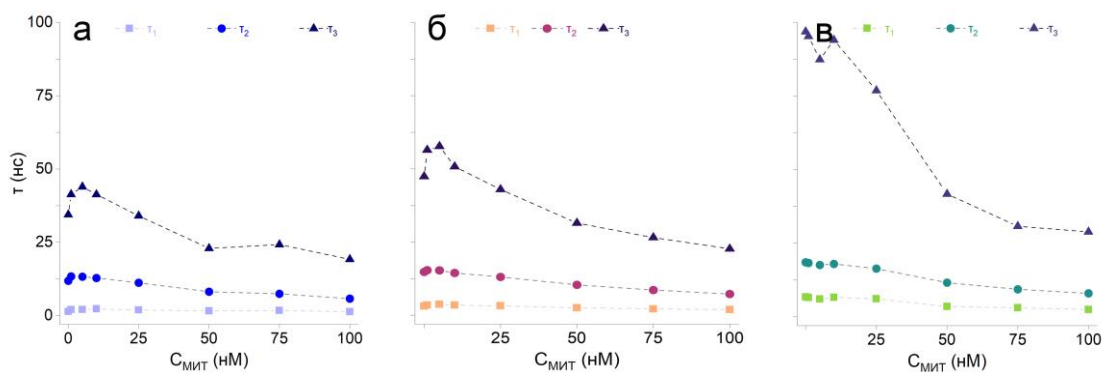


Рисунок 25. Мультиэкспоненциальное распределение времени жизни КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в воде.

Рассчитанные бимолекулярные константы тушения (согласно уравнению 4) представлены в таблице 7. Значения имеют высокий порядок для всех КТ: $k_q > 10^{14} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, значительно превышая верхний предел k_0 , что не согласуется с динамическим тушением (детальное обсуждение в разделе «3.3 Тушение люминесценции КТ во время-разрешенном режиме»). Значительное превышение экспериментальных значений k_q над теоретическим пределом свидетельствует о преимущественно статическом характере тушения, хотя полностью исключить вклад столкновительных процессов нельзя. Эффективность динамического тушения в данной системе ограничена стерическими факторами и электростатическим экранированием, затрудняющими диффузию МИТ к поверхности КТ.

Предполагается, что в системе наблюдается гетерогенная картина взаимодействий: часть КТ образует электростатический комплекс с тушителем в основном состоянии, а другая, «несвязанная» часть КТ находится в свободном возбужденном состоянии и не демонстрирует уменьшения времени жизни. Кроме того, возможно, что несколько молекул МИТ могут связываться с одной КТ. Точное определение вклада таких взаимодействий в общее тушение люминесценции требует дополнительных исследований. Результаты показывают, что общая интенсивность люминесценции КТ уменьшается с увеличением концентрации МИТ. Однако необходимо более детальное изучение этого процесса при переходе к реальным объектам исследования, основанное на изменении люминесценции КТ вследствие связывания аналита.

Несмотря на сложность процесса тушения, вклад динамического тушения остается значительным. Скорость многих реакций в растворах существенно зависит от диффузии реагентов. Изменение концентрации в системе люминофор–тушитель может привести к отклонениям в зависимостях I_0/I и τ_0/τ . Классические уравнения предполагают наличие стационарного диффузионного потока, при котором молекулы тушителя могут находиться в непосредственной близости от возбужденного люминофора и будут реагировать быстрее. Блокирование доступа МИТ к поверхности КТ в сложной биологической среде (плазме крови) может подавить процесс тушения и уменьшить связывание. Поэтому для практического применения тушения люминесценции в анализе реальных образцов необходимо детальное изучение влияния матричных эффектов плазмы крови на взаимодействие КТ с МИТ.

4.3 Тушение люминесценции квантовых точек в присутствии митоксантрона в плазме крови

4.3.1 Тушение люминесценции квантовых точек в стационарном режиме

Исследование тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ проводилось в плазме крови человека, разбавленной водой в 50 раз (конечное разведение в системе плазма–МИТ–КТ). В отсутствие тушителя интенсивность люминесценции КТ в плазме снижается на 39%, 25% и 29% для КТ, стабилизированных ТГК, МПК

и ДГЛК, соответственно, по сравнению с водными коллоидными растворами. Форма и положение спектров люминесценции остаются неизменными (рис. 26), что свидетельствует об отсутствии влияния компонентов плазмы на общую структуру нанокристаллов КТ. Тем не менее, нельзя исключать наличие специфических взаимодействий между поверхностью КТ и биомолекулами, таких как электростатические силы, водородные связи, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, а также гидрофобные и стерические контакты [166]. Указанные взаимодействия могут вносить вклад в процесс связывания КТ с МИТ за счет изменения ориентации, зарядового состояния компонентов системы и эффективного расстояния, необходимого для контакта молекулы МИТ с поверхностью нанокристалла.

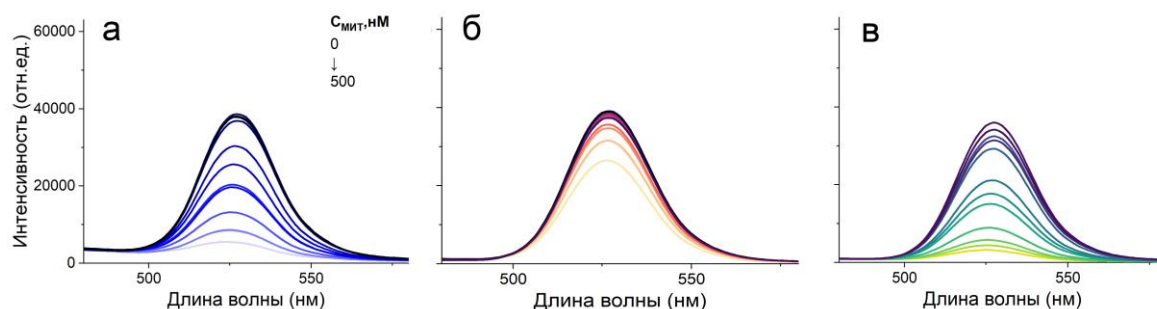


Рисунок 26. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм}$) КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в плазме крови.

Профили тушения люминесценции КТ (рис. 27а) демонстрируют постепенное снижение интенсивности люминесценции КТ по мере увеличения концентрации МИТ. В условиях плазмы крови наиболее значительное снижение чувствительности к МИТ наблюдается для КТ_МПК: интенсивность люминесценции уменьшается лишь на $\sim 30\%$ при максимальной концентрации МИТ (500 нМ). Для КТ_ТГК и КТ_ДГЛК снижение эффективности тушения в плазме выражено в меньшей степени, чем для КТ_МПК. K_{SV} для КТ_ТГК уменьшается приблизительно в 2,5 раза по сравнению с ее значением в водном растворе (табл. 7). Наибольшая эффективность тушения в плазме зафиксирована для КТ_ДГЛК и незначительно отличается от значений, полученных в водной среде (в пределах погрешности измерений) (рис. 27б).

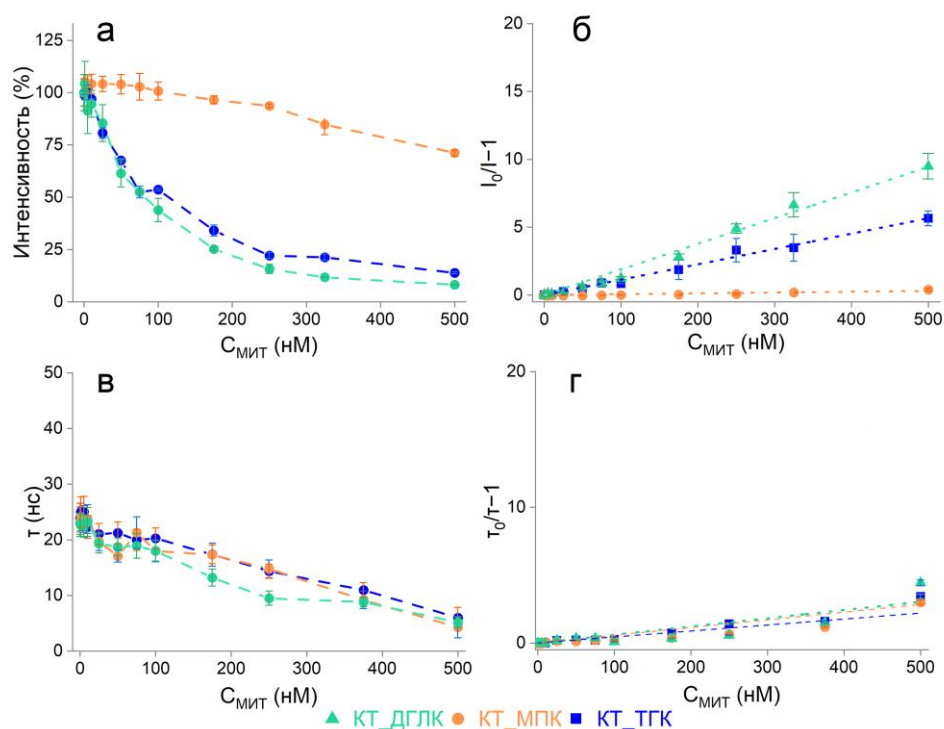


Рисунок 27. Профили тушения люминесценции (а) и изменение времени жизни люминесценции (в) КТ в присутствии МИТ; графики Штерна–Фольмера для интенсивности люминесценции (б) и времени жизни люминесценции (г). КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (синий), МПК (оранжевый) и ДГЛК (зеленый) в плазме крови.

4.3.2 Тушение люминесценции квантовых точек во время-разрешенном режиме

При переходе в плазму крови время жизни люминесценции КТ_ТГК и КТ_МПК, изменяется незначительно по сравнению с водной средой (рис. 27, 28). Для КТ_ДГЛК, зарегистрировано снижение среднего времени жизни люминесценции на ~46%. Уменьшение интенсивности люминесценции при переходе из водной среды в плазму наблюдается для всех типов КТ, однако статистически значимое изменение времени жизни люминесценции наблюдается исключительно для КТ_ДГЛК. Наибольший вклад в уменьшение среднего времени жизни вносит изменение третьей компоненты времени жизни (τ_3), что свидетельствует о значительном влиянии взаимодействия лигандов с компонентами плазмы крови на процессы рекомбинации. Можно предположить, что уменьшение интенсивности люминесценции исследованных нанокристаллов обусловлено различными механизмами в зависимости от типа стабилизирующего

лиганда. В случае одnodентатных короткоцепочечных лигандов (ТГК и МПК) тушение люминесценции преимущественно обусловлено снижением коэффициента диффузии компонентов системы, тогда как для КТ_ДГЛК доминирующим фактором является взаимодействие компонентов плазмы с длинноцепочечным лигандом.

Поскольку при концентрации МИТ ниже 100 нМ изменения времени жизни люминесценции незначительны, для детального исследования кинетики тушения в плазме крови был расширен диапазон концентраций МИТ до 1–500 нМ (рис. 28). Кинетические кривые затухания люминесценции (рис. 28) демонстрируют монотонное уменьшение времени жизни для всех типов КТ при увеличении концентрации МИТ. Индивидуальные компоненты времени жизни (τ_1 , τ_2 и τ_3) показаны на рисунке 29. Изменения компоненты τ_3 в плазме крови менее выражены, чем в водной среде, однако остаются более значительными по сравнению с изменениями τ_1 и τ_2 . Менее выраженная эффективность тушения люминесценции в плазме, предположительно обусловлена преобладанием вклада внутренних процессов рекомбинации (τ_1 и τ_2), в то время как вклад поверхностных эффектов (τ_3) минимизируется стабилизирующим воздействием компонентов плазмы крови.

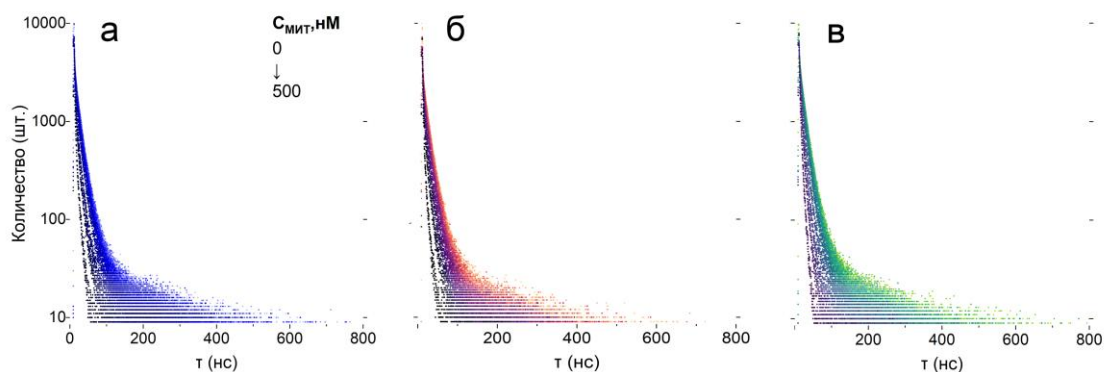


Рисунок 28. Кривые затухания люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в плазме крови.

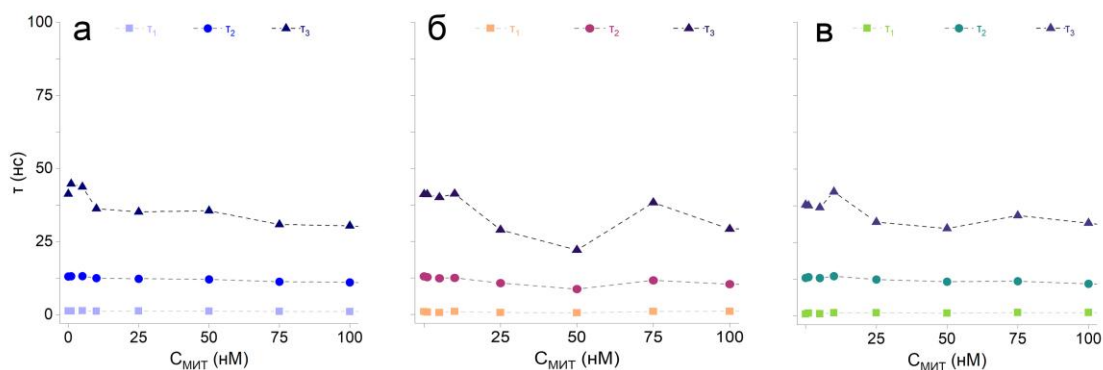


Рисунок 29. Мультиэкспоненциальное распределение времени жизни КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в плазме крови.

Рассчитанные k_q в плазме крови представлены в таблице 7. Как и в водной среде, полученные значения имеют высокий порядок величины для всех типов КТ ($>10^{14} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Константа k_q зависит от нескольких параметров, включая вязкость раствора. При переходе к плазме крови, разбавленной в 50 раз, вязкость изменяется незначительно (для воды $8,90 \times 10^{-4} \text{ Па} \cdot \text{с}$, для разбавленной плазмы крови $\approx 1,0 \times 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$). Коэффициенты диффузии МИТ и КТ в воде и плазме крови также демонстрируют близкие значения ($k_0 = 1,1 \times 10^{10}$ и $1,0 \times 10^{10} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, соответственно). Это свидетельствует о том, что основной вклад в процесс тушения вносят специфические взаимодействия с компонентами плазмы, которые влияют на взаимодействие между КТ и МИТ. В результате может происходить изменение конформации лигандов на поверхности КТ, а также адсорбция плазменных белков на поверхности или вблизи нанокристаллов, что создает стерические препятствия, ограничивающие диффузию и затрудняющие доступ молекул МИТ к поверхности КТ.

Таблица 7. Константы Штерна-Фольмера (K_{SV}) и бимолекулярные константы скорости (k_q) для КТ с различными лигандами в присутствии МИТ в воде и плазме крови.

КТ	$K_{sv} \times 10^{-7}, \text{ М}^{-1}$	$k_q \times 10^{-14}, \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
<i>В воде</i>		
КТ_ТГК	$2,7 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,2$
КТ_МПК	$0,9 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,2$
КТ_ДГЛК	$1,5 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,4$
<i>В плазме крови</i>		
КТ_ТГК	$1,1 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,05$
КТ_МПК	$0,06 \pm 0,005$	$2,6 \pm 0,2$
КТ_ДГЛК	$1,9 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,1$

Из полученных результатов видно, что в случае КТ_МПК стерические препятствия выражены наиболее значительно наибольшему влиянию компонентов плазмы крови, что приводит к существенному снижению эффективности тушения люминесценции. Для КТ_ТГК наблюдается высокая эффективность тушения в присутствии МИТ в водной среде. Однако при переходе в плазму крови K_{SV} снижается в 2,5 раза. Наибольшую эффективность тушения в плазме крови демонстрируют КТ_ДГЛК, что может быть связано с повышенной доступностью поверхности нанокристаллов для взаимодействия с МИТ благодаря особенностям структуры длинноцепочечного лиганда.

Заключение по 4 главе:

Установлено, что природа поверхностного лиганда оказывает существенное влияние на эффективность тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS в присутствии МИТ. В водной среде выявлен ряд возрастания K_{SV} : МПК < ДГЛК < ТГК. Анализ в время-разрешенном режиме показал, что процесс тушения имеет сложный характер. При низких концентрациях МИТ (<100 нМ) доминирует динамическое тушение, о чем свидетельствует согласованность зависимостей I_0/I и τ_0/τ . При высоких концентрациях преобладает статический механизм, связанный с образованием электростатических комплексов, что подтверждается сверхвысокими значениями бимолекулярных констант тушения ($k_q > 10^{14} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) и расхождением зависимостей Штерна-Фольмера. Наибольшее изменение медленной компоненты времени жизни (τ_3) свидетельствует о ключевой роли поверхностных состояний на границе раздела КТ-лиганд-микроокружение в процессе тушения.

Переход в среду плазмы крови приводит к изменению процесса тушения из-за конкурентного взаимодействия компонентов плазмы с поверхностью КТ. Наблюдается общее снижение интенсивности люминесценции для всех типов КТ, однако влияние зависит от структуры лиганда. КТ_ДГЛК, продемонстрировали наибольшую устойчивость к матричным эффектам плазмы крови. Эффективность тушения люминесценции данных КТ статистически не отличалась от значений, полученных в водной среде. Это связано со длинноцепочечной и бидентатной структурой лиганда, которая, предположительно, обеспечивает лучшую

доступность поверхности для целевого анализита и формирует более стабильный поверхностный барьер, препятствующий неспецифической адсорбции. Таким образом, КТ CdZnSeS/ZnS, стабилизированные ДГЛК, демонстрируют наибольшую перспективность для определения МИТ в плазме крови человека.

Основные результаты главы подробно изложены в [167–169].

ГЛАВА 5. Оценка аналитических характеристик и практическое применение люминесцентной методики определения митоксантрона

Разработка новой аналитической методики требует всесторонней оценки ее ключевых характеристик для подтверждения практической применимости и конкурентоспособности. После установления оптимальных условий и механизма взаимодействия КТ с целевым аналитом необходимо провести валидацию методики, включающую определение чувствительности, селективности, воспроизводимости и точности в условиях, максимально приближенных к реальным. На основании результатов, полученных в предыдущих главах, где было показано, что КТ CdZnSeS/ZnS, стабилизированные ДГЛК, демонстрируют наибольшую эффективность тушения люминесценции в присутствии МИТ и устойчивость в биологических матрицах, именно данный тип КТ был выбран для детальной аналитической валидации предлагаемой методики.

Целью данной главы являлась оценка аналитических характеристик (валидация) разработанной методики определения МИТ, основанной на тушении люминесценции КТ_ДГЛК, и оценка применимости для анализа в образцах плазмы крови человека.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Определить линейный диапазон и построить калибровочные зависимости сигнала (I_0/I) от концентрации МИТ для КТ CdZnSeS/ZnS.
2. Рассчитать ПО и ПКО МИТ для определения в воде и плазме крови человека.
3. Исследовать селективность методики по отношению к потенциальным интерферентам: ионам, различным биомолекулам и антибиотикам.
4. Провести апробацию методики на образцах крови человека для оценки правильности (точности) и воспроизводимости.
5. Сравнить результаты анализа образцов плазмы, полученные с помощью разработанной люминесцентной методики, с данными независимого референтного метода (ВЭЖХ-УФ).

6. Оценить цитотоксичность исследуемых КТ *in vitro* на культурах клеток для предварительной оценки их биобезопасности и потенциальных ограничений для дальнейшего применения.

5.1 Аналитические характеристики методики

В рамках исследования была разработана и валидирована люминесцентная методика определения МИТ с использованием КТ_ДГЛК. Оценка ключевых аналитических параметров проводилась как в водном растворе, так и в матрице плазмы крови человека для оценки влияния сложной биологической среды на определение МИТ. Основные аналитические характеристики представлены в таблице 8.

Установлено, что зависимость аналитического сигнала (I_0/I) от концентрации МИТ имеет линейный характер в диапазоне от 5 до 500 нМ (2,5–260 нг/мл) в водном растворе и от 10 до 500 нМ (5–260 нг/мл) в плазме крови (рис. 30). Несмотря на незначительное сужение линейного диапазона со стороны низких концентраций, обусловленное матричными эффектами плазмы, разработанная методика полностью охватывает область терапевтических концентраций, которая, согласно литературным данным, составляет >10 нг/мл для противоопухолевой активности, в то время как концентрации >100 нг/мл ассоциированы с миелотоксичностью [90,170].

В соответствии с данными градуировочного графика, построенного в координатах Штерна-Фольмера, были рассчитаны ПО и ПКО. Для разработанной методики значения ПО и ПКО в водной среде составили 4 нМ (2,1 нг/мл) и 13,2 нМ (7 нг/мл), соответственно. В матрице плазмы наблюдается ожидаемое незначительное снижение чувствительности: ПО и ПКО составили 7 нМ (3,6 нг/мл) и 23,1 нМ (12 нг/мл) соответственно. Полученные значения подтверждают высокую чувствительность метода и его потенциальную применимость для мониторинга концентраций препарата в клинической практике.

Линейность калибровочных зависимостей подтверждена высокими значениями коэффициента детерминации R^2 , составившими 0,96 и 0,99 для водного раствора и плазмы крови, соответственно. Более высокое значение R^2 в плазме

может быть связано с особенностями взаимодействия компонентов матрицы с поверхностью КТ, стабилизирующих аналитический сигнал.

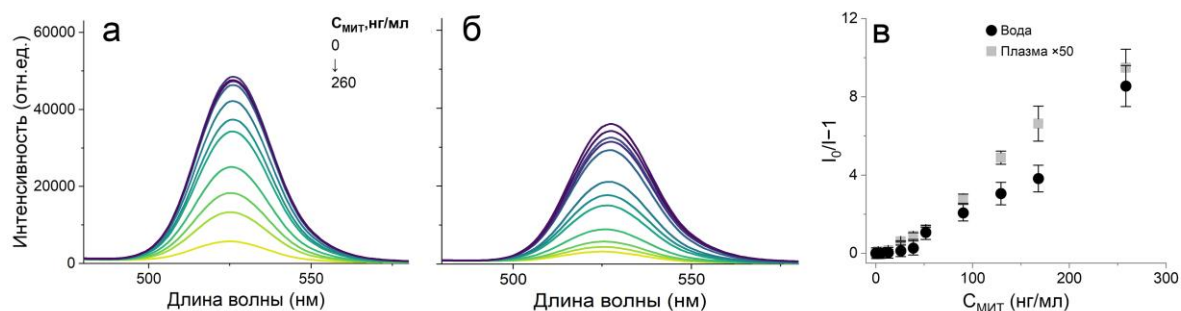


Рисунок 30. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) КТ_ДГЛК в присутствии МИТ в воде (а) и плазме крови (б), градуировочные зависимости определения МИТ в воде и плазме крови.

Таким образом, разработанная методика демонстрирует высокую чувствительность, приемлемую линейность и устойчивость к влиянию сложной биологической матрицы, что свидетельствует о перспективности его применения для дальнейшего применения в анализе реальных клинических образцов. Следует также отметить, что полученные ПО демонстрируют высокую чувствительность методики, которая является сопоставимой или превосходит характеристики ряда альтернативных методов, описанных в литературе, таких как ВЭЖХ с УФ- или люминесцентным детектированием.

Таблица 8. Сводные аналитические характеристики методики определения МИТ.

Аналитическая характеристика	Водная среда	Плазма крови
Линейный диапазон, нг/мл	2,5–260	5–260
ПО, нг/мл	2,1	3,6
ПКО, нг/мл	7	12
$\text{tg } \alpha^*$, отн.ед.·мл/нг	0,028	0,037
R^2	0,96	0,99

* — тангенс угла наклона градуировочной зависимости

Селективность методики

Селективность разработанной люминесцентной методики была всесторонне исследована в отношении широкого спектра потенциальных интерферентов, типично присутствующих в плазме крови человека и способных влиять на анализ. Тестируемые соединения включали неорганические ионы (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и другие); биомолекулы (аскорбиновая кислота, мочеви́на, ЧСА); аминокислоты (например, гистидин, триптофан, тирозин и другие) антибиотики, потенциально применяемые при терапии (цефтриаксон, ванкомицин, меропенем);

противоопухолевый препарат другого механизма действия — бортезомиб (протеасомный ингибитор).

Влияние каждого интерферента в физиологически релевантных концентрациях на люминесцентный сигнал КТ_ДГЛК оценивали и сравнивали с сигналом, обусловленным добавлением МИТ. Результаты представлены на рисунке 31.

Установлено, что наличие ионов, биомолекул и аминокислот не вызывало статистически значимого изменения интенсивности люминесценции КТ_ДГЛК. Важным отметить, что бортезомиб, а также антибиотики не проявляли значимой интерферирующей активности. Только добавление МИТ приводило к выраженному и воспроизводимому тушению люминесценции, что однозначно свидетельствует о высокой селективности взаимодействия КТ – МИТ.

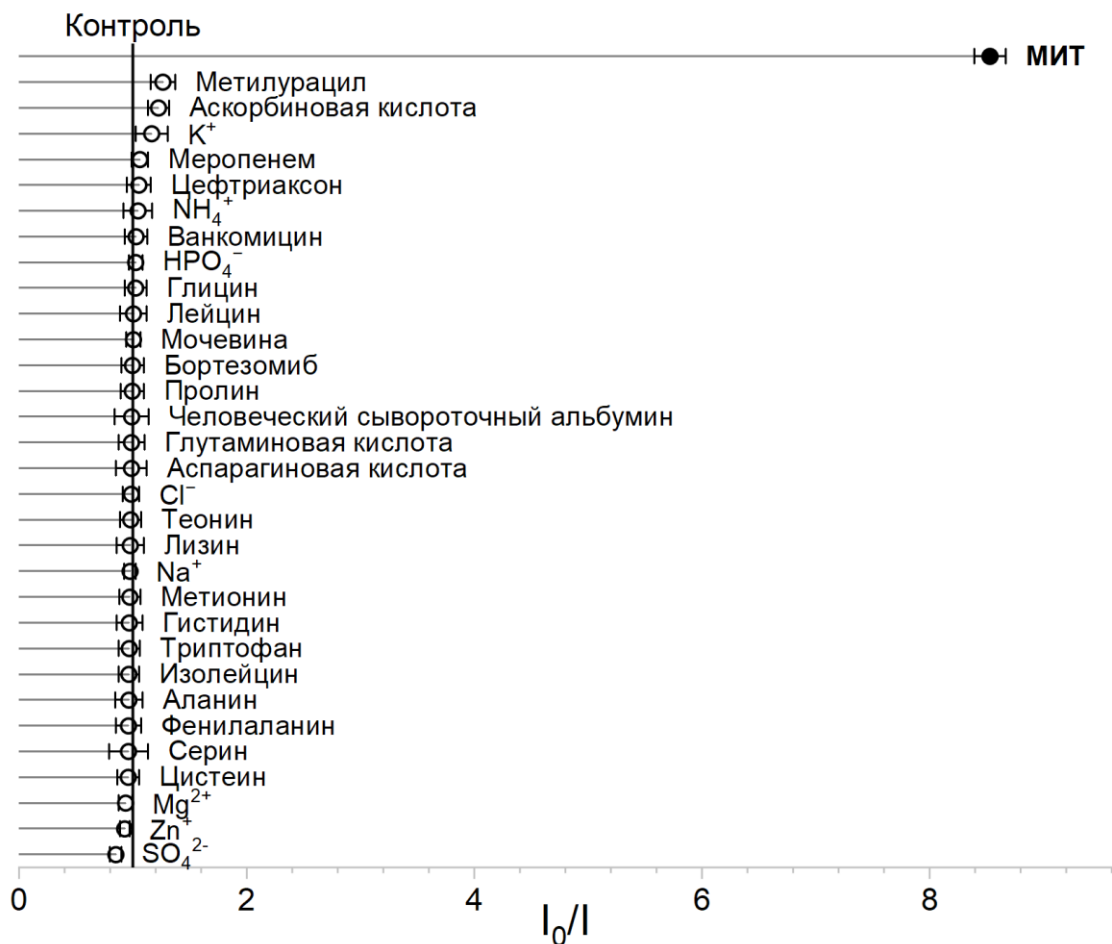


Рисунок 31. Влияние потенциальных интерферентов на интенсивность люминесценции КТ_ДГЛК. Концентрация ионов 10 мМ; различных биомолекул, антибиотиков (цефтриаксона, ванкомицина, меропенема) и бортезомиба 10 мкМ; МИТ 500 нМ.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило высокую селективность предложенной методики по отношению к МИТ, в том числе на фоне других лекарственных средств (включая цитостатик иного механизма действия). Это позволяет прогнозировать его успешное применение для мониторинга концентраций МИТ в плазме крови без существенных помех со стороны сопутствующих компонентов, даже в условиях комбинированной химиотерапии.

5.2 Определение митоксантрона в образцах плазмы крови человека

Для валидации разработанной люминесцентной методики в условиях, максимально приближенных к реальным, было проведено определение МИТ в образцах крови человека. Стандартные растворы МИТ вносили как в цельную кровь с последующим выделением плазмы, так и непосредственно в готовую плазму. Данный подход позволил смоделировать реальный процесс отбора пробы и оценить возможное влияние всего матричного состава крови на определение МИТ.

Результаты количественного анализа представлены в таблице 9. Как следует из полученных данных, разработанная методика характеризуется высокой точностью. Заниженное значение степени извлечения (88%) для самой низкой концентрации МИТ в плазме может быть связано с эффектом матрицы. Для всех остальных концентраций степень извлечения находилась в приемлемом диапазоне 93–105%, что подтверждает отсутствие систематической погрешности, а также полноту высвобождения аналита на этапе пробоподготовки. Также методика характеризуется хорошей воспроизводимостью: относительное стандартное отклонение (S_r) не превышало 16%, что свидетельствует о достаточной прецизионности методики.

Для оценки правильности, образцы плазмы были проанализированы также с использованием референтного метода — ВЭЖХ-УФ (градуировочный график представлен на рис. 32). Сравнительные данные (табл. 9), демонстрируют хорошую сходимость результатов, полученных двумя независимыми методами. Парный *t*-тест Стьюдента подтвердил, что разработанная люминесцентная методика не имеет статистически значимых различий с референтным методом ВЭЖХ-УФ при анализе МИТ как в плазме ($t = 0,644$, $p > 0.05$), так и в цельной крови ($t = 1,533$, $p > 0.05$).

Таблица 9. Анализ МИТ в образцах плазмы крови человека ($n = 5$).

ВЭЖХ-УФ				Разработанная методика		
Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Степень извлечения (%)	S _r (%)	Найдено, мкг/мл	Степень извлечения (%)	S _r (%)
Плазма						
0,85	0,80	95	12,4	0,75	88	16,0
1,4	1,35	96	5,9	1,30	93	7,7
2,3	2,25	98	2,3	2,41	105	5,0
3,5	3,45	99	2,0	3,37	96	4,5
5,3	4,97	94	2,5	5,18	98	3,9
Цельная кровь						
1,5	1,46	97	0,6	1,42	95	10,5
2,2	2,17	99	0,8	2,07	94	4,8
3,1	3,19	103	4,4	3,24	104	4,6
4,6	4,80	104	4,4	4,66	101	3,2
5,5	6,05	110	5,8	5,44	99	1,8

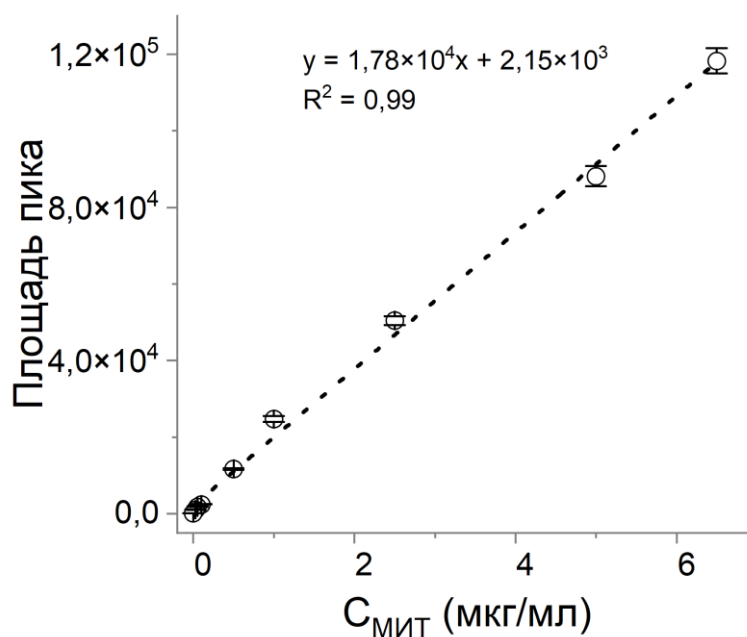


Рисунок 32. Градуировочная кривая определения МИТ ВЭЖХ-УФ.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают практическую применимость, точность и надежность разработанной люминесцентной методики для количественного определения МИТ в сложных биологических образцах. Полученные результаты демонстрируют, что методика обеспечивает точное и воспроизводимое определение МИТ как в плазме, так и в цельной крови, а его независимость от сложных этапов пробоподготовки указывает на высокий потенциал для клинических исследований.

5.3 Оценка цитотоксичности квантовых точек

Изучение цитотоксических свойств КТ представляет особую важность для оценки перспектив их использования в качестве аналитических реагентов в клинической лабораторной диагностике. Перспектива применения разработанной люминесцентной методики определения МИТ в условиях клиническо-диагностических лабораторий, обуславливает необходимость всестороннего изучения биобезопасности используемых наноматериалов. Оценка цитотоксичности является обязательным этапом, предваряющим потенциальное использование методики, и направлена на минимизацию рисков для персонала, работающего с данными наноматериалами.

Для оценки биобезопасности КТ и определения границ их возможного практического применения было проведено исследование *in vitro* цитотоксичности на двух модельных клеточных линиях: мышинных фибробластах L929 (как пример нормальных соматических клеток) и клетках карциномы молочной железы 4T1 (в качестве модели опухолевой ткани). Анализ клеточной жизнеспособности выполняли после 24, 48 и 72 часов инкубации с КТ с помощью реагента AlamarBlue.

Результаты исследования цитотоксичности КТ_ДГЛК, представлены на рисунке 33. Анализ данных показал отсутствие статистически значимых различий в жизнеспособности клеток между контрольной группой и КТ при концентрациях, соответствующих разведениям 1:100 и 1:200, на протяжении всего периода инкубации (72 часа) для обеих тестируемых клеточных линий.

Цитотоксический эффект был зарегистрирован для КТ_ДГЛК, разбавленных в 10 раз, где отмечалось достоверное снижение жизнеспособности клеток. Установлена четкая зависимость цитотоксического ответа от времени инкубации — увеличение времени приводило к прогрессирующему снижению жизнеспособности клеточных культур. Наблюдаемые эффекты предположительно связаны с высокой биологической активностью ДГЛК, которая может отщепляться от поверхности нанокристаллов в клеточной среде. ДГЛК является эндогенным кофактором ферментативных комплексов. Этот процесс может приводить также к цитотоксическому эффекту кадмийсодержащего ядра КТ. Также возможно

снижение коллоидной стабильности наночастиц в биологических средах, что существенно влияет на их взаимодействие с клетками и последующие биологические эффекты.

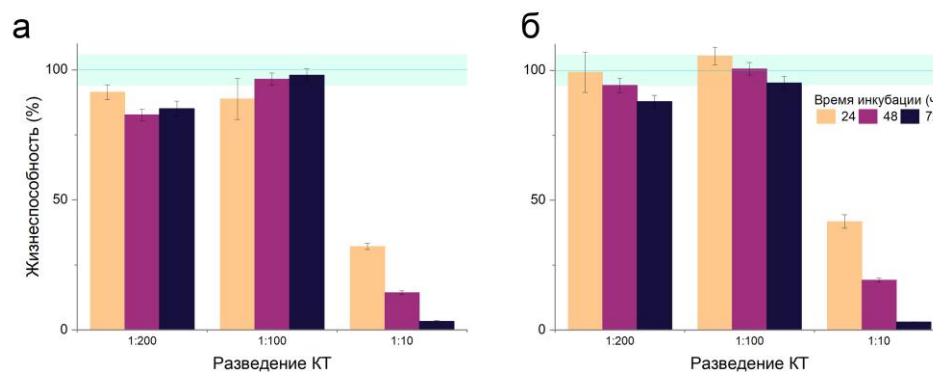


Рисунок 33. Жизнеспособность клеток L929 (а) и 4Т1 (б) при различных концентрациях и времени инкубации КТ_ДГЛК.

Важно отметить, что КТ при концентрации, которая используется в разработанной аналитической методике определения МИТ (соответствующие разведение 1:200), показала отсутствие статистически значимого токсического эффекта, что подтверждает возможность их безопасного применения в лабораторной диагностике *in vitro*.

Таким образом, КТ_ДГЛК, используемые в разработанной методике определения МИТ, не проявляют статистически значимого цитотоксического действия на тестируемые клеточные линии. Полученные результаты подтверждают возможность безопасного применения данных наноматериалов в клинической лабораторной диагностике для мониторинга концентрации МИТ.

Заключение по 5 главе:

Проведена комплексная аналитическая валидация разработанной люминесцентной методики определения МИТ с использованием КТ_ДГЛК. Установлено, что методика обладает высокими аналитическими характеристиками: линейный диапазон 5–260 нг/мл в плазме крови, ПО 3,6 нг/мл, высокая селективность по отношению к потенциальным интерферентам, а также воспроизводимость и точность. Результаты анализа образцов плазмы крови

человека демонстрируют сходимость с данными, полученными референтным методом ВЭЖХ-УФ.

Практическая значимость методики подтверждена ее применимостью для анализа плазмы крови человека. Оценка цитотоксичности показала, что КТ_ДГЛК в рабочей концентрации не проявляют статистически значимого токсического эффекта на клеточные культуры, что подтверждает возможность их безопасного использования в лабораторной диагностике. Таким образом, разработанная методика валидирована и готова к применению для мониторинга концентраций МИТ.

Основные результаты главы подробно изложены в [169,171,172].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлены закономерности тушения люминесценции квантовых точек (КТ) — тройных AgInS/ZnS , сплавных CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS , стабилизированных тиогликолевой (ТГК), меркаптопропионовой (МПК) и дигидролипоевой (ДГЛК) кислотами) — в присутствии митоксантрона (МИТ). На основе выявленных закономерностей разработан подход к высокочувствительному люминесцентному определению МИТ в плазме крови человека.

2. Проведено сравнительное исследование механизма тушения люминесценции КТ различного химического состава (тройных AgInS/ZnS и сплавных CdZnSeS , CdZnSeS/ZnS) в присутствии МИТ. Установлена зависимость эффективности тушения люминесценции от размера и состава КТ. Для тройных КТ AgInS/ZnS наблюдается увеличение константы Штерна-Фольмера (K_{SV}) с ростом размера нанокристаллов. Наибольшая эффективность тушения ($K_{SV} = (0,54 \pm 0,01) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) зафиксирована для частиц размером 7 нм (фракция 3). Рассчитанные K_{SV} имеют близкие значения ($K_{SV} = (1,6 \pm 0,2) \times 10^7$ и $(1,4 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ для КТ с оболочкой и без, соответственно). Для частиц без оболочки (CdZnSeS) наблюдаются отклонения от линейности в области низких концентраций МИТ, что связано с особенностями поверхностных процессов и затрудняет корректную количественную оценку.

3. Предложен механизм взаимодействия в системе МИТ с КТ. Методами стационарной и время-разрешенной флуориметрии показано, что тушение люминесценции происходит преимущественно по статическому механизму. Ключевую роль в процессе играет электростатическое взаимодействие между положительно заряженной молекулой МИТ и отрицательно заряженной поверхностью КТ с высокими константами связывания ($K_{св.} \approx (0,7-1,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). На основании анализа литературных данных и экспериментальных результатов установлено, что доминирующим механизмом тушения люминесценции КТ является фотоиндуцированный перенос электрона (ФПЭ). Основными доказательствами служат: выраженные окислительно-восстановительные свойства МИТ как акцептора электронов, отсутствие спектрального перекрытия, необходимого для Ферстеровского резонансного переноса энергии, а также статический характер

тушения с высокими константами скорости ($k_q > 10^{10} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), что соответствует критериям ФПЭ.

4. Выявлено влияние природы поверхностного лиганда КТ CdZnSeS/ZnS на эффективность тушения люминесценции в присутствии МИТ. В водной среде K_{SV} увеличиваются по ряду МПК < ДГЛК < ТГК ($K_{SV} = (0,9 \pm 0,3) \times 10^7$, $(1,5 \pm 0,2) \times 10^7$ и $(2,7 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ М}^{-1}$, соответственно). Однако в присутствии плазмы крови человека наибольшую устойчивость к неспецифическому тушению и наибольшую эффективность показали КТ, стабилизированные ДГЛК ($K_{SV} = (1,9 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ М}^{-1}$). Это связано с бидентатным характером координации лиганда, обеспечивающим прочное закрепление на поверхности КТ.

5. Разработан и валидирован люминесцентный подход к определению МИТ в плазме крови человека на основе тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS, стабилизированных ДГЛК, исключающий трудоемкую пробоподготовку. Предел обнаружения составил 3,6 нг/мл, линейный диапазон — 5–260 нг/мл. Продемонстрирована хорошая сходимость с результатами ВЭЖХ-УФ при анализе образцов плазмы крови, содержащих МИТ.

6. Установлено отсутствие цитотоксического действия КТ CdZnSeS/ZnS *in vitro* в рабочих концентрациях, что подтверждает перспективность их безопасного применения в клинической лабораторной диагностике.

Таким образом, разработанная методика определения МИТ не требует сложной пробоподготовки и может быть реализована в рутинных лабораторных и клинических исследованиях с высокой точностью. Кроме того, возможность надежного детектирования низких концентраций МИТ в плазме крови позволяет сократить объем образца, взятого у пациента, и минимизировать этапы пробоподготовки, связанные с концентрированием. Мы предполагаем, что полученные данные позволят приблизить разработанную методику к практическому применению не только для мониторинга концентрации МИТ в крови пациентов, проходящих химиотерапию, но и для исследований систем с пролонгированным высвобождением препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Борисович, Б.С. Коллоидные квантовые точки: синтез, свойства и применение / Б.С. Борисович, Р.В. Федорович // Успехи химии. — 2016. — № 12 (85). — P. 1297–1312.
2. Ekimov, A.I. Quantum size effect in semiconductor microcrystals / A.I. Ekimov, A.I.L. Efros, A.A. Onushchenko // Solid State Communications. — 1993. — № 11 (88). — P. 947–950.
3. Sun, J. Linear Absorption and Molar Extinction Coefficients in Direct Semiconductor Quantum Dots / J. Sun, E.M. Goldys // The Journal of Physical Chemistry C. — 2008. — № 25 (112). — P. 9261–9266.
4. Grabolle, M. Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties / M. Grabolle, M. Spieles, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüller, U. Resch-Genger // Analytical Chemistry. — 2009. — № 15 (81). — P. 6285–6294.
5. Cotta, M.A. Quantum Dots and Their Applications: What Lies Ahead? / M.A. Cotta // ACS Applied Nano Materials. — 2020. — № 6 (3). — P. 4920–4924.
6. Ramezani, Z. Classifications of Quantum Dots and Their Detection Principles in Sensing / Z. Ramezani, F.K. Ghalehsardi, S. Noorizadeh — 2023.
7. Quesada-González, D. Quantum dots for biosensing: Classification and applications / D. Quesada-González, A. Merkoçi // Biosensors and Bioelectronics. — 2025. — (273). — P. 117180.
8. Dabbousi, B.O. (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites / B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F.

Jensen, M.G. Bawendi // The Journal of Physical Chemistry B. — 1997. — № 46 (101). — P. 9463–9475.

9. Susumu, K. Purple-, Blue-, and Green-Emitting Multishell Alloyed Quantum Dots: Synthesis, Characterization, and Application for Ratiometric Extracellular pH Sensing / K. Susumu, L.D. Field, E. Oh, M. Hunt, J.B. Delehanty, V. Palomo, P.E. Dawson, A.L. Huston, I.L. Medintz // Chemistry of Materials. — 2017. — № 17 (29). — P. 7330–7344.

10. Reiss, P. Core/Shell Semiconductor Nanocrystals / P. Reiss, M. Protière, L. Li // Small. — 2009. — № 2 (5). — P. 154–168.

11. Ponomaryova, T.S. New-Generation Low-Toxic I–III–VI₂ Quantum Dots in Chemical Analysis / T.S. Ponomaryova, A.S. Novikova, A.M. Abramova, O.A. Goryacheva, D.D. Drozd, P.D. Strokin, I.Yu. Goryacheva // Journal of Analytical Chemistry. — 2022. — № 4 (77). — P. 402–409.

12. Choi, J. Ligand-Exchange-Ready CuInS₂/ZnS Quantum Dots via Surface-Ligand Composition Control for Film-Type Display Devices / J. Choi, W. Choi, D.Y. Jeon // ACS Applied Nano Materials. — 2019. — № 9 (2). — P. 5504–5511.

13. Tsolekile, N. Evolution of ternary I–III–VI QDs: Synthesis, characterization and application / N. Tsolekile, S. Parani, M.C. Matoetoe, S.P. Songca, O.S. Oluwafemi // Nano-Structures & Nano-Objects. — 2017. — (12). — P. 46–56.

14. Xiang, W. Studies on highly luminescent AgInS₂ and Ag–Zn–In–S quantum dots / W. Xiang, C. Xie, J. Wang, J. Zhong, X. Liang, H. Yang, L. Luo, Z. Chen // Journal of Alloys and Compounds. — 2014. — (588). — P. 114–121.

15. Raevskaya, A. A Fine Size Selection of Brightly Luminescent Water-Soluble Ag–In–S and Ag–In–S/ZnS Quantum Dots / A. Raevskaya, V. Lesnyak, D. Haubold, V. Dzhan, O. Stroyuk, N. Gaponik, D.R.T. Zahn, A. Eychmüller // The Journal of Physical Chemistry C. — 2017. — № 16 (121). — P. 9032–9042.

16. Vitshima, N.A. Effect of ZnS coating on the optoelectronic properties of aqueous glutathione capped AgInS quantum dots / N.A. Vitshima, B. Silwana, N. Tsolekile, M.C. Matoetoe // *Journal of Alloys and Compounds*. — 2022. — (900). — P. 163386.

17. Martynenko, I.V. Photoluminescence of Ag-In-S/ZnS quantum dots: Excitation energy dependence and low-energy electronic structure / I.V. Martynenko, A.S. Baimuratov, F. Weigert, J.X. Soares, L. Dharmo, P. Nickl, I. Doerfel, J. Pauli, I.D. Rukhlenko, A.V. Baranov, U. Resch-Genger // *Nano Research*. — 2019. — № 7 (12). — P. 1595–1603.

18. Ponomaryova, T.S. Visualization of 2D and 3D Tissue Models via Size-Selected Aqueous AgInS/ZnS Quantum Dots / T.S. Ponomaryova, V.V. Olomskaya, A.A. Abalymov, R.A. Anisimov, D.D. Drozd, A.V. Drozd, A.S. Novikova, M.V. Lomova, A.M. Zakharevich, I.Yu. Goryacheva, O.A. Goryacheva // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2024. — № 31 (16). — P. 40483–40498.

19. Li, Z. Carrier Dynamics in Alloyed Chalcogenide Quantum Dots and Their Light-Emitting Devices / Z. Li, J. Wei, F. Wang, Y. Tang, A. Li, Y. Guo, P. Huang, S. Brovelli, H. Shen, H. Li.

20. Yang, H. Enhanced Multiexciton Emission Property in Gradient Alloy Core/Shell CdZnSeS/ZnS Quantum Dots: Balance between Surface Passivation and Strain-Induced Lattice Defect / H. Yang, L. Zhang, Y. Tang, W. Xiang, X. Wang, M. Xiao, Y. Cui, J. Zhang // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2021. — № 19 (125). — P. 10759–10767.

21. Kim, J. High-quantum yield alloy-typed core/shell CdSeZnS/ZnS quantum dots for bio-applications / J. Kim, D.W. Hwang, H.S. Jung, K.W. Kim, X.-H. Pham, S.-H. Lee, J.W. Byun, W. Kim, H.-M. Kim, E. Hahm, K. Ham, W.-Y. Rho, D.S. Lee, B.-H. Jun // *Journal of Nanobiotechnology*. — 2022. — № 1 (20). — P. 22.

22. Yang, H.Y. Multifunctional Polymer Ligand Interface CdZnSeS/ZnS Quantum Dot/Cy3-Labeled Protein Pairs as Sensitive FRET Sensors / H.Y. Yang, Y. Fu, M.-S. Jang, Y. Li, J.H. Lee, H. Chae, D.S. Lee // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2016. — № 51 (8). — P. 35021–35032.

23. Cheng, J. Aqueous synthesis of high-fluorescence CdZnTe alloyed quantum dots / J. Cheng, D. Li, T. Cheng, B. Ren, G. Wang, J. Li // *Journal of Alloys and Compounds*. — 2014. — (589). — P. 539–544.

24. Zheng, Y. Aqueous Synthesis of Glutathione-Capped ZnSe and $\text{Zn}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Se}$ Alloyed Quantum Dots / Y. Zheng, Z. Yang, J.Y. Ying // *Advanced Materials*. — 2007. — № 11 (19). — P. 1475–1479.

25. Park, S.-Y. Long-term stability of CdSe/CdZnS quantum dot encapsulated in a multi-lamellar microcapsule / S.-Y. Park, H.-S. Kim, J. Yoo, S. Kwon, T.J. Shin, K. Kim, S. Jeong, Y.-S. Seo // *Nanotechnology*. — 2015. — (26). — P. 275602.

26. Parak, W.J. Conjugation of DNA to Silanized Colloidal Semiconductor Nanocrystalline Quantum Dots / W.J. Parak, D. Gerion, D. Zanchet, A.S. Woerz, T. Pellegrino, C. Micheel, S.C. Williams, M. Seitz, R.E. Bruehl, Z. Bryant, C. Bustamante, C.R. Bertozzi, A.P. Alivisatos // *Chemistry of Materials*. — 2002. — № 5 (14). — P. 2113–2119.

27. Lees, E.E. The Preparation of Colloidally Stable, Water-Soluble, Biocompatible, Semiconductor Nanocrystals with a Small Hydrodynamic Diameter / E.E. Lees, T.-L. Nguyen, A.H.A. Clayton, P. Mulvaney // *ACS Nano*. — 2009. — № 5 (3). — P. 1121–1128.

28. Brown, P.R. Energy Level Modification in Lead Sulfide Quantum Dot Thin Films through Ligand Exchange / P.R. Brown, D. Kim, R.R. Lunt, N. Zhao, M.G. Bawendi, J.C. Grossman, V. Bulović // *ACS Nano*. — 2014. — № 6 (8). — P. 5863–5872.

29. Liu, M. Ligand Exchange of Quantum Dots: A Thermodynamic Perspective / M. Liu, G. Tang, Y. Liu, F.-L. Jiang // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. — 2024. — № 7 (15). — P. 1975–1984.

30. Sun, H. Reversible Z-Type to L-Type Ligand Exchange on Zinc-Blende Cadmium Selenide Nanoplatelets / H. Sun, W.E. Buhro // *Chemistry of Materials*. — 2020. — № 13 (32). — P. 5814–5826.

31. Anderson, N.C. Ligand Exchange and the Stoichiometry of Metal Chalcogenide Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Facile Metal-Carboxylate Displacement and Binding / N.C. Anderson, M.P. Hendricks, J.J. Choi, J.S. Owen // *Journal of the American Chemical Society*. — 2013. — № 49 (135). — P. 18536–18548.

32. Ip, A.H. Hybrid passivated colloidal quantum dot solids / A.H. Ip, S.M. Thon, S. Hoogland, O. Voznyy, D. Zhitomirsky, R. Debnath, L. Levina, L.R. Rollny, G.H. Carey, A. Fischer, K.W. Kemp, I.J. Kramer, Z. Ning, A.J. Labelle, K.W. Chou, A. Amassian, E.H. Sargent // *Nature Nanotechnology*. — 2012. — № 9 (7). — P. 577–582.

33. Zhu, H. Synthesis and Optical Properties of Thiol Functionalized CdSe/ZnS (Core/Shell) Quantum Dots by Ligand Exchange / H. Zhu, M.Z. Hu, L. Shao, K. Yu, R. Dabestani, Md.B. Zaman, S. Liao // *Journal of Nanomaterials*. — 2014. — № 1 (2014). — P. 324972.

34. Koole, R. Time-Dependent Photoluminescence Spectroscopy as a Tool to Measure the Ligand Exchange Kinetics on a Quantum Dot Surface / R. Koole, P. Schapotschnikow, C. de Mello Donegá, T.J.H. Vlugt, A. Meijerink // *ACS Nano*. — 2008. — № 8 (2). — P. 1703–1714.

35. Schwabacher, J.C. Origin of the pH Dependence of Emission of Aqueous Dihydrolipoic Acid-Capped PbS Quantum Dots / J.C. Schwabacher, M.S. Kodaimati, E.A. Weiss // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2019. — № 28 (123). — P. 17574–17579.

36. You, H.R. Recent Research Progress in Surface Ligand Exchange of PbS Quantum Dots for Solar Cell Application / H.R. You, J.Y. Park, D.H. Lee, Y. Kim, J. Choi // *Applied Sciences*. — 2020. — № 3 (10). — P. 975.
37. Pong, B.-K. Modified Ligand-Exchange for Efficient Solubilization of CdSe/ZnS Quantum Dots in Water: A Procedure Guided by Computational Studies / B.-K. Pong, B.L. Trout, J.-Y. Lee // *Langmuir*. — 2008. — № 10 (24). — P. 5270–5276.
38. Li, J. Electrochemistry of thiol-capped CdTe quantum dots and its sensing application / J. Li, G. Zou, X. Hu, X. Zhang // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 2009. — № 1 (625). — P. 88–91.
39. Han, H. Electrogenenerated chemiluminescence from thiol-capped CdTe quantum dots and its sensing application in aqueous solution / H. Han, Z. Sheng, J. Liang // *Analytica Chimica Acta*. — 2007. — № 1 (596). — P. 73–78.
40. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy J.R. Lakowicz, Boston, MA: Springer US, — 2006. 27–61 p.
41. Алов, Н.В. Основы аналитической химии / Н.В. Алов, и др. 5-е., Издательский центр «Академия», — 2012. 416 с.
42. Callis, P.R. Binding phenomena and fluorescence quenching. I: Descriptive quantum principles of fluorescence quenching using a supermolecule approach / P.R. Callis // *Journal of Molecular Structure*. — 2014. — (1077). — P. 14–21.
43. Gu, Q. Improvement of Inner Filter Effect Correction Based on Determination of Effective Geometric Parameters Using a Conventional Fluorimeter / Q. Gu, J.E. Kenny // *Analytical Chemistry*. — 2009. — № 1 (81). — P. 420–426.
44. Kubista, M. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra / M. Kubista, R. Sjöback, S. Eriksson, B. Albinsson // *Analyst*. — 1994. — № 3 (119). — P. 417–419.

45. Weert, M. van de Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology / M. van de Weert, L. Stella // *Journal of Molecular Structure*. — 2011. — № 1 (998). — P. 144–150.
46. Stella, L. A reassessment of the association between azulene and [60]fullerene. Possible pitfalls in the determination of binding constants through fluorescence spectroscopy / L. Stella, A.L. Capodilupo, M. Bietti // *Chemical Communications*. — 2008. — № 39. — P. 4744–4746.
47. Rahman, A.F.M.M. Unexpectedly large binding constants of azulenenes with fullerenes / A.F.M.M. Rahman, S. Bhattacharya, X. Peng, T. Kimura, N. Komatsu // *Chemical Communications*. — 2008. — № 10. — P. 1196–1198.
48. Liang, J. Study on the interaction between bovine serum albumin and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques / J. Liang, Y. Cheng, H. Han // *Journal of Molecular Structure*. — 2008. — № 1 (892). — P. 116–120.
49. Zhang, G. Interaction of the irisfloreantin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study / G. Zhang, A. Wang, T. Jiang, J. Guo // *Journal of Molecular Structure*. — 2008. — № 1 (891). — P. 93–97.
50. He, W. Molecular modeling and spectroscopic studies on binding of 2,6-bis[4-(4-amino-2-trifluoromethylphenoxy)benzoyl] pyridine to human serum albumin / W. He, H. Chen, F. Sheng, X. Yao // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2009. — № 2 (74). — P. 427–433.
51. Ladokhin, A.S. How to Measure and Analyze Tryptophan Fluorescence in Membranes Properly, and Why Bother? / A.S. Ladokhin, S. Jayasinghe, S.H. White // *Analytical Biochemistry*. — 2000. — № 2 (285). — P. 235–245.
52. Gatto, E. Effect of Peptide Lipidation on Membrane Perturbing Activity: A Comparative Study on Two Trichogin Analogues / E. Gatto, C. Mazzuca, L. Stella, M.

Venanzi, C. Toniolo, B. Pispisa // The Journal of Physical Chemistry B. — 2006. — № 45 (110). — P. 22813–22818.

53. Stella, L. Aggregation and Water-Membrane Partition as Major Determinants of the Activity of the Antibiotic Peptide Trichogin GA IV / L. Stella, C. Mazzuca, M. Venanzi, A. Palleschi, M. Didonè, F. Formaggio, C. Toniolo, B. Pispisa // Biophysical Journal. — 2004. — № 2 (86). — P. 936–945.

54. Паркер, С.А. Фотолюминесценция растворов / С.А. Паркер М.:Мир, — 1972. 510 с.

55. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz / T. Förster — 1960. — P. 326–339.

56. Clegg, R.M. Fluorescence resonance energy transfer / R.M. Clegg // Current Opinion in Biotechnology. — 1995. — № 1 (6). — P. 103–110.

57. Clegg, R.M. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done Fret and Flim Techniques/ Elsevier, — 2009. 1–57 p.

58. Piotrowiak, P. Photoinduced electron transfer in molecular systems: recent developments / P. Piotrowiak // Chemical Society Reviews. — 1999. — № 2 (28). — P. 143–150.

59. Lindstrom, C.D. Photoinduced Electron Transfer at Molecule–Metal Interfaces / C.D. Lindstrom, X.-Y. Zhu // Chemical Reviews. — 2006. — № 10 (106). — P. 4281–4300.

60. Natali, M. Photoinduced electron transfer across molecular bridges: electron- and hole-transfer superexchange pathways / M. Natali, S. Campagna, F. Scandola // Chemical Society Reviews. — 2014. — № 12 (43). — P. 4005–4018.

61. Kavarnos, G.J. Fundamental concepts of photoinduced electron transfer J. Mattay, Berlin, Heidelberg: Springer, — 1990. 21–58 p.

62. Dexter, D.L. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids / D.L. Dexter // The Journal of Chemical Physics. — 1953. — № 5 (21). — P. 836–850.
63. Olaya-Castro, A. Energy transfer from Förster–Dexter theory to quantum coherent light-harvesting / A. Olaya-Castro, G.D. Scholes // International Reviews in Physical Chemistry. — 2011. — № 1 (30). — P. 49–77.
64. Skourtis, S.S. Dexter energy transfer pathways / S.S. Skourtis, C. Liu, P. Antoniou, A.M. Virshup, D.N. Beratan // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2016. — № 29 (113). — P. 8115–8120.
65. Sen, T. Au Nanoparticle-Based Surface Energy Transfer Probe for Conformational Changes of BSA Protein / T. Sen, K.K. Haldar, A. Patra // The Journal of Physical Chemistry C. — 2008. — № 46 (112). — P. 17945–17951.
66. Yun, C.S. Nanometal Surface Energy Transfer in Optical Rulers, Breaking the FRET Barrier / C.S. Yun, A. Javier, T. Jennings, M. Fisher, S. Hira, S. Peterson, B. Hopkins, N.O. Reich, G.F. Strouse // Journal of the American Chemical Society. — 2005. — № 9 (127). — P. 3115–3119.
67. Zhu, S. Experimental determination of surface energy for high-energy surface: A review / S. Zhu, K. Xie, Q. Lin, R. Cao, F. Qiu // Advances in Colloid and Interface Science. — 2023. — (315). — P. 102905.
68. Knowles, K.E. Dual-Time Scale Photoinduced Electron Transfer from PbS Quantum Dots to a Molecular Acceptor / K.E. Knowles, M. Malicki, E.A. Weiss // Journal of the American Chemical Society. — 2012. — № 30 (134). — P. 12470–12473.
69. Spanhel, L. Photochemistry of colloidal semiconductors. 20. Surface modification and stability of strong luminescing CdS particles / L. Spanhel, M. Haase, H. Weller, A. Henglein // ACS Publications. — 2002.

70. Moore, D.E. Q-CdS Photoluminescence Activation on Zn^{2+} and Cd^{2+} Salt Introduction / D.E. Moore, K. Patel // *Langmuir*. — 2001. — № 8 (17). — P. 2541–2544.
71. Sooklal, K. Photophysical Properties of ZnS Nanoclusters with Spatially Localized Mn^{2+} / K. Sooklal, B.S. Cullum, S.M. Angel, C.J. Murphy // *The Journal of Physical Chemistry*. — 1996. — № 11 (100). — P. 4551–4555.
72. Chen, L. Effect of Zn^{2+} and Mn^{2+} introduction on the luminescent properties of colloidal ZnS:Mn^{2+} nanoparticles / L. Chen, J. Zhang, Y. Luo, S. Lu, X. Wang // *Applied Physics Letters*. — 2004. — № 1 (84). — P. 112–114.
73. Chen, Y. Luminescent CdS Quantum Dots as Selective Ion Probes / Y. Chen, Z. Rosenzweig // *Analytical Chemistry*. — 2002. — № 19 (74). — P. 5132–5138.
74. Vinayaka, A.C. Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluoroimmunoassay based biosensor / A.C. Vinayaka, S. Basheer, M.S. Thakur // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2009. — № 6 (24). — P. 1615–1620.
75. Ji, X. (CdSe)ZnS Quantum Dots and Organophosphorus Hydrolase Bioconjugate as Biosensors for Detection of Paraoxon / X. Ji, J. Zheng, J. Xu, V.K. Rastogi, T.-C. Cheng, J.J. DeFrank, R.M. Leblanc // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2005. — № 9 (109). — P. 3793–3799.
76. Gill, R. Optical Detection of Glucose and Acetylcholine Esterase Inhibitors by H_2O_2 -Sensitive CdSe/ZnS Quantum Dots / R. Gill, L. Bahshi, R. Freeman, I. Willner.
77. Liang, J.-G. The interaction between some diamines and CdSe quantum dots / J.-G. Liang, S.-S. Zhang, X.-P. Ai, X.-H. Ji, Z.-K. He // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2005. — № 13 (61). — P. 2974–2978.
78. Shi, G.H. Fluorescence quenching of CdSe quantum dots by nitroaromatic explosives and their relative compounds / G.H. Shi, Z.B. Shang, Y. Wang, W.J. Jin, T.C.

Zhang // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2008. — № 2 (70). — P. 247–252.

79. Goldman, E.R. A Hybrid Quantum Dot–Antibody Fragment Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based TNT Sensor / E.R. Goldman, I.L. Medintz, J.L. Whitley, A. Hayhurst, A.R. Clapp, H.T. Uyeda, J.R. Deschamps, M.E. Lassman, H. Mattoussi // *Journal of the American Chemical Society*. — 2005. — № 18 (127). — P. 6744–6751.

80. Hamity, M. The effect of tetraalkylammonium and alkyl sulfate salts on the fluorescence bands of quantum-sized CdS / M. Hamity, R.H. Lema, C.A. Suchetti // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 1998. — № 2 (115). — P. 163–168.

81. Diao, X.-L. Fluorescence-detecting cationic surfactants using luminescent CdTe quantum dots as probes / X.-L. Diao, Y.-S. Xia, T.-L. Zhang, Y. Li, C.-Q. Zhu // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2007. — № 5 (388). — P. 1191–1197.

82. Zee-Cheng, R.K.Y. Structural modification study of bis(substituted aminoalkylamino)anthraquinones. An evaluation of the relationship of the [2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino side chain with antineoplastic activity / R.K.Y. Zee-Cheng, E.G. Podrebarac, C.S. Menon, C.C. Cheng // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 1979. — № 5 (22). — P. 501–505.

83. Murdock, K.C. Antitumor agents. 1. 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]-9,10-anthracenediones / K.C. Murdock, R.G. Child, P.F. Fabio, R.B. Angier, R.E. Wallace, F.E. Durr, R.V. Citarella // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 1979. — № 9 (22). — P. 1024–1030.

84. Beijnen, J.H. Mitoxantrone Hydrochloride K. Florey, Academic Press, — 1988. 221–258 p.

85. Faulds, D. Mitoxantrone / D. Faulds, J.A. Balfour, P. Chrisp, H.D. Langtry // *Drugs*. — 1991. — № 3 (41). — P. 400–449.

86. Damiani, R.M. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone / R.M. Damiani, D.J. Moura, C.M. Viau, R.A. Caceres, J.A.P. Henriques, J. Saffi // *Archives of Toxicology*. — 2016. — № 9 (90). — P. 2063–2076.

87. Anderson, R. Phase II trial of cytarabine and mitoxantrone with devimistat in acute myeloid leukemia / R. Anderson, L.D. Miller, S. Isom, J.W. Chou, K.M. Pladna, N.J. Schramm, L.R. Ellis, D.S. Howard, R.R. Bhawe, M. Manuel, S. Dralle, S. Lyerly, B.L. Powell, T.S. Pardee // *Nature Communications*. — 2022. — № 1 (13). — P. 1673.

88. Goodin, D.S. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology / D.S. Goodin, B.G. Arnason, P.K. Coyle, E.M. Frohman, D.W. Paty, Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology // *Neurology*. — 2003. — № 10 (61). — P. 1332–1338.

89. Lefort, M. Ten-year follow-up after mitoxantrone induction for early highly active relapsing-remitting multiple sclerosis: An observational study of 100 consecutive patients / M. Lefort, G. Le Corre, E. Le Page, C. Rizzato, D. Le Port, L. Michel, A. Kerbrat, E. Leray, G. Edan // *Revue Neurologique*. — 2022. — № 6 (178). — P. 569–579.

90. Ehninger, G. Pharmacokinetics and Metabolism of Mitoxantrone A Review / G. Ehninger, U. Schuler, B. Proksch, K.-P. Zeller, J. Blanz // *Clinical Pharmacokinetics*. — 1990. — № 5 (18). — P. 365–380.

91. Enache, M. Spectral characterization of self-association of antitumor drug mitoxantrone // *Rev. Roum. Chim.* — 2010. V. 55. 4. 255–262 P.

92. Enache, M. Mitoxantrone-Surfactant Interactions: A Physicochemical Overview / M. Enache, A.M. Toader, M.I. Enache // *Molecules*. — 2016. — № 10 (21). — P. 1356.

93. Kreft, D. Binding mechanism of anti-cancer chemotherapeutic drug mitoxantrone to DNA characterized by magnetic tweezers / D. Kreft, Y. Wang, M. Rattay, K. Toensing, D. Anselmetti // *Journal of Nanobiotechnology*. — 2018. — № 1 (16). — P. 56.

94. Li, N. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods / N. Li, Y. Ma, C. Yang, L. Guo, X. Yang // *Biophysical Chemistry*. — 2005. — № 3 (116). — P. 199–205.

95. Khan, S.N. Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: spectroscopic and molecular modeling studies / S.N. Khan, B. Islam, R. Yennamalli, A. Sultan, N. Subbarao, A.U. Khan // *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. — 2008. — № 5 (35). — P. 371–382.

96. Keswani, N. Calorimetric and spectroscopic studies on the interaction of anticancer drug mitoxantrone with human serum albumin / N. Keswani, N. Kishore // *The Journal of Chemical Thermodynamics*. — 2011. — № 9 (43). — P. 1406–1413.

97. Bell, D.H. Characterization of the fluorescence of the antitumor agent, mitoxantrone / D.H. Bell // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. — 1988. — № 1 (949). — P. 132–137.

98. Lin, S. Solvatochromism and time-resolved fluorescence of the antitumor agent mitoxantrone and its analogs in solution and in DNA / S. Lin, W.S. Struve // *The Journal of Physical Chemistry*. — 1991. — № 6 (95). — P. 2251–2256.

99. Lee, B.S. Optical spectroscopic studies of the antitumor drug 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]-9,10-anthracenedione(mitoxantrone) /

B.S. Lee, P.K. Dutta // The Journal of Physical Chemistry. — 1989. — № 15 (93). — P. 5665–5672.

100. Hamad, A.A. Investigating the interaction of mitoxantrone with anionic surfactants by spectrofluorimetry and its application for the feasible analysis of pharmaceutical preparation and biological fluids / A.A. Hamad, R. Ali, S.M. Derayea.

101. Seiter, K. Toxicity of the topoisomerase II inhibitors / K. Seiter // Expert Opinion on Drug Safety. — 2005. — № 2 (4). — P. 219–234.

102. Verweij, J. Phase II study on mitoxantrone in adenoid cystic carcinomas of the head and neck. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group / J. Verweij, P.H. de Mulder, A. de Graeff, J.B. Vermorken, J. Wildiers, J. Kerger, J. Schornagel, F. Cignetti, A. Kirkpatrick, T. Sahmoud, J.L. Lefebvre // Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. — 1996. — № 8 (7). — P. 867–869.

103. Agarwal, S. Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA / S. Agarwal, D.K. Jangir, R. Mehrotra // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2013. — (120). — P. 177–182.

104. Khan, S.N. Effect of mitoxantrone on proliferation dynamics and cell-cycle progression / S.N. Khan, S.K. Lal, P. Kumar, A.U. Khan // Bioscience Reports. — 2010. — № 6 (30). — P. 375–381.

105. An, G. HPLC analysis of mitoxantrone in mouse plasma and tissues: Application in a pharmacokinetic study / G. An, M.E. Morris // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2010. — № 3 (51). — P. 750–753.

106. Sugihara, N. Effects of Catechins and Their Related Compounds on Cellular Accumulation and Efflux Transport of Mitoxantrone in Caco-2 Cell Monolayers / N.

Sugihara, N. Kuroda, F. Watanabe, T. Choshi, J. Kamishikiryo, M. Seo // *Journal of Food Science*. — 2017. — № 5 (82). — P. 1224–1230.

107. Liu, Y. An electrochemical sensor based on a molecularly imprinted polymer for determination of anticancer drug Mitoxantrone / Y. Liu, M. Wei, Y. Hu, L. Zhu, J. Du // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2018. — (255). — P. 544–551.

108. Štenglová-Netíková, I.R. Anthracycline antibiotics derivate mitoxantrone-Destructive sorption and photocatalytic degradation / I.R. Štenglová-Netíková, L. Petruželka, M. Šťastný, V. Štengl // *PloS One*. — 2018. — № 3 (13). — P. e0193116.

109. De Vries, A.J. Quantification of mitoxantrone in bone marrow by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / A.J. De Vries, K. Nooter // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. — 1991. — № 2 (563). — P. 435–442.

110. Song, Y. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples / Y. Song, C. Xu, H. Kuroki, Y. Liao, M. Tsunoda // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2018. — (147). — P. 35–49.

111. Labib, M. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules / M. Labib, E.H. Sargent, S.O. Kelley // *Chemical Reviews*. — 2016. — № 16 (116). — P. 9001–9090.

112. Karimi-Maleh, H. Electrochemical Sensors, a Bright Future in the Fabrication of Portable Kits in Analytical Systems / H. Karimi-Maleh, F. Karimi, M. Alizadeh, A.L. Sanati // *Chemical Record (New York, N.Y.)*. — 2020. — № 7 (20). — P. 682–692.

113. Villar, J.C.C. Determination of mitoxantrone using phase-selective a.c. adsorptive stripping voltammetry in a flow system with selectivity enhancement / J.C.C. Villar, A.C. García, P.T. Blanco // *Analytica Chimica Acta*. — 1992. — № 2 (256). — P. 231–236.

114. Oliveira Brett, A.M. Electrochemical oxidation of mitoxantrone at a glassy carbon electrode / A.M. Oliveira Brett, T.R.A. Macedo, D. Raimundo, M.H. Marques, S.H.P. Serrano // *Analytica Chimica Acta*. — 1999. — № 1 (385). — P. 401–408.
115. Wu-Ai, W.U. Study and Application of Mitoxantrone Sensor Based on Molecular Imprinting / W.U. Wu-Ai, Y.I.N. Zhi-Fen, W.E.I. Jing-Rui, G.U.O. Man-Dong* // *Chemical Journal of Chinese Universities*. — 2008. — № 7 (29). — P. 1334.
116. Ye, L. Molecularly imprinted polymers with multi-functionality / L. Ye // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2016. — № 7 (408). — P. 1727–1733.
117. ERDEM, A. Electrochemical DNA biosensors developed for the monitoring of biointeractions with drugs: a review / A. ERDEM, H. ŞENTÜRK, E. YILDIZ, M. MARAL, A. YILDIRIM, A. BOZOĞLU, B. KIVRAK, N.C. AY // *Turkish Journal of Chemistry*. — № 5 (47). — P. 864–887.
118. Guin, P.S. Interaction of 1,4-Dihydroxy-9,10-Anthraquinone with Calf Thymus DNA: A Comparison with Anthracycline Anticancer Drugs / P.S. Guin, S. Das, P.C. Mandal // *Journal of Solution Chemistry*. — 2011. — № 3 (40). — P. 492–501.
119. Torkzadeh-Mahani, A. A label-free Electrochemical DNA Biosensor for the Determination of Low Concentrations of Mitoxantrone in Serum Samples / A. Torkzadeh-Mahani, A. Mohammadi, M. Torkzadeh-Mahani, M. Mohamadi // *International Journal of Electrochemical Science*. — 2017. — № 7 (12). — P. 6031–6044.
120. Gabriel, J. High-performance liquid chromatographic study of the aromatic nitrile metabolism in soil bacteria / J. Gabriel, J. Věková, J. Vosáhlo // *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications*. — 1996. — № 1 (681). — P. 191–195.
121. Breuzard, G. Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells / G. Breuzard, J.-F. Angiboust, P. Jeannesson, M. Manfait, J.-M. Millot // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2004. — № 2 (320). — P. 615–621.

122. Nabiev, I. Does Adsorption on the Surface of a Silver Colloid Perturb Drug/DNA Interactions? Comparative SERS, FT-SERS, and Resonance Raman Study of Mitoxantrone and Its Derivatives / I. Nabiev, A. Baranov, I. Chourpa, A. Beljebbar, G.D. Sockalingum, M. Manfait // *The Journal of Physical Chemistry*. — 1995. — № 5 (99). — P. 1608–1613.

123. Meneghello, M. Using Electrochemical SERS to Measure the Redox Potential of Drug Molecules Bound to dsDNA—a Study of Mitoxantrone / M. Meneghello, E. Papadopoulou, P. Ugo, P.N. Bartlett // *Electrochimica Acta*. — 2016. — (187). — P. 684–692.

124. Ganbold, E.-O. Nonidentical intracellular drug release rates in Raman and fluorescence spectroscopic determination / E.-O. Ganbold, J. Yoon, D. Kim, S.-W. Joo // *Physical Chemistry Chemical Physics*. — 2015. — № 5 (17). — P. 3019–3023.

125. McLaughlin, C. Quantitative analysis of mitoxantrone by surface-enhanced resonance Raman scattering / C. McLaughlin, D. MacMillan, C. McCardle, W.E. Smith // *Analytical Chemistry*. — 2002. — № 13 (74). — P. 3160–3167.

126. Tian, F. Gold nanostars for efficient in vitro and in vivo real-time SERS detection and drug delivery via plasmonic-tunable Raman/FTIR imaging / F. Tian, J. Conde, C. Bao, Y. Chen, J. Curtin, D. Cui // *Biomaterials*. — 2016. — (106). — P. 87–97.

127. Lad, A. DNA-Labeled Gold-Based Optical Nanobiosensor Monitoring DNA–Mitoxantrone Interaction / A. Lad, Y.K. Agrawal // *BioNanoScience*. — 2012. — № 1 (2). — P. 9–15.

128. Zhao, D. «Turn off-on» fluorescent sensor for platinum drugs-DNA interactions based on quantum dots / D. Zhao, J. Li, T. Yang, Z. He // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2014. — (52). — P. 29–35.

129. Zhong, Y. Red emission carbon dots for mitoxantrone detection / Y. Zhong, A. Chen, X. Yin, R. Li, Q. Deng, R. Yang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2023. — (382). — P. 133535.

130. Hamad, A.A. A simple single jar “on–off fluorescence” designed system for the determination of mitoxantrone using an eosin Y dye in raw powder, vial, and human biofluids / A.A. Hamad, R. Ali, S.M. Derayea // *RSC Advances*. — 2022. — № 12 (12). — P. 7413–7421.

131. Lian, X. Antineoplastic Mitoxantrone Monitor: A Sandwiched Mixed Matrix Membrane (MMM) Based on a Luminescent MOF-Hydrogel Hybrid / X. Lian, Y. Zhang, J. Wang, B. Yan // *Inorganic Chemistry*. — 2020. — № 14 (59). — P. 10304–10310.

132. Mohammadinejad, A. Tandem determination of mitoxantrone and ribonucleic acid using mercaptosuccinic acid-capped CdTe quantum dots / A. Mohammadinejad, Z. Es’haghi, K. Abnous, S.A. Mohajeri // *Journal of Luminescence*. — 2017. — (190). — P. 254–260.

133. Yuan, J. Anticancer drug-DNA interactions measured using a photoinduced electron-transfer mechanism based on luminescent quantum dots / J. Yuan, W. Guo, X. Yang, E. Wang // *Analytical Chemistry*. — 2009. — № 1 (81). — P. 362–368.

134. Wei, J.-R. Ratiometric fluorescence for sensitive and selective detection of mitoxantrone using a MIP@rQDs@SiO₂ fluorescence probe / J.-R. Wei, H.-Y. Chen, W. Zhang, J.-X. Pan, F.-Q. Dang, Z.-Q. Zhang, J. Zhang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2017. — (244). — P. 31–37.

135. Jiang, X. A fluorescent switch sensor for detection of anticancer drug and ctDNA based on the glutathione stabilized gold nanoclusters / X. Jiang, D.-Q. Feng, G. Liu, D. Fan, W. Wang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2016. — (232). — P. 276–282.

136. Tsyupka, D.V. Anthracycline antibiotics detection using turn-off luminescent nanosensors / D.V. Tsyupka, Y.A. Podkolodnaya, E.A. Khudina, D.G. Koganova, O.A. Goryacheva, A.M. Abramova, I.Y. Goryacheva // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2024. — (177). — P. 117774.

137. Goryacheva, O.A. Current trends and challenges in the mitoxantrone measuring in biofluids and new pharmaceutical systems / O.A. Goryacheva, P.S. Pidenko, A.V. Markin, N.E. Markina, D.V. Tsyupka, E.A. Mordovina, T.D. Ponomaryova, S.A. Meshcheryakova, D.A. Kornilov, P.D. Strokin, D.D. Drozd, Y.A. Podkolodnaya, A.A. Kovyrshina, I.V. Morozova, T.V. Shelekhova, I.Y. Goryacheva // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2023. — (169). — P. 117373.

138. Drozd, D.D. Luminescent alloyed quantum dots for turn-off enzyme-based assay / D.D. Drozd, N.A. Byzova, P.S. Pidenko, D.V. Tsyupka, P.D. Strokin, O.A. Goryacheva, A.V. Zherdev, I.Yu. Goryacheva, B.B. Dzantiev // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2022. — № 15 (414). — P. 4471–4480.

139. Drozd, D.D. Dihydrolipoic acid coated alloyed quantum dots / D.D. Drozd, P.S. Pidenko, K.Y. Presnyakov, P.D. Strokin, E.S. Speranskaya, I.Y. Goryacheva // *Saratov Fall Meeting 2019: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine*. — 2020. — (11457). — P. 247–252.

140. Würth, C. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples / C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger // *Nature Protocols*. — 2013. — № 8 (8). — P. 1535–1550.

141. Melhuish, W.H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute / W.H. Melhuish // *The Journal of Physical Chemistry*. — 1961. — № 2 (65). — P. 229–235.

142. Würth, C. Comparison of Methods and Achievable Uncertainties for the Relative and Absolute Measurement of Photoluminescence Quantum Yields / C. Würth,

M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger // *Analytical Chemistry*. — 2011. — № 9 (83). — P. 3431–3439.

143. Riley, C.M. *Development and Validation of Analytical Methods* / C.M. Riley, T.W. Rosanske Elsevier, — 1996. 363 c.

144. Tsyupka, D.V. High-fluorescent product of folic acid photodegradation: Optical properties and cell effect / D.V. Tsyupka, E.A. Mordovina, O.A. Sindeeva, A.V. Sapelkin, G.B. Sukhorukov, I.Y. Goryacheva // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 2021. — (407). — P. 113045.

145. Tsyupka, D.V. Luminescence behavior of colloid quantum dots in the presence anthracycline antibiotic mitoxantrone: Surface interaction and luminescence quenching, size and composition dependence, potential for clinical study / D.V. Tsyupka, E.A. Mordovina, T.S. Ponomaryova, D.D. Drozd, I.Y. Goryacheva, O.A. Goryacheva // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. — 2023. — (671). — P. 131648.

146. Huang, Z. ZnS Shells Enhance Triplet Energy Transfer from CdSe Nanocrystals for Photon Upconversion / Z. Huang, P. Xia, N. Megerdich, D.A. Fishman, V.I. Vullev, M.L. Tang // *ACS Photonics*. — 2018. — № 8 (5). — P. 3089–3096.

147. Grabolle, M. Stability and fluorescence quantum yield of CdSe-ZnS quantum dots--influence of the thickness of the ZnS shell / M. Grabolle, J. Ziegler, A. Merkulov, T. Nann, U. Resch-Genger // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2008. — (1130). — P. 235–241.

148. Enache, M. Spectral studies on the molecular interaction of anticancer drug mitoxantrone with CTAB micelles / M. Enache, E. Volanschi // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2011. — № 2 (100). — P. 558–565.

149. B. Davies, D. Self-association of the antitumour agent novatrone (mitoxantrone) and its hetero-association with caffeine / D. B. Davies, D. A. Veselkov,

M. P. Evstigneev, A. N. Veselkov // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. — 2001. — № 1 (0). — P. 61–67.

150. Sharma, S.N. Photoinduced Charge Transfer between CdSe Quantum Dots and p-Phenylenediamine / S.N. Sharma, Z.S. Pillai, P.V. Kamat // The Journal of Physical Chemistry B. — 2003. — № 37 (107). — P. 10088–10093.

151. Galian, R.E. Fluorescence quenching of CdSe quantum dots by tertiary amines and their surface binding effect / R.E. Galian, J.C. Scaiano // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2009. — № 1 (8). — P. 70–74.

152. Boles, M.A. The surface science of nanocrystals / M.A. Boles, D. Ling, T. Hyeon, D.V. Talapin // Nature Materials. — 2016. — № 2 (15). — P. 141–153.

153. Liu, Y. A fluorometric optical fiber nanoprobe for copper(II) by using AgInZnS quantum dots / Y. Liu, X. Tang, W. Huang, G. Yin, M. Deng, Y. Cao, L. Shi, T. Zhu, L. Huang, I.P. Ikechukwu, Y. Gong, Y. Bai, D. Qu, X. Huang, F. Qiu // Mikrochimica Acta. — 2020. — № 2 (187). — P. 146.

154. Mir, I.A. Core@shell quantum dots as a fluorescent probe for the detection of cholesterol and heavy metal ions in aqueous media / I.A. Mir, S. Kumar, M.A. Bhat, X. Yuelin, A.A. Wani, L. Zhu // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2021. — (626). — P. 127090.

155. Jagadeeswari, S. Photoinduced interaction between MPA capped CdTe QDs and certain anthraquinone dyes / S. Jagadeeswari, M. Asha Jhonsi, A. Kathiravan, R. Renganathan // Journal of Luminescence. — 2011. — № 4 (131). — P. 597–602.

156. Lakowicz, J.R. Quenching of Fluorescence J.R. Lakowicz, Boston, MA: Springer US, — 1983. 257–301 p.

157. Chipman, D.M. The Binding of Oligosaccharides Containing N-Acetylglucosamine and N-Acetylmuramic Acid to Lysozyme: THE SPECIFICITY OF

BINDING SUBSITES / D.M. Chipman, V. Grisaro, N. Sharon // *Journal of Biological Chemistry*. — 1967. — № 19 (242). — P. 4388–4394.

158. Macaroff, P.P. The effect of bovine serum albumin on the binding constant and stoichiometry of biocompatible magnetic fluids / P.P. Macaroff, D.M. Oliveira, Z.G.M. Lacava, R.B. Azevedo, E.C.D. Lima, P.C. Morais, A.C. Tedesco // *IEEE Transactions on Magnetism*. — 2004. — № 4 (40). — P. 3027–3029.

159. Tedesco, A.C. Investigation of the binding constant and stoichiometry of biocompatible cobalt ferrite-based magnetic fluids to serum albumin / A.C. Tedesco, D.M. Oliveira, Z.G.M. Lacava, R.B. Azevedo, E.C.D. Lima, P.C. Morais // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. — 2004. — (272–276). — P. 2404–2405.

160. Bai, G. Phenomenological analysis of elastocaloric effect in ferroelectric poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) copolymers / G. Bai, D. Liu, C. Gao // *Journal of Applied Physics*. — 2019. — № 16 (126). — P. 164105.

161. Khan, S.N. Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies / S.N. Khan, B. Islam, R. Yennamalli, A. Sultan, N. Subbarao, A.U. Khan // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2008. — № 5 (35). — P. 371–382.

162. Tsyupka, D.V. The story of how mitoxantrone chose his friends: Surface interaction and semiconductor quantum dots luminescence quenching for mitoxantrone detection / D.V. Tsyupka, E.A. Mordovina, T.S. Ponomaryova, D.D. Drozd, I.Yu. Goryacheva, O.A. Goryacheva // XXVII Saratov Fall Meeting 2023. — Saratov, Russia. — 25–29 September 2023.

163. Roy, D. Spectral and Temporal Optical Behavior of Blue-, Green-, Orange-, and Red-Emitting CdSe-Based Core/Gradient Alloy Shell/Shell Quantum Dots: Ensemble and Single-Particle Investigation Results / D. Roy, T. Routh, A.V. Asaithambi, S. Mandal, P.K. Mandal // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2016. — № 6 (120). — P. 3483–3491.

164. Zhong, H. Controlled Synthesis and Optical Properties of Colloidal Ternary Chalcogenide CuInS₂ Nanocrystals / H. Zhong, Y. Zhou, M. Ye, Y. He, J. Ye, C. He, C. Yang, Y. Li // *Chemistry of Materials*. — 2008. — № 20 (20). — P. 6434–6443.

165. Chevallier, T. Photoluminescence properties of AgInS₂–ZnS nanocrystals: the critical role of the surface / T. Chevallier, G.L. Blevinnec, F. Chandezon // *Nanoscale*. — 2016. — № 14 (8). — P. 7612–7620.

166. Hu, Y. Interactions between CdTe quantum dots and plasma proteins: Kinetics, thermodynamics and molecular structure changes / Y. Hu, H. Li, P. Meng, K. Li, Y. Xiong, S. Zhang, Y. Yang, A. Yin, P. Huang // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2020. — (189). — P. 110881.

167. Tsyupka, D.V. Detection of anthracycline antibiotics based on quantum dot luminescence quenching / D.V. Tsyupka, E.A. Khudina, D.D. Drozd, D.G. Koganova, D.A. Kornilov, O.A. Goryacheva, I.Yu. Goryacheva // *XXIX Saratov Fall Meeting 2025*. — Saratov. — 29 September – 3 October 2025.

168. Цюпка, Д.В. Люминесцентные наносенсоры для мониторинга антрациклиновых антибиотиков / Д.В. Цюпка, Е.А. Худина, О.А. Горячева, И.Ю. Горячева // *Всероссийская конференция с международным участием «Биохимия человека 2024»*. — Москва. — 17–19 октября 2024.

169. Tsyupka, D.V. Luminescence quenching of alloyed quantum dots for mitoxantrone detection: in search of the ideal thioligand / D.V. Tsyupka, D.D. Drozd, P.S. Pidenko, E.A. Khudina, K.Yu. Presnyakov, D.G. Koganova, D.A. Kornilov, O.A. Goryacheva, I.Yu. Goryacheva // *Microchemical Journal*. — 2025. — (219). — P. 115919.

170. Alberts, D.S. Pharmacology of mitoxantrone: mode of action and pharmacokinetics / D.S. Alberts, Y.M. Peng, G.T. Bowden, W.S. Dalton, C. Mackel // *Investigational New Drugs*. — 1985. — № 2 (3). — P. 101–107.

171. Цюпка, Д.В. Определение антрациклиновых антибиотиков на основе тушения люминесценции квантовых точек / Д.В. Цюпка, Е.А. Худина, Д.Д. Дрозд, О.А. Горячева, И.Ю. Горячева // VII Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. — Краснодар. — 21–27 сентября 2025.

172. Цюпка, Д.В. Квантовые точки в контроле терапии: люминесцентный мониторинг антрациклинов / Д.В. Цюпка, Е.А. Худина, Д.Д. Дрозд, Д.А. Корнилов, О.А. Горячева, И.Ю. Горячева // Ежегодная Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2025». — Саратов. — 19–20 ноября 2025.