



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта победителя I степени

Название работы – Разработка аналога ксероформа на основе нанокристаллического диоксида церия.

Автор – Лскавян Давид Норайрович, 11 класс, ГБОУ Школа № 1568, г. Москва.

Соавтор – Сайгин Дарий Игоревич, 11 класс, ГБОУ Школа № 1568, г. Москва.

Руководитель – Козлова Таисия Олеговна, к.х.н., н.с. Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук.

Основная идея работы, цели, задачи

Предметом изучения нанотехнологий являются свойства и возможности применения наночастиц — изолированных твёрдофазных объектов, имеющих отчётливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которых во всех трёх измерениях составляют от 1 до 100 нм [1]. В рамках данного исследования мы разрабатывали продукт на основе нанокристаллического диоксида церия, у которого, в отличие от крупнокристаллического CeO_2 [2], имеются уникальные свойства. В первую очередь нанокристаллическому диоксиду церия присуща кислородная нестехиометрия, которая обуславливает его активность в биохимических окислительно-восстановительных процессах, особенно в инактивировании активных форм кислорода в живой клетке. Кроме того, при размере частиц до ~ 10 нм CeO_2 не токсичен и сравнительно безопасен для применения. Поскольку объектом данного исследования являлся в т.ч. нанокристаллический диоксид церия с размером частиц около 5 нм, данную работу можно отнести к области нанотехнологий.

С древнейших времен человечество использовало различные мази и кремы в лечебных целях. В наши дни почти каждому известна мазь Вишневского, состоящая из березового дегтя, ксероформа и касторового масла [3]. Она используется для лечения фурункулов, инфицированных ран, ожогов и пролежней, а также многих других кожных проблем. Но у нее есть несколько недостатков, включая и довольно опасные: риск развития рака кожи, гематологических и других заболеваний [4].

В настоящее время на рынке лечебных препаратов основными аналогами мази Вишневского являются ихтиоловая и эритромициновая [5] мази, однако и они обладают рядом побочных эффектов, среди которых тошнота, рвота, диарея, нарушения функции печени, желтуха, псевдомембранозный колит, аллергические реакции.

Таким образом, разработка нового средства, способного заменить мазь Вишневского является актуальной задачей для фармакологических применений.

Основным действующим компонентом мази Вишневского является трибромфенолят висмута (рис. 1), по-другому называемый ксероформ. В данной работе мы разрабатывали аналог ксероформа, обладающий сходными положительными для организма человека свойствами и не имеющий его недостатков. С нашей точки зрения на роль другого химического соединения вместо висмута мог бы подойти нанодисперсный диоксид церия, который был выбран в связи с наличием у него уникальных биомедицинских свойств [6]. За основу схемы получения использовали синтез ксероформа [7].

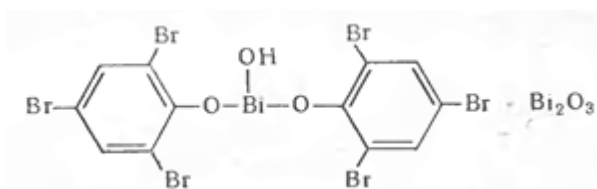


Рис. 1. Формула трибромфенолята висмута

Целью исследовательской работы стала разработка аналога ксероформа, обладающего сходными положительными для организма человека свойствами и не имеющего его недостатков.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

- Синтезировать по методике, сходной с методикой синтеза ксероформа, «цероворм» – вещество на основе нанокристаллического CeO_2 .
- Комплексом методов физико-химического анализа охарактеризовать полученное вещество.
- Протестировать биомедицинские свойства продукта.

Актуальность и новизна работы

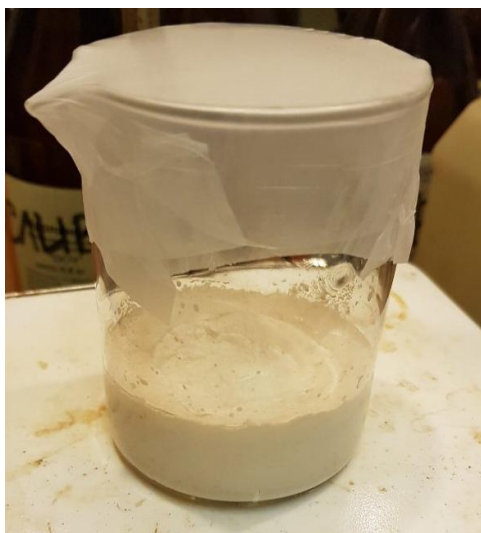
В связи с тем, что мазь Вишневского обладает вышеописанными недостатками, создание альтернативного медицинского препарата, обладающего всеми полезными свойствами мази Вишневского и не имеющего ее недостатков, безусловно, является актуальным в настоящее время и полезным для общества, так как полноценного аналога мази Вишневского на рынке медицинских препаратов сейчас не имеется. Новизна работы в первую очередь заключается в разработке нового активного компонента мази Вишневского, потенциально превосходящего ксероформ по своим биомедицинским характеристикам.

Основные результаты

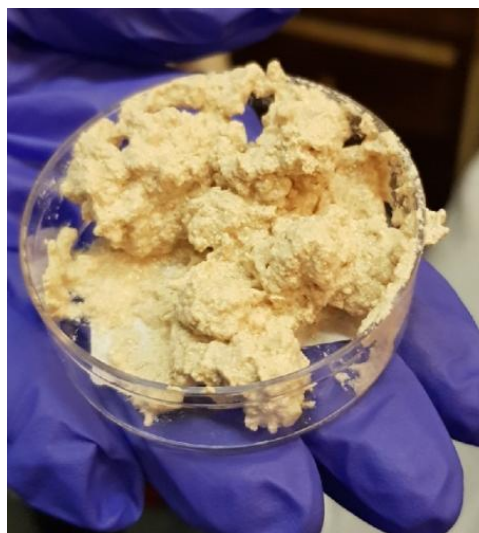
Синтез проводили по нескольким схемам. В качестве исходного соединения использовали либо нитрат церия(III), либо заранее синтезированный нанокристаллический диоксид церия. При использовании соли церия идея состояла в получении нанокристаллического CeO_2 , связанного с трибромфенолом, *in situ*.

Синтез с использованием соли церия(III)

Готовили 10% раствор NaOH, в котором растворяли навеску трибромфенола (ТБФ). К полученному раствору добавляли водный раствор $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, pH раствора после смешения составил 10. Мольное соотношение $\text{Ce}:\text{ТБФ}=3:2$. Наблюдали выпадение бежевого хлопьевидного осадка (рис. 2 а,б). Затем промывали полученную суспензию от нитрат-ионов, полноту промывки контролировали качественной реакцией с дифениламином [8]. Часть промытого осадка высушивали сутки при температуре 90°C (см. табл. 1, №1), а часть хранили под водой (см. табл. 1, №2). Цвет осадка – коричнево-бежевый.



а



б

Рис.2. а) суспензия после смешивания раствора ТБФ с нитратом церия;
б) бежевый осадок после промывки суспензии.

Затем проводили аналогичный синтез, за исключением того, что дополнительно к раствору $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ в ТБФ добавляли 15 М раствор NH_4OH . pH при этом практически не менялся, и только после добавления ≈ 10 мл раствора pH стал равен 10. Впоследствии вязкость суспензии изменилась, она стала более жидкой. Цвет суспензии изменился на светло-фиолетовый, на воздухе он становится бежево-желтого цвета (рис. 3).



Рис.3. Суспензия (слева) и изменение ее цвета на воздухе (справа)

Образец с NH_4OH также разделили на две части. Первую профильтровали на бумажном фильтре и промыли дистиллированной водой, затем поместили в сушильный шкаф на сутки при температуре 90°C (см. табл. 1, №3). Вторую часть профильтровали методом декантации и оставили храниться под водой (см. табл. 1, №4).

Синтез с использованием CeO_2

В качестве контрольного эксперимента решили использовать не соль Ce^{3+} в качестве исходного реактива, а сразу нанокристаллический CeO_2 . Для синтеза CeO_2 2.33 г $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ растворили в 23 мл воды. Полученный раствор перелили в автоклав (рис. 4а) и поместили в сушильный шкаф на сутки при 95°C , в результате чего был получен осадок светло-желтого цвета (рис. 4б). Его отделяли от надосадочной жидкости и трижды

центрифугировали в изопропанол. После этого осадок был переведен в стабильный золь в объеме 25 мл (рис. 4в). Удаление изопропанола проводили кипячением золя при 100°C в течение часа.

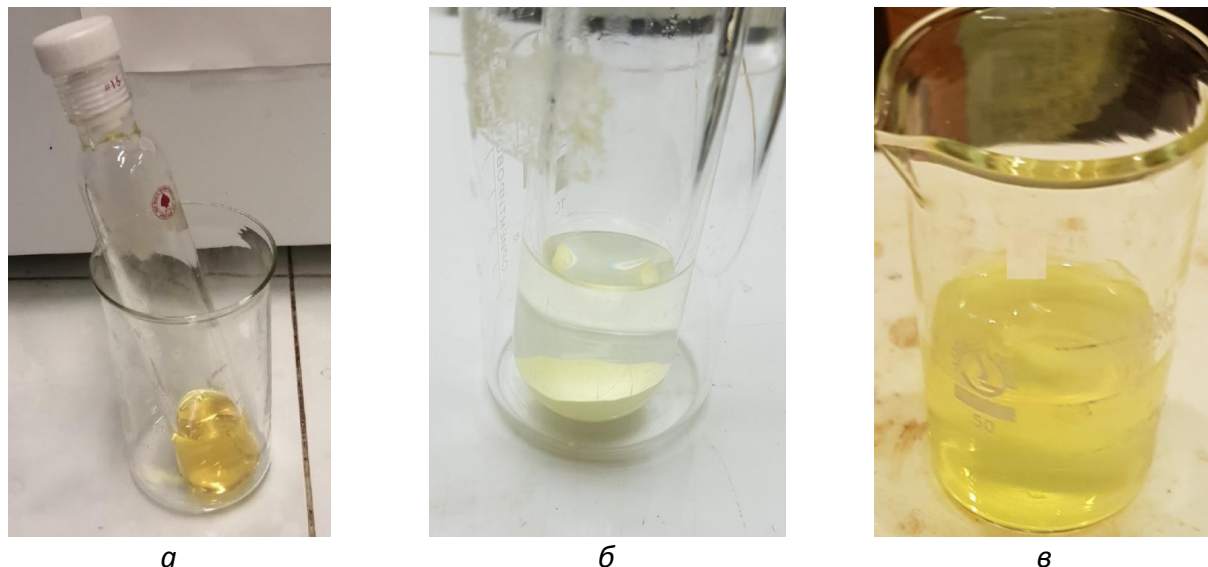


Рис.4. а) автоклав с раствором $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$, б) осадок CeO_2 , в) золь CeO_2 .

Методом гравиметрии рассчитали молярную концентрацию CeO_2 в полученном золе, она составила 0.1 М. Для последующего синтеза рассчитали количество ТБФ, чтобы мольное соотношение $Ce:ТБФ=3:2$, как в предыдущих синтезах. Водный раствор ТБФ в 10% NaOH смешивали с золем CeO_2 , вследствие чего выпадал бордово-коричневый хлопьевидный осадок. Полученное вещество профильтровали через бумажный фильтр и промыли водой, затем разделили на две части: первую в чашке Петри поставили в сушильный шкаф на сутки при 90°C (см. табл. 1, №5), после чего вещество стало иметь вид сетчатой пленки (рис. 5а); а вторую хранили под слоем воды (см. табл. 1, №6).

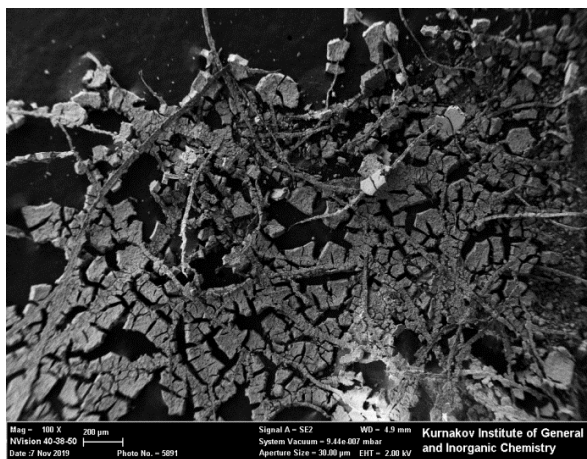
Таблица 1. Параметры синтеза и условные обозначения образцов

№	NH_4^+	Сушка, температура	Исходный компонент	Сух/влаж	Подписи к графикам
1	-	+, 90°C	$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	Сух	ТБФ-Ce
2	-	-	$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	Влаж	ТБФ-Ce без NH_4
3	+	+, 90°C	$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	Сух	ТБФ-Ce NH_4 сух
4	+	-	$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	Влаж	ТБФ-Ce NH_4 влаж
5	-	+, 90°C	CeO_2	Сух	ТБФ- CeO_2 сух
6	-	-	CeO_2	Влаж	ТБФ- CeO_2 влаж

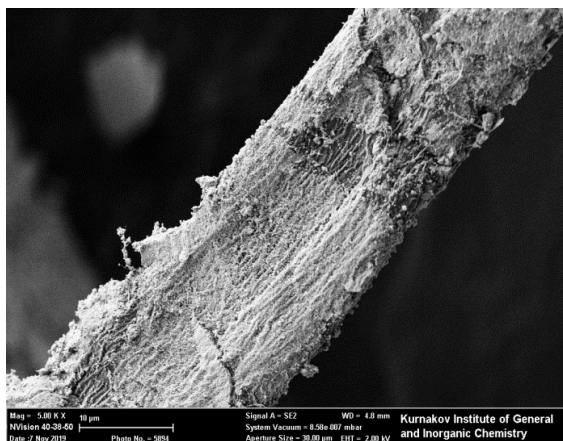
Особый интерес представлял образец №5 (ТБФ- CeO_2 сух) в связи с необычной формой полученного продукта – в виде сетчатой пленки. От полученной пленки отделили кусочек и изучили методом растровой электронной микроскопии. На микрофотографиях видно структуру данного вещества: оно состоит из сегментов, связанных между собой «мостиками» из, по всей видимости, органических полимерных волокон [9-10], на которые сорбированы наночастицы CeO_2 (рис. 5).



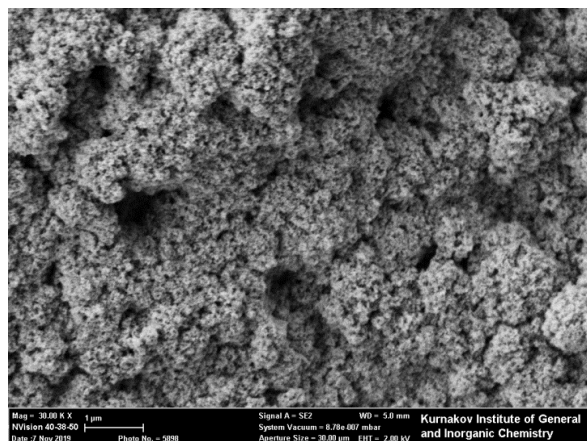
а



б



в



г

Рис.5. а) Осадок в виде высушенной пленки, б) Микрофотография пленки при увеличении в 100 раз, в) 5000 раз, г) 30000 раз, сделанная с помощью растрового электронного микроскопа.

Согласно данным рентгенофазового анализа (рис. 6) на дифрактограммах всех высушенных образцов присутствуют пики, характерные для диоксида церия. Для ТБФ- CeO_2 это является ожидаемым, поскольку в качестве источника церия был использован золь CeO_2 . Образование диоксида церия в двух других образцах можно объяснить окислением церия в процессе выдерживания суспензии на воздухе, а не в результате сушки. Это подтверждается тем, что на дифрактограммах водных суспензий также можно видеть характерные рефлексы. На этих дифрактограммах также присутствует гало, которое связано с использованием специальной пленки сверху суспензии во время съемки на дифрактометре. Внешний вид дифрактограммы ТБФ- CeO_2 -влаж совпадает с таковым для пленки, что, по всей видимости, связано с малой концентрацией образца в суспензии. На дифрактограмме водной суспензии ТБФ-Се-без NH_4 и высушенного из нее ТБФ-Се присутствуют пики в области менее $27^\circ 2\theta$, относящиеся, скорее всего, к солям церия(III).

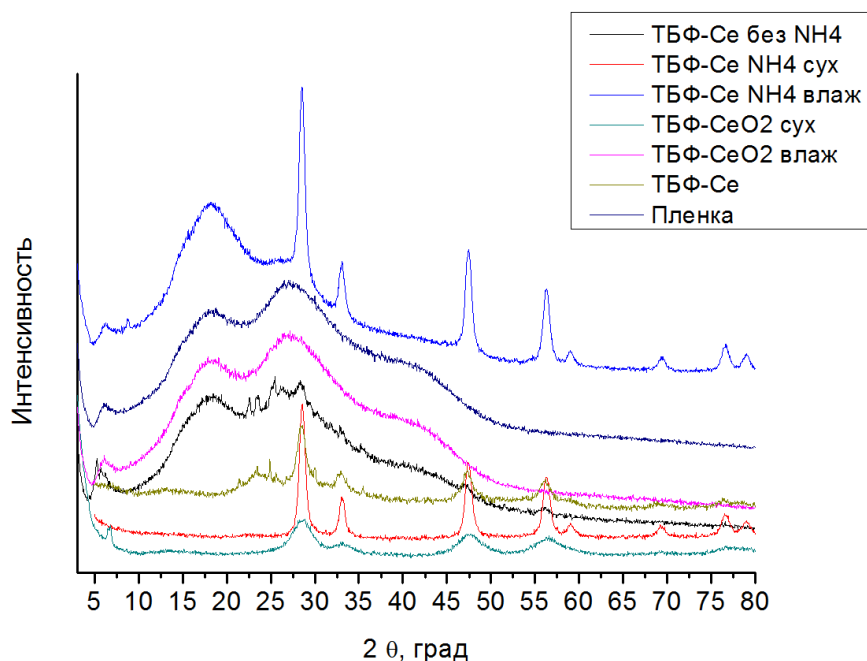


Рис.6. Дифрактограммы полученных продуктов.

Сухие образцы исследовали методом ИК-спектроскопии (рис. 7). В качестве контрольного образца использовали нанокристаллический CeO_2 без трибромфенола. В связи с тем, что образец ТБФ- CeO_2 -сух высох не только в виде пленки, но и частично в виде порошка, анализировали и то, и другое. Можно видеть, что внешний вид ИК-спектров для пленки и порошка совпадает, что свидетельствует об их идентичности. При этом максимумы на ИК-спектрах для этих образцов частично совпадают с максимумами для чистого диоксида церия. В то же время ИК-спектры ТБФ- Ce-NH_4 и ТБФ- Ce отличаются от образца, синтезированного с использованием CeO_2 , и при этом совпадают друг с другом. Большинство полос относится к трибромфенолу в соответствии базой данных NIST. Изменение расщепления и положения некоторых полос, по всей видимости, связано с полимеризацией трибромфенола и разной степенью связывания с церием, в зависимости от используемого исходного соединения.

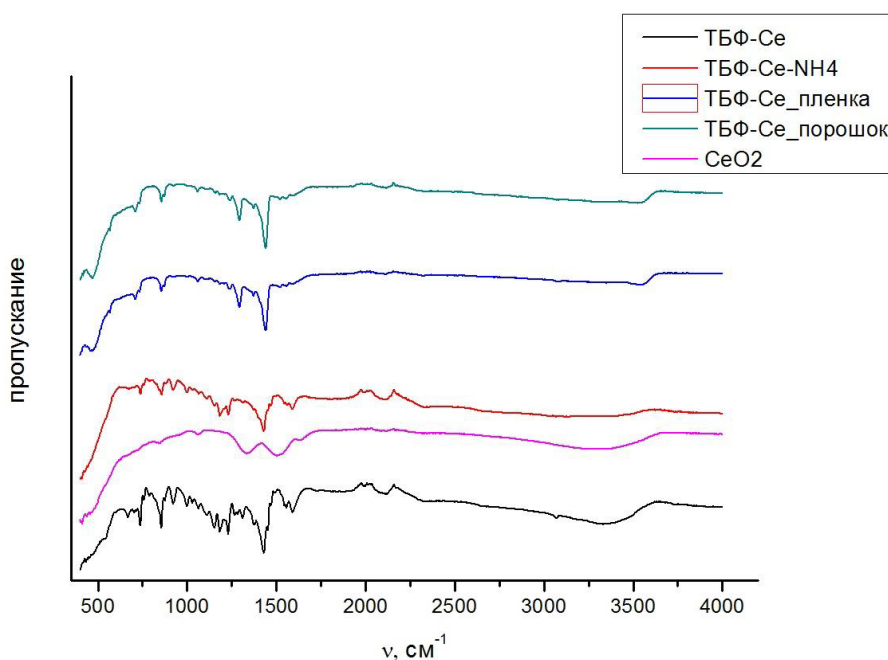


Рис.7. Данные ИК спектроскопии для высушенных образцов.

Биологические исследования

Известно, что плесень – это колония одноклеточного грибка, развивающегося из спор, которые в «законсервированном» состоянии в огромных количествах постоянно присутствуют в воздухе и «просыпаются» для интенсивного размножения, как только для этого появляются благоприятные условия: повышенная влажность и тепло [11]. Мы решили проверить, будет ли синтезированный нами продукт ингибировать размножение плесени (микрофлоры), т.е. оказывать антисептическое и антимикробное воздействие. В качестве питательной среды для размножения патогенной микрофлоры использовали клубничное варенье, перемешанное со слюной. Его разделили на две части: одну поместили в чашку Петри без изменений, а вторую перемешали с образцом ТБФ-Се (рис. 8). Спустя месяц на обработанном образце плесени не было обнаружено, в то время как на необработанном образце плесень выросла, что свидетельствует о том, что наше вещество ингибирует рост грибковых культур.

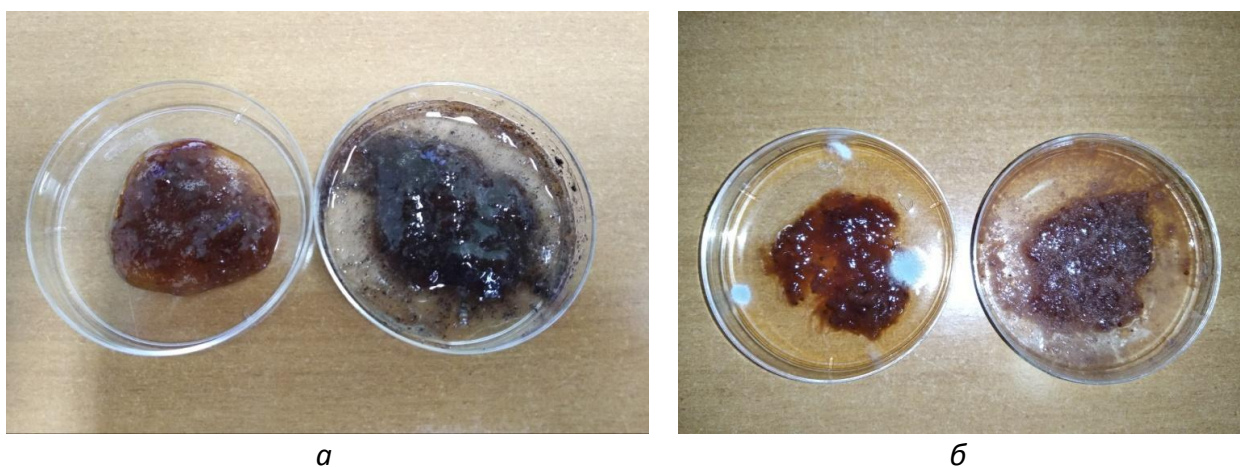


Рис. 8. образцы варенья с ТБФ-Се (справа) и без него (слева): а) в первый день б) через месяц.

Для оценки перспективности применения «цераформа» в биомедицине также важно определить токсичность синтезированных образцов. Для определения токсичности мы использовали мезенхимальные стволовые клетки пульпы зуба человека. В первую очередь мы рассадили клетки по лункам планшета и оценили их количество. Затем при помощи сотрудников Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН была подсчитана степень угнетения культуры после добавления к ней ТБФ-Се в концентрациях 0.125 – 1 мг/мл. Результаты представлены на рис. 9.

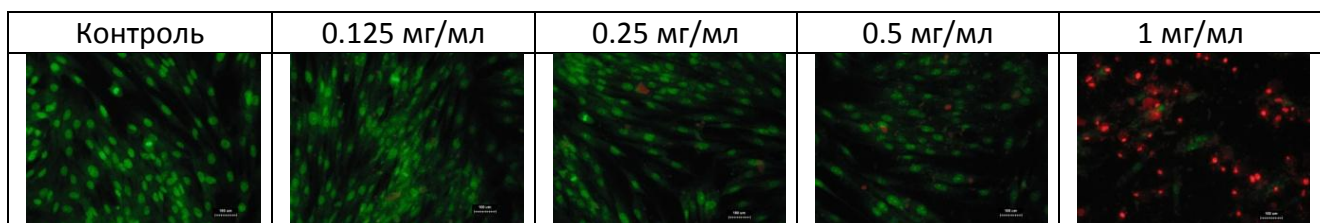


Рис. 9. Исследование жизнеспособности стволовых клеток пульпы зуба после культивирования в среде с ТБФ-Се с помощью дифференциального окрашивания флуоресцентными красителями. Зеленый – живые клетки, красный – мертвые.

Можно видеть, что максимально исследованная концентрация является токсичной по отношению к стволовым клеткам, а более низкая – относительно безвредна.

Выводы, заключение, перспективы

- В ходе работы были получены несколько продуктов по методике, схожей с методикой синтеза ксероформа: в роли исходных веществ выступали либо нитрат церия(III), либо нанокристаллический CeO_2 , синтезированный термогидролизом $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$.
- Методом рентгенофазового анализа было показано, что полученные продукты содержат нанокристаллический диоксид церия, а методом ИК-спектроскопии было выявлено наличие трибромфенола.
- Показано, что образец, полученный из соли церия(III), обладает антигрибковой активностью, и при этом характеризуется отсутствием токсичности по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам пульпы зуба человека при малых концентрациях (до 0.5 мг/мл).

Таким образом, были проведены синтезы, по методике схожие с синтезом ксероформа, с использованием разных прекурсоров церия для получения продукта на основе нанокристаллического диоксида церия. Были предложены различные варианты синтеза, отличающиеся не только исходной солью, но и рН смеси, условиями термообработки. Полученные продукты были охарактеризованы комплексом методов физико-химического анализа. Были проведены исследования антигрибковой активности продуктов синтеза и сделаны подготовительные работы по оценке токсичности на базе ИТЭБ РАН.

В качестве перспективы использования результатов работы можно отметить возможность применения «ксероформа» в фармакологии после соответствующих доработок и биологических/клинических испытаний.

Список цитированных источников

1. Наночастица // Журавлева Н.Г., Шляхтин О.А. // Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов. [Электронный ресурс] URL: https://thesaurus.rusnano.com/wiki/article1399?sphrase_id=19212
2. Что такое оксид церия? Для чего он нужен? [Электронный ресурс] URL: <https://zm-tools.ru/stati/raskhodnye-materialy-oksid-tseriya/chto-takoe-oksid-ceriya/>
3. Ex Tempore: Вишневого линимент. [Электронный ресурс] URL: <https://fp.com.ua/articles/ex-tempore-liniment-vishnevskogo/>
4. С.В. Яргин. О перспективах использования препаратов дегтя и ихтиола // Письма в редакцию, 2014, №3-4. [Электронный ресурс] URL: <http://protox.medved.kiev.ua/index.php/ru/categories/letters-to-editorial-board/item/424-preparations-of-tar-and-ichthyol-on-the-perspectives-of-practical-use>
5. Эритромицин—Регистр Лекарственных Средств. [Электронный ресурс] URL: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_3720.htm
6. Нанокристаллический диоксид церия – перспективный материал для биомедицинского применения. [Электронный ресурс] URL: <http://naukarus.com/nanokristallicheskiy-dioksid-tseriya-perspektivnyy-material-dlya-biomeditsinskogo-primeneniya>
7. М.М. Кацнельсон. 19 – Ксероформ // Приготовление синтетических химико-фармацевтических препаратов, Изд-во Directmedia, 2013, с. 197-200.
8. Справочник химика. Цветная реакция дифениламина с азотной кислотой. [Электронный ресурс] URL: <https://chem21.info/info/1496372/>
9. A.N.A. Heberle, M.E.P. Alves, S.W. Silva, et al. Phytotoxicity and genotoxicity evaluation of 2,4,6-tribromophenol solution treated by UV-based oxidation processes // Environmental

- Pollution, 2019, 249, p. 354–361.
10. S. Tsuruya. The oxidative displacement polymerization of 2,4,6-Tribromophenol with copper(II)-acetonitrile complex // Journal of Catalysis, 1975, 36(1), p. 48–57.
 11. Плесень (грибок) – Мой дом. [Электронный ресурс] URL: <https://dom.dobroest.com/plesen-gribok-opisanie-vidyi-i-prichinyi-poyavleniya-pleseni-kak-izbavitsya-ot-pleseni.html>