

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии
наименование кафедры

Синтез и оптимизация люминесцентных
нанокластеров золота

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Рацевской Регины Олеговны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

д.х.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Д.Г. Черкасов

инициалы, фамилия

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Нанокластеры золота (НКЗ) – это агломераты из нескольких десятков атомов золота [1]. Они нашли широкое применение в биомаркировке, биоимиджинге, в изготовлении биосенсоров [2], при определении токсичных катионов [3,4] и анионов [5], противоопухолевых препаратов [6,7] благодаря ФЛ, хорошей стабильности и биосовместимости. Однако, одной из наиболее частых проблем является низкое значение интенсивности ФЛ, что может сказываться на чувствительности определения различных аналитов. Поэтому важной задачей является получение НКЗ с оптимальными спектральными характеристиками.

Перспективными современными препаратами (цитостатиками), которые широко используются в клинической практике для борьбы с раковыми опухолями, являются митоксантрон (МТК) и доксорубицин (ДКР). Применение этих противоопухолевых препаратов может оказывать негативное воздействие на организм человека, так как они не только препятствуют размножению раковых клеток, но и наносят вред здоровым. В клинической практике необходим мониторинг концентрации противоопухолевых препаратов в сыворотке крови человека для того, чтобы обеспечить эффективность лечение и минимизировать токсичность данных препаратов [10]. Поэтому актуальной задачей является разработка новых меток и подходов для детектирования МТК и ДКР в сыворотке крови человека, одними из которых могут быть люминесцентные НКЗ.

Целью данной работы является оптимизация условий синтеза и оптических характеристик НКЗ с перспективой их применения для определения противоопухолевых препаратов в биологических жидкостях человека. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. поиск оптимальных условий для синтеза люминесцентных НКЗ;
2. характеристика свойств полученных НКЗ;

3. изучение влияния противоопухолевых препаратов (МТК и ДКР) на люминесцентные НКЗ.

Краткая характеристика материалов исследования. Для решения поставленных в данной работе задач применяли комплекс физико-химических методов исследования: флуориметрия, спектрофотометрия, хроматография. Объектами исследования стали люминесцентные НКЗ, полученные с помощью нагревания при 37 °С в течение 12 часов.

Описание структуры работы. Данная работа состоит из списка обозначений и сокращений, введения, двух глав (обзор литературы и экспериментальная часть), заключения, инструктажа по технике безопасности и списка использованных источников. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 41 страница, включая 32 рисунка и 3 таблицы. Всего проанализировано 33 литературных источников.

Научная значимость работы:

- синтезированы и охарактеризованы НКЗ на основе золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) и бычьего сывороточного альбумином (БСА);
 - показано, что НКЗ проявляли фотостабильность в течение месяца;
 - проведено фракционирование методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ); эксперимент показал, что НКЗ имеют близкое распределение по размерам и сохраняют прочность связи между лигандами и атомами золота;
 - происходило сокращение ФЛ НКЗ в присутствии МТК и ДКР в диапазоне концентраций 0-150 мкМ в водном растворе, что предварительно показывает потенциальную применимость синтезированных НКЗ для определения препаратов в биологических жидкостях человека.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность нанокластеров благородных металлов, определены основная цель и задачи исследования.

В **первой главе** описаны различные способы получения НКЗ путем химического восстановления золота из золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) или бромида золота (III) (AuBr_3) с помощью восстановителей и стабилизаторов: боргидрида натрия (NaBH_4) в присутствии глутатиона [8], поли(амидоаминового) дендримера [9], авидина [10], пепсина [11], бычьего сывороточного альбумина (БСА) [12] и других. БСА является наиболее привлекательным в качестве восстановителя благодаря способности к образованию комплексов (выполняет роль лиганда), ФЛ из-за остатков триптофана, структурного и функционального сродства с человеческим сывороточным альбумином [13], модификации функциональными лигандами благодаря многочисленным функциональным группам от 585 аминокислот [12]. Исходя из этого, приведены литературные способы синтеза НКЗ за счет восстановления ЗХВК с помощью БСА в щелочной среде ($\text{pH} = 12$) при температуре 37°C в течение 12 часов. Получаемые НКЗ имеют ФЛ в красной области (640 нм) и $\text{КВ} \approx 6\%$ [12]. Также уменьшение времени синтеза до 6 минут возможно при микроволновом синтезе [14]. Преимуществами такого метода синтеза являются равномерный нагрев, быстрота протекания реакции и экологичность. НКЗ имели ФЛ в области 650 нм, средний диаметр составлял около 5 нм.

Также был описан механизм формирования НКЗ из наночастиц золота (НЧЗ), поверхностно модифицированных БСА. Он основан на том, что БСА, имея в своей структуре двадцать один аминокислотный остаток тирозина, восстанавливает Au^{3+} до Au^0 [12], далее за счёт заряженных функциональных групп от аминокислотных остатков БСА прикрепляется к поверхности НЧЗ с помощью ковалентных или нековалентных взаимодействий [13]. После того, как образовались восстановленные атомы НЧЗ, БСА связывается с ними через 35

тиоловых групп, входящих в состав цистеина, образуя НКЗ. Такой процесс осуществим, так как золото обладает высоким сродством к сере [12]. Остатки цистеина также способны стабилизировать НКЗ [15].

Было продемонстрировано, что ФЛ и фотостабильность НКЗ зависят от выбора стабилизатора НКЗ (авидин [10], БСА [12], пепсин [11] и др.). На количество ядер в НКЗ могут влиять разные параметры: концентрация раствора стабилизатора [12], pH раствора [11,16], температура [12,17].

НКЗ нашли широкое применение при определении токсичных катионов (Cu^{2+} [18], Cd^{2+} [19], Hg^{2+} [3]) и анионов (CN^- [5]) в объектах окружающей среды (подземные воды, водопроводная вода, вода из прудов и озер, почва) [5], пищевых продуктах [5], живых клетках и организме человека [20].

Перспективным применением НКЗ является определение концентрации противоопухолевых препаратов (МТК и ДКР). В работе [6] для обнаружения МТК получали НКЗ восстановлением ЗХВК с помощью глутатиона. Полученные НКЗ имели интенсивный максимум ФЛ в области 570 нм, который уменьшался при добавлении МТК с концентрациями 0-26 мкМ. Диапазон больших концентраций МТК и ДКР (2,5 - 150 мкМ) анализировали с помощью биметаллических золото-серебряных НК. Образец НК был синтезирован с использованием L-триптофана в качестве матрицы для реакции с ЗХВК и AgNO_3 при 120°C в течение 4 ч. Детектировали уменьшение люминесценции в области 455 нм при добавлении МТК и ДКР [7].

Таким образом, по результатам анализа литературы была выбрана методика синтеза НКЗ, определены основные методы исследования свойств получаемых наноструктур. Также был определен диапазон концентраций МТК и ДКР для изучения их воздействия на люминесценцию НКЗ.

Во **второй главе** приведена информация об используемых реактивах, приборах и оборудовании, и методике синтеза. Описано получение НКЗ из ЗХВК, поверхностно модифицированных БСА в щелочной среде в течение 12

часов при 37 °С. Такой способ синтеза является простым в исполнении, не требует дорогостоящих и вредных для здоровья реагентов. Эти факторы делают данный способ синтеза НКЗ одним из наиболее удобных и высокопроизводительных. Были получены 9 образцов с различными концентрациями реагентов (Табл. 1, Рис. 1).

Таблица 3 – Исследуемые образцы НКЗ, полученных нагреванием при 37°С в течение 12 часов

| № образца | ЗХВК, (мг/мл) | БСА, (мг/мл) | Мольное соотношение Au:БСА |
|-----------|------------------|-----------------|----------------------------------|
| 1 | 0,004 | 6,7 | 0,1:1 |
| 2 | 0,04 | | 1:1 |
| 3 | 0,1 | | 2,4:1 |
| 4 | 0,2 | | 4,8:1 |
| 5 | 0,4 | | 9,6:1 |
| 6 | 0,8 | | 19,2:1 |
| 7 | 1,6 | | 38,4:1 |
| 8 | 4,0 | | 96:1 |
| 9 | | 50 | 13:1 |

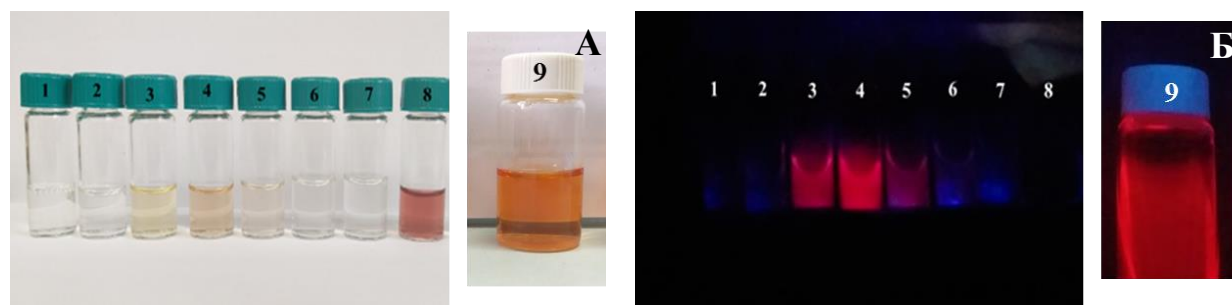


Рисунок 1 – Образцы нанокластеров золота 1-9 слева направо при дневном свете (А) и при возбуждении ультрафиолетовым светом ($\lambda_{\text{возб.}} = 365 \text{ нм}$) (Б)

Так как образцы НКЗ 3-5 и 9 обладали наибольшей ФЛ под ультрафиолетовым излучением, были рассмотрены только их спектральные характеристики.

На спектрах поглощения в диапазоне 500-600 нм НКЗ не обладали максимумом поглощения, что отличает их НЧЗ, которые в данном диапазоне длин волн имеют поверхностный плазмонный резонанс (Рис. 2).

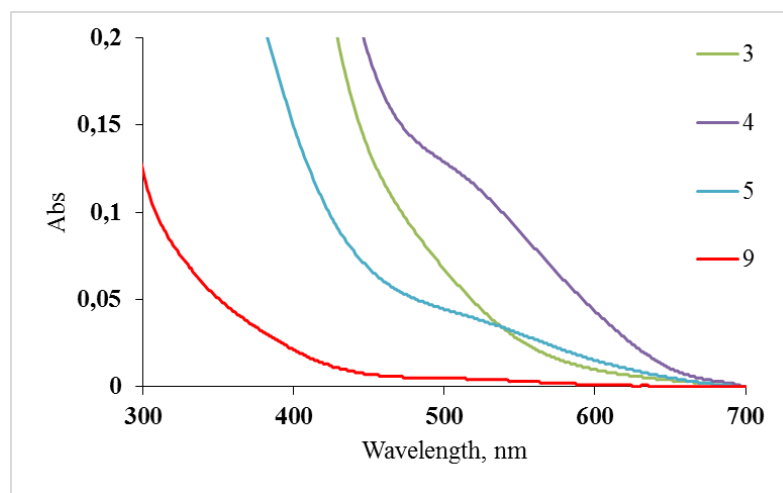


Рисунок 2 – Спектры поглощения образцов 3-5 (разбавление 1:10), образца 9 (разбавление 1:100)

Для всех образцов НКЗ были получены спектры люминесценции. НКЗ, полученные из наибольших концентраций ЗХВК и БСА имеют наибольший максимум ФЛ в области 660 нм (Рис. 3, Г). На нормированном спектре данный образец имеют один максимум люминесценции в области 660 нм (Рис. 3, Д). Таким образом, данный образец является оптимальным для дальнейшего изучения свойств и применения для определения противоопухолевых препаратов.

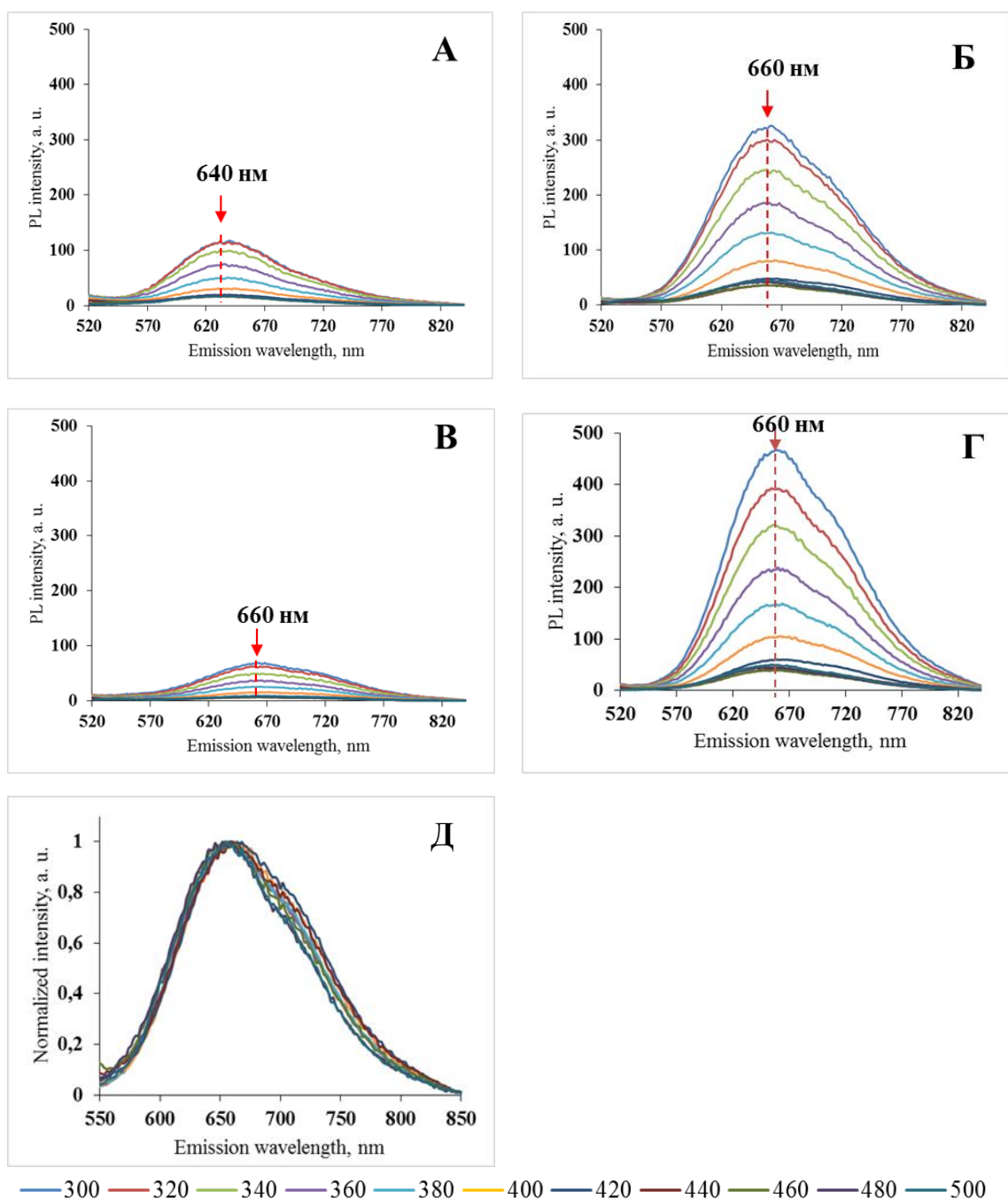


Рисунок 3 – 3D – спектры люминесценции образцов нанокластеров золота: (А) 3, (Б) 4, (В) 5 (разбавление 1:10), (Г) 9 (разбавление 1:100); (Д) нормированные спектры люминесценции образца 9 (разбавление 1:100)

Спектральные характеристики образца НКЗ на протяжении 28 дней изменились в пределах погрешности измерения оптических характеристик, поэтому полученный образец характеризуется фотостабильностью (Рис. 4, А, Б).

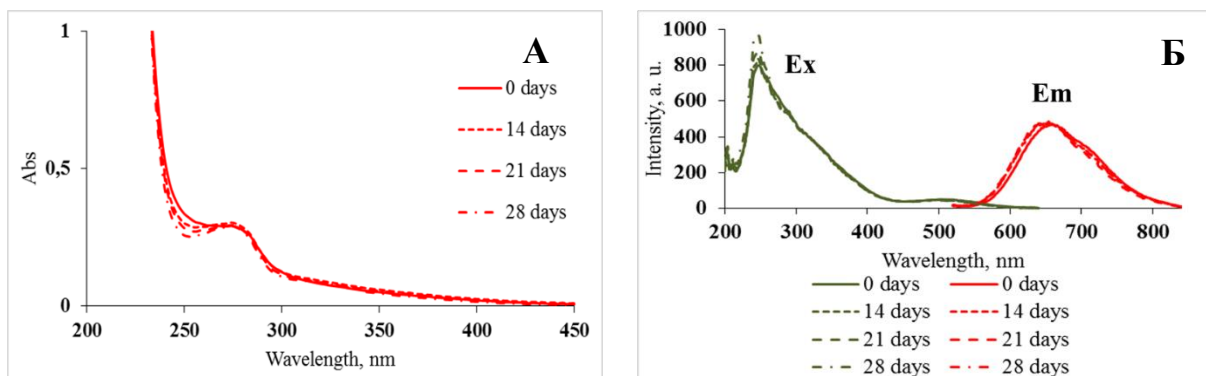


Рисунок 4 – (А) Спектры поглощения, (Б) возбуждения и испускания фотолюминесценции нанокластеров золота (разбавление 1:100). Сплошная линия – образец после синтеза, пунктирная – через 14, 21, 28 дней

Стабильность (прочность связи между лигандами БСА и НКЗ) проверяли методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ). В результате разделения с помощью эксклюзионной колонки PD-10 получили 32 фракции образца. Установлено, что НКЗ выходили из колонки во фракциях 1-4 (Рис. 5) Так как фракции 1-4 обладали ФЛ при ультрафиолетовом изучении (365 нм) были получены их спектральные характеристики.

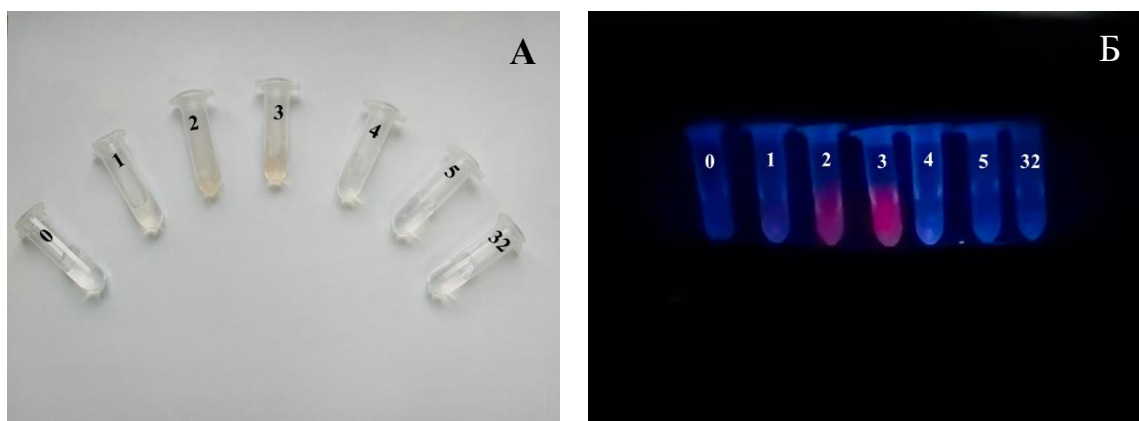


Рисунок 5 - Собранные фракции раствора нанокластеров золота методом эксклюзионной хроматографии: (А) при дневном свете, (Б) при возбуждении длиной волны 365 нм

На гистограмме зависимости ФЛ интенсивности при фиксированных длинах волн возбуждения – 320 нм и испускания – 660 нм от объема подвижной фазы, прошедшей через хроматографическую колонку, видно, что все НКЗ покидают колонку при 6,5 мл подвижной фазы, что свидетельствует о низкой дисперсности синтезированных кластеров (Рис.6).

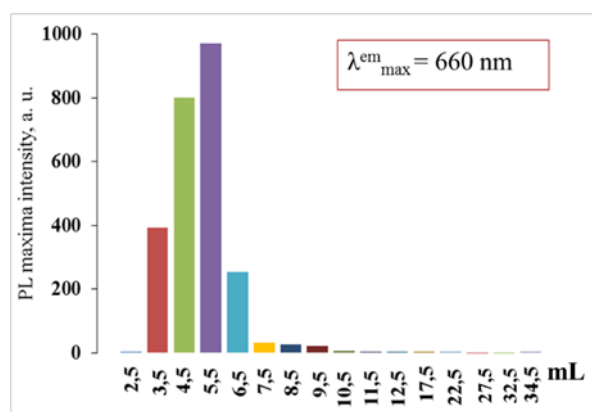


Рисунок 6 - Гистограмма зависимости максимальной интенсивности фотолюминесценции при длине волны испускания – 660 нм от объема подвижной фазы, прошедшей через колонку (мл)

Итак, оптимальный образец НКЗ обладает фотостабильностью в течение 1 месяца. Также НКЗ характеризуются прочностью связи между лигандами БСА и атомами золота в составе кластеров, так как после ЭХ не произошло смещения максимума ФЛ. Раствор НКЗ имеет кластеры с примерно одинаковым распределением по размерам.

Подбирали оптимальное разбавление раствора НКЗ для достижения высокого сигнала ФЛ. Наибольшая интенсивность ФЛ достигалась при разбавлении НКЗ 1:10. Так как это разбавление позволяет сократить расход образца для анализа, но зафиксировать изменение сигнала ФЛ, его использовали в дальнейших экспериментах.

Изучили влияние противоопухолевых препаратов: МТК и ДКР в диапазоне концентраций 0-150 мкМ на ФЛ НКЗ (Рис. 7).

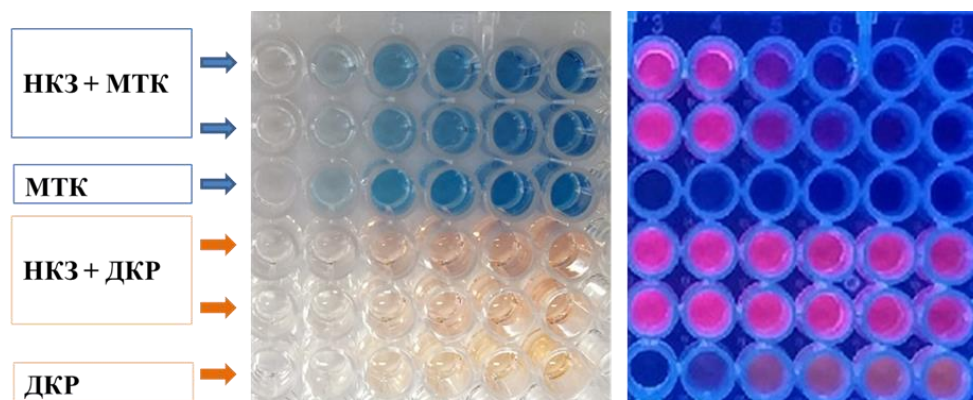


Рисунок 7 - Влияние митоксантрона и доксорубицина на нанокластеры золота, концентрация препаратов слева направо: 0, 10, 50, 75, 100, 150 мкМ

Были получены спектры ФЛ НКЗ в диапазоне длин волн 550-860 нм при добавлении МТК и ДКР. Добавление 50 мкМ МТК и ДКР к раствору НКЗ приводило к уменьшению ФЛ интенсивности от изначальной в области 676 нм на 30 и 10 %, соответственно. Дальнейшее добавление МТК с концентрациями 75, 100 и 150 мкМ уменьшало ФЛ от изначальной на 60, 80 и 90 % (Рис. 8, А, В, Д). Максимальный эффект соответствовал наибольшей концентрации МТК – 150 мкМ. ДКР оказывал меньшее воздействие на ФЛ НКЗ по сравнению с МТК. При добавлении 75, 100 и 150 мкМ цитостатика происходило подавление ФЛ от исходной на 30, 40 и 50 % (Рис. 8, Б, Г, Е).

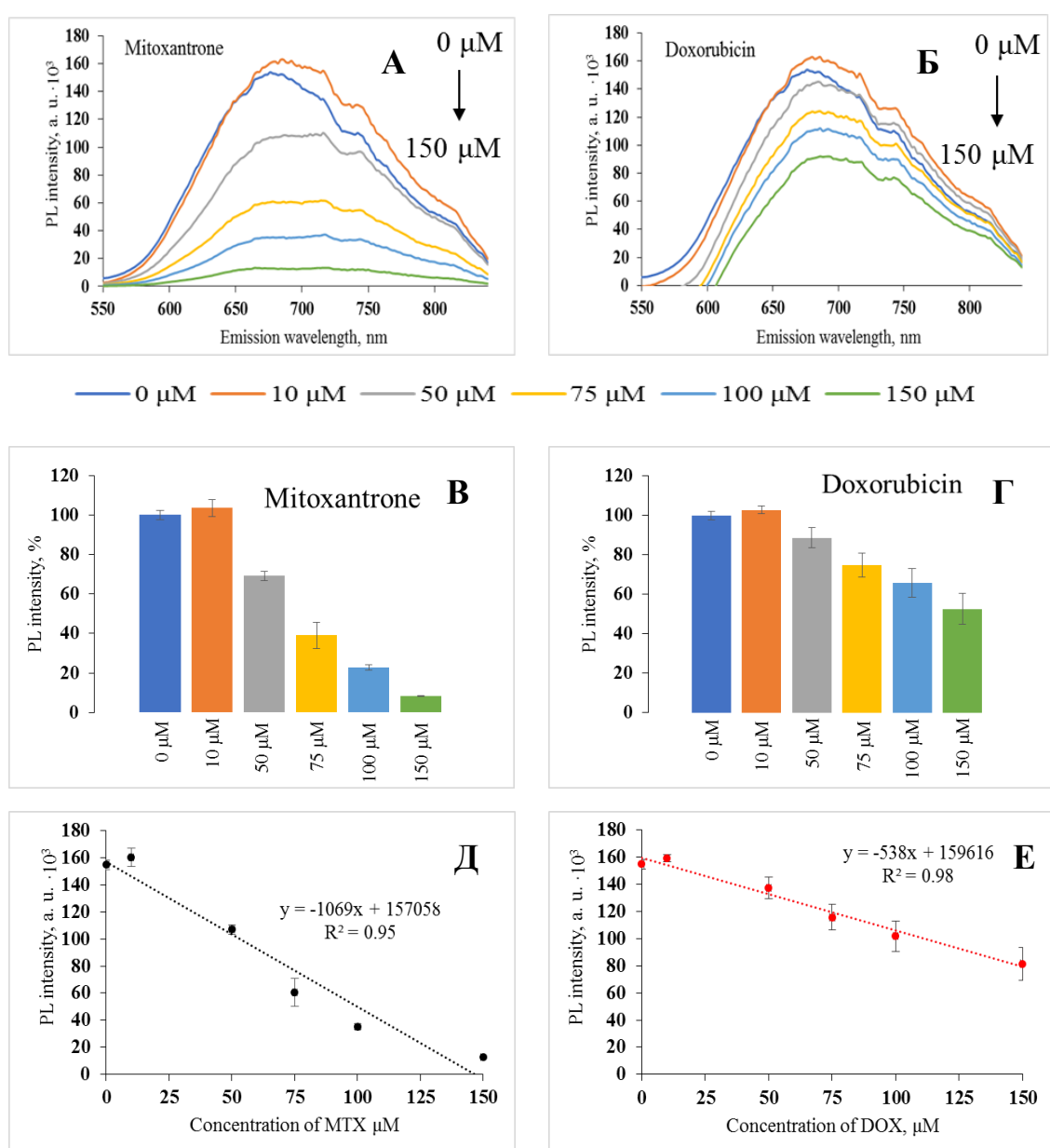


Рисунок 8 - Зависимости влияния митоксантрона (левый столбец) и доксорубина (правый столбец) (концентрации 0-150 мкМ) на фотолюминесценцию нанокластеров золота: спектры

люминесценции (А, Б), диаграммы тушения фотолюминесценции нанокластеров золота (В, Г), градуировочная зависимость изменения фотолюминесценции нанокластеров золота при добавлении препаратов (Д, Е)

Максимумы люминесценции НКЗ и поглощения МТК перекрываются, что, возможно, может говорить о проявлении эффекта внутреннего фильтра (Рис. 9) [21]. Механизм тушения ФЛ НКЗ в присутствии ДКР, вероятно, отличается, т.к. их спектры поглощения и ФЛ не перекрываются.

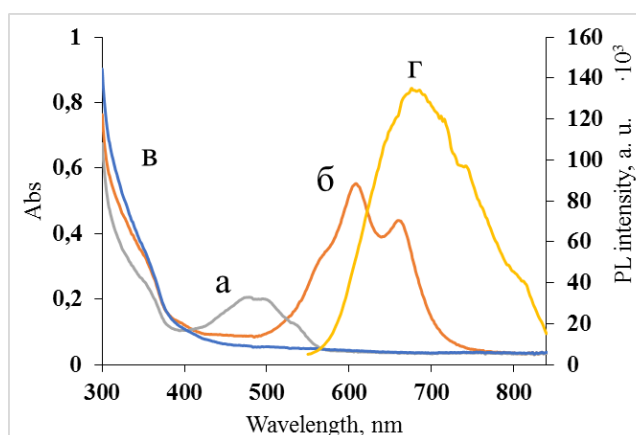


Рисунок 9 - Спектры поглощения доксорубицина (а) и митоксантрона (б) (разбавление 50 мкМ), нанокластеров золота (в) и люминесценции нанокластеров золота (разбавление 1:10)

При анализе влияния МТК и ДКР на НКЗ в сыворотке крови человека другие вещества, содержащиеся в ней, могут давать ложный сигнал (увеличение или уменьшение ФЛ). Поэтому изучили неспецифическое действие ионов и органических молекул на ФЛ НКЗ. Для модельной системы в водном растворе были выбраны ионы: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , CO_3^{2-} , NO_3^- (концентрация 5 мкМ) и органические молекулы: аскорбиновая кислота, глюкоза (концентрация 5 мкМ), фолиевая кислота (0,05 мкМ), БСА (0,77 мкМ) [7] (Рис. 10). Наблюдается увеличение ФЛ при взаимодействии НКЗ с ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} , что может быть связано с высокой ионной силой растворов солей. Значительное увеличение ФЛ при добавлении аскорбиновой кислоты к раствору НКЗ требует дальнейшего изучения. Концентрации остальных мешающих ионов высоки, но они не оказывают никакого влияния (в пределах погрешности) на ФЛ НКЗ.

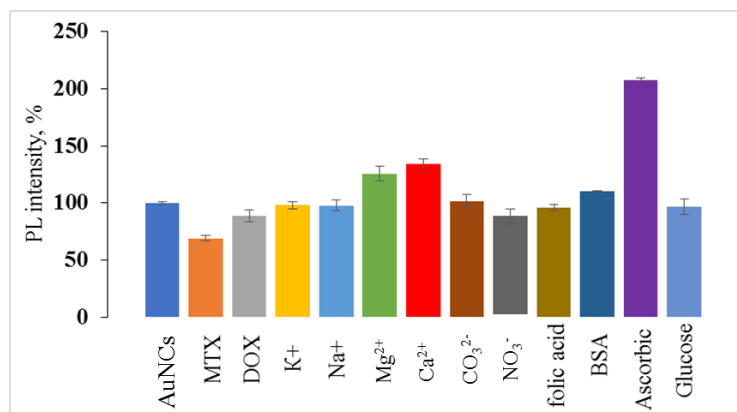


Рисунок 10 - Гистограмма изменения фотолюминесцентной интенсивности при взаимодействии нанокластеров золота с митоксантроном и доксорубицином (концентрации 50 мкМ), K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, CO₃²⁻, NO₃³⁻, аскорбиновой кислотой, глюкозой (концентрации 5 мкМ), фолиевой кислотой (0,05 мкМ), бычьим сывороточным альбумином (0,77 мкМ)

Таким образом, НКЗ могут быть применены для определения МТК и ДКР в водном растворе в диапазоне концентраций 0-150 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

✓ Была оптимизирована методика синтеза нанокластеров золота из золотохлористоводородной кислоты, путем восстановления бычьим сывороточным альбумином в щелочной среде в течение 12 часов при 37 °С; Полученные нанокластеры золота имели максимум люминесценции в области 660 нм и КВ ~ 10 %;

✓ Показано, что нанокластеры золота проявили фотостабильность в течение месяца;

✓ Методом эксклюзионной хроматографии показано, что нанокластеры имеют близкие размеры и сохраняют фотохимические свойства в результате разделения;

✓ Нанокластеры золота продемонстрировали потенциальную применимость для определения митоксантрона и доксорубицина в диапазоне концентраций 0-150 мкМ в водном растворе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Хлебцов Б.Н. Плазмонно-резонансные наночастицы для биомедицинских приложений: дис. док. физ-мат наук / Б.Н. Хлебцов. - Саратов, 2010. - 508 с.
2. Hemmateenejad B., Shakerizadeh-Shirazi F., Samari F. BSA-modified gold nanoclusters for sensing of folic acid // *Sensors Actuators, B Chem. Elsevier B.V.*, 2014. Vol. 199. - P. 42–46.
3. Xie J., Zheng Y., Ying J.Y. Highly selective and ultrasensitive detection of Hg^{2+} based on fluorescence quenching of Au nanoclusters by Hg^{2+} - Au^+ interactions // *Chem. Commun*, 2010. Vol. 46, № 6. - P. 961–963.
4. Akshath U.S., Bhatt P., Singh S.A. Differential Interaction of Metal Ions with Gold Nanoclusters and Application in Detection of Cobalt and Cadmium // *J. Fluoresc. Journal of Fluorescence*, 2020. Vol. 30, № 3. - P. 537–545.
5. Liu Y. et al. Gold-nanocluster-based fluorescent sensors for highly sensitive and selective detection of cyanide in water // *Adv. Funct. Mater*, 2010. Vol. 20, № 6. - P. 951–956.
6. Jiang X. et al. A fluorescent switch sensor for detection of anticancer drug and ctDNA based on the glutathione stabilized gold nanoclusters // *Sensors Actuators, B Chem. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 232. - P. 276–282.
7. Meng F., Gan F., Ye G. Bimetallic gold/silver nanoclusters as a fluorescent probe for detection of methotrexate and doxorubicin in serum // *Microchim. Acta. Microchimica Acta*, 2019. Vol. 186, № 6. - P. 1-8.
8. Negishi Y. et al. Origin of magic stability of thiolated gold clusters: A case study on $\text{Au}_{25}(\text{SC}_6\text{H}_{13})_{18}$ // *J. Am. Chem. Soc.*, 2007. Vol. 129, № 37. - P. 11322–11323.
9. Zheng J., Zhang C., Dickson R.M. Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots // *Phys. Rev. Lett.*, 2004. Vol. 93, № 7. - P. 5–8.
10. De La Rica R. One-step fabrication of LSPR-tuneable reconfigurable assemblies of gold nanoparticles decorated with biotin-binding proteins // *Nanoscale*, 2017. Vol. 9, № 47. - P. 18855–18860.
11. Chevrier D.M. Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review // *J. Nanophotonics*, 2012. Vol. 6, № 1. - P. 64504-64521.

12. Xie J., Zheng Y., Ying J.Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters // *J. Am. Chem. Soc.*, 2009. Vol. 131, № 3. - P. 888–889.
13. Bolaños K., Kogan M.J., Araya E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties // *Int. J. Nanomedicine*, 2019. Vol. 14. - P. 6387–6406.
14. Yan L. et al. Microwave-assisted synthesis of BSA-stabilized and HSA-protected gold nanoclusters with red emission // *J. Mater. Chem.*, 2012. Vol. 22, № 3. - P. 1000–1005.
15. Iwasaki Y. et al. Label-free detection of C-reactive protein using highly dispersible gold nanoparticles synthesized by reducible biomimetic block copolymers // *Chem. Commun*, 2014. Vol. 50, № 42. - P. 5656–5658.
16. Cao X.L. et al. PH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission // *Vib. Spectrosc. Elsevier B.V.*, 2013. Vol. 65. - P. 186–192.
17. Wong X.Y. et al. Integrating gold nanoclusters , folic acid and reduced graphene oxide for nanosensing of glutathione based on “ turn - off ” fluorescence // *Sci. Rep. Nature Publishing Group UK*, 2021. - P. 1–12.
18. Durgadas C. V., Sharma C.P., Sreenivasan K. Fluorescent gold clusters as nanosensors for copper ions in live cells // *Analyst*, 2011. Vol. 136, № 5. - P. 933–940.
19. Wang Z. X., Guo Y. X., Ding S. N. Fluorometric determination of cadmium (II) and mercury (II) using nanoclusters consisting of a gold-nickel alloy // *Microchim. Acta*, 2015. Vol. 182, № 13–14. - P. 2223–2231.
20. Wu J. et al. On–off–on gold nanocluster-based near infrared fluorescent probe for recognition of Cu(II) and vitamin C // *Microchim. Acta. Microchimica Acta*, 2017. Vol. 184, № 5. - P. 1315–1324.
21. Kubista M. et al. Experimental Correction for the Inner-filter Effect in Fluorescence Spectra. *Analyst*, 1994. Vol. 119, № March. - P. 417–419.