

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра аналитической химии
и химической экологии

***ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕТРАЦИКЛИНОВ И ИХ
КОМПЛЕКСОВ С ЕВРОПИЕМ В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ
СЕРЕБРА***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 411 группы
направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Боронахиной Валерии Дмитриевны

Научный руководитель

профессор, д.х.н., доцент

Смирнова Т.Д.

подпись, дата

Заведующий кафедрой

д.х.н., доцент

Русанова Т.Ю.

подпись, дата

Саратов 2017

Развитие технологий связано с появлением новых материалов, содержащих в своем составе наноразмерные частицы. Наноразмерное состояние веществ сильно отличается от их массивного состояния. Физико-химические параметры нч значительно отличаются от параметров, свойственных массивному состоянию. В наноразмерном состоянии вещества становятся в биологическом отношении весьма активными и находят повсеместное применение, – от лакокрасочной до пищевой промышленности. Наиболее используемыми являются частицы из углерода, оксида кремния, золота, серебра.

Наноразмерные частицы серебра (AgNPs), благодаря высокоразвитой поверхности, уникальным оптическим и биологическим свойствам: ППР, гигантское комбинационное рассеяние, гашение или усиление флуоресценции, активно применяются в оптике, аналитической химии. Их размер варьируется в интервале 5-50 нм. Области применения AgNPs различные: в качестве катализаторов химических реакций, антимикробной стерилизации. В настоящее время на основе AgNPs выпускаются препараты такие, как биологически активные добавки с антибактериальным, противовирусным и противогрибковым действием. Наночастицы серебра используют для определения антибиотиков (например, тетрациклинового ряда). Тетрациклины в свою очередь широко используются для лечения инфекций у людей и в ветеринарии. Однако широкое использование тетрациклинов в ветеринарии может привести к тому, что их остаточные содержания в молоке, мясе и других продуктах питания будут превышать допустимые концентрации. Поэтому требуется постоянный мониторинг остатков тетрациклинов в образцах: сыворотка крови, моча, молоко, мясо, рыба, яйца. Для обнаружения тетрациклинов в пищевых продуктах используется ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, ВАМ.

Целью работы явилось изучение влияния наночастиц серебра на флуориметрические свойства тетрациклинов.

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

1. Получение наночастиц серебра
2. Изучение морфологических свойств синтезированных наночастиц;
3. Изучение влияния наночастиц серебра на флуоресцентные свойства доксициклина
4. Модификация наночастиц серебра ионами европия
5. Изучение влияния наночастиц серебра, модифицированных ионами европия, на флуоресцентные свойства доксициклина.

Наночастицы серебра (AgNPs), стабилизированные цитратом натрия, получали по известной методике восстановлением соли нитрата серебра боргидридом натрия в соответствии с реакцией:



Выпускная квалификационная работа изложена на 48 страницах машинописного текста, включая введение, 3 главы, вывод, список литературы (25 наименования), используемые сокращения, техника безопасности.

В **первой** главе представлен анализ литературы, посвященной способам получения наночастиц серебра, описанию их основных оптических свойств, механизма взаимодействия с электромагнитным излучением, влияния ППР на оптические характеристики приповерхностного слоя наночастиц, особенности флуоресценции молекул и комплексов вблизи поверхности наночастиц серебра, флуоресцентных свойств антибиотиков тетрациклинового ряда и их комплексов с европием. Рассмотрены вопросы изучения кинетики затухания флуоресценции, определение понятий времени жизни флуоресценции и характеристик, их определяющих (индекса липофильности).

Во **второй** главе предоставлены использованные в ходе работы органические и неорганические реагенты различных классов, аппаратура и методы исследования.

В **третьей** главе рассмотрены результаты изучения наночастиц серебра, синтезированных боргидридным методом (стабилизация наночастиц цитрат – ионом). Полученные золи серебра охарактеризованы методами оптической спектроскопии поглощения и динамического рассеяния.

Метод	Размер, нм	ζ-потенциал, мВ	ППР, нм
Боргидридный метод (стабилизатор цитрат-ион)	20	-30	410

Спектроскопические исследования свежеприготовленных золь серебра показали, что в спектре AgNPs, стабилизированных цитратом натрия, (рис.1) наблюдается полоса ППР с максимумом $\lambda_{\text{погл}} = 400 - 425 \text{ нм}$, интенсивность которой увеличивается более чем в 3 раза в течение первых двух недель. Увеличение интенсивности поглощения и незначительный батохромный эффект (25 нм) связан с ростом размера наночастиц. После чего процесс изменения наночастиц замедляется.

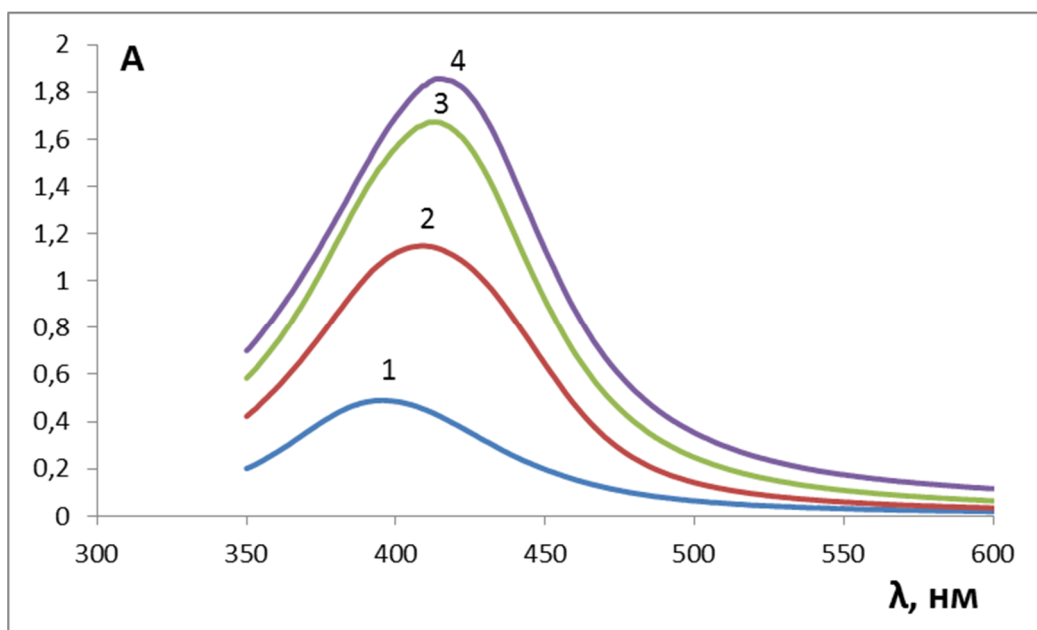


Рис.1 Спектры поглощения наночастиц серебра, полученные через
1 - 20 минут, 2 - 24 часа, 3 - 14 суток, 4 – 30 суток после синтеза.

Метод динамического рассеяния позволил установить, что размер наночастиц в течение первых двух недель после их синтеза составляет 15 – 30 нм с максимумом распределения около 20 нм (Рис. 2,3).

Наночастицы имеют отрицательный дзета-потенциал, который меняется во времени. Свежеприготовленные золи серебра характеризуются зарядом -30 милливольт, который увеличивается в течение 14 суток практически до нуля. В период 15 - 40 суток в коллоидном растворе формируются частицы со значительным отрицательным зарядом -100 мВ (рис.4).

	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 126,2	Peak 1: 17,76	99,9	2,805
Pdl: 0,381	Peak 2: 78,29	0,1	21,67
Intercept: 0,810	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

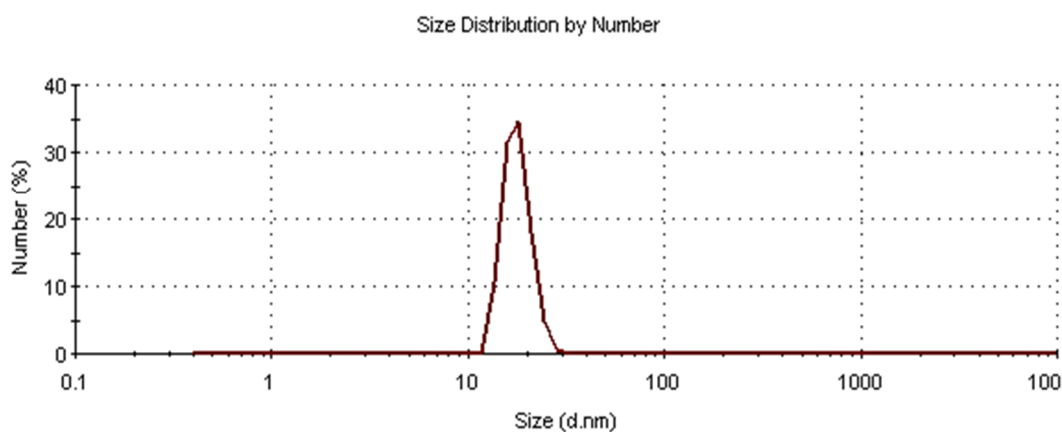


Рис.2 Распределение частиц по вкладу в общее число зарегистрированных частиц, нм.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 45,21	Peak 1: 37,88	72,0	12,67
Pdl: 0,101	Peak 2: 5,170	18,5	1,654
Intercept: 0,786	Peak 3: 1,319	9,5	0,3933

Result quality : Refer to quality report

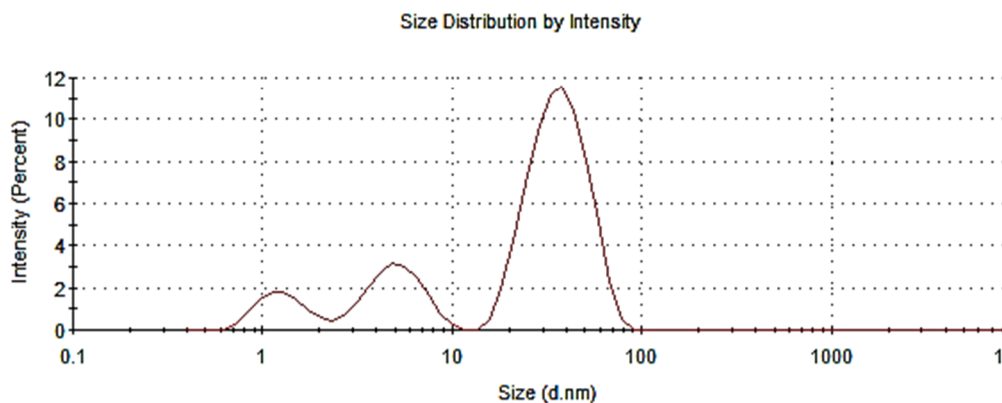


Рис.3 Распределение частиц по вкладу в общую интенсивность рассеянного света, нм. Позволяет установить наличие крупных частиц или агрегатов.

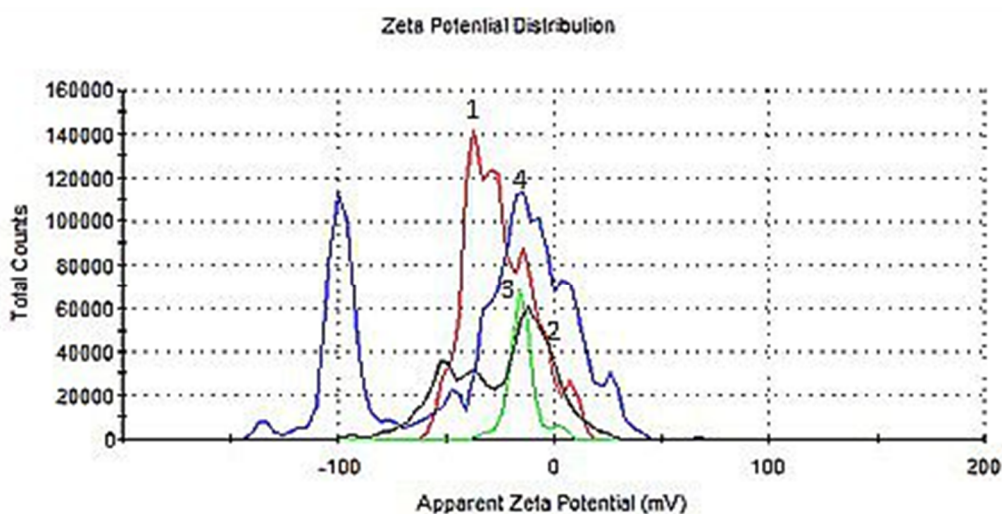


Рис.4 Измерение дзета - потенциала с течением времени: 1- через 20 минут после синтеза, 2- через неделю после синтеза, 3- через две недели после синтеза, 4- через 1,5 месяца после синтеза.

Следующий этап исследования – изучение влияния AgNPs на флуоресцентные свойства доксицилина.

Спектр флуоресценции ДЦ характеризуется невысокой интенсивностью ($\lambda_{\text{возб}} = 390 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 520 \text{ нм}$). В случае сорбции молекул доксициклина на поверхности AgNPs *возможно* усиление сигнала флуоресценции системы ввиду значительного перекрытия спектра ППР наночастиц серебра и поглощения/возбуждения ДЦ (рис.5). Однако, экспериментальным путем доказано, что увеличение интенсивности флуоресценции ДЦ *не наблюдается*, что связано, возможно, со значительным расстоянием между поверхностью металлической частицы и молекулой ДЦ. В условиях конкурентного взаимодействия цитрат - иона и ионов тетрациклина с AgNPs расстояние между поверхностью металла и тетрациклином достаточно большое, препятствующее влиянию локального поля поверхностного плазмона на флуориметрические свойства молекулы антибиотика. В таких условиях интенсивность флуоресценции ДЦ практически не возрастает.

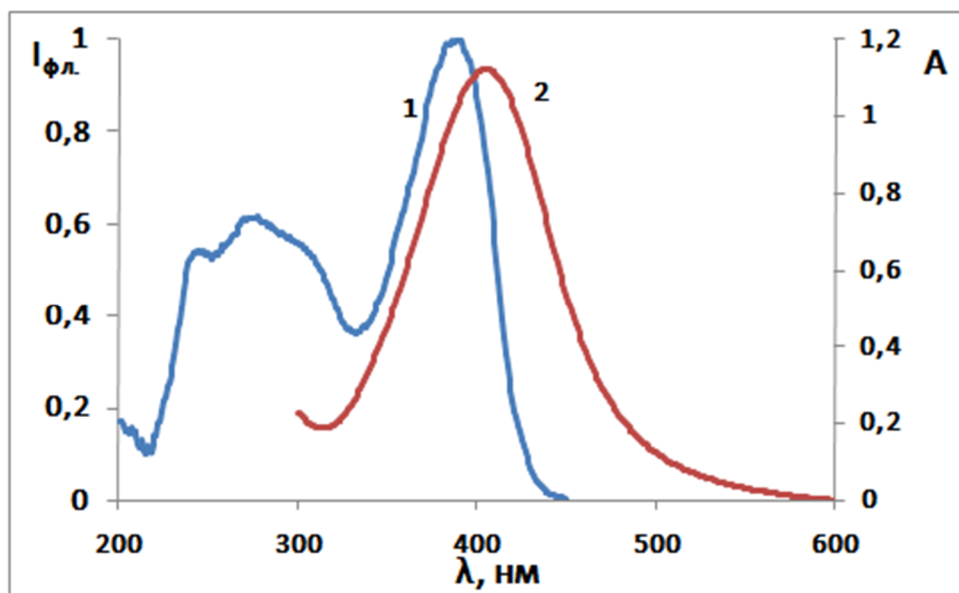


Рис.5 Перекрытие спектров поглощения ДЦ (1) со спектром поверхностного плазмонного резонанса нч серебра (2).

$$C_{\text{нч}}=2 \cdot 10^{-4} \text{ М}, C_{\text{ДЦ}}=1 \cdot 10^{-5} \text{ М}.$$

В целях сокращения расстояния между флуоресцирующей молекулой и поверхностью нч нами используется модификация поверхности нч серебра ионами Eu^{3+} .

Модификация AgNPs ионами Eu^{3+} проводилась по следующей *методике*: в полипропиленовые пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл вносили 1 мл нч серебра с концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ М, 1 мл Eu^{3+} 10^{-1} М. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и центрифугировали (12000 об/мин) в течение 20 мин. Образовавшийся осадок модифицированных нч отделяют, растворяют в спирте (общий объем 2 мл) в УЗ-ванне в течение 20 минут.

Введение в раствор ДЦ добавок модифицированных нч серебра в спектре флуоресценции ДЦ появляется новая высокоинтенсивная полоса эмиссии с $\lambda_{\text{фл}} = 615$ нм (рис. 6) ($\lambda_{\text{возб}} = 395$ нм), которая соответствует сенсibilизированной флуоресценции разнолигандного комплекса иона РЗЭ и соответствующему сверхчувствительному электродипольному переходу (${}^2\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$).

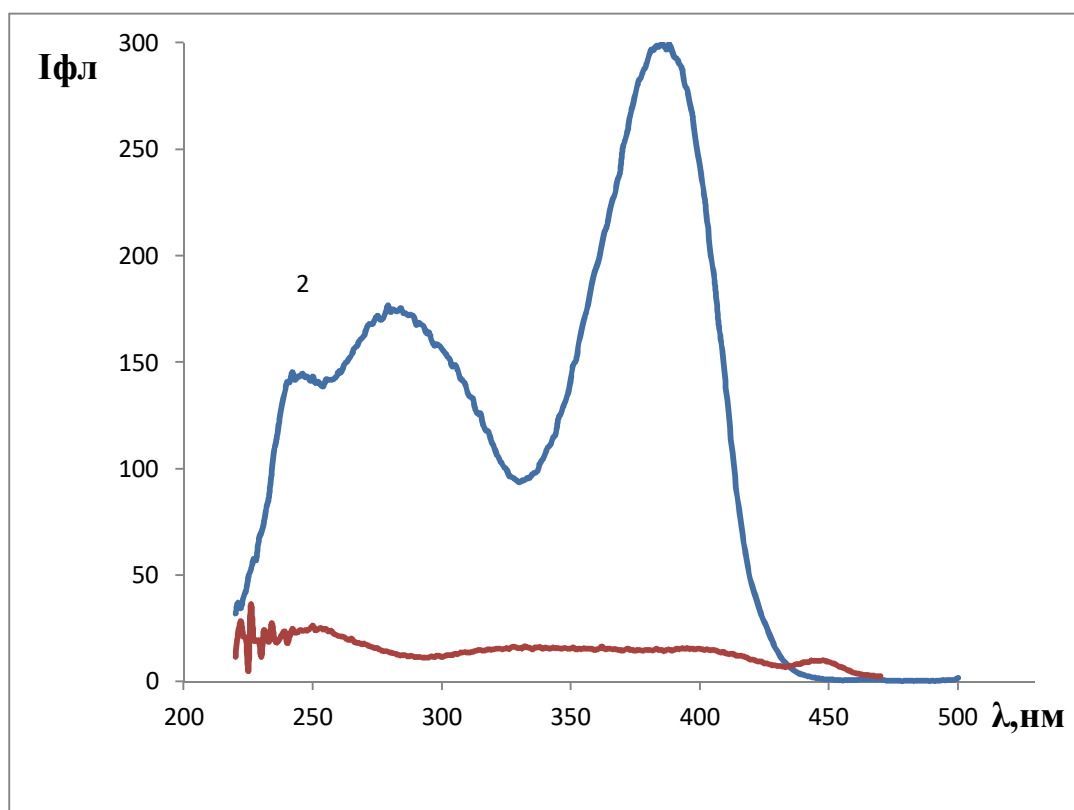


Рис. 6 1 - Спектр возбуждения комплекса ДЦ – модифицированные европием нч серебра; 2 – Спектр возбуждения ДЦ. $C_{\text{нч}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, $C_{\text{Eu}^{3+}} = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{ДЦ}} = 10^{-6} \text{ М}$, $\lambda_{\text{фл}} = 615 \text{ нм}$.

При этом сигнал сенсibilизированной флуоресценции значительно (до 30 раз) превосходит по интенсивности собственную люминесценцию ДЦ и иона европия (рис.6). Установлено, что максимальное увеличение флуоресценции в растворе ДЦ в присутствии модифицированных европием AgNPs до 10-30 раз. Сигнал сенсibilизированной флуоресценции и ζ - потенциал модифицированных нч зависит от концентрации ионов европия (рис.7).

В связи с изменением заряда нч, становится возможным электростатическое взаимодействие отрицательно заряженных ионов антибиотиков, которые образуются в нейтральной и слабощелочной среде, с положительно заряженной поверхностью модифицированных нч серебра, а также комплексообразование между ионами европия и ДЦ. Учитывая координационную ненасыщенность ионов РЗЭ, можно предположить образование на поверхности нч разнолигандных хелатов европия с ДЦ и цитрат - ионом. Образование комплексов с переносом заряда подтверждается появлением в спектре флуоресценции исследуемых систем сенсibilизированной эмиссии ионов европия.

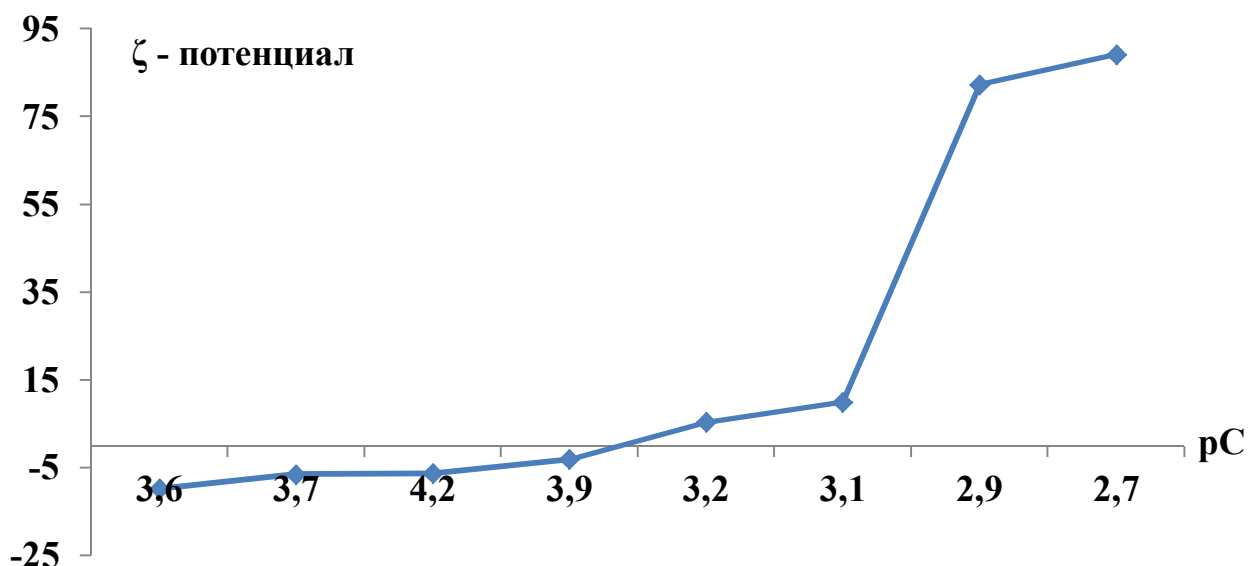


Рис.7 Зависимость ζ - потенциала нч серебра от концентрации ионов европия

Найдены оптимальные условия получения максимального сигнала сенсibilизированной флуоресценции ДЦ в присутствии модифицированных наночастиц серебра

Изучены зависимости флуориметрических свойств системы модифицированные нч серебра ионами Eu^{3+} – производные тетрациклина от липофильности антибиотиков тетрациклинового ряда.

Установлено, что интенсивность флуоресценции системы зависит от индекса липофильности. С увеличением численного значения индекса липофильности наблюдается уменьшение интенсивности сигнала флуоресценции (рис.8).

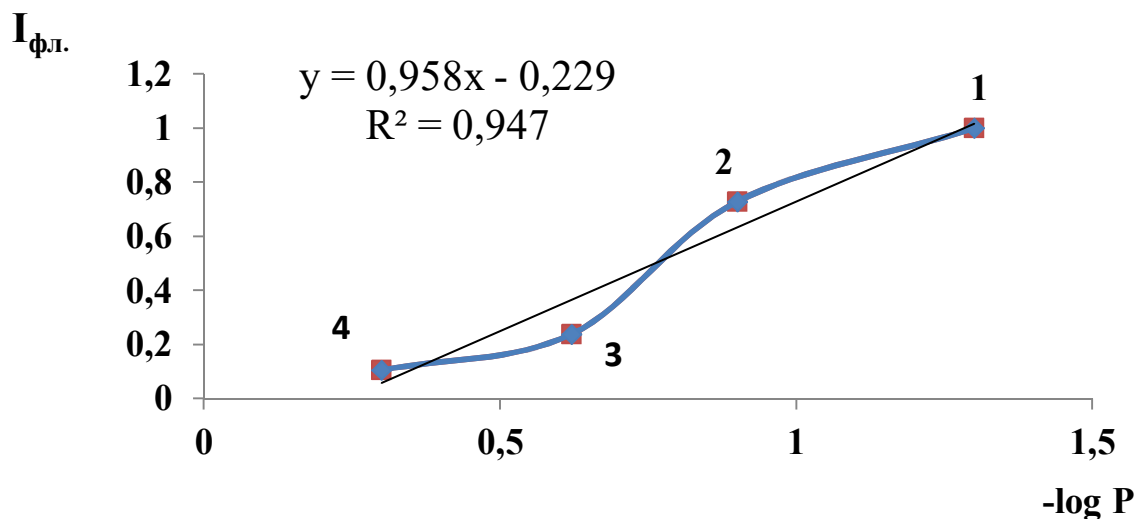


Рис. 8 Зависимость интенсивности флуоресценции производных тетрациклинового ряда в присутствии модифицированных ионами европия нч серебра от индекса липофильности лиганда

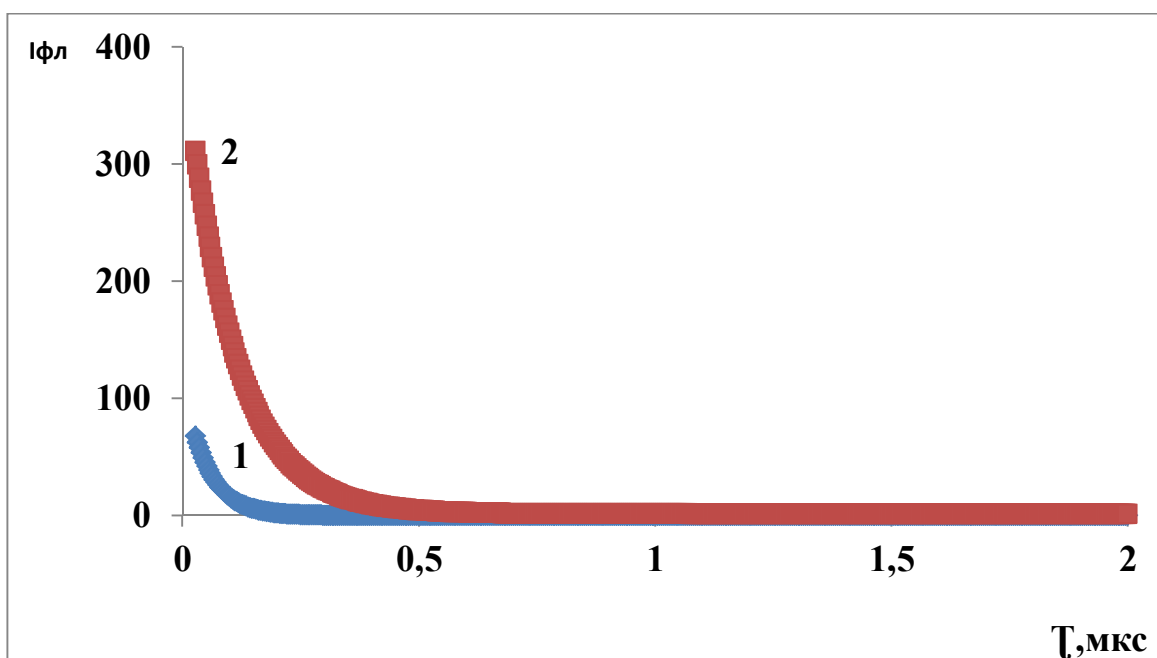


Рис.9 Кривые затухания флуоресценции комплекса ДЦ – присутствие в присутствии и отсутствии нч серебра. $C_{\text{EuIII}}=2,5 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{нч}}=3,8 \cdot 10^{-7}$ М, $C_{\text{ДЦ}}=5 \cdot 10^{-6}$ М. 1 – Eu^{3+} -ДЦ; ДЦ – модифицированные европием нч серебра.

Измерены времена жизни флуоресценции систем: производные тетрациклина – модифицированные нч серебра (табл.1). Установлено, что в присутствии наночастиц серебра интенсивность флуоресценции возрастает в 10 раз, а время жизни флуоресценции в среднем, – в 2 раза.

Табл.1 Время жизни комплексов европия с различными тетрациклинами и индексы липофильности ($\log P$) соответствующих тетрациклинов

<i>Антибиотик</i>	<i>Log P</i>	τ , мкс
Метациклин	-0.3	23
Хлортетрациклин	-0.6	29
Окситетрациклин	-0.9	35
Тетрациклин	-1.3	69

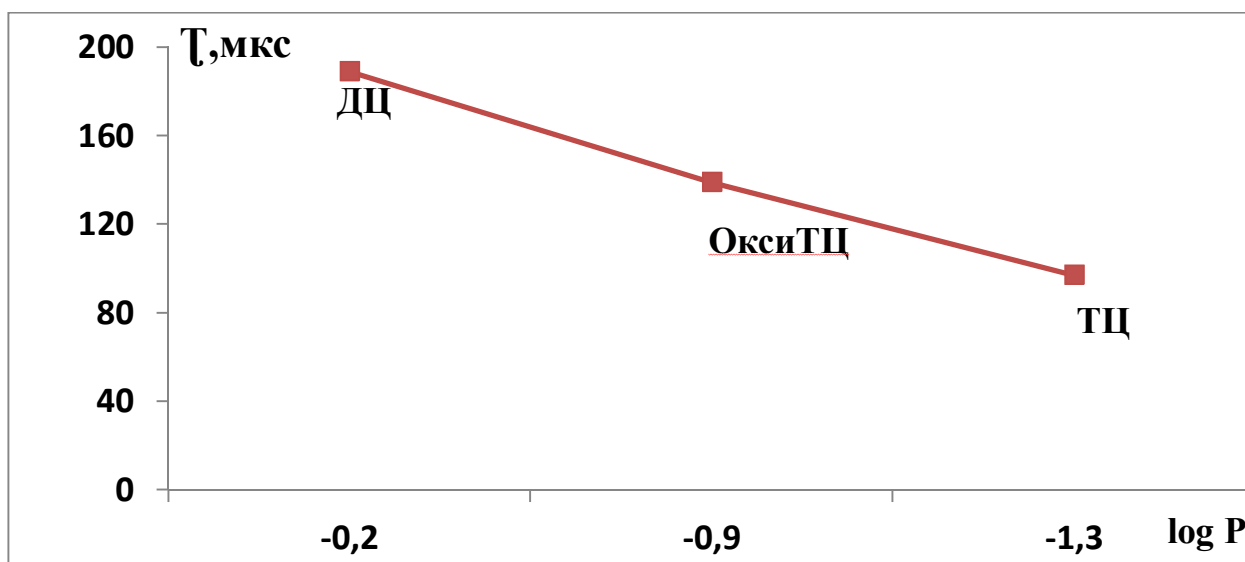


Рис.10 Зависимость времени жизни тетрациклинов в присутствии наночастиц серебра, модифицированных ионами европия. $C_{Eu^{3+}}=2,5 \cdot 10^{-5} M$, $C_{Нч}=3,8 \cdot 10^{-7} M$, $C_{ДЦ}=5 \cdot 10^{-6} M$, $C_{ОксиТЦ}=5 \cdot 10^{-6} M$, $C_{ТЦ}=5 \cdot 10^{-6} M$.

Показано, что с увеличением численного значения индекса липофильности тетрациклинов уменьшается время жизни флуоресценции

исследуемых систем в присутствии нч серебра (рис.18, табл.1) и интенсивность флуоресценции (рис.10).

Заключение

1. Получены наночастицы серебра со средним размером 20 нм, отрицательным зарядом -30мВ и стабильностью свойств в течение 14 суток.
2. Модификация наночастиц серебра ионами европия позволила получить наночастицы с потенциалом +85 мВ, что свидетельствует о высокой стабильности систем.
3. Сорбция доксициклина на поверхности модифицированных европием AgNPs сопровождается увеличением сигнала сенсibilизированной флуоресценции в 10 раз.
4. Установлена зависимость интенсивности и времени жизни флуоресценции комплексов европия с некоторыми тетрациклинами в присутствии наночастиц серебра от липофильности лигандов.