

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 нанокластеров золота, стабилизированных  
тиол-содержащими соединениями**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студента (ки) 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Зобниной Екатерины Алексеевны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

к.х.н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание

\_\_\_\_\_  
дата, подпись

А.В. Маркин

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

\_\_\_\_\_  
дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Саратов 2024

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Люминесцентные нанокластеры (НК) металлов как перспективные люминесцентные наноматериалы привлекли значительное внимание из-за их необычных физико-химических свойств и, как следствие, хороших оптических свойств [1]. В частности, люминесцентные нанокластеры золота (НКЗ) привлекли гораздо больше внимания, чем другие металлические наноматериалы, что можно объяснить простотой их получения, хорошей биосовместимостью, низкой токсичностью, высокой фотостабильностью и простотой функционализации с другими биомолекулами.

Известно, что люминесцентные НКЗ обычно состоят из нескольких сотен атомов Au размером менее 3 нм и, таким образом, сопоставимы с длиной волны Ферми для электронов [2]. В отличие от крупных наночастиц золота (НЧЗ), ультрамалые люминесцентные НКЗ не проявляют поглощения при поверхностном плазмонном резонансе в видимой области, но обладают явным излучением люминесценции в ближней инфракрасной и видимой областях [1]. В дополнение к сверхмалому размеру, поверхностные лиганды, структура и заряд, а также факторы окружающей среды, такие как ионная сила, уровень pH и температура, также оказывают значительное влияние на их люминесцентные свойства. Благодаря этим превосходным свойствам НКЗ имеют большие перспективы в области биологической маркировки, биосенсорики и биоизображения [2].

Благодаря сильному взаимодействию между серой и золотом, тиолаты являются наиболее часто используемыми лигандами-стабилизаторами в синтезе НКЗ. До настоящего времени было известно несколько небольших тиолатных лигандов, таких как метионин [3], глутатион [4], дигидролипоевая кислота [5], 3-меркаптопропионовая кислота (МПК) [6], нацетил-L-цистеин [7] и т.д. НКЗ, стабилизированные тиол-содержащими

соединениями, часто используются для определения различных компонентов в объектах окружающей среды и биологических жидкостях, однако одним из часто встречающихся затруднений в анализе с использованием НКЗ является недостаточная интенсивность люминесцентного сигнала, что может оказывать влияние на точность измерения различных компонентов. В связи с этим, ключевой задачей становится создание НКЗ с оптимальными спектральными свойствами.

**Целью данной работы** получение НКЗ, стабилизированных тиол-содержащими соединениями, с целью их использования для определения доксорубина (ДОКС).

**Краткая характеристика материалов исследования.** Для решения поставленных в данной работе задач применяли комплекс физико-химических методов исследования: флуориметрия, спектрофотометрия, гель-электрофорез и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Объектами исследования стали люминесцентные НКЗ, стабилизированные глутатионом, и НКЗ с МПК и бычьим сывороточным альбумином (БСА).

**Описание структуры работы.** Данная работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, экспериментальная часть и результаты и обсуждения), заключения, инструктажа по технике безопасности и списка использованных источников. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 57 страницы, включая 34 рисунка и одну таблицу. Всего проанализировано 47 литературных источников.

**Научная значимость работы:**

- синтезированы и охарактеризованы НКЗ на основе золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) и глутатиона;
- синтезированы и охарактеризованы НКЗ на основе МПК и БСА (БСА/МПК-НКЗ);

- опробованы два метода очистки БСА/МПК-НКЗ: диализ и центробежное концентрирование (ЦК);
- оценена применимость НКЗ, стабилизированных глутатионом, и НКЗ, синтезированные с МПК и БСА, в качестве люминесцентного сенсора для определения концентраций противоопухолевого препарата доксорубицина (ДОКС/DOX).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** описана актуальность НК благородных металлов, в частности, НКЗ, определены основная цель и задачи исследования.

В **первой главе** описаны различные способы получения НКЗ. Для синтеза НКЗ можно использовать несколько защитных лигандов или матриц, таких как тиоловые соединения, белки, небольшие пептиды, полимеры, полисахариды и дендримеры, а также молекулы ДНК и РНК [8, 9, 10].

Описаны причины люминесценции НКЗ, которые изучала исследовательская группа Джина [12], основываясь на структурном анализе. Согласно структурному анализу группы Джина, люминесценция НКЗ происходит от перехода низшая вакантная молекулярная орбиталь - высшая занятая молекулярная орбиталь [12]. Авторы работы считают, что различные оптические свойства молекулярноподобных НКЗ определяются размером и соответствующей электронной структурой. В дополнение к сверхмалому размеру лиганды, используемые для получения НКЗ, также оказывают влияние на их люминесцентные свойства [13].

Методы получения НКЗ можно разделить на две классические стратегии, а именно синтетические маршруты “снизу вверх” и “сверху вниз”. Оба способа требуют защиты матриц или органических лигандов в процессе синтеза, поскольку НКЗ без стабилизации обладают высокой поверхностной энергией, что приведет к необратимой агломерации НКЗ в растворе. При типичном подходе “снизу-вверх” синтез НКЗ достигается восстановлением

металлического предшественника (обычно соли металла) под защитой соответствующей матрицы или органического лиганда. В присутствии матриц (или органических лигандов) и восстановителей предшественники металлов восстанавливаются до атомов металла нулевой валентности, а затем эти вновь сгенерированные атомы будут объединяться, образуя ядро НКЗ. При типичном подходе “сверху-вниз” НКЗ получают травлением предварительно сформированных крупных металлических наночастиц с использованием сильно взаимодействующих лигандов.

Для получения стабильных и высоколюминесцентных НКЗ важно выбрать стабилизирующий лиганд, так как ковалентно связанные лиганды отвечают за кинетический и термодинамический контроль реакций и подбор оптимальных размеров при синтезе. Для водорастворимых НКЗ контроль синтеза достигается путем точного подбора условий реакции таким образом, чтобы получить продукт одного размера. Для получения однородных кластеров выбранных размеров методы и параметры синтеза (температура, время синтеза) нуждаются в тщательном изучении [10].

Перспективным применением НКЗ является определение концентрации противоопухолевого препарата ДОКС. В работе [14] для определения ДОКС в сыворотке крови человека были получены НКЗ, поверхностно модифицированные дитиотреитолом, карбоксилированным хитозаном. Полученные НКЗ имели интенсивный максимум люминесценции в области 650 нм. В раствор НКЗ добавляли модельные растворы ДОКС с концентрациями 0,05–2 мкМ и наблюдалось ожидаемое тушение кластеров (рисунок 18). Предел обнаружения составлял 0,005 мкМ [14].

Таким образом, по результатам анализа литературы были выбраны методики синтеза НКЗ, определены основные методы исследования свойств получаемых наноструктур и способы применения полученных образцов.

Во **второй главе** приведена информация об используемых реактивах, приборах и оборудовании, и методиках синтеза. Описано получение НКЗ из ЗХВК и глутатиона в течение 24 часов при 70 °С. Спектры поглощения, возбуждения и фотолюминесценции (ФЛ) данных НКЗ представлены на рисунке 1. Максимумы поглощения НКЗ, стабилизированных глутатионом, находятся в областях 390 нм и 470 нм. Максимум ФЛ находится в области 610 нм при возбуждении длинами волн 240 – 400 нм. Оптимальные длины волн возбуждения 280 – 300 нм. Относительный КВ образца составил  $(11 \pm 2) \%$ .

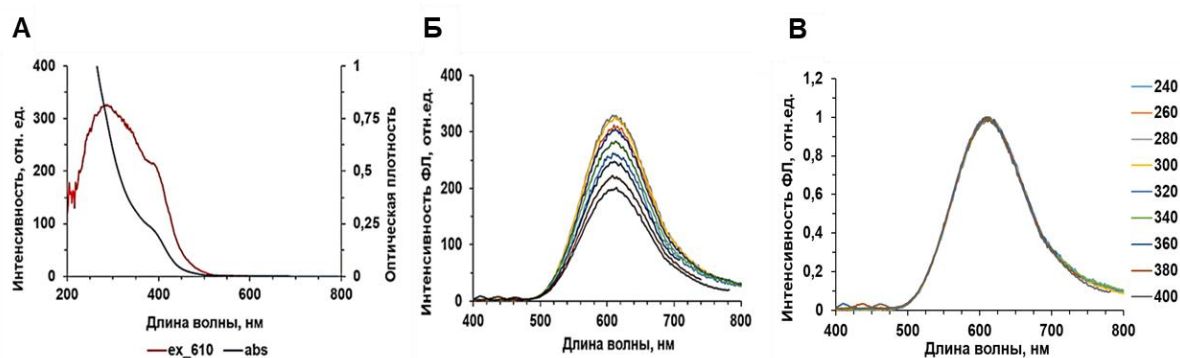


Рисунок 1 – Спектры поглощения(синий)/возбуждения (красный) (А), спектры ФЛ (Б) и нормированный спектр ФЛ (В) НКЗ, стабилизированных глутатионом

НКЗ, стабилизированные глутатионом, были исследованы с использованием гель-электрофоретического метода. На полученной электрофореграмме (рисунок 2) видно, что под действием электрического поля данные структуры двигаются к аноду, следовательно, данные НКЗ заряжены отрицательно. НКЗ «двигаются» единым фронтом, это может свидетельствовать об идентичности полученных структур.

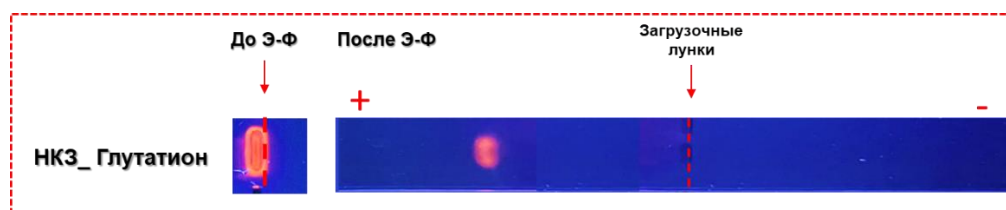


Рисунок 2 – Гель-электрофоретическое разделение НКЗ, стабилизированных глутатионом (1,5% агарозы, 150 В, 120 мА, 80 Вт, 30 мин)

Для оценки морфологических свойства НКЗ, стабилизированных глутатионом, получили снимок ПЭМ представлен на рисунке 3. Полученные НКЗ характеризовались размерами  $\approx (2,0 \pm 0,2)$  нм.

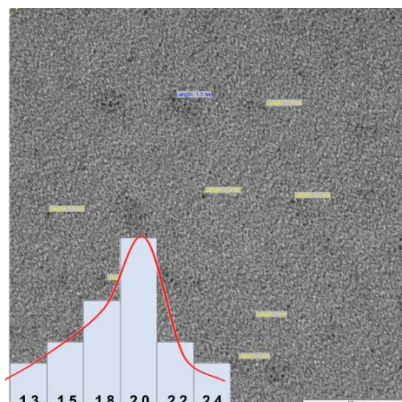


Рисунок 3 – Снимок ПЭМ НКЗ, стабилизированных глутатионом

Описано получение НКЗ, стабилизированных БСА и МПК, с различными концентрациями БСА. Варьировали концентрации БСА с целью изучения влияния БСА на оптические свойства НКЗ. Спектры поглощения, возбуждения и фотолюминесценции данных НКЗ представлены на рисунке 4. Максимумы поглощения БСА/МПК-НКЗ находятся в областях 280 нм и 340 нм. Максимум ФЛ находится в области 580 нм при возбуждении длинами волн 240 – 400 нм. Наибольшую интенсивность ФЛ характеризуются образцы при возбуждении длинами волн 320 – 340 нм. Относительный КВ образцов составил  $\approx 3-5$  %. Значения КВ для образцов НКЗ с различными концентрациями БСА представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Значения КВ для образцов с различными концентрациями БСА

<b>Концентрация БСА, мг/мл</b>	<b>КВ, %</b>
10	2,7 $\pm$ 0,1
20	2,9 $\pm$ 0,1
30	3,7 $\pm$ 0,2
40	3,3 $\pm$ 0,1
50	4,9 $\pm$ 0,2

60	$3,4 \pm 0,2$
----	---------------

Построили зависимость интенсивности ФЛ БСА/МПК-НКЗ от концентрации БСА. На рисунке 4 видно, что интенсивность ФЛ данных НКЗ увеличивается при повышении концентрации белка. Но для дальнейших исследований оптимально взять образец с концентрацией БСА 30 мг/мл, компенсируя возможность стерических трудностей при тушении с одной стороны и низкой интенсивности с другой. Также образец обладает высоким значением КВ, поэтому в дальнейших исследованиях мы использовали только этот образец.

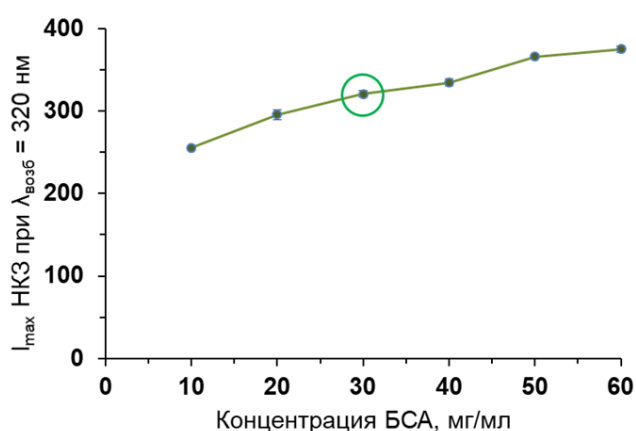


Рисунок 4 – Зависимость интенсивности ФЛ БСА/МПК-НКЗ от концентрации БСА ( $\lambda_{\text{возб}} = 320$  нм)

Изучили морфологические свойства образца БСА/МПК-НКЗ с концентрацией БСА 30 мг/мл. Снимок ПЭМ представлен на рисунке 5. Полученные НКЗ характеризовались размерами менее 2 нм, что соответствует теории люминесценции НКЗ [15].

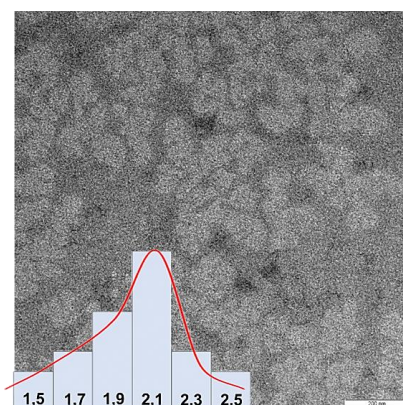




Рисунок 5 – Снимок ПЭМ образца БСА/МПК-НКЗ с концентрацией БСА 30 мг/мл

Для очистки БСА/МПК-НКЗ от непрореагировавших компонентов и доказательства формирования НКЗ одним из методов был использован диализ. На рисунке 6 представлены спектры поглощения/возбуждения, ФЛ и нормированного спектра ФЛ после диализа. Максимум поглощения, характерный для БСА, сохранялся в области 280 нм. На спектре ФЛ НКЗ после диализа наблюдались максимумы в области 380 нм и 580 нм. КВ ФЛ НКЗ в области 580 нм снизился до  $(0,20 \pm 0,02) \%$ , поэтому использование диализа для очистки данных НКЗ не является эффективным и рациональным.

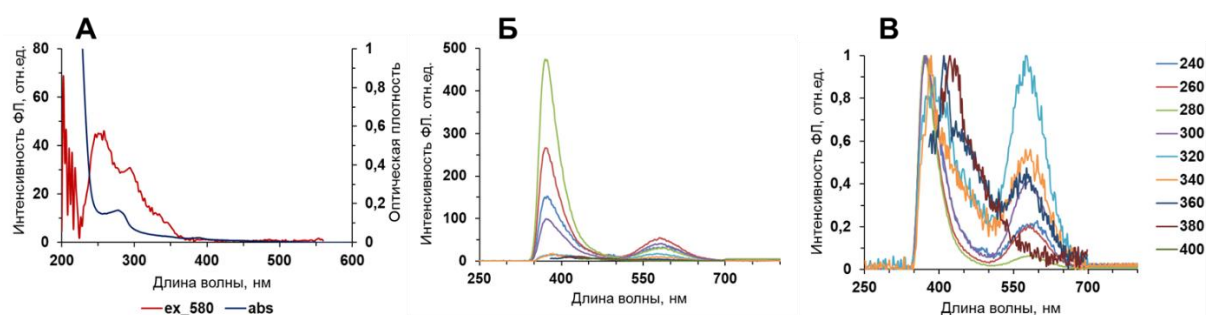


Рисунок 6 – Спектр поглощения (синий)/возбуждения (красный) (А), ФЛ (Б) и нормированный спектр ФЛ (В) БСА/МПК-НКЗ после диализа

Альтернативным способом очистки НКЗ было центрифужное концентрирование (ЦК). Спектры поглощения/возбуждения, ФЛ и нормированного спектра ФЛ после ЦК представлены на рисунке 7. Максимумы поглощения сохранялись в области 280 нм и 340 нм, максимум ФЛ находился в области 580 нм. КВ после очистки составил  $(3,6 \pm 0,2) \%$ . Использование данного метода позволило нам избавиться от непрореагировавших компонентов с сохранением структуры и оптических свойств НКЗ.

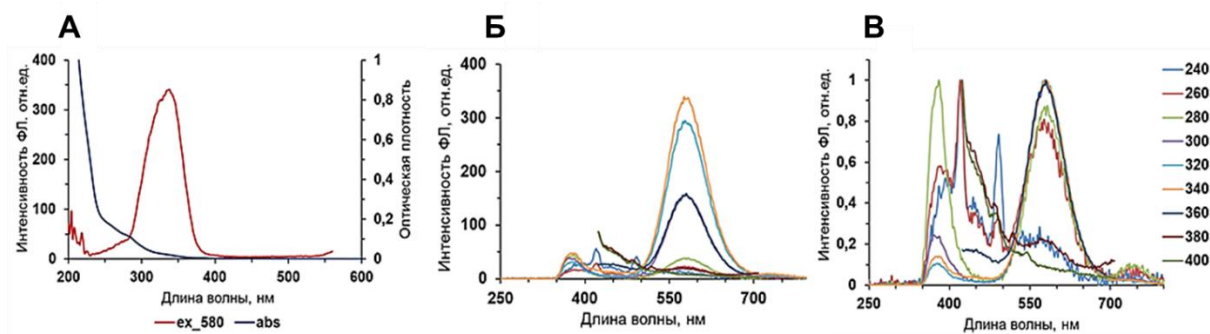


Рисунок 7 – Спектр поглощения (синий)/ возбуждения (красный) (А), ФЛ (Б) и нормированный спектр ФЛ (В) БСА/МПК-НКЗ после ЦК

Чтобы оценить применимость синтезированных БСА/МПК-НКЗ была исследована их стабильность в буферных растворах. Приготовлены наиболее часто используемые буферы: фосфатно-цитратный буферный раствор (рН 5,5), раствор MES (рН 6,5), PBS (рН 7,5), раствор тетрабората натрия (рН 8,5), буфер карбоната натрия (рН 9,5). Для достижения широкого диапазона рН был приготовлен ацетатный буфер (рН 3,5) и раствор гидроксида натрия (рН 13). БСА/МПК-НКЗ поместили в подготовленный буфер и оставили их на 48 ч. Со временем БСА/МПК-НКЗ теряют свою стабильность, интенсивность ФЛ уменьшается (рисунок 8). После 24 часов НКЗ начинают заметно терять интенсивность ФЛ. Хорошо видно, что в фосфатно-цитратном буфере и растворе тетрабората натрия осадки выпадали уже через 24 часа хранения, вероятно, это можно объяснить нестабильностью аминокруппы при кислом и нейтральном рН. В сильнокислой (рН 3,5) и сильнощелочной (рН 13) средах из-за процессов протонирования/ депротонирования наблюдается заметное уменьшение коллоидной стабильности НКЗ. Изменения в интенсивности ФЛ НКЗ зависят также от компонентов самих буферов. НКЗ сохраняют стабильность и оптические свойства в буферных растворах при рН 5,5; 8,5; 9,5.

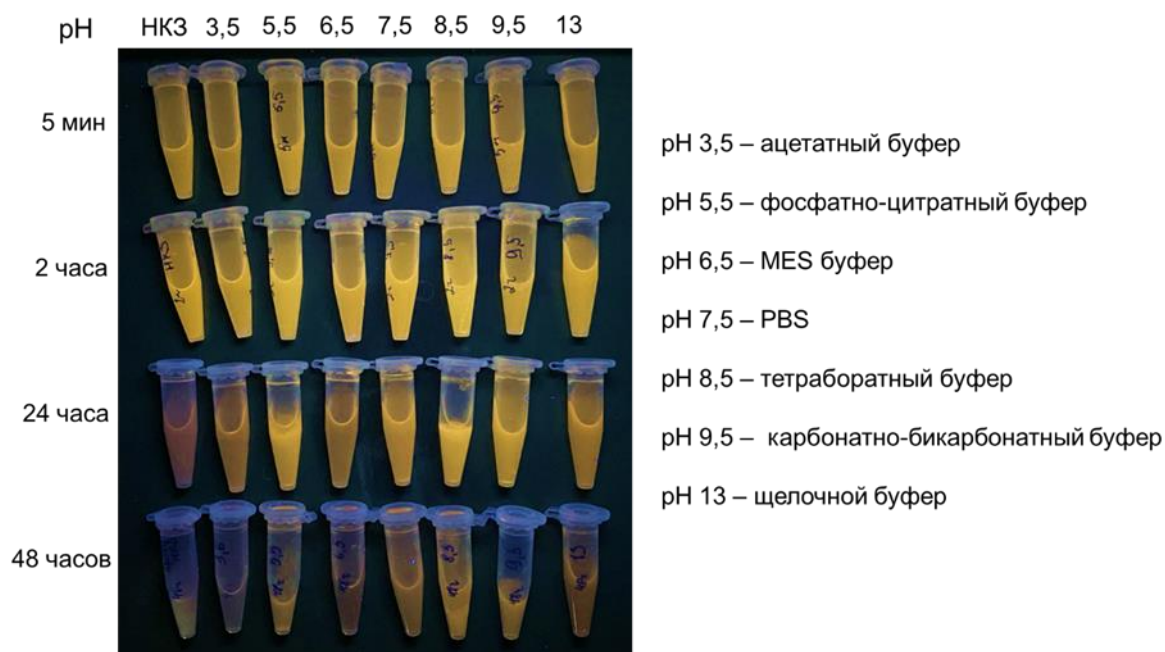


Рисунок 8 – Сравнение стабильности БСА/МПК-НКЗ при различных pH

Оценили возможность применения люминесцентных НКЗ, стабилизированных глутатионом, в качестве люминесцентного сенсора для определения концентраций противоопухолевого препарата ДОКС. Количественное определение лекарственного средства осуществляли за счет зависимого уменьшения интенсивности люминесценции НКЗ после взаимодействия.

Спектры ФЛ НКЗ, стабилизированных глутатионом, после тушения ДОКС представлен на рисунке 9 (А) и спектры ДОКС в концентрациях 0-75 мкг/мл на рисунке 9 (Б). По спектрам видно, что интенсивность ФЛ не изменяется в присутствии ДОКС.

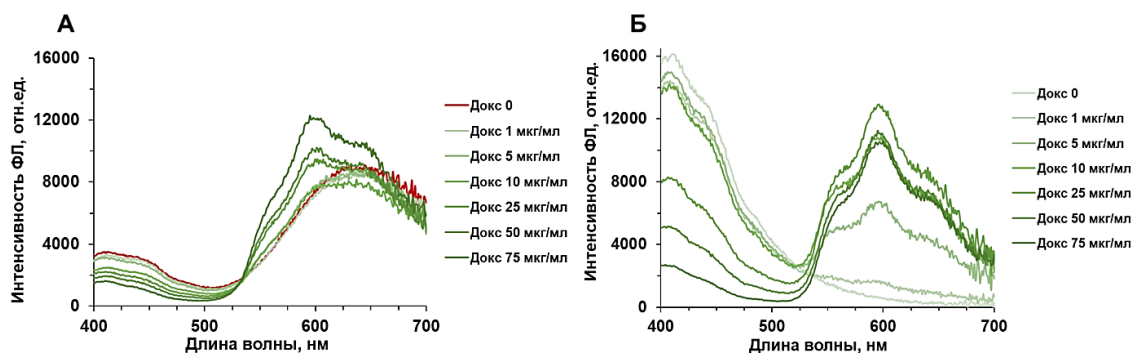


Рисунок 9 – Спектры ФЛ НКЗ, стабилизированных глутатионом, после тушения ДОКС (А) и спектры ДОКС с водой (Б)

Для оценки эффективности тушения был построен профиль тушения ФЛ (рисунок 10 (А)) и график в координатах Штерна-Фольмера (рисунок 10 (Б)). Из графиков представленных выше можно сделать вывод, что НКЗ, стабилизированные глутатионом, не пригодны в качестве люминесцентного сенсора для определения концентраций противоопухолевого препарата ДОКС.

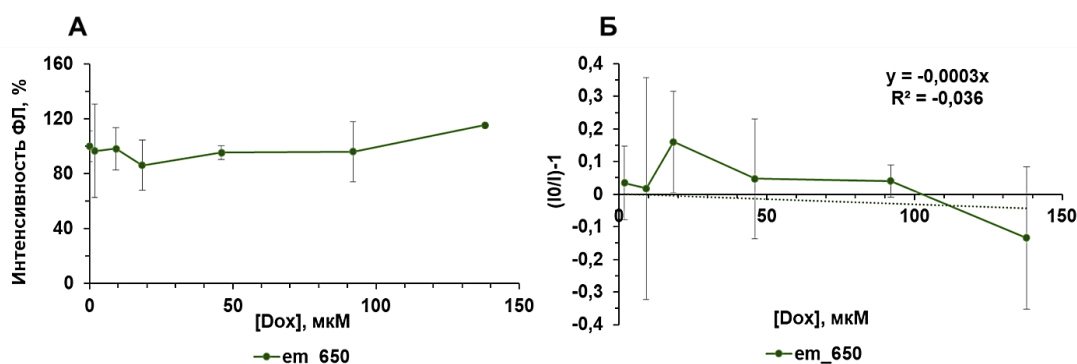


Рисунок 10 – Профиль тушения ФЛ (А) и график в координатах Штерна-Фольмера (Б) для НКЗ, стабилизированных глутатионом

Далее оценили возможность применения люминесцентных БСА/МПК-НКЗ в качестве люминесцентного сенсора для определения концентраций противоопухолевого препарата ДОКС. Спектры ФЛ БСА/МПК-НКЗ после тушения ДОКС представлен на рисунке 11 (А) и спектры ДОКС в концентрациях 0-40 мкМ на рисунке 11 (Б).

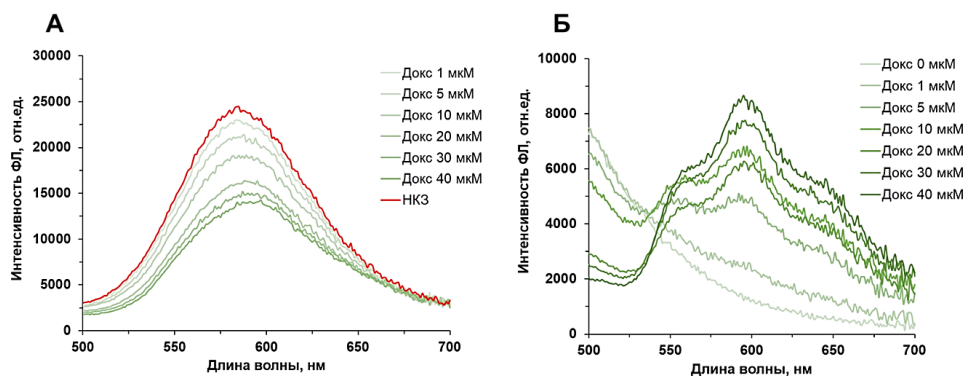


Рисунок 11 – Спектры ФЛ БСА/МПК-НКЗ после тушения ДОКС (А) и спектры ДОКС с водой (Б)

Для оценки эффективности тушения был построен профиль тушения ФЛ (рисунок 12 (А)) и график в координатах Штерна-Фольмера (рисунок 12 (В)). Как видно, при использовании концентрации 40 мкМ достигается уменьшения ФЛ НКЗ примерно на 40%. Дальнейшее увеличение концентрации ДОКС не приводит к большему уменьшению люминесцентного сигнала, что вероятно связано со стерическими трудностями. На графике Штерна-Фольмера наблюдается линейная зависимость, что может являться доказательством протекания тушения по статическому механизму, который предполагает образование нелюминесцентного комплекса НКЗ и тушителя.

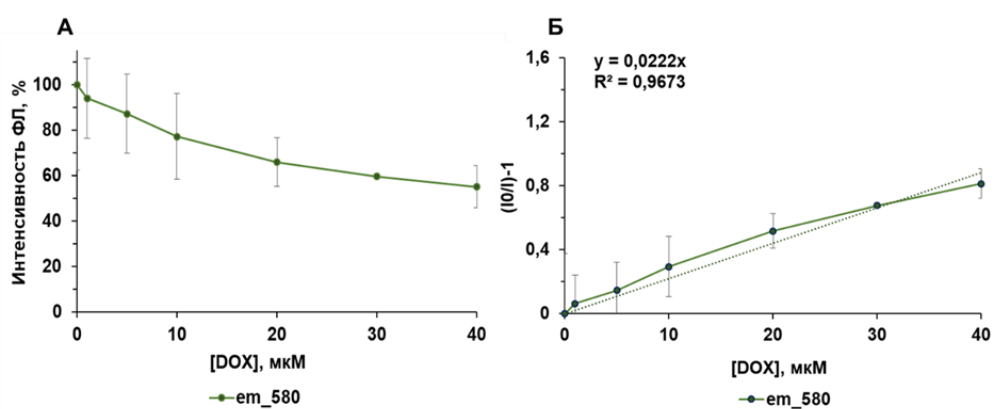


Рисунок 12 – Профиль тушения ФЛ (А) и график в координатах Штерна-Фольмера (В) для БСА/МПК-НКЗ

Для определения констант связывания противоопухолевого препарата ДОКС с поверхностью исследуемых БСА/МПК-НКЗ был построен график в логарифмических координатах (рисунок 13). Значение, полученное по наклону, равно 1,20, что соответствует данным для DOX-БСА [15]. Константа связывания НКЗ с DOX составляет  $8,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , что соответствует сообщенным константам связывания DOX с альбуминами [15].

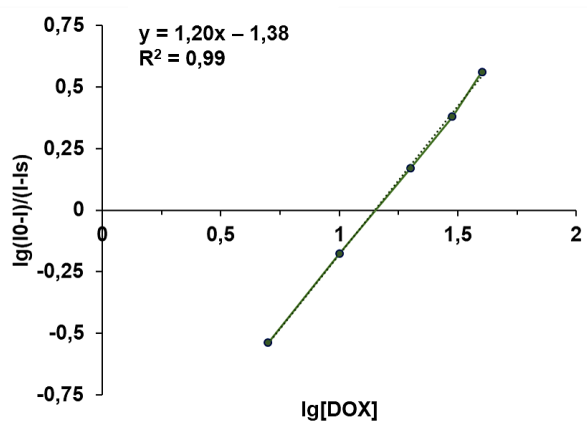


Рисунок 13 – График в логарифмических координатах для определения констант связывания ДОКС с поверхностью исследуемых БСА/МПК-НКЗ

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезированы нанокластеры золота, стабилизированные глутатионом. Образцы имеют максимум ФЛ в области 610 нм, квантовый выход составил  $(11 \pm 2)$  %. Методами гель-электрофореза и ПЭМ изучили морфологические свойства образца. Показано, что люминесцентный продукт представляет собой идентичные структуры, размер полученных структур составил  $\approx 2$  нм. Нанокластеры золота, стабилизированные глутатионом, оказались не пригодны в качестве люминесцентного сенсора для определения концентрации противоопухолевого препарата доксорубицина.
2. Синтезированы нанокластеры золота с использованием МПК и БСА. Образцы имеют максимум ФЛ в области 580 нм, квантовый выход составил  $\approx 3-5$  %. С помощью ПЭМ показано, что размер полученного образца составил  $\approx 2$  нм. Оптимальным методом очистки для данных НКЗ является центробежное концентрирование. Квантовый выход образца НКЗ после очистки составил  $(3,6 \pm 0,2)$  %. Показано, что люминесценция синтезированных БСА/МПК-НКЗ стабильна в фосфатно-цитратном буфере, растворе тетрабората натрия и карбонатном буфере.
3. Нанокластеры золота, синтезированные с МПК и БСА, продемонстрировали потенциальную применимость для определения доксорубицина в диапазоне концентраций 0-40 мкМ в водном растворе. Константа связывания НКЗ с

ДОКС составляет  $8,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , что соответствует известным константам связывания ДОКС с альбуминами.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zheng Y. et al. Gold nanoclusters for theranostic applications //Coordination Chemistry Reviews. – 2021. – Т. 431. – С. 213689.
2. Cui H. et al. Development of gold nanoclusters: From preparation to applications in the field of biomedicine //Journal of Materials Chemistry C. – 2020. – Т. 8. – №. 41. – С. 14312-14333.
3. Pan Y. et al. Cancer cell specific fluorescent methionine protected gold nanoclusters for in-vitro cell imaging studies //Talanta. – 2018. – Т. 188. – С. 259-265.
4. Chen C. T. et al. Glutathione-bound gold nanoclusters for selective-binding and detection of glutathione S-transferase-fusion proteins from cell lysates //Chemical communications. – 2009. – №. 48. – С. 7515-7517.
5. Xiao L. et al. Dihydrolipoic acid–gold nanoclusters regulate microglial polarization and have the potential to alter neurogenesis //Nano letters. – 2019. – Т. 20. – №. 1. – С. 478-495.
6. Deng H. H. et al. Water-soluble gold nanoclusters prepared by protein-ligand interaction as fluorescent probe for real-time assay of pyrophosphatase activity //Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – Т. 83. – С. 1-8.
7. Chang T. K. et al. Metabolic mechanism investigation of antibacterial active cysteine-conjugated gold nanoclusters in Escherichia coli //ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2019. – Т. 7. – №. 18. – С. 15479-15486.
8. Khlebtsov B. et al. Multifunctional Au nanoclusters for targeted bioimaging and enhanced photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus //Rsc Advances. – 2015. – Т. 5. – №. 76. – С. 61639-61649.
9. Yu Y. et al. Precursor engineering and controlled conversion for the synthesis of monodisperse thiolate-protected metal nanoclusters //Nanoscale. – 2013. – Т. 5. – №. 11. – С. 4606-4620.

10. Sokołowska K. et al. Towards controlled synthesis of water-soluble gold nanoclusters: synthesis and analysis //The Journal of Physical Chemistry C. – 2019. – T. 123. – №. 4. – C. 2602-2612.
11. Qu X. et al. Fluorescent gold nanoclusters: synthesis and recent biological application //Journal of Nanomaterials. – 2015. – T. 2015. – C. 4-4.
12. Wertheim G. K., DiCenzo S. B., Buchanan D. N. E. Noble-and transition-metal clusters: The d bands of silver and palladium //Physical Review B. – 1986. – T. 33. – №. 8. – C. 5384.
13. Wu Z., Jin R. On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters //Nano letters. – 2010. – T. 10. – №. 7. – C. 2568-2573.
14. Huang K. Y. et al. Gold Nanocluster-Based Fluorometric Banoxantrone Assay Enabled by Photoinduced Electron Transfer //Nanomaterials. – 2022. – T. 12. – №. 11. – C. 1861.
15. Agudelo, Daniel et al. Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins. – 2012.