

Doktori (Ph.D.) értekezés



Fluoreszcens sajátssággal bíró funkcionális arany nanoklaszterek

Gombár Gyöngyi

Témavezető:

Juhászné Dr. Csapó Edit
egyetemi adjunktus

Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar
Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. A nanoszerkezetű anyagok és az Au NPs általános jellemzése.....	7
2.2. Fluoreszcens nemesfém NCs.....	10
2.2.1. A NCs szerkezeti és optikai tulajdonságai.....	10
2.2.2. A NCs előállítási lehetőségei.....	14
2.2.3. A NCs alkalmazási területei.....	18
2.3. Az antioxidáns kapacitás mérésére leggyakrabban alkalmazott módszerek elvi alapjai.....	22
2.3.1. Hidrogénatom átvitelén alapuló, antioxidáns kapacitást mérő ORAC eljárás.....	25
2.3.2. Elektronátmenettel kapcsolatos, antioxidáns kapacitást mérő TEAC eljárás.....	26
2.4. Az Au NCs előállításához felhasznált kismolekulák általános jellemzése.....	27
2.4.1. B-vitamin család.....	27
2.4.2. Hidroxámsavak.....	29
3. Célkitűzés.....	31
4. Felhasznált vegyszerek, szintézisek és vizsgálati módszerek.....	33
4.1. Felhasznált vegyszerek.....	33
4.1.1. Szintézisekhez közvetlenül felhasznált anyagok.....	33
4.1.2. Antioxidáns, szenzorikai és biológiai kölcsönhatás vizsgálatokhoz felhasznált anyagok.....	33
4.2. Szintézismódszerek.....	35
4.2.1. A hisztidinhidroxámsav (HisHA) és a triptofánhidroxámsav (TrpHA) előállítása.....	35
4.2.2. B ₁ -vitaminnal stabilizált Au NCs (B ₁ -Au NCs) előállítási folyamata.....	35
4.2.3. Nikotinamiddal stabilizált Au NCs (NAM-Au NCs) előállítási folyamata.....	36
4.2.4. Hisztidinhidroxámsavval stabilizált Au NCs (HisHA-Au NCs) előállítási folyamata.....	37
4.2.5. Triptofánhidroxámsavval stabilizált Au NCs (TrpHA-Au NCs) előállítási folyamata.....	37
4.3. Vizsgálati módszerek.....	38
4.3.1. Optikai sajátosságok jellemzésére alkalmazott műszerek.....	38
4.3.2. A NCs karakterizálásához alkalmazott vizsgálati módszerek.....	40
4.3.3. Fehérje-NCs kölcsönhatások kvantitatív jellemzéséhez alkalmazott műszerek.....	42
4.3.4. Antioxidáns vizsgálatok kivitelezése.....	43
4.3.5. A HisHA-Au NCs és TrpHA-Au NCs szenzorikai méréseinek kísérleti paraméterei.....	45
5. Eredmények és értékelésük.....	46
5.1. A B₁-Au NCs és NAM-Au NCs előállítási folyamata vizes közegben.....	46
5.2. A NAM-Au NCs és B₁-Au NCs optikai és szerkezeti jellemzése.....	51
5.3. A NAM-Au NCs és B₁-Au NCs antioxidáns hatásának vizsgálata.....	58
5.3.1. ORAC vizsgálatok.....	58
5.3.2. TEAC vizsgálatok.....	61

5.4. A NAM-Au NCs és a B₁-Au NCs szérumfehérjével való kölcsönhatásának vizsgálata.....	62
5.4.1. SPR mérések kivitelezése és az eredmények értelmezése	62
5.4.2. ITC mérések kivitelezése és az eredmények értelmezése	64
5.5. A HisHA-Au NCs előállítási folyamata.....	67
5.6. A HisHA-Au NCs optikai és szerkezeti jellemzése.....	70
5.7. A HisHA-Au NCs szenzorikai vizsgálata.....	72
5.7.1. A PL kioltási mechanizmus értelmezése a Cu ²⁺ -ionok esetében	74
5.7.2. A PL erősítési mechanizmus értelmezése a diamágnese Zn ²⁺ -ion esetében	77
5.8. A TrpHA-Au NCs előállítási folyamata	79
5.9. A TrpHA-Au NCs optikai és szerkezeti jellemzése	82
5.10. A TrpHA-Au NCs szenzorikai vizsgálata	85
5.10.1. A TrpHA-Au NCs és a Cu ²⁺ -ionok PL kioltási folyamatának javasolt mechanizmusa	86
5.10.2 A TrpHA-Au NCs és a Fe ³⁺ -ionok PL kioltási folyamatának javasolt mechanizmusa	89
6. Összefoglalás.....	92
7. Summary.....	95
8. Irodalomjegyzék.....	98
Köszönetnyilvánítás	107
Publikációs lista.....	108

Rövidítések jegyzéke

AIE	aggregáció-indukált emisszió
[Au(I)_xHis_{x+1}]⁺	helikálisan rendeződő polinukleáris komplex
Au NCs	arany nanoklaszterek
Au NPs	arany nanorészecskék
Au NRs	arany nanorudak
ATP	adenozin-trifoszfát
B₁-Au NCs	B ₁ -vitaminnal stabilizált arany nanoklaszterek
BSA	(bovin serum albumin) marha szérum albumin
CL	kemilumineszcencia
CP	(coordination polymer) koordinációs polimer
Cys	<i>L</i> -cisztein
DLS	dinamikus fényszórás
DNS	dezoxiribonukleinsav
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
ET	elektronátmenet
FRAP	vasredukáló képességen alapuló módszer
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
GSH	glutation
HA	hidroxámsav
HAT	hidrogénatom átmenet
His	<i>L</i> -hisztidin
HisHA	hisztidinhidroxámsav
HisHA-Au NCs	hisztidinhidroxámsavval stabilizált arany nanoklaszterek
HOMO	legnagyobb energiájú betöltött molekulapálya
HPS	hexafenilxilol
HRTEM	nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkóp
ICP-MS	induktívan csatolt plazma-tömegspektrometria
ITC	izoterm titrációs kalorimetria
LMCT	ligandum-fém töltéstranszfer
LMMCT	ligandum-fém-fém töltéstranszfer
LSPR	lokalizált felületi plazmon rezonancia
LOD	legkisebb kimutatható mennyiség (kimutatási határ)
LUMO	legkisebb energiájú be nem töltött molekulapálya
Lyz	lizozim (fehérje)
Met	<i>L</i> -metionin
Mtsai	munkatársai
MWCO	(molecular weight cut off) membrán szűrő vágási értéke

Na-citrát	trinátrium-citrát dihidrát
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NAM	nikotinamid
MQ-víz	ultratiszta Milli-Q víz
NAM-Au NCs	nikotinamiddal stabilizált arany nanoklaszterek
NC	nanoklaszter
NCs	(nanoclusters) nanoklaszterek
NIR	közeli infravörös tartomány
NMR	mágneses magrezonancia (spektroszkópia)
NP	nanorészecske
NPs	(nanoparticles) nanorészecskék
ORAC	oxigényökök abszorpciók (elnyelő) kapacitás
PBS	foszfát pufferes sóoldat (pH = 7,4; 0,9 % (NaCl))
Phe	<i>L</i> -fenilalanin
pKa	proton disszociációs állandó tízes alapú negatív logaritmus
PL	fluoreszcencia
Pro	<i>L</i> -prolin
QY%	kvantumhasznosítási tényező
RIU	szenzorjel törésmutató egység
RIR	intramolekuláris forgások
ROS	reaktív oxigén-intermedierek
SPR	felületi plazmon rezonancia
SWAXS	kisszögű röntgenszórásos technika
TCSPC	időkorrelált egy-foton számlálás
TEAC/ABTS	troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
TOABr	tetraoktil-ammónium-bromid
TPC	összes polifenol meghatározása Folin-Ciocalteu reagenssel
TRAP	összes peroxilgyök befogására vonatkozó paraméter
Trp	<i>L</i> -triptofán
TrpHA	triptofánhidroxámsav
TrpHA-Au NCs	triptofánhidroxámsavval stabilizált arany nanoklaszterek
Tyr	<i>L</i> -tirozin
UV-Vis	ultraibolya-látható (spektrum/spektrofotometria)
XPS	röntgenfotoelektron spektroszkópia
XRD	röntgendiffrakció
3D	3 dimenziós

1. Bevezetés

Új összetételű, innovatív sajátságokat mutató nanoszerkezetű anyagok előállítása és szerkezetvizsgálata a modern nanotechnológia és a kolloidkémia egyik legintenzívebben fejlődő területe. A fejlesztések kulcsfontosságú alapelemei a nanorészecskék (NPs)¹ és nanostrukturált rendszerek, illetve a molekuláris sajátságot mutató nanoklaszterek (NCs, szub-nanométeres részecskék). Az elmúlt évtizedben az utóbb említett, mindösszesen néhány vagy néhány tíz atomból felépülő nemesfém (különösen az arany (Au)) NCs egyedi optikai és szerkezeti tulajdonságaiknak köszönhetően a természettudományos kutatások középpontjába kerültek. Optikai tulajdonságaik jelentősen eltérnek a klasszikus nemesfém kolloidokétól, ugyanis az Au NPs méretének csökkentésével a folytonos vezetési sávok diszkrét energiaszintekre hasadnak fel, ezért a lokalizált felületi plazmon rezonancia (LSPR) sajátság helyett egy új optikai tulajdonság, a fluoreszcencia (PL) válik elérhetővé ezen szub-nanométeres mérettartományú NCs kialakításával. A NCs fotolumineszcens tulajdonságait legfőképpen a klasztert alkotó atomok száma határozza meg, valamint a klaszter felületéhez kötött (bio)molekulák, hiszen a ligandum-fém és ligandum-fém-fém közötti töltésátviteli folyamatok fontos szerepet játszanak a fluoreszcencia kialakulásában és hangolásában. Ezen meghatározó tényezők mellett a klasztert alkotó fém oxidációs állapota, az elektronban gazdag, eltérő donorcsoportok jelenléte a fémmag felületén, a pH, hőmérséklet, de az oldószer is befolyásolja a detektálható optikai tulajdonságokat. Napjainkban egyre dominánsabb szerep jut ezen szub-nanométeres nemesfém NCs-nek számos alkalmazásterületen, mint pl. a (bio)katalízis, az elektronika, vagy orvosi biológiai területek mivel kiemelkedő biokompatibilitással, alacsony citotoxicitással, magas fotostabilitással rendelkeznek, ill. könnyen funkcionálizálhatók eltérő donorcsoportot tartalmazó, funkcionális biomolekulákkal. Orvosi biológiai vonatkozásban egyre meghatározóbbá válik változatos funkcióval rendelkező nanostrukturák tervezése és fejlesztése, melyek „zöldkémiai” eljárással állíthatók elő, ezáltal csökkentve az anyagfelhasználást, elkerülve a szerves oldószerek, erős redukálószeres és egyéb toxikus reagensek felhasználását.

Doktori értekezésemben elsőként számoltunk be B-vitamin származékokkal stabilizált, emellett antioxidáns tulajdonsággal rendelkező Au NCs előállítási lehetőségeiről és javaslatot tettünk újonnan szintetizált, aminosavak hidroxámsav származékaival felületmódosított, intenzív kék emisszióval rendelkező NCs szenzorikai alkalmazására.

¹ A NPs és NCs rövidítéseket a megfelelő kifejezések (nanoparticles/NPs, nanoclusters/NCs) angol elnevezései alapján használom az értekezésben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A nanoszerkezetű anyagok és az Au NPs általános jellemzése

Napjainkban a nanoszerkezetű anyagok, széleskörű alkalmazási lehetőségeik miatt, egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Az ipar számos területén, valamint az orvostudományban is domináns szerepet játszanak, de meghatározó ezen nanoszerkezetű anyagok ismerete és jellemzése a környezetvédelem és a mezőgazdaság szempontjából is, mivel kapcsolatba kerülhetnek az élő szervezetekkel [1].

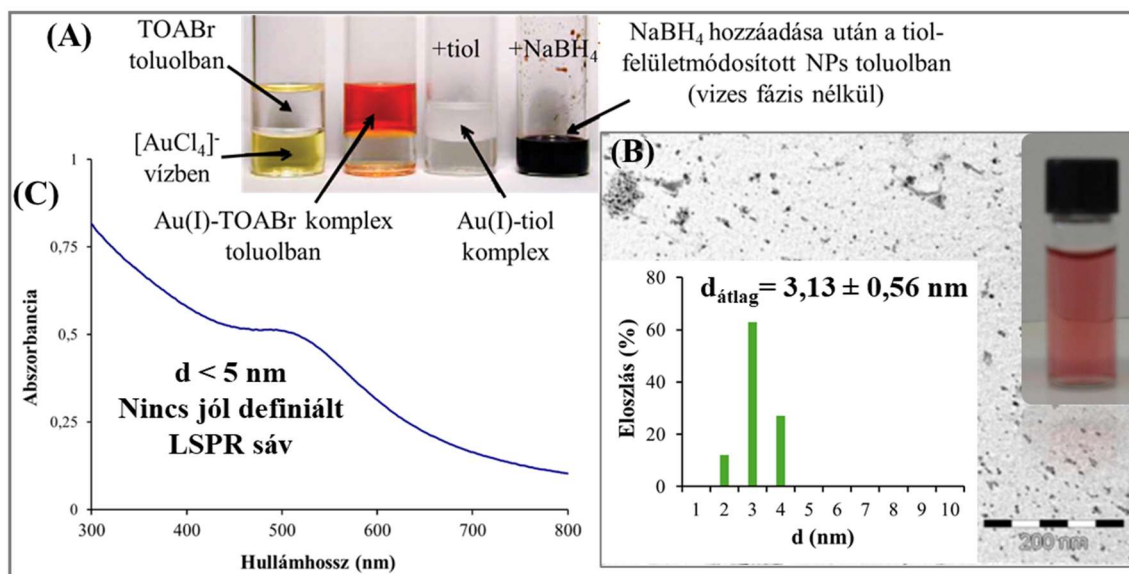
A nanoszerkezeteket többféle szempont alapján csoportosíthatjuk, pl. dimenzió, eredet, összetétel, méret, alak vagy anyagi minőség [2]. *Anyagi minőség alapján* négy csoportot különböztetünk meg. A szén-alapú nanoszerkezetek csoportjába tartoznak a szén nanocsövek, fullerének vagy éppen a grafén. A szervetlen-alapú nanostruktúrák meghatározó képviselői többek között a fémek, fém-oxidok, mint pl. az arany, ezüst, a titán-dioxid, a cink-oxid *stb.* A harmadik csoportot a szerves-alapú nanostruktúrák alkotják (pl. a dendrimerek, liposzómák, polimerek, micellák). Kiemelkedő csoportot képviselnek az összetett rendszerek is, amelyeket „hibrid” vagy „kompozit” rendszereknek nevezünk, melyek az említett szén-, fém- és szerves-alapú nanoszerkezetek eltérő kombinációiból állnak [3]. *Méretük alapján* a nanoszerkezetű anyagok elnevezésében megkülönböztetünk kolloid részecskéket (1–500 nm), nanorészecskéket (NPs-et), amelyek mérete (legalább 1 dimenzióban) az 1–100 nm közé esik ill. nanoklasztereket (NCs-et), ahol az átmérő (d) értékére < 2 nm határozható meg [4]. Kutatómunkám a szervetlen-alapú (fém-tartalmú) háromdimenziós (3D) nanoszerkezetű anyagokra összpontosít, különös a legkisebb méretű nemesfém-alapú NCs-re.

A nemesfém NPs, mint a réz (Cu), Au, ezüst (Ag) NPs új tulajdonságokkal rendelkeznek, nevezetesen a tömbfázishoz képesti jelentős méretcsökkenés hatására egyedi optikai, elektromos és mágneses tulajdonságok válnak elérhetővé [5]. A méretükből és alakjukból származó előnyös tulajdonságok közé tartozik a nagy fajlagos felület, a kémiai inertség, a biokompatibilitás és az alacsony toxicitás. A nemesfém részecskék tulajdonságai nagymértékben függenek a szintézisük során a redukáló-, stabilizáló-, vagy felületmódosító ágensként használt biomolekulák, tenzidek vagy makromolekulák (polimerek vagy polielektrolitok) minőségétől [6]. Mindezek mellett plazmonikus tulajdonságuk egyedülálló más fém-alapú részecskékhez képest, mely a LSPR jelenségből ered. Az említett jelenség során, ha az Au NPs intenzív kölcsönhatásba lépnek a látható fény fotonjaival, akkor a részecskéket alkotó atomok vezetési elektronjainak kollektív oszcillációja következik be. Ez

az oszcilláció rezonánssá válik, amikor a besugárzó fény elektromágneses terének frekvenciája megegyezik vele [7]. Az ilyen módon észlelhető LSPR spektrumok, amelyek egy abszorpciós és egy szórási komponensre oszthatók, hasznos információt nyújtanak nemcsak a nemesfém NPs összetételéről, hanem méretükről és alakjukról is. A gömbi morfológiájú Au NPs jellegzetes plazmon sávja a $\lambda_{\max} = 500\text{--}550$ nm tartományon detektálható, míg az Au/Ag ötvözet NPs esetében a plazmon módus $\lambda_{\max} = 390\text{--}550$ nm között hangolható, főként az összetétellel [8]. Az anizometrikus részecskék esetén, mint az arany nanorudak (Au NRs), szerkezetükből adódóan transzverzális és longitudinális rezgések is előfordulnak, amelynek eredményeként két csúcs jelenik meg az abszorbancia spektrumban [9].

Számos fizikai [10] és kémiai [11] módszer ismert Au és Ag NPs előállítására mind vizes, mind szerves közegben. A legáltalánosabban alkalmazott eljárás a gömbi arany NPs előállítására az 1951-ben J. Turkevich által kidolgozott szintézis vizes közegben [12], valamint a Brust és mtsai. által 1994-ben publikált előállítási folyamat [13], ahol már organikus közegben (toluolban) igazolták tiol-tartalmú ligandumokkal felületmódosított, viszonylag kis méreterű ($d \sim 2\text{--}5$ nm) Au NPs előállíthatóságát. A két módszer esetében a kiindulási prekursor fémsó a hidrogén-terakloro-aurát (HAuCl_4). Redukáló- és stabilizálószerként a Turkevich-féle módszerben trinátrium-citrát molekulát használnak, ahol a gömb alakú arany kolloidok mérete ($d = 10\text{--}100$ nm) a trinátrium-citrát és az aurát-ionok arányával szabályozható [14]. A Brust-szintézis során a prekursor fémsót vízben oldják fel, majd intenzíven kevertetik egy felületaktív molekula toluolos oldatával 10–15 percig. Általában tetraoktil-ammónium-bromidot (TOABr) használnak, amely fázistranszferáló ágensként funkcionál, vagyis a feladata a nevezett fémion átjuttatása a vizes fázisból a szerves fázisba. A szerves fázisban felhalmozódó arany(I)–TOABr komplexhez nátrium-borohidrid redukálószer adnak, majd a reakcióelegyet 3 órán keresztül szobahőmérsékleten intenzíven kevertetik (**1.A. ábra**). A szintézis eredményeképpen a szerves fázisban lokalizálódó viszonylag kicsi, kb. $d = 2\text{--}5$ nm átmérőjű Au NPs jönnek létre (**1.B. ábra**), amelyeket a szintézishez használt megfelelő alkil- vagy ariltiollal funkcionalizálnak. A funkcionalizáló molekula toluolos oldatát a redukálószer hozzáadása előtt adják hozzá a reakcióelegyhez. Ebben a módszerben a kialakított Au kolloid részecskék felületi funkcionálizálása is megtörténik és a tiolcsoporttal rendelkező ligandumok Au-S kovalens kötésekkel keresztül kötődnek az Au felületéhez [15]. Az **1.C. ábrán** látható, hogy a méret csökkenésével már a detektált LSPR sáv csak egy vállként jelenik meg és nem olyan karakterisztikus, mint a nagyobb 10–20 nm átlagos átmérővel rendelkező Au kolloidok

esetén. Az alkalmazott redukáló- és stabilizálószer anyagi minősége és mennyisége, valamint a szintézisek kísérleti körülményei (pl. hőmérséklet, oldószer, reakcióidő *stb.*) határozzák meg a különféle szintézisekkel előállított NPs alaki és méretbeli tulajdonságait.



1. ábra: (A) A Brust-szintézissel előállított, néhány nm-es átlag átmérővel rendelkező hexántiollal-funkcionalizált Au NPs előállítási folyamata. (B) a NPs-ről készített reprezentatív TEM felvétel a méreteloszlással és a (C) diszperzió abszorbanancia spektrumával.²

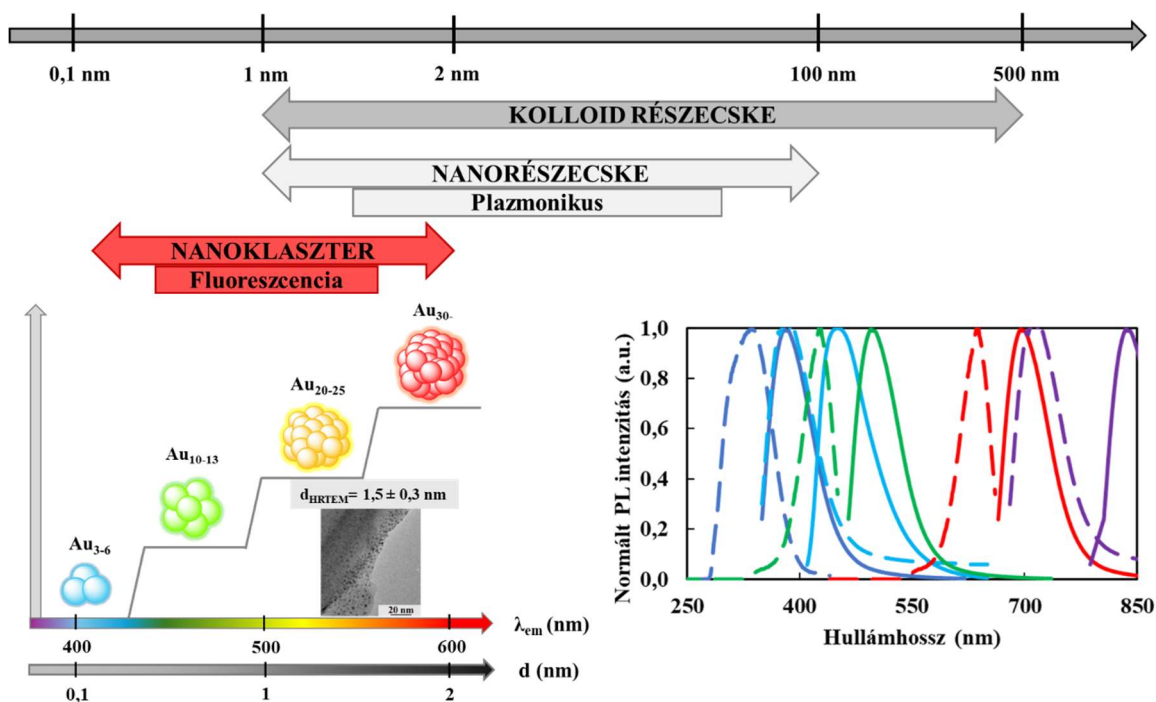
Érdekességgként említem meg, hogy döntően 1996-1999 időszakban ezen ~10 nm-es vagy annál kisebb méretű, főként tiol-tartalmú ligandumokkal funkcionalizált NPs-et tekintették NCs-nek, de a jelenleg elfogadott definíció szerint ezek nem azonosíthatók teljes mértékben NCs-nek [16]. A NCs-kel kapcsolatos kutatási eredmények publikálása a szakirodalomban a 2000-es évektől kezdődően kezdett intenzíven növekedni. Mivel dolgozatomban kizárólag a NCs „zöldkémiai” úton megvalósuló előállítására, szerkezetvizsgálatára és felhasználási lehetőségeire összpontosít, ezért a következő alfejezetekben ismertetem ezen NCs, különösen az Au NCs, szerkezeti és optikai tulajdonságait, majd bemutatom az irodalomban található előállítási protokollokat és főbb alkalmazási lehetőségeiket.

² A Kutatócsoport vezetője, Dr. Csapó Edit által előállított NPs, és azok jellemzése, mely adatok tudományos publikációban nem jelentek meg.

2.2. Fluoreszcens nemesfém NCs

2.2.1. A NCs szerkezeti és optikai tulajdonságai

A nemesfém nanoszerkezeteket, ahogyan fentebb említettem, két nagyobb csoportra oszthatjuk fel (NPs és NCs) az őket felépítő atomok száma, mérete és optikai sajátságaik alapján. Az előző fejezetben ismertetett klasszikus Au NPs méretét csökkentve a folytonos vezetési sávok diszkrét energiaszintekre hasadnak fel, így az LSPR jelenség már nem detektálható, ellenben ezen szub-nanométeres mérettartományú NCs kialakításával a fluoreszcencia válik meghatározóvá. Míg a nemesfém NPs esetében a LSPR sáv a részecskék méretével, alakjával és összetételével hangolható, addig a nemesfém NCs esetében a fotolumineszcencia is szabályozható [17]. Nevezetesen, a NCs-et alkotó aranyatomok számának növekedésével az Au NCs jellegzetes emissziója az UV-tartományból a látható fény tartományába „eltolható” [17] (**2. ábra**).



2. ábra: A nanoszerkezetek méretbeli osztályozása, kiemelve a kolloid részecskék, a NPs és a NCs mérettartományát (felül) és az Au NCs átlagos méretének (ami arányos az őket alkotó atomok számával) és karakterisztikus emissziós sajátsága közötti kapcsolat sematikus megjelenítése (a klasztert alkotó Au atomok száma az ábrán csak reprezentatív céllal szerepel, egy fém klasztermagot felépítő Au atomok száma a mágikus számokat követi [18]).

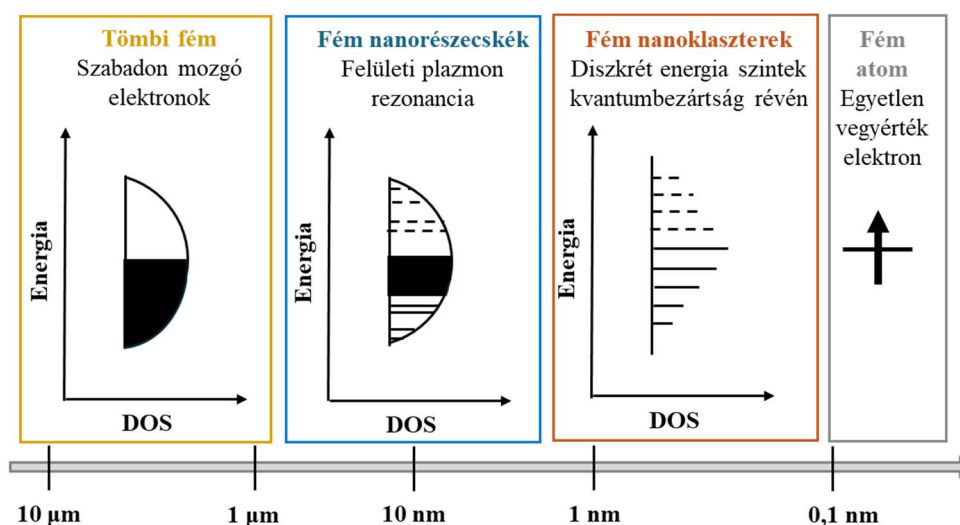
Az emissziós sáv megjelenése többnyire a klaszterekben lévő fématomok számától olyan módon függ, hogy azon Au NCs, amelyek csak néhány atomból állnak (pl. 3–6),

intenzív kék ($\lambda_{em} = 440\text{--}480\text{ nm}$) emissziót mutatnak, míg a 10–13 atomból állók zöld ($\lambda_{em} = 490\text{--}510\text{ nm}$) emisszióval rendelkeznek. A 20–25 atom esetén sárga-narancssárga ($\lambda_{em} = 520\text{--}620\text{ nm}$) tartományon jelennek meg az emissziós csúcsok [19][20]. Nagyobb méret esetén a vörös emisszió ($\lambda_{em} = 630\text{--}700\text{ nm}$) a meghatározó, de akár a közeli infravörös tartományon [21] is detektálható a karakterisztikus emissziós maximum. Ez utóbbira lehet példa Liu és mtsai. munkája, akik glutationnal stabilizált Au NCs (GSH-Au NCs) előállításával foglalkoztak, és a szintetizált NCs fluoreszcenciáját $\lambda_{em} = 600\text{ nm}$ -ről $\lambda_{em} = 810\text{ nm}$ -re hangolták a klaszter felületen lévő Au^+ -GSH motívumok változtatásával. A tiol-tartalmú ligandumokkal felületmódosított NCs esetén gyakori a felületen a $-(\text{S}-\text{Au}^+-\text{S})-$ motívumok kialakulása és ezen rendszerek hatalmas irodalommal rendelkeznek [20][22][23]. Mivel értekezésemben ezt a területet nem érintem, így részletesen erről nem is írok. Pontosan megmondani, hogy maximálisan hány Au atom alkothat egy NC-t, és hány esetében alakul már ki a plazmonikus NP egyértelműen megmondani nem lehet, hiszen korábban említettem, hogy nemcsak a fémmagot alkotó atomok száma, hanem más tényezők is befolyásolják a karakterisztikus optikai sajátságok (fluoreszcencia vagy plazmonikus jelleg) kialakulását. Találhatunk az irodalomban olyan közleményt, ahol igazolták, hogy ha az Au NCs-ben az Au atomok száma eléri az 55 atomot és a klasztert trifenilfoszfin (PPh_3) ligandumok stabilizálják ($\text{Au}_{55}(\text{PPh}_3)_{12}\text{Cl}_6$) akkor ezen nanoszerkezet már nem rendelkezik fluoreszcens tulajdonsággal [24]. Ennek ellenpéldájaként olvashatunk olyan szakirodalmi közleményeket is, – pl. egy 2023-ban a Nature Comm.-ben megjelent közlemény alapján –, mely olyan fluoreszcens Au NC jellemzését mutatja be, ahol a klasztert alkotó fémmag 138 db Au atomot tartalmaz, melyet ariltiol stabilizál [25], de olvashatunk fluoreszcens $\text{Au}_{246}(\text{SR})_{80}$ összetételű rendszerről is (SR: tiolszármazék). A klasztert alkotó Au atomok száma mellett tehát a fémklaszter felületéhez kötött (bio)molekulák és a fémmag (ligandum-fém) közötti töltésátvitel, valamint a (ligandum-fém-fém) töltésátvitel is jelentős szerepet tölt be a fluoreszcencia kialakulásában és hangolásában, ahogyan az fentebb is néhány példa esetén bemutatásra került. Ezen túlmenően, a fém oxidációs állapota (Au^0 vagy Au^+), az oldószer, az ionerősség és hőmérséklet is befolyásolja a fluoreszcens tulajdonságokat.

A nemesfémek közül az arany rendelkezik a legnagyobb szakirodalommal a legváltozatosabb struktúrák tekintetében. Az oktaéderes Au_6 NCs-től kiindulva az egyre nagyobb számú Au atomra épülő szerkezetek egyre összetettebb geometriával rendelkezhetnek. A kisebb szerkezetek periodikusan ismétlődnek és több alap NCs (pl. oktaéderes) kombinálásával nagyobb és bonyolultabb nanoszerkezetek hozhatók létre,

mint pl. az Au₂₅, Au₃₆ és az Au₁₀₂. Ezek a néhány-, illetve néhány 10 atomból felépülő klaszterek átmenetet jelentenek a NPs és a molekulák között [26][27].

Az Au NCs fluoreszcenciájának eredete kétféle megközelítéssel is értelmezhető. Az első vonatkozásában, mely az ún. „*pure metal confinement effect*”³, ha a részecske mérete már olyan kicsi, hogy összemérhetővé válik az arany atom elektronjainak Fermi-energiaszintjéből számolható hullámhosszal (< 1nm), akkor a folytonos vezetési sávok diszkrét energiaszintekre hasadnak fel, mely révén a fluoreszcencia jelenik meg, és így a NCs-re inkább jellemző a molekuláris viselkedés, mintsem a plazmonikus karakter [26] (3. ábra).



3. ábra: A tömbi nemesfém, a nemesfém NPs és a nemesfém NCs energiaszintjeinek vázlatos megjelenítése ([26]-os hivatkozás alapján készített saját ábra).

A megjelenő PL leírható az ún. szabad elektron (Jellium) modellel, mely szerint az emisszió az sp-sp és sp-d átmenetekből származtatható. A másik megközelítés a „*töltésátviteli folyamat*”, mely alapján a PL a fém klaszterek felületén kötődő ligandumok és a fémmag közötti elektrontranszfer folyamatból ered, ahol megkülönböztetünk LMCT (ligandum-fém töltéstranszfer) és LMMCT (ligandum-fém-fém töltéstranszfer) folyamatokat [28]. Sokáig az első elmélet volt elfogadott, de mára ezen két értelmezést együtt értelmezik, mivel mindkettő (mind a fémmagot alkotó atomok száma és azok oxidációs száma és a felületen lévő elektronban gazdag donorcsoportok anyagi minősége és mennyisége) együttesen alakítja a jellegzetes fluoreszcenciát. Az optikai tulajdonságok tekintetében még egy fontos jelenséget érdemes kiemelni, ami a PL fokozása. A

³ Elfogadott magyar elnevezés nincs ezen kifejezésre.

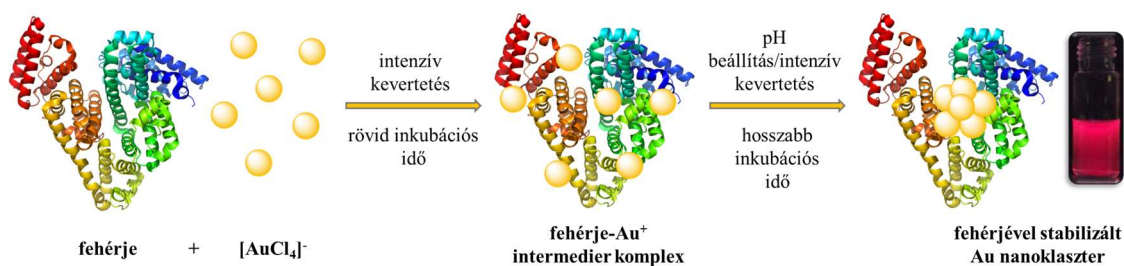
fokozás/erősítés (angolul *enhancement*) azon alapul, hogy a spontán emisszió módosítható. Erre vonatkozóan több lehetőség is adott, mint pl. ötvözet NCs kialakítása egy másik fém NC magba történő beépítésével. Az Au NCs esetén leggyakoribb a klasztert felépítő Au atomok kombinációja ezüsttel, ahol nemcsak erősítés, de gyakorta az emissziós maximum kék eltolódása is bekövetkezik [29]. A jelenség eredete az aranyatomok egy részének ezüstre történő cseréjével magyarázható, amit a Kutatócsoport munkatársai egy 2024-ben megjelent közleményükben is leírtak [30]. Ez az atomcsere megváltoztathatja a HOMO-LUMO energiakülönbséget (a legnagyobb energiájú betöltött molekulapálya (HOMO) és a legkisebb energiájú be nem töltött molekulapálya (LUMO) között). Ebben az esetben az eredeti (Au 6s és 6p molekulapályából álló) LUMO energiaszintje megváltozik az Ag 5s molekulapálya bevezetésével, amely magasabb energiaszintű pálya, mint az Au 6s, ezáltal növeli az energiakülönbséget [29]. A fémmag ilyen változtatása figyelemre méltó változásokat eredményez a NCs optikai tulajdonságaiban, a beépített új elemtől és annak mennyiségétől függően [31].

Másik lehetőség a PL erősítésre az aggregáció által indukált emisszió (AIE), mely egy fotofizikai jelenség, amire úgy tekintenek, hogy a kapcsolódó molekulák/nanoszerkezetű rendszerek fluoreszcenciája aggregációkor jelentősen felerősödik. Az AIE koncepcióját először Tang Ben Zhong kutatócsoportja vetette fel 2001-ben [32]. A jelenség értelmezéséhez először néhány fogalmat szeretnék bevezetni. Az emittáló kromofórokat „luminofóroknak” nevezik, a molekulaként nem emittáló, de megfelelő körülmények között pl.: aggregátumként emittáló kromofórokat pedig „luminogéneknek” nevezik. Innen származik az „AIEgens” elnevezés, ami az AIE tulajdonságokat mutató luminogéneket jelenti. Az AIE folyamat során az emisszióval nem rendelkező luminogének aggregáció révén emissziót mutatnak [33]. Tipikus „AIEgens” a hexafenilxilol (HPS), ami szerves oldószerben oldva nem mutat PL-t, viszont vizes közegben aggregációja által PL erősítés figyelhető meg, ami az intramolekuláris forgások (RIR) korlátozásán alapul. Mivel nem síkbeli, hanem propeller alakú molekuláról van szó, így tehát egy molekulaszervezetbeli különbséggel magyarázható a PL erősítés megfigyelése [34]. Az oldószer változtatásán kívül az AIE jelenséget számos tényező kiválthatja, mint pl. a pH, hőmérséklet változtatása, valamint egy reagens (pl.: biomolekula, ion) rendszerhez történő hozzáadása. A fluoreszcencia erősítés jelentős fejlesztési lehetőséget kínál számos fluoreszcencia-alapú orvosbiológiai alkalmazásban is [35].

2.2.2. A NCs előállítási lehetőségei

Az Au NCs-ekel kapcsolatos első jelentős összefoglalót Nienhaus és mtsai. tették közzé 2011-ben [36], amelyben a méretbeli és szerkezeti jellemzők mellett, azok jellegzetes PL tulajdonságai és előállítási lehetőségeik is említésre kerültek. Jelenleg már számos eljárás ismert a klaszterek előállítására, amelyek két fő kategóriába sorolhatóak [37].

A gyakran alkalmazott *bottom-up* („alulról felfelé”) eljárás során nagyobb nanoszerkezeteket állítanak elő főként ionokból kémiai szintézissel (pl. redukciós folyamatok révén). Az előállított arany nanostruktúrák optikai tulajdonságai célzottan szabályozhatók a prekursor fémion (pl. $[\text{AuCl}_4]^-$ vagy Ag^+) redukciójához használt biomolekulák (pl. fehérjék, oligonukleotidok) anyagi minőségével, illetve a reakciókörülmények tervezett változtatásával. Ezeket a reakciókat a szakirodalom ún. „templátos” eljárásnak nevezi, ahol a redukálószerként használt biomolekula anyagmennyiségét jelentősen megnövelik a redukálandó fémion analitikai koncentrációjához képest [6]. Ezen eljárás során az alkalmazott nagy biomolekula felesleg, a fémionok redukciójának megvalósítása mellett szterikusan gátolja a képződő atomok önszerveződésével kialakuló néhány ill. néhány tíz atomból felépülő fémmagok további növekedését, így a képződő fémmagok mérete kellően kicsi marad. A *bottom-up* eljárások közül a templátos módszer sémáját a **4. ábra** foglalja össze. Példaként a BSA szérumfehérje alkalmazásával kialakítható, vörös emisszióval rendelkező Au NCs általános előállítási sémája látható. A **4. ábrán** bemutatott templátos eljárás alapján a klaszterek képződése egy átmeneti Au(I)-fehérje intermedier komplex kialakulása révén történik.



4. ábra: Templátos eljárással készített, fehérjével stabilizált Au NCs előállításának vázlatos megjelenítése az előállított NCs-et tartalmazó vizes diszperzió UV-lámpa alatt készült fotójával ([38]-as hivatkozás alapján készített saját ábra).

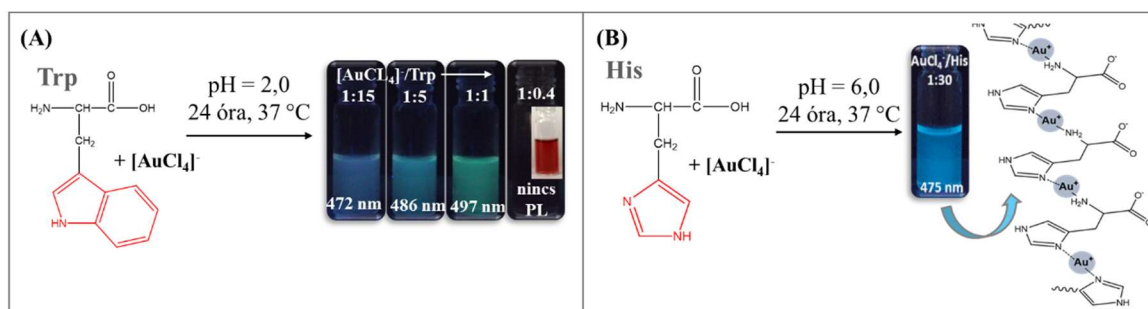
A fehérje-alapú eljárás során elengedhetetlen a NCs kialakulásához a templátként használt biomolekulák feleslege, a 37 °C-os hőmérséklet és a lúgos (pH = 12,0) közeg. Az Au(III)ionok redukciója Au⁰-vá két lépésben valósul meg. Elsőként az Au(III)ionok

Au(I)ionokká történő redukciója történik a fehérje *L*-tirozin (Tyr) és *L*-triptofán (Trp) aminosav egységei révén megvalósuló elektronátadási folyamat révén. A „láncvándorlás” során a képződő Au(I)ionokat a kéntartalmú molekulák koordinálják, majd a további redukciót ($\text{Au(I)} \rightarrow \text{Au}^0$) a közeli aminosavak biztosítják. Az alkalmazott extrém bázikus körülményeknek két fő célja van. Először is elősegíti a Tyr és Trp aminosavak redukciós képességének javítását. Másodszor, hozzájárulnak a fehérjelánc kitekeredéséhez, ami megkönnyíti a részben redukált fémionok „láncvándorlását” a fehérjelánc mentén [38]. Ennek oka az, hogy a fehérje kitekeredett állapotában az egyes aminosavak oldalláncai jobban hozzáférhetők. A kísérleti körülmények, mint pl. a fémion/fehérje moláris vagy tömegaránya, a fémion kezdeti analitikai koncentrációja, a fehérje helyett alkalmazott egyéb ligandum anyagi minősége, valamint a hőmérséklet és a reakcióidő mind domináns hatással vannak a képződő klaszterek szerkezetére és optikai tulajdonságaira.

A fehérjék mellett az arany-ionok közvetlen redukciójára és az Au NCs stabilizálására alkalmasak a növényi kivonatok pl. tealevelek, különféle citrusfélék vagy borsmenta extraktumai [39], de a fehérjéket felépítő egyedi aminosavak [19], peptidek [40] is, valamint a nukleotidok [41] alkalmazhatósága is bizonyított. Az aminosavak a redukálószernek népszerű csoportját alkotják, mivel jelen vannak biológiai rendszerekben. A szakirodalomban és korábban a Kutatócsoportban a korábban említett Tyr és Trp mellett *L*-hisztidin (His), *L*-prolin (Pro), és *L*-metionin (Met) $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionokkal való közvetlen kölcsönhatásának eredményeképpen állítottak elő (3–10 Au atomból felépülő) Au NCs-et, melyek intenzív kék fluoreszcenciával rendelkeznek a Met kivételével, ahol a NCs sárga emissziót mutattak [19]. Az $[\text{AuCl}_4]^-$ /*L*-cisztein kölcsönhatását korábban Bóta Attila és mtsai. is tanulmányozták [42], ahol kisszögű röntgenszórásos technikával (SWAXS) kimutatták az önszerveződő Au(I)-tartalmú lamellás nanohibrid struktúrák kialakulását, melyek a szakirodalomban koordinációs polimerként (CP) ismeretesek. Kutatócsoportunk szintén ezt az eredményt erősítette meg a reprodukív módon előállított Au(I)-tartalmú nanoszerkezetre röntgendiffraktometriás (XRD) mérések alapján, valamint a meglévő eredmények kiegészítéseként igazolták, hogy a lamellás szerkezet savas közegben alakul ki, a pH emelésével egyre kevésbé preferált megjelenése, amit a lényegesen csökkenő PL intenzitás is alátámasztott [43].

Aromás oldalláncú aminosavak, pl. Trp esetében kimutatták, hogy a $\text{Trp}:[\text{AuCl}_4]^-$ /0,4:1 arány beállítása esetén stabil Trp-nal stabilizált Au kolloidok képződhetnek lúgos közegben (pH > 11). Ezzel szemben erősen savas (pH < 2) közegben a Trp moláris arányának szisztematikus növelésével ($\text{Trp}:[\text{AuCl}_4]^-$ /1:1, 5:1, 15:1) zölden

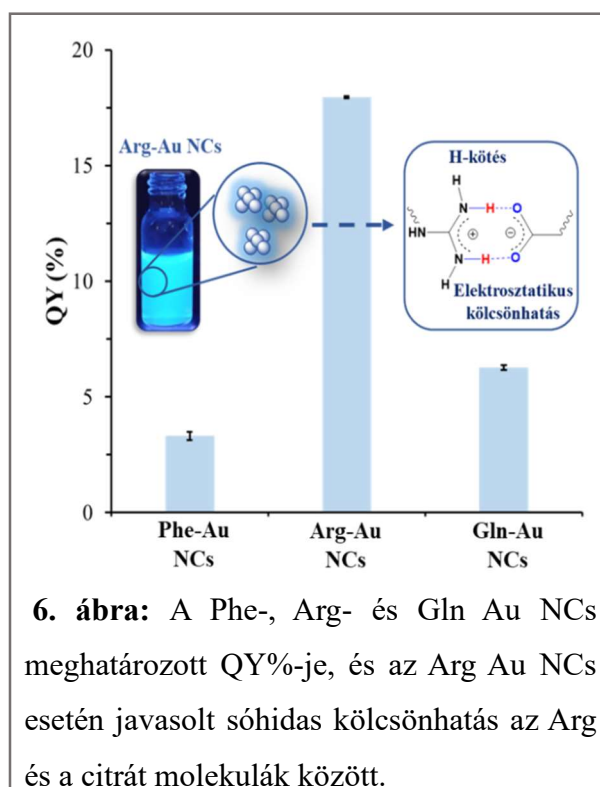
($\lambda_{em} = 497 \text{ nm}$) és kéken ($\lambda_{em} = 486$ és 472 nm) emittáló NCs képződése a preferált folyamat **(5.A. ábra)** [44]. *L*-His esetén a fluoreszcens termék képződése His:[AuCl₄]⁻/30:1 molarány, pH = 6,0 és 24 óra reakcióidő mellett valósítható meg, így az Au(III)ionok +1-es oxidációs állapotig redukálódnak, ami egy helikálisan rendeződő polinukleáris komplex ([Au(I)_xHis_{x+1}]⁺) **(5.B. ábra)** kialakulásához vezet [44]. Hazai viszonylatban Dr. Deák Andrea „Lendület” Szupramolekuláris Kémiai Kutatócsoportja (MTA TTK) foglalkozott Au(I)-tartalmú, főként foszfindonorokkal rendelkező fluoreszcens komplexek tervezésével [45][46], kialakíthatóságuk és szerkezetük meghatározásával és spektroszkópai jellemzésével. Szerkezetüktől függően ezeket a rendszereket gyakran koordinációs polimereknek vagy szupramolekuláris komplexeknek nevezik. Előállításukhoz különböző Au(I)-difoszfin építőelemeket alkalmazva Au-X (X = P, O, N, S) datív és aurofil Au-Au kölcsönhatások segítségével számos különböző szerkezettel rendelkező szupramolekuláris Au(I)komplex állítható elő, melyek egyedi fluoreszcens sajátsággal rendelkeznek.



5. ábra: (A) A His-[AuCl₄]⁻ és (B) a Trp-[AuCl₄]⁻ rendszerekben kialakítható nanoszerkezetek ([Au(I)_xHis_{x+1}]⁺, NPs, NCs) előállítási körülményeinek bemutatása a minták UV-lámpa alatt készült felvételeivel és az emissziós maximumok feltüntetésével [44].

Irodalmi adatokból ismert, hogy ha az aminosavak oldalláncában lévő heteroatomokat-tartalmazó donorcsoportokat elimináljuk, akkor egyre inkább csökken a NCs kialakíthatóságának esélye [19]. A. Amari Sadaghen és mtsai. igazolták, hogy az *L*-fenilalanin (Phe) és [AuCl₄]⁻-ionok kölcsönhatása Au NCs kialakulásához vezet [47]. A reakcióelegy sötétsárga színe jelezte a klaszterek megjelenését, ha a ligandumot kétszeres feleslegben alkalmazták a prekursor fémionok moláris arányához képest, ahol a reakciót gyengén savas (pH = 6,0) kémhatású vizes közegben végezték 4 órán keresztül 60 °C-on [48]. A Kutatócsoport munkatársai is tanulmányozták a Phe, *L*-arginin (Arg), *L*-glutamin (Gln) aurát- és ezüst-ionokkal való kölcsönhatását is [47]. Saját eredményeik nem erősítették meg ezeket a kísérleti tapasztalatokat. A fent említett moláris arányok mellett a termékek

nem mutattak PL intenzitást. A fluoreszcens Au-alapú nanostruktúrák kialakulásához nagyobb aminosav felesleg volt szükséges. A maximális PL intenzitás Phe:[AuCl₄]⁻/20:1 mólarányánál érhető el, illetve a csoport munkatársai igazolták, hogy jelentős hatása van a fémionok analitikai koncentrációjának (*c* = 0,5 mM) is a NCs kialakulása tekintetében, hiszen a nagyobb fémion koncentráció (*c* > 0,5 mM) alkalmazása már a NPs képződését támogatja [47]. Az oldalláncban alifás *N*-tartalmú Arg és Gln már nem alkalmas fluoreszcens Au NCs közvetlen kialakítására. A NCs előállítása érdekében a trinátrium-citrát dihidrát⁴ (Na-citrát), mint további enyhe redukálószer alkalmazási lehetőségét is tanulmányozták. Az Arg-[AuCl₄]⁻ rendszer esetében a Na-citrát használata miatt valószínűsíthető az Au⁰ magok



kialakulása és az elektronban gazdag, protonált guanídium oldallánc ($pK_{\text{guanídium}} = 12,48$) – stabilizálva a NC szerkezetet – sóhidas kölcsönhatásba léphet az Au mag felületén a negatív töltésű Na-citrát molekulákkal, mely kiemelkedő kvantumhasznosítási tényező (QY%) értékkel társítható, jelen rendszer esetén $QY\% = 18\%$ (6. ábra) [47]. Összességében bebizonyosodott, hogy az aminosavak különböző oldalláncú változatai, pl. a tiolcsoportot vagy az aromás gyűrűt magukban foglalók, képesek változatos arany-tartalmú hibrid struktúrák kialakítására.

A templátos eljárás mellett külső besugárzás pl. mikrohullám, ultrahang vagy UV-fény segítségével elősegíthető a fémionok könnyebb és gyorsabb redukciós folyamata, ami szintén klaszterek kialakulásához vezet [49]. A NCs előállítására szolgáló *bottom-up* módszer mellett a *top-down* ún. maratásos (etching) folyamat révén is megvalósítható a NCs-ek előállítása [37], ahol nagyobb nanostruktúrákból (pl. NPs-ből) maratásos eljárással egyre kisebb részecskéket, majd klasztereket állítanak elő. Az etching-alapú szintézisek során általában tioltartalmú ligandumot (pl. *L*-glutathiont, GSH) adagolnak a maratás során, hogy előállítsák a néhány 10 esetleg 100 nm-es mérettel rendelkező koloid részecskéket

⁴ Az értekezésben a trinátrium-citrát dihidrát minden esetben „Na-citrát” elnevezéssel szerepel.

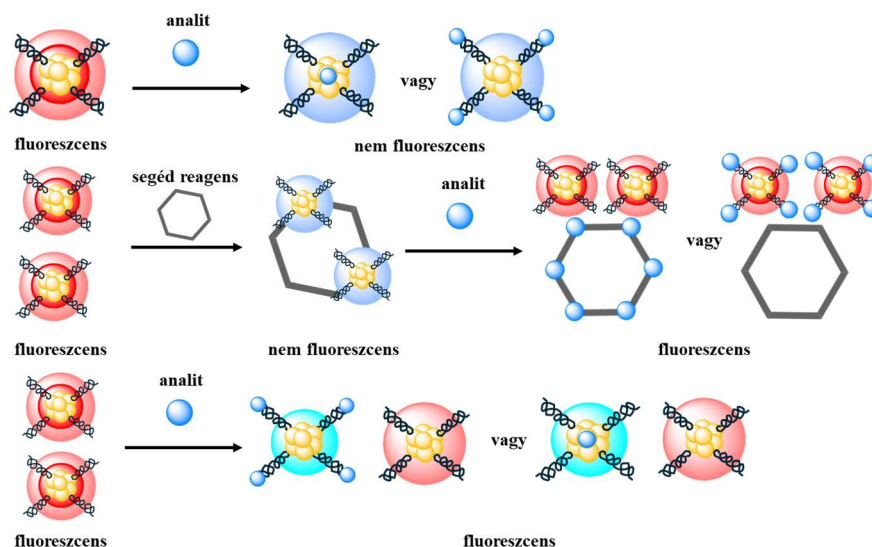
tartalmazó stabil diszperziót. A maratást szonikálás vagy mikrohullámú besugárzással segítik elő. A tiolcsoportot tartalmazó molekula eltávolítja az arany atomokat a nanorészecske felületéről, melyek a reakció előrehaladtával kisebb klaszterekké szerveződnek. Muhammed és mtsai. tanulmányozták a MSA-(merkaptoborostyánkősav) Au NPs-ből történő NCs előállítási folyamatát GSH-nal történő ligandum maratással [50]. Kisebb (4–5 nm-es) NPs-ből kiindulva a pH változtatásával kétféle összetételű, ezáltal eltérő fluoreszcenciával rendelkező NCs is előállíthatók. Nevezetesen, ha a maratási reakciót pH = 3,0 esetén végezték el, akkor Au₂₅ NCs-et tartalmazó diszperzió állítható elő, míg pH = 7,0–8,0 beállítása esetén néhány atomos, Au₈ NCs kialakulása a meghatározó folyamat. A klaszterek kialakulására két lehetséges útvonalat javasoltak. Az elsőben a ligandum-indukált maratás során a GSH felesleg a NPs felületéről arany atomokat távolít el, ami Au(I)-GSH ún. tiolát komplex kialakulásához vezet. Az Au(I)-GSH komplexben kialakuló Au-Au aurofil kölcsönhatások vagy a ligandum donorcsoportjai és a fémcentrumok között kialakuló hibrid pályákon történő elektronátmenetek eredményeképpen a NCs képződése megtörténhet. A második lehetséges útvonalon a GSH révén történik a MSA-Au NPs felületi arany atomjainak kiszakítása a felületről, ami a NPs méretének fokozatos csökkenéséhez vezet [50].

2.2.3. A NCs alkalmazási területei

A nemesfém NCs egyedülálló fizikai-kémia és szerkezeti tulajdonságai, mint a korábban említett ultrakicsi méretük, könnyű funkcionizálhatóságuk, kiváló biokompatibilitásuk és fotostabilitásuk, valamint alacsony citotoxicitásuk miatt egyre jelentősebb szerepet játszanak a biokatalízisben és számos területen alkalmazhatók orvosbiológiai vonatkozásban is, mint pl. fluoreszcens képalkotás, jelölés, a diagnosztika és hatóanyag szállítás, vagy szenzorikai területeken [51].

Mivel a disszertáció egyes témaköreiben az előállított NCs szenzorikai vizsgálatával foglalkozom, ezért ebben a fejezetben ezen alkalmazás részletesebb ismertetésére összpontosítok. Ahhoz, hogy egy nemesfém NCs érzékelőként jól működjön három fontos paraméternek kell teljesülnie: nagy érzékenység, gyors válasz, szelektivitás. A fém NCs érzékelésben való alkalmazása a külső kémiai környezet változásaira való nagyfokú érzékenységükön alapul, amely megváltoztatja a jellemző PL tulajdonságaikat [52][53]. Amint a **7. ábrán** látható a jellegzetes fluoreszcenciájuk a detektálandó analittal való közvetlen vagy közvetett kölcsönhatás következtében kioltódik, erősödik vagy

szisztematikusan eltolódik. Tehát a fluoreszcencia intenzitás változását okozó hatások vagy anyagok lehetnek kioltók (quencher) vagy fokozók (enhancer).



7. ábra: A NCs szenzorikai területen való felhasználásának lehetőségei: **(A)** kioltási folyamat révén. **(B)** segéd reagenssel a NCs fluoreszcenciája kioltódik, de az analit segítségével újra fluoreszcenssé válik. **(C)** a karakterisztikus fluoreszcencia eltolódik ([54]-es hivatkozás alapján készített saját ábra).

Kétféle kioltási folyamatot lehet megkülönböztetni, sztatikus és/vagy dinamikus kioltást. A kioltási folyamatok leírására a fluorofór élettartamát vizsgáljuk a kioltó egyensúlyi koncentrációjának függvényében, így egy lineáris összefüggést kapunk, amit Stern-Volmer egyenletnek (**1. egyenlet**) nevezünk. Általános formája:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

ahol az I_0 és az I a kioltó jelenléte nélkül és jelenlétében mért intenzitás, K_{SV} a Stern-Volmer állandó, $[Q]$ pedig a kioltó egyensúlyi koncentrációja.

Amennyiben eltérő kioltási mechanizmusokról beszélünk a kioltó számára nem egyformán hozzáférhető fluorofórok esetén, akkor a Stern-Volmer egyenlet egy módosított formáját a Lehrer egyenletet (**2. egyenlet**) célszerű felhasználni a kapott eredmények kiértékelésére.

$$\log \left[\frac{I_0}{I} - 1 \right] = n \log [Q] + \log K_b \quad (2)$$

ahol az I_0 és az I a kioltó jelenléte nélkül és jelenlétében mért intenzitás, K_b a kötődési állandó, n a kötőhelyek száma, $[Q]$ alkalmazott kioltó analitikai koncentrációja.

A fluoreszcencia kioltási folyamatok mechanizmusának megértéséhez hőmérséklet függő mérések is kivitelezhetők, ahol a termodinamikai állapotfüggvények értékének meghatározásához a van't Hoff összefüggés integrált alakja alkalmazható **(3. egyenlet)**:

$$\ln K_b = \frac{-\Delta H^0(T^0)}{RT} + \frac{\Delta S^0(T^0)}{R} + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\left(\frac{T - T^0}{T} \right) - \ln \frac{T}{T^0} \right] \quad (3)$$

ahol R az egyetemes gázállandó, T a mérés hőmérséklete, ΔH^0 a standard entalpia-változás, ΔS^0 a standard entrópia-változás, T^0 egy tetszőlegesen választott referencia hőmérséklet és ΔC_p a hőkapacitás-változás.

A sztatikus kioltás során a kioltó és a fluoreszkáló vegyület/anyag közötti kölcsönhatás már a gerjesztés előtt, alapállapotban létrejön és egy úgynevezett sötét komplex alakul ki, mely komplex nem képes fényt emittálni. K_{SV} értéke a nem fluoreszkáló komplex képződési folyamatára jellemző asszociációs állandónak (K_a) tekinthető. Ezen kioltás jellemzője, hogy diffúzió által nem befolyásolt, fluoreszcencia élettartam nem érzékeny rá, illetve a hőmérséklet növelése kedvez a nem fluoreszkáló komplex disszociációjának. A dinamikus vagy ütközéses kioltás esetében a kioltó és a fluorofór molekulák egymás közelébe kerülnek, és diffúziós folyamatok révén átmeneti komplexet hoznak létre, majd a gerjesztett fluorofór átadja az energiáját a kioltónak, ezután a komplex sugárzásmentes állapotba került fluorofórra és gerjesztett kioltóra válik szét. A sztatikus kioltással szemben a fluoreszcencia élettartam ezen folyamat során csökken, mivel az ütközések során a gerjesztett állapotban töltött idő lecsökken. Abban az esetben, ha a kioltás nem kombinált, csak tisztán az egyik folyamat vezet a fluoreszcencia intenzitás csökkenéséhez, akkor a K_{SV} értéke meghatározható úgy, hogy az I_0/I értékeket a kioltó egyensúlyi koncentrációjának függvényében ábrázoljuk, majd az adatpontokra egyenest illesztve az egyenes meredeksége megadja K_{SV} értékét. Amennyiben a két folyamat együttesen okoz kioltást, az adatpontok az y-tengely felé hajlanak el. Ezen a tartományon az $1/(I_0-I)$ értékeket kell ábrázolni $1/[Q]$ függvényében, majd az adatpontokra egyenest illesztve az egyenes meredekségéből számolható a K_a értéke.

A nehézfém-ionok – pl. higany-, réz- és krómionok – toxicitása és azok létfontosságú szervekben és szövetekben való akkumulációja miatt a kimutatásukkal kapcsolatos kutatások egyre inkább az érdeklődések középpontjában vannak [55][56][57]. Külön példaként említhető, hogy a környezetvédelem területén a vízi és biológiai rendszerek

Hg²⁺ szennyezése meghatározó figyelmet kapott, rendkívül mérgező és bioakkumulatív⁵ tulajdonságai miatt. A Hg²⁺ gyors, érzékeny és szelektív kimutatására szolgáló módszereket pl. Au NCs, mint fluoreszcens érzékelők segítségével is fejlesztettek már. Az érzékelési mechanizmus az Au NCs és a Hg²⁺ közötti kölcsönhatáson alapult a Hg-S kötés kialakításán keresztül, mely reakció mechanizmusa a fotoindukált elektrontranszfer folyamattal magyarázható. Fénybesugárzás hatására a Hg²⁺ közvetlenül Hg⁺-ionokká redukálódott a gerjesztett Au NCs-ből egy elektron kinyerésével, így a folyamat során a lyukak és a gerjesztett elektronok sugárzási rekombinációja megszakadt, és az Au NCs fluoreszcenciájában kioltás volt megfigyelhető [58]. Az élelmiszerbiztonság területén pl. NCs-alapú szenzorok segítségével is megvalósítható az élelmiszerekben található specifikus vegyszerek és növényvédőszer-maradványok (pl. dinotefurán, foxim *stb.*) egyszerű monitorozása. Mindezekon felül a biomedicina területén a betegségek diagnosztizálásában, a biomarker azonosításban (pl. aminosavak, fehérjék, biológiai merkaptánok, dezoxiribonukleinsav (DNS) és ribonukleinsav (RNS)), és egyéb fontosabb molekulák sejtekben történő kimutatásában is szerepet játszhatnak. Az Au NCs továbbá olyan speciális alkalmazásokban is hasznosak lehetnek, mint a sejten belüli hőmérséklet és pH érzékelése [59].

Az Au NCs-nek számos előnye van a képalkotásában is: (1) kis méretük miatt a sejtbiológiai kutatásokban meghatározó szerep jut nekik, mert méretüknél fogva nagyobb a sejtpenetrációs képességük, (2) az Au NCs stabilak és nem toxikusak, elhanyagolható hatásuk van a sejtekre, (3) nagy kontrasztú képalkotás végezhető jó háttérjelarány mellett [60]. A biológiai képalkotásban a kétfotonos gerjesztésen alapuló technikát használják fel a minták elemzéséhez [61]. A folyamat fizikája miatt a fluorofor gerjesztés két foton egyidejű abszorpciójával megy végbe, amelyek együttműködve biztosítják a fluoreszcens folyamat elindításához szükséges energiát. Két foton energiája csak akkor egyesülhet, ha ezek a fotonok egyidejűleg kölcsönhatásba lépnek ugyanazzal a fluoroforral. Ennek a gerjesztési eljárásnak számos egyedi előnye van, pl. csökkent a minta fénykárosodását és megnöveli a behatolási mélységet. Nagyobb kontrasztú képeket is készít, és egy új módszer lokalizált fotokémiai reakciók kiváltására. A kétfoton-mikroszkópia egyre több alkalmazást talál a biológiában és az orvostudományban. A kétfotonos gerjesztés hatására a NC folyamatosan elnyeli két foton energiáját, hogy gerjesztett állapotba kerüljön. Ily módon közeli infravörös

⁵ A bioakkumuláció vegyületek feldúsulási folyamata egy élőlény valamely szövetében, ha egy szervezet gyorsabban vesz fel pl. egy fémot, mint ahogyan azt a katabolizmus és a kiválasztás útján eliminálná, akkor a fém felhalmozódásához vezet.

(NIR) vagy az infravörös (IR) fény használható gerjesztésükre, hogy csökkentse a szórt fény okozta energiavesztésüket [62]. A szerves festékekkel és kvantumpontokkal összehasonlítva az Au NCs kétfotonos gerjesztése nagyobb mértékben csökkentheti a NIR tartományon a fototoxicitást az *in vivo* képalkotás során, és mélyebb szövetsejtekbe is besugározhat [60]. Pl. a rákos sejtekben a glükóz metabolikus sebessége alapján, amely fontos információ a rák invazivitása szempontjából, Kuo és mtsai. glükózzal funkcionalizált Au NCs-et állítottak elő, mely jó vízoldhatósággal és biokompatibilitással rendelkezik a rák mutációs folyamatának nyomon követésére [63].

Az Au NCs-nek nemcsak a fototermikus és a fotodinamikus terápiában van helye, hanem széleskörű alkalmazási lehetőségeik vannak a gyógyszer szállításban és a gyógyszerek felszabadulásának nyomon követésében is [64][65][66]. A gyógyszeradagolás folyamatában az Au NCs használható hordozóként a gyógyszerek szállításához, vagy jelölőként a gyógyszerfelszabadulás monitorozására. Az Au NCs-en alapuló kompozit anyagok gyógyszeres kezelésre való felépítésének számos előnye van: (1) az Au NCs képesek fotodinamikusan kezelni a beteg sejteket, párosulva magának a gyógyszernek a terápiás képességével, (2) a hatóanyag-felszabadulás NIR-besugárással szabályozható [60].

Az Au NCs indukálhatják a reaktív oxigén-intermedierek (ROS) termelését, és egyes kutatók sterilizálásra és fertőtlenítésre használják. A ciszteinnel felületmódosított narancsvörös emisszióval rendelkező Au NCs-et (Cys-Au NCs) korábban sikeresen alkalmazták baktériumok kimutatására és gátlására. Miután az *E. coli* bekebelezte a Cys-Au NCs-et, egyértelműen kimutatható fluoreszcencia intenzitás csökkenés volt azonosítható, ami azt jelezte, hogy a Cys-Au NCs felületi liganduma a cisztein megsemmisült. A cisztein elvesztése nagyszámú ROS termelődését indukálta, ami az *E. coli* elhalásához vezetett [67].

2.3. Az antioxidáns kapacitás mérésére leggyakrabban alkalmazott módszerek elvi alapjai

Az utóbbi években egyre több kutatás foglalkozik a különböző biológiai rendszerekben található természetes antioxidánsokkal és azok mérésével [68]. Az antioxidáns kapacitás a rendszerben lévő összes antioxidáns vegyület együttes hatása, melynek pontos, számszerű meghatározásra folyamatosan növekvő igény mutatkozik, ezért számos analitikai módszert és mérőrendszert fejlesztettek ki az elmúlt évtizedben. Az irodalomban ma már többféle módszert találhatunk az antioxidáns kapacitás meghatározására [69][70]. Ennek oka az antioxidáns fogalom összetettségében rejlik, mivel egyik módszer sem képes a valódi, természetes módon lezajló reakciók teljes skáláját modellezni. Minden mérési módszer egy adott antioxidánsra jellemző, de egyik sem képes

mérni az összes antioxidáns teljes antioxidáns aktivitását. Csak akkor vonhatunk le következtetést egy minta antioxidáns hatékonyságával kapcsolatban, ha többféle mérési módszert alkalmazunk a mesterséges körülmények között [68].

Az antioxidáns szó egy gyűjtőfogalom, amely számos elsősorban mesterséges vagy természetes vegyületet takar, amelyek élő szervezetekben és élelmiszerekben találhatók. A szabad gyökök és az antioxidánsok egyaránt jelen vannak az emberi szervezetben és folyamatos kölcsönhatásba lépnek egymással. Egyes antioxidánsok gátolják az oxidációt gyorsító katalizátorok aktivitását, más antioxidánsok pedig önmaguk is oxidálódhatnak és azzal fejtik ki a védőhatást, hogy megkötik az oxigént. Egy komplex integrált védelmi rendszer biztosítja a sejtalkotó molekulák védelmét a szabad gyökök okozta károsodásokkal szemben. Az antioxidánsok olyan molekulák, amelyek kisebb mennyiségben fordulnak elő az oxidálandó szubsztráthoz képest és jelentősen csökkenthetik vagy gátolhatják annak oxidációját. Az emberi szervezet főbb antioxidáns összetevőit az **1. táblázat** mutatja [71].

1. táblázat: Az emberi szervezet fontosabb antioxidáns hatású anyagai [71].

FUNKCIÓ	PÉLDA
vitaminok	E, C, A-vitamin, riboflavin, niacin, nikotinamid
zsírok	ω -3, ω -6 zsírsavak
aminosavak, tiolok	hisztidin, glutamin, cisztein, taurin, <i>N</i> -acetyl-cisztein
proteinek, enzimek	albumin, transferrin, kataláz, peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz
növényi metabolitok	polifenolok: flavonoidok, karotinoidok: β -karotin, likopin, lutein
ásványi anyagok	cink, vas, szelén, réz
anyagcseretermékek	húgysav, liponsav

Az antioxidánsok lehetnek hidrofilek (C-vitamin, aminosavak, polifenolok), lipofilek (E-vitamin, β -karotin, A-vitamin), citoszol antioxidánsok (Q10 koenzim), illetve szerkezeti antioxidánsok (nyomelemek, aminosavak, szelén, cink, szelenocisztein).

Az antioxidánsokat két csoportba sorolhatjuk: az elsődleges antioxidánsok közé tartozik pl. a C-vitamin és a húgysav, melyek láncreakciót megszakítva fejtik ki védő hatásukat. A másodlagos antioxidánsok közé tartozik pl. a transferrin és a polifenolos vegyületek, melyek védő hatásukat fémion kelátorok segítségével fejtik ki, gátolva a Fenton-reakciót és ezzel a rendkívül agresszív hidroxil gyök képződését. Az antioxidánsok közvetetten gátolják a gyökök kialakulását, vagy képesek magukat a gyököket megkötni. Az antioxidáns koncentrációja és reakciókészsége szorosan összefügg a gyök befogására való képességgel. A szervezet bizonyos antioxidánsokat képes előállítani, mint pl. az enzimek és

a kismolekulájú vegyületek, azonban számos molekulát nem tudunk szintetizálni, mint pl. az aszkorbinsav, a tokoferolok a karotinoidok, és a flavonoidok. Ezekhez csak külső forrásból, a táplálkozás útján juthatunk hozzá [72][73].

Mivel a disszertáció egyes témakörei az előállított NCs nem enzimatiszikus védelmi rendszer elemeit érintik, ezért a továbbiakban csak ezen elemek antioxidáns kapacitást mérő módszereinek részletesebb ismertetésére összpontosítok.

A nem enzimatiszikus antioxidáns tesztek esetében a kifejlesztett mérési módszereket mechanizmusuk alapján két csoportra lehet osztani: hidrogénatom átmenettel (HAT) és elektronátmenettel (ET) kapcsolatos módszerek. A HAT reakció egy proton és egy elektron összehangolt mozgása egyetlen kinetikai lépésben. Az ilyen típusú tesztek azt mérik, hogy egy minta mennyire hatékony egy adott szabadgyök ellen tehát, hogy milyen a szabadgyök befogó képessége [74][75].

Az ET reakciót általában színváltozás kíséri, melynek mértéke az antioxidáns kapacitás mutatója. Mindkét módszer a teljes antioxidáns kapacitást méri, de a kapott eredmények nem feltétlenül korrelálnak egymással, mivel egy minta redukáló képessége nem feltétlenül függ össze a gyökfogó képességével. A legfontosabb, az emberi szervezetre káros reaktív formák közé tartoznak a hidrogén-peroxid, szuperoxid anionok, hidroxilgyök, peroxilgyök, peroxinitrit és a szinglet oxigén. A szuperoxid-anionok és hidrogén-peroxid ellen enzimek védenek, mint pl. a szuperoxid-dizmutáz, kataláz és a peroxidázok. Hazai viszonylatban Dr. Szilágyi István MTA-SZTE „Lendület” Biokolloid Kutatócsoportja foglalkozik ilyen enzimfunkcióval rendelkező hibrid anyagok előállításával [76][77]. Mindemellett Dr. Kalmár József (Debreceni Egyetem, TTK, Szervetlen és analitikai Kémiai Tanszék) és mtsai. is állítottak elő funkcionális aerogéleket, melyek katalitikus aktivitással rendelkeznek. Munkájuk során ciklán és ciklám réz(II)komplexeit különböző kovalens linkerekkel rögzítették mezopórusos szilika aerogélen. Az így kialakított, funkcionális aerogél mikrorészecskék kiváló katalitikus aktivitást mutatnak a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimeket utánzó szuperoxid-anion dizmutációs reakciójában [78].

A többi reaktív forma ellen pedig a nem enzimatiszikus antioxidáns védelmi rendszer elemei nyújtanak védelmet, mint a C- és E-vitamin, karotinoidok, flavonoidok *stb.* A legtöbb reakció a peroxilgyök megkötésére épül, mivel ez felelős a lipidperoxidációért, mely az elsődleges kutatási terület volt, emellett az azofestékek termolízise is egyszerű módszer a gyökök előállítására.

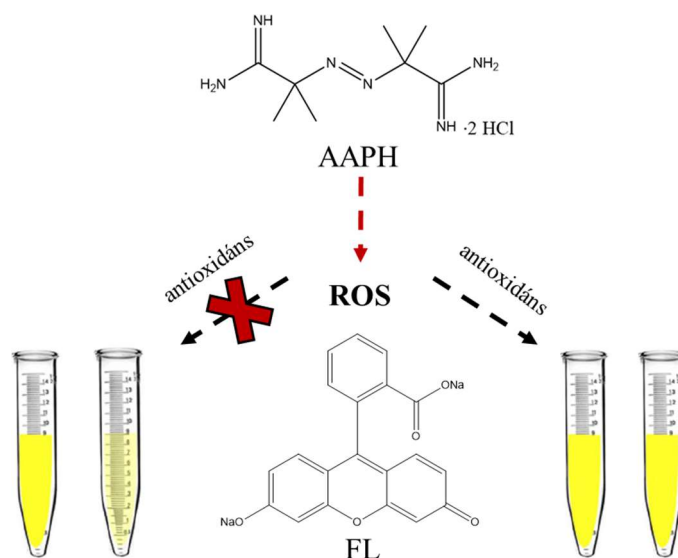
Számos HAT és ET reakción alapuló eljárás ismert az antioxidáns kapacitás meghatározására, mint pl. az ORAC (oxigénygyök abszorpció /elnyelő/ kapacitás), TRAP

(összes peroxilgyök befogására vonatkozó paraméter), CL (kemilumineszcencián alapuló módszerek), illetve TEAC (Troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás), FRAP (vasredukáló képességen alapuló módszer), TPC (összes polifenol meghatározása Folin-Ciocalteu reagenssel) [79] [80]. Ezen vizsgálatok közül figyelembe véve az előállított NCs optikai sajátságait és vizes közegbeli stabilitásukat az ORAC és TEAC teszt alapján értékeltük saját rendszereinket, mely tesztek elméleti alapjait a következő alpontokban foglalom össze.

2.3.1. Hidrogénatom átvitelén alapuló, antioxidáns kapacitást mérő ORAC eljárás

Munkám során a HAT csoportba tartozó módszerek közül a Cao és mtsai. (1993) által fejlesztett ORAC teszttel foglalkoztam. Ez a teszt a peroxilgyök oxidációjának gátlásán keresztül méri a gyöklánc-reakció antioxidánsok általi hasító képességet („lánc megszakító” mechanizmus) [72]. A peroxilgyökök olyan szabad gyökök, amelyek fiziológiás körülmények között a biológiai rendszerekben és az élelmiszerekben is a lipidoxidációban dominálnak. Ebben a vizsgálatban általánosan használt peroxilgyök generátorokat az azovegyületek képviselik, beleértve a lipofil α,α -azo-bisz-izobutironitril (AIBN), 2,2-azo-bisz(2-amidinopropán)-klórhidrát (ABAP), 2,2'-azo-bisz(2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN), és a hidrofil 2,2'-azo-bisz(2-amidinopropán)-dihidroklorid (AAPH) [68]. A vizsgálat azon az elképzelésen alapul, hogy az AAPH reaktív oxigén gyököket (ROS) termel, amely képes a fluoreszcint, mint tesztmolekulát oxidálni, mely egy erősen fluoreszkáló vegyület, míg oxidációs terméke nagyon gyenge fluoreszcenciával rendelkezik. Emiatt az oldat fluoreszcenciája idővel csökken, mivel a ROS oxidálja a fluoreszcint. A peroxilgyökökkel való reakció után a fluoreszcin emissziója 520 nm-en csökken, és az antioxidáns aktivitást az intenzitás-idő görbe alatti terület határozza meg. Ha antioxidáns anyagot (pl. molekula, nanoszerkezet *stb.*) adunk a rendszerhez, az antioxidáns sajátsággal rendelkező anyag reakcióba lép a ROS-kel, ami ezért késlelteti a fluoreszcin oxidációját az antioxidáns felhasználásáig. A lejátszódó reakciót a **8. ábra** foglalja össze.

A rendszer kalibrálásához többnyire Troloxot, egy szintetikus E-vitamin analógot használnak referencia vegyületként, amely ismert antioxidatív aktivitással rendelkezik ebben a vizsgálatban. Ezzel lehetővé válik az antioxidatív kapacitás kifejezése Trolox-egyenértékben, mint mérési egységben.



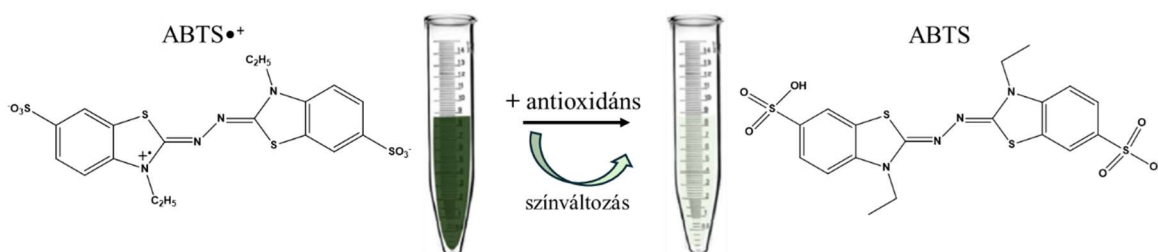
8. ábra: Az ORAC vizsgálat esetén lejátszódó reakció sematikus ábrája antioxidáns hiányában és jelenlétében.

Az eredeti módszerben fluoreszcens szondaként β -fikoeritrin fehérjét használtak, ami a fehérje fluoreszcenciájának csökkenését eredményezi, mely a fehérje konformációjának elvesztésének eredményeképpen következtében következik be, amikor az oxidatív károsodást szenved, amit egy peroxilgyök forrás okoz. A β -fikoeritrinnek számos hátránya volt, mint a fényérzékenység, polifenolos vegyületekkel való reakció, így a probléma megoldására a fluoreszcein használatát vezették be. Ennek a módszernek az az előnye, hogy mind a zsírban, mind a vízben oldódó antioxidánsok esetében alkalmazható. Rendelkezésre állnak automatizált változatok, amelyek rutinszerűen használhatók nagy mintamennyiségek esetén. Hátránya, hogy pH-érzékeny, viszonylag lassú a mérés és spektrofotométert igényel, amely a legtöbb laboratóriumban nem mindig áll rendelkezésre. A reakció időbeli lejátszódása így a mérési idő változhat a komponensek koncentrációjától és az antioxidánsok jelenlététől függően [81].

2.3.2. Elektronátmenettel kapcsolatos, antioxidáns kapacitást mérő TEAC eljárás

A Troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás (TEAC) módszert Miller és mtsai. fejlesztették ki 1993-ban [68]. A mérés alapja egy antioxidáns sajátossággal rendelkező anyag és egy előre generált $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) gyökkation közötti kölcsönhatás, mely spektrofotometriás módszerrel követhető. Az ABTS kálium-perszulfát oxidálószer jelenlétében $\text{ABTS}^{\bullet+}$ gyökkationná képes átalakulni, ami intenzív kék-zöld színnel rendelkezik ($\lambda = 734 \text{ nm}$), de ezen intenzív színnel rendelkező

ABTS $\bullet^+$ -t antioxidánsok jelenlétében redukálódni képes, ami az intenzív szín eltűnését eredményezi az idő függvényében az alkalmazott antioxidáns koncentrációjától függően (9. ábra), amiből következtetni lehet az adott minta antioxidáns kapacitására, pontosabban az ABTS gyök befogásának képességére.



9. ábra: Az ABTS teszt működésének sematikus ábrázolása.

Az eredeti tesztben hidrogén-peroxid és metmioglobinnal jelenlétében keletkezik a sötétzöld színű ABTS $\bullet^+$ kation gyök, ezek helyett ma már mangán-dioxidot vagy káliumperszulfátot alkalmaznak [82]. A módszer könnyen használható, gyors és olcsó, a gyök viszonylag stabil, ezért a pH aktivitásra gyakorolt hatásának tanulmányozására is használható. Hátránya, hogy a normál sejttanyagcsere során keletkező gyökök helyett olyan stabil gyököket használ, amelyek *in vivo* nem keletkeznek, tehát a módszer nem ad információt arról, hogy a mintában lévő antioxidánsok a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak. A mérés előtt 12–16 órás inkubálási idő szükséges, így a minta előkészítése hosszú időt vesz igénybe. Extra lépés szükséges a szabad gyökök előállításához a ABTS-ből. A generált szabad gyökök nem stabilak hosszú időn keresztül. Nem szabványosított, ezért nehéz összehasonlítani az értékeket a különböző laboratóriumok között [70].

2.4. Az Au NCs előállításához felhasznált kismolekulák általános jellemzése

2.4.1. B-vitamin család

A fémionok redukciójának megvalósítása érdekében újonnan tanulmányoztuk B-vitamin származékok (B₁, B₃) és aminosav származékok alkalmazását. Ebben a fejezetben ezen kismolekulák főbb jellemzőit foglalom össze.

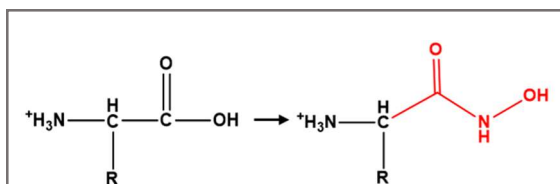
A B-vitaminok fontos szerepet játszanak az idegrendszer megfelelő működésében, segítenek legyőzni a fáradtságot, kulcsfontosságúak az immunrendszer energiatermelő folyamataiban, valamint jelentős hatással vannak a bőr egészségére. A B₁-vitamin felfedezése a beriberi nevű népbetegséghez kapcsolódik, melyet az 1885–1897 közötti időszakban Christiaan Eijkmann, a malájföldi holland katonaeorvos részletesen vizsgált a

jávai Batáviában. A tiamin molekula (B_1 -vitamin) alapszerkezete egy metilén híddal összekapcsolt pirimidin- és egy tiazol gyűrűből áll. A tiamin legnagyobb része tiamin-pirofoszfát formájában található az élő szövetekben. A szabad vegyület amorf jellegű, klorid formája szintelen (fehér), higroszkópos kristályokat alkot, illetve ebben a formában stabil. Bázikus karakterű a pirimidin-gyűrű aminocsoportja és a tiazol-gyűrű pozitív töltésű nitrogénje miatt. Savas pH-n stabil, viszont lúgos oldatokban ($pH = 7,0$ felett) bomlik, különösen levegő jelenlétében. Vizes oldata $\lambda = 235$ nm-en és $\lambda = 267$ nm-en mutat abszorpciós maximumokat. Oxidatív hatásoknak nem képes ellenállni, az oxidációs folyamat során a pirimidin- és a tiazolgyűrűk között egy második híd keletkezik és elveszítik biológiai aktivitásukat. Ilyen vegyületek pl. a tiokróm, tiazolon és tiotiazolon. A tiamin széles körben elterjedt a természetben, de csak viszonylag kis mennyiségben hozzáférhető, ezért kémiai szintézissel állítják elő. A tiamin minden iparilag releváns szintézise egy Grewe-diamin (4-amino-5-aminometil-2-metil-pirimidin) nevű pirimidin intermedierből áll, mint kulcsfontosságú építőelem. Az akrilnitril vagy a malononitril az általános kiindulási anyagok ennek a köztiterméknek a szintéziséhez. A tiazolgyűrűt ezután lineárisan felépítik az előformált pirimidin-részen (Grewe-diamin) három kémiai lépésben, hogy tiamint kapjanak [83].

A nikotinamid (NAM), más néven B_3 -vitamin amid származéka vízben oldódó vitamin és rendkívül ellenálló a légköri oxigénnel, savakkal, hővel és fénnel szemben mind vizes, mind szilárd rendszerekben. A NAM elengedhetetlen a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) koenzimekhez és ezért több mint 200 enzimreakcióhoz a szervezetben, beleértve az adenzin-trifoszfát (ATP) képződést. A B_3 -vitamin ipari előállítása jelenleg kémiai szintézisen és biokatalízisen alapul. A kémiai eljárásokban 2 metil-5-etil-piridin vagy 3-metil-piridin szerepel kiindulási anyagként, melyeket egyszerű vegyületekből pl. acetaldehidből, formaldehidből szintetizálnak. Ezek az utak magas hőmérsékletet, nagy nyomást és fémkatalizátorokat igényelnek. A biokatalitikus folyamatok ezzel szemben enzimeket használnak katalizátorként, melyek enyhe körülmények között működnek és a hozam tekintetében igen hatékonyak. A B_3 -vitamin vegyületei segítenek a szervezet káros szabadgyökök elleni védekezésében, ezáltal a nikotinamid nemcsak fontos szerepet játszik a szervezet energiaellátásában, hanem véd a sejtszintű károsodások ellen is [84].

2.4.2. Hidroxámsavak

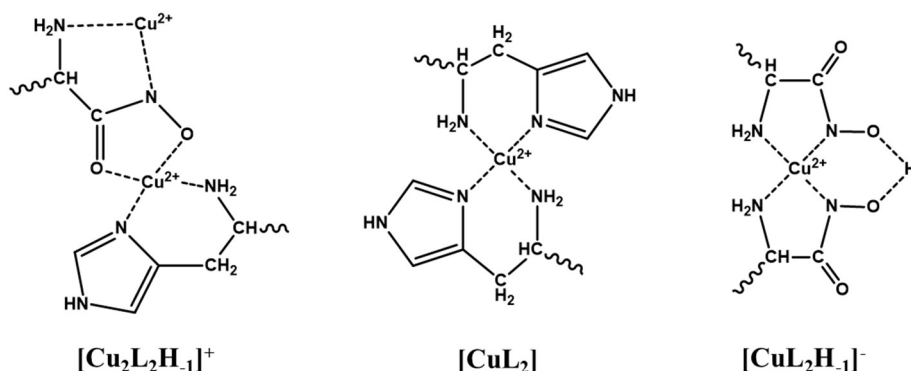
A hidroxámsavak olyan karbonsavak, melyek hidroxilcsoportját -NH-OH csoport helyettesíti (**10. ábra**). Az első hidroxámsavat Lossen állította elő 1869-ben [85], etil-oxalát és hidroxil-amin reakciójával, ahol az oxálsav hidroxámsav származékát kapta. A vegyületsalád korai felfedezésének jelentősége akkor vált nyilvánvalóvá, amikor bebizonyosodott, hogy néhány természetes vegyület is tartalmaz hidroxámsavcsoportot, mely származékokat biológiai mintákból



10. ábra: Az aminosavak és a hidroxámsavak főbb szerkezeti eltérései (pirossal a hidroxamátcsoport van kiemelve).

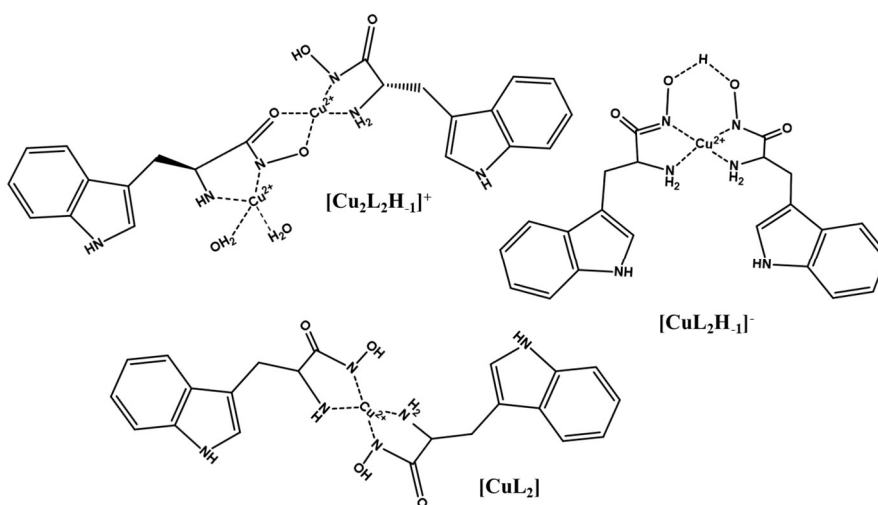
sikerült izolálni [86]. Szerkezetileg karbonsavakból és hidroxil-aminokból származtathatók [85]. Szintézisüket hidroxil-aminok és aktív acilcsoportot tartalmazó karbonsav származékok reakciójával lehet elvégezni. A hidroxámsavak szintézise közé tartozik a peptidszintetikus módszerek alkalmazása, mint pl. a karbonsavak vagy *N*-védett aminosavak és a hidroxil-amin konjugációjára szolgáló kapcsolóreagensek alkalmazása vagy a *N*-hez kötött hidroxil-amin szilárd hordozók alkalmazása. Sav-bázis tulajdonságaikat tekintve egyértékű, gyenge savak, pK értékük 8,5–9,5 tartományon található az egyéb donorcsoportok jelenléte miatt, és nagyon reaktívak a nagy stabilitású amidokhoz képest [87]. A hidroxámsav funkciós csoport számos farmakológiailag fontos természetes és mesterséges vegyületben jelen van. A legismertebb a deszferrioxamin B, a mikrobiális eredetű sziderofór család tagja, melyet a vasmérgezés kezelésére használnak. A hidroxámsavak jelenleg ismert gyógyászati alkalmazásai régóta ismert kiemelkedő kelátképző tulajdonságaikon alapulnak [88]. Kelátképző csoportjuk révén szelektíven képesek kötni fémionokat, pl. Zn(II), Cu(II), Fe(III) nagy stabilitású komplexek kialakítása révén [89]. Kutatási munkám során a His és a Trp hidroxámsav származékait (HisHA, TrpHA) tanulmányoztam. A hisztidinhidroxámsav (HisHA) a hidroxamát funkciós csoporton kívül egy aminocsoportot és egy oldalláncbeli imidazol-*N* donort is tartalmaz, melyek döntő szerepet játszanak fémionok koordinációjában. A triptofánhidroxámsav (TrpHA) az említett hidroxamát és aminocsoportokon kívül egy oldalláncbeli indolgyűrűt (aromás-*N* donor) foglal magában. Ezen vegyületek oldatkémiai jellemzése régóta kutatott terület, mind nemzetközi, mind hazai viszonylatban [90]. Magyarországon meghatározóan Dr. Farkas Etelka és kutatócsoportja dolgozott ezen a területen. A HisHA Cu^{2+} -ionokkal való koordinációja részletesen jellemzett folyamat széles pH tartományon [90]. Irodalmi adatok

alapján a Cu^{2+} -ionok koordinációja kb. $\text{pH} = 3\text{--}3,5$ között kezdődik a hidroxamát-[O,O] donorokon keresztül történő kötődés révén, de a pH növelésével a N -donorokon keresztül történő kötődés válik egyre dominánsabbá. A $\text{pH} = 4,5\text{--}7,0$ közötti tartományon az amino- N és az imidazol- N donorok koordinálnak hisztamin-típusú koordinációt kialakítva [90]. A **11. ábrán** a Cu^{2+} -HisHA rendszerben képződő néhány komplex szerkezete látható. A hidroxámsavak tehát számos funkcióval rendelkező vegyületek, amelyek hasznosak lehetnek a gyógyászatban és a kémiai iparban egyaránt.



11. ábra: Cu^{2+} -HisHA rendszerben lehetségesen képződő néhány komplex szerkezete a kötőmódok feltüntetésével.

A TrpHA oldatkémiai vizsgálatainak eredményei azt mutatják, hogy savas pH -tartományon ($\text{pH} = 3\text{--}5$) a $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_1]^+$ képződése preferált, míg $\text{pH} > 4$ esetén a $[\text{CuL}_2]$ komplex forma kezd megjelenni (**12. ábra**). Az utóbbi két esetben egy fémion a hidroxamát-[O,O] és $[\text{NH}_2, \text{hidroxamát-}N]$ vagy két $[\text{NH}_2, \text{hidroxamát-}N]$ keláton keresztül két ligandummal is kialakíthat biszkomplexeit [91].



12. ábra: A Cu^{2+} -TrpHA rendszerben lehetségesen kialakuló néhány komplex szerkezete a kialakuló kötőmódok feltüntetésével.

3. Célkitűzés

A Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszékén működő MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoport (és annak elődje a Kolloidok és Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoport) közel 10 éve foglalkozik méretszabályozott egy- és kétfémes arany-tartalmú nanostruktúrák, főként NCs, előállításával és szerkezetvizsgálatával, kiemelt figyelmet fordítva a vizes közegű „templátos” eljárás alkalmazhatóságának igazolására kismolekulák felhasználásával. Nevezetesen, 2016 óta olyan kutatások folynak a fluoreszcens Au NCs szintézise, szerkezeti és funkcionális jellemzése terén, melyhez különböző, korábban még nem vizsgált fehérjéket, kispeptideket, aminosavakat (pl. His, Trp, Tyr, Phe *stb.*), nukleotidokat használtak fel. Ezeket az újonnan szintetizált NCs-et eredményesen használták fel főként szenzorikai célokra.

PhD tanulmányaimat 2020. őszén kezdtem el, ahol az SZTE TTIK Kémia Doktori Iskola doktori képzésének keretein belül elsősorban egylépésben megvalósítható, kiemelten „zöldkémiai” szintézis folyamatok fejlesztésével kezdtem el foglalkozni. Ebben az eljárásban a prekursor tetrakloroaurát-ionok redukcióját és a keletkező nano-objektumok stabilizálását elsősorban kismolekulák segítségével kívántuk megvalósítani. A kutatómunka magában foglalta a kulcsfontosságú kísérleti paraméterek (pl. fémion/ligandum moláris aránya, pH, hőmérséklet és reakcióidő) tanulmányozását, valamint a nanodiszperziók átfogó szerkezeti és optikai jellemzését.

Doktori értekezésem céljaként annak tanulmányozását és megértését tűztük ki, hogy a fent említett kísérleti paraméterek szisztematikus változtatása hogyan befolyásolja az Au NCs előállítási folyamatát, illetve annak reprodukálhatóságát. A fémionok redukciójának megvalósításához újonnan kívántuk vizsgálni B-vitamin és aromás oldalláncú aminosavak hidroxámsav származékainak alkalmazási lehetőségeit. A szintézisek és megfelelő tisztítási protokollok kidolgozásán túl kiemelt feladatom volt az előállított termékek szerkezetvizsgálata főként a Kutatócsoportban és a Kémia Intézetben rendelkezésre álló műszerek segítségével, illetve lehetséges hasznosíthatóságuk vizsgálatára is. Feltérképezni kívántuk egyrészt az előállított és karakterizált kéken emittáló aminosavak hidroxámsav származékaival stabilizált Au NCs szenzorikai területen történő felhasználását. Számos szakirodalom foglalkozik a fémionok Au NCs-vel történő detektálásáról, azonban kevés publikáció részletezi a mechanizmusokat. Feladatom volt, hogy lehetőség szerint meghatározzam a legigéretesebb fémionok esetében, a legkisebb kimutatható mennyiséget

(LOD), illetve értelmezzem a PL kioltási és erősítési folyamatokat és mechanizmusukat. A kutatómunkám részeként optikai szenzorok fejlesztésén túl antioxidáns tulajdonsággal rendelkező, B-vitamin származékokkal stabilizált Au NCs előállítását és szerkezeti jellemzését is célul tűztük ki. Mindezek mellett az utóbbi NCs BSA fehérjével való kölcsönhatásának tanulmányozására is kísérletet tettünk. A klaszter-fehérje interakció feltérképezésére egyedi mérés technikákat kívántuk alkalmazni (úgy, mint a felületi plazmon rezonancia spektroszkópia (SPR) és izoterm titrációs kalorimetria (ITC)), melyek ígéretesek lehetnek a kötési folyamat termodinamikai jellemzése tekintetében és a rendelkezésre álló irodalom még nem tartalmaz kísérleti adatokat az ilyen technikákkal végzett kölcsönhatás vizsgálatokról.

A doktori disszertáció fő motivációja, hogy a fluoreszcens nemesfém NCs vizsgálata egyedülálló kutatási terület Magyarországon, mellyel Kutatócsoportunk foglalkozik meghatározóan, így az új tudományos eredményekkel a téma terület részletesebb megismeréséhez szeretnénk hozzájárulni.

4. Felhasznált vegyszerek, szintézisek és vizsgálati módszerek

4.1. Felhasznált vegyszerek

4.1.1. Szintézisekhez közvetlenül felhasznált anyagok

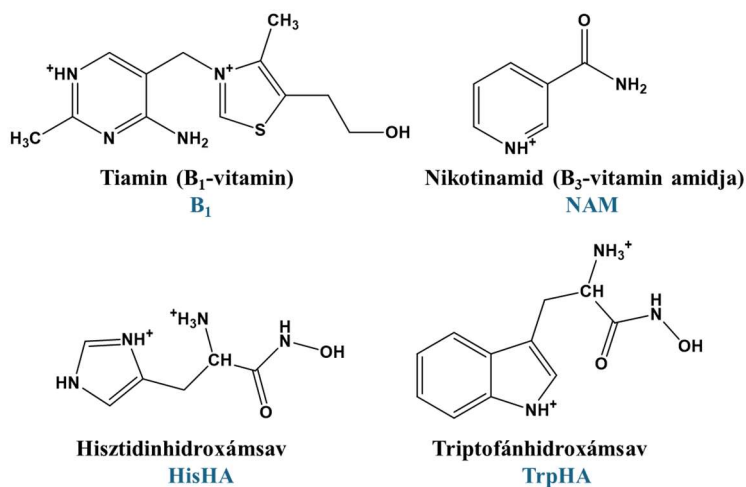
- Cellulóz-alapú dialízis membrán (cut off: 1 kDa; Sigma)
- Hidrogén-tetrakloro-aurát trihidrát ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 99,9 %; Sigma)
- Hisztidinhidroxámsav (HisHA; $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$; SZTE GYTK Gyógyszerkémia Intézet munkatársai által előállítva és tisztítva, a szintézis receptjét a következő alponban ismertetem)
- *L*-hisztidin (His; $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$; 99,9 %; Sigma)
- *L*-triptofán (Trp; $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$; ≥ 99 %; Sigma)
- Nátrium-hidroxid (NaOH; 99 %; Molar)
- Nikotinamid (NAM; $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$; $\geq 99,5$ % (HPLC))
- Sósav (HCl; 37 %; Molar)
- Tiamin hidroklorid (B_1 -vitamin; $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \times \text{HCl}$; $\geq 99,9$ %; Sigma)
- Trinátrium-citrát dihidrát ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 99 %; Molar)
- Triptofánhidroxámsav (TrpHA; $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$; SZTE GYTK Gyógyszerkémia Intézet munkatársai által előállítva és tisztítva, a szintézis receptjét a következő alponban ismertetem)

4.1.2. Antioxidáns, szenzorikai és biológiai kölcsönhatás vizsgálatokhoz felhasznált anyagok

- 2,2'-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) diammónium (ABTS; $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4$; ≥ 98 %; Alfa Aesar)
- 2,2'-azobisz (2-metilpropionamidin) dihidroklorid (AAPH; $[\text{=NC}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{=NH})\text{NH}_2]_2 \times 2\text{HCl}$; 97 %; Sigma)
- Cérium(III)-klorid-heptahidrát ($\text{CeCl}_3 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 99,9 %; Sigma)
- Cézium-klorid (CsCl; 99 %; Sigma)
- Cink(II)-klorid (ZnCl_2 ; 99,9 %; Sigma)
- Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; 99,99 %; Molar)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; 97,0 %; Molar)
- Fluorescein-dinátrium sója (FL; $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$; VWR)
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karbonsav (Trolox; 97 %; Sigma)
- Ittrium(III)-klorid (YCl_3 ; 99,99 %; Sigma)

- Kadmium-nitrát tetrahidrát ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_3 \times 4 \text{H}_2\text{O}$; 98 %; Sigma)
- Kalcium-klorid dihidrát ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 97 %; Molar)
- Kálium-klorid (KCl ; >99 %; Molar)
- Kálium-perszulfát ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; 99,99 %; Sigma)
- Kobalt(II)-klorid hexahidrát ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 98 %; Sigma)
- Lantán(III)-klorid hidrát ($\text{LaCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$; 99,9 %; Sigma)
- Magnézium-klorid hexahidrát ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 98 %; Molar)
- Metanol (CH_3OH ; 99,85 %; Molar)
- Nátrium-dihidrogén-foszfát-2-hidrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; $\geq 99,9$ %; Molar)
- Nátrium-klorid (NaCl ; 99,98 %; Molar)
- Nikkel(II)-klorid hexahidrát ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 99 %; Sigma)
- Réz(II)-klorid (CuCl_2 ; >97 %; Sigma)
- Ródiium-klorid (RhCl_3 ; 98 %; Sigma)
- Rubídium-klorid (RbCl_2 ; 99,8 %; Sigma)
- Szarvasmarha szérum albumin (BSA; liofilizált por, globulinmentes; ≥ 98 %; Sigma)
- Vas(III)-klorid hexahidrát ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 99,9 %; Sigma)

A szintézisekhez és a vizsgálatokhoz felhasznált vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak, így alkalmazásuk előtt további tisztítást nem végeztem. A törzsoldatok és pufferek előállításához minden esetben nagy tisztaságú Milli-Q vizet (MQ-víz, Millipore, Direct-Q3 UV, fajlagos ellenállás 18,2 M Ω -cm, 25 °C) használtam. A NCs előállításához felhasznált kismolekulák protonált formáinak szerkezeti képleteit a **13. ábra** foglalja össze.



13. ábra: A szintézisekhez felhasznált kismolekulák protonált formáinak szerkezeti képletei.

4.2. Szintézismódszerek

4.2.1. A hisztidinhidroxámsav (HisHA) és a triptofánhidroxámsav (TrpHA) előállítása

Az $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok redukciójához használt hidroxámsav származékokat (HisHA, TrpHA) a SZTE GYTK Gyógyszerkémia Intézet munkatársai állították elő, korábbi irodalmi módszer alapján [92][93], *L*-hisztidin-metil-észter-dihidrokloridból, illetve *L*-triptofán-metil-észter-hidrokloridból kiindulva, különböző optimalizálási lépések végrehajtásával.

A **HisHA** szintézise során első lépésben 1,0 g (4,13 mmol) *L*-hisztidin-metil-észter-dihidrokloridot 10 cm³ vízben oldottak fel egy gömblombikban. Ezen oldathoz 20 cm³ 50 w%-os hidroxil-amin oldatot adtak nagy feleslegben, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertették. A maximális konverzió elérése után (24 óra, amikor a vékonyréteg-kromatográfiás reakciókövetés során már több kiindulási anyag jelenléte nem volt kimutatható) az elegyet jeges fürdővel lehűtötték, a képződött kristályokat leszűrték és hidegvízzel (2 × 7 cm³) mosták. A tisztított HisHA jellemzéséhez ¹H-NMR és ESI-MS méréseket végeztek. Hozam: 440 mg (63 %); O.p.: 176–178 °C; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 2,51–2,59 (1H, m); 2,75–2,83 (1H, m); 3,25–3,31 (1H, m); 6,77 (1H, s); 7,50 (1H, s); MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 171,16$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 193,17$.

A **TrpHA** szintéziséhez 1,0 g (3,93 mmol) *L*-triptofán-metil-észter-hidrokloridot használtak kiindulási ligandumként [93][92], amit 8 cm³ vízben oldottak fel. Ezen oldathoz 20 cm³ hidroxil-amin oldatot adtak, majd a reakcióelegyet szintén szobahőmérsékleten kevertették 24 óráig. Az elegyet hasonlóan a másik ligandumhoz jeges fürdővel lehűtötték, a képződött kristályokat leszűrték és hidegvízzel (2 × 5 cm³) mosták. A tisztított TrpHA-at ¹H-NMR és ESI-MS mérésekkel minősítették. Hozam: 474 mg (55 %); O.p.: 183–185 °C; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 2,68–2,76 (1H, m); 2,95–3,04 (1H, m); 3,34–3,39 (1H, m); 6,95 (1H, t, $J = 7,3$ Hz); 7,05 (1H, t, $J = 7,4$ Hz); 7,12 (1H, s); 7,32 (1H, d, $J = 7,8$ Hz); 7,55 (1H, d, $J = 7,9$ Hz); 10,80 (1H, s); MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 219,99$.

4.2.2. B₁-vitaminnal stabilizált Au NCs (B₁-Au NCs) előállítási folyamata

A B₁-Au NCs szintézise során B₁: $[\text{AuCl}_4]^-$ /25:1 molarányt alkalmaztam $c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,001$ M kiindulási koncentráció beállítása mellett. A szintézis első lépéseként 1,667 cm³ 0,15 M koncentrációjú B₁ oldatot 7,333 cm³ MQ-vízzel hígítottam, majd 0,1 M koncentrációjú NaOH oldat segítségével az oldat pH-ját pH = 3,50 értékre állítottam. Második lépésként 1 cm³ 0,01 M HAuCl₄ oldatot adtam hozzá és a komponensek elegyítését

követően a mintát 24 órán át $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten termosztáltam. A szintézis idő leteltével az aurát-ionokra jellemző kezdeti intenzív sárga szín a redukciós folyamat során fokozatosan elhalványodott, végül halványbarna színűvé változott, ami egy új termék megjelenésére utalt. A szintézist követően a vizes diszperzióban kisebb aggregátumok voltak megfigyelhetők, melyeket 13000 rpm fordulatszámon 30 percig történő centrifugálással távolítottam el a diszperzióból. Utolsó lépésként az elreagálatlan komponensek diszperzióból történő eltávolítása végett 60 perc dialízissel is tisztítottam a mintát, melyhez 1 kDa vágási értékkel (MWCO) rendelkező cellulózcsövet (Pur-A-Lyzer TM Mega 1000, Sigma-Aldrich Kft.) alkalmaztam. A végleges fémkoncentrációt ICP-MS mérésekkel határoztuk meg, mely vizsgálatok kivitelezésében Dr. Galbács Gábor csoportja segédkezett. A kiindulási $c = 1,00\text{ mM}$ helyett $c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,98\text{ mM}$ volt meghatározható a redukciós folyamat és a tisztítás után. Ezt a vizes diszperziók hígításánál minden esetben figyelembe vettem.

4.2.3. Nikotinamiddal stabilizált Au NCs (NAM-Au NCs) előállítási folyamata

A kéken emittáló NAM-Au NCs szintézisének NAM:[AuCl₄]⁻/10:1 molarányt alkalmaztam $c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,005\text{ M}$ kiindulási koncentráció beállítása mellett. A fémionok redukciójának elősegítése érdekében Na-citrátot is alkalmaztam, melynek koncentrációja 0,01 M volt a reakcióelegyben. A szintézis első lépéseként 8,333 cm³ 0,3 M koncentrációjú B₃ oldatot hígítottam 38,155 cm³ MQ-vízzel, majd 2 perc kevertetés után 0,1 M koncentrációjú NaOH oldat segítségével az oldat pH-ját pH = 8,0-ra állítottam. Második lépésben 2,500 cm³ Na-citrátot, valamint 1,012 cm³ HAuCl₄ oldatot adtam hozzá. A komponensek összekeverése után a mintát 24 órán át $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten termosztáltam. A szintézist követően két lépcsős tisztítási protokollt alkalmaztam. Elsőként a kis mennyiségben jelenlévő aggregátumokat távolítottam el 13000 rpm fordulatszámon 30 perces centrifugálással, majd a mintákat 180 percig dializáltam (Pur-A-Lyzer TM Mega 1000, cut-off: 1 kDa, Sigma-Aldrich Kft.). Hasonlóan az előző alfejezetben leírtak alapján a végleges fémkoncentrációt ICP-MS mérésekkel határoztuk meg, mely vizsgálatok kivitelezésében Dr. Galbács Gábor csoportja segédkezett. Azon rendszerekben, ahol Na-citrátot is alkalmaztam a redukció közel 99,9 %-os eredményt hozott, így itt a kiindulási fémion analitikai koncentrációját vettem a számolások alapjául. A dialízist meghatározóan addig folytattam, míg a NCs nem diffundáltak át a membránon. A féligáteresztő membránon átjutott NCs mennyiségét (~ 5 % a PL intenzitás csökkenése alapján) figyelembe vettem a minták hígítása során.

4.2.4. Hisztidinhidroxámsavval stabilizált Au NCs (HisHA-Au NCs) előállítási folyamata

A szintézis során első lépésként $1,497 \text{ cm}^3$ $0,0167 \text{ M}$ HisHA vizes oldatot elegyítettem $2,953 \text{ cm}^3$ MQ-vízhez, majd ezen oldathoz néhány perc keverés után $0,05 \text{ cm}^3$ Na-citrátot ($c_{\text{Na-citrát}} = 1 \text{ M}$) és $0,5 \text{ cm}^3$ HAuCl_4 oldatot ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 10 \text{ mM}$) is adtam. A komponensek homogenizálását követően a mintát 48 órán keresztül $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on termosztáltam, ahol a rendszer pH-ja $\text{pH} = 7,0$ volt. A NCs előállításához HisHA:[AuCl₄]⁻/5:1 molarányt alkalmaztam, $1,0 \text{ mM}$ aurát koncentráció beállítása mellett. A klaszterképződés elősegítésére a mintában HisHA/Na-citrát 1:2 molarányt használtam. A szintézist követően a rendszerben képződött kisebb aggregátumokat 30 percig 13000 rpm -en történő centrifugálással távolítottam el, majd a végterméket 180 percig tartó dialízissel is tisztítottam (Pur-A-Lyzer TM Mega 1000, cut-off: 1 kDa , Sigma-Aldrich Kft.). Ennél a rendszernél is a ligandum mellett Na-citrát segítette a redukciót, mely révén az aurát-ionok közel $99,9 \%$ -a kiredukálódott az ICP-MS mérések alapján.

4.2.5. Triptofánhidroxámsavval stabilizált Au NCs (TrpHA-Au NCs) előállítási folyamata

A klaszterek előállításához első lépésben $4,5 \text{ cm}^3$ $0,0022 \text{ M}$ koncentrációjú TrpHA oldatot készítettem, majd az oldat pH-ját $0,1 \text{ M}$ sósavval $\text{pH} = 7,0$ -re állítottam. Második lépésben $0,5 \text{ cm}^3$ $0,01 \text{ M}$ HAuCl_4 oldatot adagoltam hozzá. A komponensek összekeverése után a mintát 48 órán keresztül $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on termosztáltam. A szintézis során az egyes komponensek mennyisége szerint TrpHA:[AuCl₄]⁻/2:1 moláris arányt alkalmaztam, $c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,001 \text{ M}$ kiindulási koncentráció beállítása mellett. A szintézis idő leteltével az aurát-ionokra jellemző kezdeti intenzív sárga szín a redukciós folyamat során fokozatosan elhalványult, végül halványbarnára változott, ami a végtermék kialakulására utalt. A szintézist követően a kisebb aggregátumokat 30 percig 13000 rpm -en történő centrifugálással távolítottam el, majd a vizes mintát 120 percig dializáltam (Pur-A-Lyzer TM Mega 1000, cut-off: 1 kDa , Sigma-Aldrich Kft.). Az ICP-MS mérések alapján $c = 1,0 \text{ mM}$ kiindulási arany koncentráció $c = 0,99 \text{ mM}$ értékre változott.

Mind a négy rendszer esetén a tisztított vizes diszperzió 2–3 hétig normál hűtőszekrényből ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$) felhasználható, mivel nem figyelhető meg szemmel látható és spektrális vizsgálatok alapján sem változás vagy aggregáció, emellett a tisztított vizes diszperzió fagyasztva szárítható, és a liofilizált porok $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -on hónapokig tárolhatók.

4.3. Vizsgálati módszerek

4.3.1. Optikai sajátságok jellemzésére alkalmazott műszerek

A **spektrofluorimetria** napjainkban gyakran alkalmazott vizsgálati módszer elsősorban nagy érzékenysége és sokoldalúságának köszönhetően. A fluoreszcencia jelenség során egy fluorofór csoportot, vagyis egy emisszióért felelős molekularészt tartalmazó minta elektronjai az UV-látható sugárzás abszorpciója révén szingulett gerjesztett (S1) állapotba jutnak, majd fluoreszcens fotonok kibocsátásával relaxálódnak szingulett (S0) alapállapotba, azaz a fénykibocsátást nem előzi meg spinátfordulás. A folyamatot kísérő sugárzás arányos a két állapot közötti energiakülönbséggel. A fluorofórok többsége delokalizált π -elektronokat tartalmaz, ilyenek az aromás vegyületek és a több konjugált kettős kötést tartalmazó telítetlen molekulák. Emellett a nukleofil szubsztituensek ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$ stb.) is hozzájárulnak a fluoreszcencia növeléséhez, mivel az alapállapot és az első gerjesztett állapot között elősegítik az elektronátmenetet, vagyis növelik a π -elektronok delokalizációját. A mérési módszerből származó információk a mintából gerjesztés hatására kisugárzott fluoreszcens fotonok hullámhossza (emisszió) és mennyisége (intenzitás), valamint a két paraméter változása.

A fluoreszcencia emissziós spektrumok rögzítéséhez egy ABL&E-JASCO FP-8500 típusú spektrofluorimétert alkalmaztam. A mérések kivitelezéséhez 1 cm úthosszú négyoldalú kvarc küvettát használtam. A bemeneti és kimeneti résszélességet (slit érték) a minta fluoreszcencia intenzitásától függően 2,5–5 nm-re állítottam. A scan sebesség minden esetben 200 nm/perc, a felbontás pedig 1 nm volt.

Az **abszolút kvantumhasznosítási tényezőt** (ϵ_{in}) a mintából fluoreszcenciaként kibocsátott fotonok (N_{em}) számának és a gerjesztett fényben elnyelt fotonok (N_{abs}) számának hányadosaként határozzuk meg. Az abszolút módszer lehetővé teszi a minta teljes fluoreszcenciájának detektálását és integrálását az integráló gömb segítségével, ami pontosabb mérést tesz lehetővé. A mérés kivitelezéséhez, melyhez Dr. Ungor Ditta nyújtott segítséget, egy ABL&E-JASCO ILF-835 típusú integráló gömbbel felszerelt ABL&E-JASCO FP-8500 típusú spektrofluorimétert használtunk. A kalibráláshoz ABL&E-JASCO ESC-842 kalibrált WI fényforrást alkalmaztunk, ami referenciaként is szolgált. Az adatok kiértékeléséhez az ABL&E-JASCO SpectraManager 2.0 szoftvert használtunk, mely a következő összefüggés (**4. egyenlet**) alapján számolja a kvantumhasznosítási tényező értékét:

$$\varepsilon_{in} = \frac{N_{em}}{N_{abs}} = \frac{E_2}{L_1 - L_2} \quad (4)$$

ahol E_2 emissziós intenzitás, L_1 gerjesztő fény intenzitás, L_2 szórt gerjesztési intenzitás. A kvantumhasznosítási tényezőt QY% jelöléssel, %-ban kifejezett értékben tüntetjük fel, ami $\varepsilon_{in} \times 100$. A PhD utolsó évében a mérés technikát elsajátítva a méréseket reprodukív módon, saját magam is elvégeztem.

A **fluoreszcencia élettartam (τ)** méréseket Horiba DeltaFlex készülékkel Dr. Ungor Ditta és Hajdú Cintia végezte, az időkorrelált egy-foton számlálás (TCSPC) módszerével, mivel ezen készülék a csoportban nem volt megtalálható. A mérésekhez 1 cm optikai úthosszúságú küvetát használtak. A gerjesztő fényforrás egy DeltaDiode impulzuslézer ($\lambda_{lézer} = 371$ nm). Az emittált fényt NCs specifikus emissziós hullámhosszértékek mellett detektálták (résszélesség 6–8 nm). A műszer válaszüzidejét standard HoribaLudox® SiO₂ részecskékkal mértük. Az élettartam komponenseket a rögzített lecsengési görbék exponenciális illesztésével határozták meg a Horiba EZTime programmal, az illesztés pontosságát jelző χ^2 értékek megadásával. A fluoreszcencia lecsengési görbéket maximum háromexponenciális egyenlet (**5. egyenlet**) illesztésével értékeltük, melyben már én is közreműködtem:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n B_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (5)$$

ahol $I(t)$ NCs fluoreszcencia intenzitása, τ az egyes fluoreszcencia élettartam komponensek értékei, a B_i pedig az egyes komponensek teljes fluoreszcenciához való hozzájárulásának értékei. A lecsengési görbéket nem minden esetben illesztettük a fenn említett háromexponenciális ($n = 3$) egyenlettel, hiszen volt olyan rendszer, ahol a kétkomponensű ($n = 2$) adta a legjobb illesztést.

Az **ultraibolya-látható (UV-Vis)** fény elnyelésekor a molekulák elektroneloszlása megváltozik, azaz megfelelő energiájú elektromágneses sugárzás elnyelése által a molekula gerjesztődik, majd a foton kibocsátása közben energiája csökken, alapállapotba jut vissza. Ha besugárzunk egy oldatot egy I_0 intenzitású monokromatikus fénysugárral, annak intenzitása csökken a fény abszorpciója miatt, ami egyrészt az anyagi minőség, másrészt az elnyelő molekulák mennyiségének függvénye, tehát mind minőségi, mind mennyiségi információkat hordoz.

Az ultraibolya-látható spektroszkópia mérések során a spektrumokat egy JASCO V-770 típusú kétfényutas spektrofotométerrel rögzítettem $\lambda = 200$ –800 nm közötti

hullámhossz tartományon. A mérésekhez 1 cm úthosszú, négyoldalú kvarc küvettát használtam minden esetben és a referencia oldat a kísérleti körülményektől függően MQ-víz vagy megfelelő puffer (pl. PBS) oldat volt. Fotometriás méréseket több esetben is végeztem a NCs stabilizáló ligandumainak mennyiségi analízisére, az arany kolloidok képződésének igazolására, antioxidáns sajátság meghatározására, illetve a NCs szenzorikai vizsgálataihoz hozzájárulva a fluorimetriásan rögzített emissziós spektrumok korrekciójához is. Amennyiben az abszorbancia $A > 0,05$ akkor a mért intenzitás korrekciója szükséges, amit az alábbi **6. egyenlet** szerint hajtottunk végre [94]:

$$I_{korr} = I_{mért} \times 10^{(A_{EX} + A_{EM}) / 2} \quad (6)$$

ahol I_{korr} és $I_{mért}$ a korrigált és a mért fluoreszcencia intenzitások, A_{EX} és A_{EM} a vizsgált minta gerjesztő és emissziós hullámhosszon mért abszorbancia értékei. Az egyes mérés típusok során alkalmazott mérési körülményeket az adott eredmény tárgyalásánál foglaljuk össze.

4.3.2. A NCs karakterizálásához alkalmazott vizsgálati módszerek

A **részecskeméret** meghatározására kiválóan alkalmas a dinamikus fényszórásmérés (DLS) amiatt, hogy a kolloid rendszerről szóródó fény intenzitása, polarizációja és szögeloszlása függ a szóró részecskék méretétől és alakjától, valamint meghatározható a polidiszperzitás is. A részecskeméret az oldatból szétszóródott fény intenzitásának véletlenszerű változásának mérésével határozható meg. Az alapjelenség a Brown-mozgásra épül, ami szerint a részecskék folyamatosan ütköznek az oldószer molekulákkal. A részecskék mozgását az ütközések által keltett energia indukálja, így a kisebb részecskék gyorsabban mozognak. A véletlenszerű mozgást a Stokes-Einstein egyenlet modellezi.

A felületi töltött részecskéknél a folyadék belseje közötti potenciálkülönbség és a részecske valós felszíne különböző részekre van osztva, melyet elektromos kettősrétegnek nevezünk. A két ilyen terület, az ún. nyírási sík határán megjelenő felületi potenciál, ami a ζ -potenciál. A ζ -potenciál értéke szolgáltat információt arról, hogy mennyire stabil az adott diszperzió. Ha értéke 0 körüli, a rendszer instabil, könnyen összetapadnak, aggregálódnak a részecskék. Ha a mért érték 0-tól jóval eltér (± 25 mV), a rendszer stabil, a részecskék taszítják egymást, nincs aggregálódás. A dinamikus fényszórás és ζ -potenciál méréseket egy Malvern Zetasizer NanoZS típusú műszerrel ($\lambda = 633$ nm He-Ne lézer) végeztem, mellyel a méret 0,3 nm és 10 μ m közötti tartományon mérhető. Az eredmények értékelése során a mért paramétereket (hidrodinamikai átmérő (d), polidiszperzitási index (PDI); ζ -potenciál (döntően a Smoluchowski modell alapján)) 5–10 mérés átlagaként számítottam. A NCs

esetén a primer klaszterméret sok esetben a rendkívül kis méret miatt (főleg a kéken emittáló NCs esetén) fényszórás mérésekkel nem határozható meg pontosan; csak kisebb klaszter aggregátumok azonosítására alkalmas.

Az NCs nanométer alatti mérete miatt a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) nem eredményez értékes adatokat az egyedi (primer) NCs méretéről, de egy esetben sikerült **nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópos (HRTEM)** felvételeket készíteni. Ehhez egy FEI Tecnai G2 20x-Twin típusú HRTEM-mel dolgoztunk, 200 kV gyorsítófeszültség és LB_6 katód alkalmazásával. Az átlagos méretet ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg.

A **Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)** vizsgálatok során az IR tartományba eső elektromágneses sugárzás energiájával a kisebb energiaátmenetekkel jellemezhető rezgési és forgási energiaszintekre gerjeszthetünk. Eközben egyes hullámhosszú infravörös fotonok elnyelődnek, így egy abszorpciós spektrum áll rendelkezésünkre a mérési adatok Fourier-transzformációjával. A spektrumokból következtetéseket vontunk le, arra vonatkozóan, hogy a különböző ligandumok, mely csoportja képes stabilizálni a fémmagot.

Az FT-IR mérések során egy egyszeres reflexiójú ATR Pro One feltétellel ellátott Jasco FT/IR-4700 spektrométert alkalmaztunk. A méréseket azonos pH érték beállítása mellett készített, liofilizált pormintákon végeztük, a spektrumokat 128 interferogram átlagolásával 4 cm^{-1} felbontás mellett, $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ tartományon rögzítettük. A spektrumok rögzítésében Dr. Varga Norbert segített.

Az arany oxidációs állapotának igazolása érdekében a **röntgen fotoelektron spektroszkópiás (XPS)** méréseket Dr. Samu Gergely végezte el egy PHOIBOS 150MCD9 félgömb analízátorral felszerelt SPECS műszerrel $10^{-9}\text{--}10^{-10}$ mbar tartományon lévő főkamra nyomáson. Az analízátor fix átviteli üzemmódban volt, 40 eV átmenő energiával az előzetes szkennelésekhez és 20 eV átmenő energiával a nagy felbontású szkennelésekhez. A mintát többlépcsős ciklikus liofilizálással Pt-lemezre vittük fel. Az Al $K\alpha$ röntgenforrást 200 W teljesítményen használták. A töltésreferenciát a minta felületén lévő Pt hordozó 4f-csúcsára (71,0 eV) végezték. A spektrumok kiértékeléséhez a CasaXPS kereskedelmi szoftvercsomagot alkalmazták.

A NCs fémtartalmának tisztítás utáni meghatározására az **induktív csatolású plazma-tömegspektrometriás (ICP-MS)** méréseket a SZTE TTIK Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszékén Dr. Galbács Gábor csoportja végezte el egy Agilent 7700x típusú készüléken, amely kvadropólus tömeganalízátorral van felszerelve. A mintákban lévő

fém összkoncentrációjának vizsgálatához a NCs-et 1 órán keresztül forró vízben oldották. A kalibrálást (Au esetén) Agilent Multi-Element Calibration Standard-3 segítségével végezték.

A tisztítási lépésben alkalmazott **centrifugáláshoz** egy nagy sebességű Z 366 K – Hermle típusú centrifugát használtam. Fagyasztva szárítást (**liofilizálás**) alkalmaztam a porminták előállításához az FT-IR mérések kivitelezéséhez, illetve a NCs hosszú idejű tárolásának biztosításához. Ehhez egy Christ Alpha 1-2 LD plus típusú liofilizálót használtunk. Ezzel az eljárással a NCs stabilan tárolhatóak, illetve a klaszterek több hét vagy akár hónap után is rediszpergálhatóak.

4.3.3. Fehérje-NCs kölcsönhatások kvantitatív jellemzéséhez alkalmazott műszerek

A **felületi plazmon rezonancia (SPR)** a felületi töltéssűrűség oszcillációja, mely hatására a fémfelület és a dielektrikum határán a határfelülethez közel erős, de attól távolodva exponenciálisan csillapított elektromos erőter alakul ki. Szenzorikai alkalmazások esetén a legelterjedtebb megvalósítás az Otto (prizma/víz/arany) és a Kretschmann (prizma/arany/víz) elrendezés. A szenzorként való alkalmazásra az nyújt lehetőséget, hogy a gerjesztéshez alkalmazott polarizált fénynek a totálreflexió során a prizma és a fémréteg határfelületéről visszaverődő intenzitása egyaránt függvénye a beesési szögnek, a gerjesztési hullámhossznak a fémréteg vastagságának valamint a prizma, a fém és dielektrikum törésmutatójának [95].

Az Au NCs és a BSA közötti *in vitro* kölcsönhatás azonosítása érdekében felületi plazmon rezonancia méréseket végeztem két-csatornás szögmodulált Reichert2SPR platform segítségével. A méréstechnikát jól ismertem és használtam, mert MSc szakdolgozatom fehérje-kismolekula kölcsönhatások értelmezését foglalta magában. A Reichert Technologies által szállított 50 nm-es arany bevonatú SPR chipet használtam a kötési reakció vizsgálatához. A chipet piranha oldattal (3:1 H₂SO₄:H₂O₂) 20 másodpercig tisztítottam, majd MQ-vízzel átöblítettem, végül nitrogéngázzal szárítottam. A szenzorfelület funkcionálizálását követően a kiválasztott Au NCs különböző koncentrációjú mintáit áramoltattam az előzetesen fehérjével immobilizált arany szenzor felület felett, miközben a szenzorjel törésmutató egység (RIU) dimenzióban kerül rögzítésre a mérés során eltelt idő függvényében. Az asszociációs idő 60 másodperc volt 30 µL/perc áramlási sebesség mellett. A törésmutató egységek változásának az idő függvényében rögzített görbéi, az ún. szenzorgramok a berendezés vezérlő és adatrögzítő szoftverekből szöveges fájlok formájában nyerhetők ki. Az adatok feldolgozása és értékelése a Microsoft által kifejlesztett Excel táblázatkezelő program segítségével történt.

Az **izoterm titrációs kalorimetria (ITC)** méréseket a MicroCal Inc. (Northampton, MA, USA) VP-ITC mikrokcaloriméterrel végeztük, ami két független, érzékeny fűtő/hűtő rendszerrel rendelkezik, amelyeket mikroelektronika vezérel a visszacsatolás elve alapján. Az elsődleges hűtő/fűtő rendszer állandó értéken tartja a referenciacella hőmérsékletét az adiabatikus külső köpenyhez képest, amely általában 1 °C-kal alacsonyabb. Egy másik fűtőrendszer kompenzálja a minta injektálása által okozott termikus jelenségből eredő hőmérséklet különbséget a mérő- és a referenciacella között. A mérés során a műszer megpróbálja fenntartani a mintakamra melletti referencia cellával azonos hőmérsékletet, és méri a szükséges fűtő teljesítményt. Ha a mintacellában endoterm reakció zajlik, a cellát jobban kell fűteni, mint a referencia cellát, mivel ez a folyamat hőt von el. Ha a reakció exoterm, a hőfelszabadulás azt jelenti, hogy a mintacellának kevesebb fűtésre van szüksége ugyanazon hőmérséklet fenntartásához. A fűtési vagy hűtési teljesítmény időbeli változása adja a hőmennyiség változását (dQ/dt), amelyet a vezérlő szoftver a mérés során eltelt idő függvényében rögzít.

A vizsgálatok során térfogategységeként 8 μ L BSA oldatot adagoltunk 35 lépésben állandó keverés mellett az Au NCs 1,4 cm^3 térfogatú diszperzióiba. Minden adagolási lépésben 16 másodperc alatt 8 μ L fehérjeoldatot injektáltunk, két injektálási lépés között a várakozás ideje 400 másodperc. A hígítási hatásnak a regisztrált entalpogramokból való kivonásához a megfelelő referencia vakpróbákat is ugyanilyen körülmények között végeztük el (fehérjeoldat MQ-vízben történő titrálása). A mérések megkezdése előtt minden mintát 10 percig gáztalanítottunk a buborék képződés elkerülése végett. A méréseket, melyek elsajátításában Dr. Juhász Ádám nyújtott segítséget, 25 °C-on végeztük, a mintacellát 240 rpm keverési sebességgel folyamatosan kevertettük.

4.3.4. Antioxidáns vizsgálatok kivitelezése

Az ORAC vizsgálat során a méréseket általában két egymástól független módon végzik: (I) a fluoreszcencia időfüggő jelvesztését mérik állandó antioxidáns koncentráció mellett, (II) a fluoreszcencia intenzitásokat mérik azonos reakcióidőben, különböző antioxidáns koncentrációval. Mérésünk során mi az I. esetet választottuk és a méréseket több antioxidáns koncentráció alkalmazása mellett is kiviteleztük.

A mérés során, melynek alapjait a 2.4.1. alfejezet foglalja össze, a fluoreszcencia spektrumokat $\lambda = 500\text{--}650$ nm között regisztráltuk a reakció indítása után 10 percenként az emisszió teljes megszűnéséig. Az értékeléshez $\lambda = 485$ nm és $\lambda = 515$ nm értékeket használtunk a gerjesztési és emissziós hullámhosszként (megfelelő sorrendben említve).

Adott mennyiségű antioxidáns anyagot és 0,078 cm³ fluoreszcein oldatot ($c = 1,0 \mu\text{M}$) pipettáztunk PBS ($c_{\text{NaCl}} = 0,15 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,4$) pufferbe. A reakcióelegyet sötétben 15 percig 37 °C-on inkubáltuk. A vizsgált anyagok koncentráció tartománya 1–100 μM volt (a számított koncentráció a ligandumokra volt vonatkoztatva). Az inkubálás után 0,1 cm³ 200 mM AAPH oldatot adtunk a reakció elindításához, mely a ROS termelésért felel. A mérések előtt a minták össztérfogatát 2,0 cm³ pufferoldattal egészítettük ki a megfelelő optikai jel detektálás érdekében. A hidrofil Trolox (E-vitamin) analóg molekula referenciaként szolgált. Az aktivitás összehasonlításához és számszerűsítéséhez az ORAC értéket a következő képlettel (**7. egyenlet**) határoztuk meg [70]:

$$\text{ORAC érték} = \frac{c_{\text{trolox}} \times \text{Net}_{\text{AUC minta}} \times k}{\text{Net}_{\text{AUC trolox}}} \quad (7)$$

ahol c_{trolox} a Trolox standardizált koncentrációja (50 μM), $\text{Net}_{\text{AUC minta}}$, $\text{Net}_{\text{AUC trolox}}$ értékei a lecsengési görbék alatti nettó területek a minta 50 μM NAM/B₁ tartalma és a Trolox oldat 50 μM tartalma esetén, k a minták hígítási tényezője, amely esetünkben négyszeres volt. A Net_{AUC} értékeket a vakminta korrekció (amelyben nem volt jelen antioxidáns) után az időfüggő bomlási görbék integrálásával számoltuk ki.

A TEAC vizsgálatához a törzs-és munkaoldatokat minden esetben frissen készítettük. Az ABTS munkaoldat két törzsoldat összekeverésével készült, egy 7 mM koncentrációjú ABTS és egy 2,45 mM koncentrációjú K₂S₂O₈ oldatot készítettünk, amit sötétben (0–4 °C-on) tartottunk. Ezt követően 5–5 cm³ törzsoldatot összekevertünk és 12–16 órán át szobahőmérsékleten tartottuk, hogy ABTS munkaoldatot kapjunk. A teszthez a mintaoldatokat, 0,2 cm³ ABTS munkaoldat és 0,01 cm³ mintaoldat összekeverésével készítettük, amely azonos ligandum koncentrációban (5–100 μM) tartalmazta az első mérés esetén B₁-vitamint vagy a B₁-Au NCs-et (illetve a másik mérés esetén a NAM vagy NAM-Au NCs-et). A mintákat 25 °C-on 5 percig sötétben tartottuk, majd 3 cm³-re hígítottuk és a hígított minták abszorbanciáját 734 nm-en regisztráltuk. A gátlási arányt (gátlás (%)) a következő egyenlettel (**8. egyenlet**) számítottuk [96]:

$$\text{Gátlás (\%)} = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100 \quad (8)$$

ahol az A_c és A_s a kontroll és a minta abszorbanciája 734 nm-en 5 perc után.

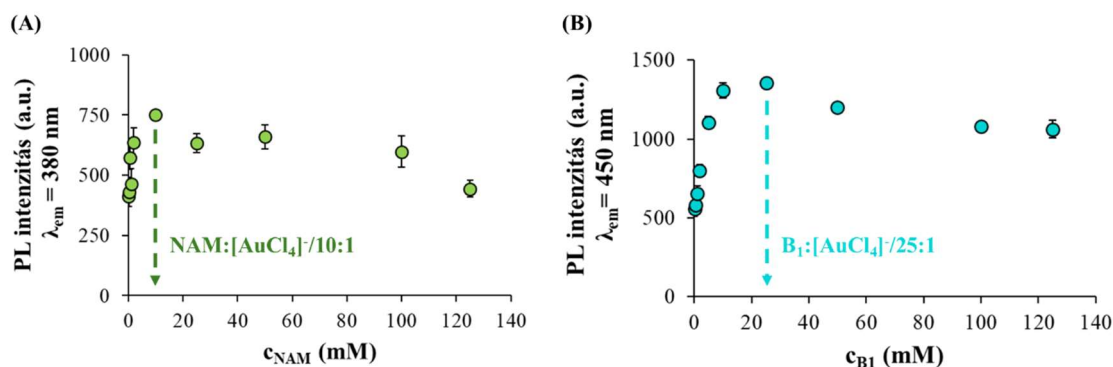
4.3.5. A HisHA-Au NCs és TrpHA-Au NCs szenzorikai méréseinek kísérleti paraméterei

Számos egy-, két- és háromértékű, para- illetve, diamágneses fémionnak (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Ce^{4+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cs^+ , Fe^{3+} , K^+ , La^{3+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Rb^+ , Rh^{3+} , Yt^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+}) a HisHA-Au NCs és a TrpHA-Au NCs fluoreszcenciájára gyakorolt hatását vizsgáltam. Minden esetben azonos térfogatú klaszter diszperziót alkalmaztam, tehát 500 μL klasztert adtam 1,100 mL MQ-vízhez, ezt követően külön-külön 400–400 μL az egy-, két- és háromértékű fémiont tartalmazó vizes oldatokból is adtam a diszperzióhoz, ahol a vizsgált ionok koncentrációja állandó volt ($c_{\text{fémion}} = 1 \text{ mM}$). A megfelelő ionerősséget ($c = 0,15 \text{ M}$) NaCl biztosította. Az Au NCs emissziós spektrumát szobahőmérsékleten vettem fel a hozzáadott ionok jelenlétében és hiányában egyaránt. Ezentúl a fluoreszcencia kioltást vagy erősítést mutató fémionok (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) detektálásához részletes PL kioltási vizsgálatokat végeztem 1 nM–100 mM koncentráció tartományon. A mérések részleteit az adott eredmény tárgyalásánál mutatom be.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A B₁-Au NCs és NAM-Au NCs előállítási folyamata vizes közegben

A NAM-Au NCs és a B₁-Au NCs előállítására olyan „zöldkémiai” szintézismódszert dolgoztam ki, ahol tanulmányoztam a NAM ill. a B₁-vitamin [AuCl₄]⁻ ionokkal való kölcsönhatása során a nevezett ligandumok és a fémionok molarányának, a reakcióelegy pH-jának, a prekursor fémsó koncentrációjának, a reakció hőmérsékletének és a szintézis időtartamának hatását az Au NCs előállítási lehetőségeire. Minden kísérletben egy paramétert változtattam és a reakcióelegyben képződő termékek emissziós spektrumait rögzítettem, ahol az emissziós maximum intenzitás értékeinek változását értelmeztem az adott paraméter változtatásának függvényében. A rendkívül jó vízdoldhatósággal rendelkező NAM és a B₁-vitamin kismolekulák redukálószerként való alkalmazhatóságának tanulmányozására egy olyan kísérlet sorozatot terveztem első lépésben, melyben a kiindulási reakcióelegyben a ligandum/[AuCl₄]⁻ moláris arányát szisztematikusan, széles tartományon változtattam 0,1:1–125:1 között, ahogyan azt a **14. ábra** is összefoglalja. A kiindulási [AuCl₄]⁻ ionok koncentrációját $c = 1,0$ mM értéknek állítottam be, mely a Kutatócsoportban korábban szintetizált Au NCs vonatkozásában gyakorta megfelelőnek mutatkozott. A fémionok és a biomolekulák molaránya nagy szerepet játszik a lehetségesen képződő nanoobjektumok méretében és karakterisztikus optikai tulajdonságaiban, hiszen, ahogyan az Irodalmi áttekintés 2.2.2. fejezetében is említettem (14. oldal), ha kellően nagy ligandum felesleget alkalmazunk a fémionok mennyiségéhez képest, akkor a klasszikus NPs kialakulását „eltolhatjuk” a szub-nanométeres mérettartományú NCs képződésének irányába.



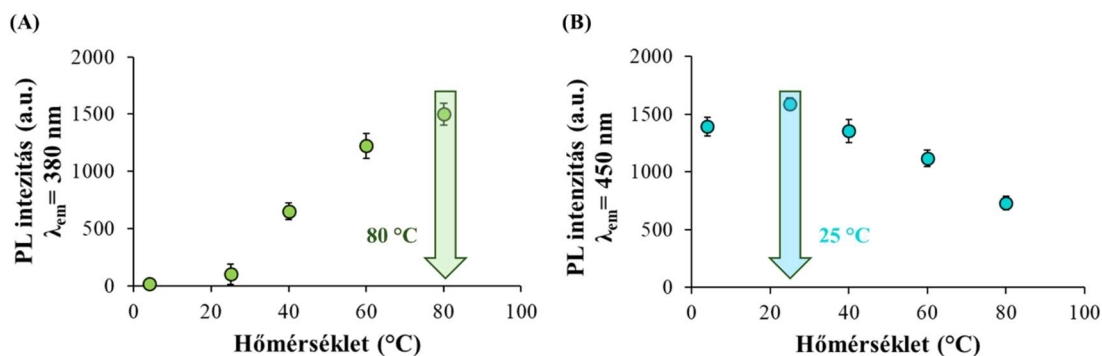
14. ábra: (A) NAM-[AuCl₄]⁻ rendszerben képződő termékek PL intenzitás maximumai a c_{NAM} függvényében ($c_{HAuCl_4} = 1,0$ mM, $\lambda_{ex} = 335$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm, pH = 7,1, T = 40 °C, t = 24 óra). (B) B₁-[AuCl₄]⁻ rendszerben mért PL intenzitás maximumok a c_{B1} függvényében ($c_{HAuCl_4} = 1$ mM, $\lambda_{ex} = 395$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm, pH = 3,1, T = 40 °C, t = 24 óra).

A **14.A. ábrán** a NAM-[AuCl₄]⁻ rendszer esetén mért PL intenzitás maximumok láthatóak 24 óra reakcióidő után különböző NAM-[AuCl₄]⁻ mólarányoknál. Jól látható, hogy a ligandum mennyiségének növelése egy adott arányig kedvezően hat a fluoreszcens termékek képződésére, hiszen egyre nagyobb fluoreszcencia intenzitás értékek figyelhetők meg $\lambda_{em} = 380$ nm-nél ($\lambda_{ex} = 335$ nm-en történő gerjesztés mellett), majd NAM:[AuCl₄]⁻/10:1 arány felett egyre kisebb ezen mért intenzitás érték. Hasonló tapasztalat figyelhető meg a **14.B. ábrán** a B₁-[AuCl₄]⁻ rendszer esetén is, ahol a fluoreszcencia intenzitás növekvő tendenciát mutat B₁: [AuCl₄]⁻/25:1 arányig ($\lambda_{em} = 450$ nm, $\lambda_{ex} = 395$ nm), majd ezt követően, a ligandum koncentráció további növelésével, csökkenő intenzitás látható. A detektált emissziós maximum hullámhossza mindkét rendszer esetében a mólarányok változtatásától függetlenül azonos értéknél figyelhető meg (mely nem a szabad ligandumokhoz rendelhető), így domináns szerkezeti átalakulást a szintézis folyamán nem feltételezünk. A mindkét esetben tapasztalt trend ennek megfelelően feltehetően annak tulajdonítható, hogy a növekvő ligandum felesleg egyre kedvezőbb a fémionok teljes mennyiségének redukciójához. A képződő NCs mennyisége így fokozatosan nő, de már a nagyobb mennyiségben jelenlévő kismolekulák szterikusan gátolhatják a fémmagok képződését, így a PL intenzitás csökkenő értéket mutat. A vizsgált B-vitaminokkal, mindkét esetben, kéken emittáló nanoszerkezetek állíthatóak elő, melyek irodalmi előzmények alapján a néhány atomos NCs kialakulására utalhat.

A szintézisek hőmérséklet változásának hatását vizsgálva megállapítható, hogy míg NAM esetén a hőmérséklet 25 °C-ról 80 °C-ra történő folyamatos növelése egyre kedvezőbb a klaszterek kialakulása szempontjából (**15.A. ábra**), addig a B₁ esetén már 25 °C-on (**15.B. ábra**) stabil, jól definiált optikai sajátsággal rendelkező nanoszerkezet szintetizálható és a hőmérséklet emelése kifejezetten kedvezőtlenül hat a NCs képződésére.

A különbség a kismolekulák hőérzékenységet összevetve elsőre nem értelmezhető, hiszen egyik sem hajlamos bomlásra magasabb hőmérsékleten. A különbség inkább keresendő a ligandumok szerkezeti tulajdonságaiban. Feltehetően a NAM lényegesen kisebb redukciós kapacitással rendelkezik az aurát(III)ionok Au⁰-vá történő teljes redukciójának megvalósításához (amit szerkezeti képlete is alátámaszt, hiszen csak egy amidcsoporttal rendelkező pirimidingyűrűt tartalmaz), így a hőmérséklet emelése ezt a redukciós folyamatot segíti. A B₁-vitamin már egy aminocsoporttal rendelkező pirimidingyűrűt tartalmaz, ill. egy S- és N-heteroatomot tartalmazó ún. tiazolgyűrűt is. A megnövekedett számú donorcsoportok jelenléte előnyös a redukció kivitelezéséhez és a kén donortom az

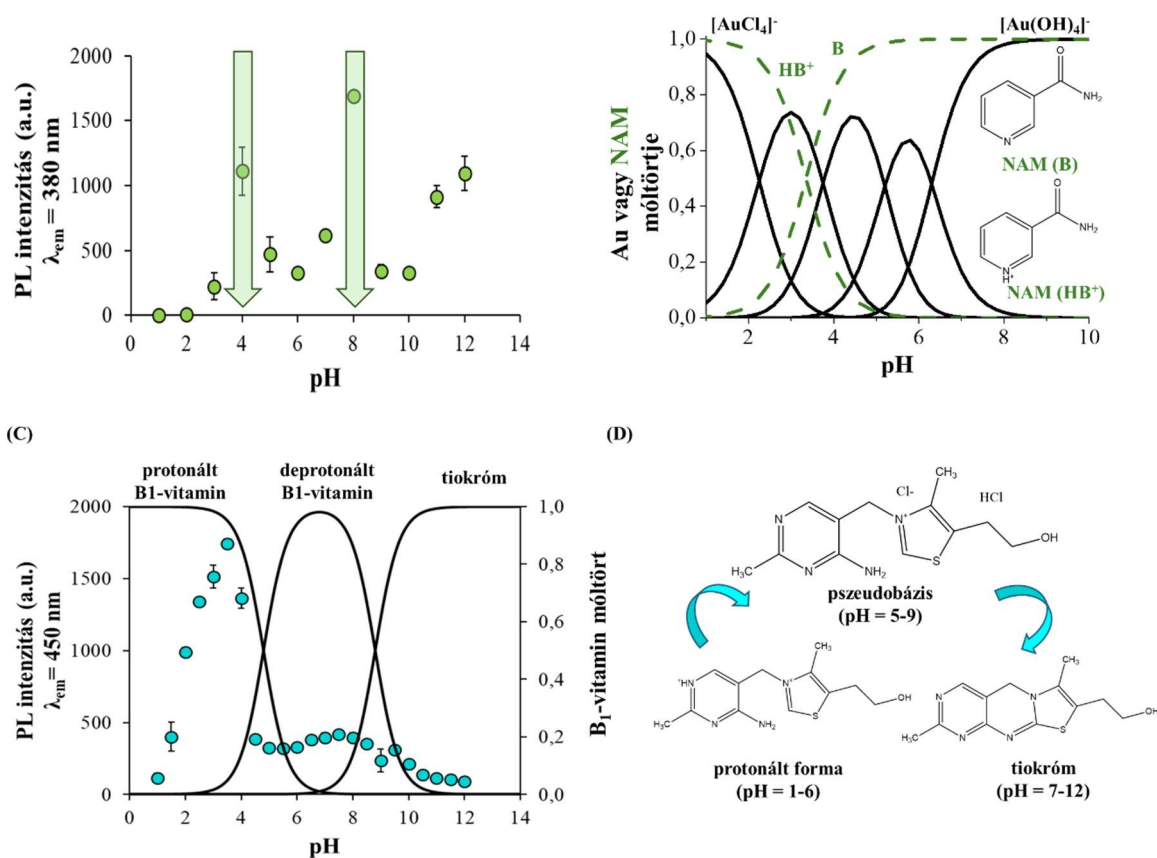
aurát(III)ionok koordinációját is elősegíti, ezáltal a NCs képződése preferáltabb lehet akár alacsonyabb hőmérsékleten is.



15. ábra: (A) NAM:[AuCl₄]⁻/10:1 rendszer PL intenzitásai eltérő hőmérsékleteken ($c_{\text{HAuCl}_4} = 1,0 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$, pH = 7,1, t = 24 óra). (B) B₁:[AuCl₄]⁻/25:1 rendszer PL intenzitásai eltérő hőmérsékleten ($c_{\text{HAuCl}_4} = 1 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, pH = 3,1, t = 24 óra).

A moláris arány és hőmérséklet kiválasztásán túl kiemelkedően fontos paraméter a ligandumot tartalmazó oldat kezdeti pH-ja. Ebből a célból a teljes pH-tartományt (pH = 1–12) vizsgáltam, ahol a kívánt pH értékeket 1,0 M-os HCl vagy NaOH oldattal állítottam be. A NAM-tartalmú rendszerben a NCs szintézisét számos, eltérő pH-jú vizes közegben is elvégeztem. Ahogyan a **16.A. ábra** mutatja, extrém savas közegben (pH < 3,0) a fluoreszcens termékek képződése nem indul meg. A pH növelésével egy lokális maximum figyelhető meg pH = 3,0–6,0 tartományon, mely maximum pH = 4,0-nél detektálható. Ez a kísérleti tapasztalat jó egyezést mutat a **16.B. ábrán** a ligandum deprotonálódási folyamatával, hiszen pH > 2,0 felett indul a semleges töltésű deprotonált forma ([B]) megjelenése, és közel pH ~ 4,0-től már 100 %-ban van jelen a rendszerben. Ez alapján feltételezhető, hogy a ligandum piridínium gyűrűjének deprotonálódása és azok [AuCl₄]⁻-ionokhoz történő koordinációja meghatározó lépés lehet a fluoreszcens termék kialakulásában [97][98]. Ezzel párhuzamosan megfigyeltük azt is, hogy pH = 6,0–10,0 tartományban egy második maximum is megfigyelhető pH = 8,0 esetén, ahol közel 1,6-szoros PL intenzitás növekedés érhető el, mint amit pH = 4,0 esetén detektáltam. A megfigyelés azonosítására figyelembe kell venni a tetrakloro-aurát hidrolitikus folyamatát is, melyet szintén a **16.B. ábra** szemléltet, melynek értelmében különféle összetételű, vegyes kloro-hidroxo-komplexek képződhetnek az oldat pH-jától függően, amelyek redoxpotenciál értékei is eltérőek. Irodalmi adatok alapján savas közegben az [AuCl₄]⁻ forma a meghatározó, $E_h([\text{AuCl}_4]^-/\text{Au}^0) = 1,0 \text{ V}$ redoxpotenciál értékkel. Ezzel szemben

pH = 8,0-nál már a $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ komplex a fő forma, $E_h([\text{Au}(\text{OH})_4^-/\text{Au}^0] = 0,60 \text{ V}$ értékkel [99][100]. Tehát a lúgos pH tartományon nemcsak a piridin gyűrűt tartalmazó molekula fokozott redukálóképessége és koordinációs hajlama segíti elő a klaszterek kialakulását, de az aurát(III)ionok teljes redukciója preferáltabbá válik az alacsonyabb redoxpotenciál miatt. A ligandum redoxpotenciál értéke pH = 4,0 és pH = 8,0 mellett közel azonos, mivel pH = 4,0 felett már nem történik szerkezeti változás. Erősen lúgos közegben (pH = 9,0–12,0) a PL intenzitás csökkenése figyelhető meg, ami a fluoreszcens termék stabilitásának csökkenése miatt történhet.



16. ábra: (A) NAM: $[\text{AuCl}_4]^-$ /10:1 arányú minták fluoreszcencia intenzitás értékei a reakcióelegy kiindulási pH értékének függvényében ($c_{\text{HAuCl}_4} = 1,0 \text{ mM}$, $\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 380 \text{ nm}$). (B) A NAM (szaggatott zöld vonal) és az aurát(III)ionok (folytonos fekete vonal) koncentráció eloszlási görbéi a pH függvényében. (C) A B₁-Au NCs PL intenzitás értékei (kék pontokkal) a reakcióelegy kezdeti pH értékének függvényében a tiamin koncentráció eloszlási görbéivel ($c_{\text{HAuCl}_4} = 1 \text{ mM}$, $\lambda_{ex} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$). (D) A B₁-vitamin különböző formáinak szerkezeti képletei eltérő pH értéken.

A B₁-Au NCs esetén viszont azt tapasztaltuk a regisztrált fluoreszcencia spektrumok alapján, hogy a pH = 3,5 a legkedvezőbb a klaszterek képződése szempontjából (16.C. ábra)

[101]. A savas közeg ($\text{pH} = 3\text{--}4$) értelmezhető egyrészt azzal az ismert ténnyel, hogy $\text{pH} > 6,0$ esetén a tiamin molekula tiazolcsoportjának gyűrűfelnyílása révén egy instabil triciklusos forma, a tiokróm kialakítása meghatározó (**16.D. ábra**), ami már egy oxidált forma révén kedvezőtlen a fémionok redukciójának elősegítéséhez, így a NCs kialakulásához. Mindezek mellett $\text{pH} = 3\text{--}4$ tartományon történik meg a ligandum piridínium gyűrűjének deprotonálódása és feltehetően azok $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionokhoz történő koordinációja, mely meghatározó folyamat lehet a fluoreszcens termék kialakulásában, ahogyan a NAM-tartalmú rendszer esetében is értelmeztük.

A prekursor fémionok teljes redukciójának elősegítése és a fluoreszcens NCs hozamának növelése érdekében a Na-citrát, mint enyhe segéd redukálószer alkalmazási lehetőségét is tanulmányoztam. A Na-citrát használata több korábbi rendszer esetén még inkább elősegítette a NCs képződését [47], főleg, ahol donorcsoportban szegényebb kismolekulákat alkalmaztak a Kutatócsoport munkatársai a fémionok redukciójához, így ennek szerepét ezen rendszerek esetén is szeretnénk volna tanulmányozni. A NAM-tartalmú rendszerek esetében azt tapasztaltuk, hogy a Na-citrát jelenlétében ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0 \text{ mM}$, $c_{\text{Na-citrát}} = 10 \text{ mM}$) kivitelezett szintézisnél a PL intenzitás megnövekedett (közel $2\times$ -es értékre) ugyanazon kísérleti körülmények mellett, így alkalmazása különösen kedvező. Ezzel szemben a $\text{B}_1\text{-Au}$ NCs rendszernél a Na-citrát alkalmazása nem okozott PL intenzitás növekedést, így a B_1 -vitamin mellett nincs szükség további redukálószer alkalmazására.

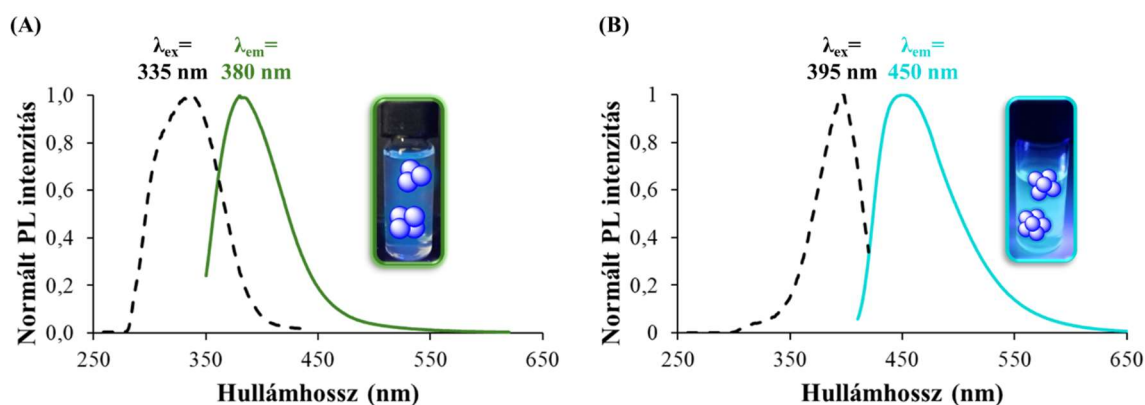
Végül további két paramétert is vizsgáltam, miközben a korábban meghatározott paramétereket állandó értéken tartottam: a redukálendő fémion kiindulási koncentrációját és a szintézis időtartamát. Az Au(III) ionok koncentrációját $0,1\text{--}7,0 \text{ mM}$ tartományon belül vizsgáltuk. A kísérletek alapján a NAM esetén a fémion koncentráció növelése fokozatosan növelte a PL intenzitást egészen $5,0 \text{ mM}$ értékig, majd ezen érték felett már aggregátumok, kisebb NPs képződtek a rendszerben, így az $5,0 \text{ mM}$ kiindulási koncentrációt választottuk a további vizsgálatokhoz. A B_1 -vitamin esetén a hasonló elgondolás alapján kivitelezett kísérlet azt mutatta, hogy maximális PL intenzitás a fémion $1,0 \text{ mM}$ -os koncentrációja esetén detektálható. A két rendszer esetén megfigyelhető különbség magyarázható azzal, hogy a NAM-tartalmú rendszerben a Na-citrát jelenléte miatt lényegesen nagyobb mennyiségben jelenlévő aurát-ionok redukciója is megvalósítható, míg a B_1 -tartalmú rendszerben, ahol nem alkalmazunk egyéb segéd redukálószer, ez nem valósulhat meg. A szintézis időtartamát néhány napon keresztül vizsgáltam olyan módon, hogy adott időnként a diszperzió PL spektrumait rögzítettem. Mindkét rendszer esetén a 24 órás szintézisidő eredményezi a

kéken emittáló termék képződését, hiszen 1 nap után további intenzitás növekedés már nem volt megfigyelhető.

A NCs részletes szerkezeti jellemzése előtt a képződő fluoreszcens termékek tisztítása nélkülözhetetlen, mivel a későbbi méréseket nagyban befolyásolhatja a redukációs folyamatban visszamaradt prekursor fémso vagy egyéb anyagok (ionok, oxidált ligandum *stb.*). Ezen tisztításhoz egy kétlépcsős tisztítási protokollt alkalmaztam, amit a szintézismódszerek fejezetben részletesen kifejtettem. A NAM-tartalmú rendszer esetén 80 percig, a B₁-vitamin rendszer esetén 60 percig történő dialízist alkalmaztam. A NAM-tartalmú rendszer esetén a hosszabb dialízisidő azért volt alkalmazható, mert a NCs lényegesen nem diffundáltak át a membránon. Ez a korábbi tapasztalatok alapján annak tulajdonítható, hogy a Na-citrát alkalmazása mellett előállított NCs némileg nagyobb mérettel rendelkeznek. A másik rendszer esetében azt tapasztaltuk, hogy 60 perc után már a NCs is megjelennek a dializáló közegben (a dialízis során a klaszterdiszperzió fluoreszcencia intenzitása csökkenni kezd, míg a dialízisközege fajlagos vezetése nő).

5.2. A NAM-Au NCs és B₁-Au NCs optikai és szerkezeti jellemzése

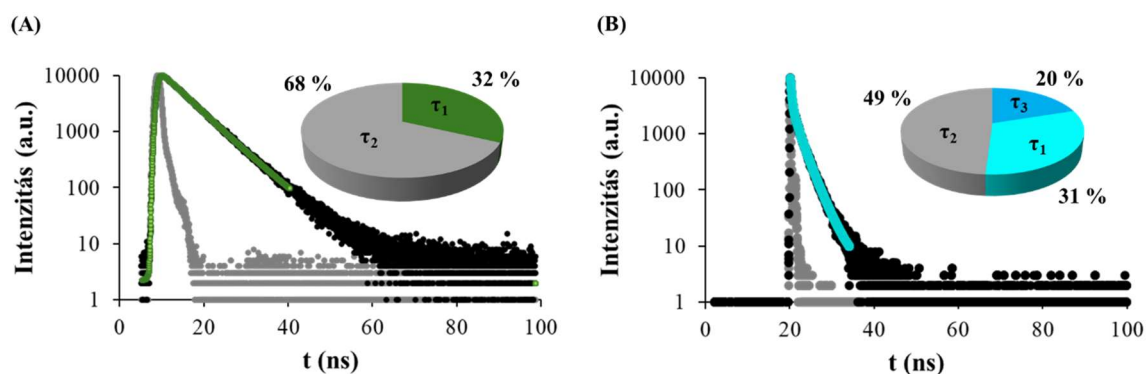
A tisztított NCs gerjesztési és emissziós spektrumait a **17. ábra** foglalja össze. Mindkét rendszerben viszonylag kis Stokes-eltolódás ($\Delta\lambda = 45\text{--}55\text{ nm}$) azonosítható és kéken emittáló NCs képződése figyelhető meg, amelyet a minták UV-lámpa alatti fotói is igazolnak.



17. ábra: (A) NAM-Au NCs és (B) a B₁-Au NCs gerjesztési (szaggatott) és emissziós (folytonos) spektrumai a mintáról UV-lámpa alatt készült fényképekkel ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,98\text{ mM}$, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$).

A fluoreszcens termékekre meghatároztuk az átlagos élettartam (τ) és főbb élettartam komponenseket, melyek értékei utalhatnak a NCs jelenlétére. A lecsengési görbék

kiértékelése után a NAM rendszer (18.A. ábra) esetén két fluoreszcens élettartam komponenst azonosítottunk: $\tau_1 = 4,3$ ns ($\alpha_1 = 32$ %) és $\tau_2 = 6,7$ ns ($\alpha_2 = 68$ %).



18. ábra: (A) A kéken emittáló NAM-Au NCs mért (szürke pontok) és illesztett (zöld vonal) fluoreszcencia lecsengési görbéi. (B) A B₁-Au NCs mért (szürke pontok) és illesztett (kék vonal) fluoreszcencia lecsengési görbéi.

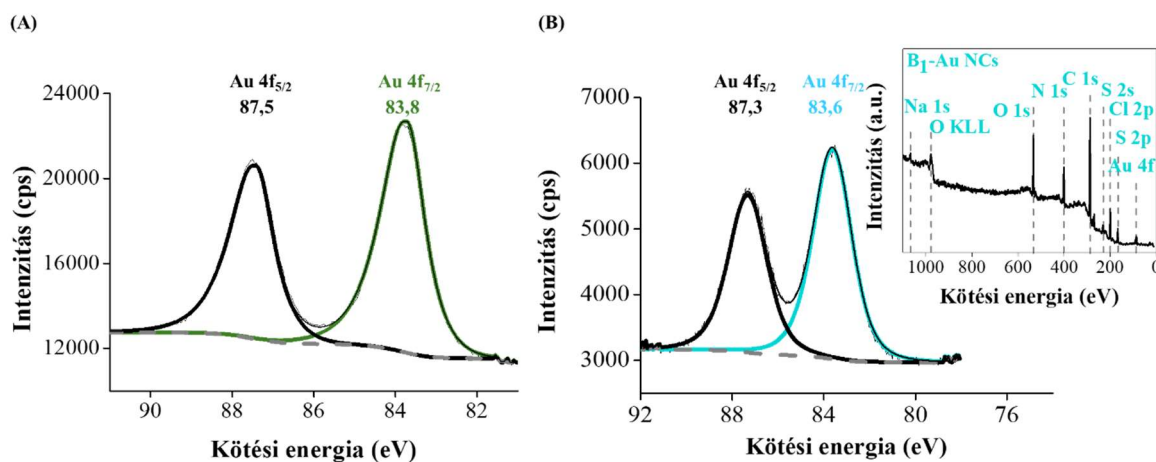
A szakirodalomból jól ismert ma már, hogy az ultrakisméretű Au NCs emissziója és τ értékei dominánsan függenek a klaszter magjában lévő atomszámtól és a stabilizáló ligandum kémiai szerkezetétől [24][102]. A szintetizált NAM-Au NCs esetén meghatározott főbb optikai paraméterek (kis Stokes-eltolódás, ns-os átlagos élettartam) jó összhangban vannak M. Dickson és munkatársai által publikált adatokkal [103]. Munkájukban a méretfüggő fluoreszcenciával rendelkező, poli(amidoamin) (PAMAM) dendrimerrel stabilizált Au NCs előállításával foglalkoztak. Megállapították, hogy a szintetizált NCs nanoszekundumos (kéken-emittáló Au₅–Au₈ NC „magokkal”, $\tau = 3,5$ – $7,0$ ns) élettartamot mutattak és szintén kis Stokes-eltolódás volt megfigyelhető. Publikációjukban arra a következtetésre jutottak, hogy a karakterisztikus fluoreszcencia dominánsan az Au NCs fémmagjától eredeztethető, nem pedig a ligandum-fém töltésátvitelből (LMCT), így a gerjesztési és emissziós energiákat jól leírja az ún. „Jellium-modell”, melyről az Irodalmi áttekintés fejezetben már említést tettem. Mérési adataink alapján feltételezhető, hogy az előállított NAM-Au NCs közel analóg klaszterszerkezettel rendelkeznek az M. Dickson és csoportja által szintetizált kék emisszióval rendelkező, Au₅–Au₈ összetételű PAMAM dendrimerekkel stabilizált Au NCs, melyet az is alátámaszt, hogy a stabilizáló ligandumok hasonló donorcsoportokkal (amidcsoportokkal) rendelkeznek. Ezen következtetések alapján az előállított NAM-Au NCs fluoreszcenciája feltehetően a fém klasztermagok protoplazmonikus sp-sp sávon belüli elektronátmenetéből származik. Emellett a mért τ komponensek közötti különbség meglehetősen kismértékű, ami szintén a közel egységes

méretre és összetételre utalhat. A NAM-Au NCs termékre meghatározott $QY\% = 1,9 \pm 0,3 \%$. A jól ismert Jellium-modell alapján, amely kvantitatív kapcsolatot teremt a fém NCs magjainak elektronszerkezete és a fématomok száma között ($E_{Ex} = E_{Fermi}/N^{1/3}$, ahol E_{Ex} a gerjesztési energia, E_{Fermi} a tömb fázisú arany Fermi-energiája (5,52 eV) és N az Au atomok száma [28]), a NAM-Au NCs esetében egy klasztermag valószínűleg $\sim 3-4$ db Au atomot tartalmaz, míg a B₁-Au NCs esetében egy klasztermag $\sim 5-6$ db Au atomot tartalmaz. Ez a modell kizárólag olyan NCs esetén alkalmas a NCs-et alkotó atomok számának közelítéssel történő meghatározására, ahol a gerjesztési és az emissziós maximumok átfednek, azaz viszonylag közel vannak egymáshoz (kis mértékű Stokes-eltolódás).

Amint az **18.B. ábrán** látható a B₁ rendszer fluoreszcencia élettartama is a nanoszekundumos tartományba esik, ami szintén a szub-nanométeres méretű fémmagok jelenlétére utalhat [24]. A nanoszekundumos tartományú átlagos élettartamból általában két, esetenként három komponens különíthető el, ilyen esetben a rövidebb komponensek csak fém vagy méretfüggőek, míg a hosszabb komponensek a ligandumfüggő töltésátvitelt mutatják [28]. A lecsengési görbék illesztésével ezen rendszer esetén 3 fő élettartam komponens tudunk azonosítani. A τ_1 értéke $1,26 \pm 0,38$ ns (31 %), ami jó egyezést mutat a B₁-vitamin oxidált formájához (tiokróm forma) rendelhető, korábban publikált élettartalommal [104]. Ez a komponens a fémionok redukcióval párhuzamosan képződött a szintézis során, ahogyan azt korábban említettem, és feltehetően π - π stacking kölcsönhatás révén [105], részt vesz a képződő fémmagok stabilizálásában. Irodalmi adatok alapján a τ_2 a ligandum-fém töltésátvitelhez tartozik, ami $2,46 \pm 0,13$ ns (49 %) és a legnagyobb mértékben járul hozzá a minta teljes fluoreszcenciához. A $\tau_3 = 0,24 \pm 0,01$ ns (20 %) legrövidebb komponens a klasztermagokban lévő fém-fém átmenetekhez rendelhető. A fluoreszcens sajátsággal rendelkező termékre meghatározott $QY\% = 3,1 \pm 0,2 \%$.

A kék emisszióval rendelkező arany-tartalmú nanoszerkezetek változatos kémiai struktúrákat mutathatnak [24]. Ezek az anyagok lehetnek szupramolekuláris komplexek, ahol a központi fémkomponens ionos formájú, legtöbb esetben +1 oxidációs állapotú, és a ligandum "P" vagy "S" donoratomokat tartalmaz. A nitrogénben gazdag funkciós csoport(ok)kal rendelkező kis(bio)molekula közvetlen redukálószerként történő felhasználásával a ligandum redukciós kapacitásától függően fémionokat-tartalmazó többmagvú komplexek vagy néhány atomos, fémes maggal (Au⁰) rendelkező Au NCs is kialakíthatók [106][107]. Természetesen más segéd redukálószer, pl. nátrium-borohidrid, Na-citrát, hidrazin jelenléte fokozhatja az ultrakisméretű fém NCs képződését. A NCs

jelenlétének, ezáltal a fémionok oxidációs állapotának igazolására XPS méréseket végeztünk. A szakirodalomból ismert, hogy a részecskeméret csökkenésével az aranyhoz tartozó kötési energiák a kisebb értékek felé tolódnak, ill. az is jól leírt a publikációkban, hogy a kötési energia rendkívül érzékeny mind az arany oxidációs állapotára, mind a fém (részecske) méretére és a felületi ligandummal való kölcsönhatás erősségére [108] [109]. A tömbfázisban az Au 4f_{7/2} értéke 84,0 eV. A **19.A. ábrán** látható, hogy a tisztított minta (NAM-Au NCs) esetén rögzített spektrumok alapján a kötési energiák 4f_{7/2} értéke 83,8 eV-nak, míg a 4f_{5/2} értéke 87,5 eV-nak adódott, ezek az értékek a klasztermagokban lévő Au nulla oxidációs állapotára utalnak, ami megerősíti ezen fluoreszcens NCs „fémess” karakterét. A tömbfázishoz viszonyított negatív (kisebb kötési energia értékek felé történő) eltolódás ultrakicsi klasztermag méretre utal, továbbá a NAM és az arany közötti erős kölcsönhatás is igazolható. Általában az amid-*N* és a piridin-*N* energiája 399,7, illetve 399,5 eV-nál található. A NAM-Au NCs-ben lévő "N" atomok XPS spektrumai alapján (külön ábraként nincs bemutatva) megállapítható, hogy az N 1s régió egy komponenssel illeszthető. Ebben a mintában az 1s kötési energia 400,1 eV-nál található, ami a ligandum és a fémmagok közötti erős kötésre utal, de az értékek alapján akár mindkét típusú nitrogén (amid-*N*, piridin-*N*) is részt vehet a fémmag stabilizálásában.



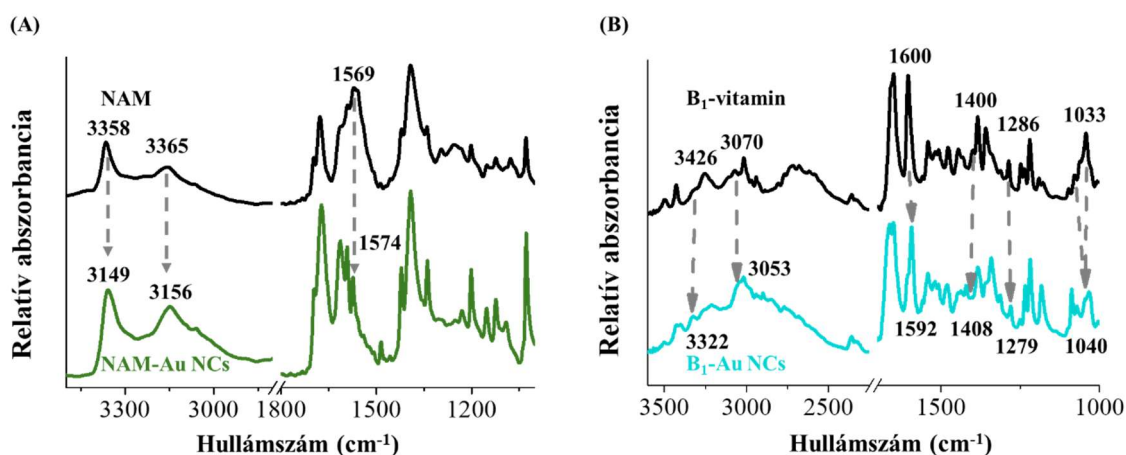
19. ábra: (A) A NAM-Au NCs-ben lévő arany XPS spektruma. (B) A B₁-Au NCs Au-tartalmának XPS spektruma, illetve a felület kémiai összetételének meghatározása.

A **19.B. ábrán** a B₁-Au NCs-tartalmú rendszerben megfigyelhető a stabilizáló ligandumból származó O, N, C, S, Cl és a fémmagból származó Au jelenléte. Az Au 4f régió a fémekre jellemző aszimmetrikus vonalakkal illeszthető. A felvett spektrumok azt mutatják, hogy a kötési energiák 4f_{7/2} értéke 83,6 eV-on, míg a 4f_{5/2} értéke 87,3 eV-on helyezkedik el, ami a fémes Au (Au⁰) jelenlétét mutatja. A tömbfázisú Au 4f_{7/2} enyhe negatív

eltolódást mutat, ami szintén a fémmagok ultrakís méretére és egy erős ligandum-fém kölcsönhatásra utal. Az XPS spektrum többi régiója a tiamin molekula jelenlétét jelzi az Au fémmagok felületén. A C 1s régió esetén három fő kötési energia komponenst tudunk azonosítani C-C és C-H kötések 284,8 eV-on, C-OH és C-N kötések 286,3 eV-on, valamint C=O és C=N kötések 287,8 eV-on, ami egyértelműen megerősíti a tiamin jelenlétét az NCs felületén. Az S 2p régió 2p_{3/2} átmenet 164,6 eV-on a tiamin tiazol aromás gyűrűjében lévő kénatomokhoz rendelhető. Az N 1s régió esetében négy különböző típusú nitrogént detektáltunk pirimidin-N 398,7 eV-nál, amino-N 400 eV-nál, tiazon-N 401,0 eV-nál és egy kis mennyiségű oxidált-N 406,2 eV-nál [110]. A stabilizáló ligandumot hidroklorid formában alkalmaztuk, így némi klorid szennyeződést is felfedeztünk. Az oxigéntartalomról származó jel elsősorban –OH formából (531,7 eV) és kis mennyiségű adszorbeált H₂O-ból (533,4 eV) származott. Az XPS mérések révén a fémmagok képződése egyértelműen igazolható, amelyet a fémmag felületén lévő ligandumok stabilizálnak.

A NCs szerkezeti vizsgálatára FT-IR méréseket is végeztünk. A NAM-dal stabilizált Au NCs esetén arra a következtetésre jutottunk, hogy a prekursor fémion előzetes koordinációja a piridin nitrogénen keresztül valósulhat meg. Mindezek mellett a FT-IR spektrumokon az is megállapítható, hogy a ligandum amid csoportjának is nagy szerepe van a néhány atomos Au NCs stabilizációs folyamatában. Nevezetesen, az –NH₂ csoport szimmetrikus (ν_s) és aszimmetrikus (ν_{as}) nyújtó rezgése 3365 cm⁻¹ és 3156 cm⁻¹-ről 3358 cm⁻¹ és 3149 cm⁻¹-re, míg a piridin gyűrű nyújtó rezgése (ν) 1569 cm⁻¹-ről 1574 cm⁻¹-re tolódik el (**20.A. ábra**) [111]. A ligandum többi része változatlan a fémion koordinációját és a klasztermagok képződését követően. Ez alapján az XPS és FT-IR mérések hasonló eredményt szolgáltatottak.

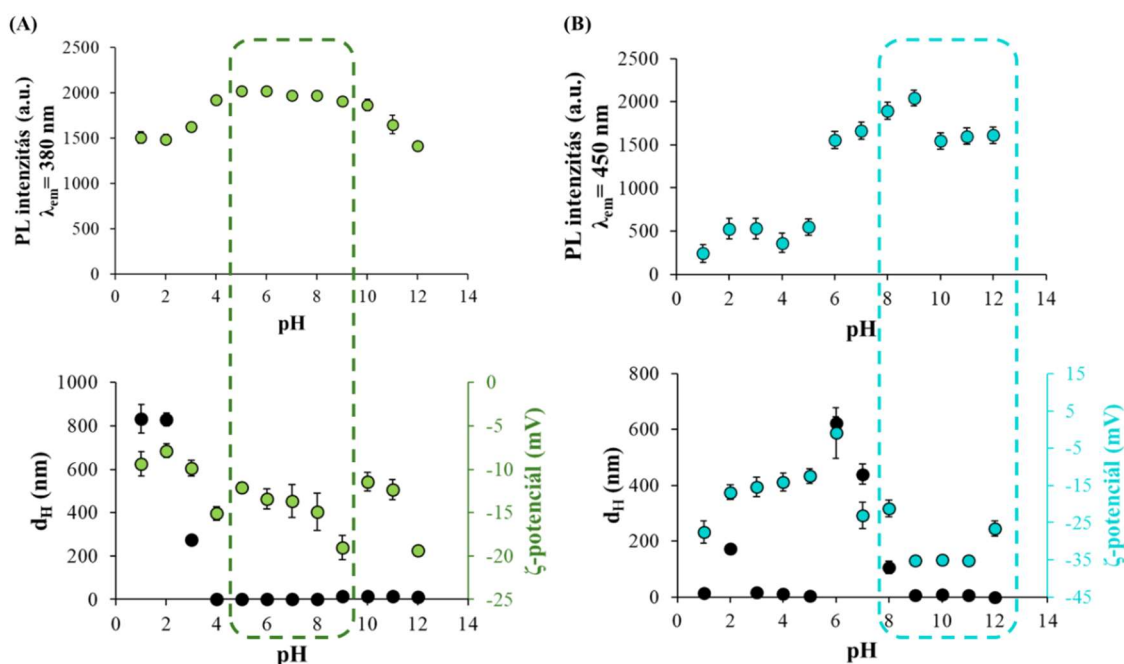
A B₁ rendszer esetén a N-donor(ok) fémmagokhoz való koordinációjának feltérképezésére szintén a tisztított por-alapú minták FT-IR spektrumát rögzítettük. A regisztrált IR spektrumok alapján megállapítható, hogy 3426 cm⁻¹-nél a primer –NH₂ nyújtó rezgése, a pirimidin gyűrűben az aromás C=N rezgése 1658 cm⁻¹ és 1600 cm⁻¹-nél, valamint a tiazolgyűrűk jellegzetes rezgései a távoli-közép IR régióban 1000–500 cm⁻¹ között tolódnak el (**20.B. ábra**). Mivel az aurát-ionok redukciója során csekély mennyiségű oxidált tiokróom forma is képződött, ezért bonyolult a rezgéssávok egyértelmű azonosítása az IR spektrumok alapján. Feltételezhető azonban a fémion pirimidin-N1-en keresztüli elsődleges koordinációja, amit más soft karakterű fémion-tiamin komplexek krisztallográfiai adatai is megerősítenek. Továbbá 3500 és 3000 cm⁻¹ közötti intenzitások domináns változása is megfigyelhető volt a fémfelület jelenlétének köszönhetően [112][113].



20. ábra: (A) A tiszta ligandum (felső) és a NAM-Au NCs (alsó) FT-IR spektruma. (B) A tiszta ligandum (felső) és a B₁-Au NCs (alsó) FT-IR spektruma.

A főbb optikai és szerkezeti jellemzők megismerése mellett az előállított és tisztított NCs stabilitását is tanulmányoztam széles pH tartományon DLS és ζ -potenciál, illetve spektrofлуorimetriás mérések kivitelezése révén (**21. ábra**). Fontos megemlíteni, hogy a klasztermagok primer méreteit fényszórás mérésekkel nem lehet közvetlenül, nagy pontossággal meghatározni, viszont kisebb klaszter aggregátumok mérése kivitelezhető. A mérések során az állandó ionerősséget NaCl inert só jelenlétével szabályoztam.

A **21.A. ábrán** jól látható, hogy a szintetizált NAM-Au NCs fluoreszcens jellege a teljes vizsgált pH-tartományon (pH = 1,0–12,0) megjelenik, de pH = 1,0–3,0 között és pH = 10 felett enyhe PL intenzitás csökkenés figyelhető meg. Erősen savas körülmények mellett (1,0 < pH < 3,0) nagy aggregátumok képződnek a vizes diszperzióban ($d_H > 800$ nm) és a ζ -potenciál értékek esetén -7–(-8) mV mérhető. Ezzel szemben pH = 5,0–8,0 tartományban a fluoreszcencia intenzitások közel azonos értéket mutatnak, aggregációs folyamat nem azonosítható, amit a mért hidrodinamikai átmérők is igazolnak ($d_H \sim 1$ nm). A mért ζ -potenciál értékek is alátámasztják a rendszer stabilisabb állapotát pH = 4,0–8,0 között ($\zeta \sim -15$ mV) [114]. Lúgos közegben a klaszterek felületén lévő ionok nagyobb elektrosztatikus árnyékoló hatásának köszönhetően veszítenek stabilitásukból, amire a fluoreszcencia mérsékelt csökkenése, illetve a méret növekedése ($d_H \sim 10$ –15 nm) is utal. A regisztrált adatok alapján megállapítható (**21.B. ábra**), hogy az előállított B₁-Au NCs savas körülmények között az ionok nagy töltésárnyékoló hatása miatt gyenge fluoreszcenciát mutatnak, és a mért hidrodinamikai átmérők ($d_H \sim 15$ nm) alapján kisebb aggregátumokat képeznek.



21. ábra: (A) A NAM-Au NCs PL intenzitás értékei, a hidrodinamikai átmérők és a ζ -potenciál értékek a pH függvényében ($T = 25$ °C, $I = 0,15$ M (NaCl), NAM:[AuCl₄]⁻/10:1, $\lambda_{ex} = 335$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm, $c_{[AuCl_4]^-} = 0,95$ mM). (B) A B₁-Au NCs PL intenzitás értékei, a hidrodinamikai átmérők és a ζ -potenciál értékek a pH függvényében ($T = 25$ °C, $I = 0,15$ M (NaCl), B₁:[AuCl₄]⁻/25:1, $\lambda_{ex} = 395$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm, $c_{[AuCl_4]^-} = 0,95$ mM).

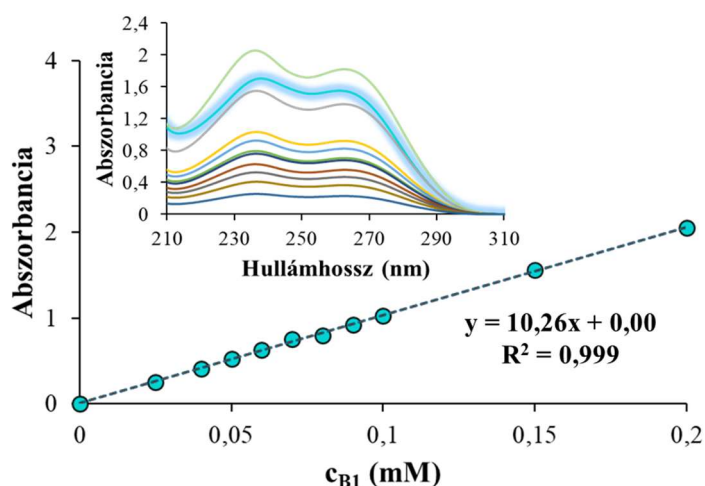
Ezzel szemben pH = 6,0 esetén domináns aggregációs folyamat figyelhető meg, mivel a detektált hidrodinamikai átmérő kb. 630 nm, amit a ζ -potenciál nulla mV közeli értéke is alátámaszt. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy ezen a pH értéken a szabad tiamin domináns formája a semleges töltésű pseudobázis forma, ahogyan az a **16. ábrán** is szemléltetésre került, így a savas közegben protonált, így sztérikus stabilitást biztosító molekulák elveszítik töltésüket, mely révén a kialakult NCs stabilitása is csökken. Ezen folyamattal párhuzamosan a fluoreszcens intenzitás növekvő tendenciát mutat feltehetően az aggregáció-indukált emisszió (AIE) jelensége miatt [115], amelyben a klasztermagok összekapcsolódása révén az intramolekuláris forgó/rezgő mozgások gátoltak. Lúgos közegben a NCs stabilitása lényegesen jobb, hiszen a rögzített d_H értékek közel vannak a nanométeres tartomány alsó határához és a stabilitást a mért ζ -potenciál értékek ($|\zeta| > 25$ mV) is bizonyítják.

5.3. A NAM-Au NCs és B₁-Au NCs antioxidáns hatásának vizsgálata

5.3.1. ORAC vizsgálatok

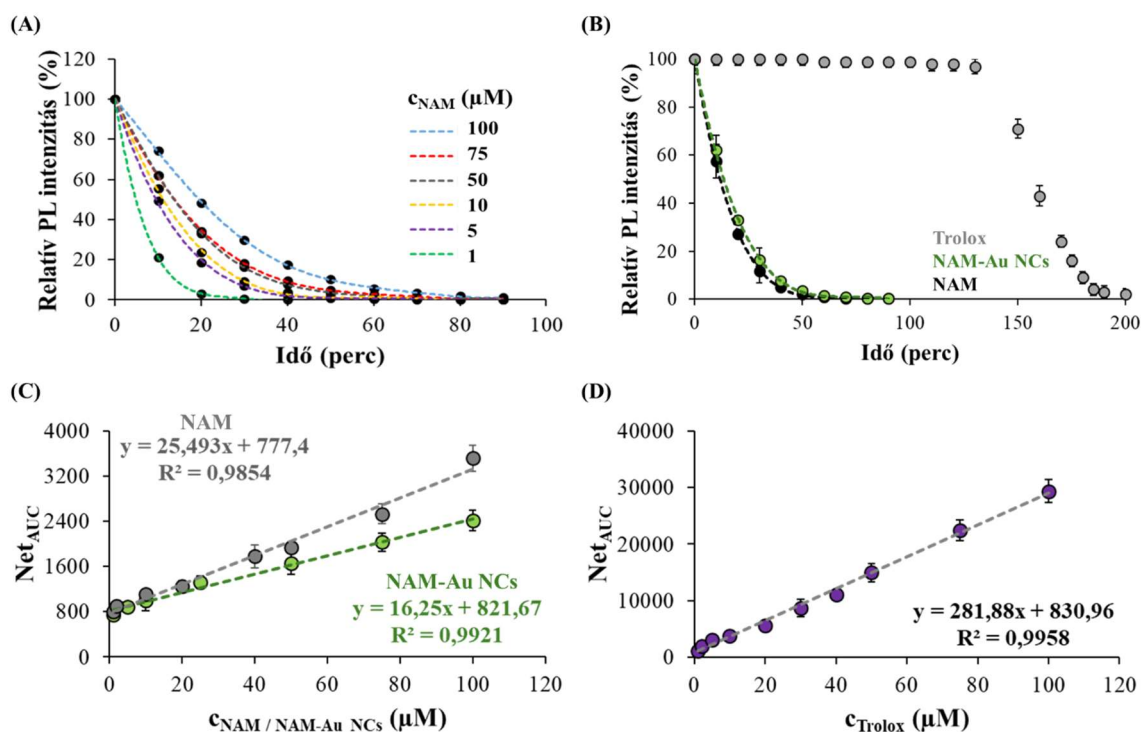
A szintézisekhez választott stabilizáló molekulákról (NAM, B₁-vitamin) ismeretes, ahogyan az Irodalmi áttekintés fejezetben is részleteztem, hogy kiváló antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek [116]. Az antioxidáns hatás pontos meghatározásához figyelembe kell venni az előállított NAM-Au NCs és B₁-Au NCs optikai tulajdonságait és vizes közegbeli stabilitásukat. A korábbi 4.2. fejezetben ismertetett szerkezeti jellemzés eredményeit figyelembe véve az ORAC teszt alapján minősítettük saját Au NCs-alapú rendszereinket.

A NCs potenciális antioxidáns aktivitásának meghatározásához szükségünk van a stabilizáló ligandum, esetünkben a NAM és B₁-vitamin mennyiségének ismeretére a klaszter szintézist követően, hiszen a dialízis során a vegyületek koncentrációja is jelentősen csökkenhet a kiindulási analitikai koncentrációhoz képest. A **22. ábrán** a B₁-vitamin példáján keresztül mutatom be a spektrofotometriás mérések alapján készített kalibrációs egyenes segítségével a diszperzióban ténylegesen jelenlévő B₁-vitamin anyagmennyiségének meghatározását. Habár a tisztított és nem hígított NCs-et tartalmazó diszperzióban a mérések alapján a kiindulási B₁-vitamin koncentráció $c_{B1} = 25,0$ mM, de a kalibráló oldatsorozatot 0,025–0,2 mM tartományon készítettem el $\lambda = 210$ –310 nm hullámhossztartományon jelentkező ligandumsáv nagy abszorbancia értékei miatt.



22. ábra: A B₁-vitaminra vonatkoztatott kalibrációs egyenes ($\lambda = 235$ nm), $T = 25$ °C (A mérési pontokhoz tartozó abszorbancia spektrumok is láthatóak az ábrán, ahol a NCs-et tartalmazó diszperzió spektruma vastagon szedett, halványkékkel látható).

A mérések alapján (a diszperziót 100-szoros hígításban elemezve) a B₁-vitamin koncentrációjára $c_{B1} = 17,0$ mM adódott, így ezt használtuk a minták elkészítéséhez. A NAM-tartalmú vizes diszperziókban, hasonló elvek alapján, szintén fotometriásan határoztuk meg a NAM koncentrációját, mely a kiindulási $c_{NAM} = 10,0$ mM értékről $c_{NAM} = 7,8$ mM értékre változott a dialízis végeztével. Munkám során az előállított NCs antioxidáns tulajdonságát az 4.3.4. fejezetben leírt kísérleti körülmények beállítása mellett tanulmányoztuk. A **23.A. ábra** a fluoreszcein lecsengési görbéjét mutatja eltérő koncentrációban jelenlévő NAM-Au NCs esetében, ahol jól látható, hogy az antioxidáns koncentrációjának növelésével adott időpontban a fluoreszcein oxidációja nagyobb mértékű, ezáltal a fluoreszcencia intenzitás csökkenése is.

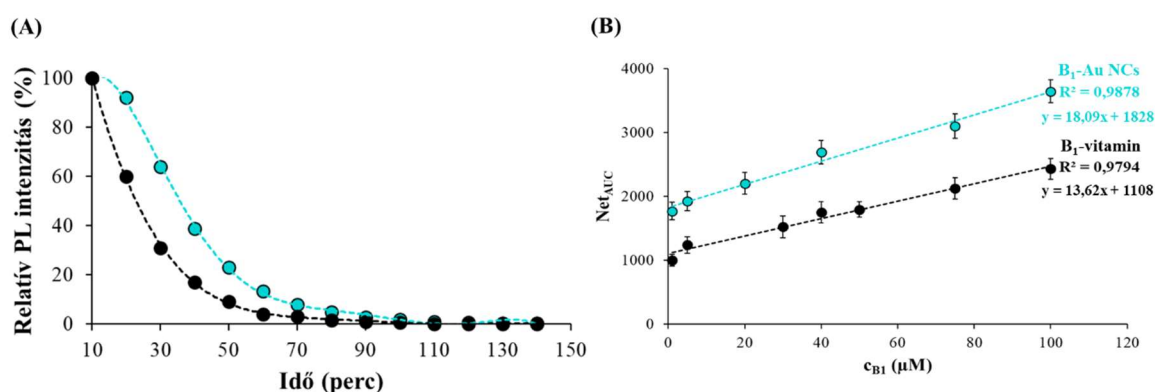


23. ábra: (A) A fluoreszcein relatív PL intenzitás értékeinek a változása eltérő NAM koncentrációk esetén az idő függvényében ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm, NAM-Au NCs-tartalmú minta esetén, $T = 37$ °C). (B) A NAM, NAM-Au NCs és Trolox jelenlétében a fluoreszcein relatív PL intenzitás értékeinek a változása ($c_{NAM} = 50$ μM, $\lambda_{em} = 515$ nm, $T = 37$ °C). (C) A NAM és a NAM-Au NCs, valamint a (D) Trolox ORAC kalibrációs görbéi 1–100 μM tartományon.

A **23.B. ábra** ugyanezen lecsengési görbéket szemlélteti csak egy kiválasztott NAM koncentráció (50 μM) esetén a tiszta NAM és a NAM-Au NCs esetén. A mérési adatok alapján megállapítható, hogy közel azonos mértékű a fluoreszcencia intenzitás csökkenése.

A mért kísérleti adatokból a **23.C. ábrán** látható kalibrációs görbét úgy kaptuk meg, hogy a görbe alatti területet (AUC) ábrázoljuk az antioxidáns (NAM) koncentrációk függvényében 1–100 μM koncentráció tartományon. Referenciaként a Trolox használata mellett is elvégeztük ugyanezen méréseket, ahol az 50 μM -os koncentráció esetén regisztrált görbét a **23.B. ábra** szemlélteti. A mérések jó egyezést mutattak irodalmi adatokkal [96]. Összehasonlítva a Trolox és a NAM antioxidáns karakterét megállapítható, hogy a Trolox lényegesen jobban gátolja a festékbomlást. A mérési adatokból az **7. egyenlet** felhasználásával az ORAC értékeket is kiszámítottuk. A számított értékek NAM és NAM-Au NCs esetén: $0,56 \pm 0,02 \mu\text{M}$ és $0,48 \pm 0,03 \mu\text{M}$. A standard Trolox molekulához képest a mért minták gyengébb antioxidáns aktivitást mutatnak. A NAM-Au NCs közel azonos ORAC értékkel rendelkeznek, mint a tiszta NAM, tehát az antioxidáns jellege megmaradt a klaszterképződés után is, de a NCs képződése révén dominánsabb fluoreszcens sajátsággal is rendelkezik.

Az előzőekben ismertetett mérés technika analógiájára a B_1 -Au NCs esetén is elvégeztük a spektrofluorimetriás ORAC vizsgálatokat, ugyanazon koncentráció értékek mellett. Amint a **24. ábra** mutatja az ORAC mérések eredménye bizonyítja, hogy az újonnan előállított B_1 -Au NCs lényegesen jobb antioxidáns aktivitással rendelkeznek, mint a szabad vitamin molekula, hiszen **24.A. ábra** alapján látható, hogy adott időpontban a NCs jelenlétében a fluoreszcein oxidációja kisebb mértékű.



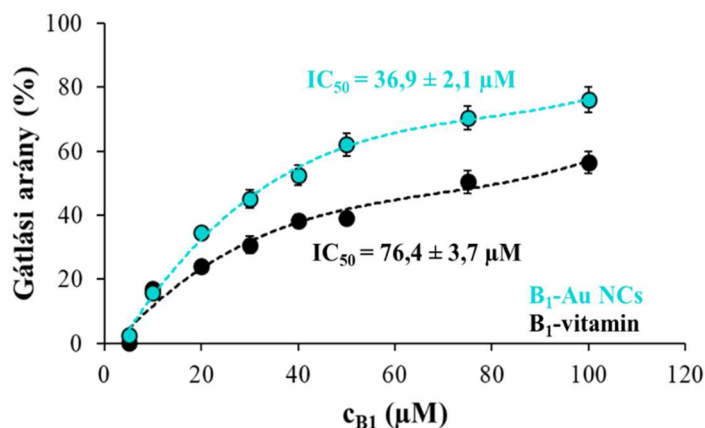
24. ábra: (A) A fluoreszcein relatív PL intenzitás értékeinek a változása $c_{\text{B}_1} = 50 \mu\text{M}$ a tiszta B_1 (fekete) és a B_1 -Au NCs (kék) esetén az idő függvényében ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$, $T = 37^\circ\text{C}$). (B) A tiszta B_1 (fekete) és a B_1 -Au NCs (kék) ORAC kalibrációs görbéi 1–100 μM tartományon.

Az **7. egyenlet** alapján számított ORAC értékek B_1 -vitamin esetén: $0,36 \pm 0,02 \mu\text{M}$, illetve B_1 -Au NCs esetén: $0,53 \pm 0,01 \mu\text{M}$. A B_1 -vitamin antioxidáns sajátsága közel

másfélszeres értékre növelhető a NCs kialakításával. Tehát a néhány atomot tartalmazó fémmagok jelenléte, az elektronban gazdag felületnek köszönhetően növelni képes az antioxidáns kapacitást [72].

5.3.2. TEAC vizsgálatok

A Kísérleti részben említett mérési elrendezés alapján (4.3.4. fejezet, 44. oldal) elvégeztük a TEAC méréseket is. Ahogyan a **25. ábra** mutatja a gátlási arány eltérő a B₁ és a B₁-Au NCs esetében azonos vitamin koncentrációt alkalmazva. A tiszta B₁-vitamin esetén **8. egyenlettel** számított IC₅₀ értéket $76,4 \pm 3,7 \mu\text{M}$ -nak határoztuk meg. Ezzel szemben az Au-magok jelenléte, valamint a klaszter felületén lévő oxidált tiokróm elősegítheti a gátló aktivitást, mivel az IC₅₀ érték $36,9 \pm 2,1 \mu\text{M}$, ami egyértelműen bizonyítja az előállított komplex szerkezet jobb antioxidáns aktivitását a tiszta molekulához képest.



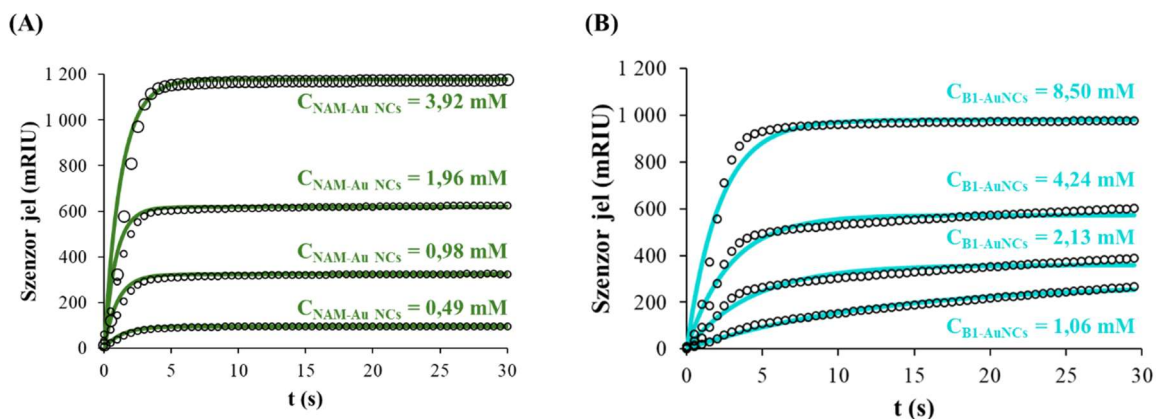
25. ábra: A tiszta B₁-vitamin (fekete) és a B₁-Au NCs (vörös) gyökfogó aktivitás görbéje ($\lambda_{\text{abs}} = 734 \text{ nm}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) 5–100 μM B₁ -vitamin tartalom esetén.

Kísérletet tettem a NAM-Au NCs TEAC vizsgálataira is, de a mérések nem szolgáltatott kiértékelhető eredményeket. A vizsgálati idő alatt a NCs nem okoztak az abszorbancia értékében csökkenést, tehát ezen mérés során igazolható antioxidáns hatás nem azonosítható. Ez a vártaknak részben megfelel, hiszen az ORAC tesztek alapján is a B₁-Au NCs esetén azonosítottunk nagyobb antioxidáns hatást. Összességében megállapítható, hogy az előállított néhány atomot tartalmazó B-vitaminokkal (B₁ és B₃) stabilizált NCs új optikai tulajdonságokat mutatnak a tiszta vitaminokkal szemben. Az antioxidáns vizsgálatok rámutattak arra, hogy a néhány atomos fémmagok jelenléte növelheti és/vagy karakterisztikus fluoreszcens tulajdonsággal egészítheti ki a tiszta vitaminok jellemzőit. Ezáltal hozzájárulnak a klaszterek további potenciális bioaktivitás vizsgálatához.

5.4.1. SPR mérések kivitelezése és az eredmények értelmezése

A szérumfehérje-NCs közötti kölcsönhatások vizsgálatára végzett SPR mérések kísérleti eredményeit és az elsődleges adatok értékeléséből származó információkat ezen fejezetben foglalom össze. A mérések kivitelezése jellemzően két lépésre osztható. Az első a fehérjével funkcionalizált szenzorfelület előkészítése, majd a szenzorfelülethez kötött szérumfehérje és a biomolekulával felületmódosított NCs közötti kölcsönhatás vizsgálata. Ebben a folyamatban az általunk használt kétszatornás berendezésben referenciaként azon csatornát használjuk, amelyben folyamatosan az adott rendszer oldószere (ioncserélt víz) áramlik. A referenciacsatornát lezárva a BSA 30 μM koncentrációjú vizes oldatát 50 $\mu\text{L}/\text{perc}$ áramlási sebességgel juttattuk az elsődleges csatornába, miközben az eszközbe integrált termosztát és szabályozó biztosította az állandó $25 \pm 0,2$ °C-os hőmérsékletet a szenzorfelület közelében. A második lépésben a szenzorfelülethez kapcsolt fehérjére különböző ismert koncentrációjú NCs-et tartalmazó vizes diszperziót (az egyes koncentrációk a ligandumra vonatkoztatva vannak megadva) majd ezek oldószerét felváltva juttatva rögzíthető a szenzorgram, ami a szenzorjel időbeni változását írja le mind a NAM-Au NCs, mind a B₁-Au NCs esetén (**26. ábra fekete körök**). Az adott „ligandum”⁶ koncentrációjához rendelhető kinetikai paraméter értéke meghatározható a feltüntetett asszociációs szakaszok megfelelő sebességi egyenlettel történő illesztésével (**26. ábra zöld és kék folytonos vonalak**).

62



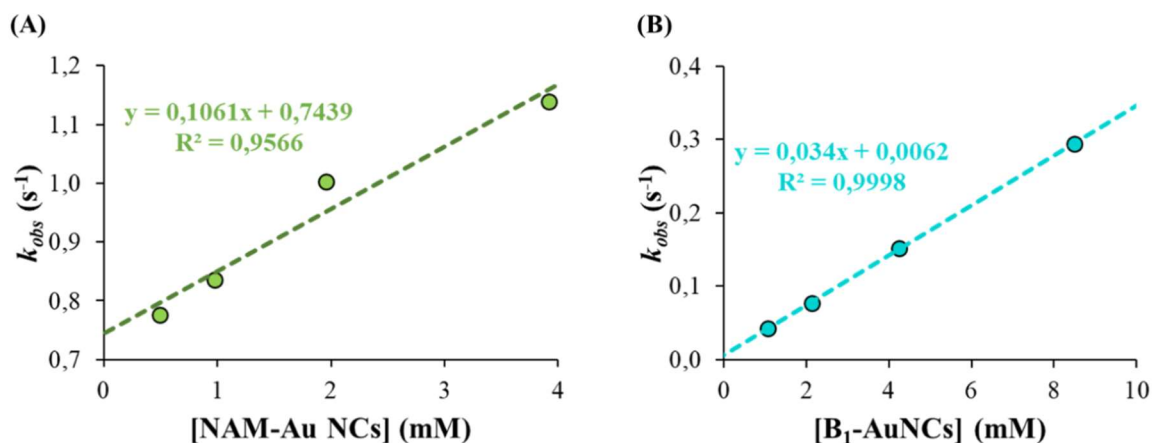
26. ábra: (A) NAM-Au NCs és (B) B₁-Au NCs megkötődését jellemző szenzorgrammok a BSA funkcionizált szenzorfelületen (fekete körök) és a kötési komplex koncentrációjának növekedését leíró sebességi egyenlet alapján illesztett modellgörbék (zöld és kék folytonos vonal) (az ábrán látható koncentrációk a ligandumra vonatkoztatva vannak számítva).

Ennek eredményeként a koncentráció függése további paraméterek számítását teszi lehetővé. Amennyiben feltételezzük, hogy a receptor (BSA) és a „ligandum” (NCs) kapcsolódása révén kialakuló felületi komplex egy reverzibilis bimolekulás reakció eredménye, akkor a kötési komplex koncentrációjának növekedését leíró integrált sebességi egyenlet **(9. egyenlet)** a következő formában írható le [117][118]:

$$[BSA - Au NCs] = [Au NCs]_0 (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (9)$$

ahol $[BSA - Au NCs]$ a kötési komplex koncentrációja a szenzor felületen, $[Au NCs]_0$ a felhasznált klaszter diszperziók koncentrációja és k_{obs} a kötési folyamat látszólagos sebességi állandója.

Tekintettel arra, hogy a $[BSA - Au NCs]$ időbeli változása arányos a szenzorjel időbeli változásával, míg az $[Au NCs]_0$ nagysága arányos az adott körülmények között elérhető maximális felületi komplex koncentrációval (maximális jeleltolódással), a **(9) egyenlet** koncentráció dimenziójú tényezőit a szenzorjel értékével helyettesíthetjük [119][120]. Adott „ligandum” anyagmennyiség esetén a felvett szenzorgram alapján illesztési paraméterként levezethető az adott koncentrációhoz rendelt k_{obs} érték. Mivel a k_{obs} a „ligandum” (biofunkcionalizált Au NCs) koncentrációjának lineáris függvénye ($k_{obs} = k_a[Au NCs]_0 + k_d$), a k_{obs} értékek „ligandum” koncentráció függvényében történő ábrázolásával **(27. ábra)** a valós sebességi állandók (k_a egyenes meredekségéből és k_d az egyenes tengelymetszetéből) lineáris regresszió segítségével kiszámíthatók.



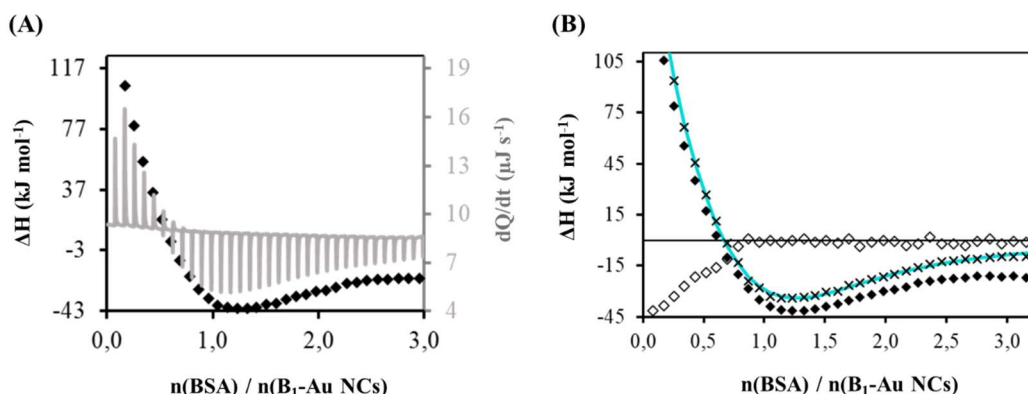
27. ábra: (A) NAM-Au NCs (B) B₁-Au NCs BSA-hoz való kötődési folyamat valós sebességi állandóinak (k_a és k_d) meghatározásához a látszólagos sebességi állandó (k_{obs}) koncentráció függése (az x -tengelyen szereplő koncentráció értékek a ligandumra vonatkoztatva vannak megadva).

A valós sebességi állandók hányadosa adja a kötési folyamat egyensúlyi állandóját (K_A), amely a B₁-Au NCs/BSA rendszerre $5468 \pm 73 \text{ M}^{-1}$ értéket mutatott. Ezzel szemben a K_A értéke a NAM-Au NCs/BSA és rendszer esetében egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, nevezetesen $143 \pm 30 \text{ M}^{-1}$. A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a mérés technika ilyen módon alkalmas a szérumfehérje-NCs közötti kölcsönhatás jellemzésére és különbségek is azonosíthatóak a két klaszter rendszer között, ami a kb. azonos fémmag és optikai sajátosság ellenére az eltérő felületi ligandumok okozta különbségből eredhet. Az eredmények összevethetősége érdekében ITC méréseket is végeztünk, melyek eredményét a következő alfejezet foglalja össze.

5.4.2. ITC mérések kivitelezése és az eredmények értelmezése

A NAM-Au NCs és B₁-Au NCs kötődését a BSA szérumfehérjéhez ITC mérésekkel is vizsgáltuk, mivel ezen korszerű technika is a különböző kölcsönhatások termodinamikai paramétereinek meghatározására szolgál. A kalorimetriás vizsgálatokat a 4.3.3. fejezetben ismertetett mérési körülmények mellett hajtottuk végre. A mérések során gyűjtött termikus információkat (hőmennyiség változás, dQ/dt) az idő függvényében regisztrált differenciális kalorimetrikus görbe mutatja (28.A. ábra szürke vonal), az entalpogramok az egyes adagolási lépésekhez rendelhető csúcsterületek számítása alapján kerültek megszerkesztésre. Az entalpogramok a rendszerhez adagolt fehérje mennyiségével kapcsolatos entalpiaváltozás értékeket ábrázolják az egyes adagolási lépésekhez rendelhető anyagmennyiség-arány ($n_{\text{fehérje}}/n_{\text{klaszter}}$) függvényében. Azonban, amikor a vizsgált

ligandumot adagoljuk, jelentős hőmennyiség változás következhet be a hígulás miatt, ez a ligandum hígulásából eredő hőhatás háttértitrálással korrigálható [121]. Ezt a hígítás/háttér entalpogramot (a **28.B. ábrán** $\diamond$ szimbólummal) kivonjuk az elsődleges kísérleti entalpogram adataiból, hogy megkapjuk a korrigált entalpogramot, amely csak a klaszter és a fehérje kölcsönhatásából eredő termikus információt tartalmazza. A kísérleti adatokat különböző kötési modellekkel lehet illeszteni; esetünkben a legjobb illesztést a két kötőhelyet feltételező modell segítségével sikerült elérni [122] [123]. Így a **28.B. ábrán** kék vonallal jelzett elméleti entalpogram által szolgáltatott termodinamikai paraméterek a kötési folyamat jellemző értékeiként fogadhatók el. A **2. táblázat** foglalja össze a NAM-Au NCs és a B₁-Au NCs fehérjéhez való kötődésének egyensúlyi állandóját (K_a), a kötési folyamat szabadentalpia változását (ΔG) és entalpiaváltozás (ΔH) értékét, valamint az egyes kötőhelyek kötési sztöchiometriáját (N) és szórását.



28. ábra: (A) B₁-Au NCs/BSA rendszer ITC vizsgálata során felvett differenciális kalorimetriás görbe (szürke vonal) és entalpogram ($\diamond$). (B) Kísérleti ($\diamond$), háttér ($\diamond$) és hígítással korrigált ($\times$) entalpogram, amely a két kötőhelyet feltételező modell alapján lett illesztve (kék vonal).

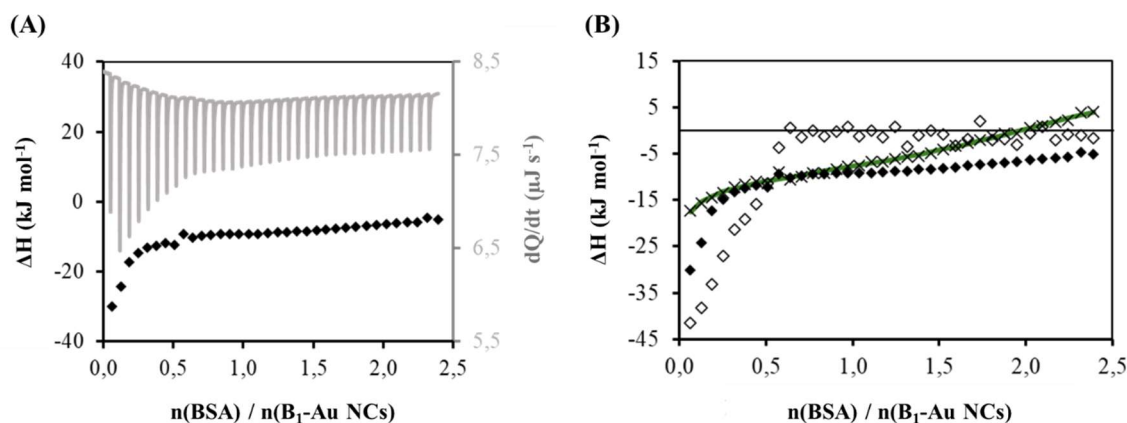
Figyelembe véve a **2. táblázatban** összefoglalt adatok szórását, megállapítható, hogy csak az első (lényegében 1:1 sztöchiometriájú) kötőhelyre vonatkozó adatok fogadhatók el a kötődést leíró értékeinek. Nevezetesen, az elsődleges kötőhelyre számított termodinamikai paraméterek értékei a következők: $K_a = 4,17 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3 M^{-1}$; $\Delta G = -26,36 \pm 0,55 kJ mol^{-1}$; $\Delta H = -230 \pm 181 kJ mol^{-1}$; és $N = 1,19 \pm 0,14$. Ezek alapján a klaszter beépülése a vizsgált hőmérsékleten spontán lezajló exoterm folyamat eredménye. Ha figyelembe vesszük a negatív ΔH értéket és a kis, de szintén negatív ΔS értéket ($-682 \pm 4 J mol^{-1} K^{-1}$), akkor arra is következtethetünk, hogy a B₁-Au NCs

fehérjéhez való kiemelkedő affinitásában olyan másodlagos erők játszanak szerepet, mint a H-kötés és az elektrosztatikus kölcsönhatás [124][125].

2. táblázat: A B₁-Au NCs vagy NAM-Au NCs és a BSA közötti kölcsönhatás kalorimetriás elemzése alapján meghatározott termodinamikai paraméterek értéke és azok szórása.

B ₁ -Au NCs – BSA rendszer		NAM-Au NCs – BSA rendszer	
K _{a,1} (M ⁻¹)	K _{a,2} (M ⁻¹)	K _{a,1} (M ⁻¹)	K _{a,2} (M ⁻¹)
$4,17 \times 10^4 \pm 9,20 \times 10^3$	$1,04 \times 10^5 \pm 7,6 \times 10^4$	$4,66 \times 10^5 \pm 6,90 \times 10^5$	$2,12 \times 10^6 \pm 3,80 \times 10^6$
ΔG_1 (kJ mol ⁻¹)	ΔG_2 (kJ mol ⁻¹)	ΔG_1 (kJ mol ⁻¹)	ΔG_2 (kJ mol ⁻¹)
$-26,36 \pm 0,55$	$-28,62 \pm 1,81$	$-32,34 \pm 3,67$	$-36,09 \pm 4,44$
ΔH_1 (kJ mol ⁻¹)	ΔH_2 (kJ mol ⁻¹)	ΔH_1 (kJ mol ⁻¹)	ΔH_2 (kJ mol ⁻¹)
-230 ± 181	1400 ± 3600	$-5,58 \pm 8,98$	$-27,71 \pm 23,28$
N ₁	N ₂	N ₁	N ₂
$1,19 \pm 0,14$	$0,29 \pm 0,18$	$1,09 \pm 0,31$	$0,44 \pm 0,25$

A **29. ábra** a NAM-Au NCs fehérjéhez való kötődésének analóg ITC eredményeit mutatja, a számított entalpogrammal együtt.



29. ábra: (A) NAM-Au NCs/BSA rendszer ITC vizsgálata során felvett kalorimetriás görbe (szürke vonal) és entalpogram (♦). (B) Kísérleti (♦), háttér (◇) és hígítással korrigált (×) entalpogram, amely a két kötőhelyet feltételező modell alapján lett illesztve (zöld vonal).

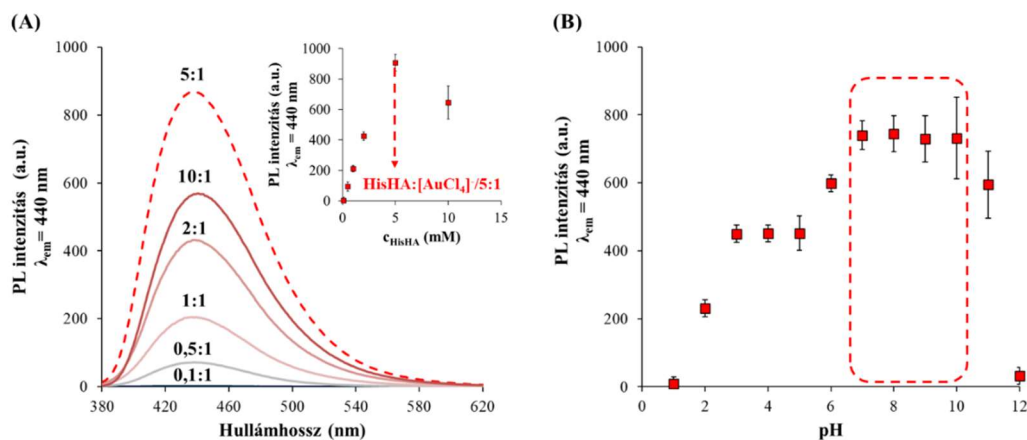
A NAM-Au NCs esetében az elméleti entalpogram, amely szintén két kötőhelyet feltételez, jól leírta a kísérleti adatok alakulását. Az elsődleges kötőhelyre kiértékelt mennyiségek a következők: $K_a = 4,66 \times 10^5 \pm 6,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; $\Delta G = -32,34 \pm 3,67 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H = -5,58 \pm 8,98 \text{ kJ mol}^{-1}$; és $N = 1,09 \pm 0,31$. A meghatározott paraméterek nagy

szórásából adódó bizonytalanság miatt a NAM-Au NCs fehérjéhez való kötődése az ITC analízis alapján nem igazolható egyértelműen. Mindezek mellett a **29. ábra B** részén látható korrigált entalpogram (*) adatainak abszolút értékét a B₁-Au NCs/BSA rendszer entalpia értékeivel összevetve az is megállapítható, hogy nem mutatható ki hasonló mértékű affinitás a klaszter megkötődésének vonatkozásában. Ezt a bizonytalanságot figyelembe véve az ITC eredmények esetében eltekintünk a NCs és a fehérje közötti kölcsönhatás további és részletesebb termodinamikai elemzésétől. A NCs kötődésének vizsgálata során először SPR, majd ITC mérésekkel igazoltuk a BSA fehérjéhez történő kötődését. Ezt követően a kísérleti adatokat feldolgozva kvantitatív módon jellemeztük a klaszterek kötési affinitását. Az eltérő mérési módszerek eredményeinek összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a B₁-vitamin által stabilizált NCs beépülése a BSA-ba a vizsgált hőmérsékleten spontán exoterm folyamat, amelyben H-kötés és elektrosztatikus kölcsönhatás típusú másodlagos erők játszanak szerepet. Vizsgálatainknak a legfontosabb eredménye, hogy a NCs fehérjékkel való kölcsönhatása kvantitatív módon tanulmányozható a nevezett mérési technikákkal.

5.5. A HisHA-Au NCs előállítási folyamata

A Kutatócsoportban korábban az *L*-hisztidin aminosav, mint a templátos szintézissel potenciálisan alkalmazható redukáló- és stabilizálószer, segítségével is megkíséreltek NCs-et előállítani, de csak kéken emittáló $[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$ összetétellel megadható koordinációs polimerek jelenlétét igazolták [44]. Ezen munkához kapcsolódva célunk volt a hisztidin karboxilcsoportjának hidroxamát funkciós csoportra történő cseréje révén tanulmányozni, hogy a funkciós csoport módosítása milyen hatással van a korábban azonosított $[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$ struktúra kialakulására, ill., hogy a redukciós folyamat átlendíthető-e Au(0) atomokat tartalmazó klaszterek képződésének irányába. A legintenzívebb fluoreszcenciával rendelkező nanoszerkezetű anyag előállításához, ugyanazon elvek alapján, melyeket korábban a B-vitamin származékok esetén részleteztünk, vizsgáltuk a ligandum/fémion molarány, hőmérséklet, pH, fémion-koncentráció és a reakcióidő hatását. A szintéziseket első lépésben különböző HisHA- $[\text{AuCl}_4]^-$ moláris arányok mellett végeztem el. A molarányok szerepét a 0,1:1–10:1 HisHA- $[\text{AuCl}_4]^-$ tartományon vizsgáltam, ahol a fémion kiindulási koncentrációját $c = 1,0 \text{ mM}$ értékre állítottam be. A reakcióelegyet 80 °C-on termosztáltam, mert a korábban kivitelezett szintézisek során megállapítottuk, hogy a hőmérséklet emelése lényegesen kedvez a redukciós folyamatnak. A minták fluoreszcenciájának megjelenését folyamatosan

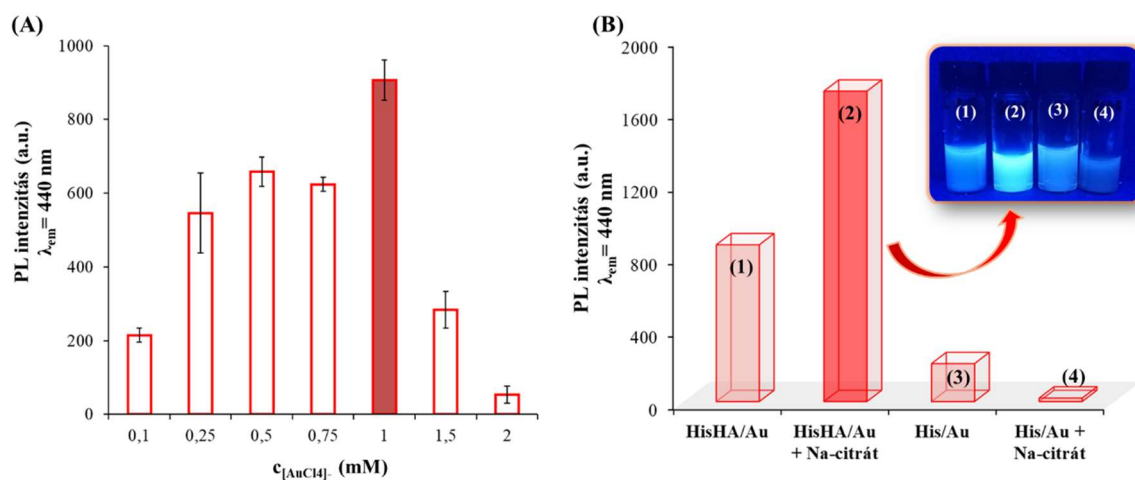
ellenőriztem UV-lámpa alatt, majd a PL spektrumokat is rögzítettem 24 óra elteltével $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm gerjesztés mellett (**30.A. ábra**).



30. ábra: (A) A minták PL spektrumai 24 óra elteltével különböző HisHA-[AuCl₄]⁻ molarányok mellett, kiegészítve a $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm-nél mért maximális emissziós intenzitások értékeinek a változásával a c_{HisHA} függvényében ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0$ mM, pH = 7,0, T = 80 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm). (B) Az átlagos emissziós intenzitások a reakcióelegy kezdeti pH értékének függvényében ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0$ mM, $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, HisHA:[AuCl₄]⁻/5:1, T = 80 °C).

A **30.A. ábrán** megfigyelhető, hogy $\lambda_{\text{em}} = 440$ -nél megjelenik egy emissziós sáv, amelynek intenzitása nő a molarány 0,5:1–5:1-ig történő emelésével, ezt követően pedig csökken. Az emissziós maximum eltolódása, sem a kisebb, sem a nagyobb hullámhosszak irányába, nem figyelhető meg. A legnagyobb PL intenzitás HisHA:[AuCl₄]⁻/5:1 aránynál azonosítható, így ezen érték alkalmazása mellett folytattuk a kísérleti körülmények hatásának vizsgálatát. Második lépésben a közeg pH-jának hatását tanulmányoztuk pH = 1–12 tartományon. Figyelembe véve a ligandum deprotonálódási tulajdonságát [126], valamint az [AuCl₄]⁻-ionok jól ismert pH-függő hidrolízisét vizes oldatban [127] megállapítottuk, hogy a semleges ill. az enyhén lúgosabb közeg (pH = 7,0–9,0) előnyösebb a klaszterek kialakulásához (**30. B. ábra**). A 24 órás szintézis időt követően a reakcióelegy pH-ja pH ~ 7, ezért ezen értéket választottam a további vizsgálatokhoz. Ez a kísérleti tapasztalat hasonlóságot mutat a His esetén megállapított körülményekkel, hiszen azon rendszer esetén a kéken emittáló termék képződése az imidazóliumcsoport deprotonálódásával párhuzamosan (pH > 6,0) volt megfigyelhető ($\text{pK}_{\text{imid}} = 6,0$). Minden valószínűség szerint ezen deprotonálódási folyamat a jelen rendszer esetén is kedvező [44]. A szintézist szobahőmérsékleten is elvégeztem, de fluoreszcens termék nem keletkezett; 37 °C-on már a kék emisszió azonosítható volt, de meglehetősen alacsony intenzitással, ezért

a 80 °C-ot választottam ideális hőmérsékletnek. A forráspont közelében a PL kialakulására, emellett Au NPs és ezek aggregátumai is megjelentek [14]. A fémion koncentráció hatását a 0,1–2,0 mM tartományon vizsgáltam, s megállapítottam, hogy a kiindulási koncentráció értéke ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0 \text{ mM}$) a leginkább kedvező a szintézis szempontjából (**31.A. ábra**), mert magasabb fémion koncentrációnál már alacsonyabb PL és a NCs enyhe mértékű aggregációja is megfigyelhető volt. Utolsó lépésként a szintézis időtartamát vizsgáltam a korábban meghatározott paraméterek konstans értéken tartása mellett. A minták emissziós spektrumát néhány napon keresztül rögzítettem, a legnagyobb intenzitás 48 óra után érhető el.



31. ábra: (A) A fémion koncentráció hatása a fluoreszcens termék képződésére (pH = 7,0, $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, HisHA:[AuCl₄]⁻/5:1, T = 80 °C). (B) A HisHA-[AuCl₄]⁻-és His-[AuCl₄]⁻ rendszerek Na-citrát jelenlétében és hiányában képződött végtermékek fluoreszcencia intenzitás értékei (HisHA:[AuCl₄]⁻/5:1, pH = 7,0, $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, His:[AuCl₄]⁻/30:1, pH = 6,0, $\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 378 \text{ nm}$, $c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0 \text{ mM}$). A (B) ábra esetén ezen reprezentációban szórás nem tehető a diagramra, melynek értéke azonban ~ 2,5-3,0 %.

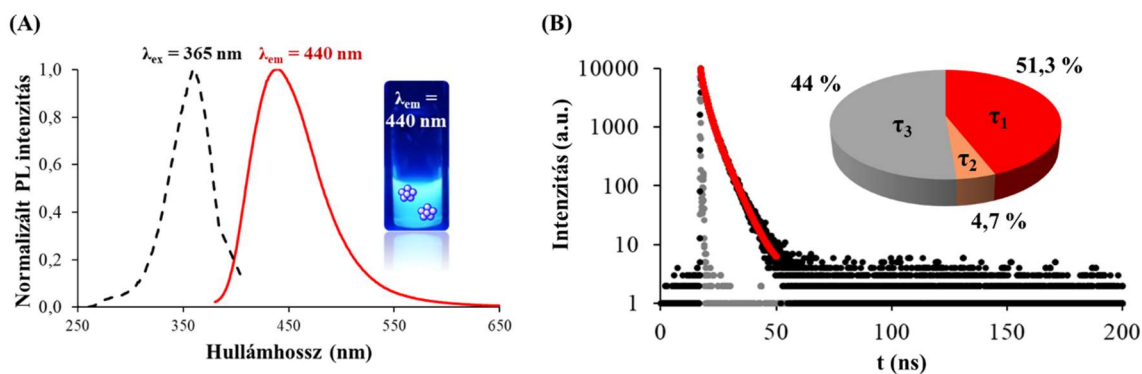
Az aminosavak és B-vitamin származékok redukálószerként való alkalmazhatóságával kapcsolatos vizsgálatok azt mutatták, hogy gyakorta a képződő termék kitermelésének elősegítéséhez enyhe redukálószer használata is szükséges. Ennek érdekében a Na-citrát, segéd redukálószer jelenlétét ezen rendszer esetén is tanulmányoztuk, ahogyan azt a NAM-tartalmú NCs vontakozásában is. A szintézist többféle Na-citrát koncentráció mellett is elvégeztem. Megállapítottuk, hogy 10,0 mM-os Na-citrát koncentráció (HisHA:Na-citrát/1:2 molarány) alkalmazásáig a PL fokozatosan növekvő trendet mutatott, de 10,0 mM értéket meghaladó koncentráció esetén a PL intenzitás

értékeiben csökkenő tendencia látható, mivel a nagy mennyiségben jelenlévő ligandumok már szterikusan is gátolhatják a klasztermagok növekedését. Összehasonlításképpen a His-[AuCl₄]⁻ rendszerek szintézisét is megismételtem Na-citrát jelenlétében, mivel a His-[AuCl₄]⁻ rendszerben a redukció csak [Au(I)_xHis_{x+1}]⁺ szerkezet képződéséig vezetett. A HisHA:Na-citrát:[AuCl₄]⁻/5:10:1 arány alkalmazásával közel kétszer nagyobb PL intenzitás növekedés érhető el, míg a His-[AuCl₄]⁻ rendszer esetén a Na-citrát jelenléte nem járul hozzá a NCs képződéséhez (**31.B. ábra**), feltételezhető, hogy a [Au(I)_xHis_{x+1}]⁺ jelenléte sokkal inkább dominánsabb. A mintákról UV-lámpa alatt készített fotók is ezt a megfigyelést támasztják alá.

A végtermék tisztítása kétlépéses eljárással történt, mivel a további méréseket erősen befolyásolhatja a redukciós folyamatból esetlegesen visszamaradt elreagálatlan fémsó és elektrolit ionok jelenléte. Az első lépésben a diszperziót centrifugálással tisztítottam 13000 fordulat/perc sebességgel 30 percig, majd 180 percig szobahőmérsékleten 1 kDa vágási határértékkel rendelkező cellulózcsővel, ultratiszta MQ-vizet használva dialízisközegeként. A képződött klaszterek tisztaságát a PL intenzitás és a dialízáló közeg fajlagos vezetéseinek mérésével ellenőriztem.

5.6. A HisHA-Au NCs optikai és szerkezeti jellemzése

Az előző fejezetben ismertetett előállítási és tisztítási folyamatot követően a tisztított minták optikai és szerkezeti jellemzését végeztük el. A legfontosabb optikai tulajdonságok megismerése közé tartozik a tisztított minta gerjesztési és emissziós spektrumának rögzítése (**32.A. ábra**), a QY% és a PL átlagos élettartam (**32.B. ábra**) értékek meghatározása.



32. ábra: (A) A HisHA-Au NCs gerjesztési (szaggatottal) és emissziós (pirossal) spektruma ($c_{\text{HisHA-Au NCs}} = 0,95 \text{ mM}$ (Au-koncentrációra számítva), $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$). (B) A HisHA-Au NCs tipikus fluoreszcencia lecsengési görbéje a fő élettartam komponensek hozzájárulásával ($\lambda_{\text{ex}} = 371 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$).

Amint azt a regisztrált spektrumok mutatják $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm gerjesztési hullámhossz szolgál az intenzív kék emisszió eléréséhez ($\lambda_{\text{em}} = 440$ nm) a HisHA-Au NCs esetében. A gerjesztő fény hasznosítását QY% mérésekkel elemeztük. A PL lecsengési görbáját pedig TCSPC módszerrel rögzítettük. A $[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$ és HisHA-Au NCs számított adatait a következő táblázatban (**3. táblázat**) hasonlítjuk össze.

3. táblázat: Az optikai mérések főbb adatai (λ_{ex} : gerjesztési hullámhossz, λ_{em} : emissziós hullámhossz, QY%: kvantumhasznosítási tényező (%), τ_1 , τ_2 , τ_3 : fő élettartam komponensek). A χ^2 értékek az illesztés jóságát jelzik.

Minta	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	QY %	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
$[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$	378	475	3,6	0,74	4,03	9,13	1,14
HisHA-Au NCs	365	440	4,2	1,87	0,07	4,20	1,02

A Jellium-modell alapján számítva [28], egy klasztermag valószínűleg $\sim 4-5$ db Au atomot tartalmaz. Ezen rendszer esetén már a B-vitamin-tartalmú rendszerekhez képest nagyobb Stokes eltolódás adódik ($\Delta\lambda = 75$ nm), így a Jellium-modell nem feltétlen tekinthető hiteles adatot szolgáltató egyenletnek. Mint látható, a QY% egy kicsit nagyobb értéknek adódik, de számottevő különbség nem mutatkozik. A PL lecsengési görbék illesztésével mindkét rendszerben 3 fő élettartam komponenst azonosítottunk. A $[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$ esetében a hosszabb élettartam egyértelműen az Au(I)komplex szerkezetére utal, ezzel szemben a rövidebb τ_1 , τ_2 , τ_3 értékek a HisHA-Au rendszer esetében döntően a fémes sajátságokra utalnak. A táblázat az egyes komponensek hozzájárulásának mértékét is szemlélteti a teljes fluoreszcenciához az illesztés jóságával (χ^2) együtt. Irodalmi adatok alapján a rövidebb τ_2 ⁷ a HisHA π --- π stacking kölcsönhatásából származhat [128], a hosszabb τ_1 és τ_3 a fémközpontú emissziókhoz tartozhatnak, úgymint a ligandum-fém (LMCT), valamint a ligandum-fém-fém (LMMCT) töltésátvitel [129][130].

A NCs szerkezeti jellemzéséhez FT-IR vizsgálatokat is végeztünk, mely eredményekből a rendszerben kialakuló kötések jelenlétére következtethetünk. Referenciaként a tiszta His és HisHA IR spektrumát is regisztráltuk. Az FT-IR mérések a minta fémes jellege miatt kevésbé alkalmasak részletes elemzésre. Ez részben megerősíti a NCs kialakulását és alátámasztja az Au nulla oxidációs állapotban történő jelenlétét, amit a

⁷ Megjegyzendő, hogy a 0,07 ns érték már elég kicsi, akár illesztési hiba is lehet, de a kétparaméteres illesztéssel lényegesebb rosszabb illesztést kaptunk. Minden esetre az érték, és az arra tett következtetést fenntartásokkal kezeljük.

Na-citrát használata is megerősíthet. XPS méréseket is megkíséreltünk, de nem sikerült annyi mintát előállítani, hogy ezen méréseket megbízhatóan kivitelezsük. Minden esetre a közvetett tapasztalatok a NCs kialakulására engednek következtetni. A HisHA-Au NCs esetében az imidazolgyűrű jellegzetes rezgésének intenzitása tolódik 3125 cm^{-1} -ről 3030 cm^{-1} -re az aurát-ionokkal való kölcsönhatás hatására, ami arra utal, hogy a fémionok koordinációja valószínűleg ezeken az aromás-*N* donorok részvételével történhet. Ezen felül az aminocsoport hajlító rezgése is eltolódik 1575 cm^{-1} -ről 1556 cm^{-1} -re, ami az aminocsoport fémionhoz történő kötődésére is utalhat [126]. A hidroxamát csoportokra jellemző rezgéstartományon nem figyeltünk meg eltolódást, ezért azt tételezzük fel, hogy ezen kelátképző funkciós csoport kvázi szabadon hozzáférhető a fémmag felületén, oxidációt nem szenved.

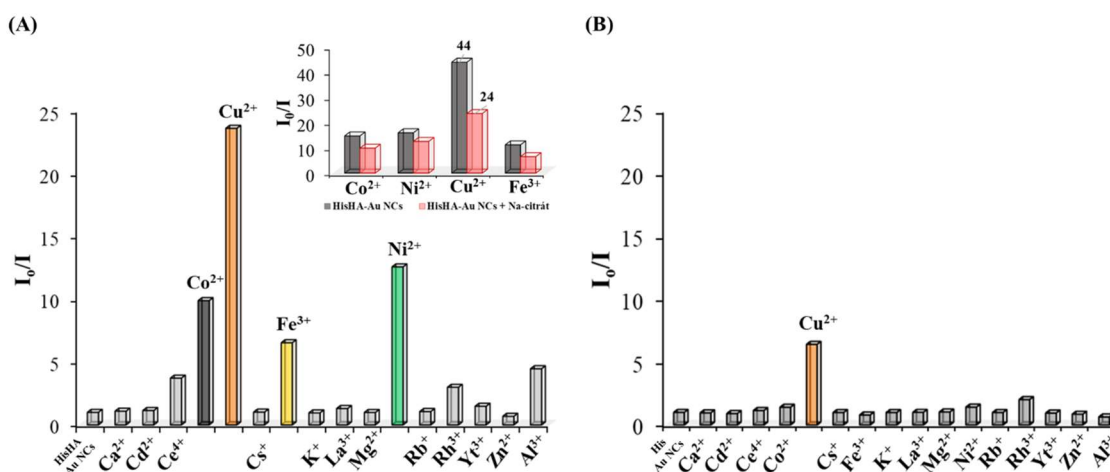
Ennek eredményeképpen a HisHA-Au NCs számos fémionnal történő kölcsönhatását is tanulmányoztam fémion szenzorok tervezéséhez hozzájárulva. Az eredményeket a következő fejezetben részleteztem.

5.7. A HisHA-Au NCs szenzorikai vizsgálata

Ahogy az előző fejezet végén említettem az FT-IR mérések alapján a hidroxamátcsoporthoz jellemző rezgési tartományában nem tapasztaltunk változást a NCs kialakulásának következtében. Ezen megfigyelést arra használtuk fel, hogy megismerjük a NCs fémionokkal szembeni érzékelési lehetőségeit, mivel a NC mag felületén egy olyan szabadon hozzáférhető funkciós csoport alakul ki, amely lehetővé teheti a fémionok (szelektív) megkötését kelátok kialakítása révén.

A biológiai rendszerekben alkalmazott érzékelők fejlesztéséhez fontos, hogy először a fluoreszcens termékek sótűrését vizsgáljuk meg. Ezen mérések a fémionok detektálása esetén nem feltétlenül szükségesek, de a PhD értekezés keretében előállított valamennyi új NCs esetében ezen sótűréses vizsgálatokat elvégeztem. Ebből a célból a HisHA-Au NCs vizes diszperziójához növekvő koncentrációjú NaCl-ot ($c_{\text{NaCl}} = 0,25\text{--}2,5\text{ M}$) adtam, majd adott idő után a NCs-et tartalmazó vizes diszperzió PL spektrumait rögzítettem. A klaszterek $\lambda = 440\text{ nm}$ -nél lévő emissziós csúcsainak intenzitásában nem történt jelentős változás, ami megerősíti akár biológiai közeg(ek)ben való potenciális felhasználásukat. A klaszterek fluoreszcenciája nagyon érzékeny a kémiai környezetre, így bizonyos fémionok jelenléte befolyásolhatja a fluoreszcenciájukat. A HisHA-Au NCs kölcsönhatását különböző elektronszerkezetű egy-, két- és háromértékű fémionnal is megvizsgáltam. A fémionok

NCs-et tartalmazó vizes diszperzióhoz történő hozzáadása után a fluoreszcencia spektrumokat ismételten rögzítettem. Mindezen mérésekhez azonos térfogatú klaszterdiszperziót használtam, és minden mintában a fémionok koncentrációja is azonos volt ($c_{\text{fémion}} = 1,0 \text{ mM}$). Az eredményeket a **33. ábra** mutatja be. Detektálható kölcsönhatás esetében általában a jellegzetes fluoreszcencia intenzitás erősítése, kioltása vagy a karakterisztikus emissziós maximum eltolódása figyelhető meg, ahogyan azt a **7. ábra** is korábban szemléltette. Amint a **33.A. ábrán** látható, a HisHA-Au NCs fluoreszcenciáját négy különböző fémion is, bár eltérő mértékben, de dominánsan csökkenti. Megfigyelhető volt, hogy a Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} és Ni^{2+} fémionok körülbelül 10-, 24-, 6- és 13-ad részére csökkentik a HisHA-Au NCs PL intenzitás értékeit. Ezenkívül a HisHA-Au NCs kizárólag Zn^{2+} -ionok jelenlétében mutatnak fluoreszcencia erősítést ($I_0/I < 1,0$). Összehasonlításként a fent említett vizsgálatokat a $[\text{Au(I)}_x\text{His}_{x+1}]^+$ rendszerre is elvégeztem. Ahogy a **33.B. ábrán** látható, a $[\text{Au(I)}_x\text{His}_{x+1}]^+$ esetében csak a Cu^{2+} -ionok hozzáadására csökken hatod részére a PL, ami nem kifejezetten számít jelentős mértékű kioltásnak.



33. ábra: (A) HisHA-Au NCs korrigált relatív fluoreszcencia értékei különböző fémionok jelenlétében ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,25 \text{ mM}$, $c_{\text{fémion}} = 1,0 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 0,15 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$). (a jobb sarokban beszúrt kis ábrán ugyanezen mérések értékei láthatóak, csak Na-citrát nélküli NCs-et tartalmazó diszperzió esetén). (B) $[\text{Au(I)}_x\text{His}_{x+1}]^+$ korrigált relatív fluoreszcenciája különböző fémionok jelenlétében ($c_{\text{fémion}} = 1,0 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCl}} = 0,15 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 378 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$).

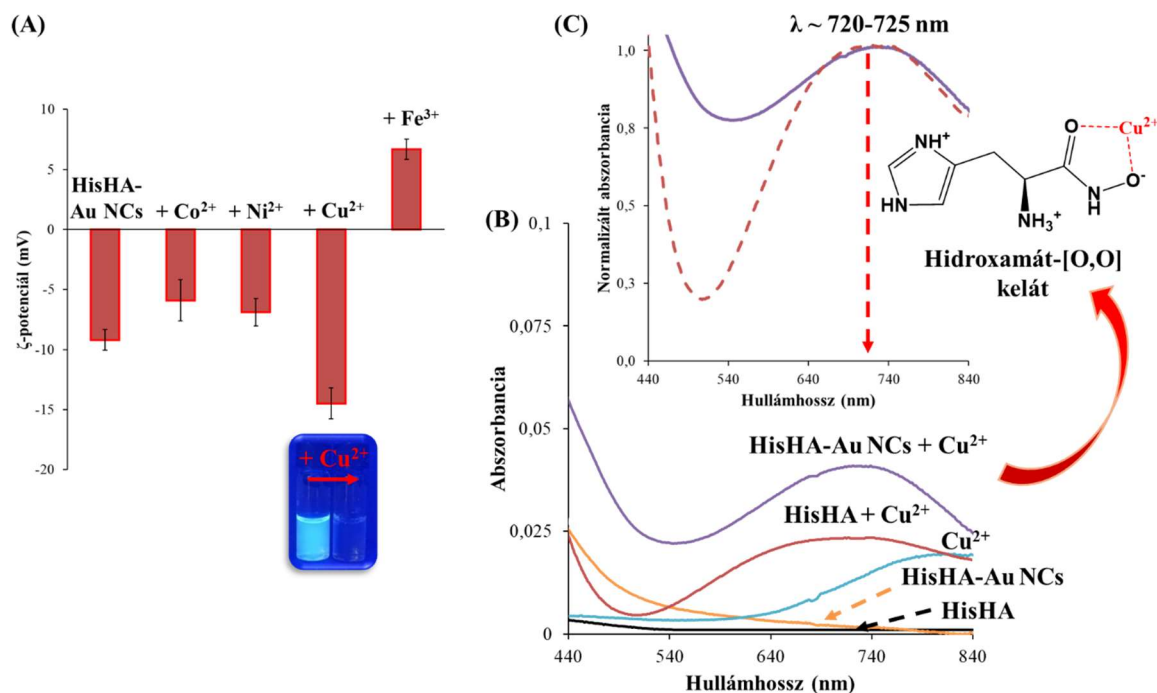
Megállapíthatjuk, hogy a jó kelátképző tulajdonságokkal rendelkező hidroxamátcsoport beépítése a His aminosavba több fémion detektálását segíti elő, és a Cu^{2+} esetében közel négyszer erősebb fluoreszcencia kioltást figyeltünk meg, mint a tiszta His aminosav-alapú nanohibrid rendszer esetében. Természetesen a fluoreszcencia kioltási

vizsgálatokat a HisHA-Au NCs esetében Na-citrát hiányában is vizsgáltam Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} és Fe^{3+} fémionok esetében, ugyanis a Na-citrát is képes ezen fémionkkal fémkomplexek kialakítására. Amint a **33.A. ábra** beszúrt kis ábrája is mutatja, Na-citrát hiányában jobb I_0/I értékeket észleltünk. Ez a pozitív hatás elsősorban a Cu^{2+} LOD értékét változtatja meg jelentősen. A Cu^{2+} esetén a LOD (Na-citrát jelenlétében) = 2,49 μM , míg a LOD (Na-citrát hiányában) = 1,35 μM értéként adható meg. A fokozottabb kioltás azzal magyarázható, hogy a Cu^{2+} -ionok a diszperziós közegben a felületi stabilizáló HisHA ligandummal képeznek komplexeket, így a felületi stabilizáló ligandumok mennyisége lényegesen lecsökken (a felület „elszegényedik”) és a klaszterek PL intenzitása közel abszolút mértékben kioltódik. A Na-citrát jelenlétében a Na-citrát molekulák felület stabilizáló molekulaként viselkednek, így miután a Cu^{2+} -ionok a diszperziós közegben a felületi stabilizáló HisHA ligandummal komplexeket képeztek, a Na-citrát molekulák be tudják tölteni a klasztermag stabilizáló ligandumának szerepét, így a PL kioltás mértéke kisebb. A jelenség részben értelmezhető úgy is, hogy a stabilizáló ligandumok részleges cseréje történik meg. A másik 3 fémion esetében nem volt számottevő változás a Na-citráttal vagy Na-citrát nélkül meghatározott LOD értékek tekintetében, ezek a LOD értékek $\sim 5\text{--}10 \mu\text{M}$ tartományon változtak.

5.7.1. A PL kioltási mechanizmus értelmezése a Cu^{2+} -ionok esetében

A mechanizmusok megértése érdekében részletes fluoreszcencia vizsgálatokat végeztem a Cu^{2+} -tartalmú vizes diszperzió esetében. Emiatt a PL kioltási vizsgálatokat több koncentrációban végeztem el az 1,0 nM–100,0 mM tartományon. Először is meghatároztam a LOD értékét mind a $[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$, mind a HisHA-Au NCs rendszerek esetében. A LOD meghatározásához H.P. Loock és P.D. Wentzell számítási eljárását használtam, amely a nemzetközi publikációkban széles körben hivatkozott LOD meghatározási módszer [131]. A Cu^{2+} -ionok LOD értéke az 1,0 nM–100,0 mM koncentráció tartományon 9,26 μM volt a $[\text{Au}(\text{I})_x\text{His}_{x+1}]^+$ esetében és 2,49 μM a HisHA-Au NCs esetében. A két rendszer esetén a külön-külön azonosított kioltás mértékében látható trend a LOD értékek esetében is kimutatható. Ahhoz, hogy további információt adjunk a kölcsönhatások természetéről, valamint választ kapjunk arra a kérdésre, hogy miért a réz(II)ionok okozzák a legintenzívebb mértékű kioltást, nyomon követtük a HisHA-Au NCs ζ -potenciál értékeit is fémionok hiányában és jelenlétében, tanulmányoztam a közeg pH változását, meghatároztam a PL élettartamokat és ezzel párhuzamosan az NCs-et tartalmazó vizes diszperzió abszorbancia spektrumát is regisztráltam (**34. ábra**). A **34.A. ábrán** jól látható,

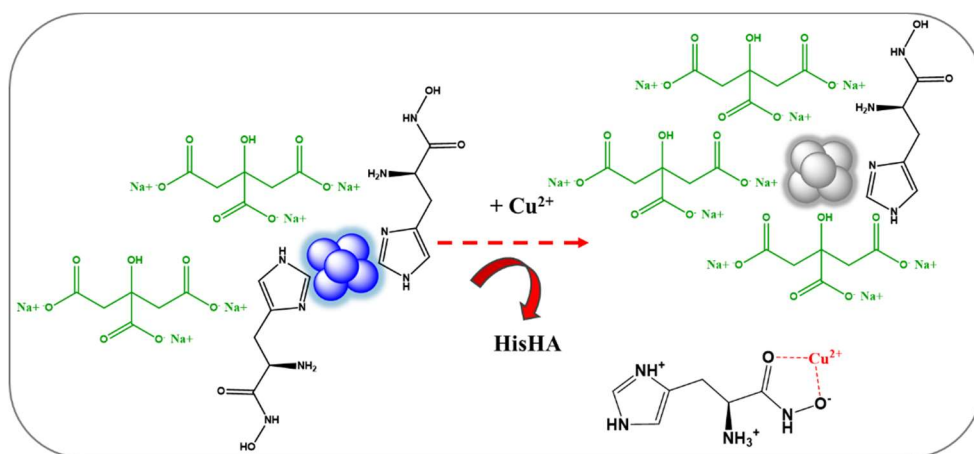
hogy a Co^{2+} -ionok ($\zeta = -5,90 \pm 1,72 \text{ mV}$) és a Ni^{2+} -ionok ($\zeta = -6,90 \pm 1,14 \text{ mV}$) hozzáadására a klaszter ($\zeta = -9,20 \pm 0,86 \text{ mV}$) ζ -potenciál értékei alacsonyabb értékek felé tolódnak, ami utalhat arra, hogy a fémion hozzáadására a NCs stabilitása csökken, ami a kismértékű kioltást okozza. Ezzel ellentétben a felületi töltés pozitív lesz a Fe^{3+} -ionok ($\zeta = +6,64 \pm 0,84 \text{ mV}$) hozzáadásának hatására. Ezek az eredmények jó összhangban vannak az elektrokinetikus potenciál értékeinek várható változásával egy diszperz rendszerben a két- és háromértékű ionok hozzáadásának hatására. Ezekben az esetekben a fémionok a fémfelületen lévő HisHA ligandumokhoz kötődhetnek, ami sztatikus fluoreszcencia kioltást eredményezhet. Sztatikus kioltás esetén az alapállapotban lévő fluorofór (HisHA-Au NCs) és a kioltó (fémion) között egy nem fluoreszcens komplex képződik, és a gerjesztett állapotban a fluoreszcens molekulák száma csökken. A ζ -potenciál további vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a Cu^{2+} -ionok ($\zeta = -14,48 \pm 0,84 \text{ mV}$), a többi fémionhoz viszonyítva, nagyobb negatív értéket mutatnak, ami egyéb kölcsönhatások jelenlétére utal azonos ionerősség beállítás mellett.



34. ábra: (A) HisHA-Au NCs ζ -potenciál értékei különböző fémionok hozzáadása után ($c_{\text{fémion}} = 1,0 \text{ mM}$, $c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,25 \text{ mM}$, $I = 0,15 \text{ M (NaCl)}$). (B) A vizsgált minták abszorbancia spektrumai: HisHA ($c = 3,0 \text{ mM}$) Cu^{2+} -ionok hiányában és jelenlétében ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,5 \text{ mM}$), HisHA-Au NCs Cu^{2+} -ionok hiányában és jelenlétében ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,0 \text{ mM}$) és a tiszta Cu^{2+} -ionokat tartalmazó vizes oldat ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,0 \text{ mM}$). (C) A HisHA- Cu^{2+} (szaggatott vonal)

és HisHA-Au NCs-Cu²⁺ (folytonos vonal) rendszerek normalizált abszorbancia spektruma a komplex javasolt koordinációs módjával az oldatban pH = 4,05 mellett.

Ennek a változásnak az egyik értelmezése az lehet, hogy a Cu²⁺ a klaszter felületéről döntő mennyiségű „soft” (elektrosztatikus stabilitást biztosító nem kötött) HisHA-t képes „összegyűjteni”, és a képződő komplexek megjelennek a vizes diszperzióban. Ezzel párhuzamosan a negatív töltéssel rendelkező, szintén a rendszerben jelenlévő, deprotonált Na-citrát molekulák, amelyek második vagy akár harmadik adszorpciós réteggént vannak jelen a fémmag körül, közelebb kerülnek a felülethez és elektrosztatikus stabilizáló ligandum szerepét töltik be (**35. ábra**), ami a negatívabb ζ -potenciál értékek alapján is feltételezhető. Ezt az elképzelést a rendszer pH-jának megváltozása is megerősítheti, mivel a diszperzió pH-ja pH = 6,81-ről pH = 4,05-re csökken. A többi fémion esetében ez nem volt megfigyelhető, csak a hígulás miatti néhány tized pH változást mértük. Ezenkívül az élettartam mérések is alátámasztják a hipotézisünket. A Cu²⁺-ionok hozzáadását követően jelentős változás mutatkozik a mért élettartam komponensekben is: $\tau_1 = 2,21 \pm 0,12$ ns (33,9 %), $\tau_2 = 0,26 \pm 0,01$ (18,7 %) és $\tau_3 = 7,14 \pm 0,11$ ns (47,4 %). Az élettartam értékek megnövekedésének az egyik oka lehet, hogy a p-pálya átmenet az oxigénben gazdag felületeken kifejezettebb, mint a nitrogén felületeken, ami nagyobb PL élettartam értékeket eredményez [132]. Ez is alátámasztja a felületi ligandum nagyobb mennyiségének cseréjét a dominánsabb N-donorokat tartalmazó HisHA ligandumról a karboxilcsoporttal rendelkező Na-citrát molekulákra.



35. ábra: A NCs szerkezetének feltételezhető változása a Cu²⁺-ionok hozzáadására (pH = 4,0).

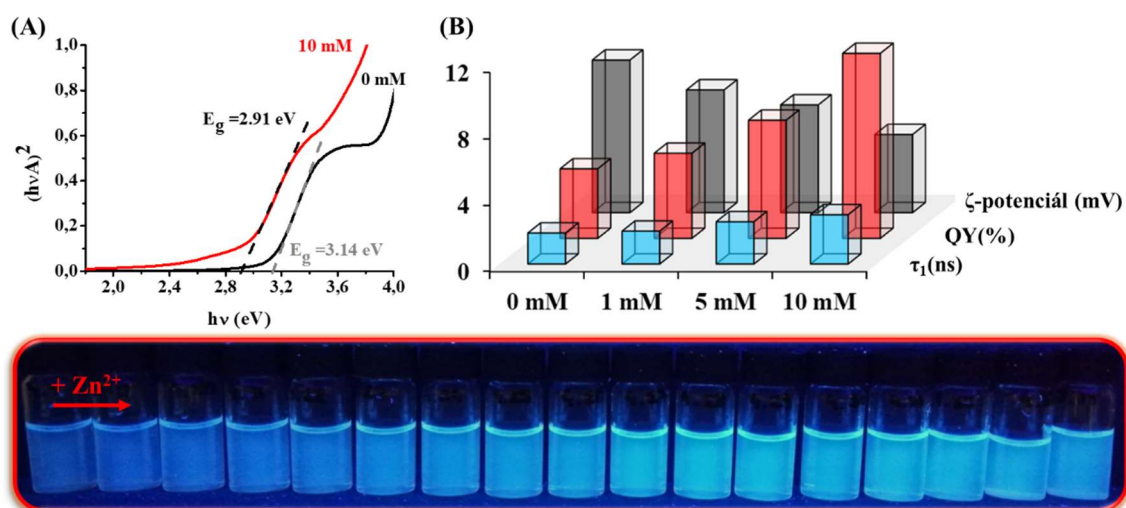
A Cu²⁺-tartalmú rendszer fentebb javasolt mechanizmusának további megerősítése érdekében a diszperzió abszorbancia spektrumát is rögzítettük Cu²⁺-ionok hiányában és

jelenlétében is annak érdekében, hogy a feltételezetten képződő Cu(II)komplexek valóban azonosíthatóak-e a mintában. Ahogyan a **34.B. ábra** szemlélteti, a HisHA-Au NCs nem mutatnak jellegzetes abszorbancia maximumot a $\lambda = 640\text{--}840$ nm tartományon pH = 4,05 mellett, de a Cu²⁺-ionok hozzáadásakor egy új abszorpciós sáv figyelhető meg a $\lambda = 720\text{--}725$ nm hullámhosszon (**34.C. ábra**). Ez a sáv nem a szabad Cu²⁺-ionok jelenlétét mutatja, mivel ez utóbbi $\lambda = 820\text{--}850$ nm-en mutat maximumot. A megfigyelt új abszorpciós sávok azonosítása érdekében a tiszta ligandum (HisHA) spektrumát is regisztráltuk Cu²⁺-ionok jelenlétében azonos pH (pH = 4,05) és koncentráció arányok beállításával. A Vis-tartományon egy széles abszorpciós sávot észleltünk, melynek maximuma $\lambda = 720\text{--}725$ nm-nél található. Az irodalomból jól ismert a HisHA komplexképzése több fémionnal, köztük a Cu²⁺-ionokkal is, és a képződött komplex(ek) spektrális adatai eltérő pH esetén már publikált adatok [126]. Ahogyan az Irodalmi áttekintés fejezetben összefoglaltam, a HisHA Cu²⁺-ionokkal való koordinációja pH = 3–3,5 körül indul és a hidroxamát-[O,O] donorokon keresztül történő kötődés válik dominánssá. A pH = 4,5–7 között az imidazol-*N* és az amino-*N* donorok is koordinálnak a komplexben. Az abszorbancia spektrum $\lambda = 800$ nm-ről $\lambda = 720$ nm-re tolódik el a pH növekedésével (pH = 2,0-ről pH = 4,0-re). A normalizált abszorpciós sávok (**34.C. ábra**) HisHA-Cu²⁺ (szaggatott vonal) és HisHA-Au NCs-Cu²⁺ (folytonos vonal) egyértelműen jelzik ugyanannak a komplexnek a jelenlétét a mintában, ami alátámasztja korábbi feltevésünket, a HisHA-Na-citrát fémfelületen történő változásáról, ahogy a sematikus ábrán is látható (**34.A. ábra**). Meg kell említeni, hogy a rendszerben jelen lévő Na-citrát savas közegben a Cu²⁺-ionokkal [Cu₂citrát₂] dimer-komplexet képezhet, amelynek jellegzetes abszorpciós sávja $\lambda = 760$ nm-en detektálható [133]. A kísérletet Na-citrát nélkül is megismételtük a [Cu₂citrát₂] komplexek preferenciális képződésének kizárása érdekében. Az abszorbancia spektrumban csak a $\lambda = 720\text{--}725$ nm-es sávot észleltük, ami arra utal, hogy a fémionok a HisHA ligandumot részesítették előnyben a Na-citráttal szemben, a Cu²⁺-ionok hozzáadása után a HisHA-Au NCs ζ -potenciálja (Na-citrát nélkül) $-8,99 \pm 5,70$ mV-ról $+9,61 \pm 2,14$ mV-ra változott, ami tovább erősíti azon feltevésünket, hogy a Cu²⁺-ionok a felületi ligandumban elszegényítik a fémag felületét, ami a PL kioltást eredményezi.

5.7.2. A PL erősítési mechanizmus értelmezése a diamágneses Zn²⁺-ion esetében

A HisHA-Au NCs fémionokkal való kölcsönhatása során csak a Zn²⁺-ionok eredményeztek PL erősítést. A Zn²⁺-ionok koncentrációját növelve a vizes diszperzióban, a klaszterek fluoreszcencia intenzitása nem mutat lineáris növekedést. A LOD számolásához a

széles körben ismert $LOD=3s_{bl}/m$ egyenletet használtuk a nem lineáris összefüggés miatt, ahol s_{bl} a Zn^{2+} -ionok nélküli háttér fluoreszcencia jel, m pedig a kalibrációs görbe kezdeti tartományának meredeksége [134]. A legkisebb kimutatható mennyiség $7,5 \mu M$. Az $1,0 nM$ – $5,0 \mu M$ koncentráció tartományon az I/I_0 értékek azonosak ($\sim 1,0$) és az első jelentős növekedés $\sim 7,5 \mu M$ -től kezdődik, és az I/I_0 értékek detektálható jelet mutatnak az $50 \mu M$ – $1,0 mM$ tartományon ($R^2 = 0,9851$). A Zn^{2+} -ionok koncentrációjának fokozatos növelése intenzív erősítést eredményez, ami a QY%-ben lineáris tendenciát mutat $1,0$ és $10,0 mM$ között. A PL erősítés mechanizmusának feltárása érdekében optikai és ζ -potenciál méréseket végeztünk különböző Zn^{2+} koncentrációk alkalmazásával. A **36.B. ábrán** látható, hogy az élettartam komponensek és a QY% növekszik a Zn^{2+} -ionok koncentrációjával, ugyanakkor a ζ -potenciál abszolút értéke csökken.



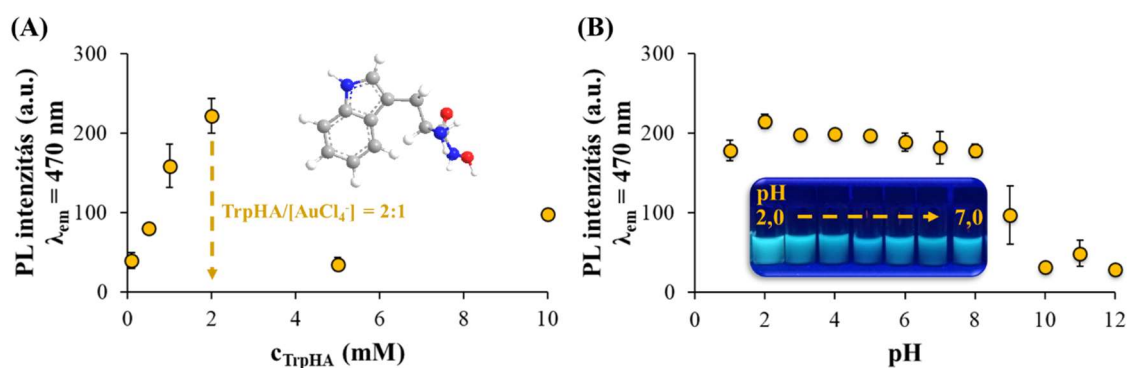
36. ábra: (A) Az UV-Vis spektrumokból készített Tauc-diagram ábrázolása a tiszta HisHA-Au NCs esetében és $10,0 mM$ Zn^{2+} -tartalom esetén. (B) A mért τ_1 , QY% és a ζ -potenciál abszolút értékei a Zn^{2+} -ion koncentráció függvényében. Növekvő Zn^{2+} koncentráció esetén a minták UV-lámpa alatti fotójával kiegészítve.

A Zn^{2+} -ion a klaszter felületén – irodalmi adatok szerint – előnyben részesíti a szabadon hozzáférhető hidroxamát [O,O] koordinációt [135]. Figyelembe véve a relatív fluoreszcencia görbék nem lineáris kapcsolatát az is megállapítható, hogy az első, enyhe erősödést mutató régióban a fémionok az NCs közelében lévő HisHA molekulához kötődnek, melyek elektrosztatikus stabilizáló szerepet töltenek be. A második régióban, ahol nagyobb erősítést észlelünk, a Zn^{2+} -ion már koordinálódhat a HisHA ligandum szabad hidroxamát donorcsoportján keresztül, amely közvetlenül a felülethez kötődik. A Zn^{2+} kötődés lehetősége a felületen lévő HisHA ligandumokon keresztül kissé gyengíti a klaszter

stabilitását a ζ -potenciál értékek alapján. Ezt a PL-élettartam adatok is alátámasztják, mivel a komponensek közül főként a fémmaghoz kapcsolódó komponensek (τ_1 és τ_3) növekednek. A Tauc-diagram segítségével lehetséges a HOMO-LUMO energiarés kiszámítása a klaszterek vonatkozásában. Ehhez olyan UV-Vis spektrumokat rögzítettünk, melyben 10 mM Zn^{2+} -ion hozzáadása a második abszorpciós csúcs nagymértékű vörös eltolódását okozza 355 nm-ről 376 nm-re, ez arra utal, hogy az NCs szupramolekuláris szerkezete megváltozott (**36.A. ábra**). Az Au NCs kezdeti energiaszintje kb. 3,1 eV volt, de a Zn^{2+} -ionokkal való kölcsönhatás következtében ez megváltozott és kb. 2,9 eV-ra csökkent, ami a Zn(II) komplexelek fotoaktív viselkedése miatt megkönnyíti az elektronok gerjesztését a HOMO-sávból a LUMO-sávba [136]. Végül arra a következtetésre juthatunk, hogy a Zn^{2+} -ionok kötése a felületi HisHA ligandumokhoz enyhe stabilitás veszteséget okoz, de jelentősen fokozott fluoreszcenciát eredményez.

5.8. A TrpHA-Au NCs előállítási folyamata

A TrpHA alkalmazásával szintetizált arany-tartalmú rendszerek esetén is számos kísérletet végeztem a reakciókörülmények (mólarány, pH, prekursor fémsó koncentráció, hőmérséklet, szintézis idő) termék előállítására gyakorolt hatásainak tanulmányozására. Munkám első lépéseként a $\text{TrpHA} \cdot [\text{AuCl}_4]^-$ mólarányok szerepét vizsgáltam a fluoreszcens termék megjelenésében a 0,1:1,0–10:1 tartományon. Az átlagos maximális fluoreszcencia intenzitásokat a **37. ábra** foglalja össze.



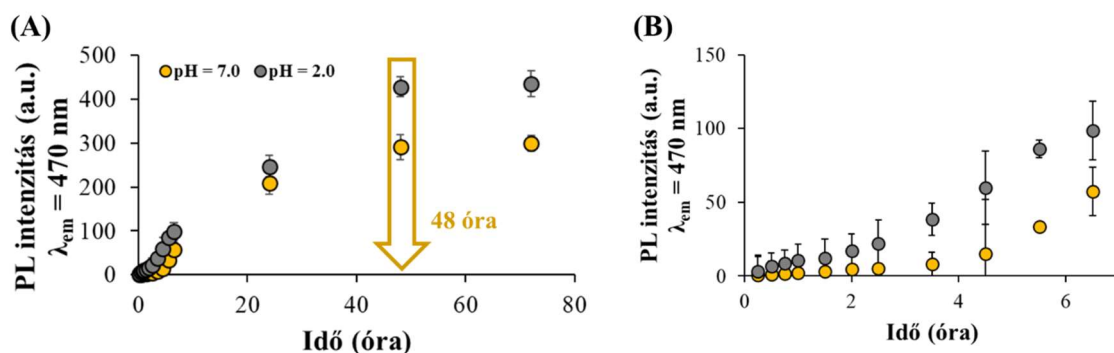
37. ábra: (A) A fluoreszcens termékek maximális emissziós intenzitás értékei a c_{TrpHA} függvényében 24 óra elteltével ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0$ mM, pH = 7,0, $\lambda_{ex} = 380$ nm) a TrpHA szerkezeti képletével. (B) A $\lambda_{em} = 470$ nm-nél lévő emissziós sáv átlagos fluoreszcencia intenzitásai a pH függvényében ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0$ mM, $\text{TrpHA}:[\text{AuCl}_4]^-/2:1$, $\lambda_{ex} = 380$ nm) a pH = 2–7 közötti minták megfelelő fotóival.

Megfigyeltük, hogy a $\text{TrpHA}:[\text{AuCl}_4]^-/2:1$ moláris arány alkalmazása Au nanoszerkezetek kialakulását eredményezi $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm gerjesztési hullámhosszon, melyek intenzív kék-zöld emisszióval rendelkeznek, tehát a fémionhoz viszonyított kisebb ligandumfelesleg is alkalmas a maximális intenzitású fluoreszcens termékek kialakulásához [44]. Kis ligandumfelesleg (pl. $\text{TrpHA}:[\text{AuCl}_4]^-/1:1$) esetén nincs elegendő ligandum az oldatban az összes fémion redukálásához, ami kisebb hozammal előállítható NCs-et eredményez, és így a jellegzetes emissziós intenzitás nem éri el a maximális értéket. Ha nagyobb mennyiségű ligandumot használunk (pl. $\text{TrpHA}:[\text{AuCl}_4]^-/5:1$), akkor a nagy mennyiségű ligandum jelenléte már sztérikusan gátolhatja a nukleációt, ami szintén a fluoreszcencia intenzitásának csökkenését eredményezheti.

A reakcióelegy pH-jának szintén fontos szerepe van a fluoreszcens klaszterek kialakulásában, ezért a szintéziseket számos pH beállítása mellett is elvégeztem széles pH tartományon. A rendszerek átlagos emissziós intenzitásait a **37.B. ábra** mutatja be. Megfigyelhető, hogy a savas pH-tartomány kedvezőbb (a pH = 2–7 tartományon közel azonos PL intenzitás detektálható), mint a bázikus közeg. A hasonló értékek alapján a további vizsgálatokhoz a pH = 2,0 értéket választottam, ugyanis a Trp esetén is az extrém savas közeg volt a kedvező [44]. A TrpHA ligandum alkalmazhatóságának tanulmányozása során az is cél, hogy összehasonlítsuk az új, hidroxamát funkciós csoporttal rendelkező molekula szintézis paramétereit a tisztán Trp segítségével előállított Au NCs esetén meghatározott főbb paraméterekkel. A ligandum-fémion moláris arány és a pH hatását összevetve a TrpHA-Au NCs kialakulására hasonló tendencia állapítható meg, mint amit a tiszta Trp-tartalmú rendszerek esetében detektáltunk. Mindent összevetve, a Trp-nal stabilizált kéken emittáló NCs esetén is ($\lambda_{\text{em}} = 497$ nm Trp:[AuCl_4] $^-/1:1$; $\lambda_{\text{em}} = 486$ nm Trp:[AuCl_4] $^-/5:1$) a savas közeg (pH ~ 1 –2), valamint a kisebb ligandumfelesleg (Trp:[AuCl_4] $^-/1:1$ –5:1) volt kedvező a klaszterképződés szempontjából.

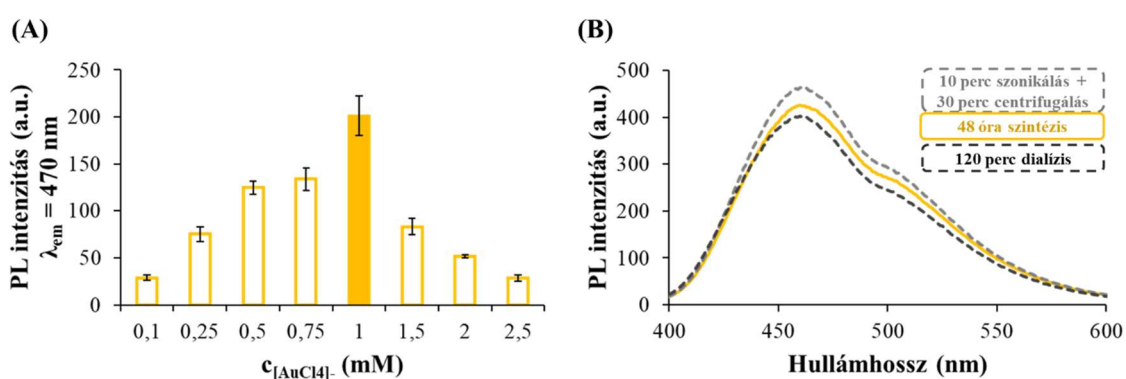
A hőmérséklet hatásának vizsgálatokhoz azt tapasztaltuk, hogy a hőmérséklet 25 °C-ról 80 °C-ra történő emelése nagyobb PL intenzitást eredményezett. Alacsonyabb hőmérsékleteken elhanyagolható PL figyelhető meg. A minta forralása nagyobb NPs és aggregátumok jelenlétét okozta, ezért a 80 °C-ot fogadtuk el megfelelőnek.

A szintézisidő vizsgálata során a reakcióelegy emissziós spektrumát több időpontban is felvettem. Ezeket a kísérleteket pH = 7,0 és pH = 2,0 mellett is elvégeztem (**38. ábra**), hogy ezzel is bizonyítsuk a pH meghatározó szerepét.



38. ábra: (A) A fémion koncentráció hatása a fluoreszcencia intenzitásokra (TrpHA:[AuCl₄]⁻/2:1, pH = 2,0, λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 470 nm, t = 24 óra). (B) A TrpHA-Au NCs emissziós spektrumai 48 órás szintézis után ((TrpHA:[AuCl₄]⁻/2:1, $c_{[AuCl_4]^-}$ = 1,0 mM, pH = 2,0, λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 470 nm, pH = 2,0).

A fluoreszcencia intenzitások 24 óráig közel lineárisan növekednek, de a maximális értéket 48 óra után érik el. (38.A. ábra) Megállapítható, hogy a TrpHA-Au NCs kialakulása savasabb körülmények mellett valóban kedvezőbb, ami a Trp-Au NCs rendszerekkel hasonlóan, az indol-tartalmú vegyületek savas környezetben lejátszódó autopolimerizációs folyamatának köszönhető. A szintézis utolsó lépéseként a fémion koncentráció hatását tanulmányoztam a 0,1–2,5 mM koncentráció tartományon. A felvett PL spektrumok alapján (39.A. ábra) a legnagyobb emissziót 1,0 mM esetén észleltem. A magasabb fémkoncentráció alkalmazása a PL intenzitás csökkenéséhez vezet, és a mintában kisebb aggregátumok is megjelennek.

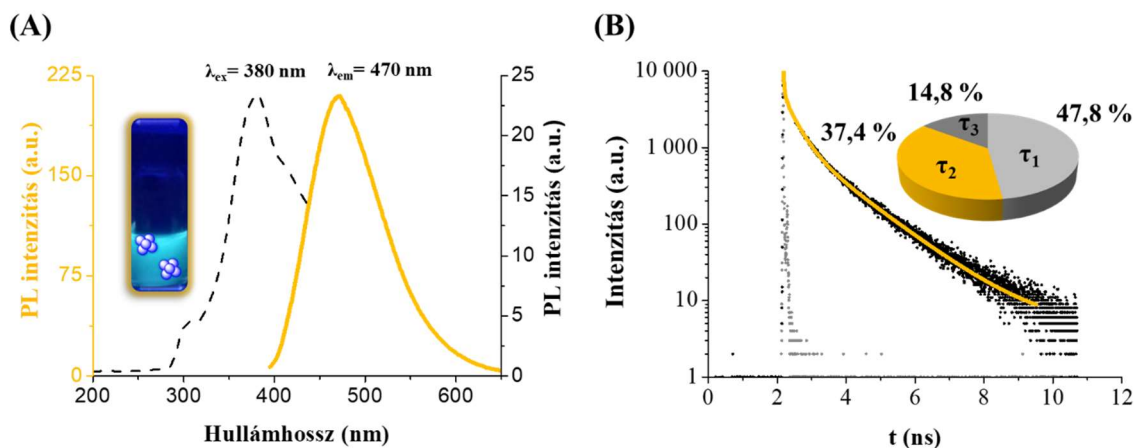


39. ábra: (A) A fémion koncentráció hatása a fluoreszcencia intenzitásokra (TrpHA:[AuCl₄]⁻/2:1, pH = 7,0, λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 470 nm). (B) A TrpHA-Au NCs emissziós spektrumai 48 órás szintézis után.

A szintézist követően a reakcióelegyet 10 perces szonikálás után 13000 rpm-en 30 percig tartó centrifugálással, majd 120 percig tartó dialízissel tisztítottam, hogy eltávolítsam a mintából a lúgfelesleget és a maradék nem redukált prekursor fémsót. A centrifugálás előtt 10 perces szonikálással az üveg felületére tapadt kis mennyiségű NCs-t vissza lehet diszpergálni a vizes diszperzióba. Ezt a 48 órás szintézis után a NCs diszperziójának emissziós spektrumai is megerősítik, mivel az emissziós intenzitás kb. 8 %-kal növelhető (**39.B. ábra**). A 120 perces dialízis végén a diszperzió intenzitása csak kb. 5 %-kal csökken, így az NCs membránon keresztül történő diffúziójának mértéke alacsony, amit a NCs koncentrációjának kiszámításánál figyelembe vettünk.

5.9. A TrpHA-Au NCs optikai és szerkezeti jellemzése

A tisztított TrpHA-Au NCs optikai jellemzőihez meghatároztuk a gerjesztési és emissziós spektrumokat (**40.A. ábra**), a QY% és a PL élettartam értékeket (**40.B. ábra**). Az emissziós spektrum esetében csak egy jellegzetes sáv azonosítható 470 nm-nél, más sáv(ok) jelenléte alacsonyabb hullámhosszon nem figyelhető meg, ami azt jelenti, hogy a Z. S. Kardar [137] által támogatott Trp aminosav indol-3-ecetsavvá történő oxidációját valószínűleg a hidroxamát funkciós csoport jelenléte gátolja.



40. ábra: (A) TrpHA-Au NCs ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0 \text{ mM}$) reprezentatív gerjesztési (fekete szaggatott) és emissziós (sárga folytonos vonal) spektrumai a minta UV-lámpa alatt készült fotójával. (B) A TrpHA-Au NCs fluoreszcencia lecsengési görbéje a fő élettartam-komponensek hozzájárulásával ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$).

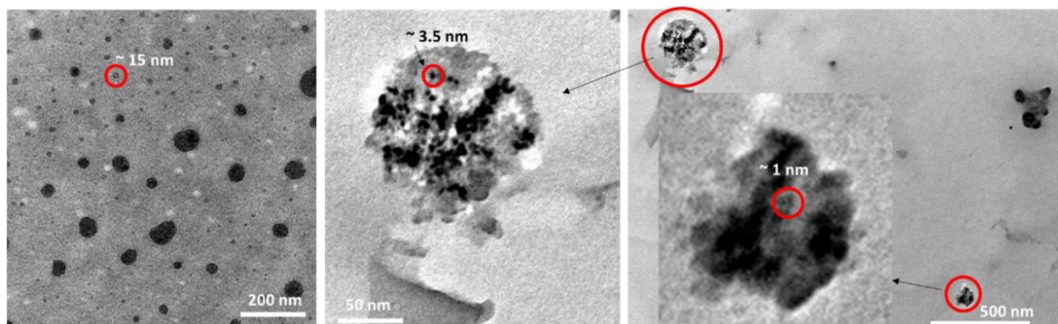
A frissen előállított NCs meghatározott QY% = 2,13 %, ami jó összhangban van a Trp-stabilizált Au és Cu NCs korábban meghatározott értékeivel [137][138]. A számított átlagos PL élettartam $1,47 \pm 0,18 \text{ ns}$, amely a különböző fotofizikai folyamatoknak

köszönhetően három komponensből származik. A fő összetevők a következők: $\tau_1 = 12,85$ ns 47,8 %-kal, $\tau_2 = 3,57$ ns 37,4 %-kal és $\tau_3 = 0,27$ ns 14,8 %-kal. Általánosságban megállapítható, hogy a legrövidebb τ_3 érték a néhány atomos fém magokhoz tartozik, míg a hosszabb τ_1 és τ_2 a felületi ligandum-függő fém-ligandum töltésátvitelt képviseli. A Jellium-modell alapján [28], egy klasztermag valószínűleg ~ 4–5 db Au atomot tartalmaz, viszont ez csak fenntartásokkal kezelhető, mert $\Delta\lambda = 90$ nm.

A TrpHA egy nitrogén-tartalmú heterociklusos vegyület, amely egy benzolgyűrűhöz fuzionált pirrolgyűrűvel, valamint hidroxámsav- és aminocsoportokkal rendelkezik. A NCs szerkezetének tanulmányozásához elvégzett FT-IR mérések alapján a tiszta TrpHA és a TrpHA-Au NCs infravörös spektrumát azonos pH mellett rögzítve megállapítható, hogy az indolgyűrű -NH csoportjának szimmetrikus nyújtási rezgése 3397 cm^{-1} -ről 3382 cm^{-1} -re tolódnak el az aurát-ionokkal való kölcsönhatás következtében, ami arra utal, hogy ennek a csoportnak lehet szerepe a Trp oxidációjában, valamint a fémionok megkötésében. A karakterisztikus, hidroxamátcsoporthoz rendelhető sávok (pl. $\nu_{\text{C=O}}$, $\delta_{\text{N-H}}$, δ_{NOH} , $\nu_{\text{C-N}}$) eltolódása nem észlelhető. S. Li és munkatársai Trp bevonatú Ag NCs-et szintetizáltak. Munkájuk során FT-IR mérésekkel is megerősítették, hogy a Trp oldalláncában lévő aromás-NH nitrocsoporttá ($-\text{NO}_2$) oxidálódik, míg az Ag^+ -ionok redukálódnak és Ag NC struktúrába rendeződnek [139]. Esetünkben a $-\text{NO}_2$ domináns jelenléte infravörös vizsgálatokkal nem azonosítható, sőt a hidroxamát oxidációja nitrozocsoportot tartalmazó vegyület megjelenését eredményezné, amely a $-\text{NO}_2$ -hoz hasonlóan szintén nem detektálható FT-IR méréseink alapján. Valószínűleg esetünkben a NCs képződése a korábban említett polimerizációs reakción alapul, amely extrém savas körülmények között az indolgyűrűvel rendelkező molekulák esetében igazolható [140]. Így az amino- és hidroxamátcsoportok a felületen akár szabadon hozzáférhető formában vannak, ezzel fémionok koordinációjára képesek lehetnek.

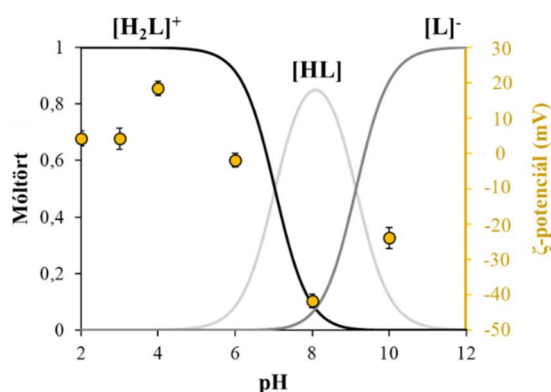
A NCs nanométer alatti mérete miatt sem a nagy felbontású transzmissziós elektronmikroszkópia, sem a DLS nem eredményez értékes adatokat az egyedi (primer) NCs méretéről és méreteloszlásáról. A legjobban sikerült HRTEM képeket a **41. ábra** mutatja be. A mintában, az első felvétel alapján (**41. ábra**, bal oldal) kisebb-nagyobb, ~ 10–80 nm közötti, néhány ill. néhány tíz NCs összekapcsolódásával kialakuló adduktumok azonosíthatóak. Nagyobb nagyítás mellett (**41. ábra**, középső felvétel) már lényegesen kisebb, 3–4 nm átmérőjű NCs is azonosíthatóak. Igyekeztünk a lehető legjobb felvételeket készíteni, de a **41. ábrán** (jobb oldalt) talán kimutathatóak ~ 1 nm körüli NCs is, de a felvétel

nem jó minőségű. Bár XPS méréseket ezen rendszer esetén sem tudunk kivitelezni, de a HRTEM képek igazolhatják a NCs jelenlétét.



41. ábra: Reprezentatív HRTEM képek a TrpHA-Au NCs-t tartalmazó vizes diszperzióról különböző nagyításokban.

A méretre vonatkozóan azonban $\sim 0,97 \pm 0,41$ nm meghatározható fényszórás mérésekkel, de mivel ez az érték közel van a műszer kimutatási határához, csak feltételekkel fogadható el. A pH-függő DLS mérés segítségével már a kisebb NCs aggregátumai ($d \sim 20\text{--}40$ nm) azonosíthatók, így a ζ -potenciál értékek $\text{pH} = 2\text{--}10$ között ezen nagyobb nano-objektumok jelenléte alapján a felület megjelenése által határozhatók meg. A mérések alapján a TrpHA fémfelületen való kötődése egyértelműen igazolható, mivel a ζ -potenciál értékek változása a pH függvényében teljes mértékben követi a TrpHA molekula koncentrációeloszlási görbáját [141][91]. Ennélfogva, jól definiált pozitív értékek (pl. ζ -potenciál = $+20,15 \pm 1,5$ mV $\text{pH} \sim 4,0$ -nél) mérhetők $\text{pH} \sim 6$ alatt, ahol a TrpHA teljesen protonált formában (H_2L^+) van. A proton disszociációval párhuzamosan (ammóniumról az aminocsoportra) a ligandum semlegessé válik és a ζ -potenciál előjelet vált, ami a ligandum fémfelületen való jelenlétét jelzi (**42. ábra**).

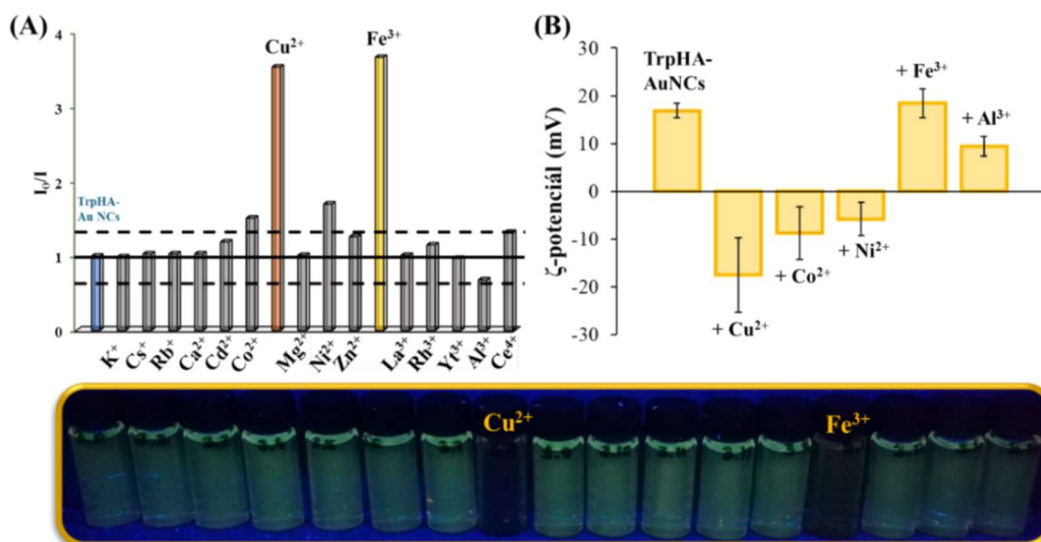


42. ábra: A TrpHA koncentrációeloszlási görbéi ($c_{\text{TrpHA}} = 2,0$ mM, folytonos vonalak) a TrpHA-Au NCs ζ -potenciálértékeivel a pH függvényében (pontokkal jelölve) ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 1,0$ mM, $I = 0,15$ M (NaCl)).

A tisztított NCs sötétítésének vizsgálatához a NaCl koncentráció hatását vizsgáltuk az NCs stabilitására a 0,25–2,5 M tartományon. Az eredmények alapján $c_{\text{NaCl}} \sim 1,0$ M alatt nem volt jelentős változás az NCs emissziós intenzitásában, de a magasabb sótartalom mérhető csökkenést okoz a PL intenzitásában (kb. 30 %), ezért a továbbiakban a szenzorikai vizsgálatokhoz $c_{\text{NaCl}} = 0,15$ M használtunk.

5.10. A TrpHA-Au NCs szenzorikai vizsgálata

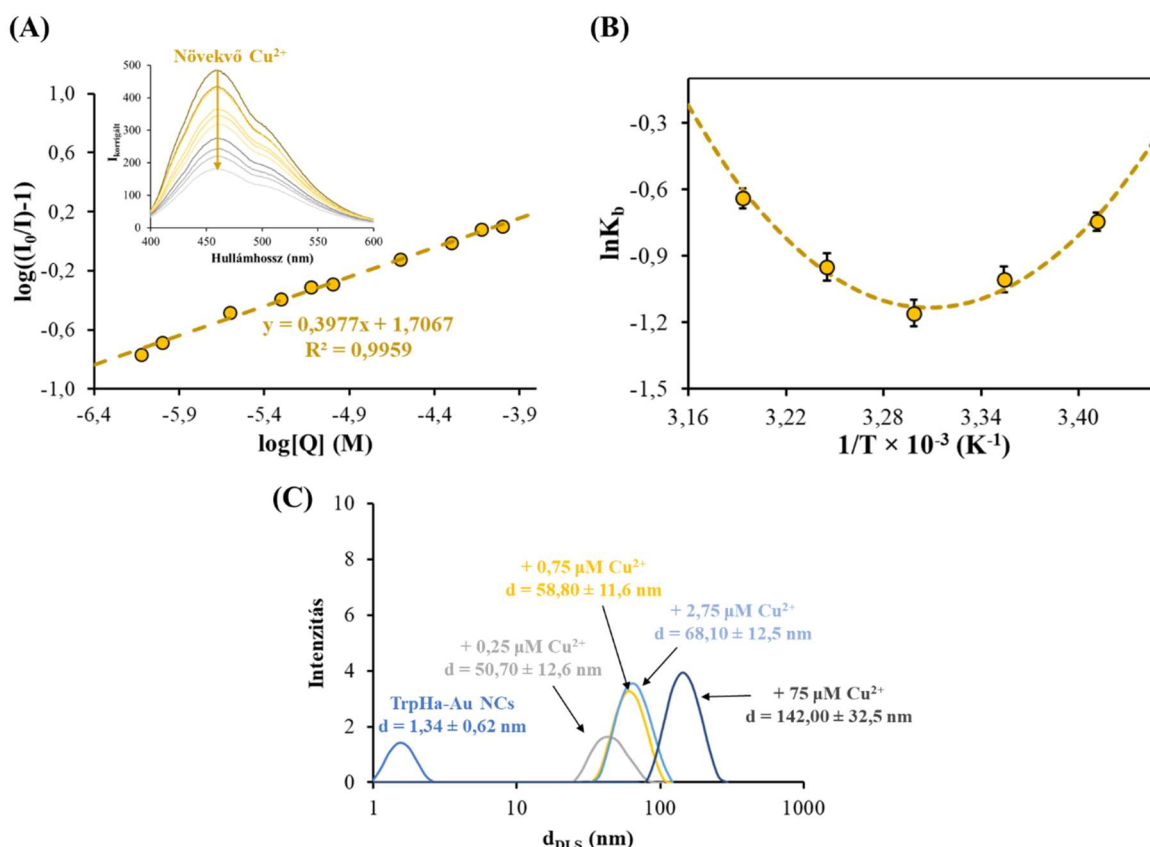
A tisztított és szerkezetileg jellemzett TrpHA-Au NCs szenzorikai alkalmazásokban rejlő lehetőségeit is vizsgáltuk eltérő fémionok esetében. Kísérleteink során olyan biológiailag fontos és általánosan vizsgált fémionokat használtunk, mint pl. a Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} *stb.* Jól ismert, hogy ezek a paramágneses tulajdonságú fémionok általában PL kioltást okoznak, míg a diamágneses fémek esetében, mint az Al^{3+} vagy a Zn^{2+} a PL erősítése a gyakoribb. A szelektivitást és az érzékenységet nagymértékben meghatározza a fémmagot stabilizáló bioligandum minősége. A TrpHA-Au NCs potenciális optikai szenzorként való alkalmazásához a klaszterek fluoreszcencia spektrumait számos fémion jelenlétében és hiányában is rögzítettem, ahogyan ezt már korábban a másik rendszer esetén is kiviteleztem. A relatív fluoreszcencia értékeket (I_0/I) a **43. ábra** szemlélteti. Szakirodalom több közlemény alapján is, a Trp-Au NCs kizárólag a Fe^{3+} -ionok hatására mutatnak mérhető fluoreszcencia kioltást [142][138], az összes többi fémiont tartalmazó rendszerben a NCs fluoreszcenciája nem változik. Amennyiben a karboxilátcsoportot hidroxamátcsoporra módosítjuk, akkor a **43. ábra** adatai alapján látható, hogy a Fe^{3+} -ionok mellett a Cu^{2+} -ionok esetén is mutatkozik domináns kioltás ($I_0/I \sim 3,6\text{--}3,8$). A Ni^{2+} és Co^{2+} -ionok esetében csak enyhe kioltást ($I_0/I \sim 1,3\text{--}1,5$) észleltünk. Az eredmények alapján tehát megállapítható, hogy a funkciócsoport cseréje valóban hatással van a NCs szelektivitására. A kioltással párhuzamosan a TrpHA-Au NCs ζ -potenciál értéke +18,5 mV-ról közel -20 mV-ra változik, ezt jól szemlélteti a **43.B. ábra**. Valószínűleg a Cu^{2+} a felülethez kötött ligandumból disszociálható protonokat szabadíthat fel, majd komplexet képezhet a klaszter felületén. Ezt igazolja a diszperzió pH értékének változása is, mivel a pH = 4,58-ról pH = 3,85-re változik (a tiszta Cu^{2+} oldat pH-ja pH = 4,93). A LOD értéket használtuk fel annak meghatározására, hogy a Cu^{2+} és Fe^{3+} tekintetében melyik okozta a dominánsabb kioltást. Ebből a célból számos fémion koncentráció (1,0 nM–100 mM) beállítása mellett követtük a NCs relatív PL intenzitás értékeinek a változását. Az eredményeket a következő fejezetben részletezzük és értelmezzük.



43. ábra: (A) A TrpHA-Au NCs korrigált relatív PL ($I_0/I = 1$ esetén nincs detektálható kölcsönhatás (fekete folytonos vonal), a szaggatott vonal pedig a mérési eredmények szórását jelöli). és (B) ζ -potenciál értékei több fémion vizsgálata során ($c_{\text{fémion}} = 0,15 \text{ mM}$, $c_{[AuCl_4]^-} = 0,25 \text{ mM}$, $c_{NaCl} = 0,15 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) az egyes minták UV-lámpa alatti fotójával.

5.10.1. A TrpHA-Au NCs és a Cu^{2+} -ionok PL kioltási folyamatának javasolt mechanizmusa

A TrpHA-Au NCs kölcsönhatását Cu^{2+} -ionok jelenlétében részletesebb PL kioltási vizsgálatokkal tanulmányoztuk szenzorikai vizsgálataink során. A mérés során folyamatos PL intenzitás csökkenés figyelhető meg (44.A. ábra). Ezen kísérletek alapján a Cu^{2+} esetében meghatározható a LOD, ami $3,16 \text{ } \mu\text{M}$ [131]. Ezután meghatároztuk azon dinamikus tartományt, ahol a detektálható jel (tehát a kioltás mértéke) lineárisan változik az analit koncentrációjának függvényében. Amint a (44.A. ábra) mutatja a $\sim 1,5\text{--}90 \text{ } \mu\text{M}$ koncentráció tartományon lineáris összefüggés érhető el, viszont a koncentráció további növelésével egy telítődés felé hajló görbét kapunk, ami kombinált (sztatikus és dinamikus) kioltási mechanizmust jelez. A fémion hozzáadását követően rögzítettem az abszorbancia spektrumokat, melyekről megállapítható, hogy a látható tartományon nem azonosítható színes komplexek jelenléte, ami megerősíti azt a tényt, hogy a stabilizáló ligandum nem „távolítható el” a fémfelületről, amit a korábbi munkánk a HisHA-Au NCs esetében már megállapítottunk. A $\text{pH} < 4$, ami miatt a Cu^{2+} -ionok hidrolízise sem meghatározó.



44. ábra: (A) TrpHA-Au NCs emissziós spektrumai növekvő Cu^{2+} koncentráció mellett és a PL kioltás adatainak módosított Stern-Volmer ábrázolása növekvő Cu^{2+} jelenlétében ($c_{[\text{AuCl}_4]^-} = 0,25 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). (B) Cu^{2+} és a TrpHA-Au NCs kölcsönhatására vonatkozó $\ln K_b$ vs. $1/T$ adatok van't Hoff ábrázolása (a szaggatott sárga vonal a nemlineáris paraméterbecslés eredményét mutatja). (C) A TrpHA-Au NCs DLS-görbéi a Cu^{2+} -ionok növekvő koncentrációjának jelenlétében.

Ahhoz, hogy több információt kapjunk a kioltás mechanizmusának természetéről, hőmérséklet-függő PL kioltási kísérleteket is végeztem. Megfigyeltük, hogy $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on a TrpHA-Au NCs fluoreszcencia intenzitása szinte lineárisan csökkent a Cu^{2+} koncentrációjának növelésével, ezért a lineáris összefüggést figyelembe véve a kioltási vizsgálatokat 5 különböző hőmérsékleten végeztem el a kötődési folyamat mechanizmusának és termodinamikájának megértése érdekében. Az eltérő kioltási mechanizmus miatt a mérési adatokat a dolgozat 2.2.3. fejezetében ismertetett módosított Stern-Volmer egyenlet segítségével értékeltem ki, ahol a kioltó analitikai koncentrációjának függvényében ábrázoltam a mérésekből származó I_0/I értékeket (44.A. ábra). Így a lineáris regresszió meredeksége és metszéspontja megadja n és K_b értékét.

4. táblázat: Stern-Volmer kötési paraméterek a $\log [(I_0/I)-1]$ vs. $\log [Q]$ ábrázolások lineáris regressziójából és termodinamikai paraméterek a $\ln K_b$ vs. $1/T$ adatok van't Hoff ábrázolásának nemlineáris regressziójából a Cu^{2+} és TrpHA-Au NCs kölcsönhatásra vonatkozóan több hőmérsékleten.

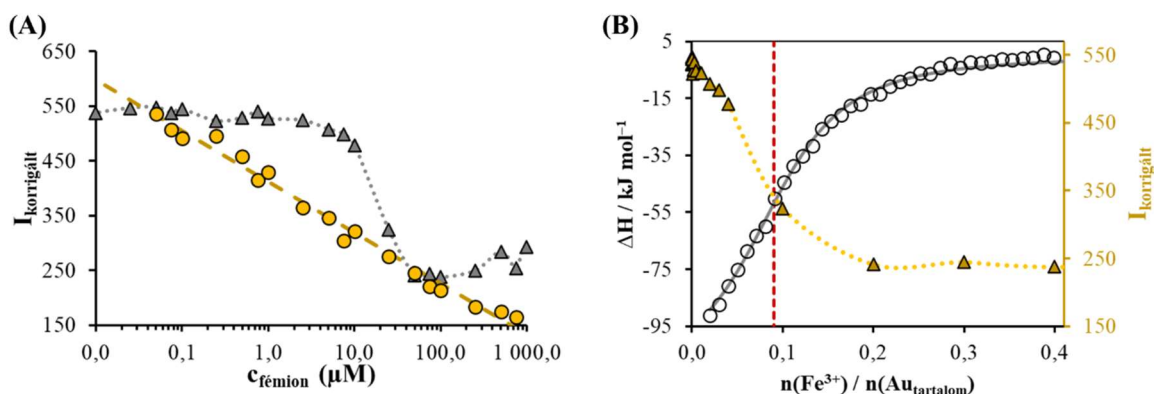
T (K)	K_b (M^{-1})	n	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 ($\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	ΔC_p ($\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
283	$2,39 \times 10^2 \pm 9,09 \times 10^{-1}$	$0,5 \pm 0,1$			
293	$6,11 \times 10^1 \pm 8,72 \times 10^{-1}$	$0,4 \pm 0,1$			
303	$4,56 \times 10^1 \pm 8,72 \times 10^{-1}$	$0,3 \pm 0,1$	$-29,69 \pm 3,40$	$-0,11 \pm 0,01$	$-7,19 \pm 0,31$
313	$1,24 \times 10^2 \pm 8,72 \times 10^{-1}$	$0,4 \pm 0,1$			
318	$3,34 \times 10^2 \pm 8,99 \times 10^{-1}$	$0,5 \pm 0,1$			

Amint a **4. táblázat** mutatja a K_b értékek három hőmérsékleti értéken 10^2 M^{-1} nagyságrendűek voltak, ez arra utal, hogy egy domináns kölcsönhatás történhet, amely a PL intenzitás kioltásához vezet egy nem fluoreszcens adduktum megjelenése miatt. A Cu^{2+} és a TrpHA-Au NCs közötti reakció termodinamikájának mélyebb megértéséhez az 5 különböző hőmérsékleten meghatározott K_b értékek alapján meghatároztuk a kioltási folyamat termodinamikai állandóit is a van't Hoff összefüggés integrált formájával (2.2.3. fejezet). Ezt a kifejezést használva a K_b kísérletileg meghatározott és becsült értékeit $1/T$ függvényében illesztettük, így a termodinamikai állapotfüggvények értékeit egy nemlineáris paraméterbecslési módszer paramétereiként kaptuk (**44.B. ábra**). A szórás kiszámításához a súlyozott „jackknife” eljárást alkalmaztuk. Az entalpia, entrópia és hőkapacitás-változás értékeit és adatait szintén (**4. táblázat**) tartalmazza. A ΔH^0 és ΔS^0 előjele szerint a kölcsönható specieszek között háromféle kölcsönhatás lehetséges: $\Delta H^0 > 0$ és $\Delta S^0 > 0$ hidrofób erők, $\Delta H^0 < 0$ és $\Delta S^0 < 0$ van der Waals-erők és hidrogén kötések, $\Delta H^0 < 0$ és $\Delta S^0 > 0$ elektrosztatikus kölcsönhatás [124]. A negatív ΔH^0 és ΔS^0 értékek van der Waals-erők és hidrogénkötések dominanciáját jelzik. DLS vizsgálatok megerősítik a NCs enyhe aggregációját a Cu^{2+} folyamatos adagolásával, ami szintén a kombinált kioltási mechanizmusra utal (**44.C. ábra**). A TrpHA Cu^{2+} -ionokkal való komplexképző tulajdonsága jól ismert az irodalomban [91]. Savas pH-tartományon ($\text{pH} = 3\text{--}5$) a $[\text{CuL}_2]$ és $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_{-1}]^+$ képződése dominál míg $\text{pH} > 4$ esetén $[\text{CuL}_2]$ is kezd megjelenni. Az utóbbi két esetben egy fémion a hidroxamát $[\text{O},\text{O}]$ és $[\text{NH}_2, \text{hidroxamát-}N]$ vagy két $[\text{NH}_2, \text{hidroxamát-}N]$ donorokon keresztül két ligandummal is kapcsolódhat, ami tovább erősíti a NCs réz(II)ionokon keresztüli lehetséges kapcsolódását, így lehetővé téve nagyobb

aggregátumok kialakulását. A fentebb említett van der Waals erők a klasztermagok összekapcsolódásából is adódhatnak.

5.10.2 A TrpHA-Au NCs és a Fe^{3+} -ionok PL kioltási folyamatának javasolt mechanizmusa

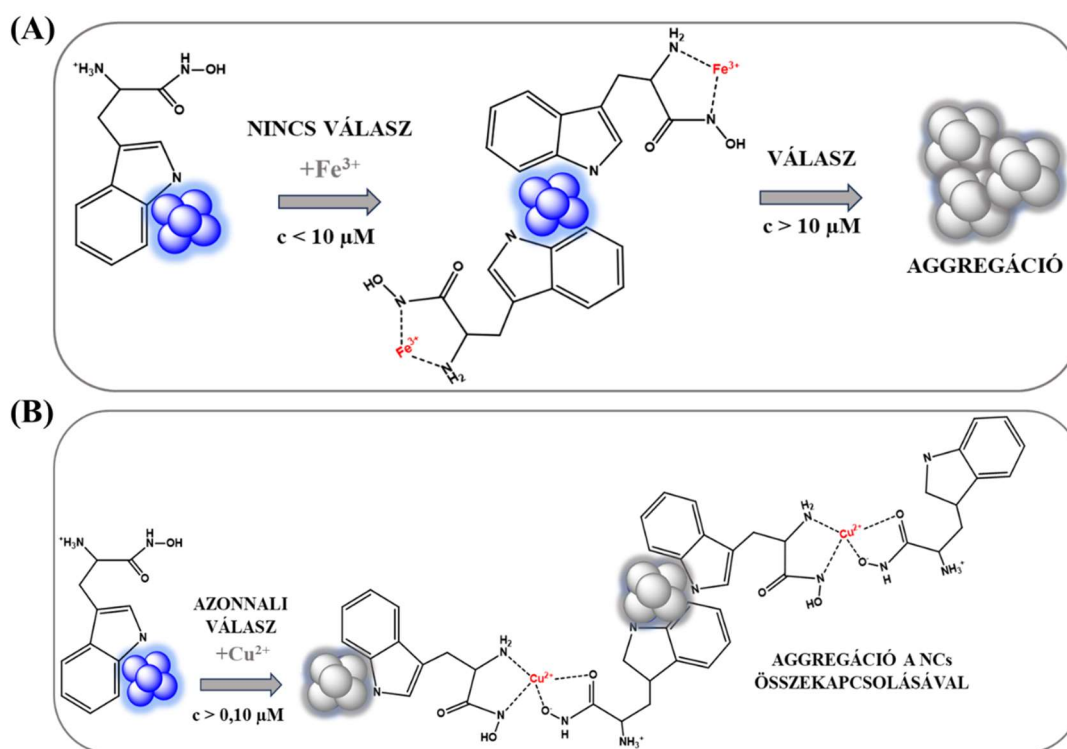
A szenzorikai mérések kiértékelése alapján a Fe^{3+} -ionok esetében lépcsőzetes fluoreszcencia kioltás figyelhető meg (**45.A. ábra**), amely erősen függ a Fe^{3+} -ionok koncentrációjától. Ebből adódóan a Fe^{3+} -ionok esetében a LOD érték és így a lineáris tartomány nem határozható meg, csak a legkisebb kimutatható mennyiség adható meg spektrofluorimetriás mérések alapján, ami $\sim 11,0 \mu\text{M}$. Ebben az esetben a TrpHA-Au NCs ζ -potenciáljának értéke nem változik számottevően, ami alátámasztja egyéb mechanizmusok dominanciáját a kioltási folyamat során, ellentétben a Cu^{2+} -ionoknál kapott eredményekkel. A klaszterdiszperzió pH-ja sem mutatott jelentős változást, csak a két vizes oldat (NCs diszperzió és Fe^{3+} oldat) keveredése okozott enyhe mértékű pH csökkenést ($\text{pH} = 3,2$). Ezen a pH-n már a Fe^{3+} esetén a fémion hidrolízisével kell számolni ($\text{pH} \sim 3$, domináns forma $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$).



45. ábra: (A) TrpHA-Au NCs korrigált fluoreszcencia intenzitása növekvő koncentrációjú Cu^{2+} -ionok (●, sárga pontok) és Fe^{3+} -ionok (▲, szürke háromszögek) jelenlétében ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$). (B) Kísérleti (○, fekete körök) és szimulált (folytonos szürke görbe) ITC-entalpogramok 1,0 mM Au-tartalmú TrpHA-Au NCs 2,0 mM Fe^{3+} -ionokkal történő titrálásáról, összehasonlítva az analóg minták korrigált fluoreszcencia intenzitásával (Δ) a fémion/arany moláris arány függvényében.

A **45.A. ábrán** jól látható, hogy alacsony Fe^{3+} -koncentráció mellett a fluoreszcencia intenzitása majdnem állandó. Jelentős kioltás következik be $10 \mu\text{M}$ feletti fémkoncentrációnál, amely felett a fluoreszcencia intenzitása meredeken csökken, majd ismét közel állandó értéket vesz fel, ahogy a Fe^{3+} koncentrációja eléri az $50 \mu\text{M}$ -t.

Megállapítható tehát, hogy eltérő folyamatok okozzák a PL kioltását. A 0,50 mM és 1,0 mM fémion koncentráció esetén ugyanez a PL aggregáció által kiváltott kioltó hatás érhető el, amit a PL élettartam értékek hasonló változása is megerősít (TrpHA-Au NCs: $1,47 \pm 0,2$ ns, TrpHA-Au NCs + 1,0 mM Fe^{3+} : $0,8 \pm 0,3$ ns; TrpHA-Au NCs + 1,0 mM Cu^{2+} : $0,79 \pm 0,3$ ns). Mivel a spektrális adatok alapján nem volt lehetőség termodinamikai elemzésre, a Fe^{3+} -ionok esetében a fluoreszcencia intenzitás csökkenéséért felelős kötés kialakulását kísérő termodinamikai mennyiségek mértékét ITC módszerrel becsültük meg. A **45.B. ábra** a Fe^{3+} -ionok TrpHA-Au NCs-hez való kötődésének ITC mérések révén rögzített eredményeit mutatja az egy kötőhely-modell által generált elméleti entalpogrammal együtt. Az ITC adatokon kívül a **45.B. ábra** szemlélteti az azonos összetételű minták PL intenzitásának változását is a Fe^{3+}/Au molarány függvényében (a molarány az arányosan a Fe^{3+} -ionok és a NCs-ben lévő Au(0) atomok számának is megfeleltethető). A **45.B. ábrán** összefoglalt eredmények szerint az ITC és PL adatokban változást mutató függvények a moláris arány függvényében analóg módon változnak. A moláris arányokat koncentráció értékekre konvertálva az ITC adatok megerősítik, hogy a TrpHA-Au NCs fluoreszcencia tulajdonsága nem változik jelentősen 10 μM Fe^{3+} -koncentráció alatt. Ha azonban ezt a határértéket túllépjük, a Fe^{3+} és a TrpHA-Au NCs stabil adduktumot (jól definiált kisebb aggregátumokat) képeznek, csökkent fluoreszcenciával. Ha a klasztermag körülbelül öt aranyatomot tartalmaz, akkor a görbék inflexiós pontjában körülbelül egy Fe^{3+} -ion jut két klasztermagra. Ez a közelítő és feltételes számítás arra utalhat, hogy egy fémmag egy vagy két felülethez kötött ligandumot tartalmazhat. Az ITC eredmények alapján a következő paraméterek számíthatók ki az egyszeri kötési modell segítségével: $K_a = 4,67 \times 10^4 \pm 3,60 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; $\Delta G^0 = -26,64 \pm 0,19 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^0 = -114,14 \pm 3,66 \text{ kJ mol}^{-1}$; és $\Delta S^0 = 0,29 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. A termodinamikai adatokat összevetve megállapítható, hogy a Fe^{3+} -ionok nagyobb kötési affinitással rendelkeznek (**4. táblázat**), mint a Cu^{2+} -ionok, de a Cu^{2+} -ionok Fe^{3+} -ionok jelenlétében is kimutathatók, ha a Fe^{3+} -ionok koncentrációja nem haladja meg a 10 μM -os értéket. A hőmérsékletfüggő fluoreszcencia kioltás és kvantitatív kalorimetriás vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy ezek a fémionok különböző módokon léphetnek kölcsönhatásba az NCs-ekel, amit a **46. ábra** foglal össze. A **46. ábra** egyrészt a TrpHA-stabilizált kéken emittáló NCs javasolt szerkezetét is bemutatja, ahol a ligandum lehetséges kötődése az NCs felületéhez az indol-*N*-en keresztül feltételezhető, de minden valószínűség szerint az amino-*N* kötődése is előfordul, annak ellenére, hogy az FT-IR mérések csak az indolgyűrű szerepére utalnak.



46. ábra: (A) TrpHA-Au NCs Fe³⁺-ionokkal (B) Cu²⁺-ionokkal való kölcsönhatásainak javasolt mechanizmusainak vázlatos ábrázolása a fémionok koncentrációjától függően savas körülmények között (pH = 3–4).

Szenzor rendszerünk Fe³⁺-ionok iránti érzékenységének csökkentésével (LOD ~11 μM) kimutattuk, hogy a Cu²⁺-ionok iránti szelektivitás jelentősen növelhető (LOD = 3,16 μM). Réz(II)ionok esetében azt az eredményt kaptuk, hogy a TrpHA felületstabilizáló TrpHA molekulák képesek koordinálni a Cu²⁺-ionokat, amit a fő termodinamikai paraméterek is megerősítettek, és savas közegben erősen generálják az NCs összekapcsolódását. A dimer- és bisz-komplexek kialakulása erősen preferálja az NCs Cu²⁺-ionokon keresztüli összekapcsolódását/felfűződését (46. A. ábra). Fe(III)ionok esetében a kioltás mértéke erősen függ a fémion koncentrációjától, és csak akkor következik be, ha az NCs nem képesek több Fe³⁺-iont kötni a felületen, ami az NCs aggregációját okozza (46. B. ábra). Valószínűleg a Fe³⁺-kötésen keresztül savas pH-n (pH ~3,1) csak monokomplex(ek) képződnek, de a Fe³⁺-TrpHA-ra vonatkozó részletes oldategyensúlyi vizsgálatok nem állnak rendelkezésre az irodalomban. Ez az eltérő komplexképződési viselkedés nagymértékben hozzájárul az érzékelési folyamathoz.

6. Összefoglalás

A nanoszerkezetű anyagok tanulmányozása a modern kolloidkémia egyik legintenzívebben fejlődő területe. A fémtartalmú nanoszerkezetű anyagokon belül a nemesfémek, különösen az Au, egyedülálló optikai és szerkezeti tulajdonságaiknak köszönhetően, ezért számos alkalmazásterületen, pl. az elektronika, szenzorika, orvosbiológia és diagnosztika egyre növekvő érdeklődés tapasztalható az alkalmazásuk iránt. Az orvosbiológia területén szintén egyre bővül az igény a korszerű, szabályozható mérettel, összetétellel és funkcióval rendelkező nemesfém NCs „zöldkémiai” úton történő újszerű szintézis protokolljainak fejlesztésére, ami motivációt adott kutatómunkámhoz. A kutatócsoportunkban néhány éve kitüntetett szereppel bírnak a fluoreszcens sajátsággal rendelkező Au NCs szintézise, szerkezeti- és funkcionális jellemzésük, mely klasztereket eredményesen használtak fel döntően szenzorikai célokra. A kutatás folytatásába 2020 őszén csatlakoztam, ahol kiemelt feladatomból volt főként egy lépéses „zöldkémiai” szintézisutak kidolgozása, melyek biokompatibilis egyfémű fluoreszcens nemesfém nanostruktúrák előállítására irányultak. Célunk volt, hogy átfogó képet adjunk arról, hogyan befolyásolja a nanoszerkezetek optikai és szerkezeti tulajdonságait a kulcsfontosságú kísérleti körülmények változtatása, ill. emellett felhasználási lehetőségeiket (bio)szenzorikai, fehérje kölcsönhatás és antioxidáns kapacitás vizsgálatokban tanulmányoztuk.

Doktori munkám első lépésében egyszerű és reprodukálható szintézis protokollt dolgoztunk ki a B₃-vitamin amid származékával, a nikotinamiddal stabilizált Au NCs lúgos közegben (pH = 8) történő előállítására NAM:[AuCl₄]⁻/10:1 moláris arány kialakítása mellett. Igazoltuk, hogy az előállított klaszterek intenzív kék emisszióval ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$) és nanoszekundumos átlagos élettartammal ($\tau_1 = 4,7 \text{ ns}$ (32 %), $\tau_2 = 4,7 \text{ ns}$ (68 %)) rendelkeznek, kb. 3–4 db. Au atomot tartalmaznak, és az [AuCl₄]⁻-ionok teljes redukcióját és a fluoreszcens termék hozamát a nikotinamid mellett a Na-citrát jelentősen elősegíti.

ORAC mérésekkel erősítettük meg, hogy a szintetizált és tisztított NAM-Au NCs (TE = $0,48 \pm 0,03$) hasonló antioxidáns kapacitással rendelkeznek, mint a tiszta NAM (TE = $0,568 \pm 0,02$), viszont emellett a NCs domináns fluoreszcens tulajdonsággal is rendelkeznek, ezért ez a kettős funkció kiemelt szerepet játszhat biokatalikus reakciókban. A NCs és a fehérje (BSA) közötti kölcsönhatást egyedi mérés technikákkal vizsgáltuk (SPR, ITC). Az SPR mérések révén igazoltuk, hogy a NAM-Au NCs sokkal gyengébb kölcsönhatást alakítanak ki a marha szérumban albuminnal, ellentétben más kékén emittáló

szintén kismolekulákkal (pl.: tiamin, AMP). Ezt azt eredményt erősíti meg a valós sebességi állandók (k_a , k_d) hányadosából számított kötési állandók értéke is ($K_A = 143 \pm 30 \text{ M}^{-1}$).

Elsőként bizonyítottuk, hogy a B₁-vitamin redukáló- és stabilizálószerként való alkalmazásával lehetőség van az Au NCs előállítására vizes közegben szobahőmérsékleten. Kimutattuk, hogy az így előállított Au NCs intenzív kék emissziót mutatnak ($\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) és kb. 5–6 Au atomot tartalmaznak. Átlagos élettartamuk néhány nanoszekundum ($\tau_1 = 1,26 \pm 0,38 \text{ ns}$ (31 %), $\tau_2 = 2,46 \pm 0,13 \text{ ns}$ (49 %), $\tau_3 = 0,24 \pm 0,01 \text{ ns}$ (20 %)) és közel 3 %-os QY%-vel rendelkeznek. Az XPS és FT-IR mérések azt mutatják, hogy a kialakult klaszterekben az arany atomok nulla oxidációs állapotban vannak jelen, míg a B₁-vitamin a pirimidin-*N* koordináción keresztül stabilizálja a fémmagot, emellett a ligandum oxidált tiokróom formája is szerepet játszhat a klasztermag stabilizálásában.

A B₁-Au NCs ($\text{TE} = 0,53 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{M}$) potenciális antioxidáns aktivitásának ellenőrzéséhez ORAC méréseket végeztünk. Az antioxidáns aktivitás másfélszeresére nő a tiszta B₁-vitaminhoz képest ($\text{TE} = 0,36 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}$), melynek oka a néhány atomot tartalmazó fémmagok jelenléte és az elektronban gazdag felület. Ezt az eredményt erősítették meg az ABTS vizsgálat során meghatározott IC₅₀ értékek is (B₁-vitamin: $\text{IC}_{50} = 76,4 \pm 3,7 \text{ }\mu\text{M}$, B₁-Au NCs: $\text{IC}_{50} = 36,9 \pm 2,1 \text{ }\mu\text{M}$), ami hasonló tendenciát mutat, mint az ORAC vizsgálat eredményei. A klasztermag felületén lévő oxidált tiokróom jelenléte okozhatja a megnövekedett antioxidáns hatást. A SPR mérések kimutatták, hogy a B₁-Au NCs sokkal erősebb kölcsönhatásra képes a marha szérum albuminnal, mint a NAM-Au NCs. Ezt a kötési állandó értéke is megerősíti ($K_A = 5468 \pm 73 \text{ M}^{-1}$).

Hisztidinhidroxámsav felhasználásával (HisHA) olyan protokollt dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi néhány atomos Au NCs előállítását. Ezek az Au NCs-ek 4%-os QY%-vel és átlagosan 4,2 ns-es fluoreszcencia élettartammal rendelkeznek. Megállapítottuk, hogy pH = 7,0 beállítása mellett a HisHA:[AuCl₄]⁻/5:1 arány alkalmazásával preferált a kék emisszióval ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) rendelkező NCs képződése. Megfigyeltük, hogy a fluoreszcens termékek hozama csaknem megduplázható a HisHA:Na-citrát:[AuCl₄]⁻/5:10:1 moláris arányának beállításával. Strukturális vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a HisHA imidazol-*N* és amino-*N* donoratomjai stabilizálják a kialakult fémmagot, és a NCs nem aggregálódnak jelentősen még a magas inert só koncentráció ($c_{\text{NaCl}} = 1 \text{ M}$) mellett sem.

Az újonnan szintetizált nanoszerkezeteket részletesen vizsgáltuk (szerkezetüket és optikai tulajdonságaikat illetően) és főként szenzorikai alkalmazásokban próbáltuk felhasználni. A HisHA-Au NCs paramágneses fémionokkal való kölcsönhatásának

vizsgálata azt mutatta, hogy több fémion is okoz PL kioltást (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+}). A legnagyobb PL kioltás Cu^{2+} -ionok esetén detektálható ($I_0/I \sim 24$), ami majdnem megduplázható a rendszerben lévő Na-citrát mennyiségének eliminálásával ($I_0/I \sim 44$). A $\text{LOD} = 2,49 \mu\text{M}$ meghatározása mellett a kioltási mechanizmus azonosítása azt jelzi, hogy a Cu^{2+} -ionok klaszter diszperzióhoz való hozzáadását követően a klaszter felületéről származó „soft” HisHA molekulák jelentős részével komplexet alkotnak, ami lehetővé teszi a vizes diszperzióban való jelenlétük spektrális azonosítását. Így a diszperzióban jelenlévő Na-citrát molekulák biztosítják a fémmag stabilizálását, melyet az élettartam mérések is alátámasztanak. Na-citrát hiányában szinte abszolút kioltás következik be, mivel a klasztermagok stabilizálása nem biztosított. A klaszterek diamágnese fémionokkal (pl. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) való kölcsönhatásának vizsgálatával kimutattuk, hogy csak a Zn^{2+} -ionok okoznak domináns PL erősítést ($\text{LOD} = 7,5 \mu\text{M}$). A vizsgálataink során sikerült bizonyítani, hogy a Zn^{2+} -ionok klaszter felületén történő kötődés jelentősen befolyásolja a klaszterek QY%-jét. Ezt a tényezőt sikerült növelni a kezdeti 4 %-ról 12 %-ra. A kötődés valószínűleg a szabadon hozzáférhető [O,O] donorcsoportokon keresztül megy végbe. Más fémionok esetén az alkalmazott kísérleti körülmények mellett ez a koordináció nem preferált.

A mérések alapján bebizonyosodott, hogy a $\text{TrpHA}:[\text{AuCl}_4]^{-}/2:1$ moláris arány optimális a kékeszöld emissziójú ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) TrpHA-Au NCs előállításához erősen savas közegben. A klaszterképződés hajtóereje feltehetően az indoltartalmú vegyületek autopolimerizációs reakciója erősen savas közegben. A hidroxamátcsoport jelenléte, amely a klaszterképződési folyamat során nem megy át konformációváltozáson, lehetővé teszi a TrpHA-Au NCs szelektivitásának és érzékenységének hangolását, ami lehetővé teszi a fémionok egyidejű azonosítását is. Hőmérsékletfüggő PL kioltási és kvantitatív kalorimetriás vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy a fémionok különböző módon léphetnek kölcsönhatásba a klaszterekkel. Egyrészt kimutattuk, hogy a klaszterfelületet stabilizáló TrpHA ligandumai képesek koordinálni a Cu^{2+} -ionokat, ezáltal savas közegben generálja a NCs összekapcsolódását, ami kombinált PL kioltást eredményez. A Fe^{3+} -ionok esetében azt figyeltük meg, hogy a PL kioltás mértéke erősen függ a fémion koncentrációjától és csak akkor következik be a NCs aggregációja miatt, ha a NCs nem képesek több Fe^{3+} -iont megkötni a felületen. Következésképpen a Cu^{2+} -ionok azonosítása vizes közegben $10 \mu\text{M}$ -nál megvalósítható Fe^{3+} -ionok jelenlétében.

7. Summary

The investigation of the nanostructured materials are one of the most intensively developing areas in modern colloid chemistry. Among metallic nanoscale materials, noble metals, especially Au, have unique optical and structural properties, which has led to increasing interest in their applications in various fields such as catalysis, sensing, medical biology, and diagnostics. In the field of medical biology, there is also a growing demand for the development of novel synthesis protocols for noble metal NCs with controllable size, composition, and function, using "green chemistry" methods, which was the main motivation of my research work. In our research group, the synthesis, structural and functional characterization of Au NCs with fluorescent properties have been playing a prominent role for several years, which clusters have been successfully used for sensor applications. I joined to the research group in the autumn of 2020, where my main task was to develop one-step "green chemistry" synthesis routes to produce biocompatible monometallic fluorescent noble metal nanostructures. Our goal was to provide a comprehensive understanding of how the optical and structural properties of nanomaterials are influenced by changes in key experimental conditions, and in addition, we studied their potential applications in (bio)sensor, protein interaction, and antioxidant capacity investigations.

In the first step of my doctoral work, we developed a simple and reproducible synthesis protocol for the production of Au NCs stabilized with NAM, a derivative of vitamin B₃, in an alkaline medium (pH = 8) with a NAM:[AuCl₄]⁻/10:1 molar ratio. We confirmed that the produced clusters exhibit intense blue emission ($\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm) and have an average lifetime in the nanosecond range ($\tau_1 = 4.7$ ns (32%), $\tau_2 = 4.7$ ns (68%)). They contain approximately 3–4 Au atoms and the total reduction of [AuCl₄]⁻-ions and the yield of the fluorescent product are significantly enhanced by Na-citrate in addition to nicotinamide.

ORAC measurements confirmed that the synthesized and purified NAM-Au NCs ($\text{TE} = 0.48 \pm 0.03$) have similar antioxidant capacity as the pure NAM ($\text{TE} = 0.568 \pm 0.02$), but in addition, the NCs also possess dominant fluorescent properties, therefore this dual function may play a prominent role in biocatalytic reactions. The interaction between NCs and the protein (BSA) was investigated using unique measurement techniques (SPR, ITC). Through SPR measurements, it was confirmed that NAM-Au NCs form much weaker interactions with bovine serum albumin compared to other blue-emitting small molecules

(e.g. thiamine, AMP), as evidenced by the binding constants calculated from the ratio of association and dissociation rate constants ($K_A = 143 \pm 30 \text{ M}^{-1}$).

We have demonstrated for the first time that the application of B₁ vitamin as a reducing and stabilizing agent enables the production of Au NCs in aqueous medium at room temperature. We have shown that the Au NCs produced in this way exhibit intense blue emission ($\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) and contain approximately 5–6 Au atoms. Their average lifetime is a few nanoseconds ($\tau_1 = 1.26 \pm 0.38 \text{ ns}$ (31%), $\tau_2 = 2.46 \pm 0.13 \text{ ns}$ (49%), $\tau_3 = 0.24 \pm 0.01 \text{ ns}$ (20%)) and they have an internal quantum efficiency of nearly 3%. XPS and FT-IR measurements indicate that the gold atoms in the formed clusters are in a zero oxidation state, while B₁ vitamin stabilizes the metal core through pyrimidine-*N* coordination, and the oxidized form of the ligand thiocrome may also play a role in cluster core stabilization.

To verify the potential antioxidant activity of B₁-Au NCs ($\text{TE} = 0.53 \pm 0.01 \text{ }\mu\text{M}$), ORAC measurements were performed, showing antioxidant activity one and a half times higher compared to pure B₁ vitamin ($\text{TE} = 0.36 \pm 0.02 \text{ }\mu\text{M}$), due to the presence of metal cores containing a few atoms and electron-rich surface. This result was further confirmed by IC₅₀ values determined via the ABTS assay (B₁ vitamin: $\text{IC}_{50} = 76.4 \pm 3.7 \text{ }\mu\text{M}$, B₁-Au NCs: $\text{IC}_{50} = 36.9 \pm 2.1 \text{ }\mu\text{M}$), which shows a similar trend as the results of the ORAC study. The presence of oxidized thiocrome on the surface of the cluster product may be responsible for the increased antioxidant activity. SPR measurements showed that B₁-Au NCs interact much more strongly with bovine serum albumin than NAM-Au NCs. This is confirmed by the binding constant value ($K_A = 5468 \pm 73 \text{ M}^{-1}$).

We have developed a protocol using HisHA that allows for the production of few atomic Au NCs. These Au NCs have a quantum yield of 4% and an average fluorescence lifetime of 4.2 ns. We found that at pH = 7.0, using a HisHA:[AuCl₄][−]/5:1 ratio, the preferred product is the formation of NCs with blue emission ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$). We observed that the yield of fluorescent products can be nearly doubled by adjusting the molar ratio of HisHA:citrate:[AuCl₄][−]/5:10:1. Structural studies confirmed that the imidazole-*N* and amino-*N* donor atoms of HisHA stabilize the formed metal core, and the NCs do not significantly aggregate even at high inert salt concentration ($c_{\text{NaCl}} = 1.0 \text{ M}$).

The newly synthesized nanostructures have been investigated in detail with respect to their structure and optical properties, and have been used mainly in sensing applications. Investigation of the interaction of HisHA-Au NCs with paramagnetic metal ions showed that several metal ions cause PL quenching (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+}), with the highest PL

quenching detected for Cu^{2+} -ions ($I_0/I \sim 24$), which can be nearly doubled by eliminating the amount of Na-citrate in the system ($I_0/I \sim 44$). This is not feasible for the other three metal ions. In addition to determining the lowest detectable quantity ($\text{LOD} = 2.49 \mu\text{M}$), identification of the quenching mechanism indicates that after adding Cu^{2+} -ions to the cluster dispersion, they form complexes with a significant portion of the "soft" HisHA molecules originating from the cluster surface, allowing for their spectral identification in aqueous dispersion. Thus, the presence of Na-citrate molecules in the dispersion ensures the stabilization of the metal core, which is supported by the lifetime measurements. In the absence of Na-citrate, almost complete quenching occurs, as the stabilization of the cluster cores is not guaranteed. By investigating the interaction of clusters with diamagnetic metal ions (e.g. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}), we have shown that only Zn^{2+} -ions cause dominant PL enhancement ($\text{LOD} = 7.5 \mu\text{M}$). During our studies, we were able to demonstrate that the binding of Zn^{2+} -ions on the cluster surface significantly affects the internal quantum yield factor of the clusters. We were able to increase this factor from the initial 4% to 12%. The binding likely occurs through the freely accessible [O,O] donor groups. In the case of other metal ions, under the applied experimental conditions, this coordination is not preferred.

Based on measurements, it has been proven that the $\text{TrpHA}:[\text{AuCl}_4]^-/2:1$ molar ratio is optimal for the production of blue-green emitting ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) TrpHA-Au NCs in strongly acidic conditions. Similar to the mechanism identified for tryptophan amino acid, the driving force for cluster formation is likely the auto-polymerization reaction of indole-containing compounds in strongly acidic conditions. The quantum yield of the produced Au NCs was 2.13% and the average lifetime was 1.47 nanoseconds. The presence of the hydroxamate group, which does not undergo conformational changes during cluster formation, allows for tuning the selectivity and sensitivity of TrpHA-Au NCs, enabling simultaneous identification of metal ions as well. Through temperature-dependent PL quenching and quantitative calorimetric studies, we have shown that metal ions can interact with the clusters in different ways. On one hand, we demonstrated that the TrpHA ligands stabilizing the cluster surface are capable of coordinating Cu^{2+} -ions, leading to cluster aggregation in acidic conditions, resulting in combined PL quenching. In the case of Fe^{3+} -ions, we observed that the extent of PL quenching strongly depends on the concentration of the metal ions and only occurs due to NCs aggregation when the NCs are unable to bind more Fe^{3+} -ions on the surface. Therefore, the identification of Cu^{2+} -ions in aqueous solution is achievable at $10 \mu\text{M}$ in the presence of Fe^{3+} -ions.

8. Irodalomjegyzék

1. Adabi M, Naghibzadeh M, Adabi M *et al.* Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* 2017; 45: 833–842.
2. Harish V, Ansari MM, Tewari D *et al.* Nanoparticle and Nanostructure Synthesis and Controlled Growth Methods. *Nanomaterials* 2022; 12: 1–30.
3. Saleh TA. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environ Technol Innov* 2020; 20: 101067.
4. Jin R. Quantum sized, thiolate-protected gold nanoclusters. *Nanoscale* 2010; 2: 343–362.
5. Zou L, Qi W, Huang R, Su R, Wang M, He Z. Green synthesis of a gold nanoparticle-nanocluster composite nanostructures using trypsin as linking and reducing agents. *ACS Sustain Chem Eng* 2013; 1: 1398–1404.
6. Rane AV, Kanny K, Abitha VK, Thomas S. *Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites*. Elsevier Ltd., 2018.
7. Fulmore JS, Geiger BF, Werner KA, Talbott LL, Jones DC. Feature Article. *Child Educ* 2009; 85: 293–299.
8. Csapó E, Oszkó A, Varga E *et al.* Synthesis and characterization of Ag/Au alloy and core(Ag)-shell(Au) nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2012; 415: 281–287.
9. Krajczewski J, Kołataj K, Kudelski A. Plasmonic nanoparticles in chemical analysis. *RSC Adv* 2017; 7: 17559–17576.
10. Khayati GR, Janghorban K. The nanostructure evolution of Ag powder synthesized by high energy ball milling. *Adv Powder Technol* 2012; 23: 393–397.
11. Grzelczak M, Pérez-Juste J, Mulvaney P, Liz-Marzán LM. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev* 2008; 37: 1783–1791.
12. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER J. *Turkevich1951.Pdf*. 1951;
13. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in. 2000; 801–802.
14. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* 2006; 110: 15700–15707.
15. Goulet PJG, Lennox RB. New insights into Brust-Schiffrin metal nanoparticle synthesis. *J Am Chem Soc* 2010; 132: 9582–9584.
16. Li J, Yang C, Wang WL, Yan XP. Functionalized gold and persistent luminescence nanoparticle-based ratiometric absorption and TR-FRET nanoplatform for high-throughput sequential detection of l-cysteine and insulin. *Nanoscale* 2018; 10: 14931–14937.
17. Xavier PL, Chaudhari K, Baksi A, Pradeep T. Protein-protected luminescent noble metal quantum clusters: an emerging trend in atomic cluster nanoscience. *Nano Rev* 2012; 3: 14767.

18. Tsunoyama H, Tsukuda T. Magic numbers of gold clusters stabilized by PVP. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 18216–18217.
19. Ungor D, Dékány I, Csapó E. Reduction of tetrachloroaurate(III) ions with bioligands: Role of the thiol and amine functional groups on the structure and optical features of gold nanohybrid systems. *Nanomaterials* 2019; 9.
20. Qian H, Zhu M, Wu Z, Jin R. Quantum sized gold nanoclusters with atomic precision. *Acc Chem Res* 2012; 45: 1470–1479.
21. Qian S, Wang Z, Zuo Z, Wang X, Wang Q, Yuan X. Engineering luminescent metal nanoclusters for sensing applications. *Coord Chem Rev* 2022; 451: 214268.
22. Yu Y, Chen X, Yao Q, Yu Y, Yan N, Xie J. Scalable and precise synthesis of thiolated Au₁₀₋₁₂, Au₁₅, Au₁₈, and Au₂₅ nanoclusters via pH controlled CO reduction. *Chem Mater* 2013; 25: 946–952.
23. Xu WW, Zhu B, Zeng XC, Gao Y. A grand unified model for liganded gold clusters. *Nat Commun* 2016; 7: 1–8.
24. Zheng J, Zhou C, Yu M, Liu J. Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale* 2012; 4: 4073–4083.
25. Liu LJ, Alkan F, Zhuang S *et al.* Atomically precise gold nanoclusters at the molecular-to-metallic transition with intrinsic chirality from surface layers. *Nat Commun* 2023; 14: 1–12.
26. Jin R, Zeng C, Zhou M, Chen Y. Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities. *Chem Rev* 2016; 116: 10346–10413.
27. Zhuang S, Liao L, Li MB *et al.* The fcc structure isomerization in gold nanoclusters. *Nanoscale* 2017; 9: 14809–14813.
28. Yang TQ, Peng B, Shan BQ *et al.* Origin of the photoluminescence of metal nanoclusters: From metal-centered emission to ligand-centered emission. *Nanomaterials* 2020; 10.
29. Wang S, Meng X, Das A *et al.* A 200-fold quantum yield boost in the photoluminescence of silver-doped Ag_xAu_{25-x} nanoclusters: The 13th silver atom matters. *Angew Chemie - Int Ed* 2014; 53: 2376–2380.
30. Ungor D, Turcsányi Á, Torma B, Csapó E. Gold/silver bimetallic nanoclusters stabilized by immunoprotein: Tuning the selectivity for identification of kynurenine pathway metabolites. *J Mol Liq* 2024; 402.
31. Zhu C, Xin J, Li J *et al.* Fluorescence or Phosphorescence? The Metallic Composition of the Nanocluster Kernel Does Matter. *Angew Chemie - Int Ed* 2022; 61: 1–6.
32. Wang D, Tang BZ. Aggregation-Induced Emission Luminogens for Activity-Based Sensing. *Acc Chem Res* 2019; 52: 2559–2570.
33. Mei J, Leung NLC, Kwok RTK, Lam JWY, Tang BZ. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem Rev* 2015; 115: 11718–11940.
34. Hong Y, Lam JWY, Tang BZ. Aggregation-induced emission. *Chem Soc Rev* 2011; 40: 5361–5388.

35. Li D, Chen Z, Mei X. Fluorescence enhancement for noble metal nanoclusters. *Adv Colloid Interface Sci* 2017; 250: 25–39.
36. Shang L, Dong S, Nienhaus GU. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today* 2011; 6: 401–418.
37. Deepa K, Sridhar A, Panda T. Biogenic Gold Nanoparticles: Current Applications and Future Prospects. *J Clust Sci* 2023; 34: 1163–1183.
38. Chevrier DM. Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review. *J Nanophotonics* 2012; 6: 064504.
39. Sharma RK, Gulati S, Mehta S. Preparation of gold nanoparticles using tea: A green chemistry experiment. *J Chem Educ* 2012; 89: 1316–1318.
40. Ungor D, Horváth K, Dékány I, Csapó E. Red-emitting gold nanoclusters for rapid fluorescence sensing of tryptophan metabolites. *Sensors Actuators, B Chem* 2019; 288: 728–733.
41. Ungor D, Csapó E, Kismárton B, Juhász A, Dékány I. Nucleotide-directed syntheses of gold nanohybrid systems with structure-dependent optical features: Selective fluorescence sensing of Fe³⁺ ions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2017; 155: 135–141.
42. Söptei B, Mihály J, Szigyártó IC *et al.* The supramolecular chemistry of gold and l-cysteine: Formation of photoluminescent, orange-emitting assemblies with multilayer structure. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2015; 470: 8–14.
43. Csapó E, Ungor D, Juhász Á, Tóth GK, Dékány I. Gold nanohybrid systems with tunable fluorescent feature: Interaction of cysteine and cysteine-containing peptides with gold in two- and three-dimensional systems. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2016; 511: 264–271.
44. Csapó E, Ungor D, Kele Z *et al.* Influence of pH and aurate/amino acid ratios on the tuneable optical features of gold nanoparticles and nanoclusters. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2017; 532: 601–608.
45. Deák A, Jobbágy C, Marsi G, Molnár M, Szakács Z, Baranyai P. Anion-, Solvent-, Temperature-, and Mechano-Responsive Photoluminescence in Gold(I) Diphosphine-Based Dimers. *Chem - A Eur J* 2015; 21: 11495–11508.
46. Jobbágy C, Baranyai P, Marsi G *et al.* Novel gold(i) diphosphine-based dimers with aurophilicity triggered multistimuli light-emitting properties. *J Mater Chem C* 2016; 4: 10253–10264.
47. Béltéki R, Kuklis L, Gombár G, Ungor D, Csapó E. The Role of the Amino Acid Molecular Characteristics on the Formation of Fluorescent Gold- and Silver-Based Nanoclusters. *Chem - A Eur J* 2023; 29.
48. Amiri-Sadeghan A, Dinari A, Mohammadi S *et al.* Phenylalanine gold nanoclusters as sensing platform for π - π interfering molecules: a case study of iodide. *Sci Rep* 2022; 12: 1–10.
49. Liu S, Lu F, Zhu JJ. Highly fluorescent Ag nanoclusters: Microwave-assisted green synthesis and Cr³⁺ sensing. *Chem Commun* 2011; 47: 2661–2663.
50. Habeeb Muhammed MA, Ramesh S, Sinha SS, Pal SK, Pradeep T. Two distinct

- fluorescent quantum clusters of gold starting from metallic nanoparticles by pH-dependent ligand etching. *Nano Res* 2008; 1: 333–340.
51. Zhang Y, Zhang C, Xu C *et al.* Ultrasmall Au nanoclusters for biomedical and biosensing applications: A mini-review. *Talanta* 2019; 200: 432–442.
 52. Keth J, Johann T, Frey H. Hydroxamic Acid: An Underrated Moiety? Marrying Bioinorganic Chemistry and Polymer Science. *Biomacromolecules* 2020; 21: 2546–2556.
 53. Zhao RX, Liu AY, Wen QL *et al.* Glutathione stabilized green-emission gold nanoclusters for selective detection of cobalt ion. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2021; 254: 119628.
 54. Qian S, Liu F, Zhu H *et al.* Metal ion-induced alloying and size transformation of water-soluble metal nanoclusters. *Polyoxometalates* 2023; 2: 9140049.
 55. Desai ML, Basu H, Saha S, Singhal RK, Kailasa SK. Fluorescence enhancement of bovine serum albumin gold nanoclusters from La³⁺ ion: Detection of four divalent metal ions (Hg²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺). *J Mol Liq* 2021; 336: 116239.
 56. Zhang H, Liu Q, Wang T *et al.* Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples. *Anal Chim Acta* 2013; 770: 140–146.
 57. Zhao Q, Chen S, Zhang L, Huang H, Zeng Y, Liu F. Multiplex sensor for detection of different metal ions based on on-off of fluorescent gold nanoclusters. *Anal Chim Acta* 2014; 852: 236–243.
 58. Cui M, Zhao Y, Song Q. Synthesis, optical properties and applications of ultra-small luminescent gold nanoclusters. *TrAC - Trends Anal Chem* 2014; 57: 73–82.
 59. Shang L, Stockmar F, Azadfar N, Nienhaus GU. Intracellular thermometry by using fluorescent gold nanoclusters. *Angew Chemie - Int Ed* 2013; 52: 11154–11157.
 60. Cui H, Shao ZS, Song Z, Wang YB, Wang HS. Development of gold nanoclusters: From preparation to applications in the field of biomedicine. *J Mater Chem C* 2020; 8: 14312–14333.
 61. Diaspro A, Robello M. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. *J Photochem Photobiol B Biol* 2000; 55: 1–8.
 62. Dunsby C, McGinty J, French P. Multidimensional fluorescence imaging of biological tissue. *Biomed Photonics Handbook, Second Ed Fundam Devices, Tech* 2014; 531–560.
 63. Cheng TM, Chu HL, Lee YC *et al.* Quantitative Analysis of Glucose Metabolic Cleavage in Glucose Transporters Overexpressed Cancer Cells by Target-Specific Fluorescent Gold Nanoclusters. *Anal Chem* 2018; 90: 3974–3980.
 64. Yahia-Ammar A, Sierra D, Mérola F, Hildebrandt N, Le Guével X. Self-Assembled Gold Nanoclusters for Bright Fluorescence Imaging and Enhanced Drug Delivery. *ACS Nano* 2016; 10: 2591–2599.
 65. Li Q, Pan Y, Chen T *et al.* Design and mechanistic study of a novel gold nanocluster-based drug delivery system. *Nanoscale* 2018; 10: 10166–10172.

66. van de Looij SM, Hebels ER, Viola M, Hembury M, Oliveira S, Vermonden T. Gold Nanoclusters: Imaging, Therapy, and Theranostic Roles in Biomedical Applications. *Bioconjug Chem* 2022; 33: 4–23.
67. Chang TK, Cheng TM, Chu HL *et al.* Metabolic Mechanism Investigation of Antibacterial Active Cysteine-Conjugated Gold Nanoclusters in *Escherichia coli*. *ACS Sustain Chem Eng* 2019; 7: 15479–15486.
68. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci* 2021; 22.
69. Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 503–515.
70. Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem* 2009; 114: 310–316.
71. Cornelli U. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* 2009; 27: 175–194.
72. Valgimigli L, Baschieri A, Amorati R. Antioxidant activity of nanomaterials. *J Mater Chem B* 2018; 6: 2036–2051.
73. Muráth S, Alsharif NB, Sáringer S, Katana B, Somosi Z, Szilagyi I. Antioxidant materials based on 2d nanostructures: A review on recent progresses. *Crystals* 2020; 10: 40–49.
74. Dokki C. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J Food Sci Technol* 2014; 11: 31–42.
75. Schaich KM, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J Funct Foods* 2015; 14: 111–125.
76. Katana B, Varga G, May N V., Szilagyi I. Superoxide dismutase mimicking nanocomposites based on immobilization of metal complexes on nanotubular carriers. *J Mol Struct* 2022; 1256.
77. Sáringer S, Valtner T, Varga Á, Maléth J, Szilágyi I. Development of polymer-based multifunctional composite particles of protease and peroxidase activities. *J Mater Chem B* 2021; 10: 2523–2533.
78. Lihi N, Balogh Z, Diószegi R *et al.* Functionalizing aerogels with tetraazamacrocyclic copper(II) complexes: Nanoenzymes with superoxide dismutase activity. *Appl Surf Sci* 2023; 611.
79. Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 2002; 36: 177–187.
80. Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* 2013; 5: 5990–5999.
81. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4290–4302.
82. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate

- multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1925–1941.
83. Fitzpatrick TB, Chapman LM. The importance of thiamine (vitamin B1) in plant health: From crop yield to biofortification. *J Biol Chem* 2020; 295: 12002–12013.
 84. Fricker RA, Green EL, Jenkins SI, Griffin SM. The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *Int J Tryptophan Res* 2018; 11.
 85. Yale HL. The hydroxamic acids. *Chem Rev* 1943; 33: 209–256.
 86. Raymond KN, Müller G, Matzanke BF. Complexation of Iron by Siderophores — A Review of Their Solution and Structural Chemistry and Biological Function. *Struct Chem* 2022; 49–102.
 87. Citarella A, Moi D, Pinzi L, Bonanni D, Rastelli G. Hydroxamic Acid Derivatives: From Synthetic Strategies to Medicinal Chemistry Applications. *ACS Omega* 2021; 6: 21843–21849.
 88. Farkas E, Enyedy ÉA, Zékány L, Deák G. Interaction between iron(II) and hydroxamic acids: Oxidation of iron(II) to iron(III) by desferrioxamine B under anaerobic conditions. *J Inorg Biochem* 2001; 83: 107–114.
 89. Farkas E, Enyedy ÉA, Micera G, Garribba E. Coordination modes of hydroxamic acids in copper(II), nickel(II) and zinc(II) mixed-ligand complexes in aqueous solution. *Polyhedron* 2000; 19: 1727–1736.
 90. Dallavalle F, Tegoni M. Speciation and structure of copper(II) complexes with (S)-phenylalanine- and (S)-tryptophanhydroxamic acids in methanol/water solution: A combined potentiometric, spectrophotometric, CD and ESI-MS study. *Polyhedron* 2001; 20: 2697–2704.
 91. Dallavalle F, Folesani G, Sabatini A, Tegoni M, Vacca A. Formation equilibria of ternary complexes of copper(II) with (S)-tryptophanhydroxamic acid and both D- and L-amino acids in aqueous solution. *Polyhedron* 2001; 20: 103–109.
 92. Ahlford K, Adolfsson H. Amino acid derived amides and hydroxamic acids as ligands for asymmetric transfer hydrogenation in aqueous media. *Catal Commun* 2011; 12: 1118–1121.
 93. Zur AA, Chien HC, Augustyn E *et al.* LAT1 activity of carboxylic acid bioisosteres: Evaluation of hydroxamic acids as substrates. *Bioorganic Med Chem Lett* 2016; 26: 5000–5006.
 94. Ungor D, Bélteki R, Horváth K, Dömötör O, Csapó E. Fluorescence Quenching of Tyrosine-Ag Nanoclusters by Metal Ions: Analytical and Physicochemical Assessment. *Int J Mol Sci* 2022; 23.
 95. Sepúlveda B, Angelomé PC, Lechuga LM, Liz-Marzán LM. LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* 2009; 4: 244–251.
 96. Xiao F, Xu T, Lu B, Liu R. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Front* 2020; 1: 60–69.
 97. Birdsall BB. 1973 2145. 1973;
 98. Jaworska A, Malek K, Marzec KM, Baranska M. Nicotinamide and trigonelline

- studied with surface-enhanced FT-Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2012; 63: 469–476.
99. Marinas M, Sa E, Rojas MM *et al.* A nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C) and isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$) study of Andalusian olive oils. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; 24: 1457–1466.
 100. Lovander MD, Lyon JD, Parr DL, Wang J, Parke B, Leddy J. Critical Review—Electrochemical Properties of 13 Vitamins: A Critical Review and Assessment. *J Electrochem Soc* 2018; 165: G18–G49.
 101. Edwards KA, Tu-Maung N, Cheng K, Wang B, Baeumner AJ, Kraft CE. Thiamine Assays—Advances, Challenges, and Caveats. *ChemistryOpen* 2017; 6: 178–191.
 102. Huang Y, Fuksman L, Zheng J. Luminescence mechanisms of ultrasmall gold nanoparticles. *Dalt Trans* 2018; 47: 6267–6273.
 103. Zheng J, Zhang C, Dickson RM. Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots. *Phys Rev Lett* 2004; 93: 5–8.
 104. Yamabe S, Tsuchida N, Yamazaki S. How is vitamin B1 oxidized to thiochrome? Elementary processes revealed by a DFT study. *Org Biomol Chem* 2021; 19: 4529–4536.
 105. Wakchaure PD, Ganguly B. Unraveling the Role of π -Stacking Interactions in Ligand Binding to the Thiamine Pyrophosphate Riboswitch with High-level Quantum Chemical Calculations and Docking Study. *J Phys Chem B* 2022; 126: 1076–1084.
 106. Assefa Z, Forward JM, Grant TA *et al.* Three-coordinate, luminescent, water-soluble gold(I) phosphine complexes: Structural characterization and photoluminescence properties in aqueous solution. *Inorganica Chim Acta* 2003; 352: 31–45.
 107. Latouche C, Lin YR, Tobon Y *et al.* Au-Au chemical bonding induced by UV irradiation of dinuclear gold(i) complexes: A computational study with experimental evidence. *Phys Chem Chem Phys* 2014; 16: 25840–25845.
 108. Wojnicki M, Michorczyk B, Wojtaszek K *et al.* Zero waste, single step methods of fabrication of reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. *Sustain Mater Technol* 2022; 31.
 109. Peters S, Peredkov S, Neeb M, Eberhardt W, Al-Hada M. Size-dependent XPS spectra of small supported Au-clusters. *Surf Sci* 2013; 608: 129–134.
 110. Jansen RJJ, van Bekkum H. XPS of nitrogen-containing functional groups on activated carbon. *Carbon N Y* 1995; 33: 1021–1027.
 111. Ramalingam S, Periandy S, Govindarajan M, Mohan S. FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation of nicotinamide: A combined experimental and theoretical study. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2010; 75: 1552–1558.
 112. Hu NH, Aoki K, Adeyemo a. O, Williams GN. Metal ion and anion coordination in the thiamine-[Pt II (NO₂)₄]²⁻ system. Structures of a metal complex, Pt (thiamine)(NO₂)₃, and two salts, (H-thiamine)[Pt (NO₂)₄]²⁻· 2H₂O and (thiamine monophosphate)₂ [Pt (NO₂)₄]²⁻· 2H₂O. *Inorganica Chim Acta* 2001; 325: 9–19.
 113. Lin L, Wang J, Liu W, Luo Y, Xiao Y, Wang Y. Rapid and visual readout of vitamin

- B1 based on the electrostatic interaction induced aggregation of gold nanoparticles. RSC Adv 2018; 8: 35850–35854.
114. Galli M, Sáringer S, Szilágyi I, Trefalt G. A simple method to determine critical coagulation concentration from electrophoretic mobility. Colloids and Interfaces 2020; 4.
 115. Bera N, Kiran Nandi P, Hazra R, Sarkar N. Aggregation induced emission of surface ligand controlled gold nanoclusters employing imidazolium surface active ionic liquid and pH sensitivity. J Photochem Photobiol A Chem 2023; 437: 114471.
 116. Lappas M, Permezel M. The anti-inflammatory and antioxidative effects of nicotinamide, a vitamin B 3 derivative, are elicited by FoxO3 in human gestational tissues: Implications for preterm birth. J Nutr Biochem 2011; 22: 1195–1201.
 117. Nguyen B, Tanious FA, Wilson WD. Biosensor-surface plasmon resonance: Quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions. Methods 2007; 42: 150–161.
 118. Myszkowski DG. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. Curr Opin Biotechnol 1997; 8: 50–57.
 119. Juhász Á, Luty-Błocho M, Wojnicki M, Tóth GK, Csapó E. General method for kinetic and thermodynamic evaluation of a receptor model peptide-drug molecule interaction studied by surface plasmon resonance. Microchem J 2019; 147: 311–318.
 120. Coelho YL, das Dores Aguiar C, Campos de Paula HM *et al.* Exploring the interaction between lactoferrin and CdTe quantum dots: Energetic and molecular dynamic study. J Mol Liq 2022; 356: 119005.
 121. Jugl A, Pekař M. Hyaluronan-arginine interactions-an ultrasound and ITC study. Polymers (Basel) 2020; 12.
 122. Debolinamitra. Use of isothermal titration calorimetry to study various systems. Mater Today Proc 2020; 23: 284–300.
 123. Herrera I, Winnik MA. Differential binding models for isothermal titration calorimetry: Moving beyond the Wiseman isotherm. J Phys Chem B 2013; 117: 8659–8672.
 124. Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. Biochemistry 1981; 20: 3096–3102.
 125. Tian ZY, Song LN, Zhao Y *et al.* Spectroscopic study on the interaction between naphthalimide-polyamine conjugates and bovine serum albumin (BSA). 2015.
 126. Kurzak B, Kozłowski H, Farkas E. Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions. Coord Chem Rev 1992; 114: 169–200.
 127. Mironov I V., Makotchenko E V. The hydrolysis of AuCl₄⁻ And the stability of aquachlorohydroxocomplexes of gold(III) in aqueous solution. J Solution Chem 2009; 38: 725–737.
 128. Vos R, Engelborghs Y. a Fluorescence Study of Tryptophan-Histidine Interactions in the Peptide Anantin and in Solution. Photochem Photobiol 1994; 60: 24–32.
 129. Roy S, Lopez AA, Yarnell JE, Castellano FN. Metal-Metal-to-Ligand Charge

- Transfer in Pt(II) Dimers Bridged by Pyridyl and Quinoline Thiols. *Inorg Chem* 2022; 61: 121–130.
130. Sinha N, Wenger OS. Photoactive Metal-to-Ligand Charge Transfer Excited States in 3d6 Complexes with Cr0, MnI, FeII, and CoIII. *J Am Chem Soc* 2023; 145: 4903–4920.
 131. Loock HP, Wentzell PD. Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications. *Sensors Actuators, B Chem* 2012; 173: 157–163.
 132. Peng B, Zhou JF, Ding M, Shan BQ, Chen T, Zhang K. Structural water molecules dominated p band intermediate states as a unified model for the origin on the photoluminescence emission of noble metal nanoclusters: from monolayer protected clusters to cage confined nanoclusters. *Sci Technol Adv Mater* 2023; 24.
 133. Mastropaolo D, Powers DA, Potenza JA, Schugar HJ. Crystal Structure and Magnetic Properties of Copper Citrate Dihydrate, Cu₂C₆H₄O₇·2H₂O. *Inorg Chem* 1976; 15: 1444–1449.
 134. Akyüz E, Şen FB, Bener M, Başkan KS, Tütem E, Apak R. Protein-Protected Gold Nanocluster-Based Biosensor for Determining the Prooxidant Activity of Natural Antioxidant Compounds. *ACS Omega* 2019; 4: 2455–2462.
 135. Brown DA, Fitzpatrick NJ, Muller-Bunz H, Ryan ÁT. Di-, tri-, and tetranuclear zinc hydroxamate complexes as structural models for the inhibition of zinc hydrolases by hydroxamic acids. *Inorg Chem* 2006; 45: 4497–4507.
 136. Kübler JA, Pfund B, Wenger OS. Zinc(II) Complexes with Triplet Charge-Transfer Excited States Enabling Energy-Transfer Catalysis, Photoinduced Electron Transfer, and Upconversion. *JACS Au* 2022; 2: 2367–2380.
 137. Kardar ZS, Shemirani F, Zadmard R. Determination of iron(II) and iron(III) via static quenching of the fluorescence of tryptophan-protected copper nanoclusters. *Microchim Acta* 2020; 187.
 138. Zheng S, Yin H, Li Y, Bi F, Gan F. One-step synthesis of L-tryptophan-stabilized dual-emission fluorescent gold nanoclusters and its application for Fe³⁺ sensing. *Sensors Actuators, B Chem* 2017; 242: 469–475.
 139. Li X, Qiao J, Sun Y, Li Z, Qi L. Ligand-modulated synthesis of gold nanoclusters for sensitive and selective detection of folic acid. *J Anal Sci Technol* 2021; 12: 6–13.
 140. Selvakannan PR, Mandal S, Phadtare S *et al.* Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *J Colloid Interface Sci* 2004; 269: 97–102.
 141. Leporati E. 2-Amino-N-hydroxypropanamide in Aqueous Solution. 1989;
 142. Saleh SM, El-sayed WA, El-manawaty MA, Gassoumi M, Ali R. Microwave-Assisted Rapid Synthesis of Luminescent Tryptophan-Stabilized Silver Nanoclusters for Ultra-Sensitive Detection of Fe(III), and Their Application in a Test Strip. *Biosensors* 2022; 12.

Köszönetnyilvánítás

Ezen a módon szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Juhászné Dr. Csapó Editnek, aki végig támogatta doktori munkámat meglátásaival és szakmai útmutatásával, valamint lehetővé tette számomra, hogy a kutatási tevékenységemet az általa vezetett MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoportban végezhessem.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Tóth Ágotának, a SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének, aki lehetővé tette számomra, hogy a disszertációhoz kapcsolódó kutatómunkámat az általa irányított tanszéken készítsem.

Ezenkívül szeretném megköszönni Kutatócsoportunk összes korábbi és jelenlegi tagjának, különösen Janóné Dr. Ungor Ditta Anitának, Dr. Juhász Ádámnak, Dr. Varga Norbertnek, Kovács Nikolett Alexandrának, Seres Lászlónak, Turcsányi Árpádnak, Dr. Varga-Bélteki Ritának, Dr. Varga Viktóriának, hogy segítettek és baráti támogatást nyújtottak a kutatásom során, ami hozzájárult a disszertációm megszületéséhez.

Végül szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak, hogy kitartó támogatásukkal és biztató szavakkal mindvégig támogattak.

Publikációs lista

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: **10073950**

A doktori munkához közvetlenül kapcsolódó tudományos közlemények:

- [1] **G. Gombár**, D. Ungor, G. F. Samu, O. Dömötör, E. Csapó: *Synthesis and characterization of novel blue-emitting nicotinamide-gold nanoclusters with “chain-breaker” antioxidant property*, Journal of Molecular Liquids, 359 (2022) 119372.
doi: 10.1016/j.molliq.2022.119372 Q1, IF₂₀₂₂ = 6,0
- [2] D. Ungor, **G. Gombár**, Á. Juhász, G. F. Samu, E. Csapó: *Promising Bioactivity of Vitamin B1-Au Nanocluster: Structure, Enhanced Antioxidant Behavior, and Serum Protein Interaction*, Antioxidants, 12 (2023) 874.
doi: 10.3390/antiox12040874 D1, IF₂₀₂₂ = 7,0
- [3] **G. Gombár**, P. Simon, D. Ungor, I. Szatmári, E. Csapó: *Histidinehydroxamic acid as new biomolecule to produce molecular-like fluorescent gold nanoclusters: Possible mechanisms for metal ion sensing*, Journal of Molecular Liquids, 387 (2023) 122597.
doi: 10.1016/j.molliq.2023.122597 Q1, IF₂₀₂₂ = 6,0
- [4] **G. Gombár**, D. Ungor, I. Szatmári, Á. Juhász, E. Csapó: *Tryptophanhydroxamic Acid-Stabilized Ultrasmall Gold Nanoclusters: Tuning the Selectivity for Metal Ion Sensing*, Nanomaterials, 14(5) (2024) 434.
doi: 10.3390/nano14050434 Q1, IF₂₀₂₂ = 5,3
Σ IF = 24,3

Egyéb tudományos közlemények:

- [5] A. N. Kovács, N. Varga, **G. Gombár**, V. Hornok, E. Csapó: *Novel feasibilities for preparation of serum albumin-based core-shell nanoparticles in flow conditions*, Journal of Flow Chemistry, 10 (2020) 497-505.
doi: 10.1007/s41981-020-00088-4 Q1, IF₂₀₂₂ = 2,786
- [6] Á. Ágoston, L. Balassa, Á. Deák, G. F. Samu, P. Sz. Tallósy, **G. Gombár**, L. Janovák: *Photocatalytic and antimicrobial activity of sulfur functionalized TiO₂ containing composite films*, Chemical Engineering & Technology, 46 (2023) 927-933.
doi: 10.1002/ceat.202200489 Q2, IF₂₀₂₂ = 2,1
- [7] R. Béltéki, L. Kuklis, **G. Gombár**, D. Ungor, E. Csapó: *The Role of the Amino Acid Molecular Characteristics on the Formation of Fluorescent Gold- and Silver-Based Nanoclusters*, Chemistry-A European Journal, 29 (2023) e2023007.
doi: 10.1002/chem.202300720 D1, IF₂₀₂₂ = 4,3
- [8] Á. Juhász, **G. Gombár**, E. F. Várkonyi, M. Wojnicki, D. Ungor, E. Csapó: *Thermodynamic Characterization of the Interaction of Biofunctionalized Gold Nanoclusters with Serum Albumin Using Two-and Three-Dimensional Methods*, International Journal of Molecular Sciences, 24(23) (2023) 16760.
doi: 10.3390/ijms242316760 D1, IF₂₀₂₂ = 5,6
- Σ IF = 14,79**
Σ Σ IF = 39,10