

Doktori (*Ph.D.*) értekezés



Arany nanorészecskék és nanoklaszterek szintézise, szerkezetvizsgálata és szenzorikai alkalmazásai

Janóné Ungor Ditta Anita

okleveles vegyész

Témavezető:

Dr. Csapó Edit

egyetemi adjunktus

Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Általános Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézet

Szeged

2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Ábra- és táblázatjegyzék	4
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Az arany, mint kémiai elem	9
2.2. Plazmonikus sajátást mutató nanoszerkezetű nemesfémek	10
2.2.1. Nanoszerkezetű nemesfémek optikai tulajdonságai	10
2.2.2. Arany koloidok szintézise	11
2.3. Fluoreszcens arany-tartalmú rendszerek	13
2.3.1. Arany nanoklaszterek szintézise	13
2.3.2. Arany klaszterek szerkezeti és optikai sajátosságai	15
2.3.3. Fluoreszcens arany nanoklaszterek felhasználása	18
3. Célkitűzés	20
4. Felhasznált anyagok, szintézisek és vizsgálati módszerek	22
4.1. Felhasznált anyagok	22
4.1.1. A szintézisekhez használt anyagok	22
4.1.2. A szenzorikai vizsgálatokhoz felhasznált fémek és biológiai kismolekulák	22
4.2. Szintézismódszerek	24
4.2.1. A ciszteinil-triptofán előállítása és jellemzése	24
4.2.2. Fehérje-stabilizált rendszerek előállítása	25
4.2.3. Cisztein és cisztein-tartalmú kismolekulákkal redukált rendszerek előállítása	26
4.2.4. Oldalláncban nitrogén-donoratomot tartalmazó aminosavakkal redukált rendszerek előállítása	26
4.2.5. Adenozin-monofoszfáttal stabilizált arany nanorészecskék és klaszterek szintézise	27
4.3. Vizsgálati módszerek	28
4.3.1. Optikai sajátosságok jellemzésére szolgáló műszeres technikák	28
4.3.2. Szerkezetvizsgálatra irányuló molekulaspektroszkópiás módszerek	31
4.3.3. Nanorészecskék és nanoklaszterek méretének, méreteloszlásának meghatározására irányuló vizsgálati módszerek	32
4.3.4. Röntgen analitikai módszerek	32
4.3.5. Egyéb alkalmazott műszeres technikák	33

5.	<i>Eredmények és értékelésük</i>	34
5.1.	<i>Fehérje-stabilizált Au nanostruktúrák méretszabályozott szintézise, szerkezet- és stabilitásvizsgálata</i>	34
5.1.1.	<i>Lizozim-Au rendszerek</i>	34
5.1.2.	<i>γ-globulin-Au rendszerek</i>	39
5.1.3.	<i>γG-Au NCs, mint potenciális L-kinurenin bioszenzor</i>	43
5.2.	<i>Az AuCl₄⁻-ionok kölcsönhatása tioltartalmú kismolekulákkal vizes közegben</i>	50
5.2.1.	<i>Glutation-Au rendszerek</i>	50
5.2.2.	<i>Ciszteín-Au rendszer</i>	52
5.2.3.	<i>Ciszteinil-triptofán-Au rendszerek</i>	54
5.3.	<i>Az AuCl₄⁻-ionok kölcsönhatásának tanulmányozása N-tartalmú, aromás oldallánccal rendelkező aminosavakkal</i>	57
5.3.1.	<i>Triptofán-Au rendszerek</i>	57
5.3.2.	<i>Hisztidin-Au rendszerek</i>	61
5.3.3.	<i>Az [Au_xHis_{x+1}]⁺ fluoreszcens nanohibrid rendszer felhasználása gyógyszerhordozók jelölésére</i>	67
5.4.	<i>Az AuCl₄⁻-ionok kölcsönhatása adenzin-monofoszfáttal vizes közegben</i>	70
5.4.1.	<i>Adenzin-monofoszfát-Au rendszerek</i>	70
5.4.2.	<i>AMP-Au NCs felhasználása Fe³⁺-ionok szenzorikai mérésére</i>	74
6.	<i>Összefoglalás</i>	80
7.	<i>Summary</i>	85
8.	<i>Irodalomjegyzék</i>	89
9.	<i>Melléklet</i>	95
10.	<i>Köszönetnyilvánítás</i>	100
11.	<i>Publikációs lista</i>	101

Rövidítések jegyzéke

NPs (nanoparticles): nanorészecskék

SPR (surface plasmon resonance): felületi plazmon rezonancia

TOABr: tetraoktil-ammónium bromid

NCs (nanoclusters): nanoklaszterek

CP (coordination polymer): koordinációs polimer

BSA (bovine serum albumin): marha szérum albumin

LYZ (lysozyme): lizozim fehérje csirke tojásból

γG: γ-globulin

GSH: redukált *L*-glutation

Cys: *L*-cisztein

CW: ciszteinil-triptofán az aminosavak egybetűs jelölése alapján

His: *L*-hisztidin

Trp: *L*-triptofán

AMP: 5'-adenozin-monofoszfát

PBS: foszfát-puffer (pH = 7,4 és 0,15 M NaCl)

MQ-víz: ultratiszta Milli-Q víz

Boc: terc-butil-oxi-karbonil

***t*But**: tercier-butil

Trt: tritilcsoport

TFA: trifluorecetsav

DTT: ditiotreitol

UV-Vis: ultraibolya-látható (spektrofotometria)

PL: fotolumineszcencia/az értekezésben fluoreszcenciát jelölve/

FT-IR: Fourier- transzformációs infravörös spektroszkópia

CD: cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

ESI-MS: electrospray ionizációs tömegspektrometria

MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionization): atmoszférikus nyomáson működő, lézerdeszorpciós ionizációs tömegspektrometria

DLS: dinamikus fényszórás

HRTEM: nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópia

XPS: röntgen fotoelektron spektroszkópia

XRD: röntgendiffraktometria

SAXS: kisszögű röntgenszórás

ITC: izotermikus titrációs kalorimetria

Ábra- és táblázatjegyzék

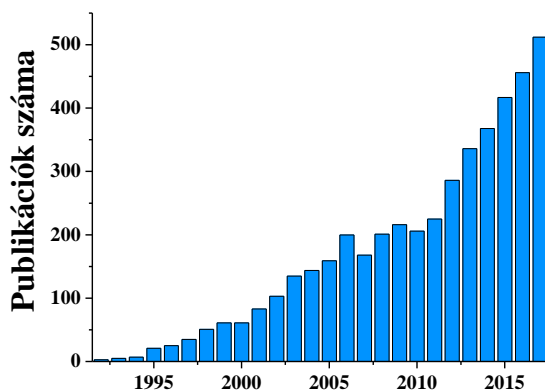
1. ábra: A nanoklaszterek témakörében megjelent publikációk számának változása 1992-2017 között 4566 db publikáció alapján.....	7
2. ábra: A tetrakloro-aurát ionok hidrolízise a pH függvényében ($c_{\text{AuCl}_4^-} = 1 \text{ mM}$)	10
3. ábra: (A) A lokalizált felületi plazmon rezonancia jelensége [16]. (B) Különböző morfológiával rendelkező Au nanorészecskék UV-Vis spektrumai és TEM felvételei.	11
4. ábra: (A) Michael Faraday portréja (1861.) és (B) az általa előállított Au szol 1857-ből.	12
5. ábra: Citráttal-stabilizált Au NPs reprezentatív TEM felvételei és az átlagos részecske átmérők citrát: Au/20:1, 10:1 és 5:1 molarányok alkalmazása esetén [26].	12
6. ábra: A fehérje-stabilizált Au NCs előállításának sematikus ábrája [51].	14
7. ábra: A lumineszcens sajátsgot mutató Au nanorészecskék és nanoklaszterek csoportosítása [65] (a kék, zöld, sárga és piros nyilak az egyes mérettartományokban képződő részecskék fluoreszcenciáját meghatározó tényezőket jelölik).	16
8. ábra: (A) Lumineszcens Au(I)-tiofenolát koordinációs polimer 2D helikális struktúrája [70], valamint (B) az $[\text{Au}_2(\text{nixantphos})_2]^{2+}$ kation szerkezeti képlete [71].	17
9. ábra: HeLa sejtek jelölése DPA-Au NCs-ekkel és a sejt 3D rekonstrukciójával [58].	18
10. ábra: Citidin-stabilizált Au NCs felhasználása Ag^+ - és Hg^{2+} -ionok detektálására [77].	19
11. ábra: A szintézishez használt kismolekulák szerkezeti képletei.	23
12. ábra: A CW pH-potenciometriás titrálási görbéje ($t = 25^\circ\text{C}$, $I = 0,2 \text{ M KNO}_3$)	25
13. ábra: (A) A LYZ-Au rendszerek Vis (A) és emissziós (B) spektrumai az alkalmazott LYZ: Au tömegaránytól függően ($m_{\text{Au}} = 2 \text{ mg}$, $t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$)	35
14. ábra: A LYZ: Au/5:1 (A) és a LYZ: Au/20:1 (B) tömegarány esetén előállított Au NPs és Au NCs reprezentatív HRTEM felvételei a vizes diszperziók UV-lámpa alatti (alsó) és nappali fényben (felső) készített fényképekkel. (C) A LYZ-stabilizált Au NPs és NCs diffraktogramja 36–45 2θ értékek között.	36
15. ábra: A (A) LYZ-Au NPs és (B) a LYZ-Au NCs XPS spektrumai.	37
16. ábra: Különböző LYZ: Au tömegarányok beállítása mellett készített rendszerek (A) SAXS méréseinek Kratky-reprezentációja és (B) FT-IR spektrumainak részlete 1700–1450 cm^{-1} tartományon.	38
17. ábra: A LYZ-Au NPs és LYZ-Au NCs frissen készített és rediszpergált szoljainak, valamint liofilizált pormintáinak fényképei nappali fényben és UV-lámpa alatt.	38
18. ábra: (A) A mért fluoreszcencia intenzitások a γG mennyiségének függvényében. (B) A $\gamma\text{G}/\text{Au}$ 15:1 tömegarány mellett készült klaszterek PL intenzitása a szintézis idejének függvényében a minta UV-lámpa alatt készült fényképével. ($m_{\text{Au}} = 1 \text{ mg}$, $t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$).	39
19. ábra: (A) A γG -Au NPs és (B) a γG -Au NCs reprezentatív HRTEM képei a felvételekből megállapított átlagos átmérő adatokkal.	40
20. ábra: A γG -Au NCs XPS spektruma dialízis (A) előtt és (B) után.	41
21. ábra: A γG -Au NCs hidrodinamikai átmérője (fekete) és ξ -potenciál (piros) értékei a pH függvényében.	42
22. ábra: A szenzorikai vizsgálatokhoz használt molekulák szerkezeti képletei.	43
23. ábra: A γG -Au NCs relatív fluoreszcenciája az 1,0 mM koncentrációjú analitik hozzáadása után a minták UV-lámpa alatt készített fényképeivel.	44
24. ábra: (A) A γG -Au NCs fluoreszcencia spektrumainak részlete 580–690 nm hullámhossz tartományban a növekvő Kyn koncentráció mellett ($t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$). (B) A $\lambda_{\text{em}} = 645 \text{ nm}$ -nél leolvasott emissziós csúcsok intenzitás értékei a Kyn koncentráció függvényében a dinamikus tartományon ($R^2 = 0,992$).	46

25. ábra: (A) A 298 K hőmérsékleten elvégzett szenzorikai mérés Stern-Volmer ábrázolása a $c_{\text{Kyn}} = 15\text{--}100\ \mu\text{M}$ dinamikus koncentrációtartományon ($R^2 = 0,992$). (B) A van't Hoff ábrázolás lineáris (szürke, $R^2 = 0,954$) és nemlineáris (piros, $R^2 = 0,991$) illesztéssel.	47
26. ábra: (A) Az 590 nm hullámhossznál detektált PL intenzitás maximumok a GSH koncentrációjának függvényében. (B) A mért fluoreszcencia spektrumok a kiindulási GSH-oldat pH-jának függvényében (GSH: Au/15:1, $c_{\text{Au}} = 1\ \text{mM}$, $t = 25\ ^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 375\ \text{nm}$).	50
27. ábra: (A) A GSH: Au/15:1 rendszer XPS spektruma pH = 3,0 és (B) pH = 12,0 kiindulási pH-t alkalmazva.	51
28. ábra: (A) A $\lambda_{\text{em}} = 620\ \text{nm}$ hullámhossznál detektált PL intenzitás maximumok a Cys koncentrációjának függvényében és (B) Cys: Au/10:1 arány mellett rögzített PL spektrumok a pH függvényében ($c_{\text{Au}} = 1\ \text{mM}$, $t = 25\ ^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 395\ \text{nm}$).	53
29. ábra: (A) A Cys-Au CP szerkezet XPS spektruma, valamint (B) a Cys és a Cys-Au CP FT-IR spektruma.	53
30. ábra: (A) A Cys és a Cys-Au CP szerkezet röntgendiffraktogramja (B) a feltételezhetően kialakuló lamellás szerkezet sematikus ábrájával.	54
31. ábra: (A) A CW-Au NPs Vis spektruma a minta fényképével, (B) a DLS mérésekből szerkesztett méreteloszlási diagram és a mintáról készített reprezentatív HRTEM felvétel ($c_{\text{Au}} = 1\ \text{mM}$).	55
32. ábra: (A) A mért fluoreszcencia intenzitás maximumok a CW koncentrációjának növelésével. (B) A fluoreszcens termék gerjesztési (fekete) és emissziós (kék) spektruma CW: Au/20:1 arány esetén ($c_{\text{Au}} = 0,1\ \text{mM}$, $t = 25\ ^\circ\text{C}$).	56
33. ábra: A fluoreszcens CW-Au rendszer ESI-MS spektruma $m/z = 300\text{--}850$ (balról) és $m/z = 1200\text{--}1500$ (jobbról) tartományokon különböző nagyítások mellett (CW: Au/20:1).	57
34. ábra: (A) Trp-Au NPs Vis spektruma a minta fényképével és (B) reprezentatív HRTEM felvételével az átlagos átmérő megadásával.	58
35. ábra: (A) A Trp-Au nanohibrid rendszerek emissziós spektrumai Trp: Au/1:1; 5:1 és 15:1 sorrendben (jobbról balra haladva) a minták fényképével ($c_{\text{Au}} = 1\ \text{mM}$, $t = 25\ ^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380\ \text{nm}$). (B) A Trp: Au/1:1 molarány mellett készített minta emissziós spektruma az alkalmazott kiindulási pH (1,0–12,0) függvényében.	59
36. ábra: A Trp-Au és a Trp FT-IR spektrumai $3500\text{--}1000\ \text{cm}^{-1}$ tartományban.	60
37. ábra: A fluoreszcens Trp-Au rendszer (Trp: Au/5:1) ESI- és MALDI-MS spektrumainak részletei különböző nagyítások mellett.	61
38. ábra: (A) A His: Au/30:1 molarányú minta 24 h óra alatt rögzített UV-Vis spektrumai. (B) A $\lambda_{\text{em}} = 475\ \text{nm}$ hullámhossznál detektált intenzitás-maximumok a His koncentrációjának függvényében ($c_{\text{Au}} = 1\ \text{mM}$, $t = 25\ ^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 375\ \text{nm}$).	62
39. ábra: (A) Az His-Au rendszer XPS spektruma. (B) A mért emissziós spektrumok a pH függvényében ($c_{\text{Au}} = 1\ \text{mM}$, $t = 25\ ^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 375\ \text{nm}$).	63
40. ábra: A His-Au rendszer FT-IR spektruma a közép IR tartományon.	64
41. ábra: A $[\text{Ag}(\text{HHis})]_n$ általános képlettel leírható koordinációs polimer fő tengelyi felülnézete (balról), amelyben a szerkezet megközelítőleg kétszeres spirális szimmetriáját mutatja és a balmenetes spirális polimer lánc oldalnézete a kristálytani a tengely mentén (jobbról). Egy menet magassága $5,739\ \text{\AA}$	65
42. ábra: A His-Au rendszer FT-IR spektruma a távoli IR tartományon.	65
43. ábra: A His-Au rendszer ESI- és MALDI-MS spektruma (His: Au/30:1).	66
44. ábra: (A) A BSA/IBU gyógyszerhordozó nanokompozit reprezentatív HRTEM felvétele. A BSA/IBU minta fluoreszcens mikroszkópos felvétele a (B) jelölés előtt és (C) után.	68
45. ábra: (A) A kitozán mikrogöngy reprezentatív SEM felvétele. A kitozán mikrogöngy fluoreszcens mikroszkópos felvétele (B) a jelölés előtt és (C) után.	69

46. ábra: A kitozáz mikrogyöngy felszínének és az $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ általános képlettel megadható polinukleáris komplex(ek) lehetséges elektrosztatikus kötésének sematikus ábrája.....	69
47. ábra: (A) AMP-Au NPs UV-Vis spektruma a minták fényképeivel 4 különböző Au koncentráció esetén és (B) egy reprezentatív HRTEM felvétel a $c_{\text{Au}} = 2,0$ mM alkalmazásával előállított rendszerről.....	70
48. ábra: (A) A 480 nm hullámhossznál detektált emissziós intenzitás az alkalmazott AMP koncentráció függvényében ($c_{\text{Au}} = 0,1$ mM, $t = 25$ °C, $\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm). (B) Az AMP: Au/20:1 arány mellett előállított minta UV-Vis spektruma (kék) a reaktánsok spektrumával.....	71
49. ábra: Az AMP-Au rendszerek XPS spektruma (A) citromsav/citrát puffer (pH = 6,0) alkalmazása nélkül és (B) citromsav/citrát pufferrel (pH = 6,0).....	72
50. ábra: (A) Az AMP (fekete) és az AMP-Au NCs (kék) FT-IR spektrumai.	73
51. ábra: (A) Az AMP-Au NCs hidrodinamikai átmérője (fekete) és ζ -potenciál értékei (kék) a pH függvényében. (B) Az AMP-Au NCs hidrodinamikai átmérőjének változása az idő függvényében pH = 1,0 közegben.....	73
52. ábra: Az AMP-Au NCs relatív fluoreszcenciája a kiválasztott (A) fémionok és (B) anionok hozzáadása után ($c_{\text{analit}} = 1$ mM), valamint a mintáról készített fénykép a kioltást okozó Fe^{3+} -ionok adagolása előtt és után.	75
53. ábra: (A) Az AMP-Au NCs fluoreszcencia spektrumai növekvő Fe^{3+} -ion koncentráció (10–100 μM) mellett ($t = 25$ °C, $\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm). (B) A klaszterek relatív fluoreszcenciája a Fe^{3+} -ionok koncentrációjának függvényében a dinamikus tartományon ($R^2 = 0,998$).	76
54. ábra: Az AMP-Au NCs mért ζ -potenciál értékei az egyes fémionok hozzáadása után.	77
55. ábra: (A) Az önabszorpciót befolyásolható komponensek vizes oldatainak UV-Vis spektruma az AMP-Au NCs emissziós spektrumával. (B) A van't Hoff grafikon lineáris (szürke, $R^2 = 0,902$) és nemlineáris (kék, $R^2 = 0,982$) illesztéssel.	78
56. ábra: (A) A γG és a γG -Au NCs FT-IR spektruma, valamint (B) a γG -Au NCs CD spektruma a pH-függvényében.	95
57. ábra: A Kyn szenzorikai mérésének Stern-Volmer kiértékelés (A) 303, (B) 308 és (C) 313 K hőmérsékleten.....	96
58. ábra: A His-Au rendszer ESI-MS spektruma a szintézis kezdeti szakaszán 0 és 20 perc 97	97
59. ábra: Az $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ tartalmú minta porformában rögzített röntgendiffraktogramja. 98	98
60. ábra: A Fe^{3+} -ionok szenzorikai mérésének Stern-Volmer kiértékelése (A) 303, (B) 310 és (C) 323 K hőmérsékleten..... 99	99
1. táblázat: A T mérési hőmérsékleten meghatározott K_{SV} értékek az illesztés jósági tényezőjével (R^2), a K_{SV} alapján meghatározott k_q , a kalkulált k_0 , a γG -Au NCs (D_{NCs}) és a Kyn (D_{Kyn}) diffúziós együtthatóinak értékei. 48	48
2. táblázat: A T mérési hőmérsékleten meghatározott K_{SV} értékek az illesztés jósági tényezőjével (R^2) és a számított termodinamikai paraméterek értékével a γG -Au NCs/Kyn rendszerre vonatkozóan..... 49	49
3. táblázat: A T mérési hőmérsékleten meghatározott K_{SV} értékek, a számított asszociációs állandók (K_a) a hibával (SD) és az illesztés jósági tényezőjével (R^2). Továbbá a számított termodinamikai paraméterek értéke (ΔG , ΔH° , ΔS°) az AMP-Au NCs/ Fe^{3+} rendszer esetén. 79	79

1. Bevezetés

Az elmúlt néhány évtizedben a nanoszerkezetű anyagok előállítása és szerkezetvizsgálata, számos tudományterületen való alkalmazhatóságuknak köszönhetően, az egyik legdinamikusabban fejlődő kutatási területté vált, melyet az új tudományos publikációk számának évről évre történő rohamos növekedése is igazol. A nanoszerkezetű anyagokon belül különösen a nemesfémek azok, amelyek egyedi elektromos, mágneses és optikai tulajdonságaiknak köszönhetően az elektronikától a katalízisen át a gyógyászatig számos tématerületen alkalmazhatóak. Az arany jól ismert kémiai inertsége a nanométeres mérettartományban is jelen van, emellett a tömbfázishoz képesti méretcsökkenés hatására megnövekedett reaktivitása és az újonnan megjelenő optikai sajátosságai következtében széleskörűen tanulmányozott nanoszerkezetű anyag. Az orvosbiológiai területen történő felhasználások során a szelektíven funkcionalizált arany nanorészecskék (Au NPs) mellett a fluoreszcens sajátossággal rendelkező szub-nanométeres mérettartományba sorolható arany nanoklaszterek (Au NCs) is egyre inkább a figyelem középpontjába kerülnek. Az **1. ábra** az elmúlt években a *nanoklaszterek* témakörében megjelent publikációk számát mutatja.



1. ábra: A nanoklaszterek témakörében megjelent publikációk számának változása 1992-2017 között 4566 db publikáció alapján.*

A biokompatibilis úton előállított nemesfém klaszterek nagy kinetikai stabilitást mutatnak fiziológias közegben. Szerkezetükkel hangolható fluoreszcenciával és nagy kvantumhasznosítási tényezővel rendelkeznek, ami lehetővé teszi fluoreszcens jelzőanyagként való alkalmazásukat, de fluoreszcens bioszenzorok alapjait is képezhetik. A doktori értekezés egyik fő motivációja volt, hogy bár nemzetközi viszonylatban

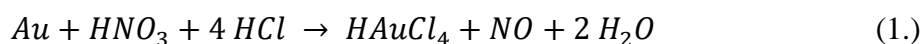
* A publikációk éves eloszlását a Clarivate Analytics Web of Science tudományometriai adatbázis segítségével határoztuk meg „nanocluster” kifejezésre keresve.

meglehetősen sok kutatócsoport foglalkozik nemesfém nanoklaszterek jellemzésével – ahogyan az az **1. ábrán** is látható, de Magyarországon, egyetemen folyó alap kutatás keretében mindösszesen 2–3 kutatócsoportban tanulmányozzák a nanoklaszterek szerkezetfüggő optikai tulajdonságait. Kutatómunkánk eredményeivel hozzájárulni kívántunk a tématerület sokrétűségének bemutatásához.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az arany, mint kémiai elem

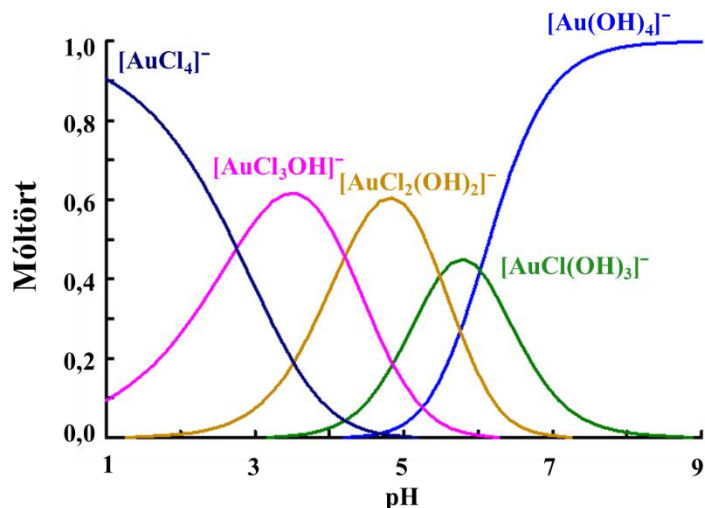
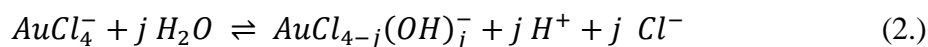
A nemesfémek egyik csoportját a réz csoport elemei, a réz (Cu), az ezüst (Ag) és az arany (Au) képviselik. Az arany jellegzetesen sárga színű nemesfém, amely a periódusos rendszer 79-ik eleme. Egy természetes izotópja van, hővezető és elektromos tulajdonságai kiemelkedően jók. Elemi állapotban, a földkéregben 0,004 ppm mennyiségben lelhető fel, de gyakorta telluridos ércekben kvarc- vagy pirit-közetekhez kapcsolódóan is megtalálható. Igen nagy sűrűségű fém ($\rho = 19,30 \text{ g cm}^{-3}$), melynek forráspontja (3129 K) mellett olvadáspontja (1337,33 K) is kiemelkedően magas. Standard potenciál értékei pozitív értékeket vesz fel, az Au^+/Au^0 : +1,691 V, $\text{Au}^{3+}/\text{Au}^0$: +1,498, míg az $\text{AuCl}_4^-/\text{Au}^0$: +1,002 V. A fémek közül a legnagyobb elektronvonzó képességgel, ezáltal legnagyobb elektronegativitással (EN = 2,4) az Au bír, melynek alapállapotú elektronkonfigurációja $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^1$. Szilárd halmazállapotban lapcentrált köbös rácsszerkezettel és nagyfokú inertséggel rendelkezik, hiszen még a tömény ásványi savakban sem oldódik. A tömény sósav és salétromsav 3:1 arányú elegyében keletkező nitrozil-klorid (NOCl) azonban feloldja, amely során tetrakloro-aurát képződik (**1. egyenlet**).



Az Au vegyületeiben leggyakrabban +3 és +1-es oxidációs állapotban fordul elő. A különféle Au(I)-tartalmú komplex vegyületek fémionjainak elektronkonfigurációja $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10}$, szerkezetüket tekintve általában lineáris bisz-ligandumúak vagy tetraéderes elrendezésűek négyes koordinációval [1–3]. Mivel az Au(I)-ionok diamágnesesek, ezért a legtöbb esetben a kialakuló komplexek színtelenek, azonban lumineszcens sajátságot mutathatnak az arany(I)ionok között fellépő 30–50 kJ mol⁻¹ energiájú ún. aurofil kölcsönhatás vagy a ligandum donorcsoportjai és a fémcentrumok között kialakuló hibrid pályákon történő elektronátmenetek miatt. Az aurofil kölcsönhatás átlagos távolsága ~ 3,0 Å [4,5], amely kisebb, mint az atomok van der Waals sugarainak összege. Az Ag(I)-komplexekhez képest azonban sokkal könnyebben diszproporcionálódnak Au(III)-ionokra és elemi aranyra, mivel a legtöbb esetben instabilak vizes közegben. A +3-as oxidációs állapotban $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^8$ elektronszerkezettel leggyakrabban síknégyzetes geometriájú komplexeket alkot [6,7]. Vizes közegben leginkább ezen +3-as oxidáció állapotban fordul elő.

Az Au(III)-komplexek vizes közegű reakciói közül talán a tetrakloro-aurát hidrolízise a legrészletesebben tanulmányozott folyamat. A **2. egyenlettel** leírható

ligandumcsere reakció alapján a tetrakloro-aurát spontán hidrolitikus folyamata során különféle összetételű, vegyes ligandumú kloro-hidroxo-komplexek képződhetnek az oldat pH-jától függően, ahogyan azt a **2. ábra** is mutatja. [8–10].

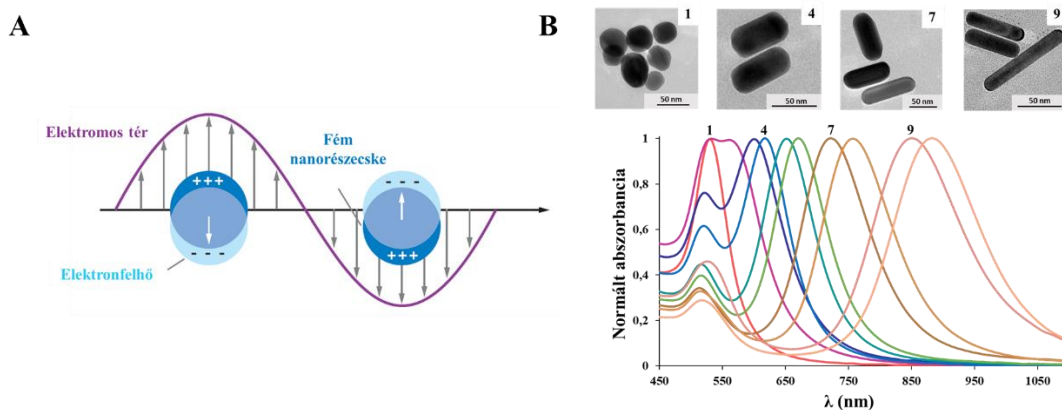


2. ábra: A tetrakloro-aurát ionok hidrolízise a pH függvényében ($c_{\text{AuCl}_4^-} = 1 \text{ mM}$)

2.2. Plazmonikus sajátyságot mutató nanoszerkezetű nemesfémek

2.2.1. Nanoszerkezetű nemesfémek optikai tulajdonságai

Az arany és ezüst nanorészecskék (Au és Ag NPs) egyedi optikai tulajdonságuk következtében, amely a lokalizált felületi plazmon rezonancia (*localized surface plasmon resonance*, LSPR), széles körben használt nanoszerkezetű anyagok. Ezen említett jelenség során az arany nanorészecskék a látható fény fotonjaival való intenzív kölcsönhatásának eredményeképpen a részecskét alkotó atomok vezetési elektronjainak kollektív oszcillációja következik be (**3.A ábra**), amely rezonánssá válik, ha az a besugárzó fény elektromágneses terének frekvenciájával megegyezik. Az így detektálható plazmon rezonancia spektrumok, amelyek egy abszorpciós és egy szórási tagra bonthatók, hasznos információt szolgáltatnak nemcsak a nemesfém nanorészecskék összetételéről, de méretéről és alakjáról is [11]. A gömb alakú arany nanorészecskék karakterisztikus plazmon módusa $\lambda_{\text{max}} = 500\text{--}550 \text{ nm}$ tartományban detektálható [12,13], míg arany/ezüst ötvözet nanorészecskék esetében a plazmon módus $\lambda_{\text{max}} = 390\text{--}550 \text{ nm}$ tartományon hangolható a mérettől, összetételtől és szerkezettől függően [14,15].



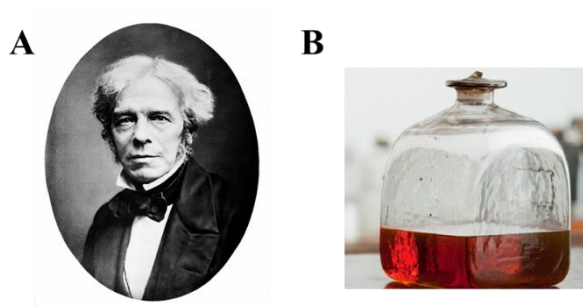
3. ábra: (A) A lokalizált felületi plazmon rezonancia jelensége [16]. (B) Különféle morfológiával rendelkező Au nanorészecskék UV-Vis spektrumai és TEM felvételei.

Anizometrikus részecskéknél, mint *pl.* Au nanorudak esetén, a szerkezetükből adódóan transzverzális és longitudinális oszcillációk is fellépnek, ami az abszorbanca spektrumon két csúcs megjelenését eredményezik (3.B ábra, 1, 4, 7 és 9 sorszámú minták). A megjelenő plazmon maximumok helye és sávszélessége a rudak hossz/szélesség arányával szisztematikusan hangolható a látható és a közeli infravörös tartományon [13,17,18]. A lokalizált felületi plazmon rezonancia a fent említett paraméterek mellett azonban a részecskék kémiai környezetétől (*pl.* oldószer, pH, stb.) is erősen függhet. Aggregációs folyamat vagy a diszperzitási fok változása révén a nanorészecskék közötti átlagos távolság akár olyan mértékben is lecsökkenhet, hogy a plazmonikus terek „átlapolása” is bekövetkezhet, amely a molekulapályák hibridizációjához hasonlítható, mivel a csatolás következtében kötő és nem-kötő elektron eloszlási állapotok jöhetnek létre [19,20].

2.2.2. Arany kolloidok szintézise

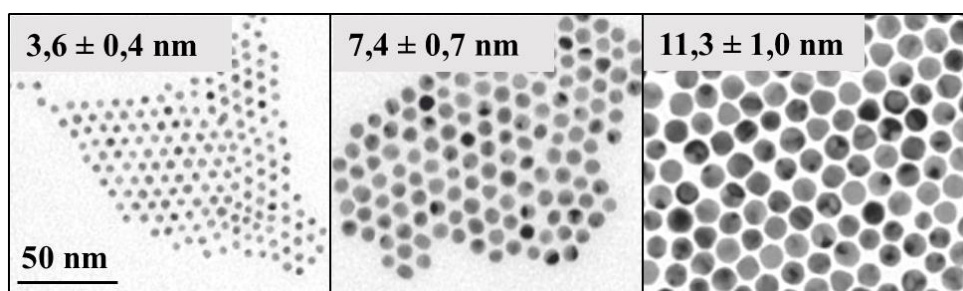
A nemesfém nanorészecskék előállítására vonatkozóan számos fizikai és kémiai eljárás ismeretes. A fizikai módszerek közé tartozik például a fizikai gőzfázisú leválasztás (*physical vapour deposition*, PVD), mely során a hevített bevonatoló anyag párologtatás után felületi réteggként csapódik le a bevonni kívánt szubsztráton [21]; vagy a nagyenergiájú őrlés, amely golyósmalom segítségével hoz létre nanorészecskéket [22].

Az arany és ezüst kolloidok előállítására az *ún.* nedves-kémiai (*wet chemistry*) eljárások a legelterjedtebbek. A legelső publikáció 1857-ből származik, melyben M. Faraday a fény és az arany kölcsönhatását taglalta foszforral redukált Au részecskék kapcsán [23]. A vizsgálatokhoz használt arany szolok a mai napig nagy stabilitást mutatnak és megtekinthetők a londoni British Museumban (4. ábra).



4. ábra: (A) Michael Faraday portréja (1861.) és (B) az általa előállított Au szol 1857-ből.

Gömbi arany nanorészecskék vizes és szerves közegben történő előállítására a legáltalánosabban alkalmazott eljárás az 1951-ben J. Turkevich által kidolgozott szintézis [24], illetve az 1994-ben Brust és *mtszai.* által publikált előállítási folyamat [25]. Mindkét módszer során kiindulási prekursor fémsóként hidrogén-tetrakloro-aurátot (HAuCl_4) alkalmaznak. A Turkevich-módszernél trinátrium-citrát molekulák töltik be a redukáló- *ill.* stabilizálószer szerepét és a vizes közegben létrehozott monodiszperz, gömbi arany kolloidok mérete az aranyionok és a citrát arányával szabályozható (**5. ábra**) [26].



5. ábra: Citráttal-stabilizált Au NPs reprezentatív TEM felvételei és az átlagos részecske átmérők citrát:Au/20:1, 10:1 és 5:1 molarányok alkalmazása esetén [26].

A Brust-szintézisnél a prekursor fémsót vízben oldják és egy felületaktív molekula toluolos oldatával intenzíven kevertetik 10–15 percet. A legtöbb esetben tetraoktil-ammónium-bromidot (TOABr) használnak, amely fázistranszferáló ágensként funkcionál, azaz feladata a fémion „átjuttatása” a vizes fázisból a szerves fázisba. A szerves fázisban feldúsuló arany(I)-TOABr komplexhez nátrium-borohidrid redukálószerrel adnak, majd a reakcióelegyet 3 órán keresztül intenzíven kevertetik szobahőmérsékleten. A szintézis eredményeképp a szerves fázisban lokalizálódó viszonylag kicsi, $\sim 2\text{--}5$ nm átmérőjű, a szintézishez használt megfelelő alkil- vagy aril-tiollal funkcionizált Au NPs jönnek létre [27], melyhez a funkcionizáló molekula toluolos oldatát a redukálószer hozzáadása előtt juttatják a reakcióelegybe. A különféle szintézisekkel előállított nanorészecskék alaki és méretbeli tulajdonságai azonban az alkalmazott redukáló- és stabilizálószer anyagi

minőségével és mennyiségével, illetve a szintézisek kísérleti körülményeivel (*pl.* hőmérséklet, oldószer, reakcióidő, *stb.*) szisztematikusan hangolhatók. A Na-citrát és a nátrium-borohidrid mellett előszeretettel használt redukálószeres még az aszkorbinsav, hidrazin vagy éppen a polielektrolitok (*pl.* polietilén-imin/PEI) [28–30]

A fent említett klasszikus szintézismódszerek esetén számos adalékanyag kerül a reakcióelegybe, mint *pl.* a prekursor fémsó, a redukálószer, valamint a különféle funkcionizáló és stabilizáló ágensek. Ezen adalékok eltávolítása a legtöbb esetben nem valósítható meg maradéktalanul, így a nemesfém kolloidok orvosi biológiában és gyógyászatban való felhasználása számos nehézségbe ütközhet. Az ún. „zöldkémiai” szintéziseknek köszönhetően a vizes közegű szintézisek egyszerűsíthetők; minimalizálják az anyagfelhasználást, ugyanis a redukáló-, stabilizáló- és funkcionizálószer szerepét ugyanazon molekula töltheti be [31–34]. Ezen szintézisekhez a legtöbb esetben növényi extraktumokat használnak, mint *pl.* a tealevél, különféle citrus gyümölcsök vagy az orvosi zsálya és a borsmenta [35–38]. Érdekes cikkeket olvashatunk akár baktériumok vagy mélytengeri organizmusok arany részecske termelő „nanogyáráként” történő hasznosíthatóságáról is [39–41], mivel ezen élőlények szervezetében a környezetben található Au(III)-ionok letális reaktív oxigén termelőként hatnak, melyet az aranyionok redukciója révén kerülnek el.

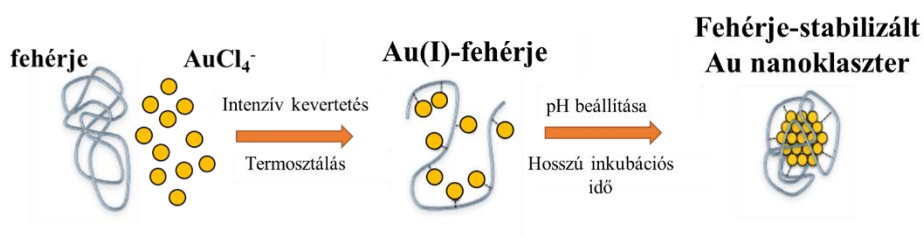
2.3. Fluoreszcens arany-tartalmú rendszerek

2.3.1. Arany nanoklaszterek szintézise

A biológiai rendszerekben megtalálható molekulák redukálószerként való alkalmazásával eleget tehetünk az *in vitro* felhasználásokhoz szükséges számos kritériumnak, mivel a képződő nanostruktúrák nemcsak nagymértékű kinetikai stabilitással rendelkeznek fiziológiás körülmények között, hanem a szintézis során közvetlenül funkcionizálhatók is.

Szakirodalmi előzmények igazolják, hogy a kolloid diszperziók szintézise esetén (*bottom-up* szintézis) a reakciókörülmények szisztematikus változtatásával és a redukálószerként alkalmazott biokompatibilis molekulák anyagi minőségével (*pl.* fehérjék, oligonukleotidok, *stb.*) célirányosan szabályozhatók az előállított arany nanostruktúrák optikai sajátságai [42,43]. Nevezetesen, ha a redukálószer ekvivalens mennyiségben vagy kis mólfeleslegben adagoljuk az AuCl₄⁻-ionok vizes oldatához, akkor a korábban bemutatott plazmonikus sajátsággal rendelkező „klasszikus” Au nanorészecskék állíthatók elő, ahol a

részecskék átlagos mérete $\sim 2,0$ nm-nél nagyobb. Ha a redukálószer szerepét betöltő molekula feleslegét számottevően (akár többszörösére) megnöveljük a prekursor fémsó koncentrációjához képest, akkor az előállított nano-objektumok esetén az arany kolloidokra jellemző karakterisztikus plazmon rezonancia sáv már nem detektálható az abszorbancia spektrumban. Ezzel szemben az említett arany-alapú rendszerek fluoreszcens sajátságot mutatnak, a keletkezett részecskék átlagos átmérője 2,0 nm-nél kisebb, gyakran a szub-nanométeres mérettartományba esik, mivel a nagy biomolekula felesleg feltehetőleg sztérikusan gátolja a kiredukálódott fémmagok növekedését. Ezen rendszerekre a szakirodalom a nanoklaszter (*nanocluster*, NCs) megnevezést alkalmazza. Az ilyen „templátokat” alkalmazó nedves kémiai szintézisek két fő csoportra oszthatók. Az első esetben a klaszterek előállításához templátként fehérjéket (*pl.* transferrin [44], lizozim [45], marha szérum albumin [46], inzulin [47] vagy tripszin [48]) vagy megfelelő szekvenciával rendelkező oligonukleotidokat [49,50] alkalmaznak. A szintézisek közös pontja, hogy a klaszterek képződése egy Au(I)-biomolekula intermedier komplex képződésén keresztül történik (6. ábra).



6. ábra: A fehérje-stabilizált Au NCs előállításának sematikus ábrája [51].

A templátok felhasználásával történő előállítások másik csoportjába azon szintézisek sorolhatók, amelyek esetén a klaszternövekedést dendrimerek alkalmazásával kontrollálják. A leggyakrabban poli(amido-amin) molekulák második és negyedik generációs dendrimereit használják ezen célra, ahol az Au NCs vizes vagy metanolos közegben történő szintézis során a dendrimer G2-OH vagy G4-OH üregeibe ágyazódnak be [52,53].

A klaszterek előállítására azonban számos más technika is alkalmas lehet. Külső besugárzás (mikrohullám, ultrahang, UV-fény) segítségével további lehetőségek nyílnak a klaszterek költséghatékony és környezetbarát előállítására. Mikrohullámot alkalmazva a kémiai reakció hajtóereje a polarizált molekulák közötti oszcilláló sűrűlódás, amely homogénen melegíti fel az egész reakcióelegyet, így a reakcióidő gyakran lerövidíthető [54]. A szonokémiai szintézisek során a nagyfrekvenciás ultrahanggal történő besugárzás következtében a kémiai hatás az akusztikus kavitációból származik, amelynek hatására

magas hőmérséklet, nyomás és rendkívül gyors hűtési sebesség érhető el. Az Au NCs mérete az ultrahangos besugárzás idejével, frekvenciájával és besugárzási ciklusok számával szabályozható, azonban a melléktermékek képződése sok esetben elkerülhetetlen [55]. Mind a mikrohullámú, mind pedig a szonokémiai technikák rövid reakcióidőt igényelnek, a keletkezett klaszterek mérete viszonylag monodiszperz eloszlást mutat az egyenletes hő- és energiaellátás következtében.

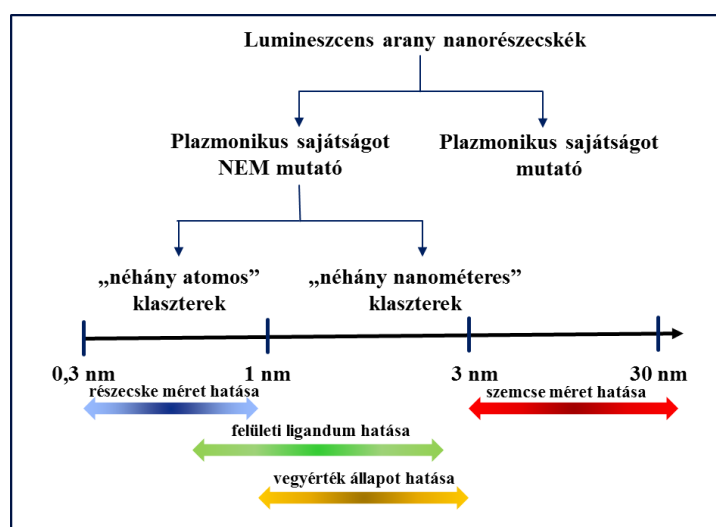
Az ún. fotoreduktív szintézisek alkalmával a prekursor fémionsó vizes oldatában általában TiO_2 fotokatalizátort diszpergálnak, majd a reakcióelegyet UV-fénnyel világítják be. Az előállítási folyamat két részlépésre bontható. Elsőként az Au(III)-ionok katalizátorfelületre történő kemisorpciója következik be egy ligandumcsere reakción keresztül, amit a besugárzás hatására bekövetkező felületen történő redukció követ. Zhang és *mtsai*. vízdoldható Au klasztereket állítottak elő tioétercsoporttal kapcsolt poli(metil-metakrilát) ligandum jelenlétében [56]. A szintézishez 8W teljesítményű, $\lambda_{\text{max}} = 365$ nm hullámhosszúságú UV-fényt alkalmaztak. A 4 órás besugárzást követően $0,6 \pm 0,4$ nm átmérőjű klaszterek képződtek termékként, melyek oldatfázisban rögzített fluoreszcenciájának maximuma $\lambda_{\text{em}} = 610$ nm volt, míg a porformában rögzített emissziós maximum $\lambda_{\text{em}} = 597$ nm-nél jelentkezett. Az oldott és szilárd állapot közötti fotolumineszcencia-különbséget a solvatációs hatásnak tulajdonították.

A *top-down* módszerek esetén, mint *pl.* a maratás (*etching*) alapú szintézisek, a néhány 10, esetleg 100 nm-es mérettel rendelkező kolloid részecskéket tartalmazó stabil diszperzióhoz általában tioltartalmú ligandumot (leggyakrabban *L*-glutationt) adagolva szonikálás vagy mikrohullámú besugárzás által állíthatók elő klaszterek. A tiolcsoportot tartalmazó molekula a nanorészecske felületéről arany atomokat távolít el, melyek a reakció előrehaladtával kisebb klaszterekké szerveződnek [57,58].

2.3.2. Arany klaszterek szerkezeti és optikai sajátosságai

Klasztervegyületeiben az Au oxidációs száma < 1 és ezen vegyületek Au–Au kötések tartalmazznak. A legtöbb esetben tiolcsoportot tartalmazó ligandumokkal állíthatók elő és a fématomok elhelyezkedését tekintve igen változatos geometriát vehetnek fel [59–63]. A szakirodalomból jól ismert, hogy az Au NCs fluoreszcens sajátossága, azaz a detektálható emissziós maximum hullámhossza erősen korrelál a klasztert alkotó atomok számával (7. ábra). A néhány atomot tartalmazó (Au_3 – Au_8) klaszterek esetén intenzív kék emisszió ($\lambda_{\text{em}} = 450$ – 480 nm) detektálható, de a már 10–13 atomból felépülő klasztereknél az emisszió a zöld hullámhossz-tartományon ($\lambda_{\text{em}} = 490$ – 510) jelentkezik. Ebben az esetben

a részecske mérete összemérhetővé válik az arany atom elektronjainak Fermi-energiaszintjéből számolható hullámhosszal ($\sim 0,5$ nm), így a folytonos vezetési sáv diszkrét energiaszintekre hasad fel és a nanoklaszter molekulaként „viselkedik”. Ebben az esetben a fluoreszcencia jól leírható a szabad elektron (*Jellium*-) modell segítségével, amely alapján az emisszió alapvetően az *sp-sp* átmenetkből eredeztethető, szemben a sávok közötti *sp-d* átmenetekkel. A klasztert alkotó atomok számától tehát az emissziós maximum hullámhossza függ, míg a kvantumhasznosítást (QY%) a felületen kötött molekulák befolyásolhatják [64,65].



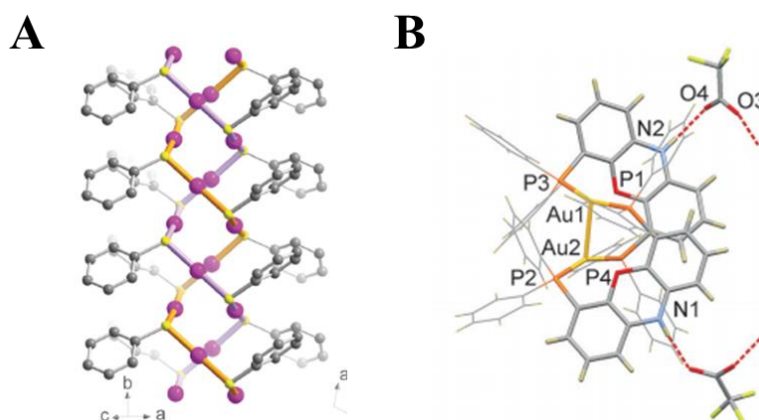
7. ábra: A lumineszcens sajátást mutató Au nanorészecskék és nanoklaszterek csoportosítása [65] (a kék, zöld, sárga és piros nyilak az egyes mérettartományokban képződő részecskék fluoreszcenciáját meghatározó tényezőket jelölik).

Tovább növelve a klasztert alkotó atomok számát a „néhány nanométeres” klaszterek mérettartományáig, a teljes látható fényt és a közeli infravörös-tartományt is lefedő emisszióval rendelkező Au NCs is előállíthatók [66]. Ezen klaszterek belső felépítésüket tekintve két részre különíthetők el: egy 13 Au⁰ atomot tartalmazó ikozaéderes elrendezésű magra, valamint egy külső, -S-Au-S- periodikus kötésekkel felépülő héjra. A stabilizálásban résztvevő ligandum jellemzően kén atomjai hibridpályákat alkot a klaszter felületén elhelyezkedő arany atomokkal, *ill.* ionokkal. A gerjesztő elektromágneses sugárzás hatására bekövetkező elektronátmenetek ezeken a hibrid pályákon történnek [67]. A kialakuló Au NCs fotolumineszcenciáját ebben az esetben elsősorban már nem csak a klasztereket alkotó atomszám határozza meg, hanem néhány olyan tényező is, mint *pl.* a külső felszint képező arany atomok vegyértékállapota vagy a stabilizálásában résztvevő, felületen kötött molekulák kémiai szerkezete is. Amikor az atomok száma eléri azt a kritikus mennyiséget,

ahol az elektron sávok közötti távolság lecsökken (folytonos sáv alakul ki), akkor eltűnik a fluoreszcencia, mert gerjesztés esetén az elektronok kollektív oszcillációja következik be (SPR). Ennek ellenére vannak olyan nagyméretű, polikristályos plazmonikus tulajdonságot mutató részecskék, amelyekben lokálisan megvalósulhat az egyes kristályfázisokban az egyelektron gerjesztés, melyet a részecske egészében létrejövő plazmon rezonancia felerősíthet (*plasmon-enhanced fluorescence*, PEF) [68].

H. Kawasaki és *mtsai.* munkájukban sikeresen bizonyították a klaszterek által emittált fény hullámhossza és az őket alkotó atomok száma között fennálló korrelációt. Pepszin fehérje felhasználásával állítottak elő eltérő emissziós sajátsággal rendelkező Au klasztereket. A megfelelő Au/pepszin arány beállítása után a pH-t széles tartományban változtatva kimutatták, hogy pH = 1 esetén Au₅–Au₈ atomból álló kéken emittáló ($\lambda_{em} = 408$ nm), pH = 9 értéknél ~ 13 arany atomos zöld emisszióval rendelkező ($\lambda_{em} = 510$ nm), míg pH = 12 értéknél pedig ~ 25 arany atomból álló és $\lambda_{em} = 670$ nm hullámhosszúságú vörös emisszióval rendelkező klaszterek jönnek létre [69].

Amint azt a 2.1 fejezetben ismertettük, bizonyos szerkezetű, Au(I)-ionokat tartalmazó komplexek is mutathatnak fotolumineszcens sajátságot a központi fémionok között fellépő aurofil kölcsönhatás miatt. Hazai viszonylatban Dr. Deák Andrea (MTA TTK) „Lendület” Szupramolekuláris Kémiai Kutatócsoportja foglalkozik fluoreszcens Au(I)-komplexek előállításával és szerkezetvizsgálatával. Ezen rendszereket a szerkezetüktől függően koordinációs polimereknek vagy szupramolekuláris komplexeknek nevezik leggyakrabban. A kialakuló struktúrát nagyban befolyásolja a szintézishez/stabilizáláshoz alkalmazott ligandum szerkezete, melyre jó példaként szolgál a **8. ábrán** látható kétféle eltérő szerkezettel rendelkező Au(I)-komplex.

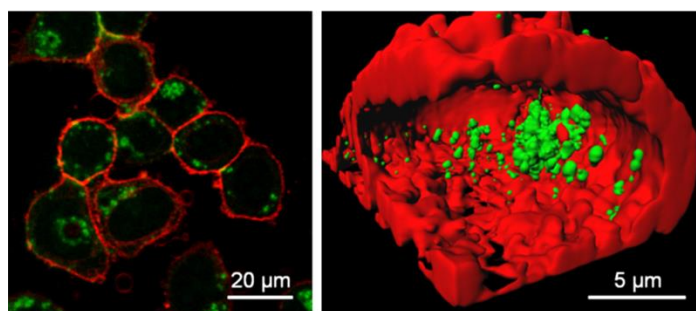


8. ábra: (A) Lumineszcens Au(I)-tiofenolát koordinációs polimer 2D helikális struktúrája [70], valamint (B) az $[Au_2(nixantphos)_2]^{2+}$ kation szerkezeti képlete [71].

A különféle, ismétlődő egységekből felépülő koordinációs polimereket általában tiol- vagy cianidtartalmú molekulák segítségével, enyhe redukációs körülmények között állítják elő [72,73]. Az Au(I) szupramolekuláris szerkezetek szintéziséhez különféle fenil-foszfin származékokat alkalmaznak leggyakrabban [74].

2.3.3. Fluoreszcens arany nanoklaszterek felhasználása

Előnyös optikai tulajdonságaiknak köszönhetően a NCs rendkívül széles körben hasznosíthatók. Amíg a hagyományos fluoreszcens festékek (akridin narancs, fluoreszcein) emissziós intenzitása nagymértékben függ a kémiai környezet pH-jától és ionerősségétől, a nanoklaszterek nagymértékű kinetikai stabilitást mutatnak a fiziológiás sókoncentráció többszöröse mellett is. Tumoros sejtek potenciális jelzőanyagaként való alkalmazásuk egyre inkább a figyelem előterébe kerül [43], mivel a nanorészecskékhez képest a klaszterek sokkal kisebb méretüknél fogva nagyobb sejtmembrán permeabilitással rendelkeznek, illetve a részecskékhez köthető fluoreszcens szerves festékanyagoknál sokkal nagyobb fotostabilitást mutatnak.



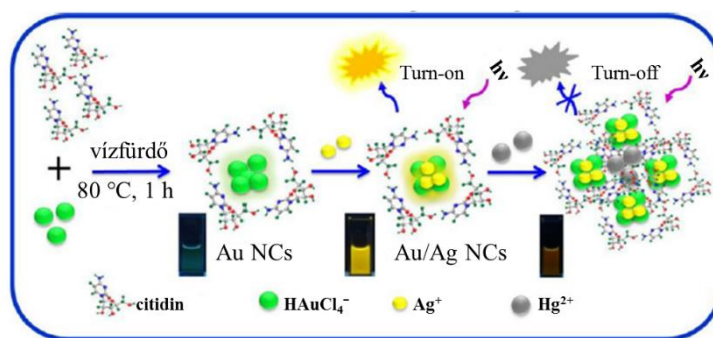
9. ábra: HeLa sejtek jelölése DPA-Au NCs-vel és a sejt 3D rekonstrukciójával [58].

A tumoros sejtekben való lokalizálódásuk a tumorokra jellemző fokozott permeabilitás és visszatartás (*enhanced permeability and retention*, EPR) effektusnak köszönhető (**9. ábra**), mivel ezen elváltozások környezetében a vérerek átteresztőképessége, illetve a nyirokrendszer sejtjeinek működése eltér az egészséges szövetekre jellemzőtől [75].

A nagy sejtmembrán permeabilitást kiaknázva potenciális jelöltek lehetnek gyógyszerhordozó rendszerek tervezéséhez is. Kis méretüknél fogva képesek áthaladni az agyi vér-agy gáton, így megvalósulhat olyan gyógyszermolekulák adagolása is, amely a hagyományos terápiás útvonalon keresztül igen rossz hatásfokkal hasznosulna az emberi szervezetben [76]. Mindezek mellett a hatóanyag felszabadulása és kiürülése a célzott szövetekből *in situ* fluoreszcens mikroszkópos technikával egyidejűleg követhető.

Rendkívül nagy fotostabilitásuk miatt szenzorikai célú felhasználásuk is lehetséges, mivel a legtöbb esetben az előállított Au NCs emissziós intenzitása függ a kémiai

környezettől, így lehetőség nyílik különféle fémionok, kismolekulák detektálására. A fluoreszcencia intenzitás csökkenése és az analit koncentrációja közötti korreláció felállításával bármely, a kérdéses anyagot ismeretlen koncentrációban tartalmazó mintában meghatározhatóvá válik az adott analit mennyisége. Számos példát találunk fémionok szelektív kimutatására a szakirodalomban. A **10. ábra** példaként a citidinnel-stabilizált Au NCs előállítását és szelektív ionszenzorikai felhasználását foglalja össze. Az Ag^+ -ionok hatására a klaszterek fluoreszcencia intenzitása megnő (*turn-on*) és eltolódik a nagyobb hullámhosszak (a látható fény sárga tartománya) irányába, míg Hg^{2+} -ionok hozzáadása után a karakterisztikus fluoreszcencia kioltása következik be (*turn-off*).



10. ábra: Citidin-stabilizált Au NCs felhasználása Ag^+ - és Hg^{2+} -ionok detektálására [77].

H. H. Deng és *mtsai.* publikációjukban metionin-stabilizált Au klasztereket alkalmaztak Cu^{2+} -ionok meghatározására, ahol a legkisebb detektálható Cu^{2+} -ionok mennyiségét 7,9 nM koncentrációban határozták meg [78]. H. Wei és *mtsai.* lizozimmal funkcionizált Au NCs segítségével sikeresen valósították meg Hg^{2+} -ionok szenzálását szintén alacsony (10 nM) kimutatási határral [79].

A szervesetlen szennyezőanyagok kimutatása mellett nagyfokú biokompatibilitásuknak és inertségüknek köszönhetően sokkal nagyobb lehetőség rejlik élő szervezetekben történő biomolekula-szenzorként való hasznosításukban [80]. Az arany nanoklaszterek fluoreszcenciájának kioltására alapozva már számos biológiai kismolekula detektálását valósították meg sikeresen. Példaként tekinthető a dopamin érzékelése gerincvelői folyadékból a BSA-stabilizált vörösen emittáló klaszterek [81], vagy a glükóz detektálása ciszteinnel stabilizált kék emissziójú Au NCs felhasználásával [82]. A legújabb kutatási irányvonalak már az *in vivo* felhasználásokat is érintik, ahol *pl.* Cu^{2+} -ionok vagy cisztein mennyiségét határozták meg különféle élő szövetek extracelluláris tereiben [83,84].

A klaszterek számos más tématerületen is eredményesen felhasználhatók (*pl.* katalízis, elektrokémia), de ezek részletezésére nem térünk ki ezen fejezetben [85,86].

3. Célkitűzés

Megalakulása és tevékenysége során (2007-2017) az MTA-SZTE Szupramolekuláris és Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoport (2017-től MTA-SZTE Biomimetikus Rendszerek Kutatócsoport) egyik fő kutatási területe a nemesfém nanorészecskék – főként arany (Au) és ezüst (Ag) tartalmú kolloid rendszerek – előállítása, optikai- és szerkezetvizsgálata. A kutatócsoport munkájához 2014 őszén csatlakoztam, ahol a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karán működő Kémia Doktori Iskola doktori képzésének keretein belül fluoreszcens sajátsággal rendelkező Au nanoszerkezetek új, eddig még nem publikált, biokompatibilis úton történő szintézis körülményeinek optimalizálásával foglalkoztam. Ezen túlmenően az előállított rendszerek széleskörű szerkezetanalízise és lehetséges szenzorikai felhasználásainak felderítése volt legfőbb feladatomban.

Az irodalomban arany nanoklaszterek biokompatibilis úton történő előállítására irányulóan az egyik elterjedt technika a „templátos” szintézis, ahol egyetlen szerves molekulát (főként dendrimereket, fehérjéket) használnak a fémionok redukciójához, amely a képződő klaszterek és részecskék vizes közegű szintézisének túl a stabilizálásukhoz is nagyban hozzájárul. Munkánk során tanulmányoztuk két eltérő méretű fehérje alkalmazhatóságát arany klaszterek, nanorészecskék közvetlen előállítására vonatkozóan. Az egyik fehérje a 14,3 kDa tömegű és 129 aminosavat tartalmazó, antibiotikus hatású, csirke tojásfehérjéből származó lizozim (LYZ) [87], míg másik fehérjeként a 150–160 kDa, átlagosan 1423 db aminosavból felépülő γ -globulint (γ G) [88] választottuk, amely a globuláris plazmafehérjék csoportjába tartozik.

A fehérjék mellett azok építőköveinek, az individuális aminosavaknak, *ill.* egy di- és egy tripeptidnek az aurácionokra gyakorolt hatását is tanulmányoztuk, mint lehetséges redukáló- és stabilizálószer. Jól ismert, hogy az arany specifikus és rendkívül erős, kovalens jellegű kötést (Au-S) képes kialakítani tiolcsoporttal és a soft jellegű arany(III)- és arany(I)ionok preferáltan a kén mellett a foszfor és nitrogén donoratomot tartalmazó funkciós csoportokhoz koordinálódhatnak. A molekulák kiválasztásánál tehát fontos szempont volt az oldalláncban tiolcsoportot tartalmazóak mellett (cisztein (Cys), ciszteinil-triptofán (CW), glutation (GSH)), hogy azok koordinációra képes oldalláncbeli donorcsoportot is tartalmazzanak és megfelelően erős redukálószerként is funkcionáljanak az aurácionokkal szemben. Irodalmi adatokból ismert, hogy az aminosavak közül a Trp rendelkezik az egyik legnegatívabb redoxpotenciál értékkel [89], így képes lehet 0 oxidációs

állapotig redukálni az Au(III)-ionokat. A Trp mellett egy másik, oldalláncban egy hidrofílsajátságú, pozitív töltést hordozó imidazoliumgyűrűt tartalmazó aminosavat, a hisztidint (His) is bevontuk a vizsgálatokba, mivel számos metalloenzim aktív centrumában His ligandumon keresztül kapcsolódnak gyakorta a fémionok [6,90,91].

Az elmúlt években az oligonukleotidok is egyre inkább a figyelem középpontjába kerülnek, mint potenciális klaszterképző ligandumok. Munkánk során az adenosin-monofoszfát (AMP) redukálószerként való alkalmazhatóságát is tanulmányoztuk, mivel az irodalomban AMP felhasználásával előállított arany klaszterekre vonatkozóan nem találunk kísérleti adatot annak ellenére, hogy meglehetősen jó fémmegkötő-sajátsággal rendelkezik [92,93].

A fentiek alapján munkánk során célul tűztük ki a fent ismertetett molekulák (LYZ, γ G, GSH, Cys, CW, Trp, His és AMP) kölcsönhatásának tanulmányozását AuCl₄⁻-ionokkal kizárólag vizes közegben 37 °C hőmérsékleten. Minden szintézismódszer kidolgozása során meghatározni kívántuk a kulcsfontosságú kísérleti paraméterek (reaktánsok moláris vagy tömegaránya, pH, szintézisidő, tárolási körülmények stb.) hatását az eltérő optikai sajátsággal rendelkező fémtartalmú rendszerek (klaszterek, részecskék) képződésére vonatkozóan. Elsősorban a fluoreszcens termékekre széleskörű szerkezet vizsgálatot kívántunk végezni a Kutatócsoportban és a Kémia Intézetben rendelkezésre álló műszeres technikák felhasználásával. Az előállított rendszereket méret- és szerkezetfüggő egyedi fluoreszcens sajátságaik révén, fluoreszcens jelzőanyagként (*pl.* gyógyszerhordozó rendszerek jelölésére) vagy (bio)szenzor fejlesztésére kíséreltük meg felhasználni.

4. Felhasznált anyagok, szintézisek és vizsgálati módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

4.1.1. A szintézisekhez használt anyagok

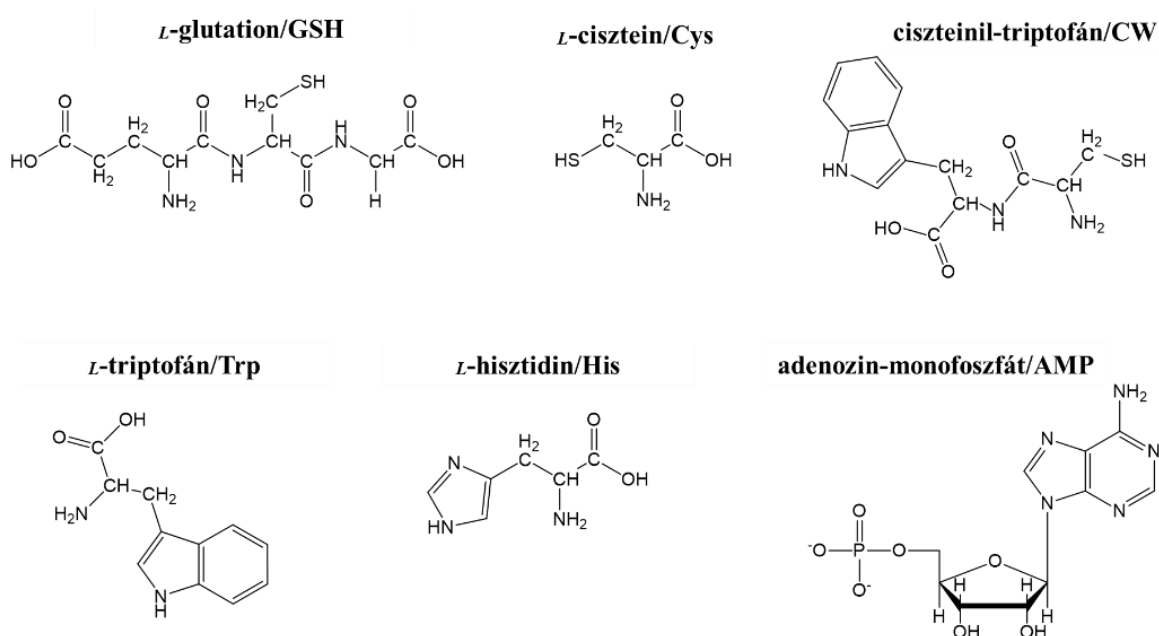
- hidrogén-tetrakloro-aurát trihidrát ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 99,9 %, Sigma)
- lizozim tojásfehérjéből (LYZ; ≥ 90 %, Sigma)
- gamma globulin marha vérből (γG ; ≥ 99 %, Sigma)
- redukált *L*-glutation (GSH; $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$; ≥ 98 %, Sigma)
- ciszteinil-triptofán (CW; $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$; ~ 70 %, SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézetben előállítva, szintézise és jellemzése a 4.2.1. fejezetben olvasható)
- *L*-triptofán (Trp; $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$; ≥ 98 %, Sigma)
- *L*-hisztidin (His; $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$; 99,9 %, Sigma)
- adenzin-5'-monofoszfát dinátrium sója (AMP; $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_7\text{P}$; 99,9 %, Sigma)
- citromsav-1-hidrát ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$; 99 %, Molar)
- trinátrium-citrát dihidrát ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 98 %, Molar)
- nátrium-hidroxid (NaOH; 99 %, Molar)
- sósav (HCl; 37 %, Molar)
- aceton (CH_3COCH_3 ; 99,9 %, Molar)
- cellulóz alapú dialízis membrán (cut off: 12–14 kDa, Sigma)

4.1.2. A szenzorikai vizsgálatokhoz felhasznált fémek és biológiai kismolekulák

- réz(II)-klorid (CuCl_2 ; >98 %, Sigma)
- cink(II)-klorid (ZnCl_2 ; 99,9 %, Molar)
- kalcium-klorid dihidrát ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 97 %, Molar)
- magnézium-klorid hexahidrát ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 98 %, Molar)
- vas(III)-klorid hexahidrát ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 99,9 %, Sigma)
- kálium-klorid (KCl; >99 %, Molar)
- mangán(II)-klorid tetrahidrát ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 98 %, Sigma)
- kobalt(II)-klorid hexahidrát ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 98 %, Sigma)
- nikkel(II)-klorid hexahidrát ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 99 %, Sigma)
- nátrium-klorid (NaCl; 99 %, Molar)
- nátrium-bromid (NaBr; 99 %, Molar)
- nátrium-jodid (NaI; 98 %, Molar)
- nátrium-hidrogén-karbonát (NaHCO_3 ; 95 %, Molar)
- nátrium-szulfát (Na_2SO_4 ; 95 %, Molar)

- nátrium-nitrát (NaNO_3 ; 99 %, Molar)
- nátrium-acetát (CH_3COONa ; 99 %, Molar)
- nátrium-oxalát ($\text{C}_2\text{Na}_2\text{O}_4$; 99,5 %, Sigma)
- kinurénsav (KYNA; $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$; ≥ 98 %, Sigma)
- *L*-kinurenin (Kyn; $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$; ≥ 98 %, Sigma)
- nikotinamid-adenin-dinukleotid ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$; ≥ 97 %, Sigma)
- szintetikus kinurénsav származék: *N*-(2-*N,N*-dimetilaminoetil)-4-oxo-1*H*-kinolin-2-karboxamid hidroklorid (SZR-72; $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$; ~ 98 %, SZTE GYTK Gyógyszerkémiai Intézetben előállítva [94])

A szintézisekhez és vizsgálatokhoz alkalmazott vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak, így azokat további tisztítás nélkül használtuk fel. Az egyes törzsoldatokat és azok felhasználásával készített vizes közegű nemesfém diszperziókat minden esetben ultratisztá, kiforralt és nitrogénnel CO_2 -mentesített MQ-vízzel (Millipore, Milli-Q Integral3, vezetőképesség 18,2 mS/cm 25 °C-on) frissen készítettük el. A szintézisekhez közvetlenül felhasznált kismolekulák szerkezeti képleteit, a fehérjék kivételével, a **11. ábra** foglalja össze.



11. ábra: A szintézishez használt kismolekulák szerkezeti képletei.

4.2. Szintézismódszerek

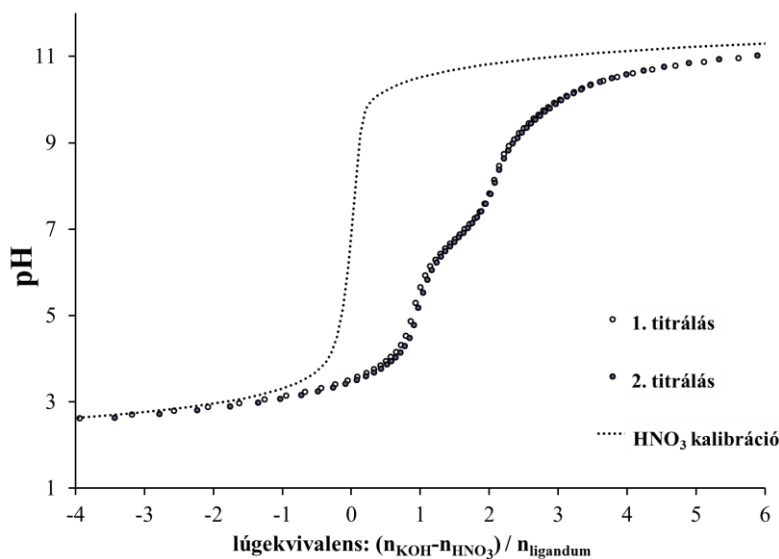
Az alábbi alfejezetekben az egyes rendszerek előállításánál az optimálisnak megállapított kísérleti körülményeket foglaljuk össze. A megfelelő biomolekula/auration tömeg-, és molarányok, valamint a reakciókörülmények megválasztásának a végtermékek előállítására gyakorolt hatását az **5. Eredmények és értékelésük** c. fejezet vonatkozó részeiben, mint új tudományos eredmények tárgyaljuk bővebben.

4.2.1. A ciszteinil-triptofán előállítása és jellemzése

A ligandumként használt ciszteinil-triptofánt (CW) folyadék fázisú peptid szintézissel, Boc kémiával állították elő az SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet munkatársai és bocsátották rendelkezésünkre. A szintézishez 765 mg Boc-Cys(Trt)-OH-t oldottak 20 mL absz. etil-acetátban, majd $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre hűtötték. Folyamatos kevertetés mellett 260 μL izobutil-klorofomátot és 230 μL trietil-amint adagoltak a reakcióelegyhez. 25 perc elteltével a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött elegyhez 445 mg H-Trp(*t*Bu) \times HCl-t és 209 μL trietil-amint adtak, majd 1 órán át $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és további egy éjszakán keresztül szobahőn folytatták a kevertetést. A kicsapódott trietil-amin-hidroklorid szűrése után a dipeptid oldatának tisztításához háromszoros extrakciót alkalmaztak 5 %-os KHCO_3 -oldat, 5 %-os KHSO_4 -oldat és MQ-víz felhasználásával. A tisztított CW oldat szárításához vízmentes Na_2SO_4 -ot használtak. A védett dipeptidet TFA:DTT:víz/90:5:5 arányú elegyében szobahőmérsékleten 2 órán át kevertették. A TFA-t vákuumbepárlással távolították el, majd a maradék oldatot éterrel dörzsölték el. A nyers dipeptidet 10 %-os vizes ecetsavban oldották fel, melyet szűrés után liofilizáltak. A kapott terméket félpreparatív nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (*reversed phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) tisztították (Phenomenex Jupiter Proteo, C18, 10 μm -es). A tisztításnál 5 mL/perc áramlási sebességet használtak, a gradiens 60–40 % volt. A kapott peptid tisztaságát egy analitikai RP-HPLC-vel vizsgálták meg (Phenomenex Luna 10 C18) 1,2 mL/perc áramlási sebesség mellett, ahol a gradiens 18–33 % volt 15 percen belül ($R_t = 10,51$).

A tisztított CW jellemzéséhez ESI-MS méréseket végeztek (Finnigan TSQ 7000 tandem kvadrupól MS), amely alapján az előzetesen kalkulált tömeg $M_{w, \text{calc}} = 307,08$ és a mérésből meghatározott tömeg $M_{w, \text{mért}} = 308,1$ volt. A dipeptid savi disszociációs állandóinak meghatározásában Dr. Dömötör Orsolya (SZTE Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék) volt segítségünkre. A meghatározáshoz pH-potenciometriás vizsgálatokat végeztek egy Orion 710A pH-mérő, Metrohm Dosimat 665 típusú automatabüretta és egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrodot alkalmazva. A titrálást $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten

0,2 M ionerősség (KNO_3) mellett végezték 0,0806 M KOH és 0,2088 M HNO_3 oldatok felhasználásával. A párhuzamos titrálási görbék a **12. ábrán** láthatók.



12. ábra: A CW pH-potenciometriás titrálási görbéje ($t = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2\text{ M KNO}_3$)

A mérési adatok alapján meghatározott savi disszociációs állandók értékei $\text{pK}_s(1) = 3,40 \pm 0,05$, $\text{pK}_s(2) = 6,65 \pm 0,03$ és $\text{pK}_s(3) = 9,34 \pm 0,02$ értéknek adódtak, melyek rendre a karboxil-, tiol- és ammóniumcsoportok deprotonálódásához rendelhetőek és jó egyezést mutatnak a ciszteinil-glicin esetében korábban meghatározott értékekkel [95].

4.2.2. Fehérje-stabilizált rendszerek előállítása

A plazmonikus, **LYZ** fehérjével stabilizált NPs előállítása során LYZ: Au/5:1 tömegarányt állítottunk be, melynél 10 mg LYZ fehérjét oldottunk 10 mL MQ-vízben, ezt követően egy lépésben adtunk hozzá 1 mL 10 mM-os HAuCl_4 -oldatot. Az elegyet 5 percig $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on kevertettük, miközben az aurationokra jellemző intenzív sárga szín fokozatosan elhalványodott. A színváltozást követően a reakcióelegy pH-ját $\text{pH} = 12,0$ -re állítottuk NaOH-oldat hozzáadásával. A mintát 24 h keresztül $37\text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten tartottuk, a szintézis végét a koloid aranyra jellemző vörös szín megjelenése és annak színállandósága jelezte. A LYZ-Au NCs szintézise során 40 mg LYZ-ot oldottunk fel 10 mL MQ-vízben, amihez 1 mL 10 mM-os aurát-oldatot adtunk LYZ: Au/20:1 tömegarányt beállítva. A reakcióút további részében hasonló módon jártunk el, mint a nanorészecske előállítása során. A klaszterek tisztítását cellulóz membránon keresztül történő (cut off: 12–14 kDa) dialízissel végeztük 24 h időtartamig.

A γG immunofehérjével stabilizált klaszterek szintézise során γG : Au/15:1 tömegarányt alkalmaztunk, amelyhez 15 mg γG -t oldottunk fel 5 mL MQ-vízben. Ehhez

adagoltunk folyamatos kevertetés mellett 1 mL 5,3 mM-os HAuCl_4 -oldatot, melynek színe a további 5 perc kevertetés mellett intenzív sárgából narancssárgára változott. Ezt követően 0,4 mL 0,1 M-os NaOH oldatot adtunk a reakcióelegyhez egy lépésben, így a végső pH értékét $\text{pH} = 12,0$ -re állítottuk. A 24 h 37°C hőmérsékleten való termosztálást követően a $\gamma\text{G-Au}$ NCs intenzív vörös színű fluoreszcenciát mutattak ($\lambda_{\text{em}} = 645\text{ nm}$). A prekursor fémsó és a lúgfelesleg eltávolítására egy 24 h-ig tartó dialízist végeztünk. A $\gamma\text{G-Au}$ NPs előállítása és tisztítása azonos séma szerint zajlott, az alkalmazott tömegarány azonban $\gamma\text{G:Au}$:1:1 volt.

4.2.3. Cisztein és cisztein-tartalmú kismolekulákkal redukált rendszerek előállítása

A fluoreszcens **GSH-** és **Cys-Au** nanohibrid rendszerek előállításánál 500–500 μL 10 mM, míg a **CW-Au** rendszer esetén 50 μL 10 mM koncentrációjú HAuCl_4 -oldatot adagoltunk a biomolekulák megfelelő mennyiségű vizes oldataihoz. A szintézisek során a GSH-Au rendszernél GSH:Au/15:1 ($\text{pH} = 3,0$ és $\text{pH} = 12,0$), a Cys-Au rendszernél Cys:Au/10:1 ($\text{pH} = 3,0$), míg a CW alkalmazása mellett CW:Au/20:1 ($\text{pH} = 12,0$) molarányokat alkalmaztunk a feltüntetett kiindulási pH értékek beállításával. A végső térfogatokat minden esetben 5 mL-re egészítettük ki. A reakcióelegyeket 24 h-ig 37°C hőmérsékleten termosztáltuk. A termékek képződését minden esetben a kiindulási aurát-oldat intenzív sárga színének eltűnése jelezte. A diszperziók tisztítását 13000 rpm fordulatszám 30 percig, centrifugálással végeztük el. A CW-Au rendszer esetén nanorészecskék előállítására is lehetőség adódott, ahol 1,0 mM végső Au koncentráció beállítása mellett 500 μL 10 mM mennyiségű aurát-oldatot adagoltuk a CW megfelelő koncentrációjú oldatához, hogy a reakcióelegyben CW:Au/0,5:1 arányt állítsunk be.

4.2.4. Oldalláncban nitrogén-donoratomot tartalmazó aminosavakkal redukált rendszerek előállítása

A **Trp-Au** rendszerek esetében 520 μL 3,83 mM koncentrációjú HAuCl_4 -oldatot adagoltunk aránytól függően 16 μL –1,2 mL 50 mM-os Trp vizes oldatához, hogy a Trp:Au molarányát 0,4:1; 1:1; 5:1 és 15:1 értékekre állítsuk be. A mintákat 4–4 mL végső térfogatokra egészítettük ki. A fluoreszcens termékek szintézisének 1:1, 5:1 és 15:1 molarányok rögzítésével $\text{pH} = 1,0$ beállítása mellett dolgoztunk, míg a Trp-Au NPs előállítása során Trp:Au/0,4:1 molaránnyal $\text{pH} = 12,0$ -t alkalmaztunk. Mind a kolloid részecskéket, mind a fluoreszcens nanohibrid rendszerek eredményező reakciók során 24 h szintézisidőt alkalmaztunk 37°C hőmérsékleten. A termékeket minden esetben 30 percig

tartó 13000 rpm fordulatszámon végzett centrifugálással választottuk el a reakciót követően visszamaradt kiindulási anyagoktól és a képződött részecskék aggregátumaitól. A tisztított rendszereket tiszta oldószerben diszpergáltuk újra.

A **His-Au** rendszer előállítása során 810 μL 5,078 mM aurát-oldatot adagoltunk 2,38 mL 2,07 mM koncentrációjú His oldathoz folyamatos kevertetés mellett, ahol His:Au/30:1 molarányt állítottuk be pH = 6,0 esetén. A minták végső térfogatát 4 mL-re egészítettük ki. A 15 perces kevertetést követően a mintákat 24 órán át 37 °C hőmérsékleten termosztáltuk a további vizsgálatok és felhasználások előtt.

4.2.5. Adenozin-monofoszfáttal stabilizált arany nanorészecskék és klaszterek szintézise

A fluoreszcens **AMP-Au** NCs előállítása során 1 mL 10 mM koncentrációjú AMP oldathoz elegyítettünk 50 μL 10 mM koncentrációjú aurát-oldatot, melynek következtében a szintézishez alkalmazott molarány AMP:Au/20:1 volt. A plazmonikus AMP-Au NPs előállításához azonban közelítőleg AMP:Au/1:1 molarányt és 2 mM-os végső arany koncentrációt alkalmaztunk. Folyamatos, 15 percig tartó mágneses kevertetés után 500 μL 0,5 M-os citromsav/citrát pufferelegy adagolásával pH = 6,0-os értéket állítottunk be. A következő 24 órában 37 °C hőmérsékleten termosztáltuk a mintákat, majd a szintézisidő letelte után a fluoreszcens terméket acetonos kicsapást követően 15000 rpm fordulatszám beállítása mellett 30 percig tartó ultracentrifugálással tisztítottuk. A részecskék tisztításához azonos paraméterek beállítása mellett kivitelezett centrifugálást használtunk. A tisztított nanohibrid struktúrákat a kiindulásival azonos koncentrációban diszpergáltuk vissza tiszta MQ-vízben.

4.3. Vizsgálati módszerek

4.3.1. Optikai sajátságok jellemzésére szolgáló műszeres technikák

Az **ultraibolya-látható (UV-Vis) spektrofotometriás** mérések során a spektrumokat egy Shimadzu UV-1800 típusú kétfényutas spektrofotométerrel rögzítettük 200–800 nm hullámhossztartományon. A mérésekhez 1 cm úthosszú, kétoldalú kvarc küvetákat használtunk. Referenciaként a kísérleti körülményektől függően MQ-víz vagy foszfátpuffer (PBS) oldat szolgált. Spektrofotometriás méréseket döntően az arany kolloidok képződésének igazolása és vizes közegbeli stabilitásuk vizsgálata érdekében végeztünk.

A **spektrofluorimetriás (PL) és a szenzorikai vizsgálatoknál** a számunkra fontos információkat a mintából gerjesztés hatására kisugárzott fluoreszcens fotonok hullámhosszai és mennyisége (intenzitás), illetve ez a két paraméter változásai szolgáltatták. Ilyen változások bekövetkezhetnek például a hőmérséklet, anyagmennyiség/koncentráció, nyomás, pH vagy ionerősség megváltozása által, de különböző ionok, atomok vagy molekulák is kölcsönhatásba léphetnek a fluoreszcens mintával. A fluoreszcencia intenzitását befolyásoló hatások vagy anyagok lehetnek kioltók (quencher) vagy fokozók (enhancer). Mivel a disszertáció egyes témakörei az előállított nanoklaszterek fluoreszcencia-kioltásán alapuló optikai szenzorként való felhasználását érintik, így a továbbiakban csak a kioltás (quenching) jelenségének részletesebb ismertetésére korlátozódunk [96]. A Stern-Volmer egyenlet (**3. egyenlet**) széles körben elterjedt a fluoreszcencia-kioltási folyamatok értelmezésére, melynek háttérében gyakorta sztatikus vagy dinamikus kioltás állhat. A Stern-Volmer egyenlet linearitásából megállapítható, hogy tisztán csak az egyik vagy másik folyamat, esetleg a két mechanizmus együttesen járul hozzá az emisszió csökkenéséhez. A kioltási állandó (K_{SV}) értéke tisztán csak sztatikus vagy dinamikus kioltásnál egyszerűen meghatározható oly módon, hogy a kioltó koncentrációjának függvényében ábrázoljuk az I_0/I értékeket, majd a kapott pontokra egyenest illesztve annak meredeksége adja a K_{SV} értékét:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3.)$$

ahol az I_0 és az I a mért fluoreszcencia intenzitás a kioltó jelenléte nélkül és jelenlétében, K_{SV} a Stern-Volmer állandó, míg $[Q]$ a kioltó egyensúlyi koncentrációja, mely helyett a legtöbb esetben a bemért analitikai koncentráció is alkalmazható. Az adatpontok y-tengely felé történő elhajlása azonban a két mechanizmus együttes jelenlétére utal, melynek kiértékelésére már a Stern-Volmer valamely módosított formáját szokás alkalmazni.

Sztatikus kioltás során a fluorofór és a kioltó között még alapállapotban, a gerjesztés előtt jön létre egy nem fluoreszkáló (sötét) komplex, így ebben az esetben K_{SV} a sötét komplex képződési folyamatára jellemző asszociációs állandóként kezelhető. Ideális rendszereknél minden fluorofór egyformán hozzáférhető a kioltó számára, azonban a legtöbb esetben egy részük sztérikusan gátolt helyzetben lehet, ezért a sztatikus kioltás kiértékeléséhez a Stern-Volmer egyenlet alábbi, módosított formáját (**4. egyenlet**) alkalmazzuk:

$$I_0/I = 1/f_a + 1/f_a K_a * [Q]^{-1} \quad (4.)$$

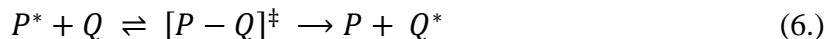
ahol f_a a fluorofór azon hányadát adja, amely a kioltó által hozzáférhető helyzetben található, K_a pedig az asszociációs állandó. A sztatikus kioltás jellemzője, hogy a fluorofór élettartama a kioltó jelenlétében sem változik meg, hiszen a komplexképződés által a gerjesztett állapotban lévő részecskék száma csökken. Mindezekon felül a hőmérséklet növelésével K_{SV} értéke csökkenő tendenciát mutat, hiszen a hőmérséklet emelése kedvez a kialakuló sötét komplex disszociációjának.

A másik gyakorta előforduló kioltási folyamat a dinamikus vagy ütközéses kioltás. Ezen mechanizmus esetén a kioltó közel kerül a gerjesztett fluorofórhoz, majd a két reaktáns ütközése következtében a fluorofór elveszíti többletenergiáját. A dinamikus kioltást tehát a fluorofór hozzáférhetősége mellett a reaktánsok diffúziója is korlátozza. A tisztán sztatikus kioltással ellentétben a dinamikus kioltási folyamatoknál a fluorofór fluoreszcencia élettartama (τ) megváltozik a kioltó jelenlétében, hiszen ebben az esetben nem a fluoreszcens részecskék száma, hanem a gerjesztett állapotban töltött idő csökken le az ütközések révén. Ez a változás egyenes arányosságban van a fluoreszcencia intenzitás változásával (I) ugyanúgy, mint ahogyan a kioltó nélküli élettartam (τ_0) és intenzitás (I_0) vannak egymással. A Stern-Volmer egyenlet dinamikus kioltás esetében az alábbi formában (**5. egyenlet**) írható fel:

$$\tau_0/\tau = I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (5.)$$

ahol k_q a bimolekuláris kioltási sebességi együttható, amely a hatásos ütközések arányát tükrözi. A dinamikus kioltás jellemzője tehát a fluoreszcencia élettartam csökkenésén túl, a K_{SV} értékének növekedése a hőmérséklettel, hiszen a nagyobb hőmérséklet által a reaktánsok nagyobb kinetikus energiával fognak rendelkezni, melynek hatására megnő a hatásos ütközések száma is. A dinamikus kioltás ennek következtében az alábbi általános sémával

(6. *egyenlet*) írható le és 3 részlépésre bontható, melyek mindegyikéhez önálló sebességi állandó rendelhető:



Első lépésben a kioltó a gerjesztett állapotban levő fluorofórhoz diffundál a gerjesztett állapot élettartama alatt, majd ütközés révén egy aktivált komplexet ($[P-Q]^\ddagger$) alkot vele (k_1). Az aktivált komplex megszűnéséhez az alábbi két, párhuzamosan lejátszódó reakcióút vezethet:

- vagy az ütközés révén megtörténik az energiaátadás és az aktivált komplex szétbomlik egy alapállapotú fluorofórt (P) és egy gerjesztett kioltót (Q^*) eredményezve (k_2),
- vagy a nem megfelelő molekuláris orientáció következtében egy nem reaktív szétesés következik be (k'_1).

A K_{SV} értéke az 6. egyenlet szerinti általános reakcióút feltételezése mellett tehát az enzimreakciók kinetikájának tanulmányozásából is ismert 7. *egyenlet* alapján egyensúlyi állandónak tekinthető:

$$K_{SV} = (k'_1 + k_2) / k_1 \quad (7.)$$

A szenzorikai vizsgálatok mechanizmusának mélyebb megértése érdekében azonban az analitikai paramétereken (kimutatási határ, dinamikus tartomány) túlmenően a kioltási folyamatot jellemző termodinamikai potenciálfüggvények számszerű értékének meghatározására is szükség van. Ezen paraméterek meghatározásához végül a kioltás fajtájától függően, K_a vagy K_{SV} ismeretében az alábbi 8. és az integrált van't Hoff (9. *egyenlet*, [97]) egyenleteket alkalmaztuk:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (8.)$$

$$\ln K = - \Delta H^0(T^0) / RT + \Delta S^0(T^0) / R + \Delta C_p / R \left[\left((T - T^0) / T \right) - \ln (T / T^0) \right] \quad (9.)$$

ahol ΔG a szabadentalpia-változás, R az egyetemes gázállandó, T a mérés hőmérséklete, K_a a sztatikus kioltás esetén meghatározott asszociációs állandó, 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 fluoreszcencia spektrumokat egy Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 típusú spektrofluoriméterrel rögzítettük. A mérésekhez 1 cm úthosszú négyoldalú kvarc küvettát használtunk. A mintákat az előzetesen meghatározott hullámhosszú fénnel gerjesztettük,

amelyhez megvizsgáltuk azokat a hullámhosszúságú gerjesztéseket, amihez a maximálisan detektálható intenzitás tartozott. A bemeneti és kimeneti résszélességet 3 nm-re állítottuk.

A **fluoreszcencia élettartam (τ) és kvantumhasznosítás (QY%)** méréseket Dr. Baranyai Péter (MTA-TTK „Lendület” Szupramolekuláris Kémiai Kutatócsoport) végezte egy Edinburgh FLS920 időfelbontásos spektrofluoriméteren 378 nm gerjesztési hullámhossz alkalmazása mellett. Referenciaként minden esetben krezil-ibolya festék szolgált.

4.3.2. Szerkezetvizsgálatra irányuló molekulaszpektroszkópiás módszerek

A **Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR)** méréseket egy ATR-feltétellel ellátott BIO-RAD Digilab Division FTS-65A/896 Fourier-transzformációs (FT) spektrométeren végeztük liofilizált pormintákon, 256 interferogram átlagolásával 4 cm^{-1} felbontás mellett a közép infravörös tartományon ($1000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$). A koordinatív kötés(ek) felderítéséhez a távoli infravörös tartományon ($200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) egy BIO-RAD Digilab Division FTS-40 FT-IR spektrométert és Nujol-Mull technikát alkalmaztunk. A kiértékeléshez a spektrumokat szintén 256 interferogram átlagolásával és 4 cm^{-1} felbontás mellett rögzítettük. A spektrumokon látható karakterisztikus rezgési sávokból meghatároztuk a fémion elsődleges koordinációs helyét az adott stabilizáló ligandum esetén, valamint további következtetéseket vontunk le a biomolekulák konformációváltozására.

A **cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás (CD)** mérések során a spektrumok rögzítéséhez egy JASCO J-1100 CD spektrométert használtunk. A méréseket 0,2 cm optikai úthosszúságú cilindrikus küvettában és a fehérjére nézve 3,5 mM koncentrációjú Au NCs diszperziót vizsgálva 250–190 nm hullámhossz tartományon végeztük. A mérési adatok kiértékeléséhez a Reed modellt alkalmaztuk [98], míg háttérként mintától függően a megfelelő pH-jú MQ-víz vagy foszfátpuffer szolgált.

A **tömegspektrometriás (MS)** méréseknél a spektrumok rögzítése Dr. Kele Zoltán (SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) segítségével történt. Kísérleteink során az ESI-MS (elektrospray ionizációs tömegspektrometria) spektrumokat egy Waters-Micromass típusú Q-TOF analizátorral szerelt spektrométerrel rögzítettük elektrospray ionizálás és 1 μL mintaadagolás mellett. A MALDI (atmoszférikus nyomáson működő lézerdeszorpciós) spektrumokat 0,5 μL mátrix (10 mg/mL koncentrációjú 12,5-dihidroxibenzoészav acetonitril:víz/1:1 elegyében) és 0,5 μL mintamennyiség felhasználásával rögzítettük egy time-of-flight analizátorral szerelt Bruker Reflex II spektrométeren.

4.3.3. Nanorészecskék és nanoklaszterek méretének, méreteloszlásának meghatározására irányuló vizsgálati módszerek

A **dinamikus fényszórás (DLS)** és **ξ-potenciál méréseket** egy Malvern NanoZS műszerrel ($\lambda = 633$ nm He-Ne lézer) $25,0 \pm 0,1$ °C hőmérsékleten végeztük. A kiértékelések során a hidrodinamikai átmérők értékét minden esetben a számszerinti átlagok felhasználásával definiáltuk. Mindhárom mért paraméter értékét (**d** (hidrodinamikai átmérő), **PDI** (polidiszperzitási index) és **ξ-potenciál**) 5–5 mérés átlagaként számítottuk.

Az előállított NPs és NCs alakjának, valamint átlagos méretének meghatározásához **nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópia (HRTEM)** technikát alkalmaztunk, amelyhez egy FEI Tecnai G2 20 X-Twin típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal, 200 kV gyorsítófeszültség és LB₆ katód alkalmazása mellett készítettünk képeket normál és nagyfelbontású (HR) üzemmódban. A méreteket átlagosan 150 darab megmért részecske átlagaként határoztuk meg az ImageJ szoftver segítségével.

4.3.4. Röntgen analitikai módszerek

Az arany oxidációs állapotának igazolása érdekében **rönggen fotoelektron spektroszkópiás (XPS)** méréseket végeztünk. Tömbi arany esetén az Au⁰ oxidációs állapothoz rendelhető 4f_{7/2} kötési energia kb. 84 eV, de ezen érték a részecske méretének csökkenésével 84,2–84,8 eV értékekig tolódhat [99,100]. Az XPS spektrumok rögzítését Dr. Varga Erika és Dr. Oszkó Albert (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) végezte egy SPECS XR50 típusú kettős anódú röntgensővel és PHOIBOS 150 MCD 9 analizátorral szerelt spektrométeren az általunk előzetesen készített tantál lemezre cseppentett filmekken. Ahol lehetőség adódott a méréseket liofilizált pormintákon végezték. A spektrumok kiértékeléséhez az Origin 7 szoftvert alkalmaztuk.

A **röntgendiffraktometriás (XRD)** méréseket egy Bruker D8 (CuKα, $\lambda = 0,154$ nm) diffraktométerrel végeztük 40 kV feszültséget, 30 mA áramerősséget és 1,2 mm részélességet alkalmazva. A bázislap-távolságok meghatározására a Bragg-egyenletet (**10. egyenlet**) használtuk:

$$\lambda = 2d * \sin \theta \quad (10.)$$

ahol **d** a bázislapok közötti távolság, **λ** a röntgensugár hullámhossza, **θ** pedig a diffrakciós szög. A LYZ-Au NPs esetén a diffraktogramokból a Scherrer-formula (**11. egyenlet**) szerint határoztuk meg a primer részecske méretet:

$$d = K\lambda / \beta \cos \theta \quad (11.)$$

ahol d az átlagos krisztallitméret, K egy alakfüggő konstans, λ a röntgensugárzás hullámhossza, β a reflexiós csúcs félérték-szélessége radiánban megadva és θ pedig a Bragg-szög értéke.

A **kisszögű röntgenszórásos (SAXS)** vizsgálatok kivitelezésében Dr. Sebők Dániel (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) segédkezett főként a LYZ-tartalmú minták esetében. A szórásgörbék egy Philips PW 1820 típusú röntgensővel (CuK α sugár, $\lambda = 0,154$ nm, 40 kV, 30 mA) szerelt KCEC/3 típusú kompakt Kratky-kamerával kerültek rögzítésre 2 mm átmérőjű kapilláris mintatartókban. A szórt sugárzás intenzitása egy PDS 50M (M. Braun AG, München) típusú helyérzékeny detektorral lett mérve a $2\theta = 0,05$ – 8° szögtartományban. A szórásfüggvényből a háttér szórásának kivonása után kerültek meghatározásra a LYZ-ra vonatkozó szerkezeti paramétereket. A számításokhoz az ATSAS Gnom szoftver nyújtott segítséget.

4.3.5. Egyéb alkalmazott műszeres technikák

A **fluoreszcens mikroszkópiás** felvételeket egy Leica DM IL LID FLUO típusú HBO (100 W) lámpával szerelt mikroszkóppal készítettük. A gerjesztési hullámhossz 345 nm volt. A BSA/ibuprofen nanokompozitok jelölése esetén 5 mg kompozitot használtunk fel, melyhez 0,15 mg Au tartalmú Au(I)-His komplexeket adtunk. Az 1 mg kitozán mikrogöngyöket tartalmazó diszperzióhoz 0,16 mg Au tartalmú fluoreszcens Au(I)-His vizes diszperzióval elegyítettük.

Fagyasztva szárítást (lioofilizálás) alkalmaztunk az FT-IR, XRD és SAXS mérésekhez felhasznált porminták előállításához, valamint a kolloid részecskék eltarthatósági idejének növelése érdekében. A mintákat minden esetben folyékony N₂ felhasználásával fagyasztottuk, majd 24 h-ig -80°C -on tároltuk őket. Az oldószert 4 mbar nyomást alkalmazva egy Christ-Alpha 1-2 LD típusú liofilizáló készülékkel távolítottuk el.

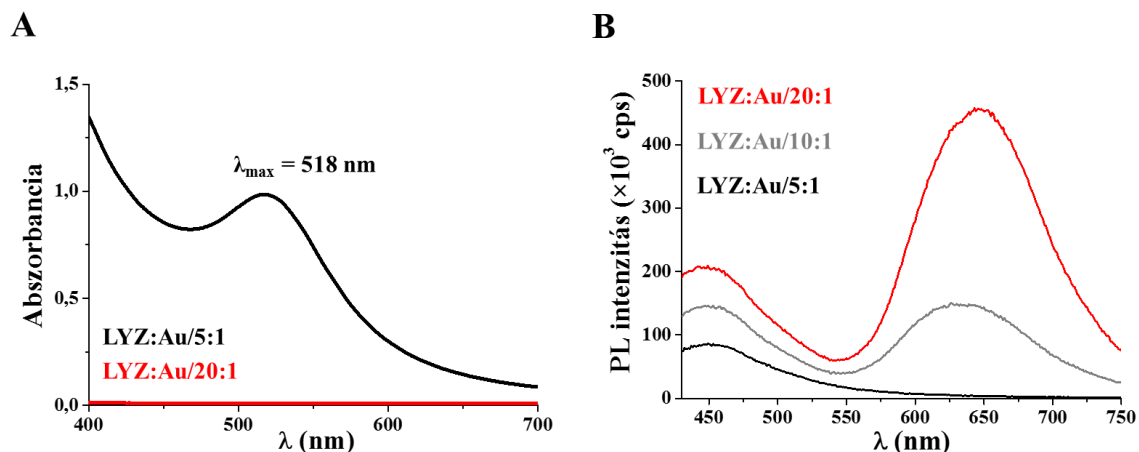
Izotermikus titrációs kalorimetriás (ITC) vizsgálatok kivitelezésében Dr. Varga Viktória (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) segédkezett a γ G-Au rendszerek esetén. A mérések során rögzített entalpogramokat egy MicroCal típusú izoterm titrációs kaloriméteren rögzítettük 1,4301 mL cella- és 300 μL fecskendőterfogatokat használva. A titrálandó komponens minden esetben a γ G 1,47 mg/ mL koncentrációjú vizes oldata volt, míg titrálószerként 0,5 mM-os Kyn szolgált. A titrálás során 20 lépésben 10 s injektálási időt és 5 perces várakozási időintervallumokat alkalmaztunk. Az entalpogramok kiértékeléséhez háttérként a γ G és Kyn vizes oldatának hígulását kísérő hőeffektusokat rögzítettük. A kiértékeléshez az Origin 7 szoftvert használtuk.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Fehérje-stabilizált Au nanostruktúrák méretszabályozott szintézise, szerkezet- és stabilitásvizsgálata

5.1.1. Lizozim-Au rendszerek

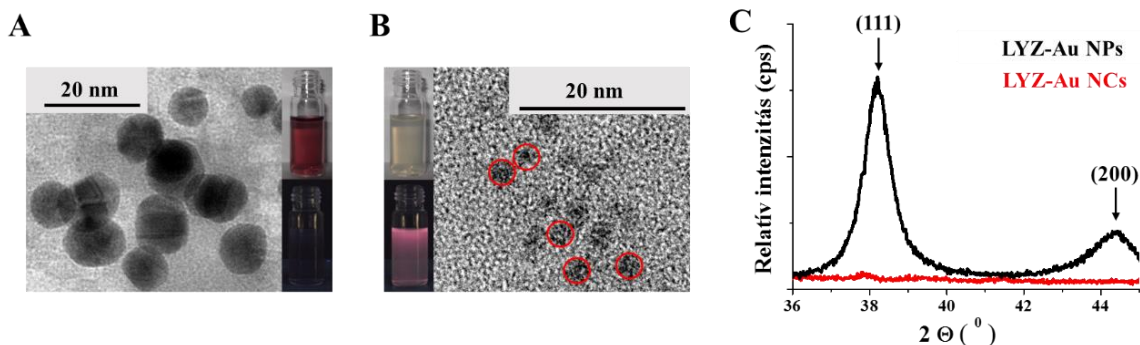
Amint azt a 2.3.1. fejezetben ismertettük, a redukáló- és stabilizálószer szerepét egyben betöltő biomolekula és a fémionok egymáshoz képesti moláris vagy tömegaránya döntő szereppel bír az arany nanorészecskék/nanoklaszterek előállítása során. A lizozim fehérje redukálószerként való alkalmazhatóságának tanulmányozása során olyan kísérletssorozatot terveztünk meg, ahol a kiindulási reakcióelegyben szisztematikusan változtattuk a LYZ: Au tömegarányát 1:1 és 40:1 értékek között lúgos közegben ($\text{pH} \sim 12$) 37°C és $m = 2,0 \text{ mg Au}$ tartalom rögzítése mellett. Azt tapasztaltuk, hogy a kisebb tömegarányok alkalmazása esetén (LYZ: Au/1:1–5:1) 24 óra szintézis idő eltelte után vörös színű, plazmonikus sajátsgot ($\lambda_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$) mutató Au nanorészecskék keletkeztek (**13.A ábra**). Ezzel szemben, ha a fehérje feleslegét megnöveltük a kiindulási aurácionok koncentrációjához képest (LYZ: Au $> 5:1$), akkor a termék(ek) abszorbancia spektrumában a kolloid részecskékre jellemző karakterisztikus sáv már nem volt detektálható [31]. Ezen megfigyeléssel párhuzamosan egy egyre nagyobb intenzitású emissziós csúcs megjelenése figyelhető meg az emissziós spektrumokon $\lambda_{\text{em}} \sim 655 \text{ nm}$ környékén 375 nm-es gerjesztési hullámhosszt alkalmazva (**13. ábra**), mely valószínűsíti a szub-nanométeres mérettartományba sorolható Au NCs képződését. A fluoreszcens termékre meghatározott kvantumhasznosítási tényező és élettartam értékek $\text{QY} = 3,8 \%$ és $\tau = 1,9 \mu\text{s}$ adódtak. A LYZ/AuCl₄[−] kölcsönhatásával előállított vizes diszperziókat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a legintenzívebb plazmon módus a LYZ: Au/5:1 tömegarálynál, míg a legnagyobb emissziós csúcs intenzitása LYZ: Au/20:1 tömegarány alkalmazásával mellett volt detektálható. A részletes szerkezetvizsgálatokat ezen fehérje:fémion arányok rögzítése mellett szintetizált LYZ-Au nanorészecske és nanoklaszter tartalmú rendszerekről készítettük.



13. ábra: (A) A LYZ-Au rendszerek Vis (A) és emissziós (B) spektrumai az alkalmazott LYZ:Au tömegaránytól függően ($m_{\text{Au}} = 2 \text{ mg}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$)

Az egyes vizes diszperziókban képződő részecskék/klaszterek méretének és méreteloszlásának meghatározásához HRTEM és DLS méréseket végeztünk. A plazmonikus LYZ-Au rendszerek esetén a keletkező részecskék átlagos átmérőire $d_{\text{HRTEM}} = 12,0 \pm 3,1 \text{ nm}$ (**14.A ábra**) és $d_{\text{DLS}} = 18,1 \pm 1,1 \text{ nm}$ értéket állapítottunk meg a megjelölt technikák sorrendjében, ami alátámasztja az arany kolloid részecskék képződését. Ezen túlmenően a minta XRD mérés technikával történő szerkezetvizsgálata során a diffraktogramon, a $2\Theta = 38,18^{\circ}$ és $44,28^{\circ}$ értékeknél megjelenő egy-egy reflexió csúcsból a lapcentrált köbös (FCC) kristályszerkezetű kolloidális Au részecskék (111) és (200) Miller-indexű rácssíkjai [JCPDS 4-784] azonosíthatók (**14.C ábra**). Az (111) indexjelű rácssíkhöz rendelhető reflexióból a 11. egyenlet segítségével számított primer részecskeméret $1,7 \text{ nm}$ -nek adódott. Látható, hogy ez sokkal kisebb, mint a HRTEM és a DLS mérésekből meghatározott átmérők, melynek oka feltehetőleg az, hogy az elektronmikroszkópos képeken illetve a fényszórás mérések során azonosítható nanorészecskék primer részecskéből felépülő aggregátumok.

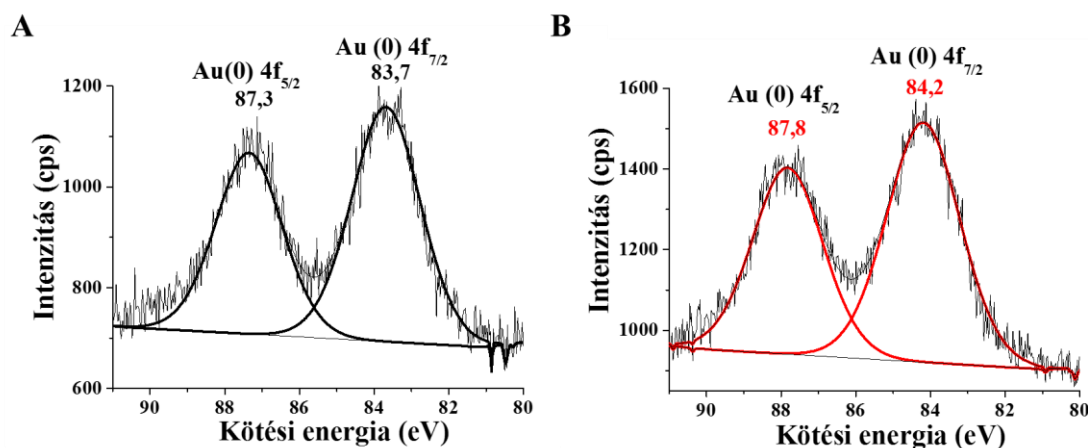
Megvizsgálva a nagyobb fehérje felesleg mellett készített mintákat megállapítottuk, hogy az átlagos méretek $d_{\text{HRTEM}} = 1,5 \pm 0,3 \text{ nm}$ -nek (**14.B ábra**), míg a $d_{\text{DLS}} = 5,0 \pm 1,4 \text{ nm}$ -nek adódtak. A röntgendiffraktogramot összevetve a LYZ-Au NPs diffraktogramjával megfigyelhető, hogy a nagyobb fehérjefelesleg alkalmazása mellett már nem jelennek meg az Au NPs-re jellemző karakterisztikus reflexiók, mivel feltehetőleg a primer kristallit mérete annyira lecsökken, hogy az XRD mérés technika kimutatási határa ($\sim 1 \text{ nm}$) miatt azok már nem azonosíthatóak (**14.C ábra**).



14. ábra: A LYZ:Au/5:1 (A) és a LYZ:Au/20:1 (B) tömegarány esetén előállított Au NPs és Au NCs reprezentatív HRTEM felvételei a vizes diszperziók UV-lámpa alatti (alsó) és nappali fényben (felső) készített fényképeikkel. (C) A LYZ-stabilizált Au NPs és NCs diffraktogramja 36–45 2θ értékek között.

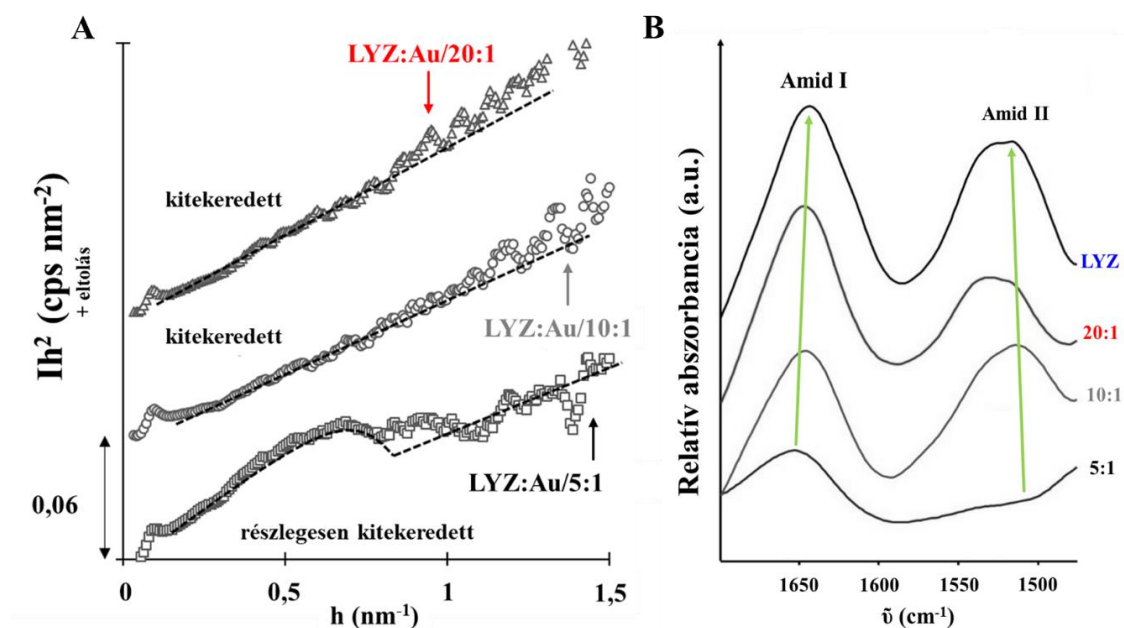
A kapott HRTEM, DLS és XRD vizsgálatok eredményeit összevetve a diszperziók optikai tulajdonságaival sikeresen igazoltuk, hogy a LYZ:Au/20:1 tömegarány beállítása mellett valóban szub-nanométeres, fehérje-stabilizált, fluoreszcens LYZ-Au NCs keletkeznek.

Megvizsgálva az Au oxidációs állapotát mind a részecskék, mind pedig a klaszterek esetében látható, hogy döntően 0 oxidációs állapotban található az arany [99], mely szintén alátámasztja a fenti kijelentéseinket. Ezen túlmenően méréseink sikeresen igazolják azon szakirodalmi feltevéseket, amely szerint a részecskeméret csökkenésével az aranyra jellemző kötési energiák a nagyobb értékek felé tolódnak el [100]. A **15. ábrán** látható, hogy a LYZ-Au NPs (**15.A ábra**) esetén a kötési energiák $4f_{7/2} = 83,7$ eV és $4f_{5/2} = 87,3$ eV értékeknek adódtak, de a részecske méretének drasztikus csökkenésével, elérve a klaszterekre jellemző szub-nanométeres mérettartományt, a kötési energiák $4f_{7/2} = 84,2$ eV és a $4f_{5/2} = 87,8$ eV értéknél mérhetők (**15.B ábra**).



15. ábra: A (A) LYZ-Au NPs és (B) a LYZ-Au NCs XPS spektrumai.

A részecskék és klaszterek képződésének eredményeképpen a LYZ fehérje szerkezetében esetlegesen bekövetkező konformáció-változások követésére SAXS és FT-IR méréseket végeztünk. A SAXS mérések során rögzített szórásgörbék Kratky-reprezentációját elemeztük részletesebben, amelynél a szórás intenzitásából (I) számított Ih^2 értékeket ábrázoltuk a szórási vektor (h) függvényében. A **16.A ábrán** látható Kratky-reprezentáció alapján megállapítható, hogy a részecskék felületén a LYZ részlegesen kitekeredett formában van jelen. A fehérje, tömegarányának növelésével, egyre inkább elveszíti a natív szerkezetre jellemző rendezettebb struktúráját, ami a fémmagoknak a fehérje láncok közé történő beékelődésével magyarázható. A SAXS mérésekből levonható következtetéseket támasztják alá a FT-IR spektrumokon az Amid I és Amid II sávok helyzete, amelyek a peptidkötésben részvevő szénatom karboxilcsoportjához ($-C=O$) és szintén a kötésben részvevő nitrogén tartalmú ($-C-N$, ill. $-N-H$) csoportok vegyértékrezgéseikhez rendelhetők [101]. Ezen karakterisztikus sávok helyzetéből a fehérjében jelenlévő domináns másodlagos szerkezeti elemek (Amid I) jelenlétén túl az egész fehérje szerkezetének tömörségéről (Amid II) is információt nyerhetünk (**16.B ábra**). A tiszta LYZ-ban az Amid I sáv 1644 cm^{-1} és az Amid II sáv pedig 1512 cm^{-1} hullámszámnál jelentkezik, ami alapján a fehérjében egy tömörebb, a β -redős szerkezet feltételezhető. Ezzel szemben a klasztereket vagy részecskéket tartalmazó minták spektrumain az Amid I és az Amid II sáv pozíciója a fehérje szerkezetének rendezetlenné válására, kompaktságának megszűnésére utal az aurácionok redukcióját követően beékelődő fémmagok méretének növekedésével.



16. ábra: Különböző LYZ:Au tömegarányok beállítása mellett készített rendszerek (A) SAXS méréseinek Kratky-reprezentációja és (B) FT-IR spektrumainak részlete 1700–1450 cm^{-1} tartományon.

A minták rediszpergálhatóságának mértékét, ezáltal az egyes rendszerek stabilitását is tanulmányoztuk, melynek érdekében a LYZ-Au NPs és LYZ-Au NCs mintákban a részecskék és klaszterek méretét és ξ -potenciál értékeit liofilizálás előtt és után is ellenőriztük.

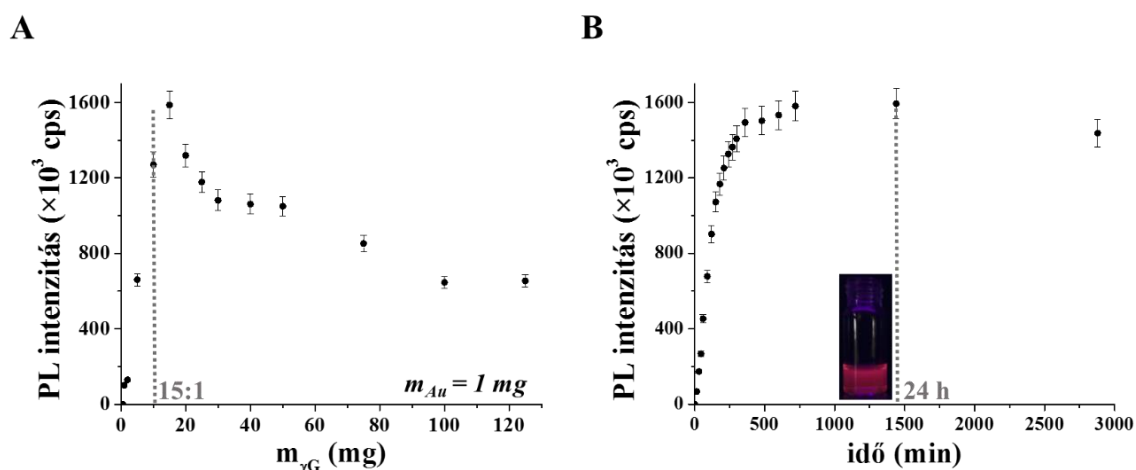


17. ábra: A LYZ-Au NPs és LYZ-Au NCs frissen készített és rediszpergált szoljainak, valamint liofilizált pormintáinak fényképei nappali fényben és UV-lámpa alatt.

A mérések igazolták, hogy a vizes minták 3–5 hétig eltarthatók a szintézis követően, de liofilizált por formájában akár 1 évvel később is stabil diszperzió készíthető belőlük (17. ábra), ugyanis sem a részecskék/klaszterek mérete, sem a stabilitásra utaló elektrokinetikai potenciál (ξ -potenciál) értéke nem változott mérhetően a liofilizálást és a rediszpergálást követően.

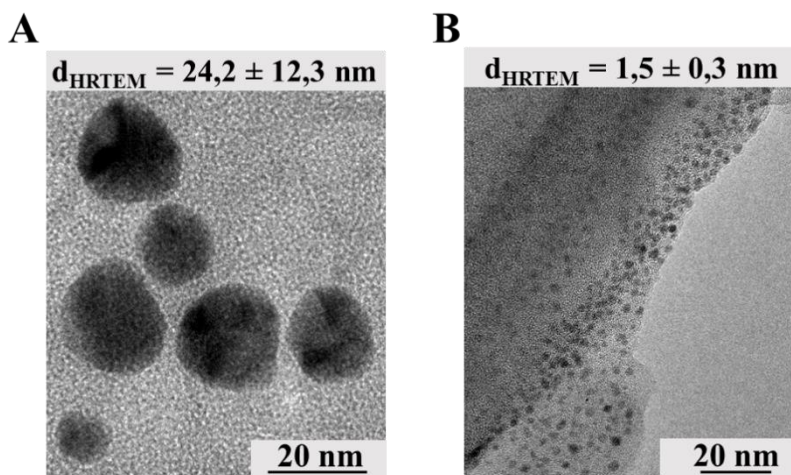
5.1.2. γ -globulin-Au rendszerek

A γ G lehetséges redukáló- és stabilizálószeként történő alkalmazásának vizsgálata során, akárcsak a LYZ fehérjénél, a méretszabályozott szintézist a fehérje aurationokhoz képesti tömegarányának változtatása révén valósítottuk meg. Első lépésben a szintézis azon optimális paramétereinek megtalálása volt a cél, ahol stabil, jól definiált optikai sajátossággal rendelkező nano-objektumokat állíthatók elő. A megfelelő γ G: Au tömegarány megállapításához a szintéziseket a 4.2.2. fejezetben összefoglalt kísérleti körülmények rögzítése mellett számos tömegarány beállítása esetén elvégeztük (γ G: Au/1:1 értéktől 125:1 értékig). Megfigyeltük, hogy már γ G: Au/1:1 tömegarány alkalmazása is stabil, vörös színű arany kolloidok képződését eredményezi, melyet a vizes diszperzió abszorbancia spektrumában megjelenő plazmon módus is alátámaszt ($\lambda_{\max} = 525$ nm). A fehérje feleslegét fokozatosan növelve, a γ G: Au/2:1 aránytól az UV-Vis spektrumokon az Au kolloidokra jellemző plazmon módus [102] nem figyelhető meg, de ahogyan a LYZ esetén is, a fluoreszcencia spektrumon ~ 645 nm környékén 350 nm-es gerjesztési hullámhossz alkalmazása mellett egy új sáv fokozatos megjelenése detektálható. A vörös emisszióval rendelkező termék fluoreszcencia intenzitása növekvő tendenciát mutat egészen a γ G: Au/15:1 arányig, de a reaktánsok tömegarányának további növelésével már fokozatosan csökkenő intenzitás figyelhető meg (18.A ábra). Ennek okán a további vizsgálatokhoz a γ G: Au/15:1 tömegarány beállítása mellett szintetizáltuk. Az ideális szintézisidő meghatározásához megvizsgáltuk azt az időtartamot, ahol az emissziós csúcs maximális intenzitást mutat 37 °C hőmérsékletű termosztálás mellett (18.B ábra).



18. ábra: (A) A mért fluoreszcencia intenzitások a γ G mennyiségének függvényében. (B) A γ G/Au 15:1 tömegarány mellett készült klaszterek PL intenzitása a szintézis idejének függvényében a minta UV-lámpa alatt készült fényképével. ($m_{Au} = 1$ mg, $t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm).

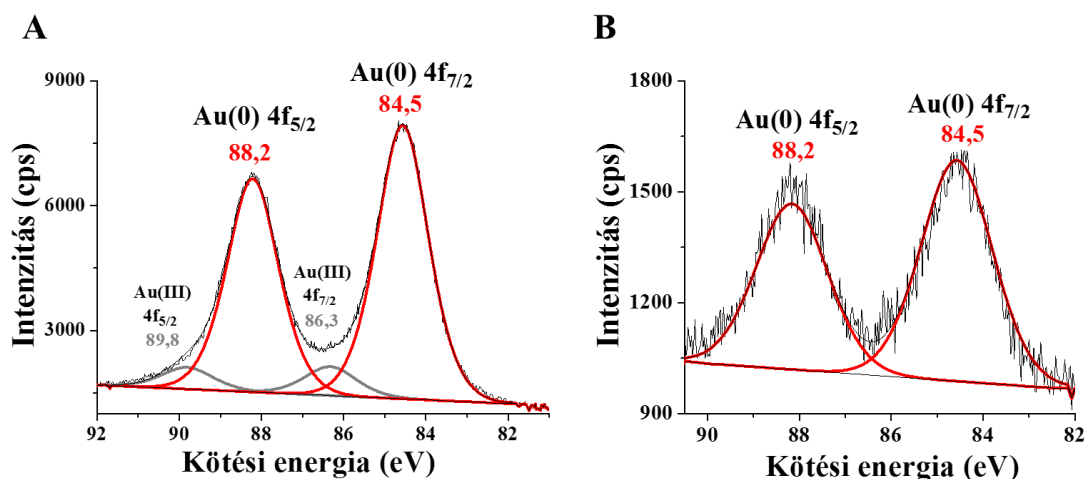
Az előállított γ G-stabilizált nemesfém részecskék és nanoklaszterek méretét és azok méreteloszlását elektronmikroszkópos felvételek (**19. ábra**) és DLS mérések alapján határoztuk meg. A keletkezett NPs átlagos mérete $d_{\text{HRTEM}} = 24,2 \pm 12,3$ nm és $d_{\text{DLS}} = 26,9 \pm 13,0$ nm-nek adódott. A fluoreszcens klaszterek átlagos átmérőjére a rögzített HRTEM képek alapján pedig $d_{\text{HRTEM}} = 1,5 \pm 0,3$ nm adható meg. Az elektronmikroszkópos képeken a kisméretű részecskék közel monodiszperz eloszlást mutatnak. Ezzel szemben hidrodinamikai átmérőre, szintén monodiszperz eloszlás mellett ($\text{PDI} = 0,124$), a HRTEM képekből meghatározott értéknél kb. háromszor nagyobb, átlagosan $d_{\text{DLS}} = 4,4 \pm 1,2$ nm határozható meg, ami feltehetően a klasztereket beborító kiterjedt fehérje héjnak tulajdonítható. A fluoreszcens nano-objektumok optikai sajátságai, morfológiája és mérete alapján a szub-nanométeres γ G-Au NCs kialakulása valószínűsíthető, melyet a mért kvantumhasznosítás $\text{QY} = 4,4\%$ és élettartam ($\tau = 1,2 \mu\text{s}$) értékek is alátámasztanak [103].



19. ábra: (A) A γ G-Au NPs és (B) a γ G-Au NCs reprezentatív HRTEM képei a felvételekből megállapított átlagos átmérő adatokkal.

A biokompatibilis úton előállított vizes közegű kolloid rendszerek lehetséges fluoreszcens jelzőanyagként vagy bioszenzorként történő felhasználásaik előtt kiemelten fontos a minták tisztítása, hiszen a későbbi méréseket nagyban befolyásolhatja a redukációs folyamatból esetlegesen visszamaradt, elreagálatlan prekursor fémsó és elektrolit ionok jelenléte. A tisztítást minden szintézist követően 24 óráig tartó dialízissel végeztük. Korábban a LYZ-Au rendszerek esetén ismertetett szakirodalmi adatok alapján, klaszterek esetén a $4f_{7/2}$ kötési energia a tömbfázisú Au^0 $4f_{7/2}$ kötési energiájához viszonyítva magasabb energiáknál jelentkezik. Felvettük egy, a szintézis után nem dializált klasztereket tartalmazó minta XPS spektrumát is (**20.A ábra**), melyben a $4f$ kötési energiákhoz tartozó karakterisztikus csúcsok felbontása után látható, hogy a minta még kis mennyiségben

tartalmazott redukálatlan arany(III)ionokat ($\text{Au(III)} 4f_{5/2} = 89,8 \text{ eV}$ és $\text{Au(III)} 4f_{7/2} = 86,3 \text{ eV}$). A tisztított minta esetén rögzített XPS spektrumok alapján a kötési energiák $4f_{7/2}$ értéke $84,5 \text{ eV}$ -nak, míg a $4f_{5/2}$ értéke $88,2 \text{ eV}$ -nak adódott (**20.B ábra**), mely alátámasztja, hogy a kialakuló fémmagokban az Au döntően 0 oxidációs állapotban található [99]. A dialízis után felvett XPS spektrum igazolta, hogy a dialízises tisztítási lépés sikeresen eltávolítja az elredukálatlan fémionok maradékát, mivel eltűnnek a szóban forgó Au(III) -ionokra jellemző csúcsok a spektrumból. A későbbi felhasználások során a mintában lévő aranytartalom megadásakor a dialízissel eltávolított mennyiséggel (*kb.* 3%) minden esetben korrigáltunk.

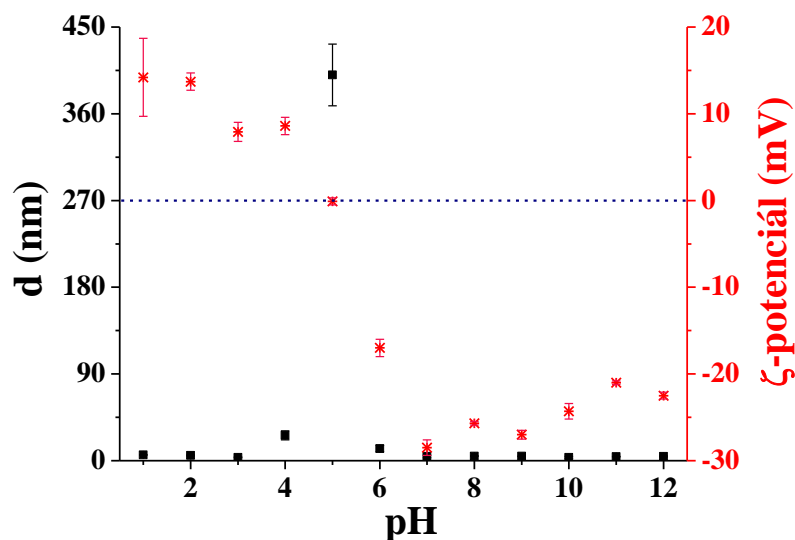


20. ábra: A $\gamma\text{G-Au NCs}$ XPS spektruma dialízis (A) előtt és (B) után.

A klaszterképződés hatására, a fehérje másodlagos szerkezetében bekövetkező változásokat FT-IR és CD spektroszkópiás mérésekkel követtük nyomon. Az FT-IR spektrumokon a LYZ-Au rendszerekhez hasonlóan, az Amid I és Amid II sávok helyzetét tanulmányoztuk. A meghatározott csúcsok intenzitása rendre γG : 1633 cm^{-1} és $\gamma\text{G-Au NCs}$: 1630 cm^{-1} hullámszámoknál jelentkeztek, míg az Amid II sávok a γG : 1531 cm^{-1} és $\gamma\text{G-Au NCs}$: 1562 cm^{-1} értékeknél mutattak maximális abszorbananciát. A sávok helyzetéből meghatároztuk, hogy az immunofehérje fiziológiás körülmények között főleg β -redőket tartalmaz, melyeket a klaszter képződés során beékelődő arany magok nyújtott β -láncokká és β -fordulatokká feszítenek ki [101]. Ezen eredményeket a CD spektroszkópiás mérések is igazolták. A spektrumok Reed-modell szerinti kiértékelése alapján a fémionok redukciója előtt a fehérje $\sim 48 \%$ -os β -redő tartalma *kb.* 20% -kal csökken a redukció bekövetkezte után kialakult szerkezetben. Ezzel egyidejűleg megnő a β -kanyarok és a rendezetlen szerkezet aránya. Az FT-IR és CD spektrumok a *Melléklet 56. ábráján* láthatók.

A biokompatibilis felhasználási módokat szem előtt tartva megvizsgáltuk a NCs vizes diszperziójának kinetikai stabilitását $\text{pH} = 1,0\text{--}12,0$ tartományon mind UV-látható

spektrofotometriával és fluorimetriával, mind pedig DLS és ζ -potenciál mérésekkel (**21. ábra**). Az eredmények rámutattak arra, hogy a γ G-Au NCs fiziológiás pH-tartományon nagyfokú kinetikai stabilitással rendelkeznek, hiszen sem optikai tulajdonságaikban, sem pedig méretükben nem következik be mérhető változás.

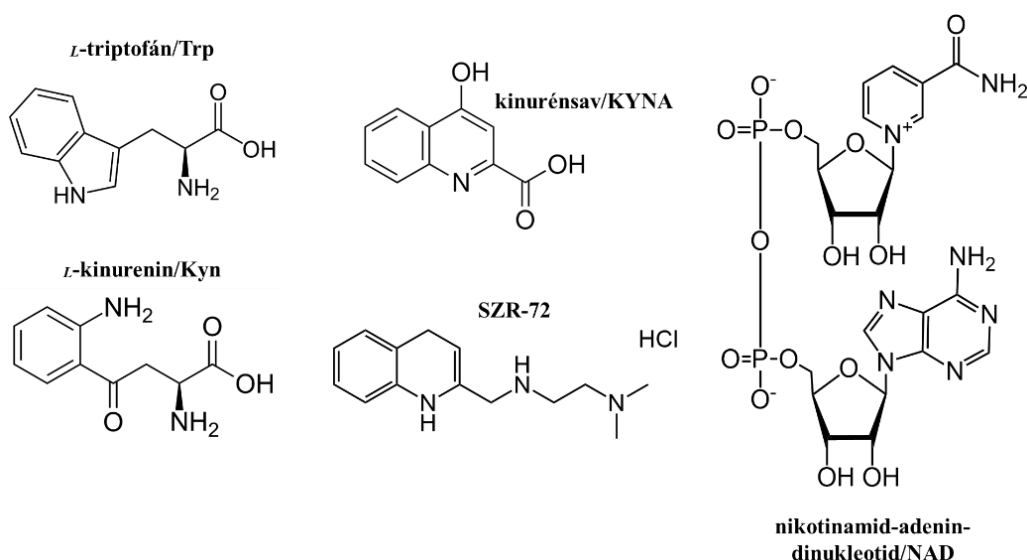


21. ábra: A γ G-Au NCs hidrodinamikai átmérője (fekete) és ζ -potenciál (piros) értékei a pH függvényében.

Ezen stabilitást támasztja alá a mért elektrokinetika potenciál értéke is, amely a pH = 7–8 tartományon kb. -27 mV körüli értéknek adódott [104]. Megfigyelhető továbbá, hogy pH ~ 5 értéknél a NCs átlagos hidrodinamikai átmérője jelentősen megnő (~ 400 nm), míg a ζ -potenciál ~ 0 mV körüli értéket vesz fel. Ezen értékek feltehetően a klaszterek aggregációjára utalnak. Az aggregálódás oka abban keresendő, hogy a pH ~ 5 érték felel meg a γ -globulin legnagyobb hányadát alkotó immunglobulin G-re (IgG) jellemző izoelektromos pontnak (pI = 4,6–6,5). Az IgG izolabilis fehérje, így izoelektromos pontja körüli pH értéken kicsapódik [105]. Az optikai mérések eredményeinek bemutatásától eltekintettünk, mivel csak a pH ~ 5 minta esetén észlelhető változás (alapvonal emelkedés) a klaszterek spektrumain, ami szintén az aggregálódásnak köszönhető. Megvizsgálva a klaszterek NaCl sótűrését azt tapasztaltuk, hogy a nagy jelentőséggel bíró fiziológiás sókoncentráció alkalmazása mellett nincs észlelhető változás sem méretükben, sem pedig fluoreszcenciájukban. Ezek alapján tehát elmondható, hogy a klaszterek nagyfokú kinetikai stabilitást mutatnak fiziológiás körülmények között, így felhasználhatók lehetnek akár biológiai rendszerekben is.

5.1.3. γ G-Au NCs, mint potenciális L-kinurenin bioszenzor

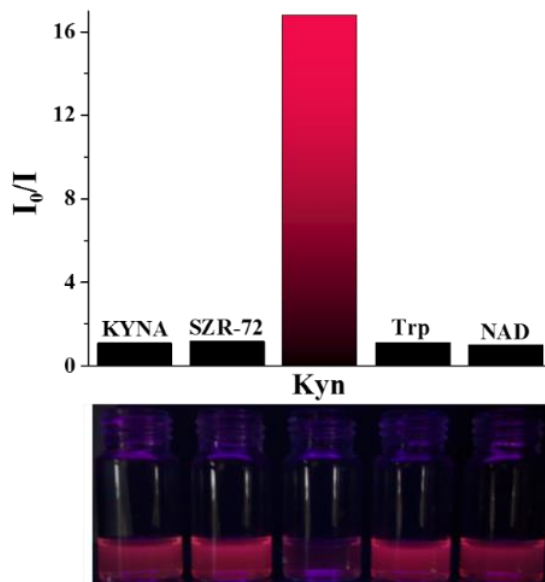
A γ G-Au nanoklaszterek szenzorikai alkalmazását az 4.3.1. fejezetben ismertetett fluoreszcencia kioltása teszi lehetővé. Az SZTE ÁOK Neurológiai Klinika intézetvezető egyetemi tanára, Prof. Dr. Vécsei László vezette MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoporttal való együttműködés keretein belül felmerült egy olyan biokompatibilis szenzor kifejlesztésére való igény, mely alkalmas lehet a kinurenin útvonal egyes metabolitjainak sejtközi térben való érzékelésére. A metabolikus útvonal egyes köztiterméki koncentrációjának a normál értékektől való kismértékű növekedése is közvetett kiváltó oka lehet daganatos megbetegedéseknek. Mindezen felül, neurotoxikus hatásai által számos neurodegeneratív rendellenesség kialakulását is elindíthatja (pl. Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór) [106]. A metabolikus útvonal kezdő (Trp) és végtermékei (KYNA, NAD) mellett egy köztitermék (Kyn), illetve egy szintetikus kinurénsav analóg (SZR-72) került vizsgálatra, melyek szerkezeti képleteit a **22. ábra** foglalja össze.



22. ábra: A szenzorikai vizsgálatokhoz használt molekulák szerkezeti képletei.

A szenzorikai vizsgálatokhoz a tisztított γ G-Au nanoklasztereket tartalmazó vizes közegű diszperziót 20-szoros hígításban használtuk, vagyis $c_{Au} = 50 \mu M$ koncentrációban jelen levő klaszterek fluoreszcencia intenzitásának változását mértük a vizsgálatok során. A méréseket minden esetben úgy végeztük el, hogy az azonos térfogatú és koncentrációjú klasztereket tartalmazó diszperzió fluoreszcencia spektrumát rögzítettük a szerves kismolekulák hozzáadása után. Referenciaként mindig a megfelelő hígításban felvett, tiszta γ G-Au NCs diszperzió emissziós spektruma szolgált, melyből a **3. egyenlet** alapján határoztuk meg a Stern-Volmer ábrázoláshoz szükséges I_0/I értékeket. Előzetes vizsgálatként az 5 tanulmányozott molekulát $c_{molekula} = 1 \text{ mM}$ koncentrációban adtuk a

klaszterekhez. Azt tapasztaltuk, hogy kizárólag a kinurenin útvonal első metabolikus lépéseként a Trp-ból képződő Kyn hatására történt mérhető változás (kioltás) a klaszterek fluoreszcenciájában, melyet a **23. ábra** szemléltet.



23. ábra: A γ G-Au NCs relatív fluoreszcenciája az 1,0 mM koncentrációjú analitok hozzáadása után a minták UV-lámpa alatt készített fényképeivel.

A kinurenin útvonal metabolitjainak optikai jelenségeken alapuló nyomon követésére elenyésző számú publikációt találhatunk a szakirodalomban. A Kyn detektálását például J. Klockow és T. E. Glass egy kumarin-aldehid vázas kemoszennzorral valósította meg, amelynek fluoreszcenciáját erősíti a kinurenin („turn-on” szenzor), viszont csak extrém savas (pH ~ 1) körülmények között használható [107]. T. Kaper és *mtsai*. a Trp által okozott fluoreszcencia kioltáson alapuló detektálást valósítottak meg egy fluoreszcens fehérjét tartalmazó fúziós-fehérje nanoszennzorral, amely előállításához költséges és komplikált génsebészeti folyamatok szükségesek [108]. Ez a meghatározási módszer azonban a génsebészeti eljárásnak köszönhetően egy viszonylag összetett és rendkívül költséges módszernek tekinthető. A γ G-Au NCs nagyfokú Kyn szelektivitása miatt viszont költségghatékony alternatívát nyújthat, mint a kinurenin útvonal első metabolikus lépésének egy potenciális szenzora.

Az előzetes szenzorikai vizsgálatok után a Kyn esetén célunk volt részletesen feltérképezni néhány fontos paramétert, hiszen a klaszterek szelektív bioszenzorként való hasznosításához elengedhetetlen a Kyn legkisebb kimutatható mennyiségének (limit of detection, LOD), majd ezt követően azon dinamikus tartománynak a meghatározása, ahol a

detektálható jel (a kioltás mértéke) lineárisan változik az analit koncentrációjának függvényében. A Kyn LOD értékét elsődlegesen a széles körben alkalmazott mérési módszerrel határoztuk meg. Ez esetben azt vizsgáltuk, hogy az egyértelmű megváltozás a nanoklaszterek fluoreszcencia intenzitásában milyen koncentrációban jelen levő kioltó hatására lesz detektálható. Ez a szakirodalomban meghatározottak szerint a kioltó azon mennyiségét jelöli, ahol a jel/zaj arány magasabb, mint 3 [109]. A Kyn-t 1 nM–1 mM koncentráció-tartományban vizsgálva ez az érték 1,0 μ M-nak adódott.

A precízebb szenzorikai kiértékeléshez azonban a H. P. Loock és P. D. Wentzell által alkalmazott számítási módszert használtuk a **12. egyenlet** alapján, mely rangos nemzetközi folyóiratokban gyakorta hivatkozott LOD meghatározási eljárás [110].

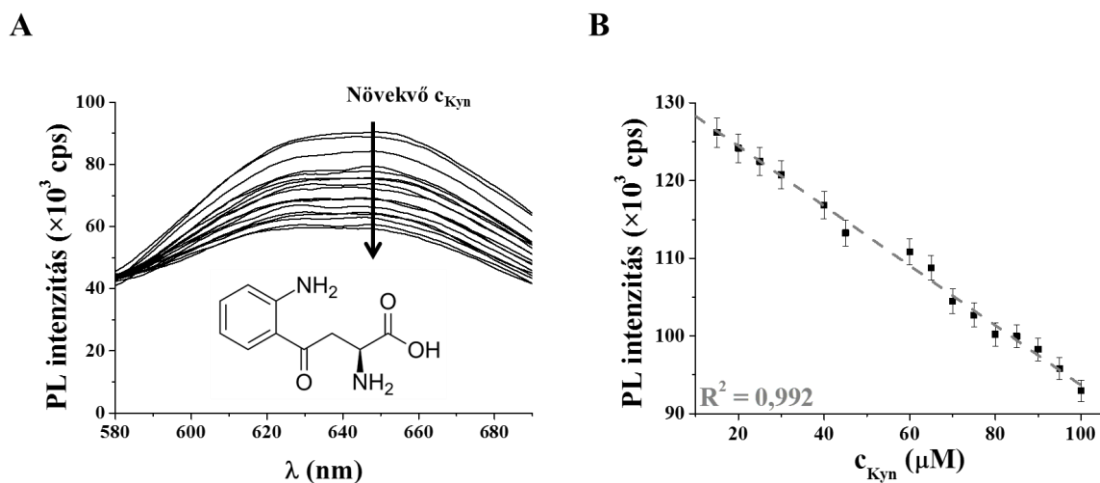
$$x_{LOD} = 2x_c = \left(\frac{2ts_y}{nt^2s_y^2 - Dr^2} \right) \left(ts_y \sum x_i - \sqrt{\frac{D^2r^2}{k} + Dr^2 \sum x_i^2 - n \frac{D}{k} t^2 s_y^2 - Dt^2 s_y^2} \right) \quad (12.)$$

ahol s_y a mért jel bizonytalansága x_i koncentráció esetén, x_c a bizonytalanságnál nagyobb koncentráció, t az egypróbás t-függvény, n a mérési pontok száma, D a determináns, r az érzékenység, k a párhuzamos mérések száma. A számolás alapja az $I_0/I - c_{Kyn}$ függvény lineáris szakaszára meghatározott kalibrációs egyenes pontjai, melyeknek az illesztett lineáristól való eltéréséből számítható a LOD értéke. Az így kapott kimutatási határ 15 μ M-nak adódott; a további szenzorikai méréseknél így ezt az értéket vettük figyelembe.

A dinamikus tartomány meghatározásához a különböző koncentrációban jelen levő Kyn hatására megváltozó fluoreszcencia intenzitás maximumokat ábrázoltuk a Kyn koncentráció függvényében; az eredményeket a **24. ábra** mutatja. A mérési adatok alapján a 15–100 μ M koncentráció tartományon bizonyult lineárisnak a kapcsolat a fluoreszcencia kioltás és a kioltó koncentrációja között.

Az analitikai paraméterek meghatározásán túl kísérletet tettünk a kioltási folyamat termodinamikai paramétereinek és így feltételezett mechanizmusának felderítésére is. A lineáris tartományon ezek meghatározása érdekében a kioltási vizsgálatokat 4 különböző hőmérsékleteken (298, 303, 308 és 313 K) is elvégeztük. Az adatok értelmezéséhez a 4.3.1. fejezetben ismertetett **3. egyenlet** szerinti Stern-Volmer ábrázolás alapján a kioltó koncentrációjának függvényében ábrázoltuk a mérésekből származó I_0/I értékeket. A 298 K hőmérsékleten mért adatok **24.A ábrán** látható lineáris illeszkedése azt bizonyítja, hogy a kioltási folyamat ezen a koncentráció-tartományon nem kombinált, vagyis tisztán csak sztatikus vagy dinamikus lehet [111]. A további három (303, 308 és 313 K) hőmérsékleten

kivitelezett mérések eredményeiből készített Stern-Volmer ábrázolások a *Melléklet 57. ábráján* láthatók.



24. ábra: (A) A γ G-Au NCs fluoreszcencia spektrumainak részlete 580–690 nm hullámhossz tartományban a növekvő Kyn koncentráció mellett ($t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm). (B) A $\lambda_{\text{em}} = 645$ nm-nél leolvasott emissziós csúcsok intenzitás értékei a Kyn koncentráció függvényében a dinamikus tartományon ($R^2 = 0,992$).

Az illesztésekből meghatározott Stern-Volmer állandók ismeretében megállapítottuk, hogy a hőmérséklet emelésével K_{SV} értéke is nőtt, tehát a kioltás tisztán dinamikus a vizsgált tartományon. A dinamikus kioltás további igazolása érdekében a vizsgálatokat közel azonos méretű és hasonló szerkezeti és optikai tulajdonságokat mutató BSA-Au NCs és LYZ-Au NCs felhasználásával is elvégeztük. A mérési eredmények ezen rendszerek esetén is igazolták az ütközéses folyamaton keresztül történő kioltást, mivel mindkét rendszernél, a stabilizáló fehérjétől függetlenül, megtörténik a kioltás, tehát a kölcsönhatás arany specifikus. A kontroll minták esetén a kimutatási határ azonban magasabb értéknek (30–40 μM) adódott, így ezek részletesebb vizsgálatától eltekintettünk. A dinamikus kioltást alátámasztandóan megvizsgáltuk a Kyn γ G-hoz történő lehetséges kötődésének mértékét ITC mérések segítségével, azonban a rögzített entalpogramok nem mutattak mérhető hőeffektust a háttérjel kivonása után, amely szintén a kioltási folyamat arany-specifikusságára enged következtetni.

A K_{SV} kioltási állandó és a klaszterek előzetesen meghatározott fluoreszcencia élettartamának ismeretében ($\tau = 1,2$ μs) egy adott hőmérsékleten az **5. egyenlet** alapján meghatározható a kioltásra jellemző k_q bimolekuláris kioltási sebességi együttható értéke, amely felhasználásával további információkhoz juthatunk a fluorofór és a kioltó között lejátszódó reakcióra vonatkozóan. Ennek értelmezéséhez szükséges az adott reakcióra

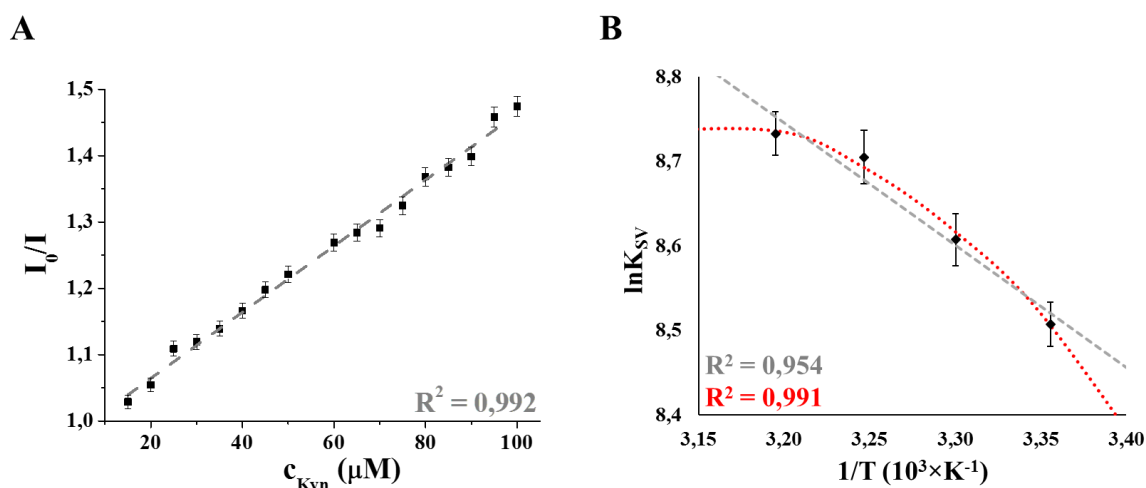
számítható k_0 diffúzió-kontrollált sebességi együtthatót ismerete is, amelyet a Smoluchowski egyenlet (**13. egyenlet**) alapján határoztuk meg:

$$k_0 = \frac{4\pi N}{1000} (r_f + r_q)(D_f + D_q) \quad (13.)$$

ahol N az Avogadro-féle szám, r_f a fluorofór, míg r_q a kioltó sugarának értéke, D_f a fluorofór és D_q a kioltó diffúziós együtthatója. A diffúziós állandók értékét a Stokes-Einstein egyenlet (**14. egyenlet**) alapján számítottuk:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (14.)$$

ahol k a Boltzmann-állandó, η az oldószer (esetünkben víz) dinamikus viszkozitása T abszolút hőmérsékleten, r az adott molekula vagy részecske sugarának értéke. A k_0 sebességi együttható tehát azon esetben érvényesülne, ha a kioltási folyamat sebességét tisztán csak a reaktánsok diffúziója kontrollálná.



25. ábra: (A) A 298 K hőmérsékleten elvégzett szenzorikai mérés Stern-Volmer ábrázolása a $c_{Kyn} = 15\text{--}100 \mu M$ dinamikus koncentrációtartományon ($R^2 = 0,992$). (B) A van't Hoff ábrázolás lineáris (**szürke**, $R^2 = 0,954$) és nemlineáris (**piros**, $R^2 = 0,991$) illesztéssel.

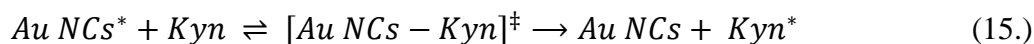
Mivel a nanoklaszterek átlagos hidrodinamikai átmérője a DLS mérések szerint $\sim 4,4$ nm, ebből adódóan az átlagos $r_f = 2,2$ nm; a kinurenin esetében a PubChem (Open Chemistry Database, CID 161166) adatbázis alapján az $r_q = 0,58$ nm. A szenzorikai mérésekből meghatározott paraméterek és a hozzájuk kapcsolódó számítások eredményei az **1. táblázatban** láthatók.

1. táblázat: A T mérési hőmérsékleten meghatározott K_{SV} értékek az illesztés jósági tényezőjével (R^2), a K_{SV} alapján meghatározott k_q , a kalkulált k_0 , a γ G-Au NCs (D_{NCs}) és a Kyn (D_{Kyn}) diffúziós együtthatóinak értékei.

T [K]	K_{SV} [M ⁻¹]	R^2	k_q [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_0 [M ⁻¹ s ⁻¹]	D_{NCs} [cm ² s ⁻¹]	D_{Kyn} [cm ² s ⁻¹]
298	4950 ± 130	0,992	4,13×10 ⁹ ± 1,08×10 ⁸	1,12×10 ¹⁰	1,11×10 ⁻⁶	4,22×10 ⁻⁶
303	5470 ± 170	0,988	4,56×10 ⁹ ± 1,42×10 ⁸	1,27×10 ¹⁰	1,26×10 ⁻⁶	4,79×10 ⁻⁶
308	6070 ± 140	0,992	5,06×10 ⁹ ± 1,17×10 ⁸	1,42×10 ¹⁰	1,41×10 ⁻⁶	5,33×10 ⁻⁶
313	6220 ± 160	0,991	5,18×10 ⁹ ± 1,33×10 ⁸	1,61×10 ¹⁰	1,60×10 ⁻⁶	6,04×10 ⁻⁶

A k_q és k_0 értékeiből, illetve egymáshoz viszonyított arányukból a kioltás mechanizmusáról nyerhetünk bővebb információt. A kioltás diffúzió-vezérelt, ha a k_q értéke $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nagyságrendű [112]. A diffúzió-vezérelt kioltásra jellemző k_q értéktől nagyobb értékek bizonyos fokú asszociációs folyamatokra utalnak, míg a kisebb szám adatok a sztérikusan gátolt, azaz nehezebben hozzáférhető fluorofórokra jellemzőek. A γ G-Au NCs/Kyn kioltási folyamatra meghatározott k_q nagyságrendileg megközelíti ugyan a tisztán diffúzió-kontrollált folyamatok sebességi együtthatójának értéket, azonban minden mérési hőmérsékleten alatta marad ($k_q < k_0$), mely feltehetőleg a klasztermagokat körül ölelő fehérjeburoknak tulajdonítható.

A fenti eredményeket figyelembe véve K_{SV} értéke így a 4.3.1. fejezetben ismertetett általános séma szerint (15. egyenlet) az alábbi mechanizmussal felírható összetett folyamatot együttesen jellemezi:



ahol minden részlépés saját, egyedi sebességi együtthatóval rendelkezik. Ezen részlépések

- az aktivált komplex ($[Au\ NCs - Kyn]^\ddagger$) kialakulása az ütközés következtében (k_1)
- az aktivált komplex szétesése alapállapotú klaszterre (Au NCs) és gerjesztett kinureninné (Kyn^*) az energiaátadást követően (k_2)
- vagy a nem megfelelő molekuláris orientáció miatti nem-reaktív szétesés (k'_1).

A fent említett részfolyamatok ismeretében K_{SV} értéke az 7. egyenletben definiáltak szerint egyensúlyi állandóként kezelhető, melyből a kioltási folyamatra jellemző termodinamikai potenciálfüggvények meghatározhatók a 8. és 9. egyenletek alapján. A kioltási folyamatot kísérő standard entalpia- és entrópiaváltozás értékét az integrált van't Hoff egyenlettel

határoztuk meg nemlineáris paraméterbecslést alkalmazva $R^2 = 0,991$ illesztési jósággal (**25.B ábra**), majd ezen értékek ismeretében kiszámítottuk a szabadentalpia-változást is a vizsgált hőmérsékleteken (**2. táblázat**).

2. táblázat: A T mérési hőmérsékleten meghatározott K_{SV} értékek az illesztés jósági tényezőjével (R^2) és a számított termodinamikai paraméterek értékével a γ G-Au NCs/Kyn rendszerre vonatkozóan.

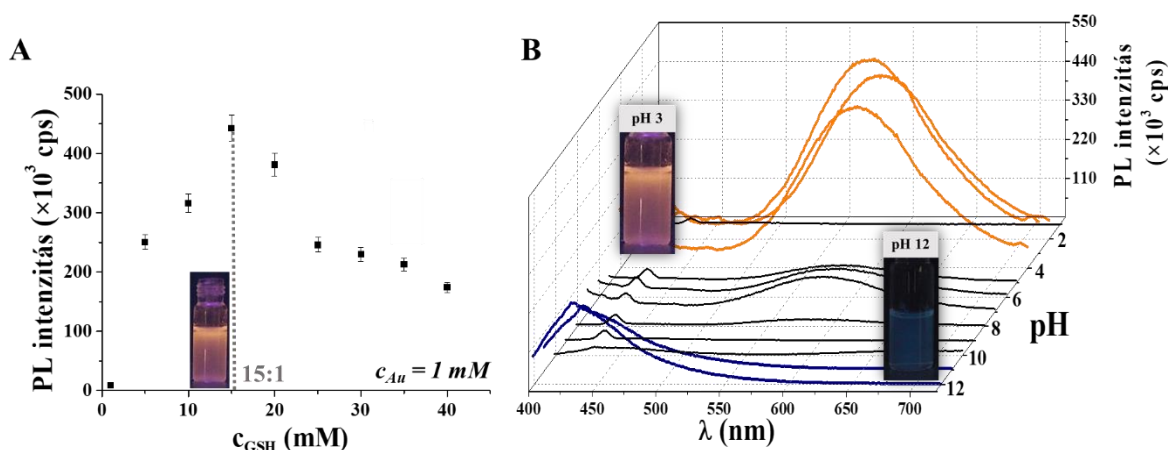
T [K]	K_{SV} [M ⁻¹]	R^2	ΔH° [kJ mol ⁻¹]	ΔS° [kJ mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG [kJ mol ⁻¹]
298	4950 ± 130	0,992	14,16 ± 3,15	0,12 ± 0,01	-21,11
303	5470 ± 170	0,988			-21,71
308	6070 ± 140	0,992			-22,30
313	6220 ± 160	0,991			-22,89

A nemlineáris paraméterbecslés alapján a standard entalpiaváltozás értéke (ΔH°) $14,16 \pm 3,15$ kJ mol⁻¹, míg a standard entrópiaváltozás (ΔS°) $0,12 \pm 0,01$ kJ mol⁻¹ K⁻¹ értéknek adódott. Mivel ΔG minden esetben negatív (*kb.* -22 kJ mol⁻¹), így megállapítható, hogy a kioltás termodinamikailag kedvezményezett. A ΔH° pozitív értékéből arra következtethetünk, hogy a kioltás endoterm, mely és a reaktánsok közötti töltésátviteli folyamat révén valósulhat meg [80]. Mivel az entrópia-tag abszolút értéke minden mérési hőmérsékleten nagyobb az entalpia-tag abszolút értékénél ($|\Delta H^\circ| < |T\Delta S^\circ|$) a kioltás entrópia-vezérelt folyamatnak tekinthető [113].

5.2. Az AuCl_4^- -ionok kölcsönhatása tioltartalmú kismolekulákkal vizes közegben

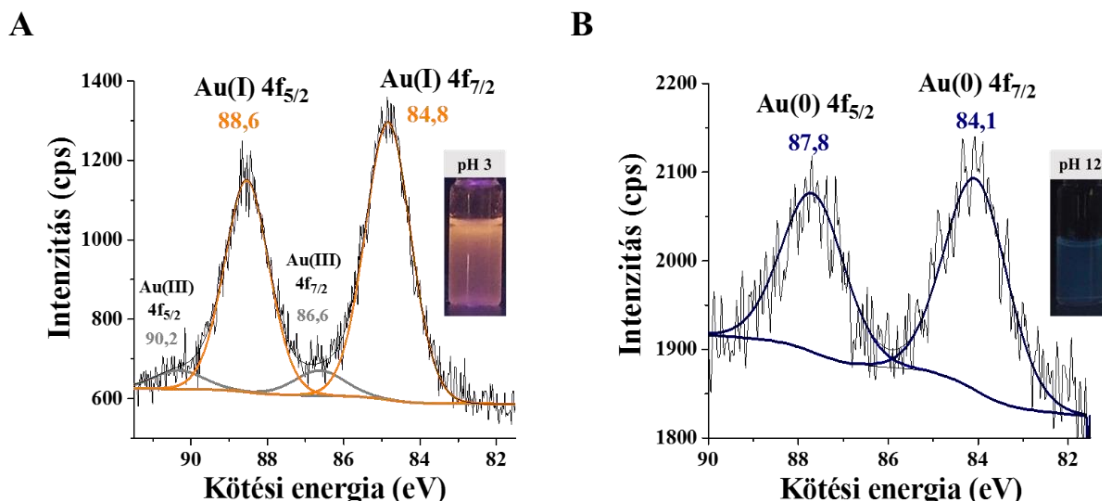
5.2.1. Glutation-Au rendszerek

A glutation alkalmazásával előállított fluoreszcens arany tartalmú rendszerek előállításáról és szerkezetvizsgálatáról több publikációt is találhatunk, de a reakciókörülmények (*pl.* reaktánsok molaránya, reakcióelegy pH-ja) termék(ek)re előállítására gyakorolt hatásai viszonylag tisztázatlanok [59,114,115]. Munkánk kezdeti lépéseként megvizsgáltuk a GSH: AuCl_4^- moláris arányának szerepét 1:1–40:1 arányok között elsőként savas körülmények beállítása (pH ~ 3,0) mellett. A reakcióelegyet 24 h-ig, 37 °C hőmérsékleten termosztáltuk, melynek során egy fehérszínű, intenzív narancssárga emissziót ($\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) mutató csapadék leválása volt megfigyelhető. A legnagyobb fluoreszcencia intenzitást a GSH:Au/15:1 molarány alkalmazása mellett detektáltuk, így a további vizsgálatokhoz ezen arány rögzítése mellett tanulmányoztuk egy másik fontos kísérleti körülmény, a pH hatásának szerepét az előállított termék(ek) optikai és szerkezeti tulajdonságaira vonatkozóan (26.A ábra).



26. ábra: (A) Az 590 nm hullámhossznál detektált PL intenzitás maximumok a GSH koncentrációjának függvényében. (B) A mért fluoreszcencia spektrumok a kiindulási GSH-oldat pH-jának függvényében (GSH:Au/15:1, $c_{\text{Au}} = 1$ mM, $t = 25$ °C, $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm).

A 26.B ábrán látható, hogy a narancsszínű emissziós sajátsággal ($\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) rendelkező termék(ek) képződése csak a pH = 2–4 tartományon preferált. A legintenzívebb emisszió pH ~ 3,0 alkalmazása mellett detektálható. A karakterisztikus emissziós sáv a pH növekedésével csökkenő tendenciát mutat egészen pH = 7,0-ig, majd a pH = 8–10 közötti tartományon már egyáltalán nem figyelhető meg. Erősen lúgos közegben egy új emissziós sáv megjelenése észlelhető a kék tartományban $\lambda_{\text{em}} = 445$ nm hullámhossznál. Ezen új optikai sajátsággal rendelkező termék képződését csapadék leválás már nem kísérte.



27. ábra: (A) A GSH:Au/15:1 rendszer XPS spektruma pH = 3,0 és (B) pH = 12,0 kiindulási pH-t alkalmazva.

Az eltérő emissziós sajátsgát mutató rendszerekben található fématomok oxidációs állapotát megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a narancssárga emisszióval rendelkező rendszerben az Au atomok +1 és +3-as oxidációs állapotban találhatók [100]. A detektált kötési energiák Au(I) $4f_{5/2}$ = 88,6 eV, Au(I) $4f_{7/2}$ = 84,8 eV és Au(III) $4f_{5/2}$ = 90,2 eV, Au(III) $4f_{7/2}$ = 86,6 eV értékeknek adódtak. Ezzel szemben a kéken emittáló rendszerben az XPS spektrumok alapján csak 0 oxidációs állapotban jelenlévő Au atomokat azonosítottunk (Au(0) $4f_{5/2}$ = 87,8 eV és Au(0) $4f_{7/2}$ = 84,1 eV. A glutation ezen eltérő redukáló képessége korábbi irodalmi adatok már jól ismert; a GSH redoxpotenciál értéke erősen pH-függő sajátsgát mutat, melyet adott pH értéken a **16. egyenlet** alapján számolhatunk [116]:

$$E_h = \left(\frac{-RT}{FpH} \right) - \left(\frac{RT}{F \log c_{GSH}} \right) \quad (16.)$$

ahol E_h a c_{GSH} koncentrációjú GSH-oldat redoxpotenciál értéke adott pH-n, R az egyetemes gázállandó, T a mérés hőmérséklete, az F pedig a Faraday állandó. Az egyenlet értelmében a GSH-hoz rendelhető redoxpotenciál értéke a GSH-Au nanohibrid rendszerek előállítása során alkalmazott pH = 12,0 érték esetén E_h = -0,272 V-nak adódik, míg pH = 3,0 esetén csak E_h = -0,031 V. A számolás révén meghatározott E_h értékek alapján értelmezhető azon kísérleti eredmény, hogy alacsonyabb pH értékeknél az arany(III)ionok redukciója csak részlegesen valósul meg. Erősen lúgos közeget biztosítva azonban már a fémionok teljes redukciója bekövetkezik, melyet a **27. ábrán** bemutatott XPS eredmények igazolnak. A különböző optikai tulajdonságot mutató arany-tartalmú rendszerek eltérő nanoszerkezettel rendelkezhetnek. A narancs emisszióval rendelkező termék esetén az ismétlődő S-Au(I)-S

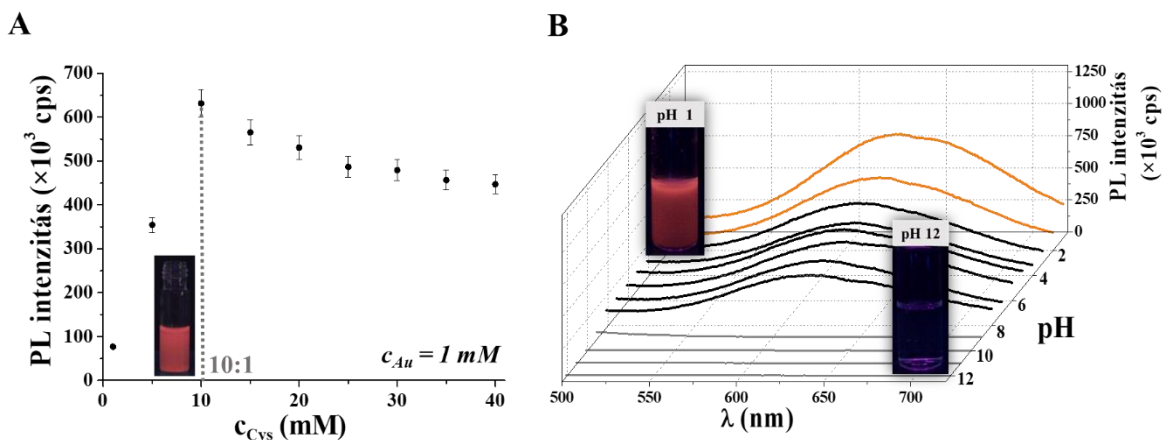
kötésekből felépülő, és más Au(I)-tiolát rendszerek esetén már egykristály röntgendiffrakcióval is igazolt, nanohibrid[†] koordinációs polimer szerkezet kialakulása valószínűsíthető [117]. Ezzel szemben a kék emisszió a néhányatomos GSH-redukált Au klaszterekhez rendelhető [118].

5.2.2. Cisztein-Au rendszer

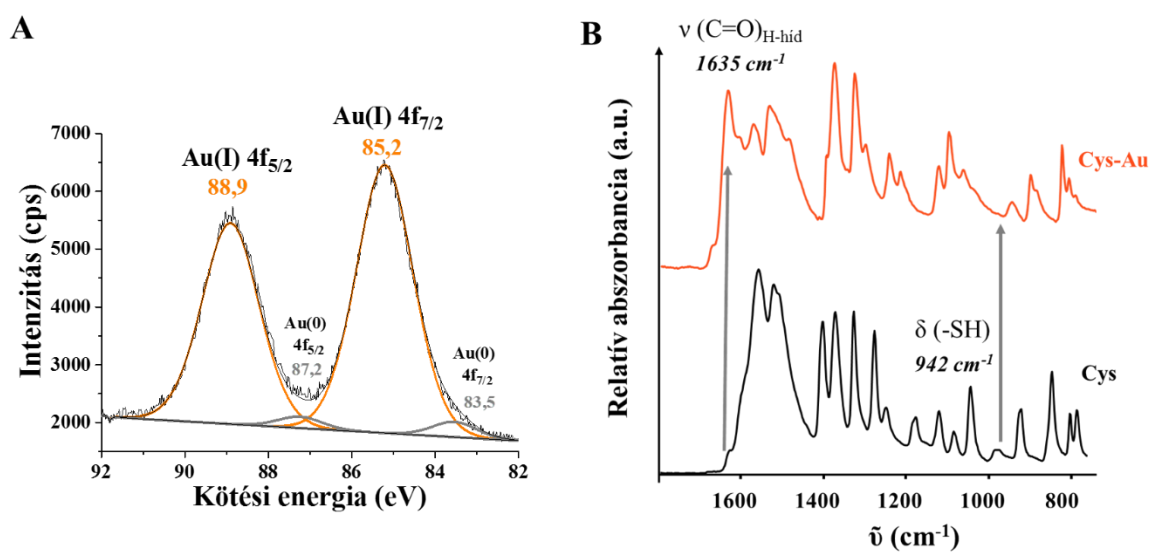
Munkánk során az aminosavak közül az oldalláncban tiolcsoportot tartalmazó ciszteint is bevontuk vizsgálatainkba. Korábban Söptei és *mtsai.* már vizsgálták a Cys és H₂AuCl₄ kölcsönhatását [119]. Kisszögű röntgenszórásos (SWAXS: small and wide angle X-ray scattering) technikával igazolták, hogy egy önszerveződő Au(I) tartalmú, lamellás nanohibrid szerkezet alakul ki, amely a szakirodalomban a koordinációs polimerként (CP) ismert szerkezetek csoportjába sorolható [70,120]. Az általuk előállított termék lamella távolságát a fenti mérés technika segítségével 1,3 nm-nek határozták meg. Az előállított lamellás szerkezetet széleskörűen tanulmányozták, de munkájuk során nem tértek ki az általunk érdekesnek gondolt kísérleti paraméterek, mint a reaktánsok moláris arányának és a kiindulási pH termék(ek)re gyakorolt hatásának tanulmányozására. Reprodukzív szintézissel mi is megkíséreltük előállítani a fluoreszcens Cys-Au CP struktúrát, de az előző fejezetekhez hasonlóan, első lépésként a reaktánsok optimális molarányának megtalálása érdekében a szintézist számos arány beállítása mellett tanulmányoztuk. Hasonló kísérleti eredményeket vártunk, mint a GSH-Au CP rendszer esetén. A savas körülmények (pH = 3,0) mellett előállított GSH-Au CP-hez hasonlóan, termékként itt is egy fehér színű, narancs emisszióval ($\lambda_{em} = 620$ nm) rendelkező csapadékot azonosítottunk. A molarány hatását Cys:Au/1:1–40:1 között vizsgáltuk, amely során a legnagyobb fluoreszcencia intenzitás a Cys:Au/10:1 arány alkalmazása mellett volt detektálható (**28.A ábra**). A további vizsgálatokhoz 10:1 arány rögzítése mellett előállított fluoreszcens termékeket vizsgáltuk. Megvizsgálva a Cys-oldat kiindulási pH értékének hatását a fluoreszcens termék képződése szempontjából azt tapasztaltuk, hogy a fluoreszcens sajátsággal rendelkező nanohibrid rendszer kialakulásához a savasabb pH-tartomány (pH = 1–6) a preferált. Amint az a **28.B ábrán** látható, a rögzített PL spektrumok alapján a karakterisztikus emissziós sáv a pH növelésével csökkenő tendenciát mutat egészen a pH = 8,0 értékig. A kiindulási Cys-oldat

[†] *Nanohibrid rendszerek:* olyan két vagy több, szervetlen és szerves komponenst együttesen tartalmazó rendszerek, melyek mérete a nanométeres skálán mozog, szintézisük során pedig a komponensek között új (koordinatív vagy kovalens) kötések jönnek létre.

pH-értékét a magasabb pH tartomány (pH = 9–12) felé tolva azonban fluoreszcencia már nem detektálható.



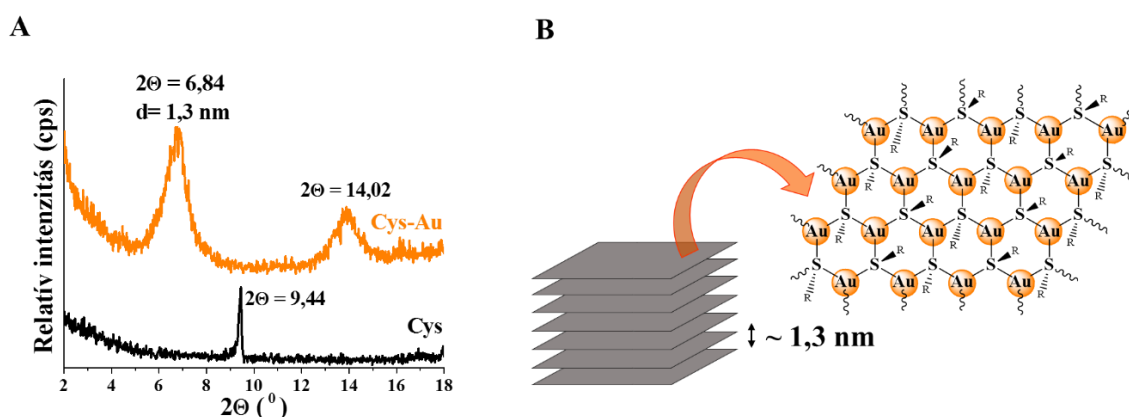
28. ábra: (A) A $\lambda_{em} = 620$ nm hullámhossznál detektált PL intenzitás maximumok a Cys koncentrációjának függvényében és (B) Cys: Au/10:1 arány mellett rögzített PL spektrumok a pH függvényében ($c_{Au} = 1$ mM, $t = 25$ °C, $\lambda_{ex} = 395$ nm).



29. ábra: (A) A Cys-Au CP szerkezet XPS spektruma, valamint (B) a Cys és a Cys-Au CP FT-IR spektruma.

A Cys-Au CP szerkezet kialakulásának igazolása érdekében XPS, FT-IR és XRD méréseket végeztünk. Az XPS mérések esetén detektált kötési energiák Au(I) $4f_{5/2} = 88,9$ eV és Au(I) $4f_{7/2} = 85,2$ eV; Au(0) $4f_{5/2} = 87,2$ eV és Au(0) $4f_{7/2} = 83,5$ eV értéknek adódtak, melyek alapján meghatároztuk, hogy a koordinációs polimer kötéseiben döntően +1-es oxidációs [67] állapotban található a fém (29.A ábra). A 29.B ábrán látható FT-IR spektrumok alapján a tiszta Cys tiolcsoportjának karakterisztikus vegyérték- és

deformációsrezgése 2549 cm^{-1} és 942 cm^{-1} hullámszámoknál jelentkeznek, melyek az auráttal történő kölcsönhatást követően már nem detektálhatók a spektrumban [121,122]. A szabad $-\text{SH}$ rezgések eltűnése azok fémionhoz való kötődésük következtében valószínűsíthető. Ezzel szemben 1635 cm^{-1} hullámszámnál egy új sáv figyelhető meg, ami a Cys hidrogénhidás kötést kialakító karbonilcsoportjainak ($-\text{C}=\text{O}$) vegyértékrezgéseirez rendelhető [123], amely feltehetőleg a lamellás szerkezet önrendeződésért felelhet.



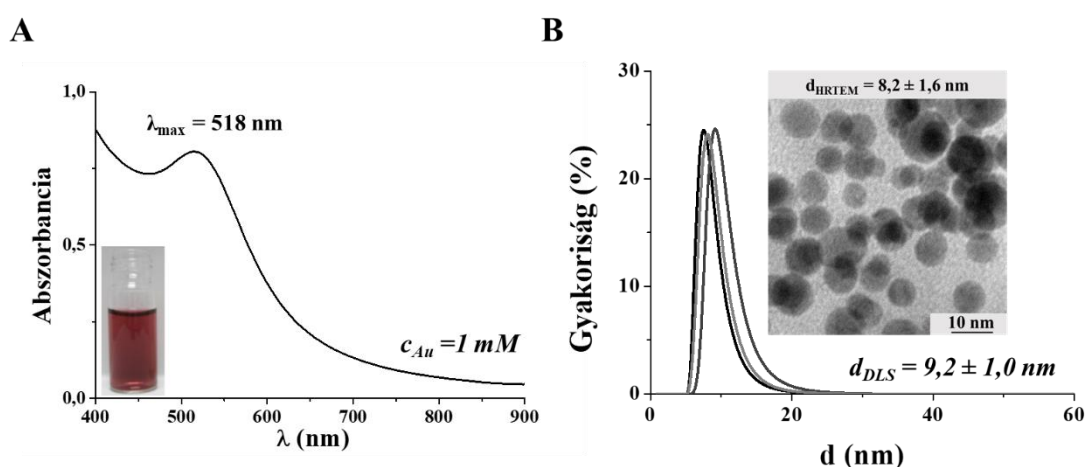
30. ábra: (A) A Cys és a Cys-Au CP szerkezet röntgendiffraktogramja (B) a feltételezhetően kialakuló lamellás szerkezet sematikus ábrájával.

A feltételezhetően kialakuló lamelláris struktúra képződését XRD vizsgálatokkal támasztottuk alá. A diffraktogramokon (30.A ábra) látható, hogy a Cys-Au CP rendszer esetén új reflexiók jelennek meg a tiszta Cys diffraktogramjához képest $2\theta = 6,84^\circ$ és $14,02^\circ$ 2θ értékeknél. A $2\theta = 6,84^\circ$ reflexióból számítható bázislaptávolság 1,3 nm-nek adódott, mely a Söptei és *mtsai*. SWAXS mérésekkel meghatározott értékével jó egyezést mutat. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy savas közegben a 30.B ábrán bemutatott fluoreszcens sajátosságot mutató lamellás szerkezet alakulhat ki a Cys és auráttal való kölcsönhatása révén, mely a pH emelésével csökkenő intenzitást mutat, pH = 8,0 felett már nem alakul ki. Ellentétben a GSH-tartalmú rendszerrel, erősen lúgos közegben a szub-nanométeres klaszterek képződése nem történik meg.

5.2.3. Ciszteinil-triptofán-Au rendszerek

A glutation és a cisztein mellett egy szintetikus előállított dipeptid, a Cys-Trp, auráttal való kölcsönhatását is tanulmányoztuk. Legfőbb célunk volt felderíteni, hogy ezen molekula is hasonlóan viselkedik-e az auráttal szemben. Van-e itt is lehetőség az önrendeződő lamellás szerkezet kialakulására vagy éppen a Trp révén a nagy térkitöltésű aromás oldallánc jelenléte ezen struktúra kialakulását szterikusan gátolja-e? Az aminosavak

közül a Trp mutatkozik a legerősebb redukálószernek, így kérdéskén merült fel van-e lehetőség esetleg a fluoreszcens klaszterek kialakulására. Korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan első lépésként itt is a kiindulási reaktánsok egymáshoz képesti molarányát változtatva tanulmányoztuk milyen szerkezettel rendelkező termékek képződnek. Ennek során a CW: Au/0,5:1–30:1 molarányok mellett pH = 12,0-t alkalmazva 37 °C hőmérsékleten végeztük kísérleteinket. A 24 h szintézisidő letelte után, a CW: Au/0,5:1 molarány esetén meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy borvörös színnel rendelkező termékek képződtek. A minta UV-Vis spektrumán, melyet a **31.A ábra** mutat, 518 nm hullámhossznál detektálható plazmon módus egyértelműen a 2 nm-nél nagyobb átlagátmérővel rendelkező arany kolloidok képződését igazolja., melyet a minta színe is megerősít.

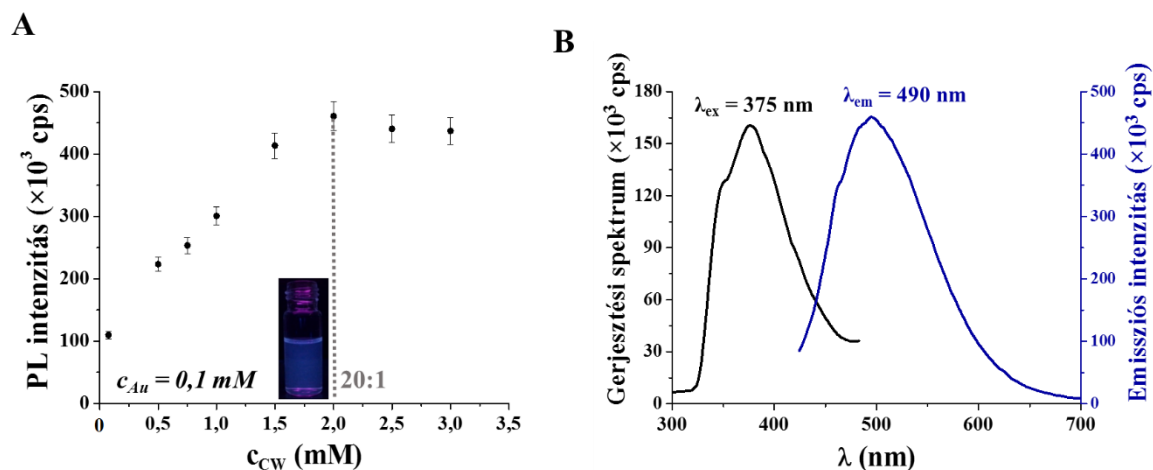


31. ábra: (A) A CW-Au NPs Vis spektruma a minta fényképével, (B) a DLS mérésekből szerkesztett méreteloszlási diagram és a mintáról készített reprezentatív HRTEM felvétel ($c_{Au} = 1\text{mM}$).

A keletkezett szférikus részecskék átlagos méretének meghatározásához DLS és HRTEM méréseket alkalmaztunk. A **31.B ábra** alapján megállapítottuk, hogy a CW-stabilizált Au NPs átlagosan 8–9 nm-es átmérővel rendelkeznek ($d_{HRTEM} = 8,2 \pm 1,6\text{ nm}$; $d_{DLS} = 9,2 \pm 1,0\text{ nm}$).

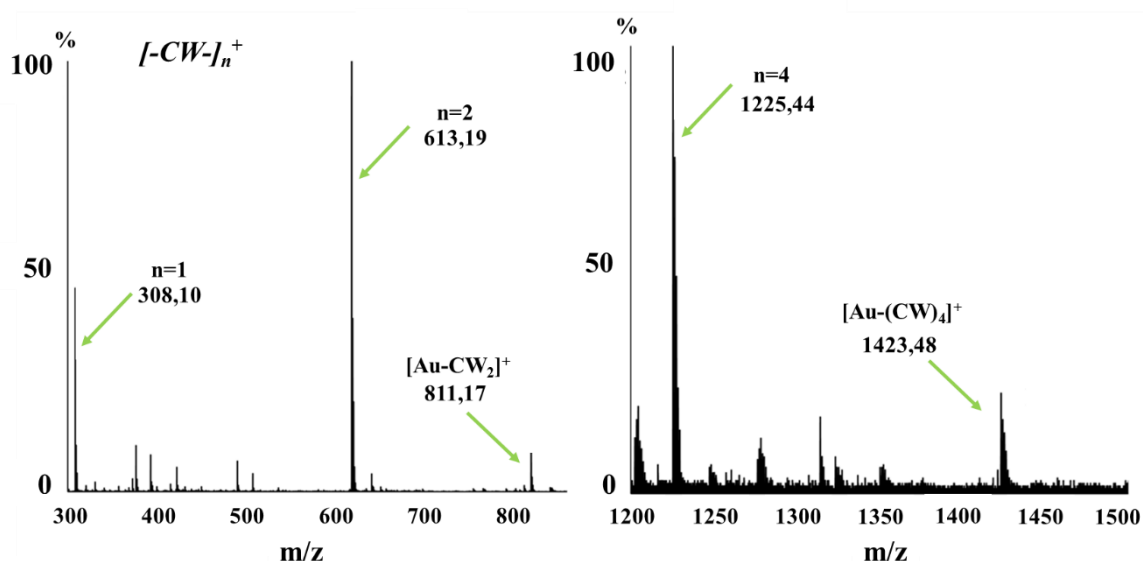
Ezzel szemben, ha az aurationok kezdeti koncentrációját a tizedére csökkentjük ($c_{Au} = 0,1\text{ mM}$) és a CW molarányát pedig megnöveljük, akkor a termékképződést az aurationok intenzív sárga színének fokozatos elhalványulása, valamint az ezzel párhuzamosan egyre nagyobb intenzitással detektálható kék fluoreszcencia megjelenése jelzi 24 h szintézisidő és 37 °C hőmérséklet alkalmazása mellett (**32. ábra**). A kéken emittáló ($\lambda_{em} = 490\text{ nm}$) rendszer esetén a legnagyobb fluoreszcencia intenzitás a CW: Au/20:1 molarány beállításával volt detektálható, így a szerkezetvizsgálatokhoz ezen arány rögzítése mellett szintetizáltuk a

fluoreszcens terméket. Meghatároztuk, hogy a fluoreszcens termék képződésére a pH döntő befolyással nem bír, így a továbbiakban – akár csak a CW-Au NPs szintéziséhez ezen rendszerénél is, $\text{pH} = 12,0$ értéket alkalmaztunk a reakció kezdetén. A termékre meghatározott kvantumhasznosítási tényező viszonylag kis értéket mutat ($\text{QY} = 0,7\%$) és az élettartam a $\tau = 3\text{ ns}$ értékkel adható meg. A GSH rendszerhez hasonlóan a kéken emittáló néhányatomos Au NCs vagy fluoreszcens Au(I)-tartalmú hibrid struktúrák/komplexek kialakulására következtethetünk [52,74].



32. ábra: (A) A mért fluoreszcencia intenzitás maximumok a CW koncentrációjának növelésével. (B) A fluoreszcens termék gerjesztési (fekete) és emissziós (kék) spektruma CW: Au/20:1 arány esetén ($c_{\text{Au}} = 0,1\text{ mM}$, $t = 25\text{ }^\circ\text{C}$).

A szintézis során megfigyeltük, hogy szemben a Cys-tartalmú rendszerrel, ezen termék képződését nem kíséri csapadékleválás és a detektált emissziós csúcs hullámhossza is alacsonyabb értéknél figyelhető meg. Rendezett szerkezetet sem FT-IR, sem pedig XRD mérésekkel nem sikerült kimutatnunk, amely feltehetőleg a Trp oldalláncában található nagy térkitöltésű indolgyűrű jelenlétének köszönhető. A sztérikus okoknál fogva az indolgyűrű meggátolhatja a rendezett struktúra kialakulását. Az FT-IR spektrumokon azonosítható Amid I ($1645\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1660\text{ cm}^{-1}$), Amid II ($1592\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1525\text{ cm}^{-1}$) és Amid III ($1206\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1199\text{ cm}^{-1}$) sávok tolódásából, valamint a Cys alegység tiolcsoportjára jellemző vegyértékrezgés (2557 cm^{-1}) eltűnéséből arra következtetünk, hogy a fémion koordinációja a dipeptid tiolcsoportján keresztül valósulhat meg [124]. A képződött termékben található Au oxidációs állapotának kimutatására XPS méréseket kivitelezünk. A kis Au koncentráció miatt azonban ezen mérések nem jártak sikerrel, így a dolgozat összeállításig nem tudtuk egyértelműen meghatározni a mintában jelenlévő Au oxidációs állapotát.



33. ábra: A fluoreszcens CW-Au rendszer ESI-MS spektruma $m/z = 300-850$ (balról) és $m/z = 1200-1500$ (jobbról) tartományokon különböző nagyítások mellett (CW: Au/20:1).

Az önrendeződő nanohibrid struktúra azonosításának hiányában fluoreszcens Au(I)-komplexek képződése valószínűsíthető, amelyre a minta elszíntelenedéséből is következtethetünk. Ennek igazolása érdekében további szerkezetvizsgálati módszerként ESI-MS technikát használtuk. Az ESI-MS spektrumokon (33. ábra) egyértelműen elkülöníthetők az $m/z = 308,10$; $613,19$ és $1225,44$ értékeknél jelentkező csúcsok, melyek magához a dipeptidhez ill. annak dimer és tetramer formájához tartoznak. Feltételezhetően a dipeptid oxidációját követő oligomerizációs folyamat során képződhetnek [125]. Néhány atomos Au klaszterek jelenlétét nem sikerült igazolni. A dipeptid fragmentumok mellett $m/z = 811,17$ és $1423,48$ m/z értékeknél egy-egy további csúcs jelenléte figyelhető meg. Ezen „részecskék” vélhetően a pozitívan töltött $[\text{Au-CW}_2]^+$ és $[\text{Au-CW}_4]^+$ 2-koordinációs Au(I) komplexekhez tartozhatnak [1,126], ahol a fémionhoz a dipeptid tiolcsoportja koordinálódhat. A CW aurácionokkal szembeni viselkedésének megértéséhez azonban nem csak tisztán a Cys, hanem a Trp kölcsönhatását is szükséges volt felderíteni, melynek eredményeit az 5.3.1. alfejezetben ismertetjük részletesebben.

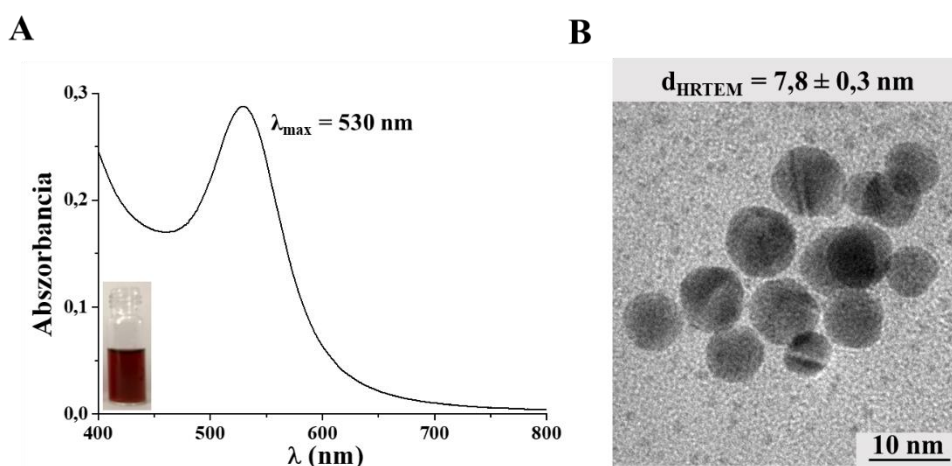
5.3. Az AuCl_4^- -ionok kölcsönhatásának tanulmányozása N-tartalmú, aromás oldallánccal rendelkező aminosavakkal

5.3.1. Triptofán-Au rendszerek

Korábban R. Antoine és mtsai. már sikeresen állítottak elő gázfázisban Trp-Au komplex kationokat, melyek jelenlétét ESI-MS mérésekkel igazolták, szerkezetük

felderítésére pedig *ab initio* molekuladinamikai számítási módszereket alkalmaztak [127]. Ezen kutatási eredményekre támaszkodva vizsgáltuk vizes közegben a Trp közvetlen kölcsönhatását tetrakloro-auráttal szemben, ahol azt tapasztaltuk, hogy a moláris arányok mellett a pH is rendkívül fontos szereppel bír az előállított termékek méretére, ezáltal optikai sajátságaira is.

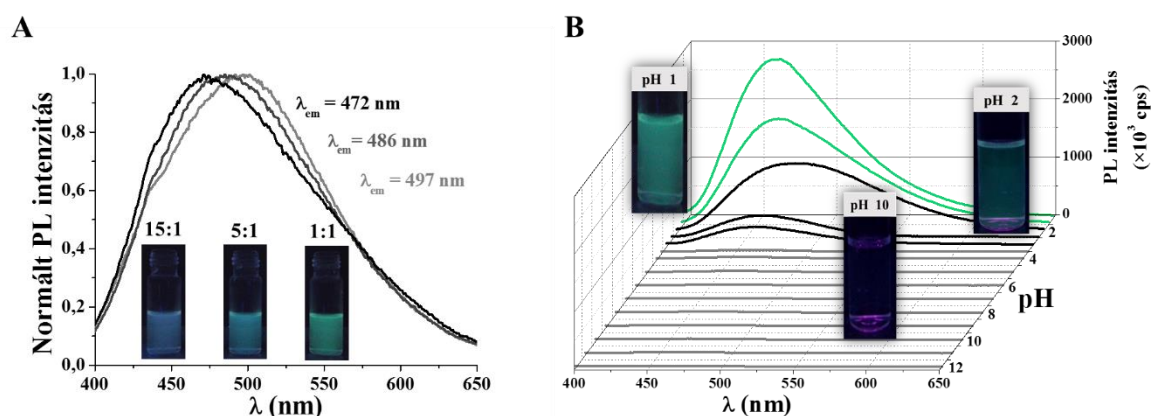
A Trp és az AuCl_4^- ionok kölcsönhatását széles skálán, Trp:Au/0,4:1–30:1 moláris arányok között vizsgáltuk mind erősen lúgos, mind pedig erősen savas közegben 24 h szintézisidőt alkalmazva 37 °C-on. Ahogyan az előző, 5.2.3 fejezetben ismertettük, a Cys-Trp dipeptid esetén fémion felesleg alkalmazásakor arany kolloidok képződése volt megfigyelhető. Kérdésként merült fel, hogy hasonló reaktáns arányok beállítása mellett a tisztán Trp tartalmú rendszerekben is megfigyelhető-e ezen részecskék képződése, hiszen a Cys- és GSH-tartalmú rendszerek esetén nanorészecskék képződését nem tapasztaltuk. Vizsgálataink szerint a vörös színű Au szol kialakulásához a kis ligandum felesleg (Trp:Au/0,4:1) és erősen lúgos (pH ~ 12) közeg kedvező. A keletkezett Trp-Au NPs plazmonikus sávja $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$ hullámhossznál detektálható a vizes diszperziók UV-Vis spektrumain, HRTEM felvételek alapján a részecskék átmérőjére átlagosan $d_{\text{HRTEM}} = 7,8 \pm 0,3 \text{ nm}$ határozható meg a (34. ábra). A DLS vizsgálatokból megállapítható, hogy a részecskék mérete monodiszperz eloszlást mutat, átlagos hidrodinamikai átmérőjük $d_{\text{DLS}} = 8,8 \pm 1,0 \text{ nm}$. A fényszórás mérésekből meghatározott ζ -potenciál értéke ($\zeta \sim -21 \text{ mV}$) stabil kolloid diszperzió képződésére utal [104].



34. ábra: (A) Trp-Au NPs Vis spektruma a minta fényképével és (B) reprezentatív HRTEM felvétellel az átlagos átmérő megadásával.

Fluoreszcens terméket nagyobb ligandum felesleg alkalmazása mellett (Trp:Au/1:1–15:1) ezen rendszer esetén is tudtunk azonosítani, de összevetve mind a Cys, Cys-Trp, GSH

rendszerek eredményeit megállapítható, hogy már 1:1 fémion:aminosav molarány beállítása mellett is képződnek fluoreszcens termékek. A termékek képződését minden esetben az aurationokra jellemző intenzív sárga szín sötétedése és ezzel egyidejűleg egy, az alkalmazott fémion:ligandum aránytól függően, a látható fény kék-zöld hullámhossztartományán detektálható karakterisztikus emissziós sáv megjelenése kísérte. Az eddigi eredményektől eltérően a rögzített spektrumok intenzitás maximuma csak kismértékben függ az alkalmazott Trp feleslegtől ($\Delta I \sim 2\text{--}5\%$), azonban a fluoreszcens fotonok hullámhosszára már jelentősebb befolyással bírt ezen érték megválasztása. Nevezetesen, az alkalmazott Trp aurationokhoz viszonyított feleslegével $\Delta\lambda = 25\text{ nm}$ eltérést detektáltunk a Trp:Au/1:1 és a Trp:Au/15:1 molarány mellett szintetizált termékek emissziós maximumának helye között (**35.A ábra**). A további vizsgálatokhoz a Trp:Au/1:1, 5:1 és 15:1 molarányok mellett szintetizált termékeket választottuk ki, mivel a fluoreszcencia intenzitás nagymértékben csökkenő tendenciát mutatott a reaktánsok moláris arányának növelésével és a Trp:Au/15:1 molaránynál nagyobb ligandum felesleg esetén már hullámhossz eltolódást nem tudtunk detektálni az egyes termékek emissziós maximumának hullámhossza között.

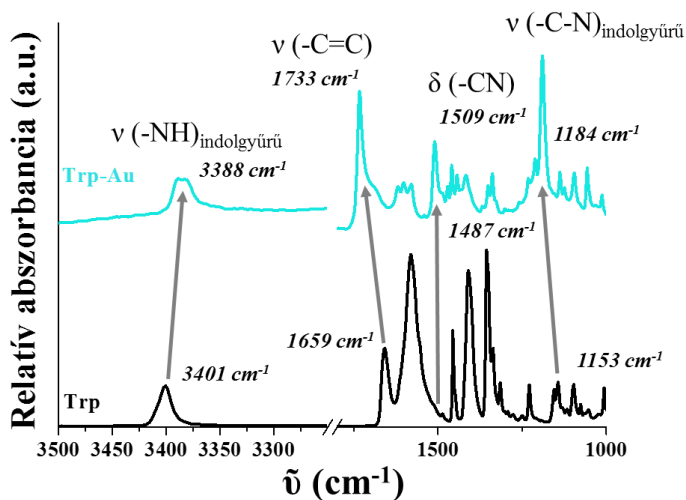


35. ábra: (A) A Trp-Au nanohibrid rendszerek emissziós spektrumai Trp:Au/1:1; 5:1 és 15:1 sorrendben (jobbról balra haladva) a minták fényképével ($c_{Au} = 1\text{ mM}$, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{ex} = 380\text{ nm}$). (B) A Trp:Au/1:1 molarány mellett készített minta emissziós spektruma az alkalmazott kiindulási pH (1,0–12,0) függvényében.

Megvizsgálva a reakcióelegy kiindulási pH értékét azt tapasztaltuk, hogy a fluoreszcens termék képződésének csak a savasabb környezet ($\text{pH} = 1\text{--}3$) a kedvező (**35.B ábra**), melynek oka feltehetőleg az aurationok hidrolízisében és a Trp savas környezetben lejátszódó autopolimerizációs folyamatában keresendő [128,129]. A $\text{pH} = 1\text{--}3$ közötti tartományon döntően az aurationok $[\text{AuCl}_4]^-$ formában vannak jelen [10], de $\text{pH} = 7,0$ felett ahogyan a **2. ábra** is mutatja, már kizárólag a $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ forma a domináns részecske. A

szintézisek során előállított fluoreszcens Trp-Au nanohibrid rendszerekre meghatározott PL élettartam ($\tau = 5\text{--}9\text{ ns}$) és a QY (1,1–1,7 %) értékek alapján a néhányatomos kéken, ill. zölden emittáló Au NCs képződésére következtethetünk [69].

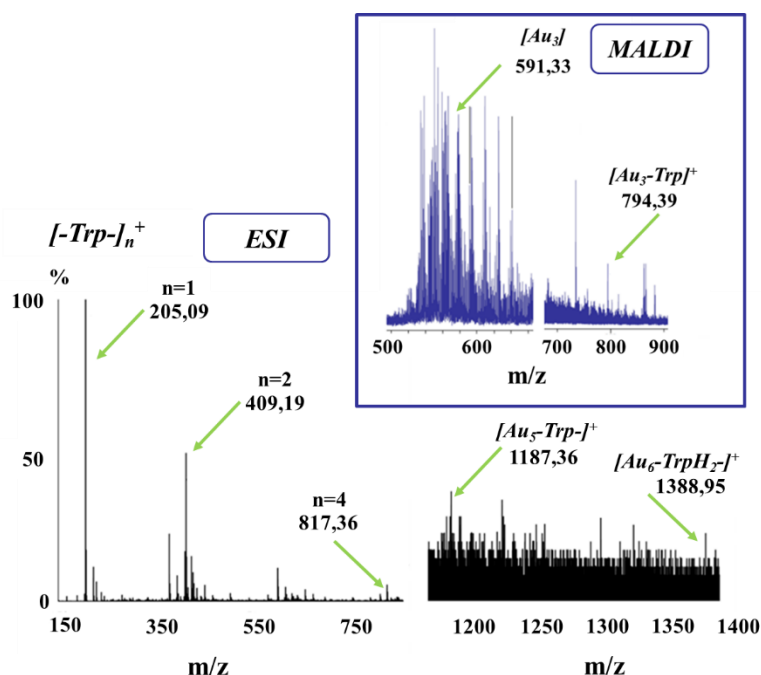
A klaszterek szerkezetének felderítése érdekében elsőként FT-IR méréseket végeztünk. A háromféle alkalmazott Trp:Au molarány mellett előállított minták FT-IR spektrumaiban számottevő különbség nem volt észlelhető, így a **36. ábrán** csak a Trp:Au/15:1 molarány mellett készített minta spektrumát ábrázoltuk a tiszta Trp spektrumával együtt.



36. ábra: A Trp-Au és a Trp FT-IR spektrumai 3500-1000 cm^{-1} tartományban.

A rögzített spektrumok alapján meghatároztuk, hogy a Trp oldalláncában található indolgyűrű –NH csoportjára jellemző vegyértékrezgések ($3401\text{ cm}^{-1} \rightarrow 3388\text{ cm}^{-1}$), valamint alifás ammóniumcsoportjának vegyérték- ($1153\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1184\text{ cm}^{-1}$) és deformációs rezgései ($1487\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1509\text{ cm}^{-1}$) tolódnak a legnagyobb mértékben az aurációval történő kölcsönhatás következtében [130].

További szerkezetvizsgálati módszerként ESI- és MALDI-MS méréseket végeztünk. A tömegspektrumokon (**37. ábra**) a Trp aminosav dimer ($m/z = 409,19$) és tetramer ($m/z = 817,36$) formája is azonosítható, ahogyan azt a CW esetén is megfigyeltük.



37. ábra: A fluoreszcens Trp-Au rendszer (Trp:Au/5:1) ESI- és MALDI-MS spektrumainak részletei különböző nagyítások mellett.

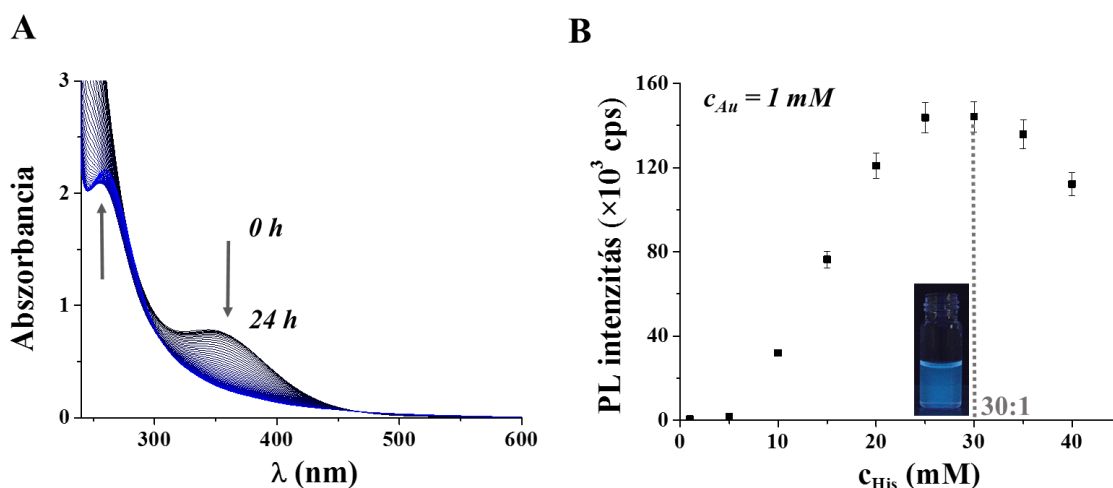
Az egyes, különféle indol-tartalmú vegyületek erősen savas környezetben lejátszódó autopolimerizációs folyamatára már 1983-ban rámutatott Francisco Amat-Guerri és *mtsai*, amelyben egészen a tetrameres formáig képesek voltak azonosítani a különféle származékokat [131]. Ezen preferáltan lejátszódó oxidáció elősegítheti a fémion redukcióhoz szükséges elektron felszabadulását, amely következtében individuális redukált Au magok keletkeznek. Ezen magok összekapcsolódásából jöhetnek létre az ESI- és MALDI-MS spektrumokon azonosított Au_3 - Au_6 fémmagot ($m/z = 591,33$) tartalmazó klaszterek, melyet általában egy ligandum kísér ($m/z = 794,36$; $1187,36$ és $1388,95$).

A mintákba jelenlévő Au oxidációs állapotának meghatározásához elvégzett XPS mérések alapján az Au oxidációs állapota nem volt egyértelműen azonosítható, melynek háttérében az állhat, hogy a klasztereket +1 és 0 oxidációs állapotú Au-magok vegyesen alkotják [67,132,133].

5.3.2. Hisztidin-Au rendszerek

A szintézis optimális paramétereinek megállapításához első lépésben a reakciópartnerek moláris arányának szerepét tanulmányoztuk His:Au/1:1–40:1 arányok között. A reakció során azt tapasztaltuk, hogy az AuCl_4^- -ionokat tartalmazó vizes oldat intenzív sárga színe fokozatosan elhalványodik, melyet $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm-nél egy új abszorbancia sáv fokozatos megjelenése kísért (**38.A ábra**). Ezzel párhuzamosan $\lambda_{\text{em}} = 475$

nm-nél egy intenzív, emissziós csúcs kinövése figyelhető meg a fluoreszcencia spektrumokon. A 24 óra szintézisidő letelte után további színváltozást már nem tapasztaltunk. A legnagyobb detektálható intenzitást a His: Au/30:1 molarány beállítása mellett figyeltük meg (**38.B ábra**), e fölötti értéket alkalmazva a fluoreszcencia már csökkenő tendenciát mutatott. A további szerkezetvizsgálatokat ezen arány beállításával készített termékre végeztük el.

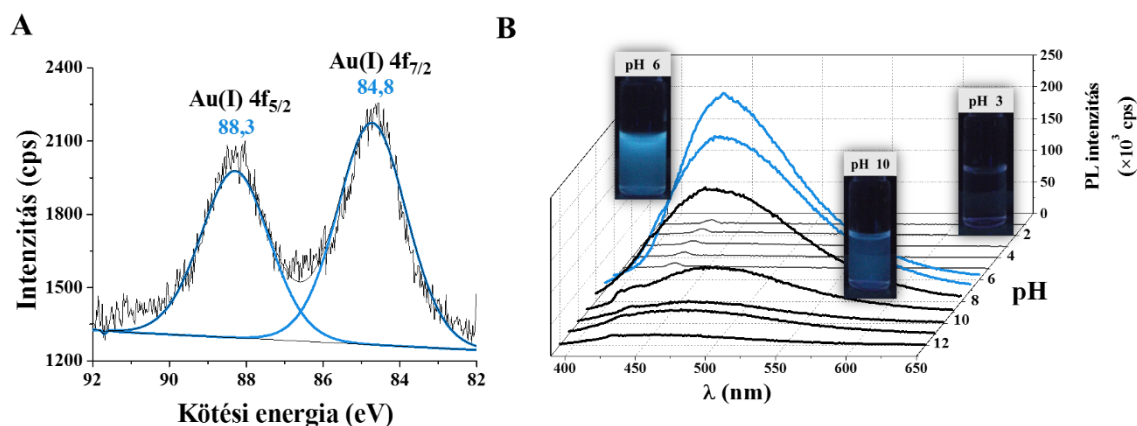


38. ábra: (A) A His: Au/30:1 molarányú minta 24 h óra alatt rögzített UV-Vis spektrumai.

(B) A $\lambda_{\text{em}} = 475$ nm hullámhossznál detektált intenzitás-maximumok a His koncentrációjának függvényében ($c_{\text{Au}} = 1$ mM, $t = 25$ °C, $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm).

A meghatározott fluoreszcencia élettartam ($\tau = 5,1$ ns) és a mért kvantumhasznosítás ($QY = 3,6$ %) adatok alapján még a szintézis végtermékét egyértelműen nem lehet azonosítani, de a minta sárga színének színtelenre változása és a kék emisszió detektálásának eredményeként vagy a teljesen kiredukált fématomokat tartalmazó, néhányatomos Au NCs vagy Au(I)-tartalmú, lineáris geometriával rendelkező szupramolekuláris komplexek képződnek, hiszen a mért adatok jó korrelációt mutatnak hasonló szerkezettel rendelkező, az irodalomban már korábban publikált adatokkal [134,135].

XPS mérések segítségével meghatároztuk, hogy a fluoreszcens termékben található fémmagok oxidációs állapota kizárólag +1 [100], melyet a mért kötési energiák Au(I) $4f_{5/2} = 88,3$ eV és Au(I) $4f_{7/2} = 84,8$ eV igazolnak. A rögzített XPS spektrum a **39.A ábrán** látható.



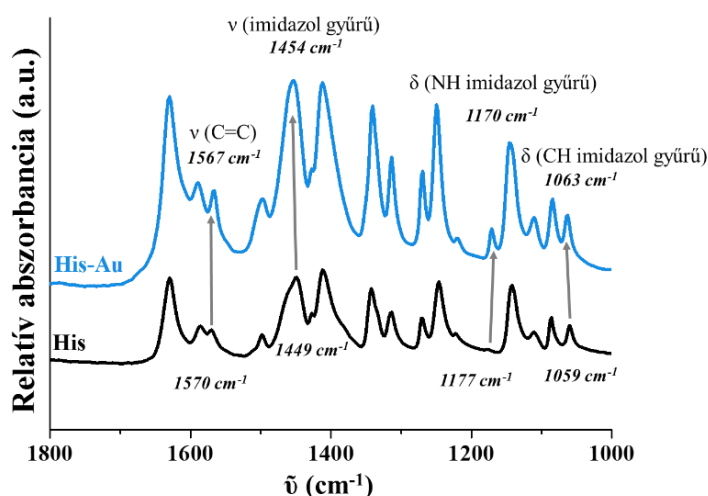
39. ábra: (A) Az His-Au rendszer XPS spektruma. (B) A mért emissziós spektrumok a pH függvényében ($c_{\text{Au}} = 1 \text{ mM}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$)

Ezen megállapítás a fentebb valószínűsíthető szerkezetekből a második (Au(I)-tartalmú szupramolekuláris komplex) kialakulását valószínűsítik.

A moláris arányok optimalizálása után megvizsgáltuk a fluoreszcens termék képződéséhez az ideális pH-tartományt (**39.B ábra**). Vizsgálataink alapján fluoreszcens termék a $\text{pH} = 1\text{--}5$ tartományon egyáltalán nem képződik. A $\text{pH} \sim 6,0$ értéket elérve és azt meghaladva azonban már megvalósul az emissziós sajátságot mutató termék képződése és a mért fluoreszcencia intenzitás maximumok egy folyamatosan csökkenő tendenciát mutatnak egészen $\text{pH} \sim 12,0$ -ig. Ennek oka egyrészt az aurácion már nem elhanyagolható hidrolitikus folyamata lehet [10]. Ezen a pH-tartományon ($\text{pH} > 6,0$) a különféle összetételű Au(III)-kloro-hidroxo komplexek jelenléte mellett már az $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ a domináns forma. Megfigyeltük továbbá, hogy a His/AuCl₄⁻ spontán reakciójának első 5 órájában a pH kismértékben nőtt ($\Delta\text{pH} \sim 1$), ami alapján feltételezzük, hogy a fémion redukció melléktermékeként OH⁻ ionok is keletkeztek.

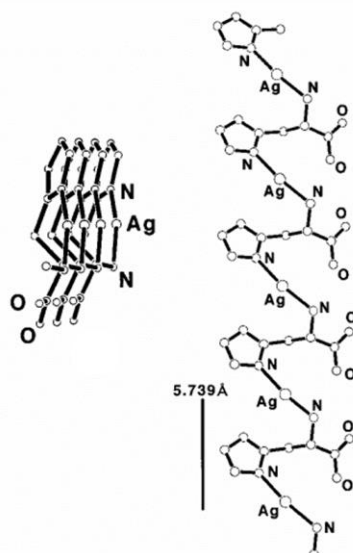
A $\text{pH} > 6,0$ esetén történő fluoreszcens termék képződése jó egyezést mutat az imidazóliumgyűrű N-atomjának protonvesztési folyamatával ($\text{pK}_a = 6,05$) [136] is, amely alapján feltételezhető, hogy a fémion elsődleges megkötésében a His imidazol-N donorja is jelentősen részt vesz. Ennek igazolása érdekében FT-IR méréseket végeztünk, melyet a **40. ábrán** bemutatott, közép IR-tartományon ($1000\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$) rögzített FT-IR spektrum eredményei jól alátámasztanak, hiszen az aurácionokkal való kölcsönhatás következtében a His oldalláncára jellemző rezgések toldódnak el a legnagyobb mértékben. Nevezetesen, az imidazolgyűrűben található C=C kettőskötésre jellemző vegyértékrezgés 1570 cm^{-1} -ről 1567 cm^{-1} -re, az imidazolgyűrű vázrezgése 1449 cm^{-1} -ről 1454 cm^{-1} -re, valamint az oldalláncban

található –NH és –CH csoportok deformációs rezgései 1177 cm^{-1} és 1059 cm^{-1} értékekről 1177 cm^{-1} és 1063 cm^{-1} hullámszámokra [130].



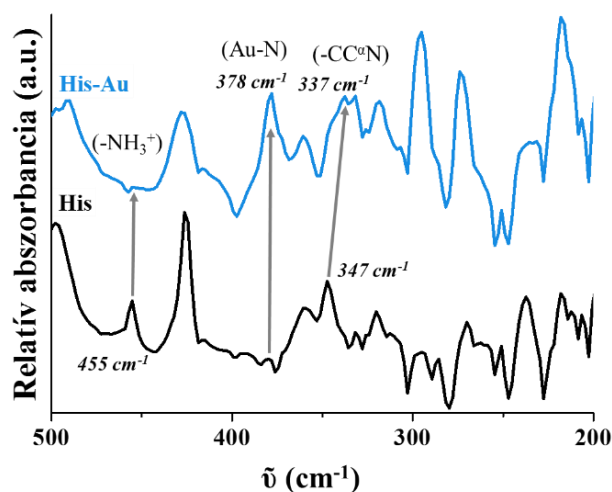
40. ábra: A His-Au rendszer FT-IR spektruma a közép IR tartományon.

A spektrum további elemzéséből meghatároztuk, hogy a fémiont nem tartalmazó, tiszta His karboxilcsoportjának nyújtórezgései 1630 cm^{-1} és 1587 cm^{-1} hullámszámoknál jelentkeznek, míg a fémtartalmú rendszerénél 1631 cm^{-1} és 1589 cm^{-1} hullámszámoknál azonosíthatók, mely a szabad, koordinatív kötésben részt nem vevő deprotonált csoportok jelenlétére utal. Ezen eredmények jól korrelálnak korábbi szakirodalmi adatokkal, amely során Ag(I)-ionok kölcsönhatását vizsgálták His-nel. A termékként keletkező $[\text{Ag}(\text{Hhis})]_n$ általános képlettel leírható koordinációs polimer struktúrát széleskörűen jellemezték. Szerkezetének igazolására egykristály röntgendiffrakciós mérések készültek, amely során megállapították, hogy ezen többmagvú polinukleáris komplex helikálisan rendeződő szerkezetet alkot. Igazolták, hogy minden egyes Ag(I)-ionhoz két ligandum koordinálódik, az egyik az aminocsoportján, a másik az imidazolgyűrű N-donoratomján keresztül [137]. Az egykristály röntgendiffrakció alapján meghatározott struktúra szerkezeti képlete a **41. ábrán** látható.



41. ábra: A $[Ag(His)]_n$ általános képlettel leírható koordinációs polimer fő tengelyi felülnézete (balról), amelyben a szerkezet megközelítőleg kétszeres spirális szimmetriáját mutatja és a balmenetes spirális polimer lánc oldalnézete a kristálytani a tengely mentén (jobbról). Egy menet magassága 5,739 Å.

A koordinatív kötés igazolásához a távoli IR tartományon is megvizsgáltuk a mintát. A **42. ábrán** látható spektrum alapján meghatároztuk, hogy az aurátionokkal való kölcsönhatás következtében ezen tartományon is a N-tartalmú csoportok rezgéseiben következik be nagymértékű változás.

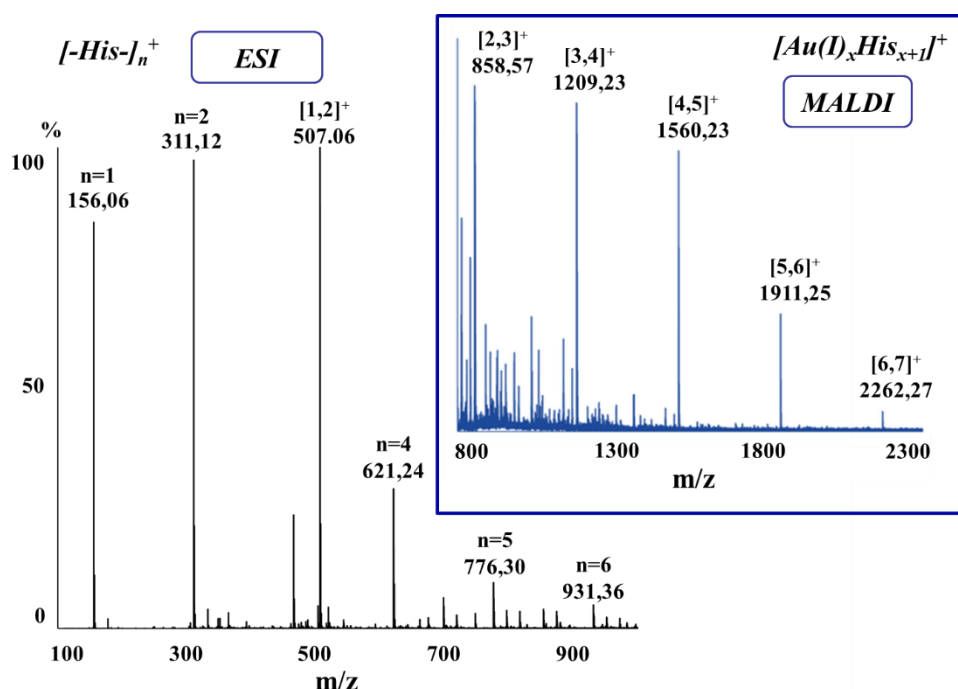


42. ábra: A His-Au rendszer FT-IR spektruma a távoli IR tartományon.

Egyrészt a $-CC^+N$ csoportra jellemző sáv 347 cm^{-1} értékről 337 cm^{-1} hullámszámokra tolódik, valamint a szabad ligandum $[H_2L]^+$ formája esetén 455 cm^{-1} hullámszámnál

jelentkező, az ammóniumcsoportra ($-\text{NH}_3^+$) jellemző rezgési sáv fémtartalmú minták esetén teljesen eltűnik. Ezzel ellentétben a reakciót követően egy új rezgési sáv detektálható 378 cm^{-1} hullámszámnál, amely az Au-N fém-heteroatom kötéshez rendelhető [138,139]. Ezen eredmények is megerősítik a korábbi adatokból levont következtetéseket, amely szerint a mintában jelenlévő His az N_{amino} és $\text{N}_{\text{imidazol}}$ donorcsoportokon keresztül kapcsolódik egy-egy fémcentrumhoz, és a szintézishez optimálisnak megállapított $\text{pH} = 6,0$ esetén a deprotonált karboxilcsoport a kötésben nem vesz részt.

A His-Au rendszerben képződő termék(ek) szerkezetének felderítéséhez ESI- és MALDI-MS méréseket végeztünk. A spektrumokból (43. ábra) egyértelműen azonosíthatók a fémion redukció melléktermékeként keletkező His oligomerek. Ezen oligomerizációs folyamat kezdő lépésénél His^+ gyökkationok képződése valószínűsíthető, amely a fémion redukciót követően akár $n = 6$ tagú ($m/z = 931,36$) His oligomereket is képes alkotni gyökkationos polimerizációs mechanizmus révén [140,141]. Az egyes aminosav oligomerek mellett többféle, $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ szerkezeti képlettel leírható polinukleáris komplexet is azonosítottunk méréseink során az egymagvú $[1,2]^+$ ($m/z = 507,06$) komplextől egészen a hatmagvú $[6,7]^+$ ($m/z = 2262,27$) összetételig.



43. ábra: A His-Au rendszer ESI- és MALDI-MS spektruma (His: Au/30:1).

Habár az ESI-MS vizsgálatok nem nyújtanak kvantitatív kiértékelésre lehetőséget, mégis a His és a HAuCl_4 -oldatok közvetlen elegyítése után elvégzett mérések rámutattak arra, hogy a reakció kezdeti szakaszán ($t < 30\text{ min}$) egy domináns részecske jelenléte

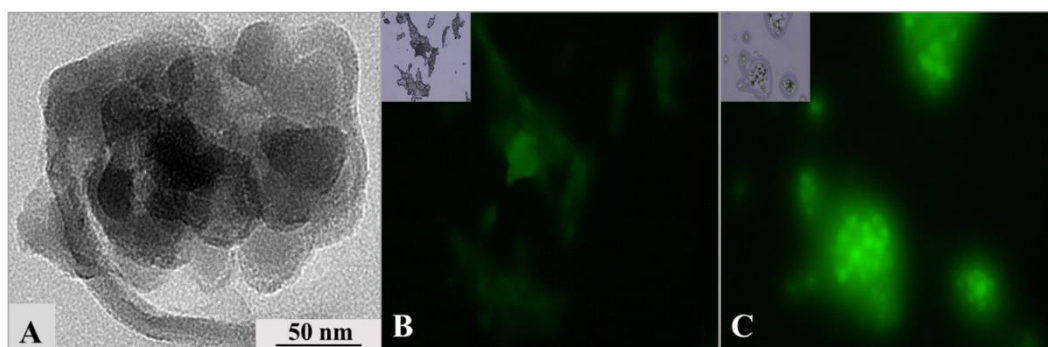
figyelhető meg $m/z = 505,08$ értéknél. Ezen részecske tömege és töltése a hisztamin típusú koordinációval kialakuló Au(III)-bisz(hisztidin) komplexhez rendelhető [6,90]. Az ehhez a komplexhez rendelhető m/z érték azonban a reakcióidő előrehaladtával fokozatosan csökken párhuzamosan a minta színének eltűnésével és végül egyáltalán ($t > 1$ h) nem azonosítható, amivel arányosan egyre dominánsabbá válik a spektrumban az $[1,2]^+$ összetételű, Au(I)-ionokat tartalmazó komplexhez rendelhető $m/z = 507,06$ értéknél detektálható csúcs. Ezen eredmények alapján valószínűsítjük, hogy a reakció kezdeti lépésekor az aurationok hisztidinnel alkotott biszkomplexe képződik hisztamin-típusú koordinációval, majd az Au(III)-ionok fokozatosan Au(I)-ionokká redukálódnak és elindul párhuzamosan a His gyökkation és az MS mérésekkel is igazolt oligomerek képződése (Melléklet, 58. ábra). Szerkezeti analógia alapján az $[Ag(His)]_n$ rendszerhez hasonló szerkezet alakulhat ki. Annak eldöntésére, hogy az Au(I)-tartalmú rendszerben is valóban kialakul-e a **41.ábrán** feltűntette rendezett struktúra, XRD vizsgálatokat végeztünk, amelyek alátámasztották előzetes feltevéseinket. A tiszta ligandum porformában rögzített diffraktogramján (Melléklet, 59. ábra) $2\Theta = 12,94^\circ$ szögnél látható diffrakciós csúcs a His: Au/30:1 molarány mellett készített minta esetén $2\Theta = 11,46^\circ$ értékre tolódik. Ezen változás az aromás imidazolgyűrűk között fellépő π - π kölcsönhatás következtében létrejövő rendezettség és/vagy a polinukleáris komplex Au(I)-ionjai között kialakuló aurofil kölcsönhatás eredménye [3,142]. A mért diffraktogramokon a $2\Theta = 38,39^\circ$ és $44,47^\circ$ szögeknél fellépő, az Au NPs (111) és (200) Miller-indexű síkjaihoz rendelhető reflexiókat [JCPDS 4-784] nem észleltünk, mely megerősíti azon következtetésünket, hogy a His: Au/30:1 molarány beállítása mellett plazmonikus részecske nem képződik.

5.3.3. Az $[Au_xHis_{x+1}]^+$ fluoreszcens nanohibrid rendszer felhasználása gyógyszerhordozók jelölésére

Amint azt a 2.3.3. fejezetben ismertettük, több esetben alkalmaztak már sikeresen biomolekulákkal-stabilizált Au klasztereket különféle sejtek/szövetek fluoreszcens jelölésére, mivel rendkívül jó fotostabilitással és nagyfokú biokompatibilitással rendelkeznek. A Kutatócsoportban évek óta foglalkozunk gyógyszerhordozó rendszerek tanulmányozásával, ahol a hatóanyag szabályozott (időben nyújtott) leadására, ill. célzott szállítására (pl. sikeres átjuttatása a vér-agy gáton) tervezünk kolloidális gyógyszerhordozó rendszerek. Az egyes rendszerek fluoreszcens jelölése révén megvalósulhat az adott gyógyszerhordozó rendszer *in situ* követése egyszerű fluoreszcens mikroszkópos technika

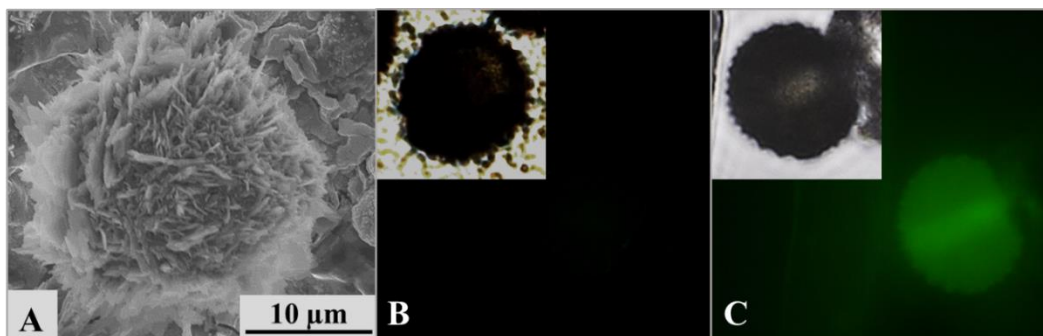
által. Ezen eljárás nagy előnyeként könyvelhető el, hogy nem szükséges a szövetminta roncsolása a hatóanyag feldúsulásának és kiürülésének monitorozása érdekében.

A fluoreszcens klaszterek és Au(I)-tartalmú nanohibridek közül a hisztidin tartalmú rendszerben képződő $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ általános képlettel megadható polinukleáris komplexekkel, viszonylag jó kvantumhasznosításuk ($\text{QY} \sim 4\%$) miatt, kísérletet tettünk a csoportban korábban előállított hordozórendszerek fluoreszcens jelölésére. Vizsgálatainkhoz a marha szérum albumin/ibuprofen (BSA/IBU) nanokompozitot választottuk [143], amely 3,2 tömegszázalékban tartalmazta a fent említett hatóanyagot. A mikroszkópos vizsgálatok során habár a jelölés sikeres volt (**44. ábra**) 5 mg BSA/IBU és 0,15 mg Au(I)-tartalmú komplex alkalmazásával, a minta stabilitásvizsgálata rámutatott arra, hogy a nanokompozit nem marad stabil. A hordozóként alkalmazott fehérje tovább redukálta a felületre kötött Au(I)-komplexek központi fémionját, melyet a néhány óra elteltével megfigyelhető Au NPs képződése támasztott alá.



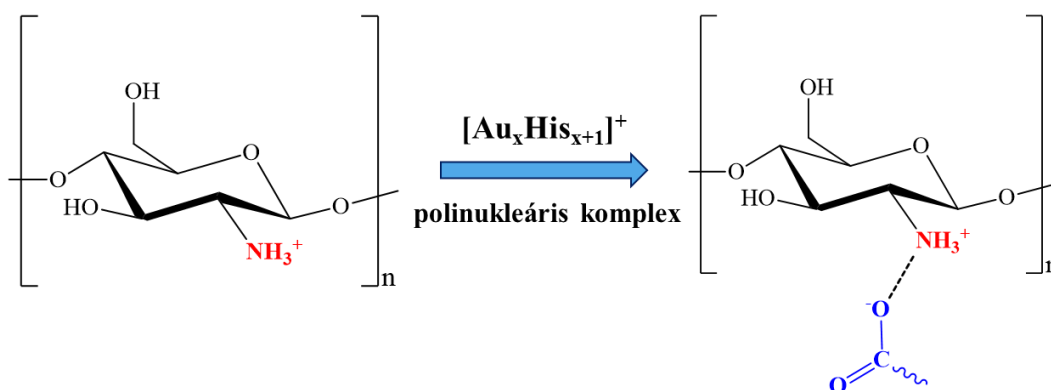
44. ábra: (A) A BSA/IBU gyógyszerhordozó nanokompozit reprezentatív HRTEM felvétele. A BSA/IBU minta fluoreszcens mikroszkópos felvétele a (B) jelölés előtt és (C) után.

Egy másik lehetséges rendszerként kitozán mikrogyöngyöket választottunk [144]. Az alkalmazott kitozán gyöngyök átlagos átmérője $15,6 \pm 7,2 \mu\text{m}$ volt, melynek meghatározásához pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk. A **45. ábrán** látható, hogy a komplex stabilan a mikrogyöngy felületén maradt a vizsgálat során. A jelöléshez az optimálisnak az 1,0 mg/0,16 mg kitozán/Au arány bizonyult. Részecskeképződést a fluoreszcens mikroszkópos mérések időtartama alatt ($\sim 5\text{--}6$ óra) nem tapasztaltunk.



45. ábra: (A) A kitozán mikrogöngy reprezentatív SEM felvétele. A kitozán mikrogöngy fluoreszcens mikroszkópos felvétele (B) a jelölés előtt és (C) után.

Habár a DLS méréstechnika kimutatási határa miatt (max. $\sim 1 \mu\text{m}$) a kitozán gyöngyök méretét nem, stabilitására és felületi töltésére vonatkozó információkat azonban mégis megtudtunk határozni. Nevezetesen, a gyöngyök átlagos ζ -potenciálját pH = 3,0 alkalmazásával $+7,1 \pm 2,5 \text{ mV}$ -nak, míg pH = 6,0 közegben $+2,5 \pm 1,4 \text{ mV}$ értéknek mértük. A mért paraméterek értelmében a jelöléshez használt komponensek között valószínűleg elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel, mely elősegíti az Au(I)-komplexek kitozán felületre történő stabil kötődését.



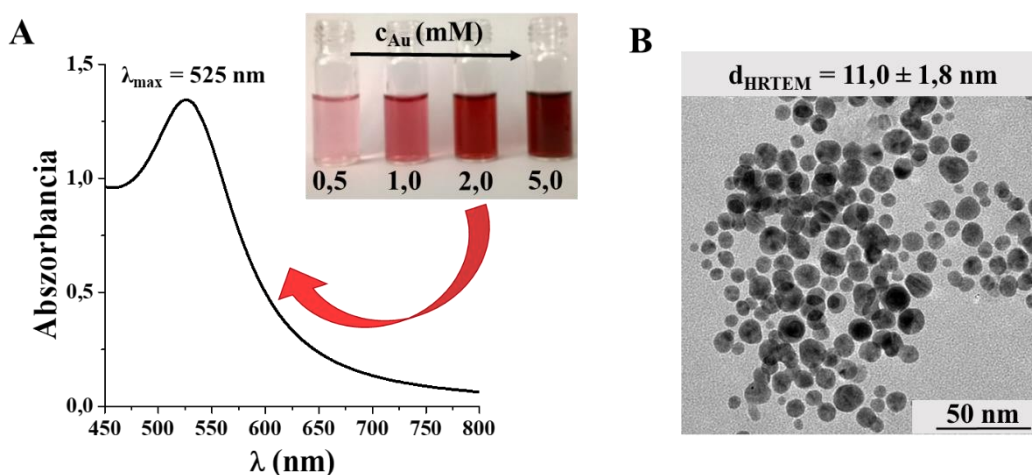
46. ábra: A kitozáz mikrogöngy felszínének és az $[\text{Au}_x \text{His}_{x+1}]^+$ általános képlettel megadható polinukleáris komplex(ek) lehetséges elektrosztatikus kötésének sematikus ábrája

Ezen elektrosztatikus kölcsönhatás feltehetőleg a His-tartalmú Au(I)-komplex deprotonált, a fémion koordinatív kötésében részt nem vevő karboxilcsoportja és a kitozán részecskék felületén található protonált aminosocsoportok között lép fel (**46. ábra**).

5.4. Az AuCl_4^- -ionok kölcsönhatása adenozin-monofoszfáttal vizes közegben

5.4.1. Adenozin-monofoszfát-Au rendszerek

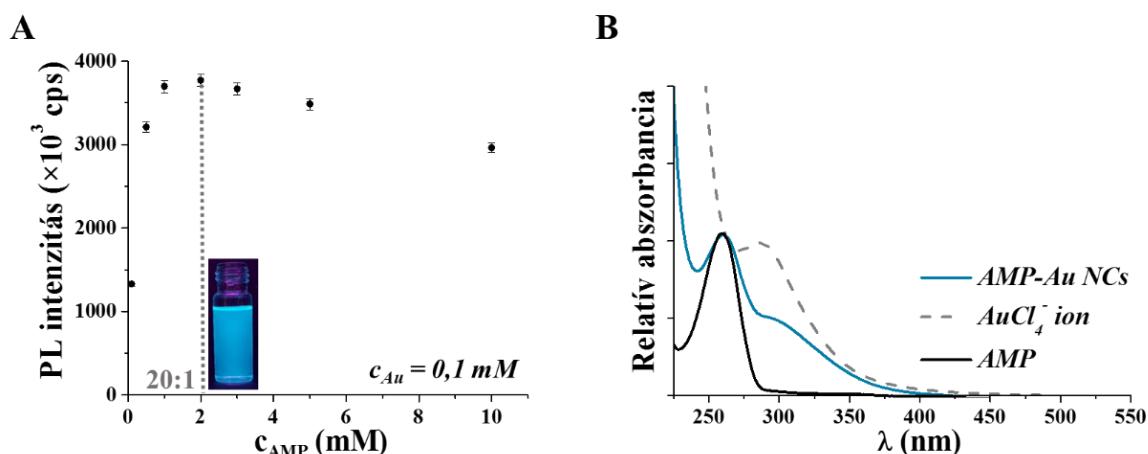
A tetrakloro-aurát ionok kölcsönhatását AMP-vel is tanulmányoztuk. A reakciópartnerek moláris arányát AMP:Au/1:1–100:1 között változtatva azt tapasztaltuk, hogy a keletkező részecske mérete jelentősen függ nem csak az alkalmazott arányoktól, hanem a teljes fémion-koncentrációtól is. Nevezetesen, ha a reakció kiindulásakor AMP:Au/1:1 molarányt és legalább 0,5 mM aurátion koncentrációt alkalmazunk, akkor a keletkezett részecskék átlagosan $d = 10\text{--}12$ nm átmérővel rendelkeznek és plazmonikus sajátosságot mutatnak (**47. ábra**). A kiindulási aurátion koncentrációt $c_{\text{Au}} = 5,0$ mM-ig növelve egyre mélyebb színű, de még stabil diszperziók készíthetők, azonban $c_{\text{Au}} > 5,0$ mM esetén a képződő részecskék gyors aggregációja figyelhető meg.



47. ábra: (A) AMP-Au NPs UV-Vis spektruma a minták fényképeivel 4 különböző Au koncentráció esetén és (B) egy reprezentatív HRTEM felvétel a $c_{\text{Au}} = 2,0$ mM alkalmazásával előállított rendszerről.

A. Lopez és J. Liu korábbi munkája már rámutatott arra, hogy különféle adenin származékok segítségével hogyan állíthatók elő fluoreszcens sajátossággal rendelkező szupramolekuláris Au(I) komplexek [145]. Azonban az alkalmazott reakciókörülmények mellett a szintetizált rendszerek minden esetben gyors ülepedést mutattak. Ha a kiindulási fémion-koncentrációt lecsökkentjük 0,1 mM-ra, akkor egy nagyfokú kinetikai stabilitást mutató kék emisszióval rendelkező termék képződik a 37 °C hőmérsékleten 24 h alatt lejátszódó szintézist követően. Ezen fluoreszcens termék emissziós sávja $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm-nél detektálható $\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm gerjesztési hullámhosszt alkalmazva és az AMP:Au/20:1 molarány mellett mutatja a mérhető legnagyobb intenzitást (**48.A ábra**). Az emissziós sajátosság megjelenésével párhuzamosan az UV-Vis spektrumokon a kolloidális gömbi Au

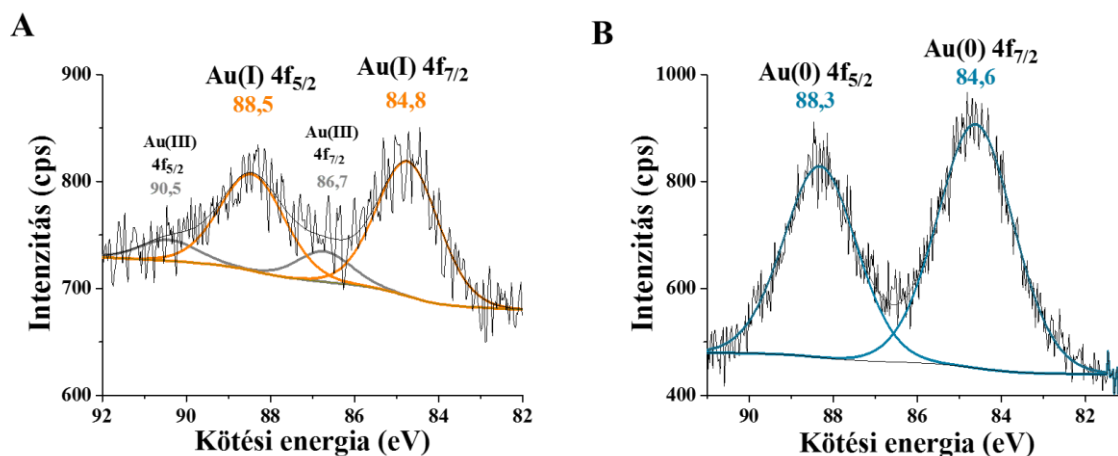
részecskékre jellemző plazmonikus sajátság helyett 305 nm hullámhossznál egy „váll” jelenik meg (48.B ábra). A termék fluoreszcens sajátságát megvizsgálva meghatároztuk, hogy a QY = 0,9 %, míg az átlagos $\tau = 200$ ns, mely két jelentősebb komponensre bontható. Ezen két összetevő a $\tau_1 = 92$ ns (42 %) és $\tau_2 = 400$ ns (40 %), amely a keletkező fluorofór poláris környezete miatt felerősödő fémion-ligandum töltésátviteli folyamatokhoz rendelhető. Figyelembe véve az optikai mérésekből származó eredményeket megállapítható, hogy az AMP:Au/20:1 molarány és $c_{Au} = 0,1$ mM koncentráció alkalmazása mellett feltehetőleg intenzív kék fluoreszcenciát mutató AMP-Au NCs képződnek [65].



48. ábra: (A) A 480 nm hullámhossznál detektált emissziós intenzitás az alkalmazott AMP koncentráció függvényében ($c_{Au} = 0,1$ mM, $t = 25$ °C, $\lambda_{ex} = 335$ nm). (B) Az AMP:Au/20:1 arány mellett előállított minta UV-Vis spektruma (kék) a reaktánsok spektrumával.

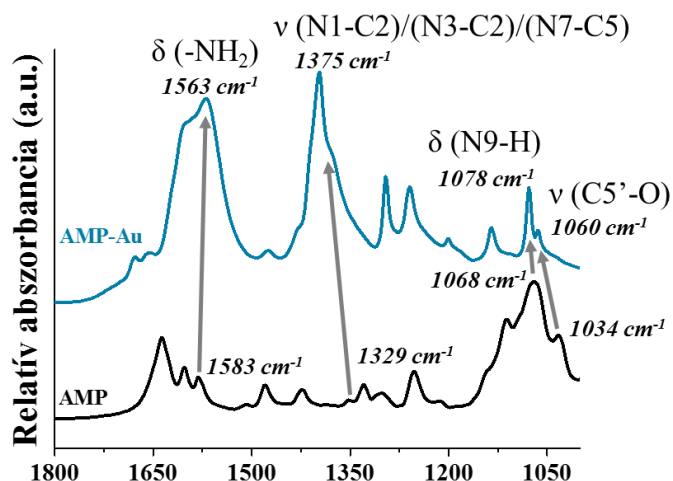
A megfelelő koncentráció-viszonyok alkalmazása mellett megállapítottuk, hogy a szintézishez használt 0,5 M koncentrációjú citromsav/citrát (pH = 6,0) puffer elegy jelenléte is meghatározó szereppel bír, hiszen enyhe redukív közeget teremt az aurácionok redukációjához. A puffer alkalmazásának szerepére irányulónan XPS méréseket végeztünk. Az egyik esetben a pufferelegy adagolása nélkül, a 24 óra szintézisidőt követően rögzítettük a spektrumot. Igazoltuk, hogy a citromsav/citrát puffer hiányában az Au(III)-ionok redukációs folyamata csak részlegesen játszódik le, mivel a mért kötési energiák Au(III) és Au(I) ionok jelentére utaltak (Au(III) $4f_{5/2} = 90,5$ eV és Au(III) $4f_{7/2} = 86,7$ eV, valamint Au(I) $4f_{5/2} = 88,5$ eV és Au(I) $4f_{7/2} = 84,8$ eV). Termékként feltehetőleg különböző összetételű Au(I)-AMP és Au(III)-AMP komplexek képződnek, melyek nem mutatnak fluoreszcens sajátságot. Ezzel szemben, ha a reakcióelegy kiindulási pH értékét a fent említett 0,5 M koncentrációjú citromsav/citrát (pH = 6,0) puffereleggyel kontrolláljuk, akkor a fémionok redukciója teljes egészében, Au(0) oxidációs állapotig végbe megy [100]. Az

így képződött fluoreszcens AMP-Au NCs esetén $4f_{5/2} = 88,3$ eV és $4f_{7/2} = 84,6$ eV kötési energiákat határoztunk meg, mely egyértelműen az Au(0) jelenlétére enged következtetni. A rögzített XPS spektrumok a **49. ábrán** láthatók.



49. ábra: Az AMP-Au rendszerek XPS spektruma (A) citromsav/citrát puffer (pH = 6,0) alkalmazása nélkül és (B) citromsav/citrát pufferrel (pH = 6,0).

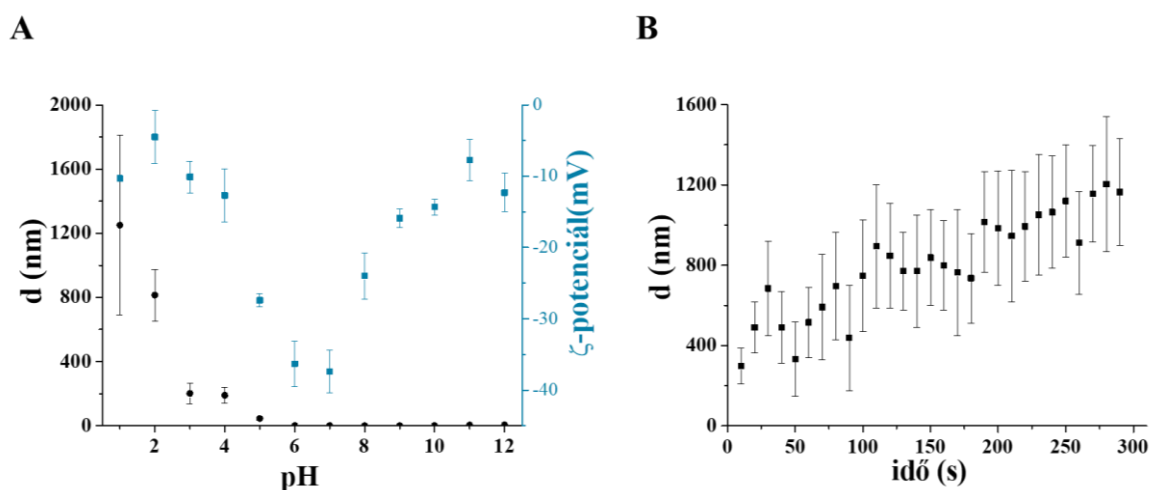
A fémion(ok) ligandumhoz történő koordinációjának felderítéséhez FT-IR méréseket végeztünk. Az **50. ábra** spektrumán látható, hogy az adenin $-NH_2$ csoportjára jellemző deformációs rezgés 1583 cm^{-1} hullámszámról 1563 cm^{-1} hullámszámra tolódik az aurationokkal való kölcsönhatás következtében. Megfigyelhető továbbá, hogy a purinbázisban található N1-C2, N3-C2 és N7-C5 kötésekhez rendelhető vegyértékrezgés a nagyobb hullámszámok felé tolódott ($1329\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1375\text{ cm}^{-1}$). Ezen rezgések frekvenciájában bekövetkező változások arra utalhatnak, hogy a reakció kezdeti szakaszán a prekursor fémionok koordinációjában az adenin gyűrű 6. számú szénatomján található aminocsoport és az adenin N7 atomja vesz részt elsődlegesen, hiszen így a fémion stabil, 5-tagú kelátgyűrűbe zárható ezen két N-atom által [146,147].



50. ábra: (A) Az AMP (fekete) és az AMP-Au NCs (kék) FT-IR spektrumai.

Az N9-H csoport deformációs ($1068\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1078\text{ cm}^{-1}$) és a ribóz molekulában található C5'-O csoport vegyértékrezgésében ($1034\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1060\text{ cm}^{-1}$) bekövetkező változások az AMP molekula konformációs változásaira utalhatnak, mely a fémion koordinatív kötésének következménye [146].

A további felhasználásokat szem előtt tartva megvizsgáltuk az AMP-Au NCs kinetikai stabilitását pH = 1–12 tartományon. A mérések során DLS technikával rögzítettük a klaszterek átlagos hidrodinamikai átmérőjét és ζ -potenciál értékeit a közeg pH értékének függvényében, melynek eredménye az **51.A ábrán** látható.



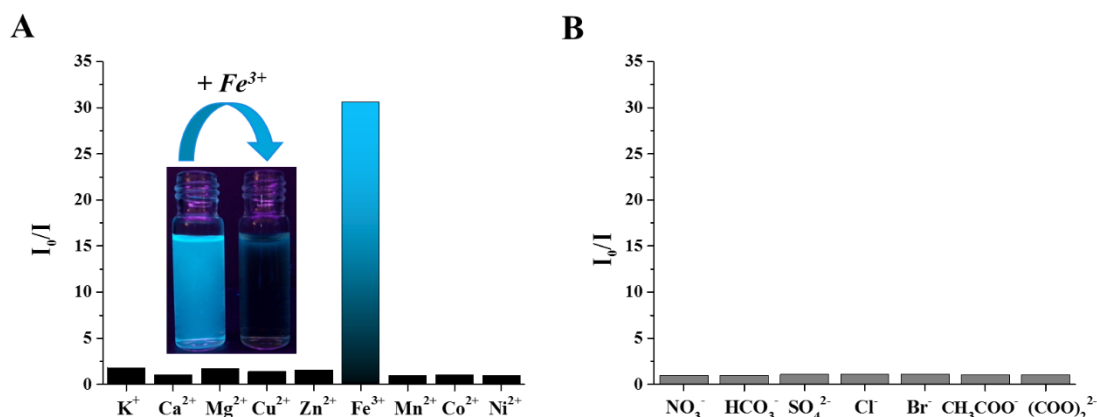
51. ábra: (A) Az AMP-Au NCs hidrodinamikai átmérője (fekete) és ζ -potenciál értékei (kék) a pH függvényében. (B) Az AMP-Au NCs hidrodinamikai átmérőjének változása az idő függvényében pH = 1,0 közegben.

Az AMP-Au NCs nagymértékű kinetikai stabilitást mutattak pH = 6–9 tartományon, mivel sem átlagos hidrodinamikai átmérőjük ($0,7 \pm 0,1$ nm, PDI = 0,181) sem pedig a mért ζ -potenciál értéke (~ -35 mV) nem utalt aggregációra. A pH < 6,0 alatti értékek esetén a klaszterek átmérője fokozatosan növekvő tendenciát mutatott a pH csökkenésével. A pH = 1,0 értéket elérve azonban egy rendkívül gyors aggregációt figyeltünk meg, ahol az átlagos átmérő mintegy ~ 400 %-os növekedést mutatott a mérési idő első 10 másodperces szakaszában (**51.B ábra**). Ennek oka feltehetőleg a nagyobb mennyiségű sav hozzáadására megnövekedő ionerősség, melynek hatására a klasztereket stabilizáló elektromos kettősréteg kompaktabbá, tömörebbé válva kinetikai instabilitást eredményez [148,149]. A nagyobb pH-tartományon (pH = 9–12) a részecskék átlagos átmérőjének kisebb növekedése volt megfigyelhető ($d \sim 20$ nm). A fluoreszcencia spektrumokról leolvasott emissziós intenzitások változása jó egyezést mutatott ezen eredményekkel. A legnagyobb fluoreszcencia intenzitás maximumokat a pH = 6–9 közötti tartományon detektáltuk; a pH < 6 és pH > 9 értékek esetén a klaszterek kék emissziójának intenzitása csökkentő tendenciát mutatott. A biokompatibilis felhasználási lehetőségek kiaknázása érdekében mindenképpen fontos megvizsgálni a klaszterek sótűrését. Ennek érdekében 0,025–5,0 M között növekvő mennyiségben adagoltunk NaCl-ot az AMP-Au NCs vizes diszperziójához. A klaszterek emissziós intenzitásában egészen 0,2 M NaCl sótartalomig nem következett be jelentősebb változás, így ez a rendszer a jövőben alkalmas lehet különféle biológiai rendszerekben (bio)szenzorok fejlesztéséhez.

5.4.2. AMP-Au NCs felhasználása Fe^{3+} -ionok szenzorikai mérésére

Amint azt a 4.3.1 fejezetben ismertettük, a klaszterek fluoreszcenciája rendkívül érzékeny a kémiai környezetre, így egyes fémionok, anionok vagy biomolekulák jelenléte nagyban befolyásolhatja fluoreszcenciájukat. Kísérleteink során számos biológiailag fontos fémionnak (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) és anionnak (NO_3^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , CH_3COO^- , $(COO)_2^{2-}$) az AMP-Au NCs fluoreszcenciájára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ezen mérésekhez minden esetben azonos térfogatú és koncentrációjú klaszter diszperziót alkalmaztunk, amelynél a fémtartalomra számított koncentráció $c_{Au} = 5 \mu M$ volt. A mérési adatok kiértékeléséhez használt Stern-Volmer ábrázolásnál minden esetben a megfelelő hígítás mellett rögzített, tisztított AMP-Au NCs $\lambda_{em} = 480$ nm hullámhossznál leolvasott fluoreszcencia intenzitás maximuma szolgáltatta az I_0 értéket. Az előzetes vizsgálatokhoz $c_{anion/kation} = 1$ mM koncentrációban adagoltuk a kiválasztott ionokat a

klaszterekhez, majd a rögzített spektrumok és a **3. egyenlet** alapján meghatároztuk az I_0/I értéket minden esetben.



52. ábra: Az AMP-Au NCs relatív fluoreszcenciája a kiválasztott **(A)** fémionok és **(B)** anionok hozzáadása után ($c_{\text{analit}} = 1 \text{ mM}$), valamint a mintáról készített fénykép a kioltást okozó Fe^{3+} -ionok adagolása előtt és után.

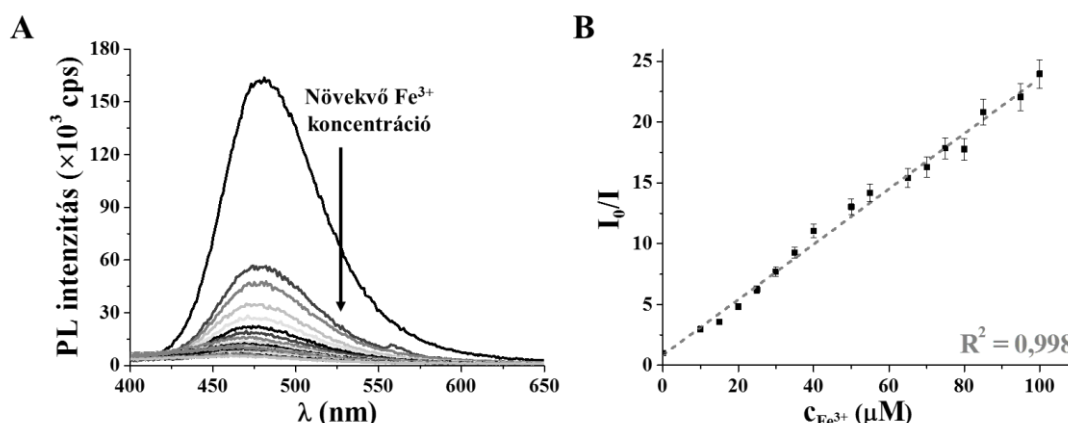
Amint az az **52. ábrán** látható, fluoreszcencia kioltás csak a Fe^{3+} -ionok hatására következett be. Mivel az AMP molekula számos funkcióscsoportja nem vesz részt a klaszter felületéhez való kötődésben [147], így lehetőség nyílik a Fe(III) -ionok koordinációjára is ezen szabad csoportokon keresztül. A vas fontos nyomelem az élő szervezetekben, amely jelentős szerepet játszik az oxigénszállításban és különféle elektrontranszfer folyamatokban. Pontos koncentrációjának meghatározása *pl.* az ivóvizekben elengedhetetlen, mivel az Európai Unió Tanácsának 1998. november 3-i 98/83/EK irányelve szerint az emberi fogyasztásra szánt ivóvíz vastartalma nem haladhatja meg a $200 \mu\text{g dm}^{-3}$ ($\sim 3,5 \mu\text{M}$) értéket.

A Fe^{3+} -ionok szenzorikai mérésére az elmúlt évekből számos publikációt találhatunk a szakirodalomban. A legtöbb esetben a vas(III)ionok okozta aggregációt követő fluoreszcencia intenzitás csökkenésből határozták meg a fémion tartalmat különféle ipari víz vagy vészérum mintákból. X. Mu és *mtsai* *L*-prolinnal stabilizált Au klasztereket alkalmaztak ezen eljárásra, miközben a fémion mennyiségét $2\text{--}5000 \mu\text{M}$ koncentrációtartomány között változtatták az analitikai vizsgálatokhoz. Az analitikai paraméterek meghatározásán túl a klaszter újrahasznosíthatóságát is bebizonyították, mivel a hozzáadott fémion EDTA (etilén-diamin-tetraacetát) komplexképző ligandum segítségével 83,5 %-ban eltávolítható volt [150]. Q. Zhao és *mtsai*. ugyanezen célra már 3,3',5,5'-tetrametil-benzidinnel érzékenyített GSH-Au klasztereket használtak, amely során rendkívül alacsony $\text{LOD}_{\text{Fe}^{3+}}$ értéket ($1,25 \text{ nM}$) határoztak meg. A detektálás kolorimetrikus

(színváltozásos) kimutatáson alapult, amely méréseknél már nem fluoreszcencia változást, hanem a fémion koordinatív kötése miatt fellépő színváltozást detektálták [151]. A legtöbb esetben ezen publikációkban azonban nem térnek ki a klaszterek és a fémion közötti kölcsönhatás termodinamikai elemzésére, ezáltal a reakciópartnerek közötti kölcsönhatás mélyebb felderítésére. Ennek következtében munkánk egyik fontos céljaul tűztük ki a kioltási folyamat részletes tanulmányozását is.

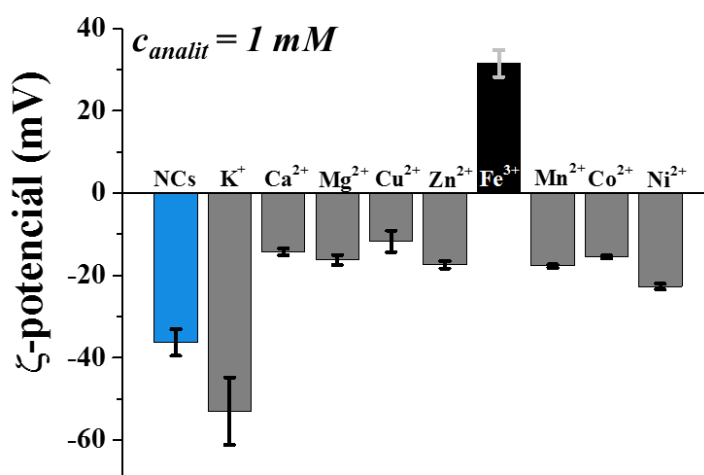
A szenzorikai mérések kiértékelése során első lépésként a legkisebb kimutatható mennyiséget és a dinamikus tartományt határoztuk meg, akár csak a γ G-Au NCs/Kyn rendszer esetében. A Fe^{3+} -ionokat 1 nM–1 mM koncentráció-tartományban vizsgálva a LOD értéke 2 μM -nak adódott, mivel ezen koncentráció mellett a jel/zaj arány magasabb volt, mint 3 [151]. A további vizsgálatokhoz ezt alkalmaztuk, mert a 4.3.1. fejezetben ismertetett 12. egyenlet alapján szintén hasonló értéket kaptunk ($\sim 2,1 \mu\text{M}$). A dinamikus tartomány meghatározásához a Kyn szenzorikai méréséhez hasonlóan, ebben az esetben is a különböző koncentrációban jelen levő Fe^{3+} -ionok hatására megváltozó fluoreszcencia intenzitás maximumokat ábrázoltuk a hozzáadott fémion koncentráció függvényében, ami alapján a 10–100 μM koncentráció tartomány bizonyult lineárisnak.

A Fe^{3+} -ionok által okozott kioltás mechanizmusának megértéséhez a mérési adatokból a 4.3.1. fejezetben ismertetett Stern-Volmer kiértékelés szerint (3. egyenlet) ábrázoltuk a klaszterek relatív fluoreszcenciáját (I_0/I) a kioltó koncentrációjának függvényében. Az 53. ábrán látható, hogy a 298 K hőmérsékleten regisztrált mérési pontokra $R^2 = 0,998$ -as jósági tényezővel egyenes illeszthető, tehát a kioltási folyamat ezen a koncentráció-tartományon vagy csak tisztán sztatikus vagy csak dinamikus lehet [111].



53. ábra: (A) Az AMP-Au NCs fluoreszcencia spektrumai növekvő Fe^{3+} -ion koncentráció (10–100 μM) mellett ($t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$). (B) A klaszterek relatív fluoreszcenciája a Fe^{3+} -ionok koncentrációjának függvényében a dinamikus tartományon ($R^2 = 0,998$).

Ennek eldöntésére a szenzorikai vizsgálatokat méréseket 4 különböző hőmérsékleten (298, 303, 310 és 323 K) végeztük el. A detektált fluoreszcencia spektrumok Stern-Volmer egyenlet szerinti kiértékelése alapján meghatározott kioltási állandó (K_{sv}) a hőmérséklet növelésével csökkenő tendenciát mutatott. Ezen eredmény szerint a kioltás tisztán sztatikus a vizsgált koncentráció-tartományon, azaz a kioltó és a fluorofór egy nem-fluoreszkáló, ún. sötét komplexet alkot.

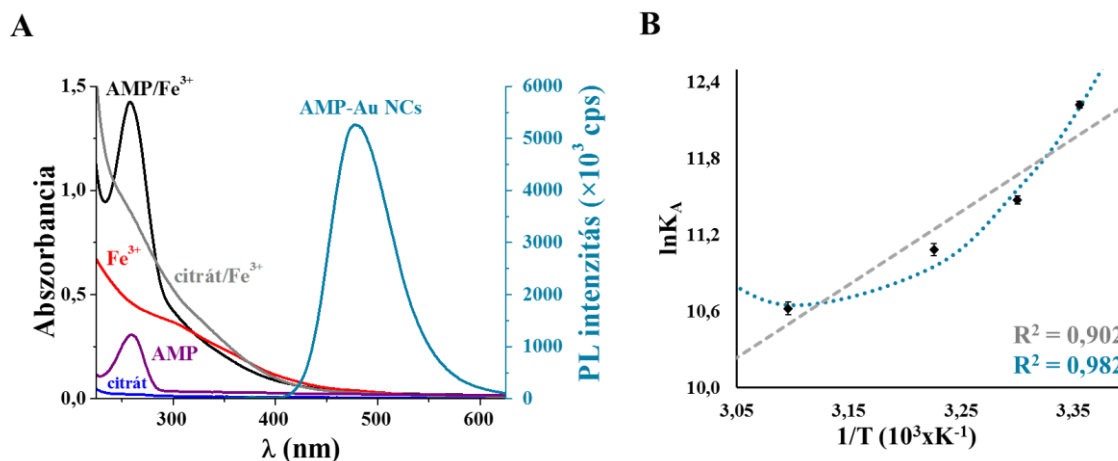


54. ábra: Az AMP-Au NCs mért ζ -potenciál értékei az egyes fémionok hozzáadása után.

Az **54. ábrán** bemutatott diagram szintén alátámasztja a komplexképződésre vonatkozó következtetéseket, hiszen látható a klaszterek felületének áttöltését csak a Fe^{3+} -ionok hozzáadásával értük el. Ezen eredményekkel jó egyezést mutatnak azon elméleti megfontolások is, melyek szerint a detektált Fe^{3+} -ionok feltehetőleg az AMP molekulák azon hard jellegű csoportjaihoz koordinálódhatnak, amelyek az FT-IR spektrumok alapján nem vesznek részt Au(III)-ionok koordinatív kötésében [152].

A sztatikus kioltás során keletkező komplex bizonyításaként további spektrofotometriás vizsgálatokat végeztünk, amelynek során megvizsgáltuk, hogy a szenzorikai méréseknél esetlegesen jelenlévő komponensek vagy ezen molekulák Fe(III)-komplexeinek[‡] (Fe(III):citrát/1:1 és Fe(III):AMP/1:1) UV-Vis spektrumai átfedhetnek-e az AMP-Au NCs emissziós spektrumával, így csökkentve a klaszter emissziójának intenzitását.

[‡] Feltételezve, hogy a tisztítás után a klaszteres diszperzióban ezen anyagok szennyezőként nyomnyi mennyiségben visszamaradhatnak.



55. ábra: (A) Az önabszorpciót befolyásolható komponensek vizes oldatainak UV-Vis spektruma az AMP-Au NCs emissziós spektrumával. (B) A van't Hoff grafikon lineáris (szürke, $R^2 = 0,902$) és nemlineáris (kék, $R^2 = 0,982$) illesztéssel.

Az **55.A ábrán** látható, hogy a rendszerben jelenlévő Fe^{3+} -ionok sem a stabilizálószerként alkalmazott AMP-tal, sem pedig a tisztítás után esetlegesen visszamaradt citromsav/citrát pufferalkotókkal nem alkot olyan komplexet, melynek abszorbanciája a klaszter emissziós hullámhossz-tartományával (405–620 nm) átfedne *ún.* önabszorpciót révén fluoreszcencia kioltást okozva. Fontos megjegyezni azt is továbbá, hogy ezen anyagok sem rendelkeznek elnyeléssel a meghatározott hullámhossz-tartományon.

A sztatikus kioltás mélyebb értelmezéséhez, a **4. egyenlet** segítségével minden mérési hőmérsékleten meghatároztuk a sötét komplex képződését leíró asszociációs állandók (K_a) értékét [153], melyek a hőmérséklet emelésével szintén csökkenő tendenciát mutattak (*Melléklet, 60. ábra*). A K_a ismeretében a kioltási folyamatot kísérő szabadentalpia-változást a **4.3.1 fejezetben** ismertetett **8. egyenlet** segítségével, míg a standard entalpia- és entrópia-változást az integrált van't Hoff egyenlet (**9. egyenlet**) alapján határoztuk meg nem lineáris paraméterbecslést alkalmazva 0,982 jósági tényezővel (**55.B ábra**). A kölcsönhatásra vonatkozó termodinamikai paramétereket a **3. táblázatba** foglaltuk össze.

3. táblázat: A T mérési hőmérsékleten meghatározott K_{SV} értékek, a számított asszociációs állandók (K_a) a hibával (SD) és az illesztés jósági tényezőjével (R^2). Továbbá a számított termodinamikai paraméterek értéke (ΔG , ΔH° , ΔS°) az AMP-Au NCs/ Fe^{3+} rendszer esetén.

T [K]	K_{SV} [M ⁻¹]	K_a [M ⁻¹]	SD	R^2	ΔG [kJ mol ⁻¹]	ΔH° [kJ mol ⁻¹]	ΔS° [kJ mol ⁻¹ K ⁻¹]
298	237000	203000	5000	0,998	-30,28 ± 0,81		
303	112000	96000	3000	0,981	-28,90 ± 0,83	-84,57 ± 8,46	-0,18 ± 0,03
310	73000	65000	3000	0,949	-28,56 ± 0,87		
323	49000	41000	2000	0,929	-28,52 ± 0,93		

Mivel a számított szabadentalpia-változás (ΔG) értéke átlagosan -29 kJ mol⁻¹, ezért a kioltási folyamata termodinamikailag kedvezményezett. A nemlineáris paraméterbecsléssel meghatározott standard entalpiaváltozás (ΔH°) -84,57 ± 8,46 kJ mol⁻¹ és a standard entrópiaváltozás (ΔS°) -0,18 ± 0,03 kJ mol⁻¹ K⁻¹ értéknek adódott. Mivel ΔH° negatív, a kioltási folyamat exoterm. A meghatározott standard termodinamikai paraméterek előjele és egymáshoz való viszonya alapján a kioltás entalpia-vezérelt ($|\Delta H^\circ| > |T\Delta S^\circ|$) folyamat; a kialakuló nemfluoreszkáló, sötét komplexet pedig feltehetőleg intermolekuláris erők stabilizálják [111,154].

6. Összefoglalás

Az elmúlt néhány évben a nanométeres mérettartományba sorolható nemesfémek (arany, ezüst) egyedülálló tulajdonságaiknak köszönhetően egyre inkább a figyelem előterébe kerülnek szenzorikai és orvosi kutatásokban. Kiemelkedő elektromos, mágneses és optikai sajátságai eredményeként potenciális bioszenzorok alapjait képezik, minek következtében az intenzív érdeklődés leginkább az arany nanorészecskék orvosdiagnosztikában és humán terápiában betöltött potenciális szerepük felé irányul.

Kutatócsoportunkban közel 10 éve kiemelt figyelmet kap a plazmonikus arany nanorészecskék és fluoreszcens sajátsággal bíró arany nanoklaszterek biokompatibilis szintéziseinek kidolgozása illetve a szintetizált arany/biomolekula hibrid nanoszerkezetek jellemzése: szerkezet és optikai tulajdonságai közötti kapcsolatuk feltérképezése, valamint potenciális hasznosíthatóságuknak vizsgálata. Ezen kutatásokba kapcsolódtam be 2014. őszén a Kémia Doktori Iskola Katalízis, felület, kolloid és anyagtudomány alprogramjába, ahol munkám során tioltartalmú fehérjék és kismolekulák (aminosavak, peptidek) kölcsönhatását vizsgáltuk tetrakloro-aurát ionokkal vizes közegben, majd ezt követően a reakciók optimalizálásának körét aromás N-tartalmú kismolekulákra is kiterjesztettük. Főbb célul tűztük ki olyan reprodukálható szintézismódszerek kidolgozását, amely során termékként jól definiált optikai sajátsággal rendelkező arany nanohibrid rendszerek keletkeznek. Meghatároztuk a szintézisek végbemenetelének jelentős kísérleti paramétereit (reaktánsok molaránya, pH, reakcióidő *stb.*), valamint széleskörűen jellemeztük a stabil nanodiszperziókat, *ill.* a fluoreszcens hibrid struktúrákat. Néhány rendszer esetén javaslatot tettük orvosdiagnosztikai és szenzorikai felhasználásokra is. Doktori munkám során kapott eredményeket az alábbi főbb pontokba foglalhatjuk össze:

- Sikeresen alkalmaztunk AuCl_4^- -ionok vizes közegű redukciójához 37 °C hőmérsékleten LYZ fehérjét. A szintézisek során szisztematikusan változtatva a komponensek tömegarányát igazoltuk, hogy lúgos közegben átlagosan $12,0 \pm 3,1$ nm átmérőjű plazmonikus Au nanorészecskék (LYZ:Au/5:1), és $1,5 \pm 0,3$ nm átlag átmérővel rendelkező fluoreszcens ($\lambda_{\text{em}} = 655$ nm) Au nanoklaszterek (LYZ:Au/20:1) előállítására is lehetőség nyílik. A kialakuló fémrészecskék mérete a LYZ mennyiségének növelésével csökkenő tendenciát mutat.

- Liofilizálás után mind a LYZ-Au NPs, mind pedig a LYZ-Au NCs akár 1 évig is eltárolhatók és aggregáció nélkül rediszpergálhatók voltak. A SAXS és FT-IR mérés technikákkal történő szerkezetvizsgálatok alapján meghatároztuk, hogy a fehérje

szerkezetében bekövetkező változások mindkét mérés technikával azonos eredményeket mutattak. A SAXS szórás görbe Kratky-reprezentációjából megállapítottuk, hogy a LYZ-Au NPs képződését követően a fehérje részlegesen kigombolyodott formában található a NPs felületén. A LYZ-Au NCs vonatkozásában a LYZ teljesen kitekeredett állapota volt azonosítható, melyet az FT-IR spektrumokból meghatározható Amid I sáv helye is igazolt (1648 cm^{-1} , rendezetlen, *ún. random coil* struktúra).

- Redukáló- és stabilizálószerként γ G immunofehérjét alkalmazva megállapítottuk, hogy a γ G:Au/1:1 tömegarány mellett előállított Au kolloidok $24,2 \pm 12,3\text{ nm}$ mérettel rendelkeznek, míg γ G:Au/15:1 tömegarány beállítása mellett vörösen emittáló ($\lambda_{\text{em}} = 645\text{ nm}$), monodiszperz méreteloszlást mutató ($1,5 \pm 0,3\text{ nm}$) fluoreszcens Au NCs-t kaptunk termékként.

- Az FT-IR és CD spektroszkópiás vizsgálatok rámutattak arra, hogy a fehérje másodlagos szerkezeti elemei a klaszterképződésnek köszönhetően megváltoznak: a döntően β -redős szerkezet β -kanyarokká és rendezetlen struktúrává (*random coil*) alakultak át. A γ G-Au NCs nagymértékű kinetikai stabilitást mutattak fiziológiai körülmények között.

- Sikeresen alkalmaztuk a γ G-Au NCs-t *L*-kinurenin (Kyn) szelektív detektálására. kinurenin útvonal főbb metabolitjai közül, csak a Kyn oltotta ki a klaszterek fluoreszcenciáját. A szenzorikai méréseket 4 különböző hőmérsékleten elvégezve a kölcsönhatás analitikai és termodinamikai paramétereit is meghatároztuk. A legkisebb kimutatható Kyn mennyiség $15\text{ }\mu\text{M}$ -nak adódott, míg a szenzorikai mérések a $15\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ Kyn koncentráció-tartományon bizonyultak lineárisnak. Meghatároztuk, hogy a γ G-Au NCs/Kyn kioltási folyamat dinamikus, termodinamikailag kedvezményezett, entrópia-vezérelt, endoterm és feltehetőleg a reakciópartnerek közötti töltésátviteli folyamat révén valósulhat meg.

- Kísérleteinkkel elsőként mutattunk rá, hogy az *L*-glutation (GSH) oldat pH-ja döntő szereppel bír az AuCl_4^- -oldattal történő kölcsönhatás során a GSH:Au/15:1 molarány mellett. Savas közeg ($\text{pH} = 2\text{--}4$) alkalmazásával sárgán emittáló ($\lambda_{\text{em}} = 590\text{ nm}$) Au(I)-tartalmú koordinációs polimer (CP) struktúra alakult ki. Megfigyeltük, hogy a fluoreszcencia intenzitás erősen csökkenő tendenciát mutatott $\text{pH} = 7$ -ig; $\text{pH} 8\text{--}10$ tartományban már egyáltalán nem volt megfigyelhető. Lúgos közegben ($\text{pH} = 10,0$ -tól indulóan) a fluoreszcencia spektrumban $\lambda_{\text{em}} = 445\text{ nm}$ -nél fokozatosan megjelent egy új emissziós sáv, mely a néhány atomos, kéken emittáló Au(0) tartalmú NCs képződését igazolhatja, melyet az XPS mérések támasztottak alá. A GSH savas és lúgos közegben megfigyelhető, eltérő

redukáló tulajdonsága feltehetőleg a molekula erősen pH-függő standard potenciál értékeivel volt magyarázható.

- Az AuCl_4^-/L -cisztein (Cys) rendszerben képződő fluoreszcens Cys-Au(I) önrendeződő CP struktúra előállítására reproduktív szintézist végeztünk el. Új eredményként kimutattuk, hogy a reaktánsok molaránya és a pH meghatározó szereppel bír a képződő termék megjelenésére és annak emissziós tulajdonságára. Megállapítottuk, hogy a legnagyobb fluoreszcencia intenzitás a Cys:Au/10:1 molaránynál volt detektálható, valamint az önrendeződő struktúra képződéséhez a savasabb környezet a preferált, amit a $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm-nél jelentkező emissziós csúcs pH = 1–8 között folyamatosan csökkenő értéke is alátámasztott. A Cys-Au(I) CP lamellás szerkezetét sikeresen igazoltuk XRD vizsgálatokkal.

- Sikeresen valósítottuk meg plazmonikus sajátssággal rendelkező ciszteinil-triptofánnal (CW) stabilizált, átlagosan $d = 8\text{--}10$ nm-es arany kolloidok lúgos közegű (pH = 11–12) szintézisét CW:Au/0,5:1 molarány mellett. Megfigyeltük, hogy növelve a reakció során a dipeptid mennyiségét (CW:Au/20:1, $c_{\text{AuCl}_4^-} = 0,1$ mM) kéken emittáló ($\lambda_{\text{em}} = 495$ nm) termék keletkezett, amelyet feltehetőleg Au(I)-tartalmú szupramolekuláris komplexek alkottak. Megállapítottuk, hogy a Trp aromás oldalláncának jelenléte sztérikusán gátolta az önrendeződő koordinációs polimer struktúra kialakulását, továbbá, hogy a fluoreszcens termék képződésére a pH nem bírt meghatározó szereppel.

- Megállapítottuk, hogy a reaktánsok koncentrációján és arányán túl a pH is meghatározó szereppel bírt az L -triptofán (Trp) aminosavval stabilizált arany nanohibrid rendszerek méretszabályozott szintézise során. Vizsgálataink eredményeképpen igazoltuk, hogy lúgos közegben (pH > 11), Trp:Au/0,4:1 arány alkalmazásával stabil, Trp-stabilizált Au kolloidok ($\lambda_{\text{max}} = 530$ nm) képződtek. Ezzel szemben erősen savas (pH < 2) közegben a Trp molarányának szisztematikus növelésével (Trp:Au/1:1, 5:1 és 15:1) zölden ($\lambda_{\text{em}} = 497$ nm), illetve kéken ($\lambda_{\text{em}} = 486$ és 472 nm) emittáló NCs képződése volt a preferált folyamat. Kimutattuk továbbá, hogy állandó arany koncentráció mellett az aminosav mennyiségének növelésével a klaszterek képződése során detektálható emisszió (472–497 nm) hangolható. A klasztereket alkotó atomok számát és a redukciót kísérő aminosav oligomerizációt az ESI és MALDI-MS mérések igazolták.

- Sikeresen alkalmaztuk az L -hisztidin (His) aminosavat AuCl_4^- -ionok vizes közegű redukációjához. Igazoltuk, hogy a képződő fluoreszcens termék jelenléte függ a közeg pH értékétől; a maximális fluoreszcencia intenzitás His:Au/30:1 molarány alkalmazása mellett

és $\text{pH} = 6,0$ -nál volt megfigyelhető. Az alkalmazott kísérleti körülmények között bekövetkező redukciós folyamat termékének szerkezetvizsgálata során kimutattuk, hogy az Au(III) -ionok (+1) oxidációs állapotig redukálódtak, amelyek feltehetően az Ag(I)/His rendszerhez hasonlóan, szerkezeti analógia alapján, helikálisan rendeződő $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ polinukleáris komplexeket alkotnak.

- Az $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ fluoreszcens komplexeket viszonylag jó kvantumhasznosításuk ($\text{QY} \sim 4\%$) miatt használtuk fel gyógyszerhordozó rendszerek fluoreszcens jelölésére. Korábban a kutatócsoport munkatársai által szintetizált marha szérum albumin/ibuprofen nanokompozit és kitozán biopolimer alapú mikrogyöngyök jelölését végeztük el sikeresen, melyet a regisztrált fluoreszcencia mikroszkópos felvételek igazolnak. A jelölt kompozitok stabilitásvizsgálata során megállapítottuk, hogy a fehérje-alapú kompozit jelölése után a fehérje kiredukálta a felületére kötött Au^+ -komplexet és néhány órán belül arany nanorészecskék képződése volt megfigyelhető. A $\text{pH} = 6,0$ esetén pozitív töltéssel rendelkező kitozán mikrogyöngyök felületén a protonált aminos csoportokkal feltehetően a komplexek deprotonált, igazoltan kötésben nem lévő karboxil csoportjai képesek voltak hidrogénhidas kölcsönhatást kialakítani, ezáltal kötődni a mikrogyöngyök felületéhez, mivel a komplex stabilan a kitozán mikrogyöngy felületén maradt a vizsgálat és a fluoreszcens mikroszkópos megfigyelés időtartama alatt.

- Megállapítottuk, hogy az $\text{AuCl}_4^-/\text{AMP}$ rendszerben az AuCl_4^- -ionok Au^0 -vá történő teljes redukciója nem következett be tisztán az AMP alkalmazásával így a szintéziseket citromsav/citrát ($\text{pH} = 6,0$) pufferben végeztük el. Az AuCl_4^- koncentrációját $0,1\text{ mM}$ értéken tartva $\text{AMP}:\text{Au}/20:1$ molarány mellett termékként kék emisszióval ($\lambda_{\text{em}} = 480\text{ nm}$) rendelkező, néhány atomos AMP-Au NCs képződtek. Ezzel szemben $0,5\text{--}5,0\text{ mM}$ közötti AuCl_4^- koncentrációk és $\text{AMP}:\text{Au}/1:1$ molarány mellett vörös színű ($\lambda_{\text{max}} = 525\text{ nm}$), $d = 10\text{--}13\text{ nm}$ átmérőjű $\text{AMP-stabilizált Au}$ kolloidokat kaptunk termékként. Az AMP-Au NCs rendszerek fiziológiás sókoncentráció alkalmazása mellett is nagymértékű kinetikai stabilitást mutattak $\text{pH} = 6\text{--}9$ között, erősen savas ($\text{pH} = 1\text{--}2$ között) közegben azonban az AMP-Au NCs gyors aggregációja következett be.

- A szenzorikai vizsgálathoz számos aniont és kationt teszteltünk. A vizsgált ionok közül nagymértékű szelektivitás csak a Fe^{3+} -ionok esetén volt megfigyelhető, melyet a nanoklaszter fluoreszcenciájának kioltása révén detektáltunk ($I_0/I > 30$). A minimálisan detektálható analit mennyiségét $2\text{ }\mu\text{M}$ -nak határoztuk meg, míg a dinamikus tartomány $10\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ Fe^{3+} -ion koncentráció között található.

- A mérési adatokból a Stern-Volmer állandó csökkenése a hőmérséklettel rámutatott, hogy az AMP-Au klaszter/ Fe^{3+} rendszer esetén sztatikus kioltás következik be. Sztatikus kioltásnál az AMP-Au NCs és Fe^{3+} -ionok egy nemfluoreszkáló komplexet alkotnak, melyet a mért ξ -potenciál értékek is alátámasztottak. Míg a többi fémion esetén a mért ξ -potenciál értékek kismértékű változást mutattak, addig egyedül a Fe^{3+} -ionok esetén állapítottuk meg a felület áttöltését (-35 mV-ról +30 mV-ra), ami a Fe^{3+} -ionok és a klaszterek felületén kötött AMP molekulák közötti koordinatív kötés kialakulására enged következtetni. Az asszociációs állandó (K_a) értékei a mérési hőmérsékleteken (298, 303, 310 és 323 K) rendre csökkenő tendenciát mutatnak. A termodinamikai paraméterek ismeretében megállapítottuk, hogy a klaszterek és Fe^{3+} -ionok közötti kioltási folyamat termodinamikailag kedvezményezett, exoterm és entalpia-vezérelt, a kialakuló sötét komplexet pedig feltehetőleg intermolekuláris erők stabilizálhatják.

7. Summary

In the last years, the nanosized noble metal (gold, silver) became increasingly in the focus of interest in the sensor and medical researches thanks to their unique properties. Because of their outstanding electrical, magnetic and optical properties, they can be the basis of potential biosensors and the intense interest is directed towards the feasible role of gold nanoparticles in medical diagnostics and human therapies.

In our research group, we have been paying close attention to the development of biocompatible syntheses of plasmonic Au NPs and fluorescence Au NCs as well as the characterization of the produced gold/biomolecule hybrid systems: study the relationship between the structure and their optical properties and investigation of their potential utilizations. In the autumn of 2014, I joined to the research group in the frame of the Catalysis, Surface, Colloidal and Material Science program of the Chemistry Doctoral School of the University of Szeged. In the first period, the interactions of thiol-containing proteins and small molecules with tetrachloro-aurate ions have been investigated in aqueous medium. Furthermore, the experimental studies have been extended to the aromatic N-containing biomolecules as well. The aim of the work was to develop reproducible synthesis methods where gold nanohybrid systems having well-defined optical properties can be formed as products. The critical parameters of the synthesis (molar ratio of reactants, pH, time ...) were determined, and the stable nanodispersions, fluorescence hybrid structures were widely characterized. For some systems, we have also proposed their possible applications for medical diagnostic and sensor field. The results of my PhD work can be summarized as follows:

- The LYZ protein was successfully applied to reduction of AuCl_4^- ions in aqueous medium at 37 °C. The weight ratios of the components was systematically changed and we found that in the alkaline medium plasmonic Au NPs (LYZ:Au/5:1) with 12.0 ± 3.1 nm in-size and fluorescent Au NCs (LYZ:Au/20:1) having 1.5 ± 0.3 nm average diameter were fabricated. The size of the metal particles showed downward trend by increasing the amount of the protein.

- After the lyophilisation, both the LYZ-Au NCs and the LYZ-Au NPs could be stored even 1 year and they could be redispersed without aggregation. Based on the structural measurements using SAXS and FT-IR techniques, it was determined that the change in the secondary structure of the protein showed same results in case of both technique. From the Kratky representation of the SAXS scattering curves, it can be concluded that the protein

had a partially unfolded structure after the formation of LYZ-Au NPs. In case of the LYZ-Au NCs the fully unfolded conformation of the protein was identified, which was supported by the location of the Amid I band (1648 cm^{-1} , random coil) on the FT-IR spectra.

- During the application of γG as reducing and stabilizing agent we found that using $\gamma\text{G}:\text{Au}/1:1$ weight ratio the prepared plasmonic Au NPs have a diameter of $24.2 \pm 12.3\text{ nm}$, while Au NCs synthesized at $\gamma\text{G}:\text{Au}/15:1$ weight ratio, showed characteristic red fluorescence at 645 nm and monodisperse distribution of the NCs with $1.5 \pm 0.3\text{ nm}$ average size was obtained.

- The FT-IR and CD spectroscopic measurements indicated that the secondary structure of the protein during the cluster formation was changed: the mainly β -sheets was transformed into β -turns and random coils. The γG -Au NCs showed high kinetic stability under physiological conditions.

- The γG -Au NCs were successfully applied for the selective detection of *L*-kynurenine (Kyn). It was found that, the measurable change of the fluorescence was detected in case of only the first metabolic molecules (Kyn) of the kynurenine pathway. The sensor measurements were carried out at 4 different temperatures and the analytical and thermodynamic parameters of the interaction were determined. In case of the Kyn the limit of detection (LOD) of $15\text{ }\mu\text{M}$ and the dynamic range of $15\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ were obtained. We suggested that the quenching process was dynamic, thermodynamically favourable, entropy-driven and endotherm. Even, a charge transfer between the clusters and the Kyn may occurs.

- Based on our experiments we confirmed first time that the pH of *L*-glutathione (GSH) solution has a dominant role on the interaction between AuCl_4^- and GSH using $\text{Au}:\text{GSH}/15:1$ molar ratio. In acidic medium ($\text{pH} = 2\text{--}4$) a yellow emitting ($\lambda_{\text{em}} = 590\text{ nm}$) Au(I) coordination polymer was formed. It has been observed that the fluorescence intensity showed downward tendency to $\text{pH } 7.0$ while between $\text{pH } 8\text{--}10$ this band was disappeared. However, in the alkali medium (from $\text{pH} = 10.0$) a new emission band was evolved at $\lambda_{\text{em}} = 445\text{ nm}$, which probably belongs to the few-atomic blue-emitting Au(0) NCs which was identified by XPS measurements. The different reducing properties of GSH in acidic and alkali medium was derived from the strong pH-dependent standard potential of the molecule.

- Reproductive synthesis of the fluorescent Cys-Au(I) self-assembly coordination polymer was carried out. As a new result it was shown that, the molar ratio of the reactant and the pH had dominant influence on the formation of the nanoproducts and its fluorescence properties. It has been found that, the largest emission intensity could be detectable at

Cys: Au/10:1 molar ratio and the more acidic medium was preferred to the formation of the self-assembly structure, which was also supported by the decreasing of the emission peak at $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ between $\text{pH} = 1\text{--}8$. The lamellar structure of the Cys-Au(I) CP was successfully confirmed by XRD.

- We successfully implemented the syntheses of 8–10 nm sized cysteinyl-tryptophan (CW)-stabilized plasmonic Au NPs ($\lambda_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$) in alkaline medium ($\text{pH} = 11\text{--}12$) using CW: Au/0.5:1 molar ratio. It has been observed that, increase in the dipeptide amount (CW: Au/20:1 and $c_{\text{Au}} = 0.1 \text{ mM}$) resulted in the formation of blue-emitting ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) products, which was probably identifiable as supramolecular Au(I)-complexes. It was established that, the aromatic side chain of tryptophan prevented the formation of self-assembly coordination polymer structure and the pH had no dominant role on the formation of the fluorescent product.

- We found that, besides the ratio and the concentration of the reactants the pH was also a crucial factor during the syntheses of size-controlled *L*-tryptophan(Trp)-stabilized Au nanohybrid systems. As a result of our experiments we have verified that, in alkaline medium ($\text{pH} > 11$) Trp-stabilized Au colloids ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) were formed using Trp: Au/0.4:1 molar ratio. In contrast, in strong acidic medium ($\text{pH} < 2$) the preferred process was the formation of blue-emitting ($\lambda_{\text{em}} = 486 \text{ and } 472 \text{ nm}$) and green-emitting ($\lambda_{\text{em}} = 497 \text{ nm}$) Au NCs. We also showed that using constant Au concentration the emission is tuneable (between 472–497 nm) with increasing the amount the amino acid. The number of the atoms in the clusters and the amino acid oligomerization, which accompanies the reduction, were confirmed by ESI- and MALDI-MS.

- The *L*-histidine was successfully applied to reduction of AuCl_4^- ions in aqueous medium. It has been proved that, the presence of the fluorescence product depended on the pH of the medium. The maximum intensity was measurable at $\text{pH} = 6.0$ and using His: Au/30:1 molar ratio. During the structural analyses of the products it has been shown that, the Au(III) ions were reduced to (+1) oxidation state, which formed $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ polynuclear complexes with helical structure similar to the Ag(I)-His system.

- Because of the relatively good quantum yield ($\sim 4\%$) of the fluorescent $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ complexes this system was used for fluorescent labelling of drug delivery systems. Bovine serum albumin/ibuprofen (BSA/IBU)-based nanocomposite and chitosan biopolymer-based microbeads which were synthesized previously in our group, were successfully marked confirmed by fluorescence microscopy images. During the stability test of the labelled

composites it was found that, the Au(I)-complexes were further reduced by the protein in case of the BSA/IBU nanocomposite, which was supported by the formation of gold particles. The deprotonated, unbounded carboxyl groups in the $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ complexes could be formed a hydrogen bond with the positive charged amino groups on the surface of the chitosan beads because the complexes stayed firmly on the surface of the microbeads during the microscopic measurements.

- It was found that, in the AuCl_4^- /AMP system the total reduction of AuCl_4^- to Au(0) was not occurred by using only the AMP molecules, so the syntheses were carried in citric acid/citrate (pH = 6.0) buffer solution. Using AMP:Au/20:1 molar ratio with 0.1 mM AuCl_4^- concentration blue-emitting ($\lambda_{\text{em}} = 480$ nm) AMP-Au NCs were formed which consisted of only a few atoms. In contrast, the application of AMP:Au/1:1 molar ratio in the gold concentration range of 0.5–5 mM resulted in the formation of 10–13 nm sized AMP-Au ($\lambda_{\text{max}} = 525$ nm) colloids. The fluorescent AMP-Au NCs showed high kinetic stability under physiological conditions (pH = 6–9 and $c_{\text{NaCl}} = 0.15$ M) because any significant changes of their optical properties, size and ξ -potential were not measureable. Although, in high acidic medium (pH = 1–2) a rapid aggregation of the AMP-Au NCs was observed.

- Numerous metal ions and anions were tested during the sensor investigations. During the studies, high selectivity was found only for Fe^{3+} ion, which was detected via the fluorescence quenching of the nanoclusters ($I_0/I > 3$). The minimum detectable amount of the Fe^{3+} ion was 2 μM and the dynamic range was appointed between 10–100 μM concentrations.

- The decrease of the Stern-Volmer constant with increasing temperature supported the static quenching process between the clusters and the Fe^{3+} ions. In case of the static quenching, a non-fluorescent complex can be formed by the interaction of the fluorophore and the quencher, which was supported by the ξ -potential values. After the addition of metal ions and anions to the clusters the ξ -potential was changed only in case of Fe^{3+} ions from -35 mV to +30 mV, which was thanks the formation of the coordinative bonding between the iron(III)ions and the clusters. Using the modified Stern-Volmer plot for static quenching the association constant (K_a) of dark complex were determined, which also showed downward trend with the growing of the temperature (298, 303, 310 and 323 K). Knowing the thermodynamic parameter we found that the quenching process between the clusters and the Fe^{3+} -ions was thermodynamically favourable, exothermic and enthalpy-controlled, and the intermolecular forces presumably stabilized the dark complex.

8. Irodalomjegyzék

1. Manotti Lanfredi, A. M.; Ugozzoli, F.; Asaro, F.; Pellizer, G.; Marsich, N.; Camus, A. *Inorganica Chim. Acta* **1992**, *192*, 271–282.
2. Kaub, C.; Augenstein, T.; Bauer, T. O.; Rothe, E.; Esmezjan, L.; Schünemann, V.; Roesky, P. W. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 4491–4499.
3. Latouche, C.; Lin, Y.-R.; Tobon, Y.; Furet, E.; Saillard, J.-Y.; Liu, C.-W.; Boucekkine, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 25840–25845.
4. Scherbaum, F.; Grohmann, A.; Krüger, C.; Schmidbaur, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1544.
5. Scherbaum, F.; Huber, B.; Müller, G.; Schmidbaur, H. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1988**, *27*, 1542–1544.
6. Rychlewska, U.; Warżajtis, B.; Glišić, B. Đ.; Živković, M. D.; Rajković, S.; Djuran, M. I. *Dalt. Trans.* **2010**, *39*, 8906.
7. Glišić, B. D.; Rajković, S.; Živković, M. D.; Djuran, M. I. *Bioorg. Chem.* **2010**, *38*, 144–148.
8. Hunter, G. *Biochem. J.* 1936, *30*, 1183–1188.
9. Fry, F. H.; Hamilton, G. A.; Turkevich, *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 1943–1946.
10. Mironov, I. V.; Makotchenko, E. V. *J. Solution Chem.* **2009**, *38*, 725–737.
11. Krajczewski, J.; Kołataj, K.; Kudelski, A. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 17559–17576.
12. Streszewski, B.; Jaworski, W.; Paclawski, K.; Csapó, E.; Dékány, I.; Fitzner, K. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *397*, 63–72.
13. Xu, X.; Zhao, Y.; Xue, X.; Huo, S.; Chen, F.; Zou, G.; Liang, X.-J. *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 3528.
14. Csapó, E.; Oszkó, A.; Varga, E.; Juhász, Á.; Buzás, N.; Körösi, L.; Majzik, A.; Dékány, I. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *415*, 281–287.
15. Rioux, D.; Meunier, M. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 13160–13168.
16. Willets, K. A.; Van Duyne, R. P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267–297.
17. Zhou, N.; Polavarapu, L.; Gao, N.; Pan, Y.; Yuan, P.; Wang, Q.; Xu, Q.-H. *Nanoscale* **2013**, *5*, 4236.
18. Smitha, S. L.; Gopchandran, K. G.; Smijesh, N.; Philip, R. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2013**, *23*, 36–43.
19. Csapó, E.; Patakfalvi, R.; Hornok, V.; Tóth, L. T.; Sipos, Á.; Szalai, A.; Csete, M.; Dékány, I. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *98*, 43–49.
20. Pothorszky, S.; Zámbo, D.; Deák, T.; Deák, A. *Nanoscale* **2016**, *8*, 3523–3529.
21. Moreau, N.; Michiels, C.; Masereel, B.; Feron, O.; Gallez, B.; Vander Borgh, T.; Lucas, S. *Plasma Process. Polym.* **2009**, *6*, 888–892.
22. Khayati, G. R.; Janghorban, K. *Adv. Powder Technol.* **2012**, *23*, 393–397.
23. Faraday, M. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, *147*, 145–181.
24. Turkevich, John; Cooper, P. H. *J. Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *55*, 55–75.
25. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801–802.
26. Piella, J.; Bastús, N. G.; Puentes, V. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 1066–1075.
27. Kuzmann, E.; Csapó, E.; Stichleutner, S.; Garg, V. K.; de Oliveira, A. C.; da Silva, S. W.;

- Sing, L. H.; Pati, S. S.; Guimaraes, E. M.; Lengyel, A.; Dékány, I.; Lázár, K. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *504*, 260–266.
28. Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J. *Langmuir* **2006**, *22*, 5882–5887.
29. Zhang, A.-Q.; Cai, L.-J.; Sui, L.; Qian, D.-J.; Chen, M. *Polym. Rev.* **2013**, *53*, 240–276.
30. Francois, T.; Onani, M.; Madiehe, A.; Meyer, M. *Int. J. Mater. Res.* **2014**, *105*, 1025–1037.
31. Shankar, S. S.; Ahmad, A.; Pasricha, R.; Sastry, M. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 1822.
32. Shukla, R.; Nune, S. K.; Chanda, N.; Katti, K.; Mekapothula, S.; Kulkarni, R. R.; Welshons, W. V.; Kannan, R.; Katti, K. V. *Small* **2008**, *4*, 1425–1436.
33. Sirajuddin; Nafady, A.; Afridi, H. I.; Sara, S.; Shah, A.; Niaz, A. *J. Iran. Chem. Soc.* **2011**, *8*, S34–S43.
34. Aswathy, B.; Avadhani, G. S.; Suji, S.; Sony, G. *Front. Mater. Sci.* **2012**, *6*, 168–175.
35. Yin, X.; Chen, S.; Wu, A. *Micro Nano Lett.* **2010**, *5*, 270.
36. Sharma, R.; Gulati, S.; Mehta, S. *J. Chem. Educ.* **2012**, *89*, 1316–1318.
37. Sujitha, M. V.; Kannan, S. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *102*, 15–23.
38. Dzimitrowicz, A.; Jamróz, P.; diCenzo, G. C.; Sergiel, I.; Kozlecki, T.; Pohl, P. *Arab. J. Chem.* **2016**, *in press*
39. Gericke, M.; Pinches, A. *Gold Bull.* **2006**, *39*, 22–28.
40. Sharma, N.; Pinnaka, A. K.; Raje, M.; Fnu, A.; Bhattacharyya, M. S.; Choudhury, A. R. *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 1.
41. Li, J.; Li, Q.; Ma, X.; Tian, B.; Li, T.; Yu, J.; Dai, S.; Weng, Y.; Hua, Y. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 5931–5944.
42. Duff, D. G.; Baiker, A.; Edwards, P. P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 272, 96.
43. Shang, L.; Dong, S.; Nienhaus, G. U. *Nano Today* **2011**, *6*, 401–418.
44. Guével, X. Le; Daum, N.; Schneider, M. Synthesis and characterization of human transferrin-stabilized gold nanoclusters. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 275103.
45. Russell, B. A.; Jachimska, B.; Komorek, P.; Mulheran, P. A.; Chen, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 7228–7235.
46. Raut, S.; Chib, R.; Rich, R.; Shumilov, D.; Gryczynski, Z.; Gryczynski, I. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3441.
47. Liu, C. L.; Wu, H. T.; Hsiao, Y. H.; Lai, C. W.; Shih, C. W.; Peng, Y. K.; Tang, K. C.; Chang, H. W.; Chien, Y. C.; Hsiao, J. K.; Cheng, J. T.; Chou, P. T. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 7056–7060.
48. Kawasaki, H.; Yoshimura, K.; Hamaguchi, K.; Arakawa, *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 591.
49. Li, Z.; Liu, R.; Xing, G.; Wang, T.; Liu, S. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 44–48.
50. Kennedy, T. A. C.; MacLean, J. L.; Liu, J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6845.
51. Chevrier, D. M. D. M.; Chatt, A.; Zhang, P.; Chatt, A. *J. Nanophotonics* **2012**, *6*, 64504.
52. Zheng, J.; Petty, J. T.; Dickson, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7780–7781.
53. Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson, R. M. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 5–8.
54. Liu, S.; Lu, F.; Zhu, J.-J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2661.
55. Xu, H.; Suslick, K. S. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3209–3214.

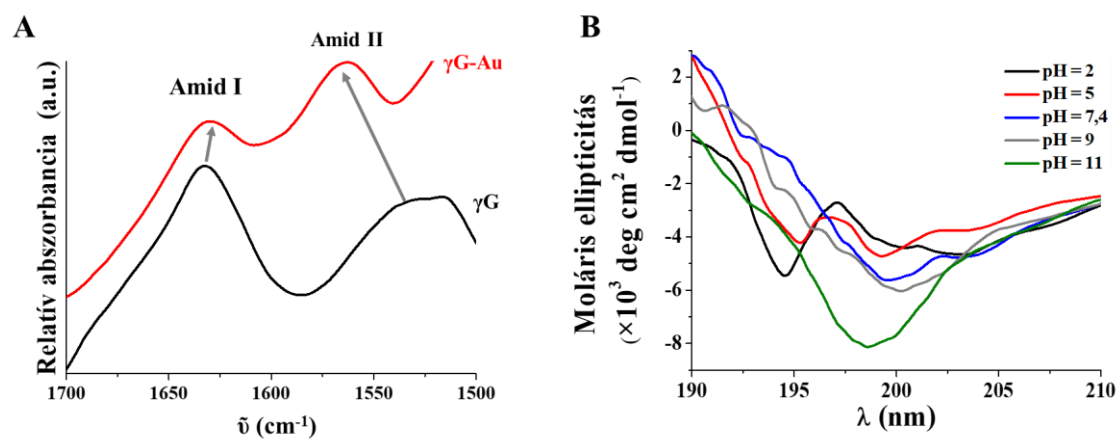
56. Li, L.; Li, Z.; Zhang, H.; Zhang, S.; Majeed, I.; Tan, B. *Nanoscale* **2013**, 5, 1986.
57. Duan, H.; Nie, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2412–2413.
58. Cui, M.; Zhao, Y.; Song, Q. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, 57, 73–82.
59. Characterization, S.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc. Commun.* **2004**, 38, 6518–6519.
60. Tsunoyama, H.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18216–18217.
61. Schooss, D.; Weis, P.; Hampe, O.; Kappes, M. M. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, 368, 1211–1243.
62. Yu, Y.; Chen, X.; Yao, Q.; Yu, Y.; Yan, N.; Xie, J. *Chem. Mater.* **2013**, 25, 946–952.
63. Xu, W. W.; Zhu, B.; Zeng, X. C.; Gao, Y. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 1–8.
64. Zheng, J.; Nicovich, P. R.; Dickson, R. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 409–431.
65. Zheng, J.; Zhou, C.; Yu, M.; Liu, J. *Nanoscale* **2012**, 4, 4073.
66. Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 888–889.
67. Simms, G. A.; Padmos, J. D.; Zhang, P. *J. Chem. Phys.* **2009**, 131, 214703.
68. Zhou, C.; Yu, J.; Qin, Y.; Zheng, J. *Nanoscale* **2012**, 4, 4228.
69. Kawasaki, H.; Hamaguchi, K.; Osaka, I.; Arakawa, R. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 3508–3515.
70. Lavenn, C.; Okhrimenko, L.; Guillou, N.; Monge, M.; Ledoux, G.; Dujardin, C.; Chiriack, R.; Fateeva, A.; Demessence, A. *J. Mater. Chem. C* **2015**, 3, 4115–4125.
71. Deák, A.; Jobbágy, C.; Marsi, G.; Molnár, M.; Szakács, Z.; Baranyai, P. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21, 11495–11508.
72. Odriozola, I.; Loinaz, I.; Pomposo, J. A.; Grande, H. J. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 4843.
73. Bayse, C. A.; Ming, J. L.; Miller, K. M.; McCollough, S. M.; Pike, R. D. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, 375, 47–52.
74. Assefa, Z.; Forward, J. M.; Grant, T. A.; Staples, R. J.; Hanson, B. E.; Mohamed, A. A.; Fackler, J. P. *Inorganica Chim. Acta* **2003**, 352, 31–45.
75. Wu, X.; He, X.; Wang, K.; Xie, C.; Zhou, B.; Qing, Z. *Nanoscale* **2010**, 2, 2244.
76. Nair, L. V.; Nair, R. V.; Shenoy, S. J.; Thekkuveetil, A.; Jayasree, R. S. *J. Mater. Chem. B* **2017**.
77. Zhang, Y.; Jiang, H.; Wang, X. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 870, 1–7.
78. Deng, H. H.; Zhang, L. N.; He, S. Bin; Liu, A. L.; Li, G. W.; Lin, X. H.; Xia, X. H.; Chen, W. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 65, 397–403.
79. Wei, H.; Wang, Z.; Yang, L.; Tian, S.; Hou, C.; Lu, Y. *Analyst* **2010**, 135, 1406.
80. Govindaraju, S.; Ankireddy, S. R.; Viswanath, B.; Kim, J.; Yun, K. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 40298.
81. Tao, Y.; Lin, Y.; Ren, J.; Qu, X. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 42, 41–46.
82. Hussain, A. M. P.; Sarangi, S. N.; Kesarwani, J. A.; Sahu, S. N. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 29, 60–65.
83. Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. *Analyst* **2011**, 136, 933–940.
84. Yu, H.; Liu, Y.; Wang, J.; Liang, Q.; Liu, H.; Xu, J.; Shao, S. *New J. Chem.* **2017**, 41, 4416–4423.
85. Ott, L. S.; Finke, R. G. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 1075–1100.
86. Lu, Y.; Chen, W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3594.

87. Jollès, J.; Schoentgen, F.; Jollès, P.; Prager, E. M.; Wilson, A. C. *J. Mol. Evol.* **1976**, 8, 59–78.
88. Pain, R. H. *Biochem. J.* **1963**, 88, 234–9.
89. Nussbaum, M. A.; Przedwiecki, J. E.; Staerk, D. U.; Lunte, S. M.; Riley, C. M. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1259–1263.
90. Cuadrado, J. A.; Zhang, W.; Hang, W.; Majidi, V. *J. Environ. Monit.* **2000**, 2, 355–359.
91. Csapó, E.; Buglyó, P.; Nagy, N. V.; Santos, M. A.; Corona, A.; Farkas, E. *Polyhedron* **2010**, 29, 3137–3145.
92. Mikulski, C. M.; Cocco, S.; De Franco, N.; Moore, T.; Karayannis, N. M. *Inorganica Chim. Acta* **1985**, 106, 89–95.
93. Ghose, R. *Synth. React. Inorg. Met. Chem.* **1992**, 22, 379–392.
94. Kassai, F.; Kedves, R.; Gyertyán, I.; Tuka, B.; Fülöp, F.; Toldi, J.; Lendvai, B.; Vécsei, L. *Pharmacol. Reports* **2015**, 67, 1188–1192.
95. Kozłowski, H.; Urbanska, J. *Polyhedron* **1990**, 9, 831–837.
96. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US: Boston, MA, 2006; ISBN 978-0-387-31278-1.
97. Juhász, Á.; Csapó, E.; Ungor, D.; Tóth, G. K.; Vécsei, L.; Dékány, I. *J. Phys. Chem. B* **2016**, 120, 7844–7850.
98. Reed, J.; Reed, T. A. *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 36–40.
99. Casaletto, M. P.; Longo, A.; Martorana, A.; Prestianni, A.; Venezia, A. M. *Surf. Interface Anal.* **2006**, 38, 215–218.
100. Peters, S.; Peredkov, S.; Neeb, M.; Eberhardt, W.; Al-Hada, M. *Surf. Sci.* **2013**, 608, 129–134.
101. Adochitei, A.; Drochioiu, G. *Rev. Roum. Chim.* **2011**, 56, 783–791.
102. Majzik, A.; Fülöp, L.; Csapó, E.; Bogár, F.; Martinek, T.; Penke, B.; Bíró, G.; Dékány, I. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, 81, 235–241.
103. Li, H.; Zhu, W.; Wan, A.; Liu, L. *Analyst* **2017**, 142, 567–581.
104. Csapó, E.; Sebők, D.; Makrai Babić, J.; Šupljika, F.; Bohus, G.; Dékány, I.; Kallay, N.; Preočanin, T. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2014**, 35, 815–825.
105. Elkak, A.; Yehya, T.; Salloub, I.; Berry, F. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2012**, 17, 584–590.
106. Routy, J. P.; Routy, B.; Graziani, G. M.; Mehraj, V. *Int. J. Tryptophan Res.* **2016**, 9, 67–77.
107. Klockow, J. L.; Glass, T. E. *Org. Lett.* **2013**, 15, 235–237.
108. Kaper, T.; Looger, L. L.; Takanaga, H.; Platten, M.; Steinman, L.; Frommer, W. B. *PLoS Biol.* **2007**, 5, 2201–2210.
109. Li, X.-J.; Ling, J.; Han, C.-L.; Chen, L.-Q.; Cao, Q.-E.; Ding, Z.-T. *Anal. Sci.* **2017**, 33, 671–675.
110. Looock, H.-P.; Wentzell, P. D. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, 173, 157–163.
111. Al-Omari, S. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2014**, 18, 297–304.
112. Shoup, D.; Lipari, G.; Szabo, A. *Biophys. J.* **1981**, 36, 697–714.
113. Bordbar, M.; Shamsipur, M.; Alizadeh, N. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2006**, 178, 83–89.
114. Schaaff, T. G.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 2630–2641.

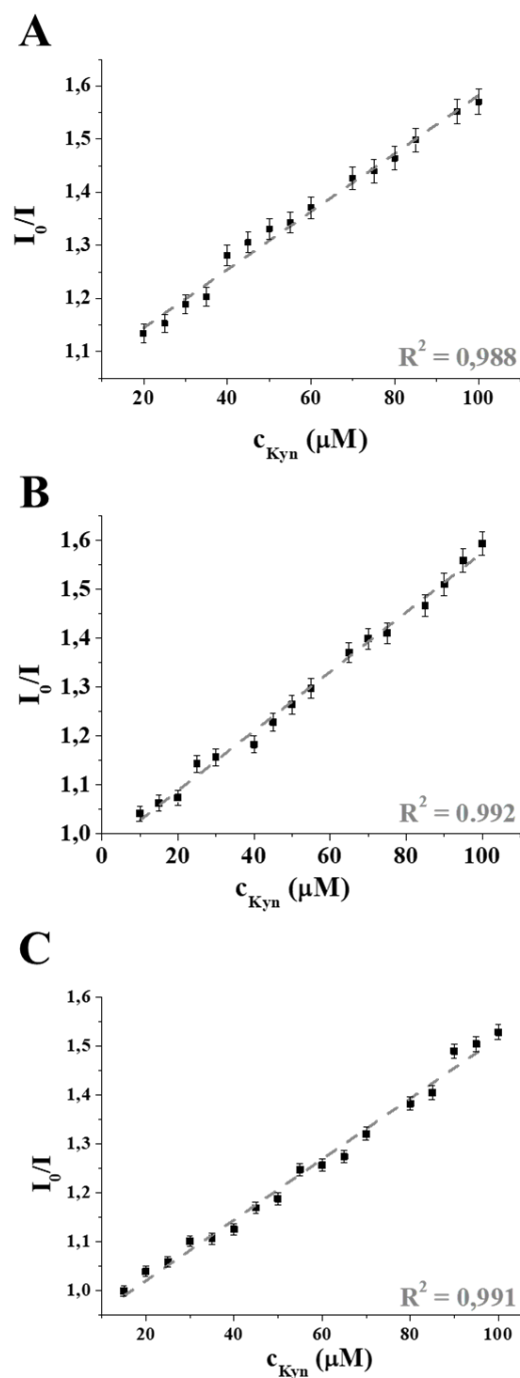
115. Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.
116. Green, D. E. *Reduct. Potentials Sulphydryl Compd.* **1933**, 678–689.
117. Schaaff, T. G.; Knight, G.; Shafigullin, M. N.; Borkman, R. F.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10643–10646.
118. Zhang, H.; Liu, Q.; Wang, T.; Yun, Z.; Li, G.; Liu, J.; Jiang, G. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *770*, 140–146.
119. Söptei, B.; Mihály, J.; Szigyártó, I. C.; Wacha, A.; Németh, C.; Bertóti, I.; May, Z.; Baranyai, P.; Sajó, I. E.; Bóta, A. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *470*, 8–14.
120. Nie, H.; Li, M.; Hao, Y.; Wang, X.; Zhang, S. X.-A. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1852.
121. Pawlukojć, A.; Leciejewicz, J.; Ramirez-Cuesta, A. J.; Nowicka-Scheibe, J. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61*, 2474–2481.
122. Mink, J.; Hajba, L.; Mihály, J.; Németh, C.; Pálmai, M.; Sandström, M. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2012**, *47*, 415–483.
123. Aryal, S.; Remant, B. K. C.; Dharmaraj, N.; Bhattarai, N.; Kim, C. H.; Kim, H. Y. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2006**, *63*, 160–163.
124. Barth, A. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073–1101.
125. Mutulis, F.; Gogoll, A.; Mutule, I.; Yahorava, S.; Yahorau, A.; Liepinsh, E.; Wikberg, J. E. S. *Molecules* **2008**, *13*, 1846–1863.
126. He, X.; Yam, V. W. W. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2111–2123.
127. Antoine, R.; Bertorelle, F.; Broyer, M.; Compagnon, I.; Dugourd, P.; Kulesza, A.; Mitrič, R.; Bonačić-Koutecký, V. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 7829–7832.
128. Bukowska, J.; Jackowska, K. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *322*, 347–356.
129. Grose, K. R.; Bjeldanes, L. F. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 188–193.
130. Barth, A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 141–173.
131. Amat-Guerri, F.; López-González, M. M. C.; Martínez-Utrilla, R. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3749–3752.
132. Zhu, M.; Aikens, C. M.; Hollander, F. J.; Schatz, George C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5883–5885.
133. Wen, X.; Yu, P.; Toh, Y. R.; Tang, J. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 11830–11836.
134. Balzani, V.; Juris, A.; Venturi, M.; Campagna, S.; Serroni, S. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 759–834.
135. Yam, V. W.-W.; Lo, K. K.-W. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 323–334.
136. Carl L. A. Schmidt, Paul L. Kirk, and W. K. A.. *J. Biol. Chem.* **1930**, *88*, 285.
137. Nomiya, K.; Takahashi, S.; Noguchi, R.; Nemoto, S.; Takayama, T.; Oda, M. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3301–3311.
138. Matei, A.; Drichko, N.; Gompf, B.; Dressel, M. *Chem. Phys.* **2005**, *316*, 61–71.
139. Al-Maythalony, B. A.; Wazeer, M. I. M.; Isab, A. A. *Inorganica Chim. Acta* **2009**, *362*, 3109–3113.
140. Wang, H. L.; O'Malley, R. M.; Fernandez, J. E. *Macromolecules* **1994**, *27*, 893–901.
141. Yang, X.; Shi, M.; Zhou, R.; Chen, X.; Chen, H. *Nanoscale* **2011**, *3*, 2596–2601.
142. McGaughey, G. B.; Gagné, M.; Rappé, A. K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15458–15463.
143. Varga, N.; Benko, M.; Sebok, D.; Dékány, I. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 616–622.

144. Li, Y.; Yin, Q.; Deng, M.; Cui, J.; Jiang, B. *Chinese J. Polym. Sci.* **2009**, 27, 335–341,
145. Lopez, A.; Liu, J. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 3653–3661.
146. Kundu, J.; Neumann, O.; Janesko, B.; Zhang, D.; Lal, S.; Barhoumi, A.; Scuseria, G. E.; Halas, N. J. *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 14390–14397.
147. Liu, J. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, 58, 99–111.
148. Grahame, D. C. *Chem. Rev.* **1947**, 41, 441–501.
149. Hogg, R.; Healy, T. W.; Fuerstenau, D. W. *Trans. Faraday Soc.* **1966**, 62, 1638.
150. Mu, X.; Qi, L.; Dong, P.; Qiao, J.; Hou, J.; Nie, Z.; Ma, H. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 49, 249–255.
151. Zhao, Q.; Yan, H.; Liu, P.; Yao, Y.; Wu, Y.; Zhang, J.; Li, H.; Gong, X.; Chang, J. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 948, 73–79.
152. Martin, R. B. *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 32–38.
153. Huang, S.; Qiu, H.; Liu, Y.; Huang, C.; Sheng, J.; Su, W.; Xiao, Q. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, 136, 955–962.
154. Ross, P. D.; Subramanian, S. *Biochemistry* **1981**, 20, 3096–3102.

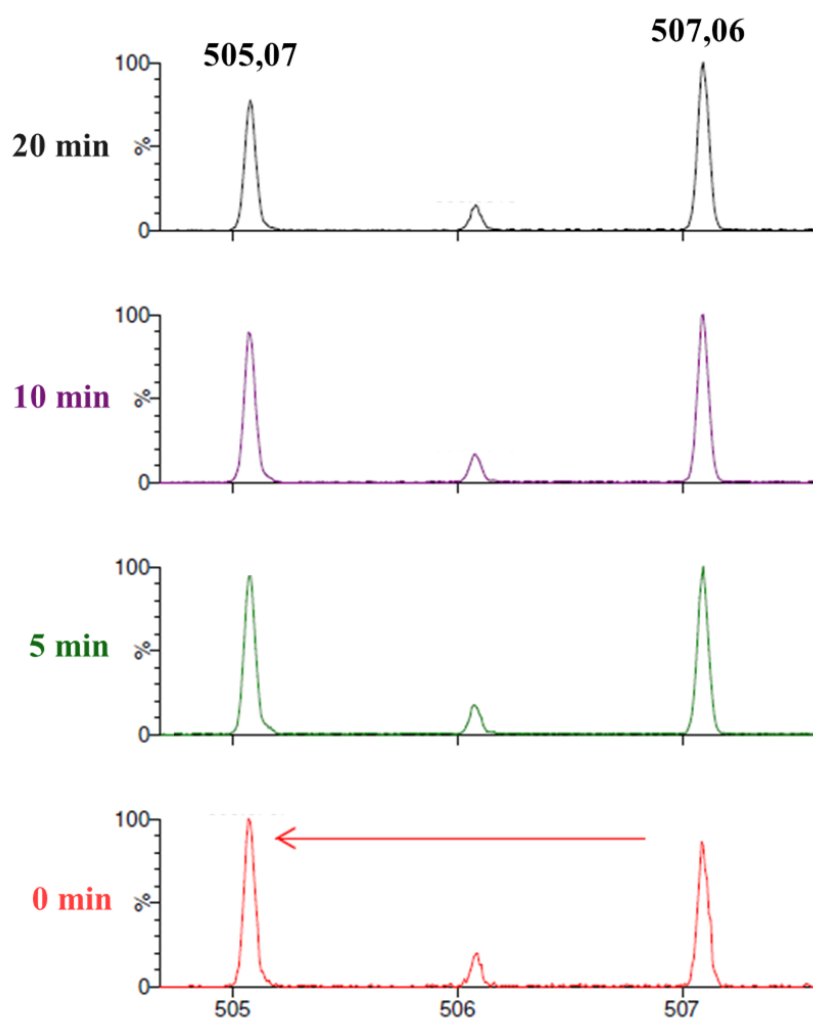
9. Melléklet



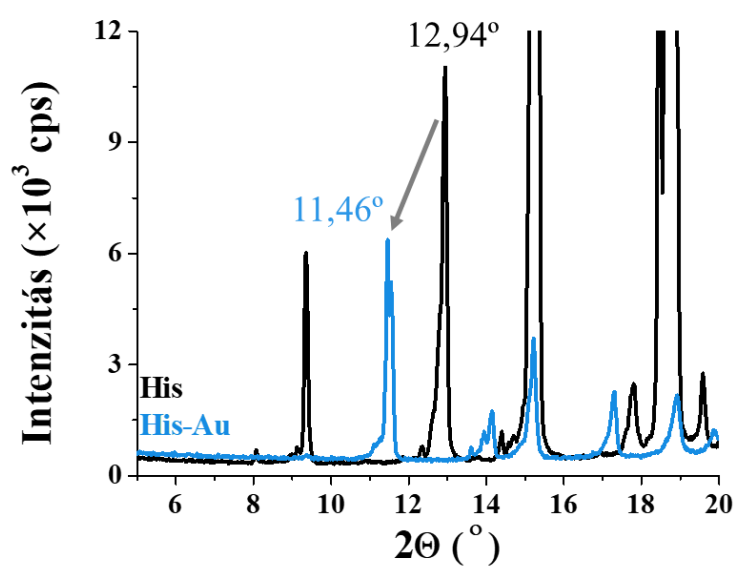
56. ábra: (A) A γ G és a γ G-Au NCs FT-IR spektruma, valamint (B) a γ G-Au NCs CD spektruma a pH-függvényében.



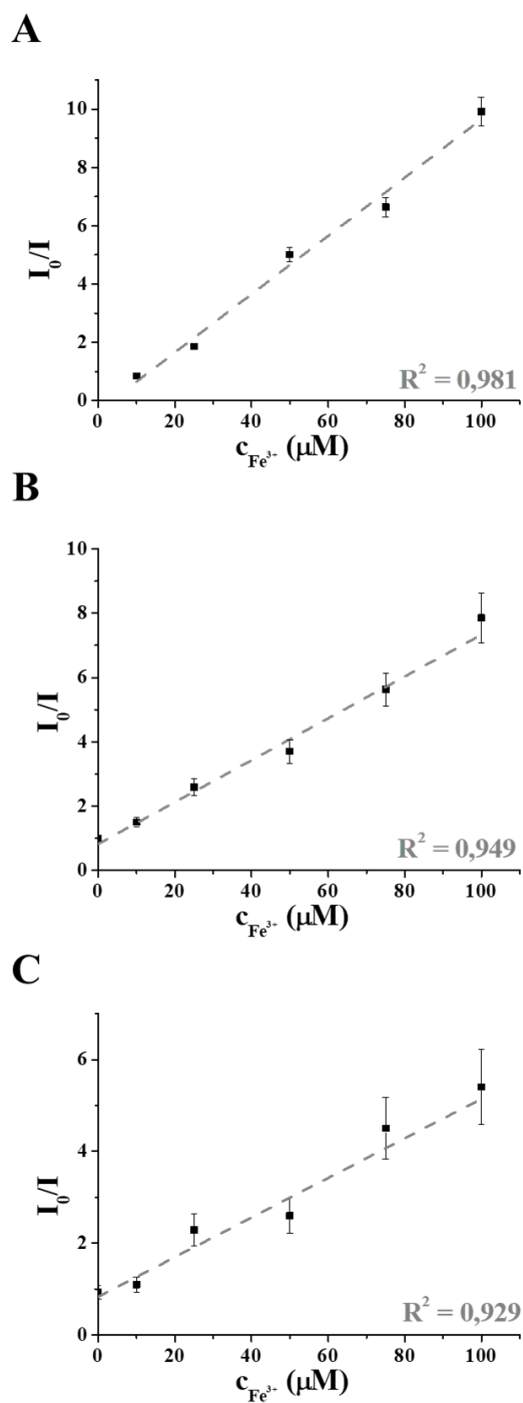
57. ábra: A Kyn szenzorikai mérésének Stern-Volmer kiértékelés (A) 303, (B) 308 és (C) 313 K hőmérsékleten.



58. ábra: A His-Au rendszer ESI-MS spektruma a szintézis kezdeti szakaszán 0 és 20 perc között.



59. ábra: Az $[\text{Au}_x\text{His}_{x+1}]^+$ tartalmú minta porformában rögzített röntgendiffraktogramja.



60. ábra: A Fe^{3+} -ionok szenzorikai mérésének Stern-Volmer kiértékelése **(A)** 303, **(B)** 310 és **(C)** 323 K hőmérsékleten.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Dékány Imre** akadémikusnak és **Prof. Dr. Tóth Gábor** intézetvezető egyetemi tanárnak, amiért biztosították számomra, hogy a doktori értekezéshez kapcsolódó kutatásaimat az általuk vezetett kutatócsoportban végezhessem.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Juhászné Dr. Csapó Editnek**, hogy az elmúlt évek során támogatott az általam felvázolt kutatási irányvonalak kivitelezésében és megtanított rá, hogyan szemléljük más-más aspektusból a kapott eredményeket.

Külön köszönet illeti **Juhász Ádám** doktorjelöltet, amiért a szenzorikai mérések eredményeinek kiértékelését és megértését elősegítő termodinamikai háttérhez segítő keze nyújtott.

Köszönöm továbbá **Dr. Sebők Dánielnek**, **Dr. Baranyai Péternek**, **Dr. Oszkó Albertnek** és **Dr. Varga Erikának** a SAXS, fluoreszcencia élettartam és kvantumhasznosítás, valamint az XPS mérésekben nyújtott segítségüket.

Szeretném megköszönni a Kutatócsoportunk valamennyi volt és jelenlegi tagjának – főként **Marótiné Szokolai Hajnalkának**, hogy mind a kellemes légkörrel, mind pedig baráti beszélgetésekkel hozzájárultak a dolgozathoz.

Végül szeretném megköszönni **férjemnek** kitartó türelmét, mellyel végig kísért az egyetemi éveim alatti jobb és nehezebb időszakokon. Valamint hálás szívvel köszönöm **szüleimnek és testvéremnek**, hogy mindvégig biztattak az akadályok leküzdésében és hittek bennem.

A kutatómunka dologi háttérét a GINOP-2.3.2-15-2016-00038 azonosító számmal rendelkező „Intelligens fémvegyületek” pályázati projekt biztosította 2017-től.



11. Publikációs lista

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10052666

A doktori munkához közvetlenül kapcsolódó tudományos közlemények:

- 1) V. Hornok, E. Csapó, N. Varga, **D. Ungor**, D. Sebők, L. Janovák, G. Laczkó, I. Dékány: *Controlled syntheses and structural characterization of plasmonic and red-emitting gold/lysozyme nanohybrid dispersions*, Colloid Polym. Sci. 294 (2016) 49-58. doi:10.1007/s00396-015-3781-7.

IF₂₀₁₆ = 1,723

- 2) E. Csapó, **D. Ungor**, Á. Juhász, G.K. Tóth, I. Dékány: *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. 511 (2016) 264-271. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.10.003.

IF₂₀₁₆ = 2,714

- 3) **D. Ungor**, E. Csapó, B. Kismárton, Á. Juhász, I. Dékány: *Nucleotide-directed syntheses of gold nanohybrid systems with structure-dependent optical features: Selective fluorescence sensing of Fe³⁺ ions*, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 155 (2017) 135-141. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.04.013.

IF₂₀₁₆ = 3,887

- 4) E. Csapó, **D. Ungor**, Z. Kele, P. Baranyai, A. Deák, Á. Juhász, L. Janovák, I. Dékány: *Influence of pH and aurate/amino acid ratios on the tuneable optical features of gold nanoparticles and nanoclusters*, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 532 (2017) 601-608. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.02.047.

IF₂₀₁₆ = 2,714

Σ IF = 11, 038

Egyéb tudományos közlemények:

- 5) E. P. Krivan, **D. Ungor**, C. Janáky, Z. Németh, C. Visy: *Optimization of the photoactivity of conducting polymer covered ZnO nanorod composite electrodes*, J. Solid State Electrochem. 19 (2015) 37-44. doi:10.1007/s10008-014-2587-8.

IF₂₀₁₅ = 2,327

- 6) Á. Deák, L. Janovák, E. Csapó, **D. Ungor**, I. Pálinkó, S. Puskás, T. Ördög, T. Ricza, I. Dékány: *Layered double oxide (LDO) particle containing photoreactive hybrid layers with tunable superhydrophobic and photocatalytic properties*, Appl. Surf. Sci. 389 (2016) 294-302. doi:10.1016/j.apsusc.2016.07.127.

IF₂₀₁₆ = 3,387

- 7) Á. Juhász, E. Csapó, **D. Ungor**, G.K. Tóth, L. Vécsei, I. Dékány: *Kinetic and Thermodynamic Evaluation of Kynurenic Acid Binding to GluR1₂₇₀₋₃₀₀ Polypeptide by Surface Plasmon Resonance Experiments*, J. Phys. Chem. B. 120 (2016) 7844-7850. doi:10.1021/acs.jpcb.6b05682.

IF₂₀₁₆ = 3,177

- 8) I. Kálomista, A. Kéri, **D. Ungor**, E. Csapó, I. Dékány, T. Prohaska, G. Galbács: *Dimensional characterization of gold nanorods by combining millisecond and microsecond temporal resolution single particle ICP-MS measurements*, J. Anal. At. Spectrom. 32 (2017) 2455-2462, doi:10.1039/C7JA00306D

IF₂₀₁₆ = 3,379

- 9) A. Kéri, I. Kálomista, **D. Ungor**, Á. Béteki, E. Csapó, I. Dékány, T. Prohaska, G. Galbács: *Determination of the structure and composition of Au-Ag bimetallic spherical nanoparticles using single particle ICP-MS measurements performed with normal and high temporal resolution*, Talanta 179 (2018) 193-199, doi: 10.1016/j.talanta.2017.10.056

IF₂₀₁₆ = 4,162 **Σ IF = 16,432** **$\Sigma\Sigma$ IF = 27,470**