

УДК 543.426

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ДОКСИЦИКЛИНА

© 2022 г. Т. Д. Смирнова^а, *, Е. А. Желобицкая^б, Т. Г. Данилина^а

^аСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

^бООО «Нита-Фарм» ул. Осипова, 1, к. 3, Саратов, 410010 Россия

*e-mail: smirnovatd@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2021 г.

После доработки 08.11.2021 г.

Принята к публикации 09.11.2021 г.

Показано, что наночастицы серебра, модифицированные ионами Eu^{3+} , способствуют увеличению интенсивности сигнала флуоресценции в 125 раз в аналитической системе, содержащей доксициклин, в результате сочетания резонансного и обменно-резонансного механизмов переноса энергии возбуждения. С помощью модельной системы – комплекса доксициклина с ионами Tb^{3+} – выявлена и оценена роль переноса энергии от наночастиц серебра на ион доксициклина в процессе формирования аналитического сигнала. Разработана флуориметрическая методика определения доксициклина в диапазоне концентраций 1.0×10^{-8} – 1.0×10^{-5} М, основанная на образовании комплекса антибиотика с ионами Eu^{3+} в присутствии наночастиц серебра. Уравнение градуировочного графика $y = 5.0 \times 10^7 x + 10$, $R^2 = 0.996$.

Ключевые слова: плазмонный резонанс, перенос энергии, тетрациклины, ионы европия, наночастицы серебра.

DOI: 10.31857/S004445022208014X

Определение антибиотиков тетрациклинового ряда в различных объектах является актуальной задачей аналитической химии в связи с их широким применением в медицине, животноводстве и пищевой промышленности. Флуориметрическое определение биологически активных веществ имеет ряд преимуществ, связанных с широким диапазоном определяемых концентраций, высокой чувствительностью, простотой выполнения анализа, доступностью оборудования. Использование сигнала сенсibilизированной флуоресценции, связанной с переносом энергии возбуждения, позволяет повысить чувствительность и избирательность люминесцентного определения. Участие в формировании аналитического сигнала наноматериалов с уникальными квантово-размерными свойствами способствует увеличению квантового выхода, времени жизни флуоресценции органического аналита, эффективности резонансного переноса энергии в системе донор–акцептор [1–3]. Особое значение имеет модификация поверхности нанокластеров функциональным компонентом, определяющая реакционную способность наночастиц, а также возможность повы-

шения или, наоборот, подавления эффективности резонансного переноса энергии [4–8].

Наночастицы благородных металлов характеризуются высокими молярными коэффициентами поглощения, легко перестраиваемыми спектрами флуоресценции при изменении размера и формы наночастиц, а также развитой поверхностью [9]. Оптические свойства наночастиц обусловлены наличием в области видимого света ярко выраженной резонансной полосы поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [10]. В результате взаимодействия флуорофора в возбужденном состоянии со свободными электронами наночастиц металла возможно значительное увеличение времени жизни флуоресценции органической молекулы, эффективности резонансного переноса в системе донор–акцептор.

Цель настоящей работы – изучение влияния наночастиц серебра, модифицированных ионами Eu^{3+} , на флуоресцентные свойства доксициклина и использование их при флуориметрическом определении указанного антибиотика.

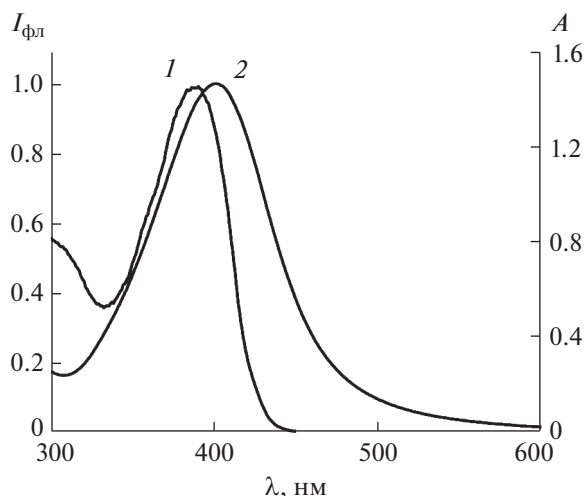


Рис. 1. Спектры возбуждения доксициклина (1) и поверхностного плазмонного резонанса наночастиц серебра (2). $c_{\text{AgNPs}} = 3.3 \times 10^{-7}$ М, $c_{\text{ДЦ}} = 1.0 \times 10^{-5}$ М.

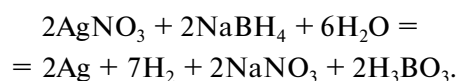
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приборы. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies, Австралия) с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина щели возбуждения – 10 нм, флуоресценции – 20 нм. Скорость регистрации спектров – 300 нм/мин. Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Сигнал регистрировали под углом 90° к возбуждающему свету. Оптическую плотность растворов в видимой и УФ-области измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Значения pH растворов контролировали pH-метром pH-673 М со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения. Размер и ζ -потенциал наночастиц серебра измеряли с помощью анализатора “Zetasizer Nano ZS” (Великобритания).

Реагенты. Доксициклин (ДЦ) фирмы “Sigma”, содержание основного вещества не менее 98%; кислота уксусная, ГОСТ 61-75, х.ч.; гидроксид натрия, 0.1 М фиксаж; аммиак водный, ГОСТ 3760-79, ч.д.а.; вода бидистиллированная, ГОСТ 6709-72; нитрат серебра 99.9%, ч.д.а. (РеаХим, Россия); натрий лимоннокислый трехзамещенный 5.5-водный, ч.д.а. (РеаХим, Россия); боргидрид натрия, х.ч. (РеаХим, Россия); хлорид европия(III) шестиводный, 99.9% (AcrosOrganics, Бельгия).

Синтез наночастиц серебра (AgNPs). Наночастицы серебра синтезировали по методике [9]: 1.0 мл раствора AgNO_3 (10 мМ), 1.0 мл $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (500 мМ) и 47.0 мл бидистиллированной воды в течение 10 мин перемешивали при комнатной

температуре, добавляли 600 мкл NaBH_4 (10 мМ). Реакция восстановления продолжалась 30 мин, реакционную смесь оставляли в холодильнике на 8–9 ч для завершения роста наночастиц:



Концентрацию AgNPs в растворе (моль/л) рассчитывали по формуле:

$$c = \frac{N}{N_A V}; \quad N = \frac{3m}{4\pi r^3 \rho},$$

где N – число частиц в растворе; $N_A = 6.02 \times 10^{23}$, моль $^{-1}$ – постоянная Авогадро; V – объем раствора, л; m – масса серебра в растворе ($m = 0.0535$ г); r – радиус наночастиц, см; $\rho = 10.5$ г/см 3 – плотность серебра.

Восстановление тетрагидроборатом натрия отличается простотой и возможностью получения коллоидного раствора AgNPs определенного размера и поэтому часто используется на практике. Полученные наночастицы стремятся образовывать агрегаты, подавление этого процесса достигается в результате снижения поверхностной энергии за счет формирования двойного электрического слоя, создания кинетических препятствий и электростатического отталкивания частиц дисперсной фазы, имеющих одноименный электрический заряд. В качестве стабилизатора использовали цитрат-ион, адсорбирующийся на поверхности наночастиц и контролирующий их рост.

На положение полосы ППР наночастиц серебра влияют характеристики индивидуальных частиц и диэлектрические свойства окружающей среды [9, 10]. Спектры поглощения (рис. 1) синтезированных наночастиц содержали ярко выраженную резонансную полосу ППР при $\lambda = 405$ нм. По данным просвечивающей электронной микроскопии наночастицы имели сферическую форму и относительно узкий диапазон распределения по размерам со средним диаметром (7 ± 2) нм (рис. 2), ζ -потенциал –30 мВ, что свидетельствует об удовлетворительной стабильности золь, которая сохранялась в течение 14 сут. В течение последующих двух недель ζ -потенциал наночастиц медленно уменьшался от –30 до –20 мВ вследствие агрегации и увеличения размера наночастиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Флуоресцентные свойства доксициклина в присутствии наночастиц серебра. Можно выделить два основных условия реализации эффективного резонансного переноса энергии в системах, содержащих наночастицы серебра и флуоресцирующие биологически активные молекулы: значительное

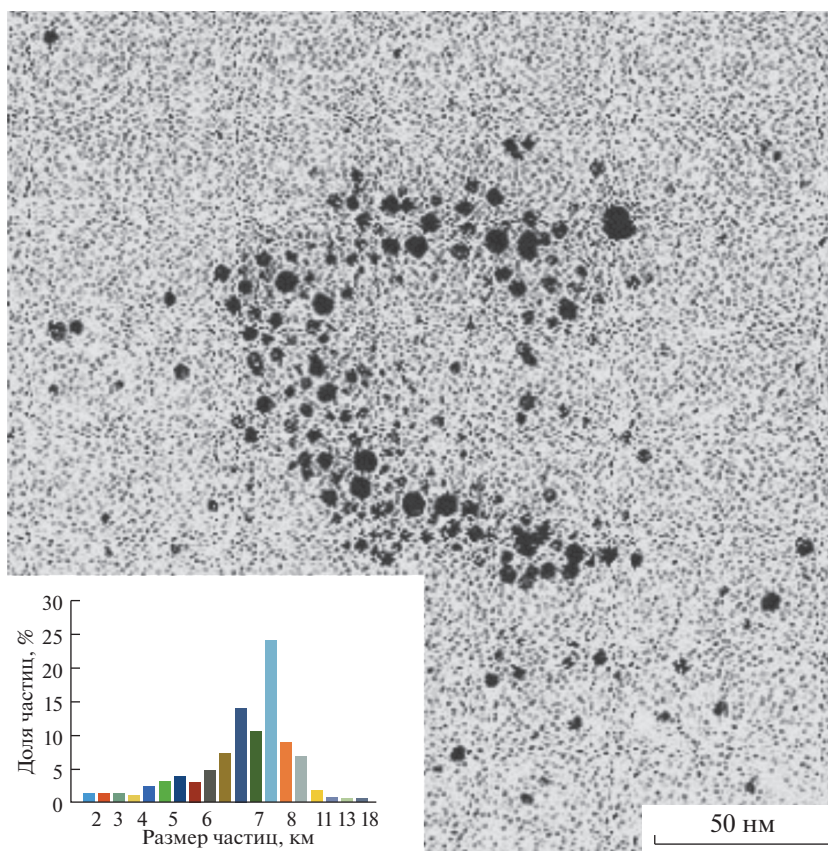


Рис. 2. Микрофотография наночастиц серебра, полученная с помощью просвечивающей электронной микроскопии, и кривая распределения наночастиц по размерам.

перекрытие полос спектров ППР наночастиц и спектров возбуждения флуоресцирующей молекулы, а также близость (расстояние 20–50 Å) компонентов пары донор–акцептор, определяющая константу скорости переноса энергии [11]. Как видно из рис. 1, первое условие выполняется для доксициклина и наночастиц серебра, синтезированных путем восстановления нитрата серебра борогидридом натрия и стабилизированных цитрат-ионом. По-видимому, высокая плотность заряда стабилизатора способствует экранированию поверхности наночастиц, увеличению расстояния в паре донор–акцептор. Ожидаемый перенос энергии возбуждения не наблюдали. С целью сокращения расстояния между доксициклином и наночастицами серебра в качестве модельного комплексообразователя использовали ион Tb^{3+} . Комплексообразование Tb^{3+} с антибактериальным лигандом исключает *внутримолекулярный* перенос энергии возбуждения ввиду того, что энергия триплетного уровня (18100–20300 cm^{-1}) доксициклина ниже резонансного уровня Tb^{3+} (5D_4 , 20500 cm^{-1}) [12]. Данная система позволила выявить и оценить вклад *межмолекулярного* переноса энергии между наночастицами серебра и ан-

тибиотиком в формирование сигнала флуоресценции аналитической системы. В качестве критерия эффективности переноса энергии использовали параметр интенсивности собственной флуоресценции доксициклина. Фотометрически установили, что в присутствии добавок доксициклина в раствор модифицированных наночастиц серебра на поверхности последних образуются смешанолигандные хелаты ионов Tb^{3+} с антибиотиком и цитрат-ионом, схема комплексов представлена на рис. 3. При комплексообразовании сокращается расстояние между донором (AgNPs) и акцептором (доксициклин) и, исключая внутримолекулярный перенос энергии, реализуются условия резонансного переноса, увеличивая интенсивность флуоресценции антибиотика в два раза (рис. 4). Возрастание люминесценции является результатом одновременного воздействия на флуорофор (доксициклин) внешнего источника излучения и локального поля поверхностного плазмона.

Влияние ионов Eu^{3+} . Дополнительно увеличить сигнал сенсibilизированной флуоресценции аналитической системы, содержащей доксициклин, возможно в случае модификации поверхности наночастиц серебра ионами Eu^{3+} . Образующийся

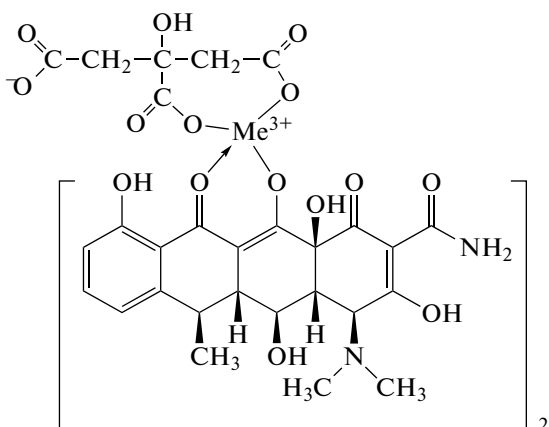


Рис. 3. Схема комплексов ионов металлов Me^{3+} (где Me^{3+} : Eu^{3+} или Tb^{3+}) с цитрат-ионом и доксициклином.

на поверхности нанообъекта смешанолигандный хелат Eu^{3+} с антибиотиком тетрациклинового ряда, таким как доксициклин, и цитрат-ионом характеризуется переносом энергии с триплетного уровня лиганда антибиотика (18100 см^{-1}) на излучательные уровни иона Eu^{3+} с последующей его флуоресценцией ($\lambda_{\text{фл}} = 615\text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}} = 390\text{ нм}$, ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ переход) [12, 13]. Наблюдаемое синергетическое увеличение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции в 125 раз является результатом коллективного воздействия энергии внешнего возбуждения и резонансного локального поля поверхностного плазмона наночастиц серебра на доксициклин (рис. 5). В таких условиях вероятность перехода доксициклином в возбужденное состояние значительно возрастает, что способствует наиболее эффективной реализации внутримолекулярного переноса энергии возбуждения.

Модификация наночастиц серебра ионами Eu^{3+} сопровождается возрастанием и перезарядкой ζ -потенциала коллоидной частицы от -30 до $+90$ мВ (рис. 6). Предполагается, что аналогичные процессы изменения ζ -потенциала возможны в коллоидных растворах серебра в присутствии ионов Tb^{3+} . Выявлены оптимальные условия модификации наночастиц серебра, позволяющие получить максимальное увеличение сигнала сенсibilизированной флуоресценции в аналитической системе [14].

Методика модификации наночастиц серебра ионами Eu^{3+} : в полипропиленовые пробирки типа Эппендорф объемом 2.0 мл вносили 1.0 мл 3.3×10^{-7} М раствора $AgNPs$, 1.0 мл 2.0×10^{-3} М раствора Eu^{3+} , центрифугировали (12000 об/мин) в течение 20 мин, $AgNPs$ отделяли, растворяли в спирте (общий объем 2.0 мл) в ультразвуковой (УЗ) ванне в течение 20 мин.

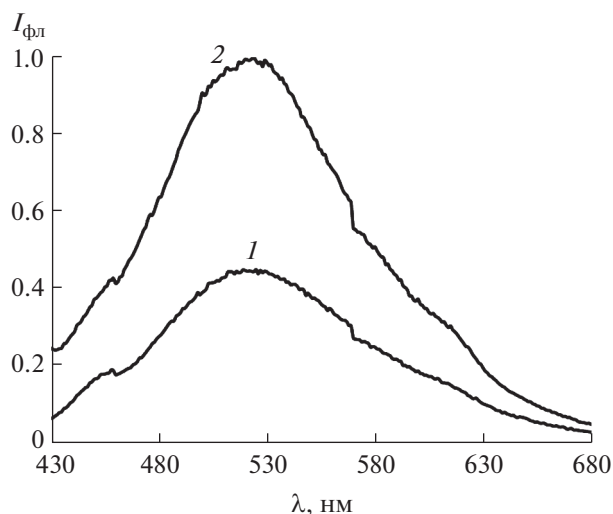


Рис. 4. Спектры флуоресценции доксициклином в отсутствие (1) и в присутствии наночастиц серебра и ионов Tb^{3+} (2). $c_{AgNPs} = 3.8 \times 10^{-7}$ М, $c_{ДЦ} = 1.0 \times 10^{-6}$ М, $c_{Tb^{3+}} = 2.5 \times 10^{-5}$ М, pH 8.0, $\lambda_{\text{возб}} = 390\text{ нм}$.

Модификация наночастиц серебра ионами Eu^{3+} происходит в результате взаимодействия ионов металла с цитрат-ионами, находящимися на поверхности наночастиц. В результате становится возможным образование смешанолигандного комплекса между координационно ненасыщенным ионом Eu^{3+} и доксициклином. Таким образом, ион антибиотика оказывается также на

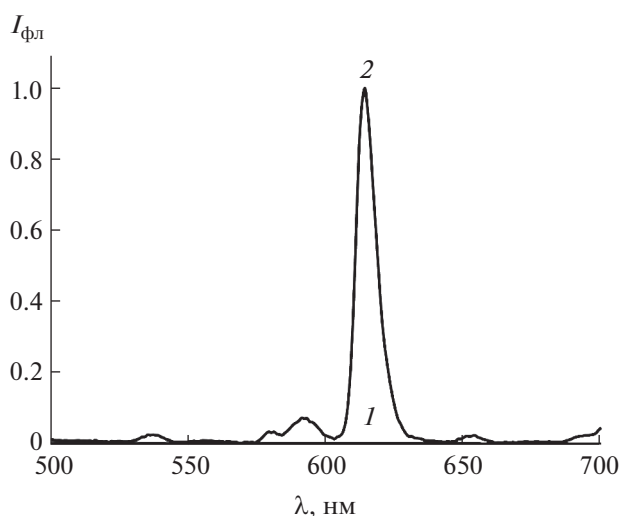


Рис. 5. Спектры флуоресценции доксициклином в отсутствие наночастиц серебра (1) и в присутствии наночастиц серебра, модифицированных ионами Eu^{3+} (2). $c_{AgNPs} = 8.0 \times 10^{-10}$ М, $c_{ДЦ} = 1.0 \times 10^{-6}$ М, $c_{Eu^{3+}} = 2.5 \times 10^{-5}$ М, pH 9.0, $\lambda_{\text{возб}} = 390\text{ нм}$.

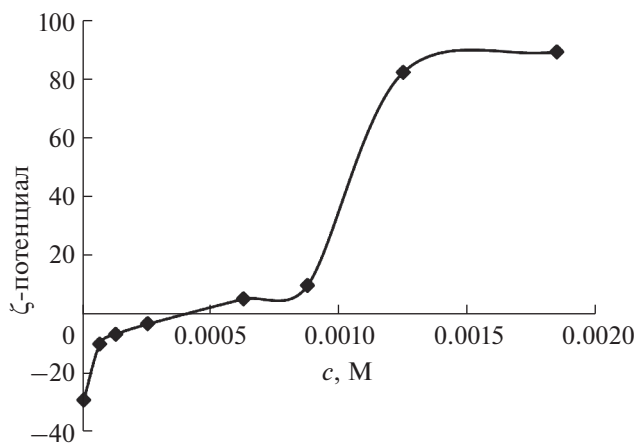


Рис. 6. Зависимость ζ -потенциала наночастиц серебра от концентрации ионов европия в растворе. $c_{\text{AgNPs}} = 3.75 \times 10^{-6}$ М.

поверхности наночастицы и создаются условия для переноса энергии.

Интенсивность сенсibilизированной флуоресценции ДЦ в присутствии модифицированных наночастиц серебра в значительной степени зависит от кислотности среды, необходимой для реализации комплексообразования ионов Eu^{3+} с доксициклином. Исследовали влияние ацетатно-аммиачного буферного раствора на интенсивность флуоресценции. Установили, что максимальный сигнал эмиссии наблюдается в слабощелочной среде при pH 8.0–9.0 в условиях, оптимальных для

Таблица 1. Результаты определения доксициклина в лекарственном препарате “Доксициклин” ($n = 3$, $P = 0.95$)

Производитель	Найдено, мг	
	$x \pm \Delta x$	s_r
Курган Синтез	101 ± 9	0.01
Озон	109 ± 4	0.03

Таблица 2. Контроль правильности определения доксициклина в препарате “Доксициклин” методом введено-найденно ($n = 3$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 4.30$)

Производство	Введено, мг	Найдено, мг	s_r	$t_{\text{эксп}}$
Курган Синтез	10	10 ± 1	0.03	2.89
	30	26 ± 14	0.14	1.87
	50	48 ± 3	0.06	2.78
Озон	10	13 ± 3	0.20	1.98
	30	29 ± 2	0.04	1.13
	50	51 ± 4	0.06	0.65

комплексообразования доксициклина с ионами Eu^{3+} . Отмеченный нами диапазон кислотности согласуется с результатом работы [15], авторы которой утверждают, что при pH 7–8.5 происходит образование достаточно прочного комплекса Eu^{3+} с тетрациклиновыми производными, сопровождающееся флуоресценцией иона металла.

В оптимальных условиях получения максимальной сенсibilизированной флуоресценции ионов Eu^{3+} построили градуировочный график для флуориметрического определения доксициклина с помощью модифицированных наночастиц серебра. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации определяемого антибиотика линейна в диапазоне концентраций 1.0×10^{-8} – 1.0×10^{-5} М. Уравнение градуировочного графика $y = 5.0 \times 10^7 x + 10$, $R^2 = 0.996$.

Методика определения доксициклина. Разработана флуориметрическая методика определения доксициклина в лекарственном препарате “Доксициклин” двух производителей. Содержимое нескольких капсул препарата измельчали в ступке, смешивали, навеску препарата, соответствующую одной капсуле, переносили в колбу емк. 25 мл с 2.0 мл соляной кислоты (1.0×10^{-8} М), растворяли с добавлением бидистиллированной воды (УЗ-ванна, 20 мин) и отделяли раствор от осадка фильтрованием (“синяя лента”), разбавляли в 100 раз, отбирали для анализа 0.1–0.5 мл в другую пробирку, смешивали с 1.0 мл буферного раствора (pH 9.0), добавляли 0.4 мл модифицированных ионами Eu^{3+} AgNPs и буферный раствор до общего объема 4.0 мл. Измеряли интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}} = 612$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 389$ нм), с помощью градуировочного графика определяли содержание доксициклина в лекарственном препарате.

Результаты определения представлены в табл. 1, правильность контролировали методом введено-найденно (табл. 2). Погрешность определения (s_r) не превышала 0.08.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, (проект № 21-13-00267).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tan H., Chen Y.* Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium(III) for detection of tetracycline in milk // *Sens. Actuators B.* 2012. V. 173. P. 262.
2. *Ding F., Zhao H., Jin L., Zheng D.* Study of the influence of silver nanoparticles on the second-order scattering and the fluorescence of the complexes of Tb(III) with quinolones and determination of the quinolones // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 566. P. 136.
3. *Shen J., Sun C., Wu X.* Silver nanoprisms-based Tb(III) fluorescence sensor for highly selective detection of dopamine // *Talanta.* 2017. V. 165. P. 369.
4. *Wang P., Wu T.-H., Zhang Y.* Novel silver nanoparticle-enhanced fluorometric determination of trace tetracyclines in aqueous solutions // *Talanta.* 2016. V. 146. P. 175.
5. *Thakur S., Kumar P., Reddy M.V., Siddavattam D., Paul A.K.* Enhancement in sensitivity of fluorescence based assay for organophosphates detection by silica coated silver nanoparticles using organophosphate hydrolase // *Sens. Actuators B: Chem.* 2013. V. 178. P. 458.
6. *Blake-Hedges J.M., Greenspan S.H., Kean J.A., McCarron M.A., Mendonca M.L., Wustholz K.L.* Plasmon-enhanced fluorescence of dyes on silica-coated silver nanoparticles: A single-nanoparticle spectroscopy study // *Chem. Phys. Lett.* 2015. V. 635. P. 328.
7. *Suslov A., Lama P.T., Dorsinville R.* Fluorescence enhancement of Rhodamine B by monodispersed silver nanoparticles // *Opt. Commun.* 2015. V. 345. P. 116.
8. *Yang X., Zhu S., Dou Y., Zhuo Y., Luo Y., Feng Y.* Novel and remarkable enhanced-fluorescence system based on gold nanoclusters for detection of tetracycline // *Talanta.* 2014. V. 122. P. 36.
9. *Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В.* Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // *Успехи химии.* 2008. Т. 77. С. 242.
10. *Шевцова В.И., Гайду П.И.* Положение полосы поверхностного плазмонного резонанса в коллоидных растворах наночастиц серебра и золота // *Вестник БГУ. Сер. 1.* 2012. № 2. С. 15.
11. *Ghosh D., Chattopadhyay N.* Gold and silver nanoparticle based superquenching of fluorescence: A review // *J. Lumin.* 2014. V. 160. P. 223.
12. *Erostyak J., Buzady A., Kaszas A., Kozma L., Hornyak I.* Time-resolved study of intramolecular energy transfer in Eu^{3+} , Tb^{3+} / β -diketone/o-phenanthroline complexes in aqueous micellar solutions // *J. Lumin.* 1997. V. 72–74. P. 570.
13. *Смирнова Т.Д., Штыков С.Н., Кочубей В.И., Хрячкова Е.И.* Перенос энергии возбуждения в хелате европия с доксициклином в присутствии второго лиганда в мицеллярных растворах неионогенных ПАВ // *Оптика и спектроскопия.* 2011. Т. 110. № 1. С. 65.
14. *Смирнова Т.Д., Желобицкая Е.А., Данилина Т.Г., Симбирева Н.А.* Флуоресцентные свойства доксициклина в присутствии нанокластеров серебра // *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2021. Т. 64. Вып. 1. С. 34.
15. *Hirsch L.M., Van Geel T.F., Winefordner J.D., Kelly R.N., Schulman S.G.* Characteristics of the binding of europium(III) to tetracycline // *Anal. Chim. Acta.* 1985. V. 166. P. 207.