

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ФАКУЛЬТЕТ РАДІОФІЗИКИ, ЕЛЕКТРОНІКИ ТА КОМП'ЮТЕРНИХ СИСТЕМ

Кафедра медичної радіофізики

«На правах рукопису»

Робота допущена до захисту в ЕК
рішенням кафедри медичної радіофізики

від _____ 2026 року, протокол № ____

Завідувач кафедри к.ф.-м. н., доцент

_____ Сергій РАДЧЕНКО

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

на тему:

**««ЗЕЛЕНІ» НАНОЧАСТИНКИ ЗОЛОТА: СИНТЕЗ І ЗАСТОСУВАННЯ У МАС-
СПЕКТРОМЕТРІЇ»**

Виконав:

студент 2-го курсу магістратури

денної форми здобуття освіти

спеціальності 105 Прикладна фізика та наноматеріали

ОНП Біомедична фізика, інженерія та інформатика

Ліннік Олександр Олександрович _____

Науковий керівник:

д. фіз.-мат. н., доцент

Іванісік Анатолій Іванович _____

к.х.н., с.н.с.

Лагута Ірина Валеріївна _____

Рецензент:

к.ф.-м. н., ст.дослід.

Петрик Ірина Сергіївна _____

Засвідчую, що у цій дипломній роботі

немає запозичень з праць інших авторів без

відповідних посилань

Студент _____ Олександр ЛІННІК

Київ – 2026

ЗМІСТ

Вступ.....	6
1. Оглядова частина.....	9
1.1 «Зелений» синтез наночастинок золота.....	9
1.2 Фізико-хімічні властивості НЧ золота.....	14
1.3 Метод мас-спектрометрії.....	29
1.3.1. МАЛДІ мас-спектрометрія	31
1.3.2. Традиційні та альтернативні матриці в мас-спектрометрії МАЛДІ-МС.....	33
1.3.3. Застосування мас-спектрометрії.....	38
1.3.3.1. Застосування МАЛДІ МС в медицині.....	39
2. Практична частина.....	41
2.1. Приготування рослинного екстракту.....	41
2.2. Приготування реакційних сумішей та синтез НЧ золота...	42
2.3. Методика мас-спектрометричного аналізу та пробопідготовка зразків.....	43
3. Результати дослідження.....	47
3.1. Одержання колоїдних систем НЧ золота-екстракт.....	47
3.2 Аналіз оптичних властивостей.....	48
3.3 Визначення розміру НЧ	51
3.3.1. Використання методу ДРС для визначення розміру НЧ...	53
3.3.2 Дослідження морфології та розміру НЧ за допомогою СЕМ.....	56

3.4. Дослідження здатності зеленої матриці до співкристалізації з аналітом.....	59
3.5. Мас-спектрометричні дослідження.....	61
Висновки.....	73
Перелік використаних джерел.....	74

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена синтезу та застосуванню «зелених» наночастинок (НЧ) у мас-спектрометрії. «Зелений» синтез НЧ із використанням екстрактів природного походження є екологічно безпечним для навколишнього середовища методом, що запобігає утворенню токсичних побічних продуктів на відміну від традиційних фізико-хімічних методів. Синтез НЧ золота (AuNC) проводили шляхом відновлення HAuCl_4 за участі компонентів екстракту вичавок льону при $25\text{ }^\circ\text{C}$ і $60\text{ }^\circ\text{C}$. Методом УФ-видимої спектроскопії (за інтенсивністю та кінетикою зміни смуги поверхневого плазмонного резонансу) встановлено формування AuNC , що підтверджує роль компонентів екстракту як ефективних відновників і стабілізаторів, а також показано, що підвищення температури з $25\text{ }^\circ\text{C}$ до $60\text{ }^\circ\text{C}$ суттєво прискорює утворення колоїду. Застосування методів СЕМ, ДРС і УФ-видимої спектроскопії дозволило охарактеризувати структурно-морфологічні характеристики AuNC : середній розмір AuNC , одержаних при 25°C і 60°C , становить менше 20 нм і 40 нм відповідно; підвищення температури від 25°C до 60°C призводить до переходу від переважно сферичних наночастинок до полідисперсних систем із різноманітними геометричними формами (трикутна, видовжена, сферична та багатокутна). Визначено, що синтезовані «зелені» AuNC забезпечують рівномірну співкристалізацію глюкози з катіонізуючими добавками по всій площі мішені. Отримані дані МАЛДІ-МС демонструють лінійну залежність між концентрацією глюкози та нормованою площею піка аддукту $[\text{Глюкоза}+\text{Na}]^+$ для AuNC -матриці, одержаних як при $25\text{ }^\circ\text{C}$, так і $60\text{ }^\circ\text{C}$. Встановлено, що AuNC -матриці, синтезовані при $25\text{ }^\circ\text{C}$, забезпечують вищу чутливість визначення глюкози методом МАЛДІ-МС завдяки монодисперсності та однорідній формі НЧ.

Таким чином, AuNC є перспективними матрицями для кількісного аналізу низькомолекулярних сполук методом МАЛДІ-МС і виступають ефективною альтернативою традиційним органічним матрицям.

ПЕРЕЛІК ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, СИМВОЛІВ

НЧ – наночастинки

ППР – поверхнево-плазмонний резонанс

AuНЧ – наночастинки золота

МАЛДІ-МС - матрично-активована лазерна десорбція/іонізація

m/z – відношення маси до заряду

ПАЛДІ - поверхнево- активована лазерна десорбція/іонізація

HAuCl₄ - тетрахлорауратна кислота

УФ - ультрафіолетове світло

$A_{\text{ппр}}$ - значеннями поглинання максимуму ППР

A_{450} - поглинання на 450 нм

ДРС - динамічне розсіювання світла

СЕМ - сканувальна електронна мікроскопія

$I_{\text{абс}}$ – значення абсолютної інтенсивності

$I_{\text{від}}$ - значення відносної інтенсивності

S_{197} - площа піку для іона з $m/z = 197$ ([Au]⁺)

S_{203} - площа піку для іона з $m/z = 203$ ([Глюкоза+Na]⁺)

$S_{\text{норм}}$ – нормована площа

ВСТУП

Останні десятиліття в різних наукових дисциплінах інтенсивно продовжує розвиватися напрямок нанотехнологій, який досліджує синтез і використання наноматеріалів. В результаті досліджень у цій сфері було створено велика кількість різноманітних типів функціональних наночастинок (НЧ) металів. Увага до НЧ металів обґрунтована їхніми особливими фізичними та хімічними властивостями, а саме розвиненою питомою поверхнею, високою теплопровідністю, вільними валентними зв'язками та підвищеною хімічною активністю. Особливе місце в дослідженні нанооб'єктів займають наночастинок благородних металів, таких як золото та срібло, які широко застосовуються у багатьох наукових галузях. Вони є перспективними завдяки унікальним та контрольованим властивостям поверхневого плазмонного резонансу (ППР), простоті синтезу, керованості розмірам та багатофункціональності. НЧ золота (AuНЧ) володіють рядом переваг, серед яких є відносна інертність, біосумісність і стабільність. Завдяки поверхневим властивостям AuНЧ легко поєднуються з молекулами білків, барвників, антитіл, ферментів і нуклеїновими кислотами. Ці властивості дозволяють використовувати такі наночастинок у біомедицині: діагностика та транспортування ліків або нуклеїнових кислот. Також AuНЧ застосовуються, як високочутливі зонди у спектроскопії та оптичній візуалізації при використанні методу посиленого комбінаційного розсіювання (Раманівська спектроскопія). Окрім того, AuНЧ широко застосовуються у фототермальній і променевої терапії, а також у комп'ютерній томографії. Завдяки своїм електричним і оптичним властивостям, а також здатності легко зв'язуватися з різними біомолекулами, AuНЧ використовують для створення високочутливих біосенсорів. На основі НЧ золота були створені біосенсиори, призначені для виявлення та кількісного аналізу аналітів у зразках сечі, результати показали високу ефективність у діагностиці захворюванню нирок, серцево-судинної системи та раку. Підбір умов синтезу дає

змогу отримувати НЧ з різною структурою, розміром та формою, що визначає подальші фізико-хімічні властивості одержаних матеріалів. Для підвищення стабільності при дослідженнях в біологічних середовищах, AuНЧ покривають білками, фосфоліпідами та полімерними сполуками. Зміна розміру частинок також дозволяє керувати оптичними властивостями, наприклад здатністю поглинати світло в ближній інфрачервоній області спектра.

НЧ благородних металів є перспективними у використанні як неорганічних матриць у методі мас-спектрометрії з лазерною десорбцією/іонізацією. Класичні органічні матриці, які застосовуються в методі мас-спектрометрії з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією (МАЛДІ-МС) є низькоефективними для аналізу низькомолекулярних сполук. Це зумовлено тим, що інтенсивні піки фрагментів, кластерів і матричних іонів у ділянці низьких значення маси до заряду (m/z) повністю маскують сигнали аналітів або перешкоджають їх точній фіксації. Щоб виправити ці недоліки проводяться дослідження щодо використання альтернативних матеріалів як матриць, наприклад наночастинки металів, бінарні матриці, іонні рідини та вуглецеві нанотрубки. Використання таких наноструктурованих субстратів виокремилося в самостійний напрям - ПАЛДІ (поверхнево- активована лазерна десорбція/іонізація).

Останнім часом увагу дослідників привертають синтезовані «зеленим» методом AuНЧ, які також розглядають як альтернативу традиційним органічним матрицям у методі МАЛДІ-МС для аналізу низькомолекулярних сполук. Матриці на основі НЧ мають вищу ефективність іонізації за рахунок плазмонних властивостей (високої поглинальної здатності щодо лазерного випромінювання), високої теплопровідності та великої питомої площі поверхні, мають вищу чутливість у виявленні різних малих молекул (можуть слугувати як матрицею, так і адсорбентом), більш інтенсивний пік сигналу, потребують меншої концентрації аналіту та виявляють гарну відтворюваність результатів. При цьому адсорбовані на поверхні НЧ компоненти рослинних екстрактів можуть додатково сприяти «м'якій»

іонізації аналіту (утворенню протонованих форм чи аддуктів) за методом сендвіча. Важливо, що інтенсивність сигналу аналізованої речовини залежить від розміру та концентрації НЧ.

У цій роботі досліджено використання «зелених» AuНЧ як матриці для аналізу модельних молекул вуглеводів (глюкози) методом МАЛДІ МС. Завдяки наявності органічної оболонки з біомолекул екстракту, а також поєднанню властивостей самих наночастинок (високої поглинальної здатності та високої теплопровідності), одержані матеріали можуть ефективно виконувати функцію матриці. Тому **метою** роботи було синтезувати наночастинки золота з використанням рослинного екстракту, отриманого із вичавок льону, дослідити вплив температури та тривалості синтезу на процес їх формування, а також оцінити ефективність застосування одержаних матеріалів у МАЛДІ-МС аналізі глюкози.

Об'єкт дослідження: процес формування наночастинок золота шляхом відновлення іонів золота складовими рослинного екстракту льону.

Предмет дослідження: вплив температури та тривалості синтезу на формування наночастинок, а також дослідження ефективності їх використання в аналізі глюкози методом МАЛДІ МС..

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 «Зелений» синтез наночастинок золота

Наночастинки металів одержують фізико-хімічними та біосентитичними методами. Фізико-хімічні методи мають два підходи: згори – вниз та знизу-вгору. При використанні методу «згори-вниз» об’ємні матеріали спочатку подрібнюють до порошкоподібного стану, а потім зменшують до нанорозмірних частинок за допомогою шліфування, термічного або лазерної абляції. Натомість підхід знизу-вгору ґрунтується на самоорганізації атомів у ядра, які потім утворюють наночастинки. Цей підхід використовується для отримання НЧ із рівномірною морфологією та стабільним хімічним складом. Серед методів цього підходу можна виділити метод Туркевича [1], який використовується для отримання сферичних наночастинок золота діаметром 10-30 нм. При використанні цього методу необхідно суворо контролювати параметри процесу: температуру, рН та концентрацію солей. Також використовується метод Брюста та метод контрольованого росту наночастинок (seed-mediated growth method). Проте більшість фізико-хімічних методів синтезу є дорогавартісними, які потребують комерційних речовин, високої температури та тиску, та несуть потенційну небезпеку для здоров’я людини через використання токсичних реагентів, відбувається утворення побічних продуктів під час синтезу та під час покриття або стабілізації НЧ. До прикладу, цетилтриметиламоній бромід є поверхнево-активною речовиною, яка використовується як стабілізатор при рості наночастинок золота у методі контрольованого росту наночастинок і виявляє високу токсичність щодо різних типів клітин, тому наночастинки, стабілізовані цією речовиною непридатні для біомедичного застосування. Тому, для застосування НЧ в біомедичних цілях використовуються біосинтетичний метод або метод «зеленого синтезу» (метод біогенного відновлення). Механізм «зеленого синтезу» НЧ золота є простим процесом та не потребує високої температури чи тиску. Цей метод синтезу

відноситься до підходу «знизу-вгору», а відновниками в цьому методі слугують екстракти природного походження, які є і стабілізаторами росту НЧ. Метод «зеленого» синтезу з використанням екстрактів природного походження є екологічно «чистими» та безпечними для навколишнього середовища та організму, не формують небезпечних побічних продуктів реакції на відміну від хімічних речовин. Спочатку біологічний екстракт (рослинний, бактеріальний або грибний) змішують із розчином солі тетрахлорауратної кислоти (HAuCl_4), що призводить до відновлення іонів золота (Au^{3+}) до атомів золота (Au^0). Потім відбувається ріст і стабілізація наночастинок золота, унаслідок чого формується колоїдний розчин наночастинок AuNPs (Рис. 1.1). Біосполуки, такі як ензими, фенольні складові та цукри, можуть брати участь як у процесі відновлення, так і стабілізації наночастинок.

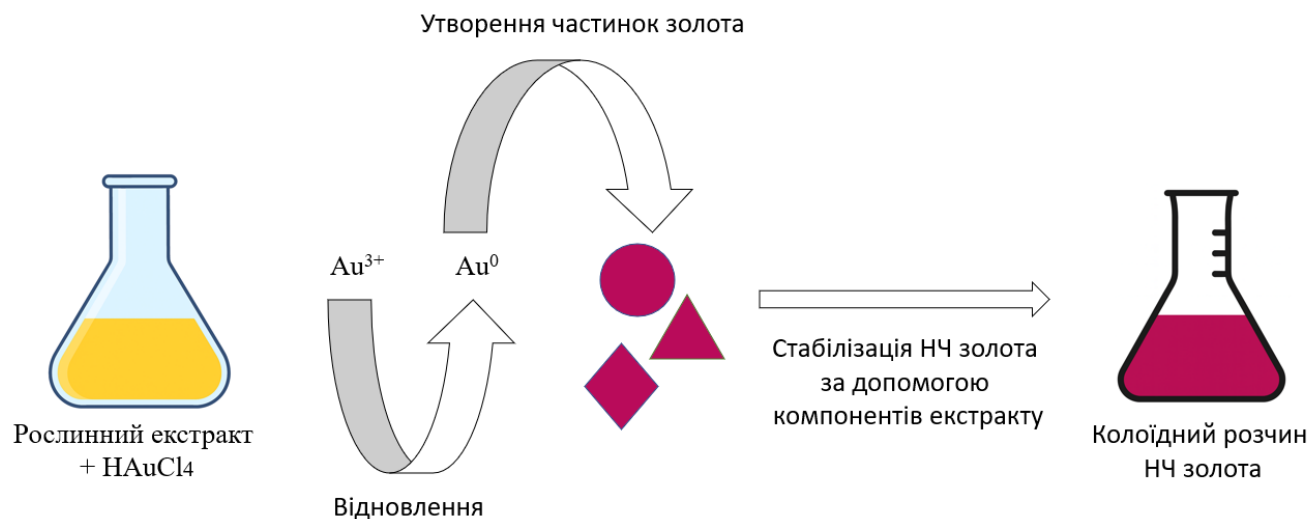


Рис. 1.1 Схематичне зображення процесу синтезу наночастинок золота

З метою одержання НЧ золота методом «зеленого» синтезу використовують різні екстракти рослин. Для ефективної реакції відновлення необхідно, щоб екстракт вміщував певні сполуки, а саме: фенольні кислоти, флавоноїди, білки, органічні кислоти, моно- та полісахариди, тощо. Всі ці компоненти можуть

відновлювати іони металів, запобігають агрегації та керують швидкістю росту кристалів. Це все дозволяє отримати різні форми НЧ металів.

Приготування екстракту гібіскуса [2] проводили наступним чином: подрібнене листя змішували з 200 мл деіонізованої води при температурі 300 К протягом 1 хв з наступною фільтрацією суміші. Для синтезу НЧ золота до 30 мл водного розчину тетрахлорауратної кислоти ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$) концентрацією 5×10^{-4} М додавали 5 мл екстракту гібіскуса та перемішували протягом 1 хв. З часом відбувався процес повільного відновлення золота, який завершився протягом 1,5 години. Висновок про завершення реакції робили за появою світло-фіолетового забарвлення в розчині, що вказувало на утворення колоїдного золота. Для отримання інших зразків змінювали об'єм доданого екстракту (10, 20 і 30 мл). Показано, що збільшення кількості екстракту прискорює процес відновлення, так при додаванні 30 мл екстракту реакція відбувалась протягом 30 хв.

В роботі [3] для синтезу використовувався квітковий екстракт, який був виготовлений з квітів дерева коуропіта гаянського. Екстракт містить функціональні групи, наприклад фенольні сполуки, алколоїди, спирти та аміни, які є донорами електронів, необхідних для відновлення Au^{3+} . Квіти були промиті дистильованою водою, висушені та подрібнені до порошкоподібного стану. Потім 1г подрібнених квітів змішували з 50 мл дистильованої води, після чого екстракт відфільтровували через фільтрувальний папір. Для синтезу НЧ золота використовували 100 мл 1мМ розчин $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$. Реакцію проводили з різним об'ємним співвідношенням екстракту до розчину HAuCl_4 , а саме 1:9, 2:8, 3:7, 4:6 та 5:5. В процесі синтезу суміш змінювала забарвлення від жовтого на фіолетово-червоний, що свідчить про формування НЧ.

Синтез наночастинок золота здійснювався у суміші глюкози та крохмалю [4], в якому глюкоза виступає відновником для НЧ золота, крохмаль є стабілізатором, що покриває поверхню НЧ і запобігає їх агрегації. Буфер, наприклад МЕК (2-N

морфолінетансульфонова кислота), забезпечує потрібний рН, який важливий для відновлення та стабілізації. В цій роботі використовували комерційні реагенти (глюкоза, крохмаль) з метою відтворення умов синтезу та контролю характеристик НЧ. Показано, що формування стабільних НЧ відбувається в нейтральному або слаболужному середовищі (рН $\sim$ 7-8). При значенні рН $\leq$ 5, навіть при високій температурі, частинки практично не утворюються, а утворюється осад або нестабільні агрегати. Синтез відбувався з використанням 0,5-2 мМ розчину HAuCl_4 , 10-30 мМ розчину глюкози, 0,6-1,0 % (від маси розчину) крохмалю, 10-30 мМ буферу. Загальний об'єм робочого розчину становив 20-100 мл. Взаємодія крохмалю (суміш амілози та амілопектину) з іонами Au^{3+} приводить до формування нестабільних наночастинок, які відразу коагулювали. Тільки комбінація глюкози, крохмалі та буферу дозволяє одержати стабільні, добре дисперговані НЧ. Автори вказують на те, що глюкоза окиснюється до глюконової кислоти. Для керування рН і контролю присутності токсичних компонентів, було досліджено 6 буферів: 2-(N-морфолінетансульфонова кислота (MES), 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота (HEPES), трис(гідроксиметил)амінометан (TRIS), піперазин-N,N'-біс(2-етансульфонова кислота) (PIPES), фосфатний буфер та амоній-ацетат. Аналіз за допомогою циклічної вольтамперометрії на монокристалічних електродах $\text{Au}(100)$, $\text{Au}(110)$, $\text{Au}(111)$ показав, що фосфатний буфер є хімічно інертний до $[\text{AuCl}_4]^-$, тобто він не відновлює іони золота, лише контролює рН. В свою чергу MES проявляє сильнішу електрохімічну активність. При потенціалах 0,7-1 В на $\text{Au}(111)$ цей буфер активно окиснюється, тобто він може виконувати роль додаткового відновника іонів золота. В результаті взаємодії з цим буфером, НЧ золота утворюються дуже швидко при кімнатній температурі. Інші буфери швидко окиснюються та не дають однорідних частинок.

В роботі [5] використовували екстракти чотирьох рослин: шавлія лікарська, вербена лимонна, пеларгонія духмяна, гранат звичайний. Процес приготування

виглядав наступним чином: 10 грамів листків або фруктів промили один раз проточною водою та два рази дистильованою водою. Після чого листки перемололи в блендері з 30 мл води доки не утворилась гомогенна рідина. Екстракт був гомогенізований шляхом перемішування, після чого його помістили в центрифугу, де перемішували протягом 2 хв. Далі відбувалось фільтрування за допомогою фільтрувального паперу (0,45 мкм). Для забезпечення біосумісності використовувалися лише частини рослин, які придатні для споживання та містять високий рівень антиоксидантів. Розчин іонів золота був приготовлений шляхом розведення 16,6 мкл 30% розчину HAuCl_4 в 50 мл подвійно дистильованій воді до концентрації 0,1 г/л. НЧ золота були синтезовані шляхом змішування 10 мл розчину золота (1 мг HAuCl_4) з 10 мл рослинного екстракту. Суміші пеларгонії духмяної та гранату звичайного швидко набула фіолетово-червоного кольору вже через декілька секунд, що вказує на утворення НЧ золота. Суміші з інших екстрактів потрібно було нагрівати до 35 – 40 °С протягом кількох хвилин для утворення НЧ золота

В роботі [6] як основу для синтезу НЧ золота було вибрано листя олдвуду (*Leucosidea sericea*), які подрібнили до порошкоподібного стану масою 107,4 г, і цей порошок екстрагували 50% водно-етанольним розчином об'ємом 1,2 л. Екстракцію проводили протягом 72 год при кімнатній температурі, періодично перемішуючи. Після чого проводили концентрування екстракту в вакуумі, в результаті чого було отримано 36,2 г сухого залишку, який розчинили у 0,5 л води та послідовно екстрагували в 0,6 л гексану, 1 л дихлорметану та 1л етилацетату. Далі розчин розділили на дві фракції, одну очищали за допомогою 80% толуол-етанолом, а іншу - 20% водного етанолу. Наночастинки золота синтезували шляхом розчинення 0,01 г екстрактів у 1 мл деіонізованої води та змішували протягом 10 хв, в результаті чого утворився прозорий жовтуватий розчин. Отриманий розчин додавали у

нагрітий, при 100°C, 1 мМ розчин натрій хлороаурата, в результаті колір розчину змінився на гранатовий, що свідчило про успішний синтез НЧ золота

В роботі [7] як основу для синтезу наночастинок був використаний сік двох сортів гранату. Сік центрифугували протягом 30 хв при 6000 об/хв, щоб відділити тверді залишки. Склад, який використовувався в синтезі, включав 1,5 мл розчину HAuCl_4 , 2 мл дистильованої води та 500 мкл гранатового соку. Суміш помішували при 120 об/хв протягом 4 годин при кімнатній температурі. Після чого отриманий колоїдний розчин центрифугували для очищення, а кінцева концентрація розчину становила $2 \cdot 10^{-11}$ М.

1.2 Фізико-хімічні властивості НЧ золота

В роботі [2] спектрофотометричним (УФ-видима спектроскопія) методом визначено, що зміна об'єму доданого екстракту впливає на положення та форму піку поверхнево-плазмонного резонансу (ППР), а саме у випадку додавання 5 мл екстракту, максимум піку знаходився при довжині хвилі 573 нм. При збільшенні вмісту екстракту, а саме 10, 20 та 30 мл, максимум зміщався у сторону нижчих довжин хвиль, 553, 548 та 550 нм відповідно (Рис. 1.2).

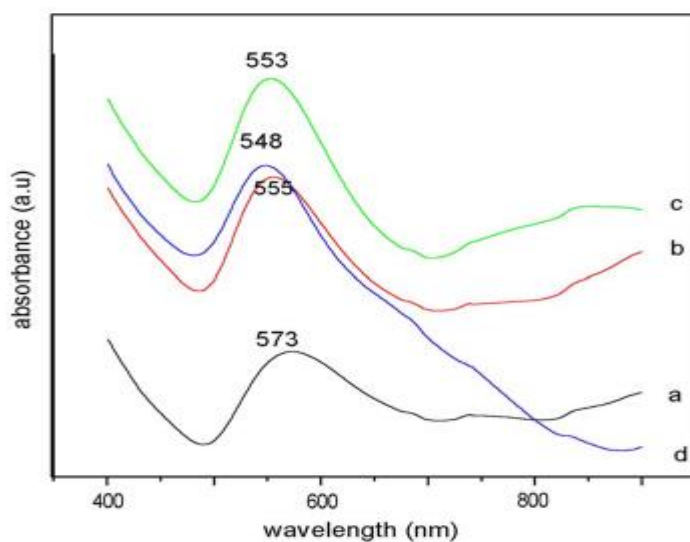


Рис. 1.2 Спектри поглинання колоїдних розчинів НЧ золота з різним вмістом екстракту.

Максимуми ППР колоїдів, які готувались з додаванням екстракту об'ємом 5-20 мл свідчать про формування анізотропних частинок: трикутників, декаєдрів та гексагонів, а формування сферичних НЧ відбувається при додаванні екстракту об'ємом 30 мл, як свідчать результати аналізу ТЕМ знімків і спектрів поглинання одержаних зразків (Рис. 1.3 і 1.4). Таким чином, вміст екстракту впливає на форму та розмір НЧ.

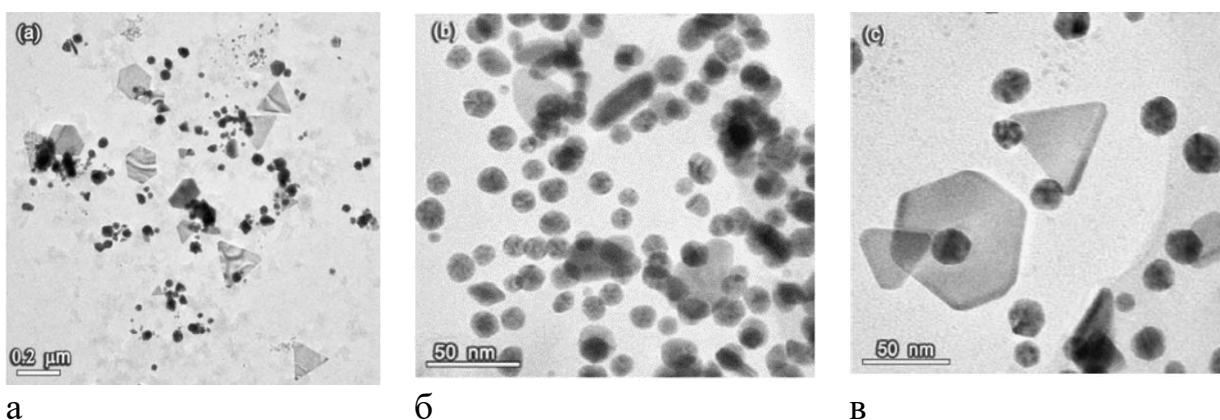


Рис 1.3 ТЕМ зображення наночастинок трьох різних за вмістом екстрактів колоїдних розчинів: а - 10 мл, б – 40 мл, в – 30 мл.

Аналіз ІЧ-Фур'є (інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є) спектрів дозволив ідентифікувати функціональні групи, які відповідають за відновлення та стабілізацію наночастинок металів у біосистемах. У спектрі екстракту гібіскусу присутні декілька смуг коливання. Смуги, які свідчать про присутність C=O та C-O карбоксильних кислот відповідають коливанням при 1733 см^{-1} та 1317 см^{-1} . Виявлено також коливання C=O пептидного зв'язку білків, яке характеризується смугою 1619 см^{-1} (амід 1) та деформаційні коливання N-H білків 1546 см^{-1} (амід 2). Смуга 1399 см^{-1} свідчить про наявність ароматичних амінів. Коливання C-O-C та C-OH полісахаридів і білкових фрагментів характеризується смугою 1022 см^{-1} (Рис. 1.4 а). Цей набір груп свідчить, що екстракт містить білки, флавоноїди, амінокислоти та органічні кислоти, які є сильними відновниками. З даних ІЧ-Фур'є спектрів можна зробити висновок про механізми відновлення. Показано, що аскорбінова кислота та фенольні групи перетворюються у дегідровані

форми, тобто вони є основними відновниками металів, а білки та амінокислоти відіграють роль стабілізаторів в результаті взаємодії аміногруп та пептидних ланцюгів з іонами металів, що приводить до сповільнення агрегації та контролю росту наночастинок.

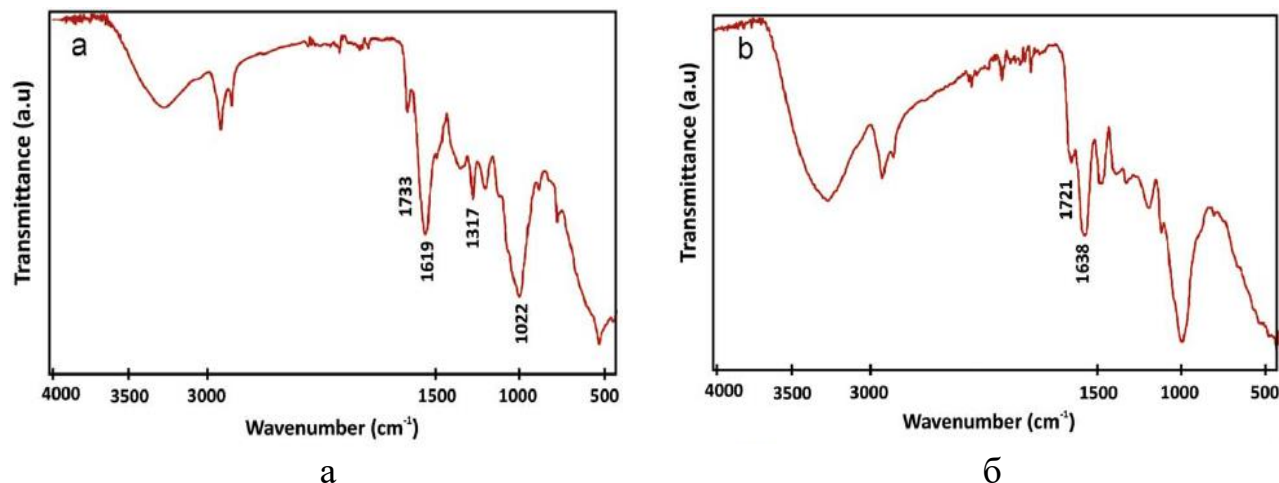


Рис. 1.4 ІЧ- Фур'є спектри висушеного листя гібіскуса без (а) та з НЧ золота (б)

Аналіз ІЧ-Фур'є спектру екстракту з НЧ золота (Рис 1.4 б) вказує на те, що смуга C=O зміщується до 1721 cm^{-1} , як і коливання при 1619 cm^{-1} , яке спостерігали в чистому екстракті, зміщується до 1638 cm^{-1} . Це вказує на взаємодію білкових аміногруп з поверхнею золота. Цей зв'язок відбувається через те, що атом азоту має неподілену електронну пару, яка взаємодіє з поверхнею золота через донорно-акцепторний механізм. В результаті цього відбувається зміна електронної густини навколо карбонільної групи, зміна конфігурації пептидного зв'язку та взаємодія НЧ золота з -COOH, про що свідчить поява C=O при 1721 cm^{-1} .

Метод рентгенівської дифракції (РФА) дозволив встановити не тільки фазовий склад НЧ, їхню орієнтацію росту та визначити розмір кристалітів.(Рис. 1.5). Максимуми рефлексів і індекси Міллера наведені в таблиці 1.1 для зразку з об'ємом 30 мл екстракту. Дані рефлекси характерні для золота, це вказує, що наночастинок є чистим золотом без оксидів або сторонніх фаз. Площина 111 у благородних металів має найнижчу поверхневу енергію та найбільшу стабільність

у колоїдних системах. Співвідношення інтенсивностей 200 і 111 дорівнює 0,37, що менше стандартного, що відповідає $\sim 0,52$. Це свідчить про те, що поверхня наночастинок збагачена площиною 111 та ріст НЧ відбувається у напрямку, перпендикулярних до площини 111.

Таблиця 1.1. Значення 2θ і індекси Міллера, одержані для зразку з об'ємом 30 мл екстракту.

2θ	індекси Міллера
$38,2^\circ$	111
$44,3^\circ$	200
$64,7^\circ$	220
$77,8^\circ$	311

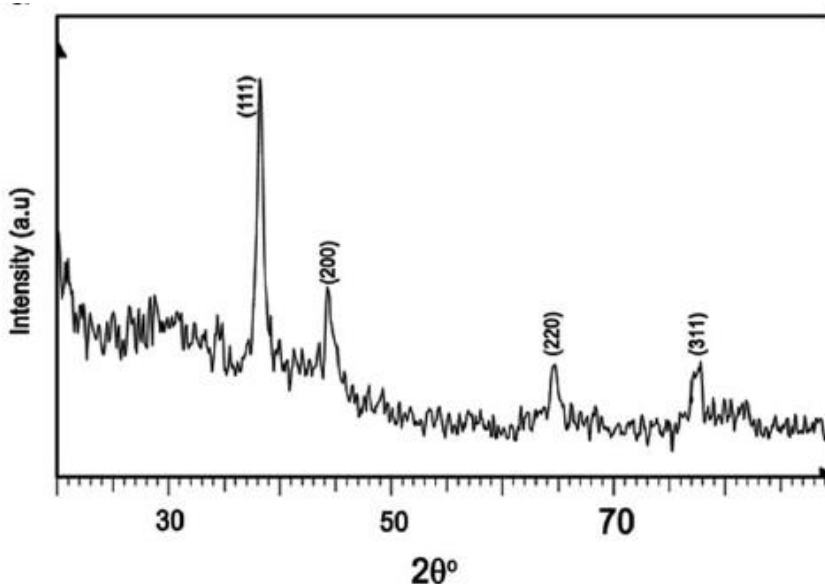


Рис 1.5 Дифрактограма зразку, який одержували з використанням екстракту об'ємом 30 мл.

Спектри поглинання [3] характеризуються інтенсивним піком при 534 нм, що вказує на те, що розмір НЧ становить близько 10-50 нм,. Спостерігається чіткий та симетричний максимум, що вказує на переважання сферичних частинок, а

відсутність піків при вищих за 600 нм довжин хвиль свідчить про малу кількість анізотропних форм. ІЧ-Фур'є спектри дозволили визначити, які саме функціональні групи беруть участь у формуванні та стабілізації НЧ золота, основні смуги яких представлені в спектрах екстракту до та після формування НЧ золота (Рис. 1.6). Зафіксовано поява смуг при 3414 см^{-1} , що відповідає коливанням фенолів (відновники), 2133 см^{-1} – алкінам (індикатори вторинних метаболітів), 1648 см^{-1} – алкенам (ароматичні структури), 1383 см^{-1} – аміним групам (стабілізуючі агенти) та 1288 см^{-1} спиртам у зразку екстракту до реакції. Після формування НЧ золота, у спектрі спостерігається зсуви коливань для фенолів з 3414 до 3615 см^{-1} та з'являється коливання при 1744 см^{-1} , що відповідає коливанню $\text{C}=\text{O}$ групи. Це вказує на те, що відбувається окиснення до альдегідних груп під час відновлення іонів Au^{3+} . Зменшення інтенсивності піків 1648 , 1383 та 1288 см^{-1} , на думку авторів, вказує на адсорбцію амінів, спиртів і фенолів на поверхні НЧAu , що забезпечує їхню стабілізацію.

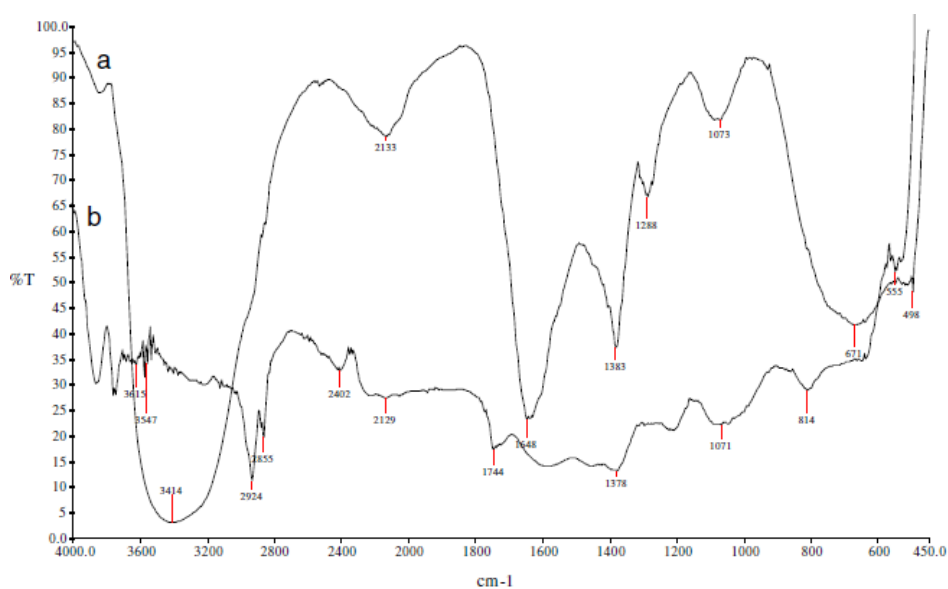


Рис. 1.6 ІЧ-Фур'є спектри: (а) екстракти квітів курупіті гвіанської, (б) наночастинок золота, синтезованих за допомогою екстракту.

За допомогою РФА визначено, що чотири дифракційні максимуми при 38° , 44° , 64° та 77° (Рис. 1.7) належать рефлексам гранецетрованої-кубічної структури

золота. Таким чином, запропонована методика дозволяє отримати кристалічні НЧ, які мають гранецетрову-кубічну структуру та не містять аморфних домішок.

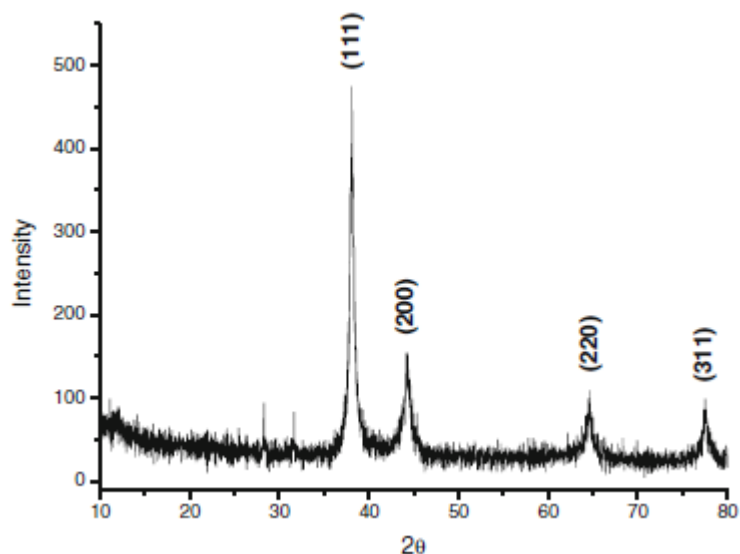


Рис. 1.7 Дифрактограма одержаних НЧ золота.

Видно, що найінтенсивнішим рефлексом є максимум при 38° , що відповідає площині 111. Це дозволяє проаналізувати механізм росту НЧ, а саме ця площина має найнижчу поверхневу енергію, в ній атоми знаходяться найщільніше один до одного, що вказує на найбільшу стабільність та найменший коефіцієнт дифузії атомів з поверхні. Вузькі та добре виражені рефлекси вказують на високий індекс кристалічності. Оскільки на графіку відсутні рефлекси, які належать Au_2O_3 та AuO , то можна зробити висновок про те, що процес відновлення $\text{Au}^{3+} > \text{Au}^0$ був повним.

Показано [4], що максимуми ППР НЧ золота, які одержували у суміші глюкози та крохмалю при різних умовах, знаходиться при довжині хвилі 520-600 нм. Для розчину з буфером РВ пік ППР знаходиться при 523 нм. Смуга ППР є вузька, симетрична, що вказує на значну монодисперсність та сферичну форму частинок, а відсутність поглинання в довгохвильовому діапазоні (>600 нм) вказує на відсутність анізотропних частинок. Для систем з буфером MES охарактеризовано різні комбінації. Перша, суміш MES з HAuCl_4 , пік ППР знаходиться при 602 нм, на що вказує синє забарвлення колоїду. Друга комбінація

– це $\text{MES} + \text{HAuCl}_4$ + крохмаль: пік ППР при 539 нм. В наступному варіанті крохмаль замінили на глюкозу, пік ППР знаходився при 602 нм, але спостерігається його уширення, що вказує на формування НЧ різних розмірів. В останньому варіанті використали суміш всіх компонентів: пік ППР був при 521 нм, що відповідає монодисперсним НЧ розміром ~ 4 нм. В результаті використання MES утворилися сферичні, добре відокремлені одні від одного частинки, які оточені тонким шаром залишків крохмалю (Рис. 1.8).

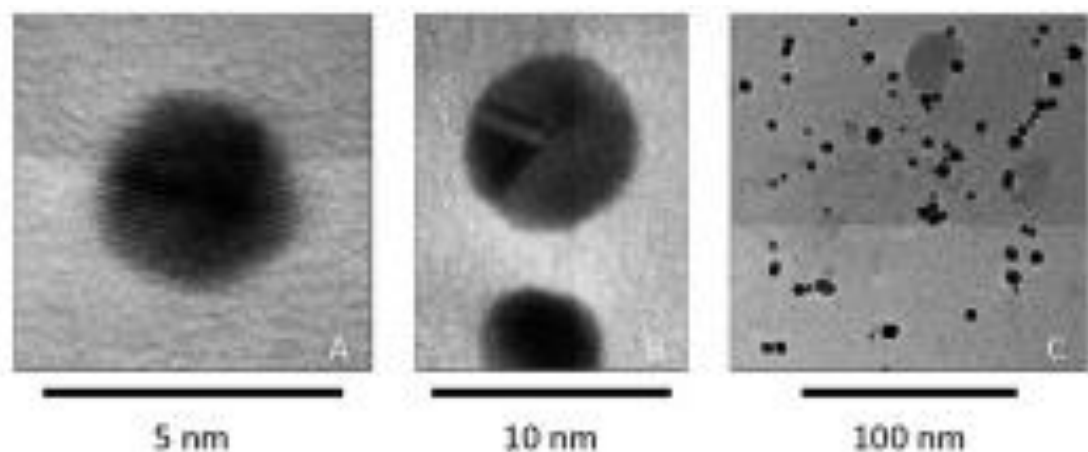


Рис. 1.8. ТЕМ зображення наночастинок золота з різним масштабом

Атомно-силовий мікроскоп дозволив кількісно оцінити товщину шару крохмалю (Рис. 1.9). Проводилась процедура визначення середньої висоти до очищення та після очищення від надлишків крохмалю та глюкози та визначено, що товщина крохмального шару становить 10-12 нм.

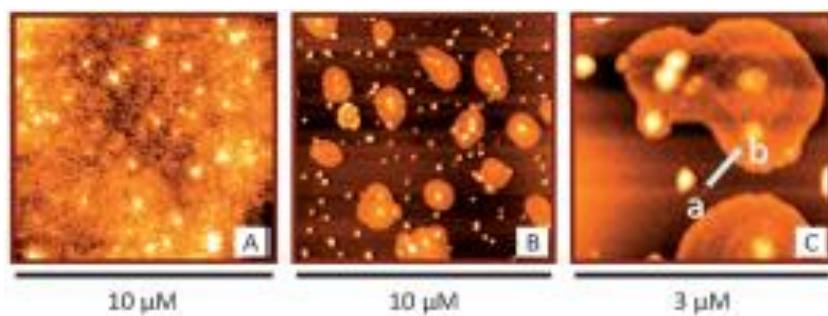


Рис. 1.9. Зображення атомно-силової мікроскопії НЧ золота, вкритих крохмалем.

Показано, що значна кількість НЧ розташовані в межах одного кластеру, що вказує на вплив крохмалю на формування матриці навколо частинок. Показано, що значна кількість НЧ розташовані в межах одного кластеру, що вказує на вплив крохмалю на формування матриці навколо частинок.

В роботі [5] отримані колоїдні розчини досліджували за допомогою УФ-вид спектроскопії. На рис. 1.10 зображено типові спектри, отримані для чотирьох екстрактів. Видно, що у трьох спектрах піки ППР НЧ золота розташовані у вузькому діапазоні довжин хвиль. Для шавлії лікарської – це при 535 ± 8 нм, вербени лимонної при 536 ± 2 нм, пеларгонії духмяної при 538 ± 8 нм та гранату звичайного при 568 ± 12 нм.

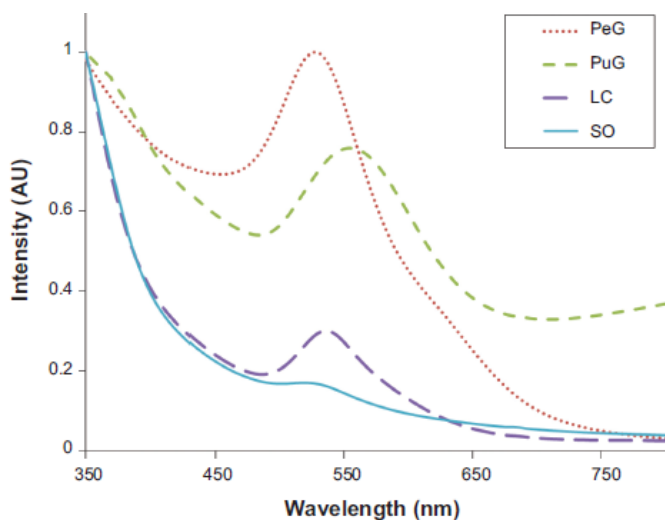


Рис. 1.10 Спектри поглинання НЧ золота, одержаних при використанні PeG - пеларгонія духмяна, PuG – гранат звичайний, LC- вербена лимонна, SO – шавлія лікарська.

ІЧ спектри були отримані як для чистого екстракту, так і для колоїдних розчинів (Рис. 1.11). Показано, що зсув піків пов'язані з адсорбцією компонентів екстракту на поверхні НЧ золота.

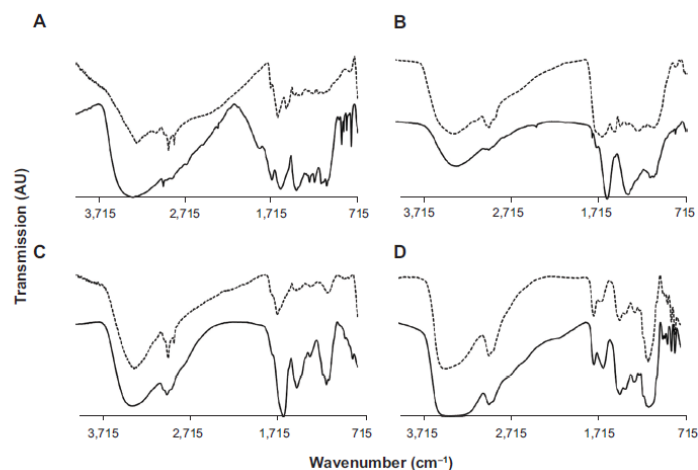


Рис. 1.11. ІЧ спектри одержаних колоїдів

Аналіз складу частинок був здійснений за допомогою енергодисперсної рентгенівської спектроскопії (ЕДС). На Рис. 1.12 зображено ЕДС спектри, отримані для трьох різних зразків. Спектри показуються, що композит вміщує золото, а присутність таких елементів, як С, О, Al, Na, Mg, K, Ca, пов'язано з елементним складом рослинних екстрактів після випаровування розчинника.

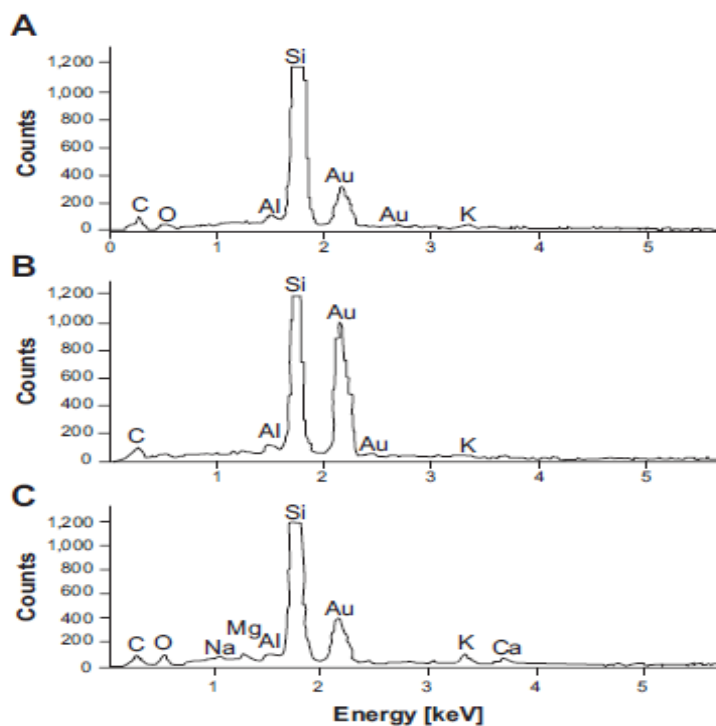


Рис. 1.12 Спектри енергодисперсної рентгенівської спектроскопії

Розподіл гідродинамічного діаметра НЧ золота досліджували за допомогою двох методів на основі розсіювання світла. Вимірювання динамічного розсіювання світла проводили при 90° три рази для кожного з трьох зразків кожного рослинного екстракту. Результати представлені на Рис. 1.13, де інтенсивність розсіювання зображена як функція від логарифму діаметрів частинок (Рис. 1.13 А). В усіх випадках зафіксовано бімодальний розподіл, при цьому піки для більших діаметрів мали найбільшу інтенсивність.

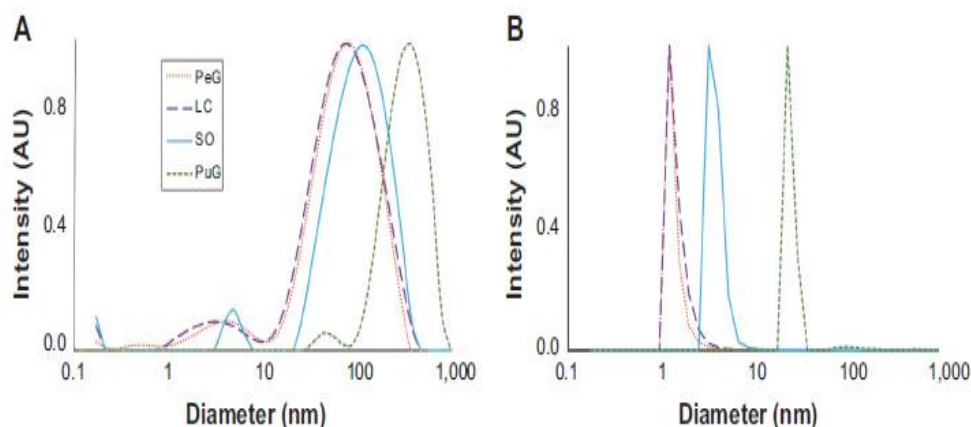


Рис. 1.13. Криві розподілу гідродинамічного діаметра НЧ: А - розподіл діаметрів, на основі інтенсивності розсіювання світла, В - розподіл діаметрів, на основі кількості частинок.

В результаті аналізу показано, що розподіл частинок отриманий цим методом, більш підходить для аналізу більших за розміром частинок і не відображає кількість частинок з певним розмірів. Розподіл за кількістю частинок (Рис. 1.13 В) вказує на обернений розподіл, тобто більшість (близько 97%) частинок у колоїдному розчині відповідала групі малих частинок. Можна зробити висновок, що більшість частинок у розчинах були малими, близько 1-8 нм. У випадку гранату звичайного більшість частинок мали розмір 30-70 нм. Середні значення частинок наведені в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2. Середні діаметри НЧ золота.

Екстракт	Середній діаметр (нм)		Середній розмір за кількістю частинок (нм)
	Пік для малих НЧ	Пік для великих НЧ	
вербена лимонна	2,6±0,8	50±8	64±47
шавлія лікарська	4±1	72±16	84±46
пеларгонія духмяна	6±3	78±30	75±35
гранат звичайний	34±18	312±46	127±57

Другий підхід до аналізу розподілу гідродинамічного діаметра НЧ був комп'ютерний аналіз зображень. Середні діаметри представлені на таблиці 1.3. В цьому випадку розмір частинок для гранату звичайного схожі за розмірами на інші зразки. Різниця результатів для гранату звичайного двох методів ймовірно пов'язана тому, що колоїди гранату містили скупчення НЧ, з'єднані органічними молекулами.

Таблиця 1.3. Середні діаметри НЧ золота, обраховані комп'ютерним аналізом зображень.

Екстракт	Середній діаметр ДРС (нм)			Середнє значення (нм)
	Площа	Периметр	Середній діаметр, нм	
вербена лимонна	20±4	56±8	32±6	36
шавлія лікарська	18±4	42±3	28±4	29
пеларгонія духмяна	30±6	56±8	50±8	45
гранат звичайний	16±6	50±6	30±4	32

ТЕМ зображення НЧ золота показали частинки різних розмірів та форм (Рис. 1.14). Найменші частинки, розміром 10 нм, мали сферичну та трикутну форму, а більші частинки розміром 150 нм мали трикутну, пентагону та гексагону форму.

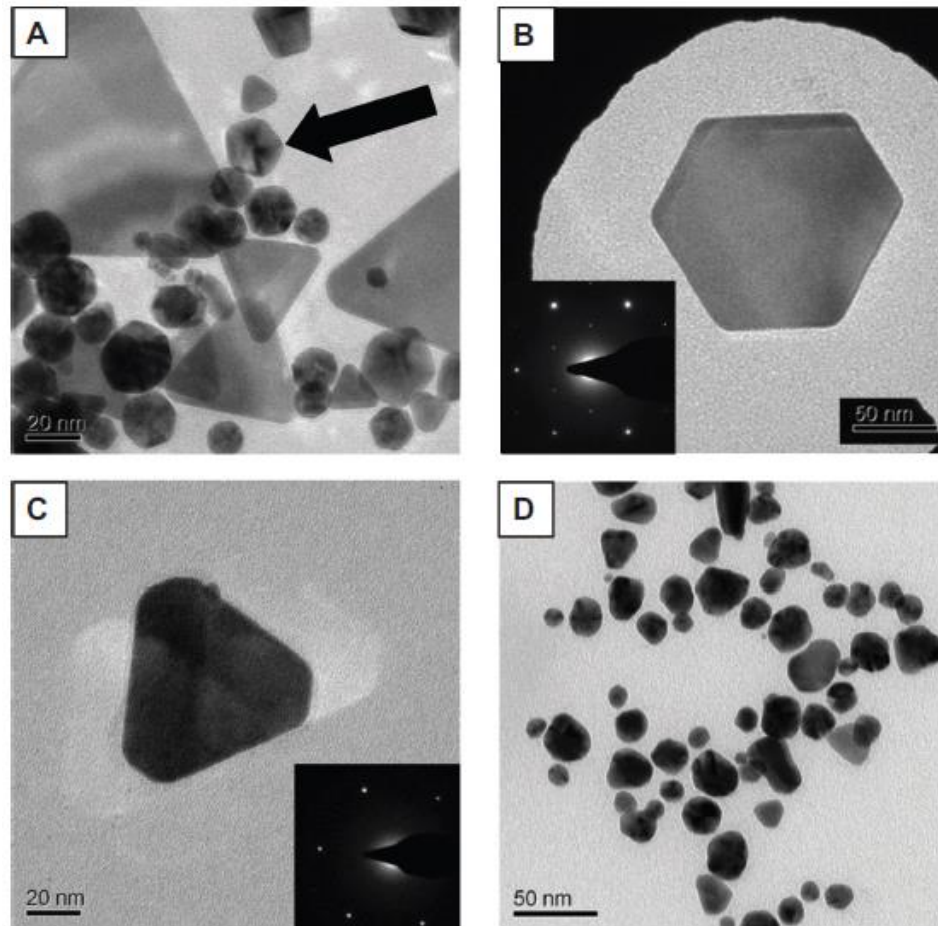


Рис. 1.14. ТЕМ зображення НЧ золота.

Однією з основних цілей цієї роботи було синтезувати НЧ золота для потенційного застосування у біомедичних системах. Кореляція між швидкістю росту L-клітин у присутності НЧ золота використовувалась як показник біосумісності. Для цього були синтезовані суспензії об'ємом 1, 10 і 100 мкл для чотирьох рослинних екстрактів, які потім помістили на диски-петрі з біокультурами, які включають L-клітини. Після чого рахували клітини після 24, 48 та 72 годин. Отримані криві росту (Рис. 1.15) в усіх випадках були практично

ідентичними до контрольної кривої (культури без НЧ золота). Дані результати демонструють хорошу біосумісність всіх НЧ золота з L-клітинами.

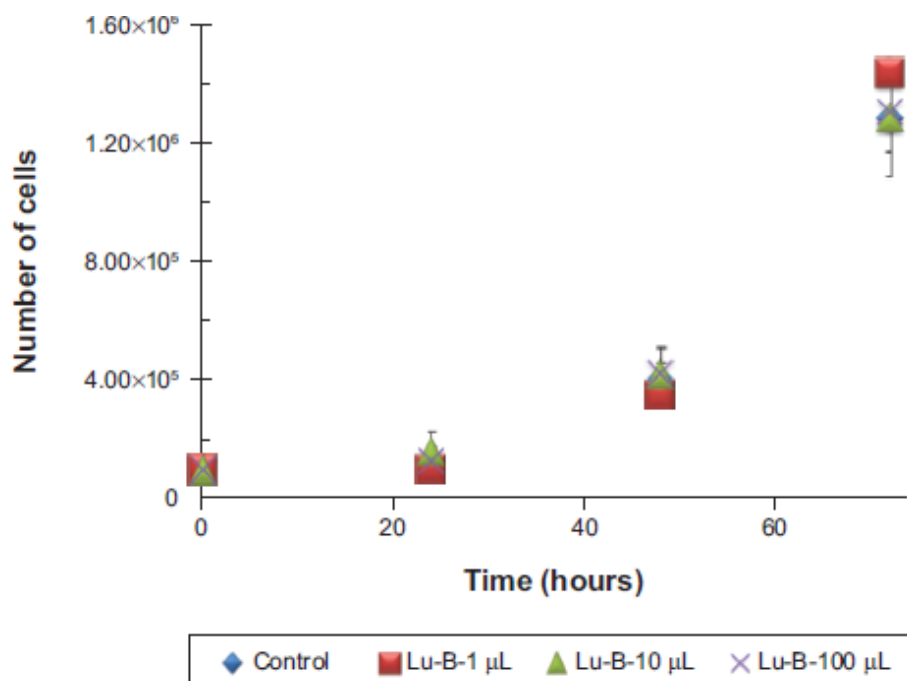


Рис. 1.15. Криві росту L-клітин для різних об'ємів НЧ золота.

Спектри поглинання НЧ золота з екстрактами характеризуються максимумом ППР у діапазоні 530 нм (Рис. 1.16) [6]. Фітохімічні компоненти, які одержані з екстрактів сумішшю етанолу та толуолу (F_1) та етанолу (F_2), діяли як відновники та стабілізаційні агенти для утворених НЧ золота, запобігаючи їх агрегації. З спектрів видно, що ППР для всіх екстрактів були майже ідентичними, це пов'язано з подібним хімічним складом.

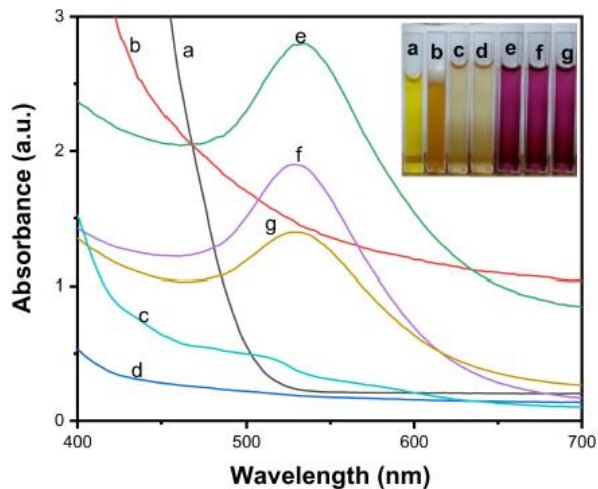


Рис. 1.16. Спектри поглинання розчину йонів золота (а), водного розчину екстракту олівуду (b), водного розчину F₁ (c) та F₂ (d) та відповідних НЧ золота олівуд (e), водних розчинів F₁ (f) та F₂ (g).

На Рис. 1.17 показано зображення та розподіли за розміром утворених НЧ. Найнижчий розмір частинок формується при застосуванні водного розчину екстракту олівуду з середнім розміром частинок 6 нм. При використанні F₁ та F₂ розмір частинок становить 15 – 40 нм.

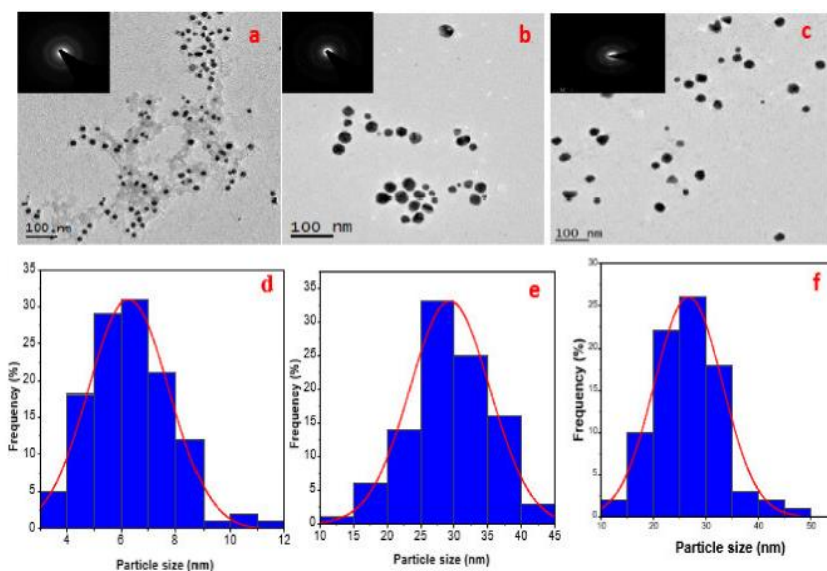


Рис. 1.17. ТЕМ зображення та розподіл за розмірами НЧ золота, одержаних у суміші з водним розчином екстракту олівуду (a,d), водного розчину F₁ (b,e) та F₂ (c,f).

Дослідження морфології, форми та розміру НЧ високороздільною просвічувальною електронною мікроскопією (ПЕМ) вказують на те, що середні діаметри частинок ставили $6,3 \pm 2$, $24,4 \pm 5$, $22,4 \pm 5$ нм для екстракту олвуду, розчину F₁ та F₂ відповідно. Сформовані НЧ були переважно мономодальними та мали сферичну форму. Навколо частинок спостерігалися товсті покривні шари, утворені екстрактом, що можуть слугувати стабілізаторами росту. Результати РФА вказують на кристалічну форму НЧ золота, про що свідчать поява рефлексів з 38.2° , 44.4° , 64.6° та 77.5° , які відповідають площинам (111), (200), (220) та (311) відповідно та вказують на формування гранецетрованої кубічної решітки.

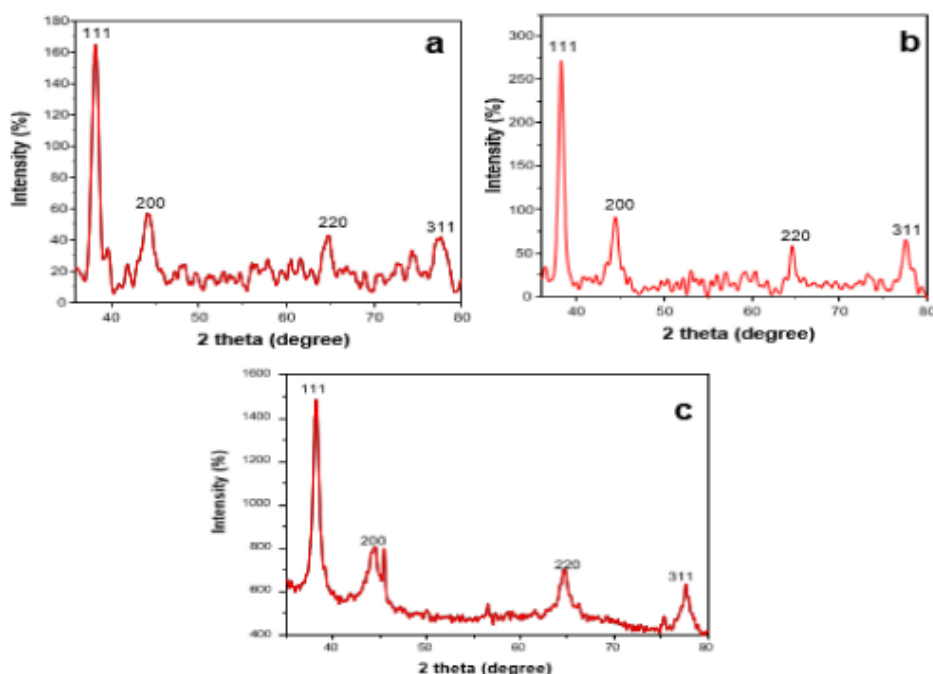


Рис. 1.18 Дифрактограми НЧ золота, одержаних з екстрактів олвуду (а), водного розчину F₁ (b) та F₂ (c).

В роботі [7] реєструвалися зображення з сканувального електронного мікроскопу (рис. 1.19 а). Наночастинки мають сферичну форму та мають однорідний розмір $\sim 7,6$ нм. Також реєструвалися зображення за методом ПЕМ (рис. 1.2.18 б), які підтверджують кристалічну природу частинок. УФ-видимі спектри демонструють появу максимуму поглинання в діапазоні 520-550 нм, що відповідає

поверхневому плазмонному резонансу НЧ золота. Під час експерименту максимум зміщувався від 540 нм до 523 нм. Дані отримані за допомогою спектроскопії наявності кількох фаз формування НЧ. перша фаза синтезу включає швидку нуклеацію з утворенням частинок радіусом 2 нм та їх коалесценцію протягом перших 20 хв до частинок радіусом 4 нм. Друга фаза триває від 25-50 хв та характеризується безперервним ростом частинок з середнім радіусом 5,2 нм. Ріст частинок відбувається за рахунок дифузійного приросту золота, тобто низька швидкість відновлення обмежує швидкість росту. Третя фаза триває 50-70 хв та характеризується збільшенням розміру частинок близько 7,6 нм.

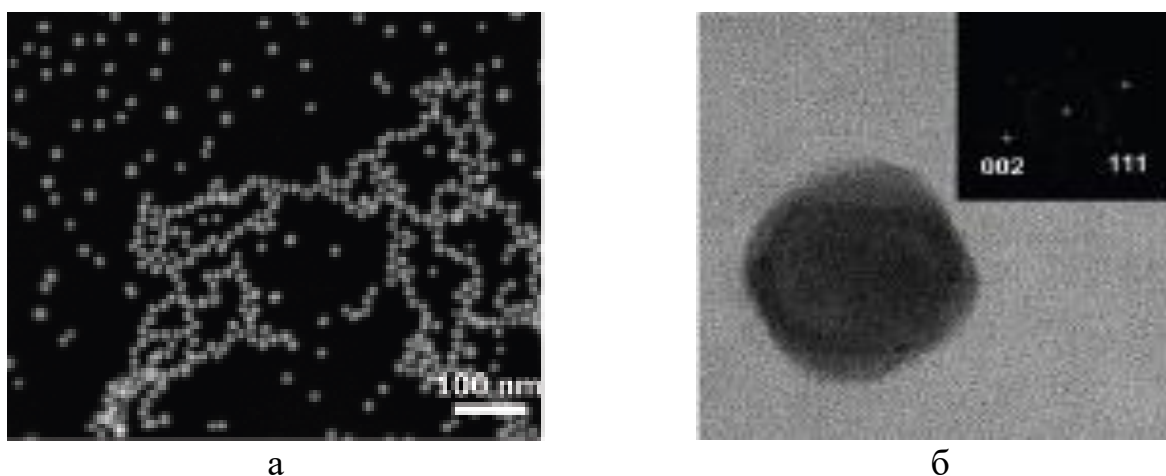


Рис. 1.19. ТЕМ зображення НЧ.

1.3 Метод мас-спектрометрії

Мас-спектрометрія – аналітичний метод, що дозволяє ідентифікувати речовини, визначати їхню концентрацію та вивчати структуру молекул шляхом вимірювання m/z їхніх іонів [8]. Види мас-спектрометрії можна класифікувати за трьома параметрами: за методом іонізації, за типом мас-аналізатора, за режимом вимірювання. Найважливішими характеристиками методу є внутрішня енергія, що передається під час процесу іонізації, а також фізико-хімічні властивості аналіту, який іонізується. Умовно за методом іонізації можна виділити «жорстку» іонізацію (електронний удар), при якій виділяється велика кількість енергії та відбувається фрагментація аналіту, та «м'яку» (електророзпилення, хімічна, МАЛДІ, ПАЛДІ),

при якій утворюються лише іони молекул. Прямі іонні джерела поділяються на рідиннофазні та твердофазні. Хімічна іонізація приводить до формування іонів з мінімальним надлишком енергії, що дозволяє одержати спектр з меншою фрагментацією, завдяки чому молекули легко детектуються. Метод полягає в утворенні іонів унаслідок зіткнення молекул аналіту з первинними іонами джерела при умові того, що локальний тиск має бути достатнім для частих зіткнень. Електрони іонізують молекули реагентного газу шляхом електронної взаємодії. Утворені іони зіштовхуються з іншими молекулами реагентного газу, в результаті чого утворюється іонізаційна плазма, у якій шляхом хімічних реакцій утворюються позитивні та негативні іони аналіту.

Основними характеристиками мас-аналізаторів є масовий діапазон, швидкість аналізу, трансмісія, масова точність і роздільна здатність. Роздільна здатність визначають як:

$$R = \frac{m}{\Delta m}, \quad 1.4$$

де Δm — найменша різниця мас, за якої два іони можуть бути розділені.

Квадрупольний аналізатор використовує стабільність траєкторій іонів в осцилюючому електричному полі. Він складається з чотирьох паралельних стрижнів, до яких прикладають постійну та радіочастотну напруги:

$$\Phi_0 = \pm(U - V \cos \omega t), \quad 1.5$$

де U – постійна напруга, V – амплітуда радіочастотної напруги, ω – кутова частота.

Рух іонів описується рівнянням Пауля:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2}(U - V \cos \omega t)x = 0 \quad 1.6$$

Після перетворення отримуємо рівняння Мат'є:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad 1.7$$

Параметри стабільності мають вигляд:

$$a_u = \frac{8zeU}{m\omega^2 r_0^2} \quad 1.8$$

$$q_u = \frac{4zeV}{m\omega^2 r_0^2} \quad 1.9$$

Іони зі стабільними траєкторіями проходять через аналізатор і детектуються.

Іонно-пасткові аналізатори: іонна пастка утримує іони за допомогою радіочастотного квадрупольного поля. Існують тривимірні та двовимірні пастки. У пастці Пауля рух іонів також описується рівнянням Матьє. Для малих значень q параметр стабільності визначають:

$$\beta_u = \sqrt{a_u + \frac{q_u^2}{2}} \quad 1.10$$

Ефективність захоплення іонів описується псевдопотенціальною ямою Демельта:

$$\overline{D_z} = \frac{q_z V}{8} = \frac{eV^2}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \quad 1.11$$

Двовимірні іонні пастки характеризуються більшою іонною ємністю та ефективністю захоплення порівняно з тривимірними.

Детектори перетворюють потік іонів на електричний сигнал. Найпоширенішими є електронні помножувачі, у яких іони прискорюються до високих енергій та спричиняють емісію вторинних електронів. Поширеним електрооптичним детектором є детектор Дейлі, де іони послідовно перетворюються на електрони, фотони та електричний сигнал.

1.3.1. Матрично-активована лазерна десорбція/іонізація мас-спектрометрія (МАЛДІ)

МАЛДІ-МС є один з двох методів «м'якої» іонізації, призначений для аналізу великих нелетких молекул. Завдяки «м'якій» іонізації складні біомолекули не руйнуються, утворюючи переважно протоновані форми або аддукти. Цей метод

дозволяє досліджувати сполуки, які не можуть бути досліджені традиційними методами іонізації, наприклад електронною та хімічною.

Умовами для використання матриць методом МАЛДІ є поглинання лазерного випромінювання, співкристалізація з аналітом, термолабільність та здатність до сублімації. Матриця виконує важливі функції, наприклад передача енергії від лазера до аналіта, пригнічення міжмолекулярної взаємодії між аналітами та сприяє утворенню протонуваних або іонізованих форм молекул аналіту. Матриці поділяють на традиційні та альтернативні. До традиційних належать α -ціано-4-гідроксикорична кислота (CHCA), яка використовується, наприклад, для визначення пептидів, синапінова кислота для аналізу білків, а 2,5-дигідроксибензойна кислота (DHB) для аналізу гліканів, глікокон'югантів та ліпідів. Однак, такі матриці є низько ефективні для визначення низькомолекулярних сполук, так як фіксуються низько інтенсивні піки фрагментів, кластерів і матричних іонів у ділянці низьких значення m/z при їх використанні. Тому, запропоновано застосування альтернативних матриць, до яких належать іонні рідини та матриці на основі наночастинок благородних металів.

Іонні рідини - це суміші матриць з органічними сполуками, вони формують структури без великих кристалів, що підвищує стабільність сигналу. Матриці на основі благородних металів, наприклад золота та срібла, є перспективними у використанні завдяки легкій процедурі синтезу та прогнозованим фізико-хімічним властивостям. Додатково, НЧ характеризуються біосумісністю, а використання зелених технологій дозволяє одержати екологічно безпечні матеріали.

Механізм іонізації охоплює іонізацію матриці та подальше перенесення заряду на аналіт. Спочатку матриця поглинає енергію лазера, але оскільки енергії одного фотона УФ - лазер (3,5 – 3,7 eV) недостатньо для іонізації, через те що потенціали матриць вищі, процес відбувається через двофотонне поглинання або колективне збудження молекул у конденсованій фазі. Після іонізації утворюються

протоновані/депротоновані іони та негативні, внаслідок захоплення електронів, радикальні іони. Існує дві основні моделі утворення іонів $[\text{аналіт} + \text{H}]^+$ та $[\text{аналіт} - \text{H}]^-$ у аналіті: модель перенесення заряду та модель «заряджених» залишків. Перший заряд передається від іонів матриці до нейтральних молекул аналіту безпосередньо у плазмовому плюмі. В другій моделі аналіти подаються в матрицю вже заряджені. При десорбції утворюються кластери, які згодом дисоціюють, втрачаючи молекули матриці та розчинника, залишаючи іони аналіту. [9]

1.3.2. Традиційні та альтернативні матриці в мас-спектрометрії МАЛДІ-МС

В роботі [10] досліджувався вплив NaCl на ефективність аналізу вуглеводів методом МАЛДІ як основу використовували дерев'яне вугілля, а як аналіти розчини глюкози, сахарози, аргініну, полімеру етиленгліколю та міоглобіну. Дерев'яне вугілля подрібнювали, промивали ацетоном, метанолом і дистильованою водою. Потім суспендували в водному розчині 50% ацетонітрилу до 0,1% трифтороцтової кислоти, з подальшою сонікацією протягом 15 хв. Концентрація приготованої суспензії вугілля становила 10 мг/100 мкл. Розчини глюкози, сахарози, аргініну та полімеру етиленгліколю у 0,5 трифтороцтовій кислоті з водою у концентрації 100 мМ. Розчин міоглобіну піддавали ферментативному гідролізу трипсином при 37°C протягом 24 год у співвідношенні білка до ферменту 50:1. На пластинку МАЛДІ-МС наносили 1 мкл розчину матриці з вугілля та висушували при кімнатній температурі, після чого на поверхню висушеної матриці наносили 1 мкл аналіту. Для порівняння, в окремих випадках, додатково наносили 1 мкл 10 мМ розчин Na + трифтороцтова кислота або 10 мМ NaCl в ролі катіонізуючого агенту.

На рис. 1.20 (а-в) показано МАЛДІ МС спектри 100 нмоль сахарози. У цьому експерименті 1 мкл 100 мМ сахарози наносили на матрицю з деревного вугілля без додавання Na^+ (Рис. 1.20 а), з додаванням Na + трифтороцтова кислота (Рис. 1.20 б) та з додавання NaCl (Рис. 1.20 в). Піки $m/z = 364.6$ та 380.5 відповідали

$[M + Na]^+$ та $[M + K]^+$. Без додавання Na^+ домінував калієвий аддукт, тоді як після введення іонів натрію домінував натрієвий аддукт. Іонізаційна ефективність сахарози була вищою при додаванні $NaCl$, ніж $Na +$ трифтороцтова кислота. Межа детекції однаково дорівнювала 10 нмоль без катіонізуючого агента та з $Na +$ трифтороцтова кислота, у випадку з додаванням $NaCl$ межа детекції була 1 нмоль. Аналіз глюкози та сахарози з додавання $NaCl$ виявилося ефективнішим, ніж з $Na +$ трифтороцтова кислота. При аналізі присутності агнініну, пептидів та білків не було зафіксовано білки або пептиди в жодному діапазоні концентрацій, проте був присутній сигнал, який відповідав протонаному аргініну $[M + H]^+$. Імовірно причина полягає в тому, що деревне вугілля не забезпечувало ефективного перенесення енергії до зразка.

На рис. 1.20 (г - д) зображені МАЛДІ-спектри 10 нмоль глюкози, де 1 мкл 10 мМ розчину глюкози було нанесено поверх 1 мкл матриці з деревного вугілля без додавання Na^+ (Рис. 1.20 г), з додаванням $Na +$ трифтороцтова кислота (Рис. 1.20 г) та з додавання $NaCl$ (Рис. 1.20 д). Піки при $m/z = 203.1$ та $m/z = 219$ відповідали іонам $[M + Na]^+$ та $[M + K]^+$ відповідно. Протонаного іона аналіту не спостерігається. Без катіонізуючого агента калієвий аддукт глюкози мав більшу інтенсивність, ніж натрієвий. Після додавання натрію натрієвий аддукт ставав домінуючим. Додавання $NaCl$ забезпечувало вищу ефективність іонізації, порівнянно з $Na +$ трифтороцтова кислота. Глюкозу вдавалося детектувати без катіонізації, з $Na +$ трифтороцтова та $NaCl$ до рівнів 10 нмоль, 1 нмоль та 100 пмоль відповідно.

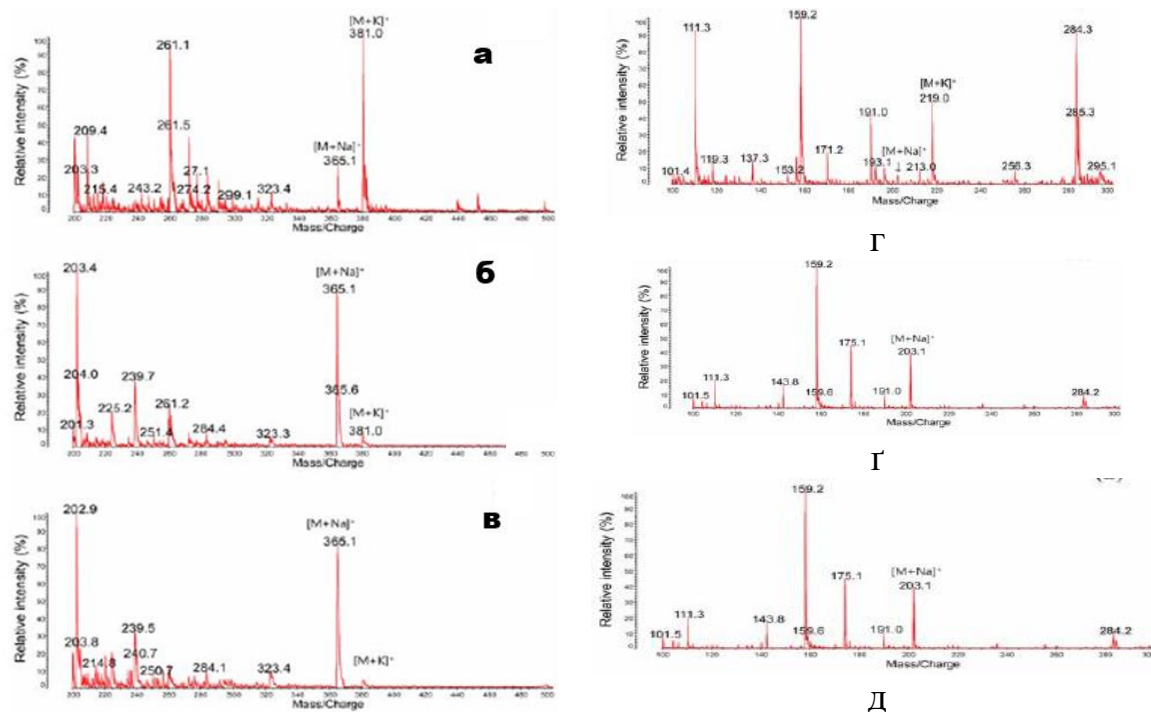


Рис. 1.20 Мас-спектри для 100 нмоль сазарози, яку нанесли на матрицю з деревного вугілля: без додавання іонів натрію (а), з додаванням Na + трифтороцтова кислота (б), з додаванням NaCl (в). Мас-спектри для 10 нмоль глюкози, яку нанесли на матрицю з деревного вугілля: без додавання іонів натрію (г), з додаванням Na + трифтороцтова кислота (г), з додаванням NaCl (д).

В роботі [11] описується метод детекції малих метаболітів методом МАЛДІ-МС з використанням синтезованих наночастинок срібла ($AgNC$) з листя кадранії тригостренної як зеленої матриці. Для зеленого синтезу використовувався 1мМ водний розчин $AgNO_3$ з додаванням екстракту листя кадранії тригостренної. Одержану суміш утримували при температурі від 30°C до 99°C. Формування наночастинок супроводжувалось зміною забарвлення на жовтувато-коричневе. УФ вид спектри (Рис. 1.21 а) свідчать про утворення наночастинок срібла при різних температурах. Розчинні фітокомпоненти, які присутні в рослинному екстракті сприяли відновленню та стабілізації наночастинок срібла. Гістограма ДРС (Рис. 1.21 б) показала, що середній розмір НЧ становив 50 нм, а розмір варіювався від 5 до 80 нм. Також було виявлено, що НЧ мали сильний негативний заряд -89,8 мВ

(Рис. 1.21 в). На спектрах ІЧ (Рис. 1.4.2.2 г) спостерігалися коливання при 3424, 1620, 1076 та 609 cm^{-1} , що відповідають валентним коливанням ОН-груп фенолів, валентних NH груп аміду, CO та CN амінів.

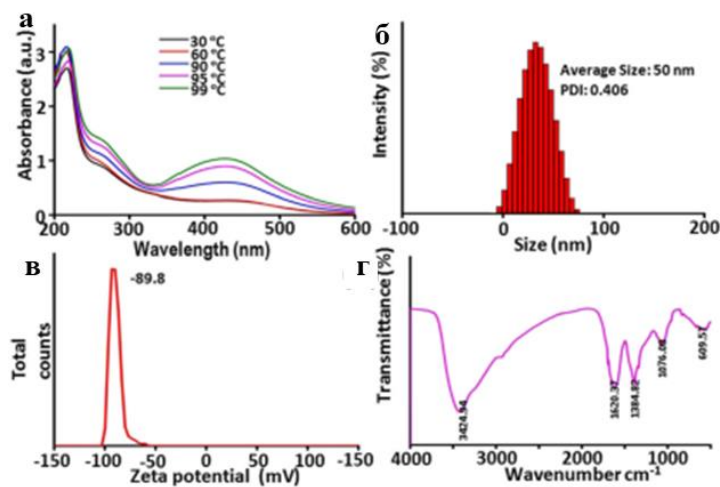


Рис. 1.21. УФ-вид спектри (а), гістограма ДРС розподілу НЧ за розмірами (б) синтезованих при 95°C, зета потенціал матриці, приготовлений при 95°C (в), ІЧ спектри (г).

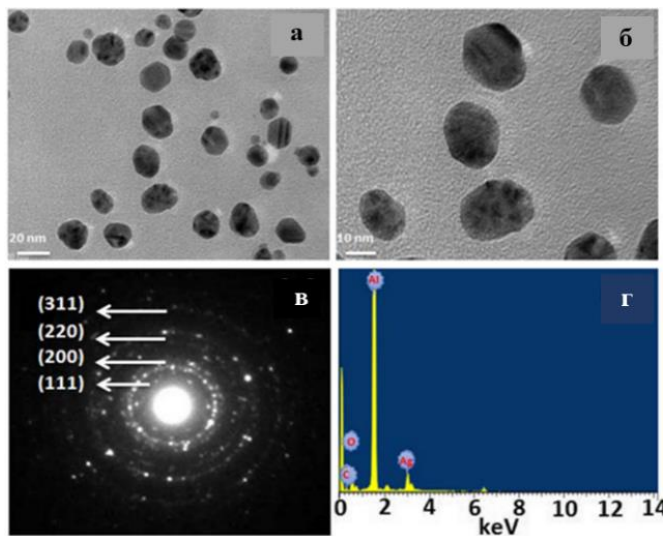


Рис. 1.22. ТЕМ-зображення НЧ (а,б), дифракція електронів (в). енергодисперсійний рентгенівський спектр (г).

ТЕМ зображення показали утворення НЧ різних розмірів, більшість НЧ мали сферичну або багатокутну форму. Дифракція електронів у вибраній обласні (Рис. 1.22 в) вказує на полікристалічність срібла, ЕДС (Рис. 1.22 г) довів наявність срібла у матриці.

НЧ срібла як матрицю, змішуючи з розчинами глюкози, лізину, сахарози та глютамінової кислоти використовували для аналізу малих метаболітів та амінокислот використовуючи МАЛДІ-МС. Спектри МАЛДІ (Рис. 1.23) продемонстрували вищу чутливість та селективність порівняно з іншими матрицями. Також для всіх спектрів були отримані інтенсивні сигнали срібла, що були визначені разом з молекулярними піками (Рис. 1.23 а-г). Значення m/z іонів $[M + 107 Ag]^+$ та $[M + 109 Ag]^+$ виявлені для глюкози, лізину, сахарози та глютамінової кислоти. При утворенні іонів $[M + Ag]^+$ конкурентні іони Ag^+ можуть катіонізувати молекули, що містять π -зв'язки, за моделлю Дьюара, а також полярні функціональні групи через іон-дипольну взаємодію. Матриця на основі НЧ срібла стабільно іонізувала сполуки, тоді як інші матриці демонстрували значні коливання інтенсивності або повну відсутність іонізації. Оцінювалася та порівнювалася ефективність α -ціано-4-гідроксикоричної кислоти як традиційної матриці (Рис. 1.23 г-є) було виявлено лише кілька піків низької інтенсивності для глюкози (m/z 180,0 $[M-H]^-$), лізину (m/z 446,50 $[M-H]^-$), сахарози (m/z 342,1 $[M-H]^-$) та глютамінової кислоти (m/z 147,1 $[M-K]$), а всі інші фонові сигнали відповідали матриці. При використанні зеленої матриці всі аналіти були виявлені з високою інтенсивністю. Це свідчить, що зелена матриця здатна виявляти низькомолекулярні сполуки з високою чутливістю. Межі виявлення для стандартних молекул при використанні зеленої матриці становить від 4 до 20 нмоль

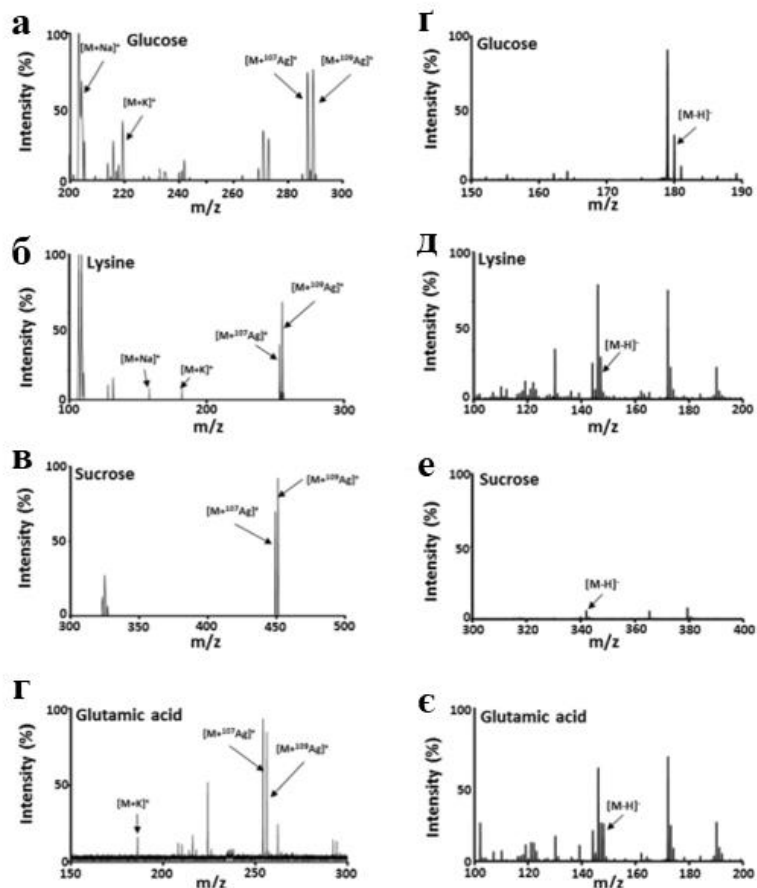


Рис. 1.23 Мас-спектри досліджуваних сполук, отримані методом МАЛДІ-МС у режимі позитивних іонів з використанням: а–г «зелених» НЧ; г–є: α -ціано-4-гідроксикоричної кислоти.

1.3.3 Застосування мас-спектрометрії

Мас-спектрометрія широко застосовується в багатьох галузях науки. Її широко застосовують в протеоміці для якісного та кількісного аналізу зразків глобального протеому, що дозволяє суттєво розвинути розуміння функціонування клітин. В роботі [12] методи мас-спектрометрії застосовують для визначення білків в складних сумішах, що включає точне вимірювання маси пептидів, які були отримані шляхом розщеплення повного протеому, а також багатовимірне

розділення пептидів і використання мас-спектрометрії для аналізу та характеристики білкових ізоформ.

Мас-спектрометрія також застосовується у розробці лікарських засобів. В роботі [13] використовується вискоєфективна рідинна хроматографія у поєднанні з мас-спектрометрією для визначення метаболітів на етапі пошуку та на етапі розробки лікарських засобів. Обговорювалося різні методи іонізації та мас-аналізаторів для вимірювання точної маси біомолекул і покращення визначення метаболітів.

В роботі [14] описується застосування та огляд можливих викликів у клінічній лабораторії, таких як пригнічення іонізації, яке виникає, в момент, коли компоненти зразка перешкоджають процесу іонізації цільових аналітів. Описуються типи мас-аналізаторів та методів аналізу. Застосування мас-спектрометрії в токсикології, наприклад методи токсикологічного скринінгу на основі імунохімічного аналізу, газової-хромато-мас-спектрометрії та рідинної хромато-тандемної мас-спектрометрії обговорюються. Такий скринінг дозволяє визначити клас сполук, але не призначений для визначення конкретної речовини. Показано, що мас-спектрометричні дослідження застосовуються в ендокринології, а методи рідинної хромато-тандемної мас-спектрометрії призначені для визначення та розділення вітаміну D₂ та D₃, для отримання інформації про епімерну форму вітаміну D, а також для аналізу стероїдів.

1.3.3.1. Застосування МАЛДІ-МС в медицині

МАЛДІ МС використовується в біомедицині для високочутливого аналізу біомолекул: білки, пептиди, ліпіди, нуклеїнові кислоти та малі метаболіти. Завдяки м'якій іонізації МАЛДІ дозволяє досягти мінімальної фрагментації аналітів, що дуже важливо для дослідження біологічних сполук. Цей метод використовується в діагностиці, мікробіології, онкології та фармакології.[14]

МАЛДІ широко застосовується і в клінічній мікробіології, для швидкого визначення мікроорганізмів. Метод базується на отриманні білкових «відбитків», які порівнюються з референтними базами даних. Це дозволяє ідентифікувати бактерії та грибки протягом кількох хвилин, що значно швидше порівняно з традиційними біохімічними методами [15]. Впровадження МАЛДІ МС у клінічну практику суттєво скоротили час діагностики інфекційних захворювань та підвищило ефективність антимікробної терапії [16]. В онкології МАЛДІ МС використовується для виявлення біомаркерів пухлин, аналізу протеомних профілів і дослідження молекулярних гетерогенності тканин. Для цього використовується МАЛДІ МС візуалізація, яка дозволяє візуалізувати просторовий розподіл біомолекул в гістологічних зрізах тканин, що дозволяє точніше діагностувати пухлини, визначати межі резекції та оціни агресивності утворень. [17]. МАЛДІ МС також застосовується для аналізу змін у метаболімі пухлинних клітин, що має важливе значення для розробки нових методів терапії [18]. МАЛДІ МС активно використовується в фармакологічних досліджень для аналізу фармакокінетики та фармакодинаміки лікарських засобів. Метод дозволяє визначити розподіл препаратів та їх метаболітів у тканинах організму, що є важливим для оцінки ефективності та безпеки терапії [19].

2. ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

«Зелений» синтез НЧ золота проводили в ємності (колбі) шляхом змішування рослинного екстракту з розчином прекурсору золота, тетрахлорауратну кислоту (HAuCl_4), при певній температурі та рН. Як рослинний екстракт застосовували екстракт, одержаний із відходів місцевого олійного виробництва - вичавок із насіння льону. Різноманітні активні сполуки, які містяться в рослинному екстракті, здатні як відновлювати іони металів, так і стабілізувати НЧ. Як прекурсор металу використовували тетрахлорауратну кислоту.

2.1 Приготування рослинного екстракту

Вичавки подрібнювали в керамічній ступці та відбирали зразок вагою 70 г. З подрібнених вичавок видаляли залишки олії за допомогою апарату Сокслета та гексану (500 мл) протягом 6 годин. Потім із знежирених вичавок екстрагували активні сполуки. Екстракцію проводили упродовж 6 годин за допомогою апарату Сокслета та 500 мл 96% етанолу. Після екстракції, за допомогою ротаційного випарника (Рис. 2.1 а) проводили концентрування розчину шляхом відгонки частини етанолу для подальшого аналізу вмісту класів активних сполук методом ВЕРХ.



а



б

Рис. 2.1. Зображення ротаційного випаровувача (а) та бані-шейкеру (б)

2.2 Приготування реакційних сумішей та синтез НЧ золота

Для одержання 1 мМ ($C=0,001$ моль/л) розчину HAuCl_4 брали 0,4 мл 0,25 М готового розчину тетрахлорауратної кислоти та доливали дистильовану воду до мітки колби об'ємом 100 мл.

Для приготування 20 мл реакційної суміші, брали 1 частину екстракту (2 мл) та 9 частин розчину 1 мМ HAuCl_4 (18 мл). Синтез НЧ проводили при кімнатній температурі (25°C) та при нагріванні (60°C) з постійним повільним перемішуванням протягом певного періоду на водяній бані-шейкері (Рис. 23 б). Реакцію проводили у посуді з темного скла, без доступу світла. Проби реакційних сумішей у кількості 2,4 мл відбирали через певні проміжки часу, які потім аналізували на вміст НЧ.

Ефективність відновлення іонів металів та формування НЧ контролювали шляхом вимірювання смуги поверхневого плазмонного резонансу (ППР) в УФ-Вид. спектрах поглинання колоїдних розчинів. Для розчинів з високою інтенсивністю ППР сигналу, проби реакційних сумішей розбавляли у 5 разів (до 0,5 мл суміші додавали 2 мл H_2O) та реєстрували спектри одержаних розбавлених колоїдів при певному часі реакції. Для подальшого аналізу оптичних спектрів, спектральні дані розбавлених колоїдів збільшували в 5 разів з метою реконструювання (відтворення) «початкових» спектрів колоїдних розчинів НЧ. Спектри реєстрували за допомогою спектрофотометра Lambda 35 (PerkinElmer). Для вимірювання використовували кварцові кювети товщиною 1 см, як розчин порівняння застосовували дистильовану воду.

2.3. Методика мас-спектрометричного аналізу та пробопідготовка зразків

Мас-спектрометричні дослідження проводилися за допомогою мас-спектрометричного комплексу з лазерною десорбцією/іонізацією MALDI-TOF Autoflex II LRF20 (Bruker Daltonik GmbH, Німеччина, 2004). Цей мас-спектрометр призначений для визначення якісного складу органічних сполук, зокрема біомолекул. Принцип його роботи полягає в тому, що короткі імпульси лазерного випромінювання взаємодіють із спеціально підбраною матрицею, яку додають до аналіту. Матриця виконує роль поглинача енергії лазера, що забезпечує «м'який» перехід молекул аналіту у газову фазу з їх одночасною іонізацією. Завдяки цьому метод МАЛДІ МС широко застосовується для дослідження нелетких високомолекулярних сполук, таких як білки, пептиди та вуглеводи.



Рис. 2.2. Зображення приладу MALDI-TOF мас-спектрометра

Зазначений комплекс оснащений азотним лазером ($\lambda = 337$ нм) і дає змогу проводити аналіз іонів у широкому діапазоні m/z , надаючи детальну інформацію

про молекулярні маси речовин. Можливості приладу дозволяють досліджувати різноманітні об'єкти — від низькомолекулярних сполук до полімерів та білків із молекулярною масою понад 100 кДа. Метод ефективний також для аналізу олігонуклеотидів, вторинних рослинних метаболітів та фітогормонів. Комплекс функціонує у двох режимах: лінійному (із діапазоном мас до ~250 кДа та роздільною здатністю понад 4000) та рефлектрона (із діапазоном мас до ~6 кДа та роздільною здатністю понад 10 000) [20].

На рис. 2.4.1 схематично зображено стадії формування заряджених частинок при використанні методу МАЛДІ-МС. На поверхню металевої мішені наноситься зразок, попередньо змішаний з матрицею. після чого відбувається його лазерне опромінення. Короткий імпульс лазерного випромінювання потрапляє на поверхню цієї суміші, викликаючи миттєве локальне нагрівання поверхневого шару. Це призводить до десорбції та викиду молекул матриці й аналіту в газову фазу, де молекули досліджуваної речовини іонізуються без руйнування їхньої структури (шляхом утворення протонованих форм або аддуктів з іонами металів). Утворені іони під дією електричного поля рухаються у бік мас-аналізатора, де розділяються за відношенням m/z .

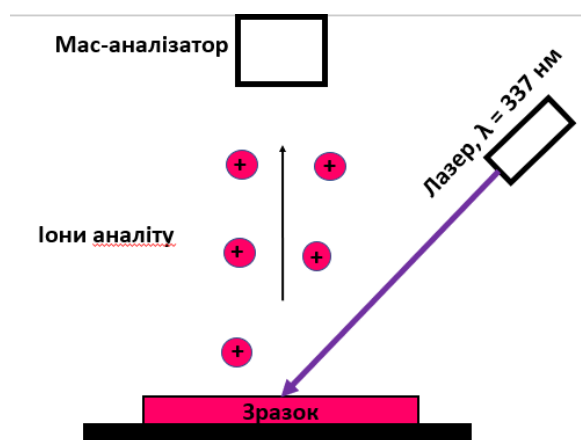


Рис. 2.3. Схематичне зображення принципу роботи МАЛДІ-МС.

Метод МАЛДІ-МС застосовували для аналізу вуглеводів, зокрема для оцінки можливості швидкого та високочутливого визначення глюкози, яка в цьому дослідженні виступає як модельна сполука для низькомолекулярних аналітів.

Пробопідготовку здійснювали шляхом нанесення на сталеву підкладку (мішень) суміші загальним об'ємом 2 мкл, яка містила AuНЧ (одержані шляхом «зеленого» синтезу за різних температур), розчин NaCl із концентрацією 0,5 мМ та дистильовану воду (1 мкл) для контролю або розчин глюкози з концентрацією від 0,5 до 2 мМ. Нанесені зразки витримували при кімнатній температурі до повного випаровування рідкої фази з подальшим їх аналізом методом МАЛДІ-МС.

Реєстрацію мас-спектрів здійснювали в режимі детектування позитивно заряджених іонів. Процес лазерної десорбції/іонізації сухих зразків відбувався за імпульсного налаштування лазера з тривалістю сигналу 3 нс та частотою повторення 20 Гц. Накопичення даних виконували у лінійній конфігурації приладу, встановивши час затримки екстракції іонів 10 нс та прискорювальний потенціал 20 кВ. Фінальні мас-спектри отримували шляхом сумування (акумуляції) 100 поодиноких спектрів. Інтенсивність випромінювання лазера оптимізували за критерієм максимального співвідношення сигнал/шум, підтримуючи її незмінною для всієї серії вимірювань. Інтерпретацію та ідентифікацію сигналів проводили на основі референтних баз даних та опублікованих літературних джерел для чистих сполук.

Одною з основних вимог до матриць, які застосовуються в мас-спектрометрії, є їх співкристалізація з аналізованою речовиною. Матриця та аналіт повинні утворювати однорідну суміш, яка при висиханні формує кристалічну структуру. Це забезпечує ефективну передачу енергії від матриці до молекул аналіту. Тому, синтезовані колоїди AuНЧ з використанням екстракту вичавок льону, які розглядаються як потенційні «зелені» матриці (або «зелені» AuНЧ як потенційні іонні емітери) для аналізу низькомолекулярних органічних речовин методом ЛДІ МС, були досліджені щодо їхньої здатності забезпечувати рівномірну

кристалізацію з аналізованою речовиною у присутності NaCl як додаткового катіонізуючого агента. Дослідження проводили за наступною процедурою: колоїдні розчини AuНЧ, розчини глюкози (концентрація 2 ммоль/л) та солі натрію (концентрація 0,5 ммоль) у кількості 1 мкл наносилися послідовно на скляну підкладку. Після висихання розчинів, одержані зразки досліджували методом МАЛДІ-МС і паралельно одержували знімки за допомогою оптичного мікроскопу, щоб проаналізувати можливість однорідної кристалізації глюкози у присутності NaCl.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Одержання колоїдних систем НЧ золота-екстракт

Згідно умов синтезу, описаних в розділі 2.3, нами одержано колоїди НЧ золота шляхом відновлення йонів золота сполуками рослинного екстракту льону. Як видно з Рис. 3.1, спостерігається поява після 15 хв реакції та збільшення інтенсивності з часом проведення реакції малинового забарвлення розчинів, що вказує на формування НЧ золота (AuNC).

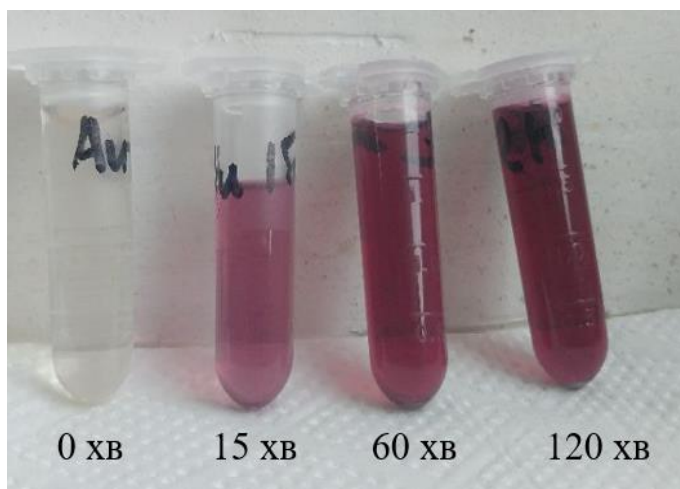


Рис. 3.1. Фотографія реакційної суміші екстракту льону та HAuCl_4 через 0 хв 15 хв, 60 хв і 120 хв нагрівання при 60°C

Згідно аналізу експериментальних досліджень [7], виконаних за допомогою комбінації методів мало-кутового рентгенівського розсіювання (SAXS) і структури рентгенівського поглинання поблизу порогу (XANES), процес зародження та росту НЧ золота відбувається в чотири етапи. Початковий етап - це швидке утворення ядер (етап 1 на Рис. 3.2), а потім агрегація ядер у більші частинки (етап 2). Третій етап включає повільний дифузійний ріст частинок, що підтримується постійним відновленням прекурсору золота, а також подальшою коалесценцією (етап 3). Згодом частинки швидко ростуть до свого кінцевого розміру, причому кінцевий розмір частинок визначається повним відновленням йонів золота (етап 4).

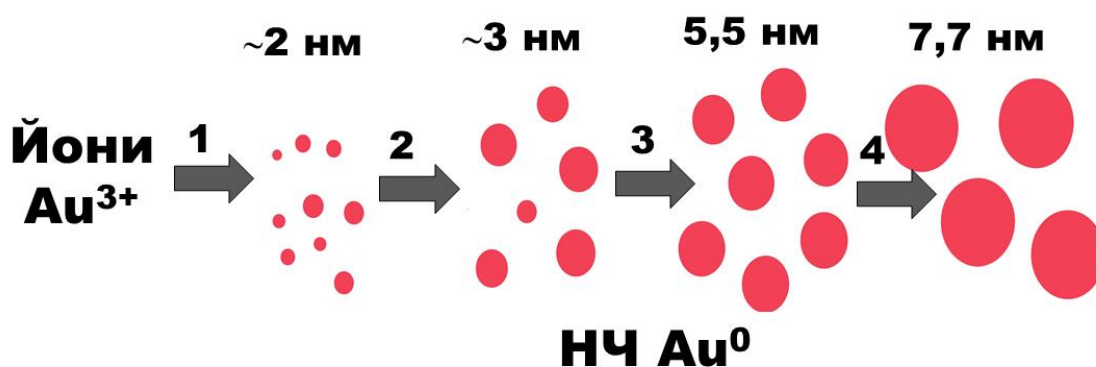


Рис. 3.2. Схематичне зображення процесів формування НЧ золота

3.2. Аналіз оптичних властивостей

Як свідчать спектри поглинання колоїду НЧ золота та екстракту льону (Рис. 3.3), після перемішуванні протягом 2,5 год при 25°C не спостерігається поява нового максимуму в області 500-600 нм, що свідчить про низьку швидкість відновлення НЧ. Поява низькоінтенсивного максимуму в області ППР спостерігається після 5 год зберігання суміші. Чітко виражене поглинання в області 538 нм зафіксовано після 24 год. Протягом наступних 168 год інтенсивність смуги зростає та смуга в області йонів золота спадає, що свідчить про неповне їх відновлення (Рис. 3.3, вставка). Відсутність формування плато на рис. 3.4 свідчить про неповне протікання реакції при даних умовах.

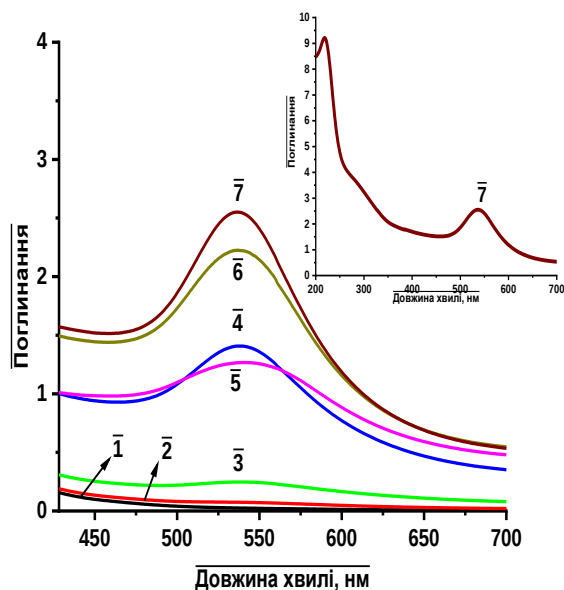


Рис. 3.3. Еволюція спектрів поглинання колоїдів AuНЧ, одержаних за участі екстракту льону в часовому інтервалі при 25°C: 1 год (1), 2,5 год (2), 5 год (3), 24 год (4), 48 год (5), 144 год (6), 168 год (7). Вставка: спектр поглинання колоїду після 168 год.

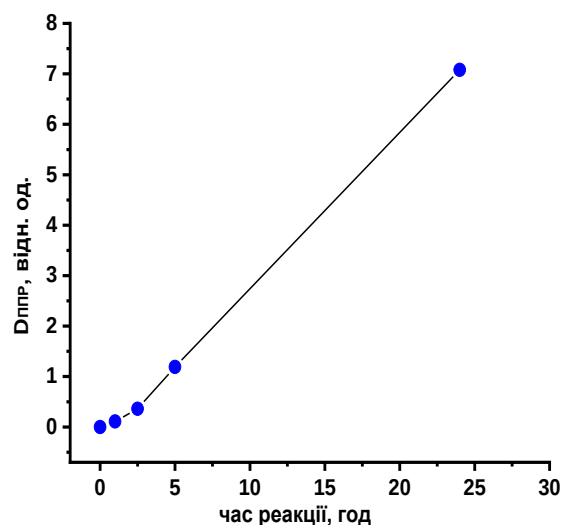


Рис. 3.4. Залежність максимумів ППР ($\lambda = 538$ нм) від часу реакції при 25°C.

Спектри поглинання суміші HAuCl_4 і екстракту льону після нагрівання при постійній температурі 60° та перемішування в бані-шейкері протягом 0,25, 1, 2, 3, 4, 5, 24 та 48 год наводяться на Рис. 3.5. З метою контролю ефективності протікання реакції з часом отримували спектри поглинання колоїду HAuCl_4 з екстрактом льону до нагрівання (Рис. 3.5, крива 1). Еволюція спектрів поглинання колоїду з реакційним часом вказує на те, що після протікання реакції протягом 0,25 год відбувається відновлення йонів золота до НЧ, про що свідчить зниження інтенсивності поглинання максимумів тетрахлорауратної кислоти та поява максимум ППР при $\lambda = 538$ нм. Протягом перших 2 год реакції спостерігається різке зниження максимумів, які належать HAuCl_4 , з поступовим збільшенням

інтенсивності ППР смуги. Видно, що після 2 год нагрівання піки, які належать HAuCl_4 зникають (майже всі йони золота відновлені), про що свідчить і залежність максимуму смуги ППР від часу (Рис. 3.6). Наступні 3 години відбувається перетворення залишкових йонів на НЧ і агрегацією НЧ згідно процесів, зображених на Рис. 3.6. Спостерігається підняття кривих поглинання, що обумовлено формуванням наночастинок металу, які спричиняють відбиття світла. Після 5 год відбувається уширення смуги ППР, що може бути спричинено збільшенням НЧ золота.

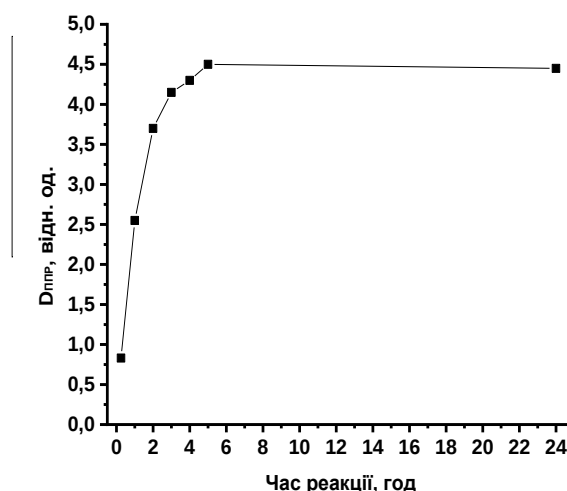
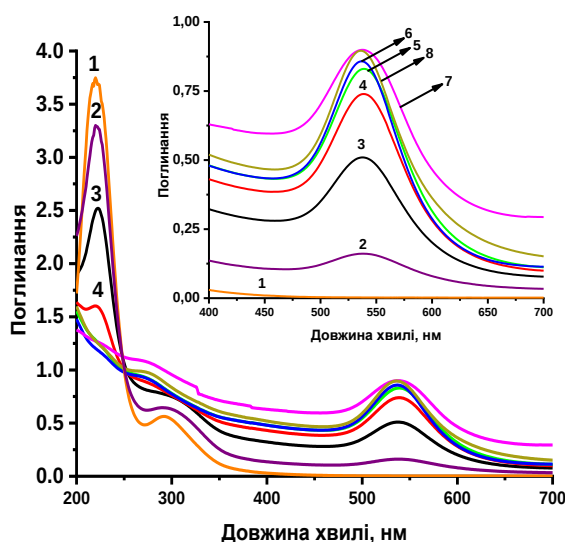


Рис. 3.5. Спектри поглинання колоїдів AuNCH , одержаних за участі екстракту льону. до (1) і після нагрівання при 60°C протягом: 0,25 год (2), 1 год (3), 2 год (4), 3 год (5), 4 год (6), 5 год (7) та 24 год (8). Вставка: ділянка спектру ППР.

Рис. 3.6. Залежність максимумів ППР ($\lambda = 538 \text{ nm}$) від часу реакції при 60°C .

При порівнянні спектрів поглинання колоїдів після 2 год і 48 год (Рис. 3.7) видно, що при проведенні експерименту протягом 48 год, форма кривої спектру поглинання колоїду дещо змінюється, а саме уширюється та спостерігається

підвищення інтенсивності поглинання в області 600-700 нм. Це може бути пов'язано зі збільшенням розміру НЧ внаслідок їх агрегації та росту.

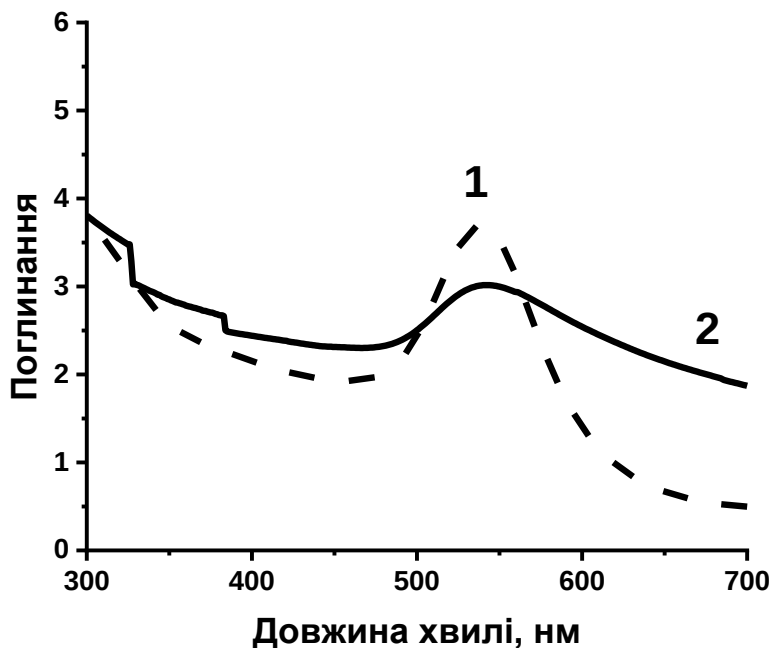


Рис. 3.7. Спектри поглинання колоїду AuНЧ, одержаного за участі екстракту льону після нагрівання при 60°C протягом: 2 год (1) і 48 год (2).

3.3. Визначення розміру НЧ

В статті [21] описується методи, які дозволяють за допомогою УФ-видимих спектрів визначити розмір та концентрацію НЧ. Кожний спектр характеризується поглинанням ППР, що обумовлено коливаннями електронів під дією світла. Для НЧ золота цей пік лежить в межах 520-580 нм. В свою чергу форма та положення піку залежить від розміру частинки (d), діаметричної функції золота та показника заломлення середовища. Було виведено формулу (1), яка дозволяє визначити розмір частинки за значеннями поглинання максимуму ППР ($A_{\text{ппр}}$) та поглинання на фіксованій довжині хвилі, а саме 450 нм (A_{450}). Ця довжина хвилі була вибрана оскільки в цій точці поглинання НЧ золота є ще досить значне, але не настільки чутливе до розміру та не перекривається з піком. Також в цій роботі були виведені універсальні константи $B_1 = 3$ та $B_2 = 2,2$.

$$d = \exp(B_1 \frac{A_{\text{ппр}}}{A_{450}} - B_2) \quad 3.1.$$

Таблиця 3.1. Значення $A_{\text{ппр}}$ і A_{450} , одержані зі спектрів поглинання, і розрахований розмір НЧ золота, одержаних при 25°C у різному часовому інтервалі.

Час реакції, год	$A_{\text{ппр}}$	A_{450}	Розмір НЧ, нм
1	0,02	0,09	0,2
2,5	0,08	0,13	0,7
5	0,25	0,25	2,2
24	1,4	0,94	9,7
144	2,22	1,44	11,3
168	2,5	1,5	16,4

За формулою (1) розраховано нами розмір НЧ золота, одержаних при 25°C (Таблиця 3.1) і 60°C (Таблиця 3.2). Формування НЧ золота при 25°C відбувається дуже повільно, про що свідчать розраховані розміри НЧ. Протягом 5 год діаметр НЧ зростає до ~2 нм, до 24 год - ~ 10 нм, збільшення часу до 168 дозволяє отримати НЧ розміром ~ 16 нм. У випадку реакції при 60°C, спостерігається стрімкий ріст НЧ від ~ 9 нм до ~ 35 нм протягом перших 2 год, при проведенні реакції більше 3 год відбувається незначне збільшення розміру НЧ.

Таблиця 3.2. Значення $A_{\text{ппр}}$ і A_{450} , одержані зі спектрів поглинання, і розрахований розмір НЧ золота, одержаних при 60°C у різному часовому інтервалі.

Час реакції, год	$A_{\text{ппр}}$	A_{450}	Розмір НЧ, нм
0,25	0,16	0,11	8,7
1	0,51	0,28	26,2
2	0,73	0,38	35,3
3	0,83	0,43	36,3
4	0,85	0,43	41,7
5	0,9	0,46	40,4
24	0,89	0,46	36,8

3.3.1 Використання методу динамічного розсіювання світла для визначення розміру НЧ

Метод динамічного розсіювання світла або фотонна кореляційна спектроскопія дає можливість розрахувати коефіцієнти дифузії, які пов'язані з броунівським рухом частинок у рідких середовищах. Це досягається за рахунок опромінення зразка променем лазера та аналізу флуктуацій інтенсивності світла, яке розсіюється від частинок.

Метод ДРС вимірює гідродинамічний діаметр наночастинок. Броунівський рух – рух частинок, зумовлений випадковими зіткненнями з молекулами рідкого середовища. Дрібні частинки рухаються швидше, порівняно з великими, тобто коефіцієнт поступальної дифузії частинок D обернено залежить від їхнього розміру, а саме гідродинамічного радіусу частинок R_H за рівнянням Стокса-Енштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad 3.2.$$

В результаті броунівського руху відстань між частинками змінюється з часом, це призводить до утворення інтерференції в інтенсивності розсіяного світла. Флуктуація інтенсивності розсіяного світла як функція часу дає інформацію про швидкість частинок, тобто про коефіцієнт поступальної дифузії. Великі частинки спричиняють меншу швидкість флуктуації світла, порівняно з маленькими частинками. З часових флуктуацій інтенсивності розсіяного світла можна визначити коефіцієнти дифузії та радіуси частинок.

Корелятор в приладі ДРС співвідносить зміни інтенсивності як функцію часу та генерує кореляційну функцію $G(t)$:

$$G(t) = \langle I(t_0)I(t_0 + t) \rangle, \quad 3.3.$$

Де $I(t_0)$ – кількість фотонів, які отримує детектор в момент часу t_0 , а $I(t_0+t)$ – кількість фотонів через певний проміжок часу t . У випадку, якщо інтенсивність експоненціально згасає, то кореляційна функція є функцією експоненціального згасання з часом релаксації τ :

$$G(t) = A + Be^{-2t/\tau}, \quad 3.4.$$

де A та B – параметри, отримані в результаті апроксимації експериментальних точок в кореляційній функції, а τ характеризує функцію кореляції, значення якої повинно змінюватися протягом інтервалу збору даних $\Delta\tau$.

Коефіцієнт поступальної дифузії D можна розрахувати на основі кореляційної функції, яка буде сумою часів згасання, згенерованим декількома типами дифузії:

$$G(t) = A + [B_1e^{-t/\tau_1} + B_2e^{-t/\tau_2}]^2 \quad 3.5.$$

Кожен момент згасання або час релаксації τ_i у спектрі відповідатиме певному коефіцієнтові дифузії:

$$D = \left(\frac{1}{\tau_i}\right)q^{-2} \quad 3.6.$$

За допомогою рівняння Стокса-Ейнштейна, знаходяться гідродинамічні радіуси [22].

Дослідження розподілу НЧ за розміром проводили з використанням модуля аналізу наноматеріалів та характеристики дисперсних систем (Malvern Instrument LTD, Великобританія, 2018 р.). На рис. Рис 3.8 та Рис 3.9 наведено дані щодо розподілу частинок за розмірами, отримані методом ДРС для AuНЧ синтезованих при 25°C та 60°C відповідно. Результати ДРС свідчать про формування колоїдних систем із діаметром частинок у межах 10–35 нм та 25–110 нм для 25 °C та 60 °C відповідно. Вузька та симетрична форма піку на гістограмі Рис 3.8 вказує на формування колоїдної системи з домінуючою фракцією наночастинок діаметру 16–20 нм.

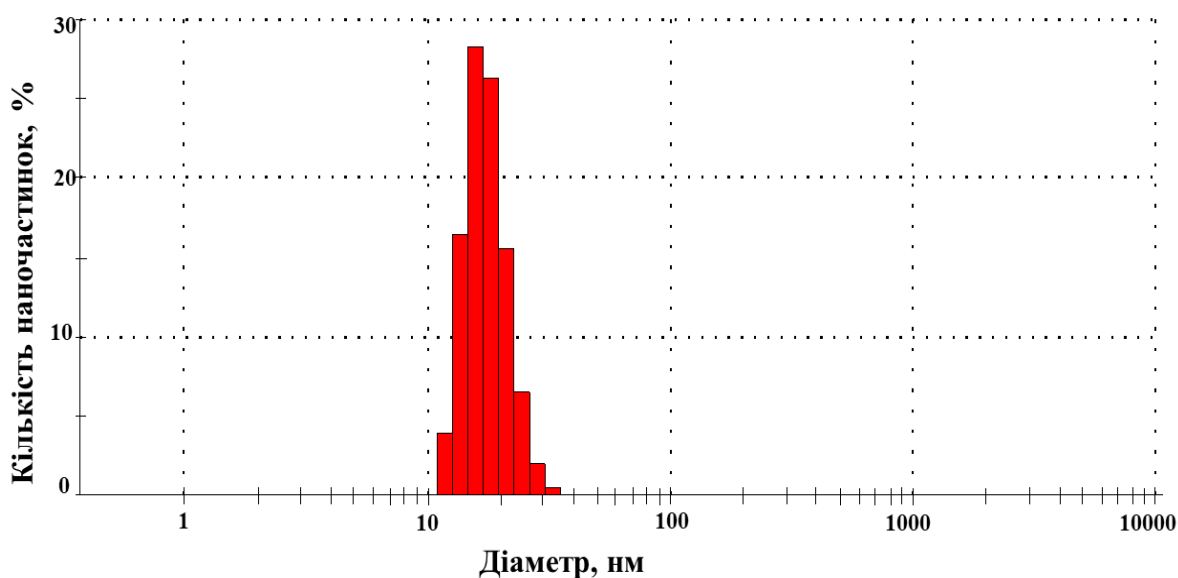


Рис 3.8. Розподіл AuНЧ, одержаних при 25°C, за розмірами згідно даних ДРС.

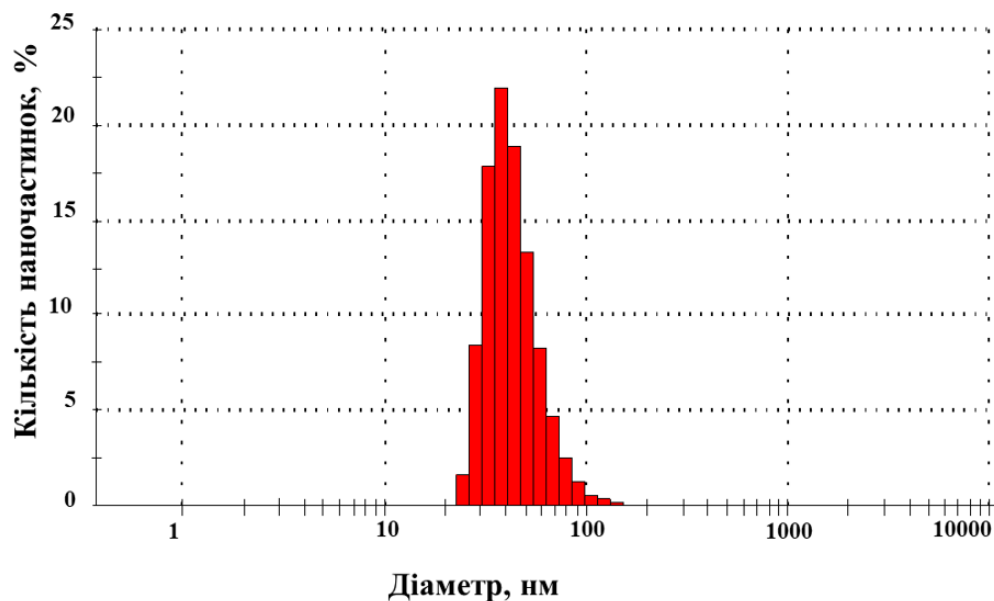


Рис 3.9. Розподіл одержаних при 60°C, за розмірами згідно даних ДРС.

В той час як, асиметрія графіку Рис 3.9 в бік більших діаметрів свідчить про наявність у системі частинок з більшим розміром для колоїдів, одержаних при 60 °C. Найбільша кількість частинок, як свідчать дані ДРС, характеризуються діаметром 20 - 50 нм, з максимальною кількістю НЧ розміром 38 нм.

3.3.2 Дослідження морфології та розміру НЧ за допомогою СЕМ

Метод сканувальної електронної мікроскопії (СЕМ) використовується для отримання високоякісних зображень, які надають детальну інформацію про морфологію та розмір зразків [23]. У цьому методі для сканування поверхні об'єкта використовується сфокусований пучок електронів, що дозволяє отримувати зображення з високою роздільною здатністю від менше 1 нм до декількох нанометрів. СЕМ проектує та спрямовує сфокусований потік електронів на поверхню досліджуваного зразка. В результаті електрони взаємодіють з атомами зразка, генеруючи сигнали з інформацією про морфологію та склад зразків, які вимірює детектор. Електрони мають набагато меншу довжину хвиль порівняно зі

світлом, що забезпечує кращу роздільну здатність порівняно з оптичним мікроскопом. За рівнянням де Бройля (3.7) довжина хвилі падаючого електрона залежить від прискорювальної напруги мікроскопа V :

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meV}} \quad 3.7.$$

Таблиця 3.3. Значення довжини хвилі електрона в залежності від прискорювальної напруги.

Прискорювальна напруга V	Довжина хвилі електрона λ
5 кВ	0,0172 нм
10 кВ	0,0122 нм
20 кВ	0,0086 нм

Різниця між довжинами хвиль електронів та довжинами хвиль видимого світла дає можливість електронним мікроскопам візуалізувати матеріали на атомному та нанометровому рівнях.

Електрони формуються в генераторі електронів та прискорюються вздовж колони мікроскопа під дією прискорювальної напруги. Конденсорні лінзи та діафрагми зменшують діаметр пучка, а об'єктна лінза фокусує пучок електронів на поверхні зразка. Діаметр пучка електронів залежить від типу генератора, прискорювальної напруги та конфігурації лінз та може бути в діапазоні від <1 до 20 нм. Як колона, так і камера знаходяться під дією вакууму, який забезпечує система насосів.

В результаті взаємодії електронного пучка зі зразком генерується велика кількість сигналів, які розділяються на три основні типи: вторинні електрони, відбиті електрони та характеристичне рентгенівське випромінювання.

Вторинні електрони використовуються переважно для отримання зображень морфології, оскільки вона генерується ближче до поверхні зразка. Вторинні

електрони випромінюється внаслідок непружного розсіювання, енергія таких електронів становить менше 50 еВ.

Відбиті електрони утворюються внаслідок наближення первинного пучка електронів до ядра атома зразка, а позитивний заряд викликає відхилення швидкого електрона, що призводить до його вильоту з поверхні.

Характеристичне рентгенівське випромінювання виникає в результаті повернення іонізованого атому до основного стану, заповнюючи місце на внутрішній електронній оболонці електроном з вищої орбіталі. Різниця енергій між двома електронними оболонками еквівалентна енергії характеристичного рентгенівського випромінювання, що дозволяє використовувати їх для визначення конкретного елемента, в якому вона виникла.

СЕМ знімки колоїдів AuНЧ, одержаних при 25 °С, вказують на те, що розмір частинок в більшій мірі відповідає 7-10 нм (Рис. 3.10 а і б), хоча трапляються і більшого розміру (Рис. 3.10 в), а саме 21-29 нм. Згідно розрахунків, одержаних за допомогою програми ImageJ (за трьома СЕМ-мікрофотографіями), встановлено, що середній розмір частинок, синтезованих при 25 °С, становить 12 нм. З СЕМ-мікрофотографій видно, що за цієї температури переважно формуються сферичного розміру наночастинки.

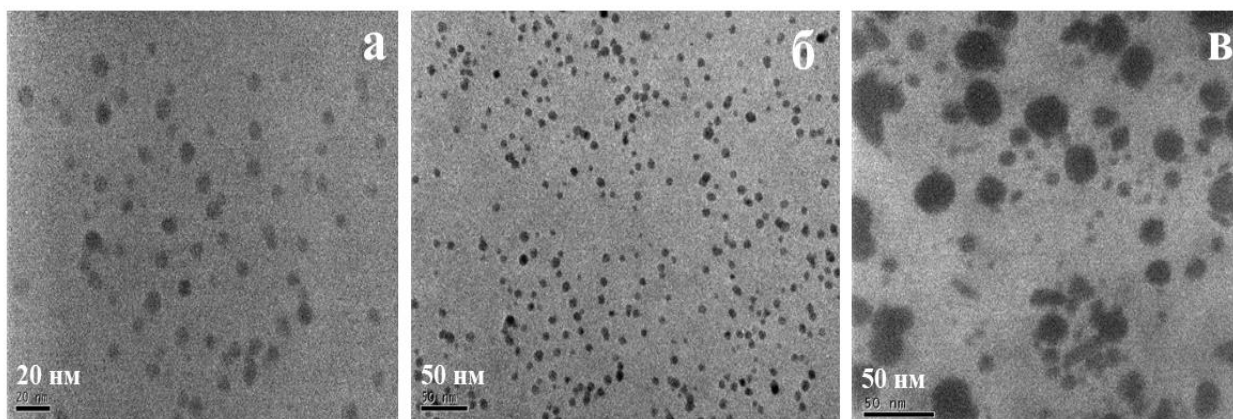


Рис. 3.10. СЕМ зображення наночастинок золота, синтезованих при 25°С.

У випадку наночастинок золота, синтезованих при 60 °С (Рис. 3.11), формуються частинки різного розміру, від 7-20 нм і до 50-70 нм. Згідно розрахунків, одержаних за допомогою програми ImageJ (за трьома СЕМ-мікрофотографіями), встановлено, що середній розмір частинок, синтезованих при 60 °С, становить 28 нм. На відміну від зразку, одержаного при 25 °С, спостерігається формування НЧ різної морфології: трикутної, видовженої, сферичної та багатокутної, що вказує на їхню агрегацію та/чи агломерацію при вищій температурі синтезу. Відомо, що ріст частинок відбувається внаслідок дифузійних процесів; зокрема, вища швидкість відновлення іонів металу сприяє інтенсивнішому формуванню нуклеаційних центрів НЧ.[23]

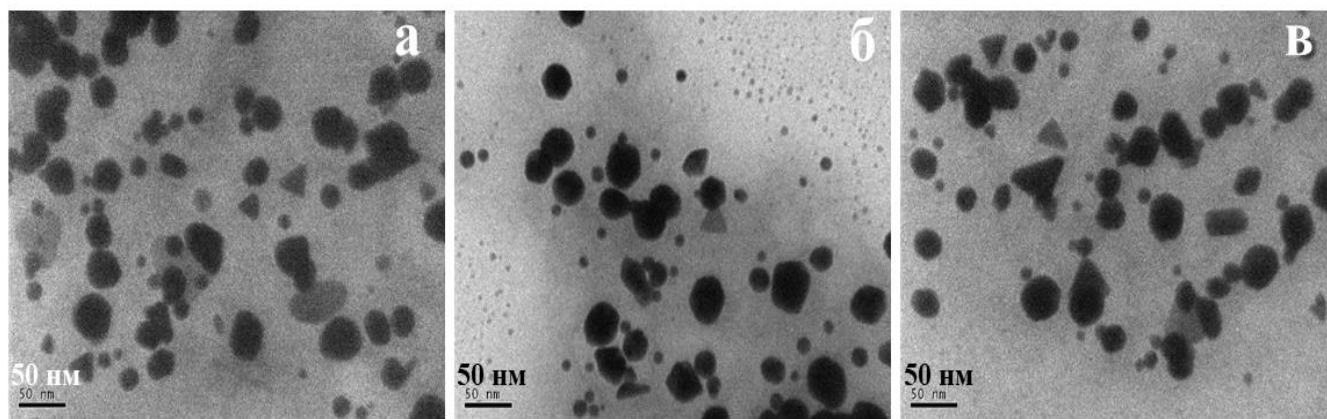


Рис. 3.11. СЕМ зображення наночастинок золота, синтезованих при 60°C.

Таким чином, регулювати середній розмір та дисперсність AuНЧ можна не лише завдяки специфіці обраного екстракту [5, 6], а й шляхом варіювання температури синтезу.

3.4. Дослідження здатності зеленої матриці до співкристалізації з аналітом

На Рис. 3.11 і Рис. 3.12 наведено оптичні мікрофотографії скляної підкладки з нанесеними і висушеними контрольними та дослідними зразками різного складу.

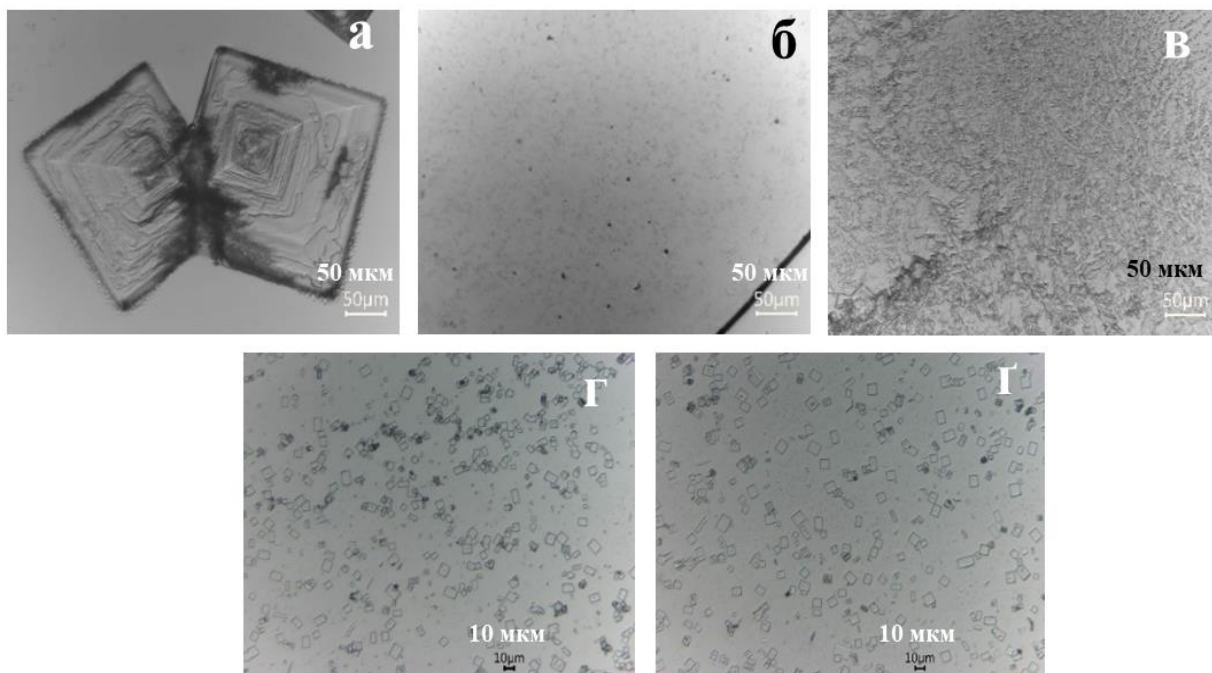


Рис. 3.11. Оптичні мікрофотографії нанесених на скляну підкладку та висушених на повітрі контрольних зразків: а – екстракт вичавок льону з NaCl, б – AuНЧ з екстрактом льону при 60°С протягом 24 год, в - AuНЧ з NaCl при 60°С протягом 24 год, г - екстракт льону з додаванням глюкози та NaCl при 60°С протягом 24 год, ґ – екстракт льону з додаванням глюкози та NaCl при 60°С протягом 48 год.

Як видно, у випадку колоїду AuНЧ після висушування на скельці утворюється рівномірний суцільний шар з AuНЧ, а у випадку додавання NaCl – рівномірний шар з кристалів NaCl розміром 10 ± 2 мкм. При цьому додавання глюкози не впливає на розмір кристалітів солі натрію. Розміри і рівномірність шару мікрокристалів NaCl залежать від температури синтезу та концентрації НЧ у системі. Так, у випадку колоїду (Рис. 3.12 б) утворюються більші за розміром ($\sim 40 \pm 2$ мкм) кристаліти солі, ніж для колоїдів синтезованих при вищій температурі (Рис. 3.12 в).

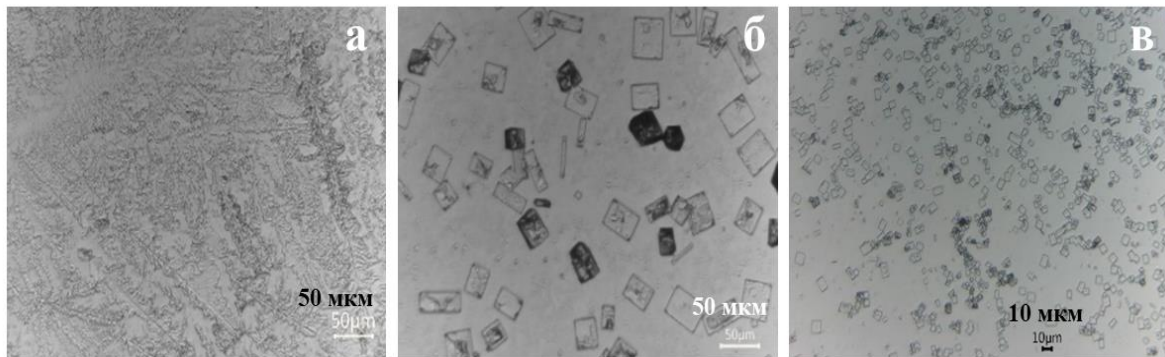


Рис. 3.12. Оптичні мікрофотографії нанесених на скляну підкладку та висушених на повітрі досліджених зразків: а - AuНЧ з додаванням глюкози та NaCl, б – AuНЧ з додаванням глюкози та NaCl при 25°C протягом 168 год, в - AuНЧ з додаванням глюкози та NaCl при 60°C протягом 144 год.

Таким чином, одержані результати свідчать, що синтезовані «зеленим» методом колоїди AuНЧ за участі екстрактів льону здатні забезпечити рівномірну співкристалізацію з аналітом і можуть бути застосовані як матриці для дослідження низькомолекулярних сполук методом мас-спектрометрії з поверхнево-активованою лазерною десорбцією/іонізацією.

3.5 Мас-спектрометричні дослідження

З загального вигляду (Рис 3.13 а) мас-спектрів AuНЧ, синтезованих при 25°C, (контрольний зразок 1) видно, що фіксуються сигнали, які відносяться до Au-вмісних іонів: Au^+ ($m/z = 197,1$), Au_2^+ ($m/z = 394,0$) і Au_3^+ ($m/z = 590,7$) і до катіонізованої форми глюкози $[\text{Глюкоза}+\text{Na}]^+$ ($m/z = 203,0$). Інтенсивність сигналу при $m/z = 203,1$ є досить інтенсивним, що вказує на ефективність визначення її при застосуванні AuНЧ як матриці. Поява даного сигналу у мас-спектрах вказує на те, що синтезовані з застосуванням екстракту льону колоїди AuНЧ містять певну кількість глюкози.

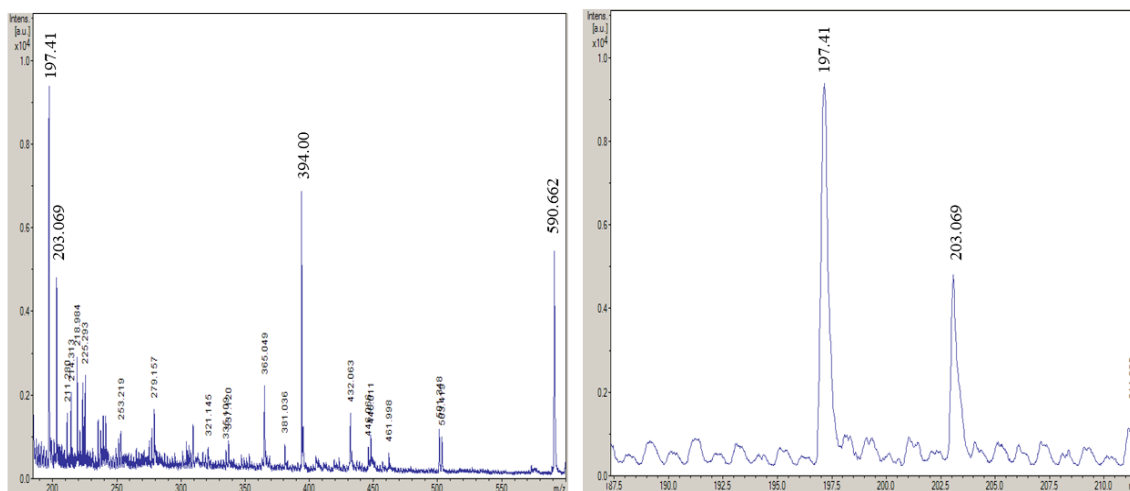


Рис. 3.13. Мас-спектри МАЛДІ-МС AuНЧ (контрольний зразок 1), синтезованих при 25°C: загальний вигляд (зліва) та фрагмент мас-спектру в діапазоні m/z 190-220 (справа).

Відсутність AuНЧ у наступному контрольному зразку (суміш NaCl + Глюкоза), навіть при наявності NaCl як додаткового катіонізуючого агенту, не дозволяє визначити глюкозу даним методом (Рис. 3.14). Це вказує на те, що глюкоза не іонізується за відсутності AuНЧ.

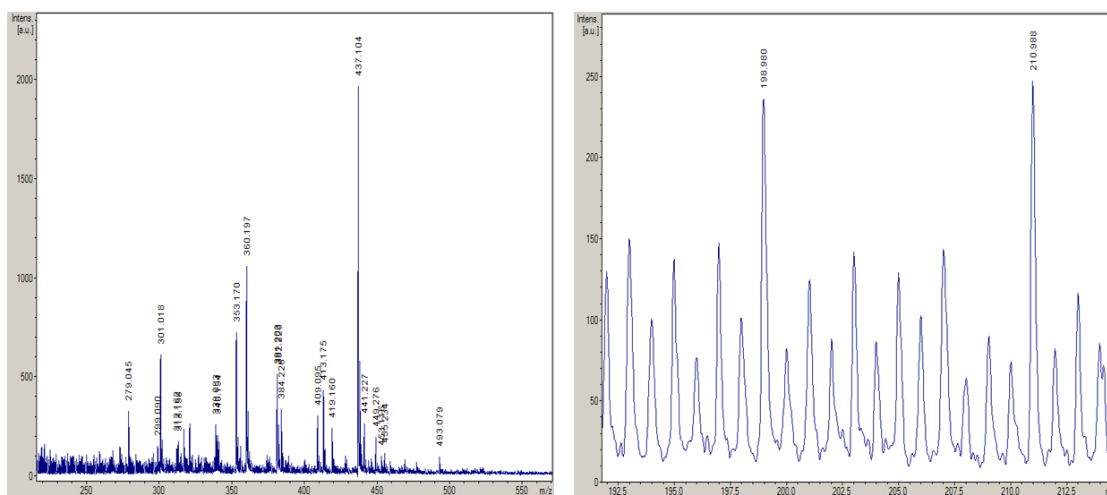


Рис. 3.14 Мас-спектри МАЛДІ-МС суміші NaCl + Глюкоза (контрольний зразок 2): загальний вигляд (зліва) та фрагмент мас-спектру в діапазоні m/z = 190-220 (справа).

Додавання 2 мкл 1 мМ глюкози до AuНЧ приводить до підвищення абсолютної інтенсивності ($I_{\text{абс}}$) сигналу глюкози $m/z = 203,1$ (Таб. 3.4) і Au-вмісних іонів: Au^+ ($m/z = 197,1$), Au_2^+ ($m/z = 394,0$) і Au_3^+ ($m/z = 590,7$). Відзначається підвищення $I_{\text{абс}}$ для Au_2^+ і Au_3^+ , що відрізняється від контрольного зразку 1 (Рис. 3.13).

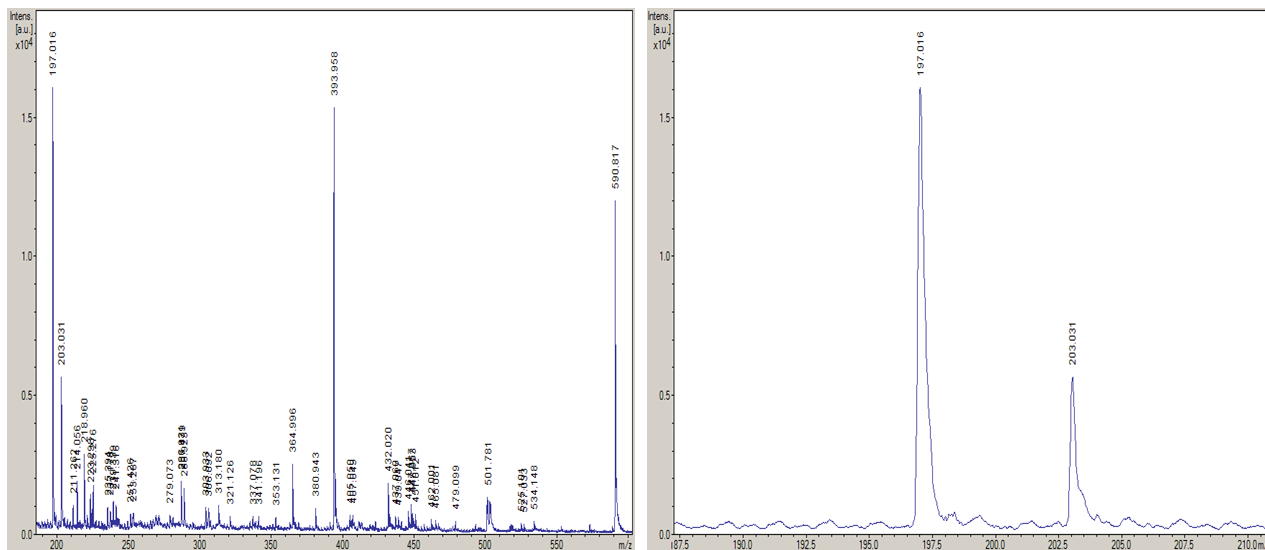


Рис. 3.15. Мас-спектри МАЛДІ-МС суміші AuНЧ + Глюкоза (контрольний зразок 3) з синтезованими НЧ при 25°C: загальний вигляд (зліва) та фрагмент мас-спектру в діапазоні m/z 190-220 (справа).

Зниження $I_{\text{абс}}$ сигналу глюкози $m/z = 203,0$ (Таб. 3.4, Рис. 3.16) спостерігається для суміші AuНЧ + NaCl.

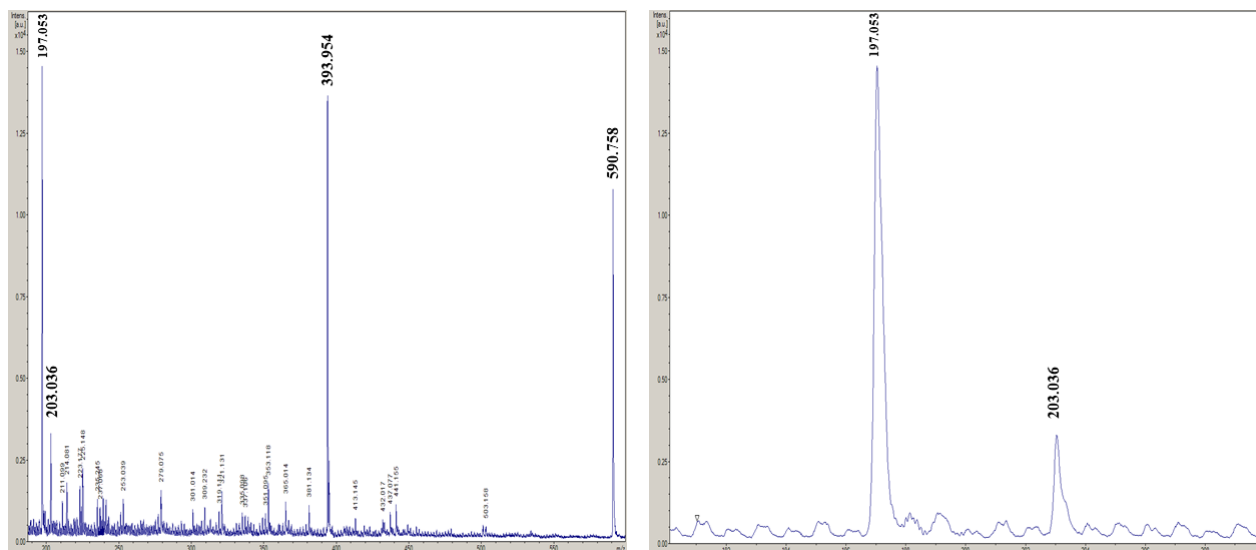
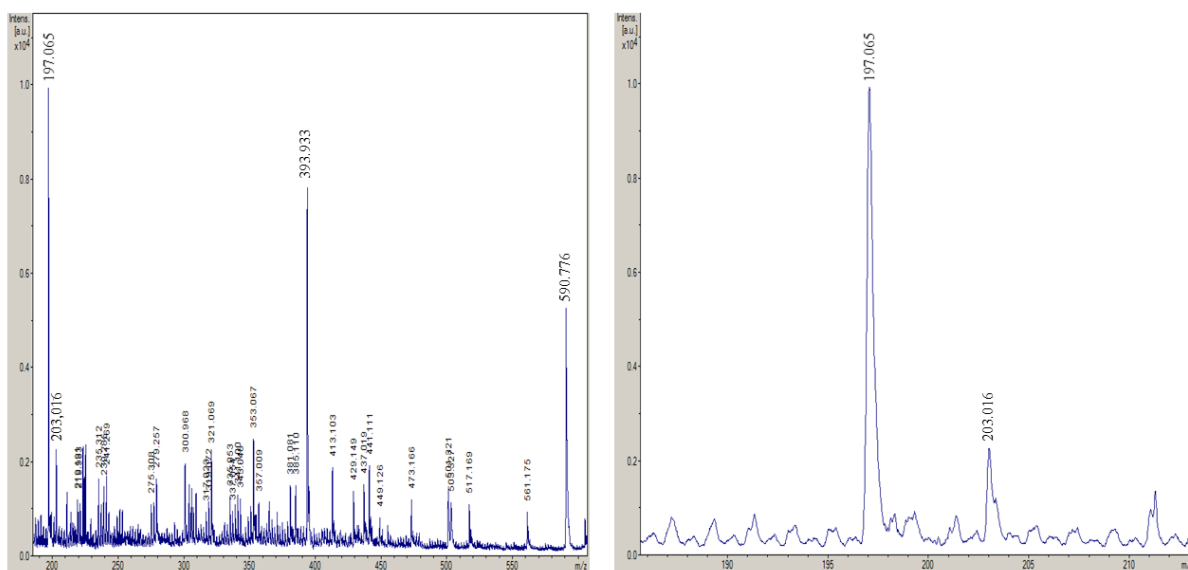
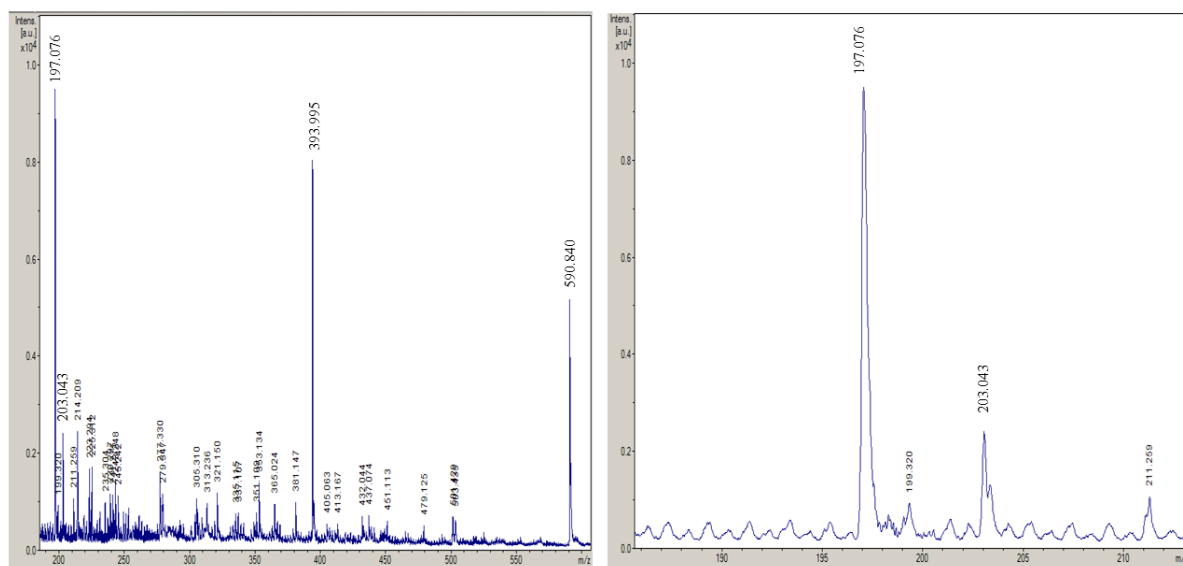


Рис. 3.16. Мас-спектри МАЛДІ-МС AuНЧ + NaCl (контрольний зразок 4) з синтезованими НЧ при 25°C, загальний вигляд (зліва) та фрагмент мас-спектру в діапазоні $m/z = 190-220$ (справа).

Для дослідження та аналізу результатів трикомпонентної суміші AuНЧ+NaCl+Глюкоза, проводили додаткові експерименти (контрольний зразок 5 і 6) (Рис. 3.17), де замість глюкози додавали H_2O з метою використання сталого об'єму зразків при наступному використанні. У випадку AuНЧ+NaCl+ H_2O з синтезованими НЧ як при 25°C, так і при 60 °C, I_{abs} сигналу глюкози $m/z = 203,1$ значно знижується, що зумовлено збільшенням об'єму зразку та зниженням концентрації аналіту. Також ймовірно, що розбавлення аналіту приводить до зміни морфології та «розмиття» ділянки зразку після висихання та/або концентрації НЧ, що, своєю чергою, призводить до зниження ефективності десорбції/іонізації.



а



б

Рис. 3.17. Мас-спектри МАЛДІ-МС контрольних зразків $\text{AuNC}+\text{NaCl}+\text{H}_2\text{O}$ (контрольний зразок 5 і б) з синтезованими НЧ при 25°C (а) та 60°C (б): загальний вигляд (зліва) та фрагмент мас-спектру в діапазоні $m/z = 190-220$ (справа).

Мас-спектри МАЛДІ-МС сумішей AuNC , NaCl та глюкози різної концентрації (НЧ синтезовані при температурі 25°C) наведено на Рис. 3.18. Додавання глюкози з концентрацією $0,5\text{ мМ}$ до суміші AuNC і NaCl спричиняє

зростання інтенсивності піків при $m/z = 197$ і $m/z = 203$ у порівнянні з контрольним зразком 5 (Рис 3.17. а, Таб. 3.4).

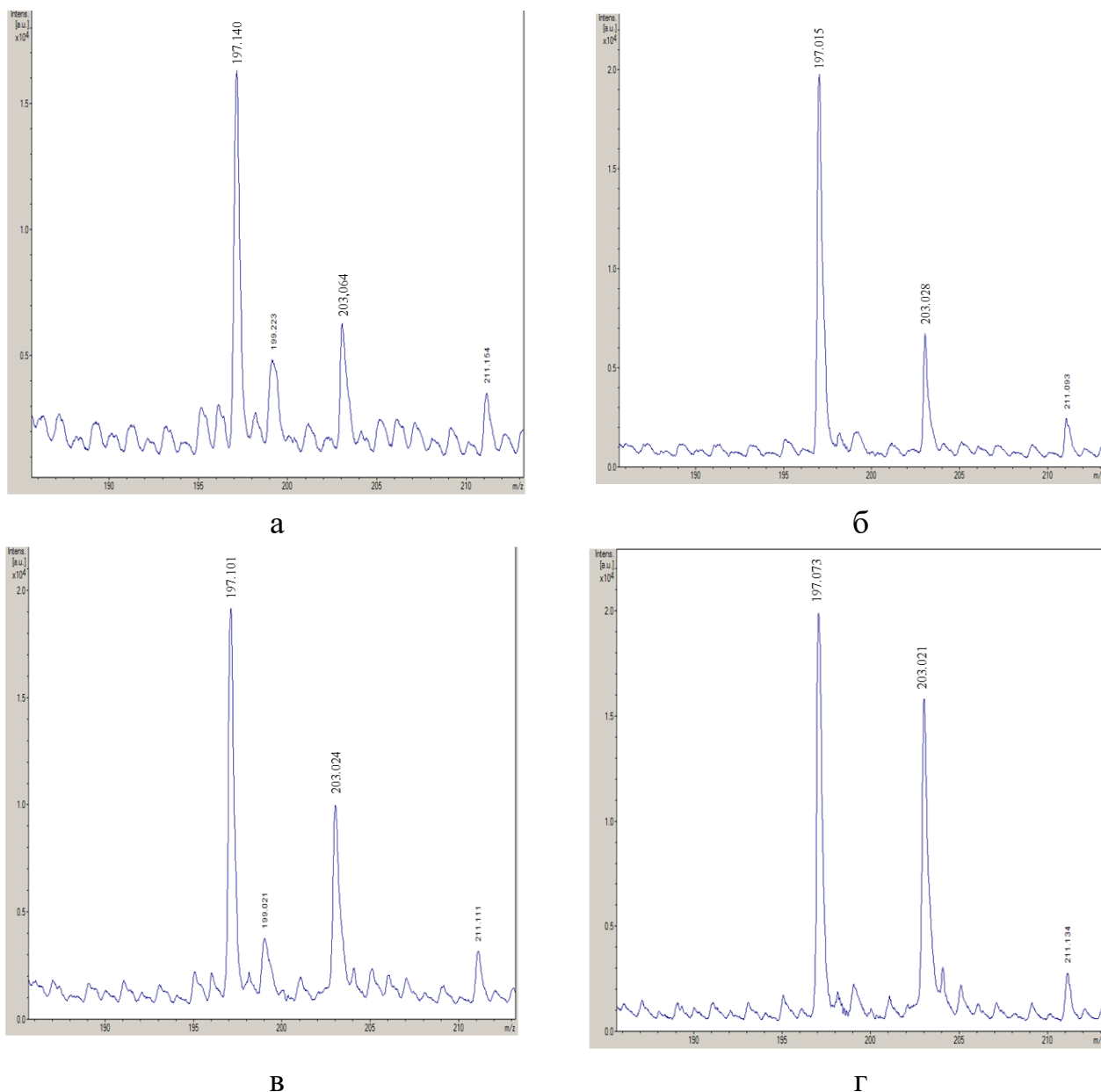


Рис. 3.18. Мас-спектри МАЛДІ-МС суміші $\text{AuNH}_4 + \text{NaCl} + \text{Глюкоза}$ (НЧ синтезовані при температурі 25°C) з різною концентрацією глюкози: 0,5 мМ (а), 0,75 мМ (б), 1 мМ (в), 2 мМ (г).

Збільшення концентрації глюкози до 0,75 мМ призводить до несуттєвого зростання інтенсивності піку при $m/z = 203$. При вищих концентраціях глюкози (1 мМ і 2 мМ) спостерігається значне зростання $I_{\text{абс}}$ піку при $m/z = 203$.

У випадку трикомпонентних зразків з синтезованими НЧ при 60 °С спостерігається аналогічна тенденція, що свідчить про високу відтворюваність запропонованого методу визначення глюкози з використанням AuНЧ.

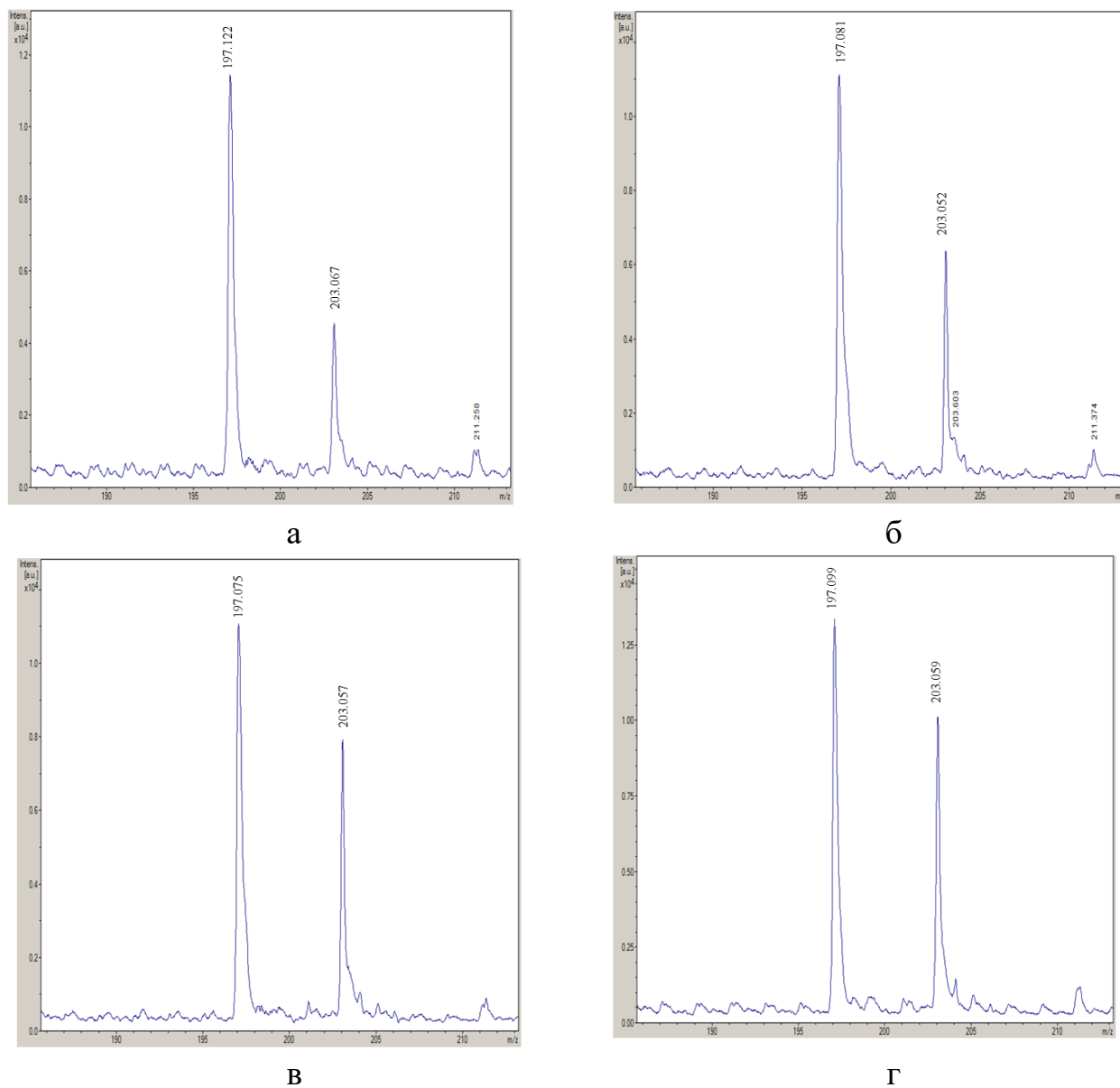


Рис. 3.19. Мас-спектри МАЛДІ-МС суміші AuНЧ+NaCl+Глюкоза (НЧ синтезовані при температурі 60 °С) з різною концентрацією глюкози: 0,5 мМ (а), 0,75 мМ (б), 1 мМ (в), 2 мМ (г).

Значення абсолютної ($I_{\text{абс}}$) і відносної ($I_{\text{від}}$) інтенсивностей для сигналів з $m/z = 197$ і $m/z = 203$ наведено в Табл. 3.4.

Таблиця 3.4. Значення абсолютної ($I_{\text{абс}}$) і відносної ($I_{\text{від}}$) інтенсивностей для сигналів з $m/z = 197$ і $m/z = 203$.

зразок	$I_{\text{абс}}$, відн.од.		$I_{\text{від}}$, %.	
	$m/z = 197$	$m/z = 203$	$m/z = 197$	$m/z = 203$
AuНЧ	8838	4054	100	46
AuНЧ + Глюкоза	15436	5192	100	34
AuНЧ + NaCl	13982	2674	100	20
НЧ синтезовані при 25°C				
AuНЧ+NaCl+H ₂ O	9400	1725	100	18
AuНЧ+NaCl+Глюкоза				
0,5 мМ	14352	4316	100	30
0,75 мМ	19254	5536	100	29
1 мМ	18370	8568	100	47
2 мМ	19744	14446	100	73
НЧ синтезовані при 60° С				
AuНЧ+NaCl+H ₂ O	9266	1926	100	21
AuНЧ+NaCl+Глюкоза				
0,5 мМ	9825	2677	100	27
0,75 мМ	9852	3940	100	40
1 мМ	10510	4440	100	42
2 мМ	12905	9111	100	71

Як видно з Таб. 3.4 і мас-спектрів (Рис. 3.18 і Рис. 3.19), аналіз результатів з використанням $I_{\text{абс}}$ і $I_{\text{від}}$ не дозволяє точно визначати кількісні характеристики, тому оцінку результатів проводили шляхом визначення площі піків з $m/z = 197$ та 203,

які відповідають утворенню іонів золота та катіонізований формі глюкози відповідно, з трьох незалежних вимірів для знаходження середнього значення.

Площу контрольного та дослідних (аналіт) зразків знаходили шляхом нормування лінії $m/z = 203$ спектру аналіту відносно спектру колоїду без аналіту (контрольні зразки 5 і 6) за формулою, щоб виключити вплив присутньої глюкози екстракту в колоїдах AuНЧ:

$$S_{\text{норм}} = \frac{S_{197}(\text{еталон})}{S_{197}(\text{аналіт})} * S_{203}(\text{аналіт}) - S_{203}(\text{еталон}) \quad 3.8$$

де $S_{\text{норм}}$ – площа піку в мас-спектрі для іона з $m/z = 203$, що відповідають $[\text{Глюкоза}+\text{Na}]^+$, $S_{197}(\text{еталон})$ – площа піку для іона з $m/z = 197$ ($[\text{Au}]^+$) у мас-спектрі порівняння без глюкози; $S_{197}(\text{аналіт})$ – площа піку для іона з $m/z = 197$ у мас-спектрі з глюкозою; $S_{203}(\text{еталон})$ – площа піку для іона з $m/z = 203$ у мас-спектрі без глюкози; $S_{203}(\text{аналіт})$ – площа піку для іона з $m/z = 203$ у порівняльному мас-спектрі з глюкозою.

Розрахована нормована площа ($S_{\text{норм}}$) глюкози для трикомпонентної суміші з синтезованими НЧ при 25 °С і 60 °С представлені в таблицях Таб. 3.6 і Таб. 3.7. відповідно. В обох випадках спостерігається зростання $S_{\text{норм}}$ зі збільшенням концентрації, що свідчить про оптимально підібрані умови для аналітичного визначення глюкози методом МАЛДІ-МС.

Таблиця 3.6. Площі піків для AuНЧ, синтезованих при 25°С (S_{197}), глюкози (S_{203}) і розрахована нормована площа ($S_{\text{норм}}$) для глюкози .

Зразок	S_{197}	S_{203}	$S_{\text{норм}}$
еталон	3615	1119	
Аналіт + глюкоза 0,50 мМ	6120	1852	1625
Аналіт + глюкоза 0,75 мМ	7521	3480	2256
Аналіт + глюкоза 1,00 мМ	7563	1539	2431
Аналіт + глюкоза 2,00 мМ	7712	7729	4590

Таблиця 3.7. Площі піків для AuНЧ, синтезованих при 60 °С (S_{197}), глюкози (S_{203}) і розрахована нормована площа ($S_{\text{норм}}$) для глюкози.

Зразок	S_{197}	S_{203}	$S_{\text{норм}}$
еталон	4163	945	
Аналіт + глюкоза 0,50 мМ	4331	1306	310
Аналіт + глюкоза 0,75 мМ	4411	1495	466
Аналіт + глюкоза 1,00 мМ	4558	2182	1047
Аналіт + глюкоза 2,00 мМ	4890	3524	2054

Згідно одержаних результатів по нормуванню побудовано залежності нормованої площі піку $m/z = 203$ від концентрації глюкози, які можуть слугувати калібрувальними кривими для визначення глюкози у біологічних рідин. Як видно з рисунків Рис. 3.20 і Рис. 3.21 підвищення концентрації глюкози приводить до збільшення нормованої площі.

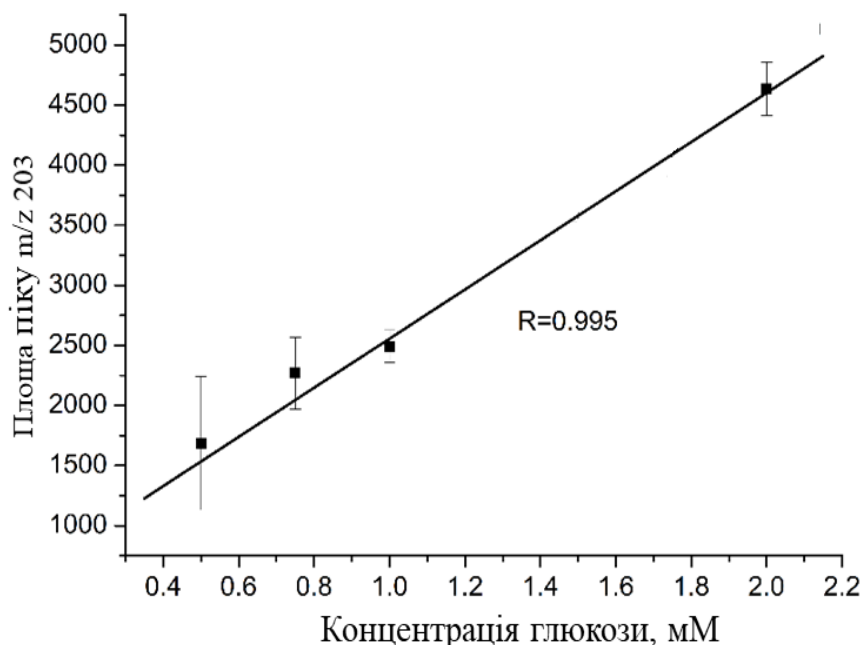


Рис. 3.20. Залежність площі нормованого піку глюкози ($S_{\text{норм}}$) від концентрації для систем з AuНЧ, синтезованих при 25°С.

Залежність зображена на Рис. 3.13 для зразку з AuНЧ, одержані при 25°C, демонструють вищу кореляцію між концентрацією глюкози та нормованою площею сигналу. Слід зауважити у контрольному розчині сигнал глюкози не був виявлений. Крім того, наявність NaCl виявилася необхідною для ефективного утворення іонів [глюкоза+Na]⁺ із високою лінійною залежністю площі піка $m/z = 203$ від концентрації глюкози в діапазоні 0,5–2,0 ммоль/л. Отримані результати свідчать про те, що цей підхід може бути корисним для кількісного аналізу глюкози, з використанням матриць на основі AuНЧ. Одержані при 25°C AuНЧ-матриці проявляють вищу ефективність у визначенні глюкози, що обумовлено вузьким розподілом НЧ за розмірами та їхньою практично однаковою формою. Це, своєю чергою, дозволяє знизити собівартість даного методу шляхом їх формування при нормальних умовах.

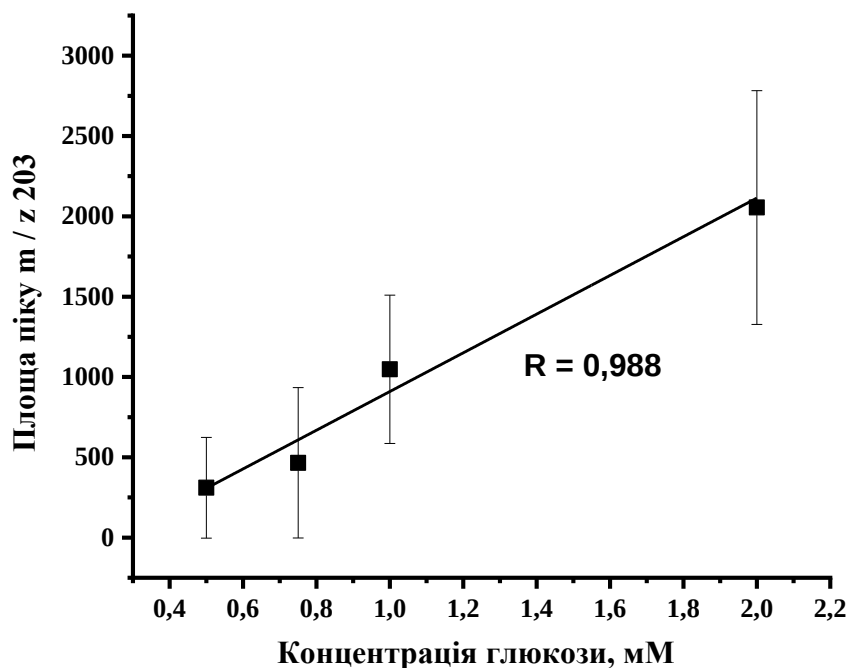


Рис. 3.21. Залежність площі нормованого піку глюкози ($S_{\text{норм}}$) від концентрації для систем з AuНЧ, синтезованих при 25°C.

У випадку зразку з AuНЧ, одержаних при 60°C, спостерігається аналогічна залежність, але з дещо нижчою кореляцією, що може бути обумовлено різною

формою та більшим розміром синтезованих частинок золота, що підтверджують дані СЕМ (Рис. 3.10).

Таким чином, розмір і форма AuНЧ за умови їх застосування як матриць впливають на ефективність детектування аналіту, а отримані результати свідчать про перспективність цього підходу для кількісного аналізу глюкози методом МАЛДІ-МС.

Висновки

1. Встановлено, що компоненти екстракту вичавок льону є ефективними відновниками йонів золота та стабілізаторами НЧ, одержаних «зеленим» синтезом. Показано, що підвищення температури з 25 до 60°C прискорює процес формування колоїду з 24 годин до 15 хвилин.
2. Методами СЕМ, ДРС і УФ-видимої спектроскопії досліджено, що середній розмір AuНЧ становить менше 20 нм і 40 нм для 25°C і 60°C відповідно; формування сферичних частинок відбувається при 25°C, а полідисперсні системи з різноманітними геометричними формами утворюються при 60°C.
3. Показано, що синтезовані «зелені» AuНЧ забезпечують рівномірну співкристалізацію глюкози з катіонізуючими добавками по всій площі мішені. Це дозволяє нівелювати ефект «неоднорідного розподілу» та суттєво підвищує відтворюваність аналітичного сигналу під час кількісних вимірювань.
4. Встановлено, що присутність NaCl інтенсифікує утворення аддукт-іонів [Глюкоза+Na]⁺, що суттєво підвищує чутливість аналізу та підтверджує ефективність запропонованого підходу для кількісного визначення глюкози методом МАЛДІ-МС.
5. Отримані дані демонструють лінійну залежність між концентрацією глюкози та нормованою площею піка з $m/z = 203$, що відповідає аддукту [Глюкоза+Na]⁺. Встановлено, що AuНЧ-матриці, синтезовані при 25 °C, забезпечують вищу аналітичну якість визначення завдяки монодисперсності та практично однорідній формі наночастинок.
6. Результати досліджень вказують на доцільність практичного застосування AuНЧ, синтезованих із використанням «зеленої» хімії, у мас-спектрометричному аналізі МАЛДІ. Поєднання задовільної відтворюваності сигналу та простоти підготовки зразків свідчить про перспективність подальшого розвитку цього підходу для визначення вуглеводів.

Використані джерела

1. Santhosh, P.B.; Genova, J.; Chamati, H. Green Synthesis of Gold Nanoparticles: An Eco-Friendly Approach. *Chemistry* 2022, 4, 345-369. <https://doi.org/10.3390/chemistry4020026>
2. Daizy P. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. 2010, 42, 1417-1424. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2009.11.081>.
3. Geetha R.; Ashokkumar T.; Tamilselvan S. et al. Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. 2013, 4, 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12645-013-0040-9>
4. Engelbrekt, Christian & Sørensen, Karsten & Zhang, Jingdong & Welinder, Anna & Jensen, Palle & Ulstrup, Jens. Green synthesis of gold nanoparticles with starch-glucose and application in bioelectrochemistry. *Journal of Materials Chemistry*. 2013, 19, 7839-7847. 10.1039/B911111E.
5. Elia P.; Zach R.; Hazan S.; Kolusheva S.; Porat Z.; Zeiri Y. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *Int J Nanomedicine*. 2014, 9(1), 4007-402. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57343>
6. Badeggi, U.M.; Ismail, E.; Adeloye, A.O.; Botha, S.; Badmus, J.A.; Marnewick, J.L.; Cupido, C.N.; Hussein, A.A. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Capped with Procyanidins from *Leucosidea sericea* as Potential Antidiabetic and Antioxidant Agents. *Biomolecules* 2020, 10, 452. <https://doi.org/10.3390/biom10030452>
7. Polte J.; Ahner TT.; Delissen F.; Sokolov S.; Emmerling F.; Thünemann AF.; Kraehnert R. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. *J Am*

- Chem Soc. 2010 Feb 3;132(4):1296-301. doi: 10.1021/ja906506j. PMID: 20102229.
8. Hoffmann E.; Stroobant V. Mass Spectrometry. Principles and application. 2007
 9. Hillenkamp F., Peter-Katalic J. MALDI-MS. A practical guide to instrumentation, methods, and application. 2007
 10. Lee; Sun-Young. "Analysis of Arginine, Glucose, Sucrose, and Polyethylene Glycols Using a Wood Charcoal Matrix for MALDI-MS." Mass Spectrometry Letters, 2010, 33–36, 1. doi:10.5478/MSL.2010.1.1.033.
 11. Sharma, A., Rejeeth, C., Vivek, R. et al. "Novel Green Silver Nanoparticles as Matrix in the Detection of Small Molecules Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry" (MALDI-MS), 2021, 715–725, <https://doi.org/10.1007/s12247-020-09486-6>
 12. Shuguang M., Swapan K., Chowdhury B., Kevin B. "Application of Mass Spectrometry for Metabolite Identification", 2006, 503-523, doi: 10.2174/138920006777697891
 13. Strathmann F. G., Hoofnagle A. N. "Current and Future Applications of Mass Spectrometry to the Clinical Laboratory". American Journal of Clinical Pathology. 2011, 609–616, <https://doi.org/10.1309/AJCPW0TA8OBBNGCK>
 14. Clark A. E., Kaleta E. J., Arora A., Wolk D. M. "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology". 2013, DOI: 10.1128/CMR.00072-12
 15. Patel R. "MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases" Clin Chem., 2015, DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
 16. Caprioli R. M., Farmer T. B., Gile J. "Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS", 1997, 4751-4760, DOI: 10.1021/ac970888i
 17. Schwamborn K., Caprioli RM. "MALDI imaging mass spectrometry--painting molecular pictures.", 2010, 529-38, DOI: 10.1016/j.molonc.2010.09.002

18. Prideaux B., Stoeckli M. “Mass spectrometry imaging for drug distribution studies.”, J Proteomics. 2012, 4999-5013, DOI: 10.1016/j.jprot.2012.07.028
19. <https://isc.gov.ua/index.php/ua/kompleksna-kontrolno-analitichna-laboratoriya>
20. Haiss W.; Thanh NT.; Aveyard J.; Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. Anal Chem. 2007, 1,79(11). doi: 10.1021/ac0702084. Epub 2007 Apr 26. PMID: 17458937.
21. Ramos A. P., “Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticles Characterization”, 2017, 99-110, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49778-7.00004-7>
22. <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>
23. Xia Y., Xiong Y., Lim B., Skrabalak S. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?. Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48: 60-103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

1. Ліннік О.О., Лагута І.В., Ставинська О.М., Кузема П.О., Фесенко Т.В., Іванісік А.І. Дослідження оптичних властивостей та розміру наночастинок золота, синтезованих за допомогою екстракту з вичавок льону. Х Всеукраїнська наукова конференція «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (15 квітня 2026 року). Наук. зб. Праць. Житомир, 2026, 100 – 101.
2. O.O. Linnik, I.V. Laguta, T.V. Fesenko, P.O. Kuzema, O.M. Stavinskaya, A.I. Ivanisik. Morphological and structural characteristics of gold nanoparticles synthesized by flax pomace extract. XXVI International Young Scientists Conference on Applied Physics, Kyiv, 2026, <https://icap.knu.ua/index.php/contents#mp>
3. O.O. Linnik, I.V. Laguta, T.V. Fesenko, P.O. Kuzema, O.M. Stavinskaya, A.I. Ivanisik. Analysis of glucose by green Au nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Ukrainian conference with
i
n
t
e
r
n
a
t
i
o
n
a
l