

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ РАЗМЕРА И КОНЦЕНТРАЦИИ ЛАЗЕРНО-АБЛИРОВАННЫХ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

© 2022 г. В.А. Скрибицкий*, **, Н.В. Позднякова*, **, А.А. Липенголец*, **, ***, А.А. Попов**, Г.В. Тихоновский**, Ю.А. Финогенова*, **, А.В. Смирнова*, **, ****, Е.Ю. Григорьева*, **

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24

**Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское шоссе, 31
ГНЦ РФ «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», 123098, Москва, ул. Живописная, 46

***Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы, 111123, Москва, шоссе Энтузиастов, 86

E-mail: skyseva@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.10.2021 г.

После доработки 07.10.2021 г.

Принята к публикации 18.11.2021 г.

Рассматривается возможность использования спектрофотометрического метода для оценки размера и концентрации золотых наночастиц, полученных методом лазерной абляции. Золотые наночастицы, синтезированные разными методами, имеют различные физико-химические свойства своей поверхности. Это может влиять на их оптические свойства в коллоидном растворе. В работе получены результаты, подтверждающие возможность использования спектрофотометрического метода для оценки размера и концентрации наночастиц, полученных методом лазерной абляции. Показано, что оценку концентрации наночастиц спектрофотометрическим методом оптимально проводить на длине волны 400 нм. Определение размера наночастиц по спектрам поглощения в ультрафиолетовой и видимой области возможно для частиц размером не менее 11 нм.

Ключевые слова: золотые наночастицы, радиосенсибилизаторы, спектрофотометрия, коллоидный раствор.

DOI: 10.31857/S0006302922010045

Наночастицы являются перспективной основой для создания препаратов-радиосенсибилизаторов в лучевой терапии, а также систем доставки лекарственных и рентгеноконтрастных средств [1–4]. Для использования наночастиц в качестве рентгеноконтрастных средств или радиосенсибилизаторов необходима концентрация элемента с атомным номером $Z > 52$ не менее 65 мг/мл [5–7]. Одним из наиболее перспективных и широко используемых металлов для синтеза наночастиц является золото.

Существуют два основных принципиально разных метода получения растворов коллоидного золота: химический метод Туркевича [8] и физический метод лазерной абляции [9]. При масштабировании производства золотых наночастиц до

промышленного уровня метод лазерной абляции экономически выгоднее [10]. Однако при получении наночастиц золота методом лазерной абляции максимальная концентрация золота в итоговом коллоидном растворе наночастиц лимитирована оптической проницаемостью самого раствора для аблирующего лазера и составляет порядка ~ 0.1 мг/мл.

При разработке, исследовании и производстве препаратов на основе наночастиц возникает необходимость проводить простую и быструю оценку концентрации и размера наночастиц. Для оценки концентрации и размера золотых наночастиц существует множество точных и чувствительных методов, таких как методы атомной эмиссионной спектроскопии и метод электронной микроскопии.

Сокращение: ППР — пик плазмонного резонанса.

Параметры установки с лазером при синтезе золотых наночастиц

Характеристика установки	Кратность единиц измерения
Частота следования лазерных импульсов	100 кГц
Энергия в импульсе	30 мкДж
Длина волны лазерного излучения	1030 нм
Длительность лазерных импульсов	250 фс
Тип фокусирующего объектива	F-theta
Фокусное расстояние объектива	100 мм
Скорость перемещения лазерного луча по поверхности мишени	4 м/с

Методы атомной эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой имеют пределы обнаружения вплоть до 0.1 мкг/мл и 0.05 нг/мл соответственно [11]. Для определения концентрации золота в коллоидном растворе наночастиц данными методами требуется пробоподготовка, которая заключается в полном растворении золотых наночастиц в растворе концентрированных азотной и соляной кислот, взятых в соотношении 1 : 3 по объему. Пробоподготовка образца для исследования может длиться от нескольких часов до суток, что не позволяет проводить быструю оценку концентрации раствора. Также данные методы требуют наличия дорогостоящего оборудования и расходных материалов для его эксплуатации.

Для определения размера золотых наночастиц электронная микроскопия является одним из наиболее точных методов. Данный метод часто используется в качестве метода сравнения [12–14]. Электронная микроскопия может обеспечить точность определения размера наночастиц до десятых долей нанометра. Однако данный метод требует высокой профессиональной квалификации персонала, трудоемкой обработки изображений и дорогостоящего оборудования.

Спектрофотометрический метод позволяет объединить в себе возможность оценки размера и концентрации наночастиц. При этом данный метод отличается простотой исполнения и скоростью анализа.

В основе определения концентрации раствора спектрофотометрическим методом лежит закон Бугера–Ламберта–Бера [15]:

$$A = \ln(I_0/I) = \varepsilon Cx,$$

где A — оптическая плотность, I_0 — интенсивность светового потока в отсутствии образца, I — интенсивность светового потока в присутствии образца, ε — коэффициент экстинкции, C — концентрация образца, x — толщина исследуемого образца.

Теория рассеяния и поглощения света Ми на сферических наночастицах связывает положение пика плазмонного резонанса в спектре поглощения с размером наночастицы [16]. Данная теория является основой для спектрофотометрического метода определения размера наночастиц. На основе данной теории в ряде работ определяли размер сферических золотых наночастиц, полученных методом Туркевича [17–19]. Однако наночастицы, полученные методом лазерной абляции, представляют собой смесь сфер и эллипсоидов, в связи с чем были предложены уточненные модели взаимодействия наночастиц со светом [20, 21]. Также при синтезе методом лазерной абляции в водном растворе на поверхности золотых наночастиц преобладает золото в химической форме $\text{Au}-\text{O}^-$ [22]. В то же время при синтезе методом Туркевича с цитратом на поверхности образуется $\text{Au}-\text{COO}^-$, а также присутствуют атомы Au^{3+} [23]. Таким образом, наночастицы золота, полученные методом лазерной абляции, могут иметь химические и оптические свойства, отличающиеся от наночастиц, полученных методом Туркевича.

Учитывая все выше изложенное, целью данной работы являлось исследование возможности применения спектрофотометрического метода для оценки размера и концентрации лазерно-аблированных золотых наночастиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Золотые наночастицы были синтезированы одностадийным методом фемтосекундной лазерной абляции в водном растворе 1 mM NaCl. При наработке наночастиц были использованы параметры лазера, указанные в таблице.

Массовую концентрацию полученного коллоидного раствора определяли гравиметрическим путем — взвешиванием абляционной мишени до и после процесса лазерной абляции с последующим делением полученной разницы масс на объемом используемой жидкости. Массовая концен-

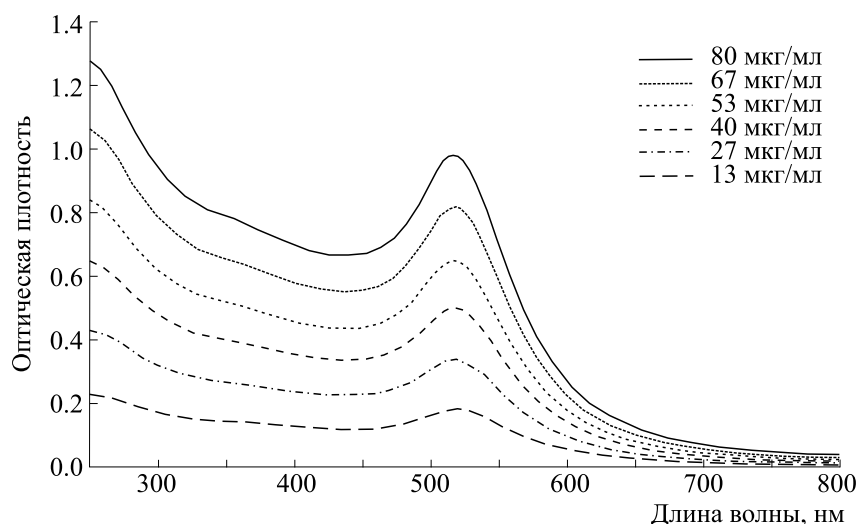


Рис. 1. Спектры поглощения лазерно-аблированных золотых наночастиц различной концентрации.

трация, определенная таким способом, составила 0.1 мг Au/кг.

Для оценки размера наночастиц в качестве метода сравнения использовали просвечивающий электронный микроскоп MAIA 3 (TESCAN, Чехия).

Для предотвращения агломерации в качестве стабилизатора при концентрировании наночастиц использовали бычий сывороточный альбумин. К раствору исходных нестабилизированных золотых наночастиц (0.1 мг Au/кг) при перемешивании при комнатной температуре добавляли стабилизирующий подготовленный раствор одновременно с раствором HEPES с pH 7.0. В результате был получен коллоидный раствор стабилизированных золотых наночастиц с концентрацией 0.08 мг Au/кг.

Для разделения исходного раствора по размерным фракциям использовали центрифугу 5427R (Eppendorf, Германия) с ротором FA-45-30-11. Центрифугирование исходного раствора золотых наночастиц проводили с центробежным ускорением 14000 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

Подготовку образца золотых наночастиц для спектрофотометрического анализа осуществляли следующим образом. Не менее 5 мкл анализируемого коллоидного раствора золотых наночастиц разбавляли дистиллированной водой. При этом кратность разведения подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность раствора составляла от 0.2 до 1.4. Далее образец помещали в кварцевую кювету и проводили регистрацию спектра поглощения в оптической и ультрафиолетовой областях (от 250 до 800 нм). Использовали спектрофо-

тометр Cary 50 (Varian, США). Измерения проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре 20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение концентрации коллоидного раствора золотых наночастиц. Был проведен спектральный анализ шести образцов с различными концентрациями золотых наночастиц одной размерной фракции. Растворы различной концентрации были получены путем разбавления исходного стабилизированного коллоидного раствора с концентрацией 0.08 мг Au/кг. На рис. 1 приведены спектры поглощения данных растворов.

Был построен график зависимости массовой концентрации золотых наночастиц в растворе от оптической плотности при длине волны 400 нм. Полученные результаты аппроксимированы линейной зависимостью, представленной для длины волны 400 нм уравнением $y = 117.8x - 1.6$ ($R > 0.99$). Градуировочная кривая представлена на рис. 2. Выбор длины волны был обусловлен влиянием стабилизирующего вещества на оптическую плотность коллоидного раствора золотых наночастиц. Для наночастиц, полученных методом Туркевича, зависимость оптической плотности при длине волны 400 нм от стабилизирующего вещества слабее, чем при больших длинах волн [17, 18]. Также данное утверждение было проверено для лазерно-аблированных золотых наночастиц. На рис. 3 представлены спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях коллоидных растворов лазерно-аблированных золотых наночастиц со стабилизирующим веществом и без такового. При добавлении стабилизирующего

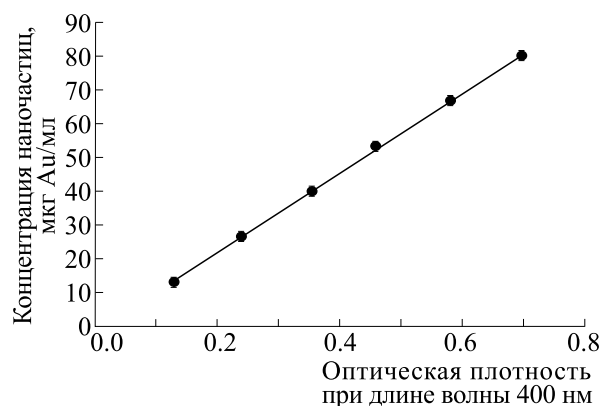


Рис. 2. График зависимости концентрации золотых наночастиц в растворе от оптической плотности. Уравнение прямой носит линейный характер: $y = 117.8x - 1.6$ ($R > 0.99$).

вещества (бычьего сывороточного альбумина), прозрачного в данной области спектра, заметно увеличение оптической плотности коллоидного раствора. Разница оптических плотностей при длине волны пика плазмонного резонанса (ППР) составляет 0.06, тогда как при длине волны 400 нм — 0.008. Таким образом, можно сделать вывод о меньшем воздействии стабилизирующего вещества на оптическую плотность коллоидного раствора при длине волны 400 нм.

Определение среднего размера золотых наночастиц в коллоидном растворе. Исходный коллоидный раствор золотых наночастиц был разделен на две размерные фракции путем центрифугирования. Исходная и полученные размерные фракции золотых наночастиц были проанализированы методами электронной микроскопии и оптической

спектрофотометрии. На рис. 4 представлено электронно-микроскопическое изображение исходного раствора золотых наночастиц.

В результате анализа изображений был определен средний диаметр золотых наночастиц для трех размерных фракций: исходная фракция — 11.3 ± 5.2 нм, первая размерная фракция — 8.9 ± 1.7 нм, вторая размерная фракция — 22.3 ± 6.8 нм.

Для определения размера золотых наночастиц с помощью оптических спектров поглощения были сопоставлены результаты, полученные методом электронной микроскопии, и отношения оптических плотностей при длине волны ППР и 400 нм ($A_{\text{ППР}}/A_{400 \text{ нм}}$). На рис. 5 представлена данная зависимость. В данном диапазоне зависи-

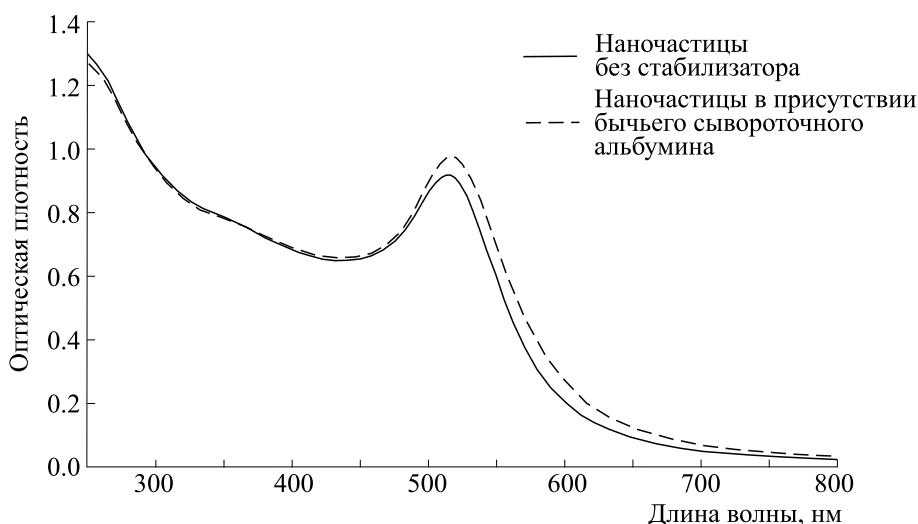


Рис. 3. Спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях коллоидного раствора лазерно-аблированных золотых наночастиц со стабилизирующим веществом и без него. Разница оптических плотностей при длине волны ППР составляет 0.06, а при длине волны 400 нм — 0.008.

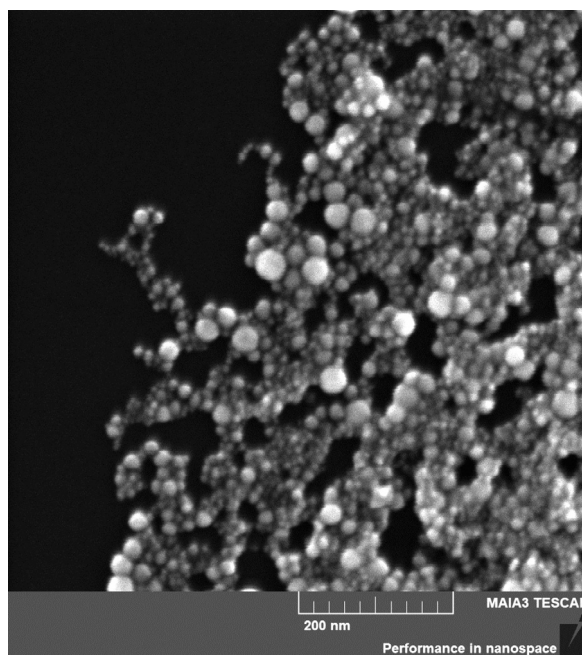


Рис. 4. Изображение лазерно-аблированных золотых наночастиц, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии.

мость можно аппроксимировать линейной функцией $y = 23.4x - 18.2$ ($R > 0.98$).

По спектрам поглощения был рассчитан средний диаметр золотых наночастиц в исследуемых образцах согласно работе [19], в которой применяется теория светорассеяния Ми на золотых наночастицах, полученных методом Туркевича. Результат сравнения расчетов по спектрам поглощения с электронной микроскопией исследуемых образцов представлен на рис. 6. Полученные результаты хорошо согласуются в пределах погрешности при размерах наночастиц больше 11 нм. При размерах золотых наночастиц меньше 11 нм наблюдается расхождение размеров, определенных разными методами. Такое же расхождение в области меньше 10 нм представлено для зо-

лотых наночастиц, полученных методом Туркевича в работе [19]. Таким образом, коллоидный раствор лазерно-аблированных наночастиц демонстрирует сходные оптические свойства с золотыми наночастицами, полученными методом Туркевича.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрация и размер золотых наночастиц являются одними из основных параметров коллоидного раствора. Спектрофотометрический метод позволяет проводить быструю оценку размера и концентрации лазерно-аблированных золотых наночастиц в коллоидном растворе. Независимо от метода получения наночастицы обла-

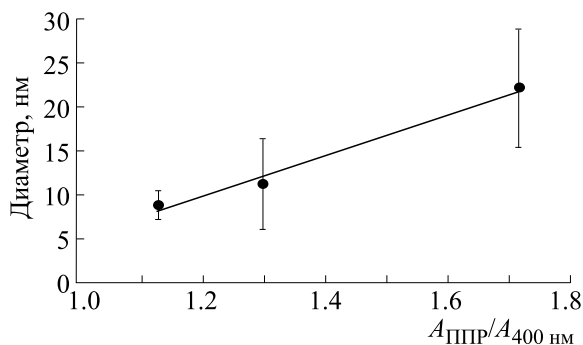


Рис. 5. Зависимость среднего диаметра золотых наночастиц от отношения оптических плотностей при длинах волн ППР и 400 нм.

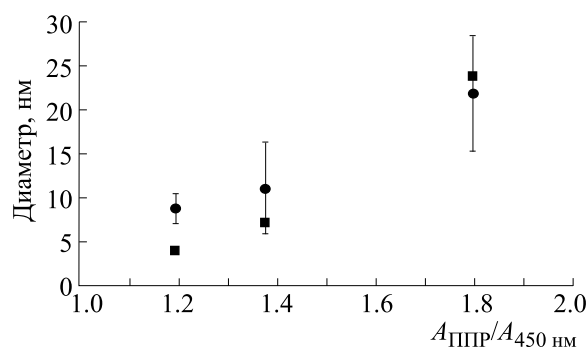


Рис. 6. Сравнение среднего размера золотых наночастиц: кружки — значения получены методом электронной микроскопии, квадраты — расчетные значения по спектрам поглощения коллоидных растворов.

дают схожими оптическими свойствами, что позволяет использовать ранее разработанные методы обработки экспериментальных данных на лазерно-аблированных золотых наночастицах.

Показано, что добавление бычьего сывороточного альбумина в качестве стабилизатора в коллоидный раствор лазерно-аблированных золотых наночастиц приводит к изменению его спектра поглощения в области пика плазмонного резонанса в сравнении с нестабилизированными наночастицами с той же концентрацией золота. В области 400 нм спектра поглощения наблюдается на порядок меньшее изменение оптической плотности при сравнении спектров стабилизированных и нестабилизированных наночастиц, в связи с этим данная длина волны является оптимальной для определения концентрации золота в коллоидном растворе наночастиц.

Проведено сравнение средних диаметров золотых наночастиц, определенных методом просвечивающей электронной микроскопии и методом расчета по спектрам поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях. Установлено различие диаметров в пределах погрешности в области менее 11 нм, что также отмечено в литературе для наночастиц, полученных методом Туркевича. При размере наночастиц более 11 нм наблюдается согласование результатов в пределах погрешности, что позволяет использовать расчетные методы по спектрам поглощения на лазерно-аблированных золотых наночастицах в данном интервале.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Haume, S. Rosa, S. Grellet, et al., *Cancer Nanotechnol.* **7** (1), 1 (2016).
2. D. M. Connor and A. M. Broome, *Adv. Cancer Res.* **139**, 163 (2018).
3. V. N. Kulakov, A. A. Lipengol'ts, and N. L. Shimanovskii, *Rus. J. Gen. Chem.* **83** (12), 2559 (2013).
4. Yu. V. Stukalov, E. Yu. Grigorieva, A. V. Smirnova, et al., *Bull. Rus. State Medical University* **6**, 113 (2018).
5. C. Schürmann, F. Gremse, H. Jo, et al., *PLoS One* **10** (6), e0130374 (2015).
6. Y. Wang, Z. Xiong, Y. He, et al., *Mater. Sci. Engineer. C* **83**, 9 (2018).
7. A. A. Lipengol'ts, A. A. Cherepanov, V. N. Kulakov, et al., *Pharmaceut. Chem. J.* **51** (9), 783 (2017).
8. J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, et al., *J. Phys. Chem. B* **110** (32), 15700 (2006).
9. A. A. Popov, G. Tselikov, A. Al-Kattan, et al., *Synthesis and Photonics of Nanoscale Materials XVI* 10907, 1090708 (2019).
10. S. Jendrzey, B. Gökce, M. Eppel, et al., *ChemPhys-Chem.* **18** (9), 1012 (2017).
11. В. Н. Музгин, Н. Н. Емельянова и А. А. Пупышев, *Аналитика и контроль*, № 3—4, 3 (1998).
12. J. Zhang, L. Mou, and X. Jiang, *Chem. Sci.* **11** (4), 923 (2020).
13. J. Kim, M. Yeom, T. Lee, et al., *J. Nanobiotechnol.* **18** (1), 1 (2020).
14. K. X. Lee, K. Shameli, Y. P. Yew, et al., *Int. J. Nanomed.* **15**, 275 (2020).
15. J. H. Lambert, *Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae* (sumptibus viduae E. Klett, typis CP Detleffsen, 1760).

16. G. Mie, *Annalen der Physic* **330** (3), 377 (1908).
17. T. Hendel, M. Wuihthschick, F. Kettemann, et al., *Anal. Chem.* **86** (22), 11115 (2014).
18. A. G. Shard, L. Wright, and C. Minelli, *Biointerphases* **13** (6), 061002 (2018).
19. W. Haiss, N.T. Thanh, J. Aveyard, et al., *Analytical chemistry* **79** (11), 4215 (2007).
20. M. Zimbone, L. Calcagno, G. Messina, et al., *Materials Lett.* **65** (19–20), 2906 (2011).
21. V. Amendola, M. Meneghetti, *J. Phys. Chem. C* **113** (11), 4277 (2009).
22. J. P. Sylvestre, S. Poulin, A.V. Kabashin, et al., *J. Phys. Chem. B* **108** (43), 16864 (2004).
23. R. La Spina, V. Spampinato, D. Gilliland, et al., *Bio-interphases* **12** (3), 031003 (2017).

A Spectrophotometric Method for Evaluation of Size and Concentration of Laser Ablated Gold Nanoparticles

V.A. Skribitsky*, **, N.V. Pozdniakova*, **, A.A. Lipengolts*, **, A.A. Popov, G.V. Tikhonowski**, Yu.A. Finogenova*, **, A.V. Smirnova*, **, ****, and E.Yu. Grigorieva*, ****

**N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoye Shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

***National Research Nuclear University "Moscow Engineering Physics Institute", Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia*

****A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia*

***** A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department, shosse Entuziastov 86, Moscow, 111123 Russia*

In this work, we consider if a spectrophotometry approach can be used for evaluation of size and concentration of gold nanoparticles produced by laser ablation. Gold nanoparticles synthesized by different methods have different physical and chemical properties of their surface. This can have an effect on their optical properties in colloidal water solution. The results obtained from experiments confirmed that a spectrophotometry approach can be useful for evaluation of size and concentration of gold nanoparticles prepared by laser ablation. It has been shown that 400 nm is an optimal wavelength to use for estimation of the concentration of nanoparticles by spectrophotometry. Determination of gold nanoparticles size from UV-Vis spectra is possible only for nanoparticles not less than 11 nm in diameter.

Keywords: gold nanoparticles, radiosensitizers, spectrophotometry, colloidal solution