

Санкт-Петербургский государственный университет

ГОРНЯЯ София Борисовна

Выпускная квалификационная работа

Поверхностные свойства растворов смеси наночастиц золота и биомакромолекул

Уровень образования: Бакалавриат

Направление *04.03.01 «Химия»*

Основная образовательная программа *СВ 5014 2017 «Химия»*

Профиль: физико-химический

Научный руководитель: кафедра
коллоидной химии, к.х.н, доцент,
Акентьев Александр Владимирович

Рецензент: кафедра химии
высокомолекулярных соединений,
д.х.н., доцент, Зорин Иван
Михайлович

Санкт-Петербург
2021

Оглавление

Список условных сокращений	4
Введение	5
1. Обзор литературы	7
1.1. Синтез наночастиц золота	7
1.1.1. Синтез в присутствии биомакромолекул	10
1.2. Белковая корона	11
1.2.1. Методы исследования комплексов наночастица/белок и получения информации о белковой короне на поверхности наночастиц	12
1.2.2. Конформационные переходы белков, связанных в корону	14
1.2.3. Влияние стабилизирующих агентов на толщину белковой короны	16
1.3. Поверхностные свойства растворов смеси наночастиц с белком	17
1.3.1. Поверхностные свойства модифицированных наночастиц	17
1.3.2. Поверхностные свойства растворов белков	19
1.3.3. Поверхностные свойства растворов комплексов наночастица/белок	23
2. Экспериментальные методы и методика измерения	27
2.1. Синтез наночастиц золота по методу Туркевича	27
2.2. Анализ синтезированных наночастиц золота	29
2.2.1. Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)	29
2.2.2. Метод атомно-силовой микроскопии	29
2.2.3. Метод динамического рассеяния света	30
2.3. Определение поверхностного натяжения методом пластинки Вильгельми	30
2.4. Определение динамической поверхностной упругости методом осциллирующего барьера	31
3. Результаты и обсуждение	34

3.1.	Синтез и анализ наночастиц золота	34
3.2.	Результаты измерения поверхностных свойств	35
	Выводы	44
4.	Благодарность	45
5.	Список литературы	46

Список условных сокращений

γ – поверхностное натяжение;

ε – модуль динамической поверхностной упругости;

F – сила, необходимая для удержания пластинки на поверхности жидкости в методе определения поверхностного натяжения с помощью пластинки Вильгельми

k – постоянная пластинки;

S – площадь поверхности в ванне Ленгмюра;

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

БК – белковая корона;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ДРС – динамическое рассеяние света;

ЗНЧ – наночастицы золота;

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования;

НЧ – наночастицы;

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

Введение

Наночастицы золота (ЗНЧ) и других металлов представляют большой интерес для исследователей в последние десятилетия. В частности, ЗНЧ имеют наибольшее распространение среди прочих металлических наночастиц (НЧ) из-за своих уникальных оптических и биологических свойств. На данный момент они хорошо изучены благодаря их характеристичному поверхностному плазмонному резонансу, который проявляется в середине видимой области спектра. Так, впервые в современной научной литературе ЗНЧ упоминаются в работе Фарадея около 160 лет назад, а их первый синтез разработан и описан Туркевичем в 1851 году.

Среди уникальных свойств ЗНЧ отмечают их каталитические и настраиваемые оптические свойства, способность к самосборке. Они хорошо поглощают и рассеивают свет, нетоксичны и химически более стабильны, чем прочие металлические наночастицы, что делает их перспективными материалами для создания целого ряда оптических и не только приборов: от средств медицинской диагностики до различных химических сенсоров, оптоволоконных устройств и компьютерных схем. Также одной из перспективных областей их применения служит создание полимерных нанокомпозитов, которые сохраняют свойства одной частицы при переходе к их множеству. Подобные материалы находят широкое применение в создании каталитических, оптических, абсорбирующих приборов, светофильтров.

Еще больший интерес представляют так называемые биосовместимые свойства ЗНЧ. Они обусловлены высокоразвитой поверхностью наночастиц, которая может служить удобной «посадочной площадкой» для различных полимеров, органических кислот, белков и других биомолекул. Слой адсорбированных на наночастице биомолекул называется биомолекулярной короной и представляет собой некоторое индивидуальное свойство данной частицы. В зависимости от материала, формы и размера НЧ может сорбировать сугубо специфичный, присущий ей одной набор соединений. Именно это обстоятельство выступает ключевым в области наномедицины: благодаря такой специфичности биомолекулярная корона может служить «паспортом» данной НЧ в биологической среде и обуславливать соответствующий биологический ответ. Крайне интересным представляется тот факт, что НЧ могут селективно адсорбировать некоторые биомолекулы, в частности и

некоторые «поврежденные» фибриллы. В настоящее время уже происходит разработка некоторых лекарственных препаратов, использующих данное свойство. Таким образом, свойства соединений ЗНЧ с макромолекулами открывают путь к новым многообещающим применениям в области наномедицины, позволяют ставить люминесцентные метки и производить новейшие химические сенсоры.

Более узким, но не менее важным термином в научной литературе считается «белковая корона» (БК), т.е. корона, целиком состоящая из адсорбированных белков. Такая система в некотором роде служит модельной, так как в процессе ее формирования не только меняются свойства самой НЧ, но и белковая молекула претерпевает некоторые изменения. Среди таких эффектов в литературе отмечается изменение конформации, появление структурных дефектов и частичная денатурация. Показано, что комплексы НЧ/белок обладают поверхностной активностью, поэтому исследование поверхностных свойств данных систем может указать на конформационные изменения белковых молекул при адсорбции и дать дополнительную информацию о взаимодействиях между наночастицей и ее короной.

Основной целью данной выпускной квалификационной работы служит изучение динамических поверхностных свойств растворов ЗНЧ в смеси с глобулярным белком бычьим сывороточным альбумином (БСА) с целью определения механизма формирования адсорбционных пленок в растворах ЗНЧ/БСА.

Среди задач данной работы необходимо выделить: 1) синтез и анализ ЗНЧ; 2) нахождение кинетических зависимостей поверхностных свойств БСА; 3) подбор оптимальных концентраций компонентов комплекса ЗНЧ/БСА, при которых наблюдалось бы наибольшее отклонение от свойств чистого БСА; 4) исследование адсорбции комплекса на поверхности раствора в условиях повышенной ионной силы.

1. Обзор литературы

1.1. Синтез наночастиц золота

В настоящее время ЗНЧ широко применяются в различных областях науки и промышленности, поэтому разрабатываются новые методы синтеза и усовершенствуются классические. Одним из таких классических методов синтеза считается цитратный метод Туркевича. Из-за простоты исполнения и ряда других положительных особенностей данный метод используется в исследовательских и прикладных лабораториях. В качестве исходного соединения золота в синтезе выступает хлорид золота (III) AuCl_3 или золотохлористоводородная кислота HAuCl_4 . В общем случае синтез протекает по реакции:



Главной положительной особенностью метода служит использование цитрат-анионов в качестве восстановителя и стабилизатора одновременно. Среди недостатков метода следует отметить: 1) ЗНЧ с требуемыми размерами получаются при строго определенных концентрациях исходных веществ и требуют точного контроля температуры, скорости перемешивания и других параметров; 2) при нестрогом соблюдении вышеуказанных условий синтеза продукты реакции обладают большой полидисперсностью (получаются НЧ с размерами от десятков до нескольких сотен нанометров).

Механизм данного метода синтеза ЗНЧ хорошо изучен [1–3]. В частности, в работе [2] представлена модель постадийного формирования частиц. Математически данная модель описана в статье [3], что позволяет предсказывать размеры получаемых частиц в зависимости от температуры проведения синтеза и концентрации восстановителя. Более подробно механизм синтеза методом Туркевича, условия проведения реакции, концентрации компонентов будут рассмотрены в экспериментальной части данной работы.

Рассмотрим далее методы синтеза коллоидных ЗНЧ с применением других восстановителей, стабилизаторов и условий синтеза. Подавляющее число методов, используемых на данный момент, включая методы стабилизации полимерами и синтез в неводных и биологических системах, рассмотрено в обзоре [4].

Своеобразной вариацией метода Туркевича служит ультразвуковой метод синтеза, который можно использовать даже при низких температурах. В работе [5] разработана подобная методика, и с ее помощью получены растворы ЗНЧ с диаметром 20 нм, отличающиеся высокой монодисперсностью. Суть метода состоит в обработке ультразвуком смеси растворов золотохлористоводородной кислоты и цитрата натрия. Размер ЗНЧ можно регулировать интенсивностью излучения, концентрацией цитрата и температурой. В разное время от начала синтеза были исследованы образцы растворов на предмет определения размеров формируемых частиц. Как оказалось, в данном варианте синтеза требуется большее, чем в классическом варианте, время формирования конечных частиц.

Существует также и альтернативный метод синтеза ЗНЧ, активно используемый учеными – метод Бруста-Шифрина [6], заключающийся в синтезе на границе несмешивающихся фаз. Идея синтеза заключается в получении НЧ из реагентов, пространственно разделенных в двух несмешивающихся фазах. Скорость взаимодействия иона золота и восстановителя лимитируется площадью поверхности раздела жидкостей и интенсивностью переноса реагента из водной в органическую среду, который осуществляется с помощью четвертичной алкиламмониевой соли. Стабилизация образующихся на границе фаз кластеров происходит в результате монослойного покрытия их поверхности алкантиолом, находящимся в неполярной среде. В работе [6] в качестве неполярной среды использован толуол, а межфазным переносчиком служил бромид тетра-*N*-метиламмония. Меняя концентрацию комплекса тетра-*N*-метиламмония, можно варьировать размеры НЧ от 5 до 14 нм. Кроме того, существует большое разнообразие модификаций данного метода с использованием других растворителей: *n*-гексана, циклогептана, этиленгликоля, тетрагидрофурана и других. Отмечается, что некоторые из этих растворителей сами могут выступать стабилизаторами, например этанол или ацетон [4]. Среди недостатков данного метода авторы отмечают: 1) прямая зависимость размера НЧ от концентрации бромида; 2) большое количество реагентов, загрязняющих поверхность НЧ.

Еще один необычный, но довольно часто используемый и современный метод синтеза ЗНЧ – синтез с помощью лазера [7]. Методика процесса скорее физическая, нежели химическая, и происходит лишь дробление металлического золота на

частицы, и для остановки процессов коагуляции необходимо присутствие какого-либо стабилизатора. В работе [7] рассмотрен синтез ЗНЧ, в котором в качестве стабилизатора выступает поверхностно-активное вещество – додецилсульфат натрия, который, оседая на поверхности НЧ, предотвращает их дальнейший рост и способствует устойчивости коллоидного раствора. Методика получения ЗНЧ посредством лазерной абляции состоит в следующем: тонкий диск из золота помещают на дно стеклянного сосуда, наполненного раствором стабилизатора, и подвергают облучению лазером частотой 10 Гц и плотностью лазерного импульса около 10^5 мДж/см². Без восстановителя концентрация ЗНЧ оказывается очень малой, что свидетельствует о большой степени коагуляции золота. Также было выяснено, что малые концентрации додецилсульфата натрия оказывают существенное влияние на кинетику процесса формирования частиц и их размеры, но для концентраций, близких к критической концентрации мицеллообразования (ККМ), такого эффекта не наблюдается. Исходя из данных статьи, данным методом можно получать коллоидные растворы ЗНЧ, обладающие малой полидисперсностью.

В рамках направления «зеленой» химии также исследуются новые способы получения ЗНЧ, которые используют продукты жизнедеятельности некоторых бактерий в качестве реагентов для синтеза. Так, в работе [8] указано, что бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* вырабатывают поверхностно-активные рамнолипиды и редуктазы, которые авторы успешно использовали для восстановления солей золота (III). Методика основана на выращивании клеточной культуры и последующем смешении отделенного клеточного осадка с золотохлористоводородной кислотой при температуре 37° С и перемешивании. В течение часа раствор приобрел рубиновый оттенок, что свидетельствует о восстановлении золота и образовании НЧ. Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) определили сферическую морфологию ЗНЧ и средний размер 50 нм. Кроме того, синтез проводили при варьировании рН раствора рамнолипида в диапазоне 2-10, причем стабильные в течение месяца дисперсии ЗНЧ удалось получить лишь при рН от 7 до 8. Авторы объяснили подобный эффект изменениями в строении поверхностно-активных веществ в кислой и щелочной средах, подтвердив вывод измерениями поверхностного натяжения растворов рамнолипида различной кислотности.

1.1.1. Синтез в присутствии биомакромолекул

В выпускной квалификационной работе я рассматриваю систему цитрат-стабилизированных ЗНЧ, на которые адсорбируются молекулы белка бычьего сывороточного альбумина. Но может ли сам БСА служить реагентом и инициатором для синтеза ЗНЧ? На этот вопрос утвердительно отвечает статья [9]. В ней предложен неожиданный метод синтеза: приготовить раствор золотохлористоводородной кислоты в концентрации 0.002 М в фосфатном буфере с рН 7, прибавить к нему белок в концентрации 2 мг/мл и оставить на длительное время при комнатной температуре в закрытой емкости. Авторы зафиксировали медленный переход окраски раствора от светло-желтого до красного в течение всего времени синтеза и предположили, что восстановление белком золота (III) происходило за счет специфических аминокислотных остатков 35 треонина и 32 серина, содержащих гидроксильные группы. Далее, при помощи различных методов анализа авторы дали характеристику полученным частицам и проследили конформационные изменения белка. Так, с помощью УФ-спектроскопии зафиксировали характерную для ЗНЧ полосу поверхностного плазмонного резонанса, которая увеличивала свою интенсивность со временем. Обнаруженная несимметричность пика указывала на неоднородность частиц по размеру. Методы ПЭМ и динамического рассеяния света (ДРС) подтвердили, что в растворе присутствует большое количество ЗНЧ разной морфологии (треугольные, гексагональные, кубические, ромбоэдрические и проч.) размером от 10 до 50 нм. Данные опыты проводили на протяжении всего времени синтеза, поэтому удалось зафиксировать медленный рост частиц. Исходя из предположения о ключевой роли белка в восстановлении золота и стабилизации ЗНЧ, авторы исследовали конформационные изменения БСА методами рамановской спектроскопии и кругового дихроизма. Рамановская спектроскопия позволяет делать выводы о разрывах дисульфидных мостиков, которые соединяют между собой α -спирали в белке. После сравнения рамановских спектров белка в начале и конце синтеза авторы зафиксировали изменение конформации дисульфидных мостиков и указали на их близкое расположение к поверхности ЗНЧ. Метод кругового дихроизма зафиксировал уменьшение доли α -спиралей вдвое за время синтеза. Наибольшее падение интенсивности кругового дихроизма появилось, когда цвет раствора

сменился на рубиново-красный. Т.е. за этот период остановился рост частиц и сформировалась так называемая белковая корона.

1.2. Белковая корона

Все поверхности, попадающие в биологические среды или растворы белковых молекул, незамедлительно покрываются слоем адсорбированных биомолекул: белков, пептидов, энзимов, аминокислот. Если в качестве поверхности адсорбции выступают НЧ, то из вышеперечисленных биомолекул формируется так называемая «корона», причем характеристики образующихся комплексов зависят не только от свойств адсорбированных компонент, но и от размера, формы, характеристик поверхности, заряда, химической природы, стабилизирующих агентов самой частицы. Впервые термин «корона» для описания взаимодействия белков с НЧ был введен в 2007 году Доусоном [10], а с 2012 года это понятие обобщили до «биомолекулярной короны» [11]. Такая корона НЧ представляет собой уникальную характеристику, единственную для данного вида частиц и раствора биомолекул, своеобразный отпечаток пальцев в биологической среде, по которому НЧ может быть идентифицирована клеткой.

Образование БК в физиологической среде представляет собой динамический процесс, так как некоторые белки избирательно адсорбируются на частицы с определенными характеристиками. Таким образом, фиксируемая на НЧ корона – это не твердое нерастворимое образование, а динамичная структура, причем каждый из адсорбированных белков имеет индивидуальный набор констант равновесия и времен нахождения на поверхности. Белки и биомолекулы, имеющие большее сродство к данной НЧ, формируют практически неизменную твердую корону, а остальные – мягкую корону, в которой устанавливается равновесие адсорбции/десорбции. В настоящее время не существует исчерпывающего определения твердых и мягких БК. Обычно под твердой короной понимают биомолекулы, оставшиеся на поверхности НЧ после длительного промывания раствора приготовленных НЧ буферным раствором. Согласно [11], равновесие в твердой БК, белки которой связаны с НЧ наиболее сильными взаимодействиями, может достигаться от нескольких секунд до получаса, в то время как мягкая БК формируется значительно дольше, в течение нескольких часов.

1.2.1. Методы исследования комплексов наночастица/белок и получения информации о белковой короне на поверхности наночастиц

В настоящее время бурно развивается исследование БК, поэтому многие методы микроскопии и спектроскопии используются для их изучения. Методикам определения размеров, формы и других характеристик комплексов НЧ/белок посвящена обзорная статья [12]. Авторы собрали основные методы исследования в таблицу, представленную ниже (табл.1).

Методы визуализации НЧ с их коронами представлены тремя видами микроскопии: атомно-силовая, просвечивающая электронная и сканирующая электронная. С помощью данных методов можно получать изображения НЧ и достоверно определять размеры, но невозможно определить твердую и мягкую БК, равно как и изменения структуры и свойств самих адсорбированных белков.

Кроме проблемы определения размеров комплексов НЧ/белок, существуют затруднения с получением информации о составе БК и адсорбированных биомолекулах. В настоящее время используют разные методы, но наиболее информативными оказываются электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и масс-спектрометрия [12]. Количество и соотношение адсорбированных белков можно выяснить с помощью кварцевых микровесов и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой [12]. Зафиксировать процесс связывания белка с НЧ позволяют методы калориметрического титрования и поверхностного плазмонного резонанса [9]. Наиболее интересным представляется вопрос об изменении конформации белка на поверхности НЧ, поэтому для этого вопроса применяют большое количество спектrophотометрических методов, таких как круговой дихроизм, ИК-Фурье спектроскопия, УФ-спектроскопия и флуоресцентные методы, Рамановская спектроскопия и, в некоторых случаях, методы ЯМР на ядрах C^{13} и F^{19} [12].

	Transmission Electron Microscopy (TEM)	Visualization of protein adsorption onto NP surfaces	Negative staining of protein is needed
	Scanning Electron Microscopy (SEM)	Minimal preparation, can acquire detailed 3D images	Difficulties in detection of proteins on the NP surface, staining with heavy metals is required
Identification	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	Separation of proteins by molecular weight, quantification of proteins in the different weight range	Protein determination possible after isolation of NP-protein coronas from the biological fluid
	Mass Spectrometry (MS)	Determination of protein corona content, gel and nongel based methods	Separation of protein by trypsin digesting, complicated to analyze
Quantification	Quartz Crystal Microbalance (QCM)	Highly sensitive to total mass change	Impossible to distinguish the mass changes of specific molecules
	Inductive coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)	Quantification of the amount of metal (NPs) and serum (proteins and NPs)	Can quantify only inorganic NPs and calculate NP/protein ratio only under known conditions
Kinetic	Isothermal Titration Calorimetry (ITC)	Detection of proteins' binding affinities	Limitations on sample concentration (NP aggregation)
	Surface Plasmon Resonance (SPR)	Detection of NP and protein binding	Comparably higher cost
Conformation	Circular Dichroism (CD)	Real time secondary structure determination in the presence of unbound proteins	Impossible to provide information about structural changes of individual amino acid residues
	Fourier Transform Infrared (FTIR)	Highly sensitive, possible to measure in liquid and solid states	For measurements in the solid state, an isolation step is required
	Raman Spectroscopy (RS)	Comparably simple, possible to detect aromatic chains, peptides and sulfur bonds from protein	Only metal NPs, Detection of Raman active molecules
	Surface-enhanced Raman Scattering (SERS)	Analysis of secondary structure changes due to protein adsorption on NPs	Low sensitivity, impossible to detect carbon based NPs
	Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	Dynamic interaction details of the structural changes of proteins and the chemical nature of molecules	Difficult to analyze NP-protein complexes
<i>In situ</i>	Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)	Real time detection of kinetic and thermodynamic changes	Detection of fluorescent molecules
	¹⁹ F NMR	Higher abundance compared to ¹³ C and less signal overlap compared to ¹ H	Complicated matrix of analyst

Таблица 1. Методы исследования белковых корон на НЧ согласно статье [12].

1.2.2. Конформационные переходы белков, связанных в корону

Конформация глобулы белка строго контролируется взаимодополняемыми формами гидрофобных остатков, которые способствуют более плотной упаковке. В то же время, белковые структуры нельзя считать очень стабильными, так как при плотной упаковке они теряют выигрыш в энтропии и появляется дополнительное электростатическое отталкивание между одноименно заряженными участками белковой цепи. Таким образом, взаимодействие белка с некоторой поверхностью легко может привести к изменению начальной конформации и, как следствие, к потере биологических функций белка. В работе [11] указано, что изменение конформации биомолекулы на плоской поверхности отлично от такового на искривленной, в частности сильно искривленной поверхности НЧ.

Кроме кривизны поверхности, конформационные переходы белковых молекул могут быть инициированы и различными стабилизирующими агентами на поверхности частиц. Подобные изменения можно зафиксировать с помощью спектров флуоресценции аминокислот тирозина и триптофана, находящихся в белке. Авторы [13] сравнивали спектры флуоресценции раствора БСА со спектрами смеси ЗНЧ/БСА. Интенсивность пика одного из аминокислотных остатков белка в короне увеличивается и наблюдается батохромный сдвиг, в то же время уменьшается интенсивность пика другого остатка, но уже без сдвига, что говорит о внутримолекулярном переносе энергии. Этот перенос может быть продиктован конформационным переходом белка в процессе адсорбции на НЧ.

Другим информативным способом изучения изменений в конформации белка служит ИК-Фурье спектроскопия. Этим методом в работе [13] изучили взаимодействие БСА с ЗНЧ, стабилизированными цитрат-ионами, цистеином, полиэтиленгликолем (2к и 5к) и бромидом цетилтриметиламмония. С помощью ИК-Фурье спектров БСА в присутствии НЧ различной стабилизации и в их отсутствие зафиксировали конформационные переходы при адсорбции на поверхность НЧ. В присутствии бромида цетилтриметиламмония удалось отметить модификацию третичной структуры белка, в то время как практически никаких изменений не наблюдалось для ИК-спектров с полиэтиленгликолями, что говорит о практически неизменной конформации БСА в данных системах.

ЗНЧ с такими же лигандами исследовали в присутствии БСА с помощью спектроскопии кругового дихроизма [13]. Этот метод представляется наиболее подходящим для задачи определения конформационных переходов в белках, так как позволяет узнать процентное содержание α -спиралей в белке и по его изменению судить об изменении конформации в присутствии НЧ. Таким образом было выяснено, что для растворов, содержащих НЧ с полиэтиленгликолем, не меняется процент спиралей, из чего был сделан вывод, что практически незаряженные поверхности НЧ не вызывают конформационных перестроек. Этот вывод подтверждается сильным изменением конформации в присутствии положительно заряженной поверхности НЧ с катионами цетилтриметиламмония. Соответственно, заряд поверхности НЧ также выступает существенным фактором, влияющим на конформационные переходы белков в БК.

Работа [14] посвящена термодинамическим параметрам комплекса ЗНЧ/БСА и влиянию различных параметров, таких как рН раствора, температура, начальная концентрация БСА, время контакта на адсорбцию белка на поверхность ЗНЧ. УФ-спектроскопией получены адсорбционные спектры наночастиц золота и их комплексов. Симметричный спектр частиц без добавок белка в цитратном буфере при длине волны 516 нм указывает на то, что частицы имеют сферическую форму. Авторы на основании спектра ЗНЧ с белком делают вывод, что при концентрации 100 мг/л молекулы белка сорбируются на поверхности частицы, образуя монослой и стабилизируя ее. Они выделили данную концентрацию как «критическую концентрацию стабилизации», ниже которой может произойти агрегация. Были также получены спектры флуоресценции, которые указали на изменения во вторичной структуре белка при его адсорбции на ЗНЧ. Из сравнения флуоресцентных спектров БСА в отсутствие частиц и комплекса белка с ЗНЧ авторы заключили, что в присутствии частиц молекула белка становится более гибкой. Из изображений ПЭМ был рассчитан средний размер комплексов 15 ± 10 нм. Из данных флуоресцентной спектроскопии рассчитана константа связывания, величина которой равнялась $2.2 \cdot 10^{11}$ л/М. Авторы [14] объясняют данное значение изменением конформации белка при адсорбции. Далее была исследована адсорбция БСА на поверхности ЗНЧ при разных значениях рН, температуры и концентрации белка. Для этого готовились растворы заданных значений концентрации, рН и температуры, помещались во

встряиватель и через определенные промежутки времени исследовались с помощью УФ-спектрофотометра для определения количества белка, адсорбированного на поверхности частиц. Для всех концентраций, рН и температур кинетические кривые выходили на постоянные значения за 40 минут. Авторы отмечают уменьшение процента адсорбции при повышении температуры и объясняют такой ход кривых тем, что увеличение температуры приводит к потере подвижности белковой молекулы и увеличению вязкости раствора.

Кроме того, авторы [14] представили свои результаты с точки зрения моделей адсорбции Ленгмюра и Фрейндлиха для различных значений температуры и рН растворов. Рассчитанные значения коэффициентов по данным моделям предсказали положительную адсорбцию белковых молекул на ЗНЧ во всех исследованных растворах. Наиболее предпочтительные условия для адсорбции белка на ЗНЧ отвечают меньшей температуре и большим значениям рН растворов. Кроме того, были рассчитаны термодинамические параметры адсорбции БСА на ЗНЧ и показано, что адсорбция белка – спонтанный и экзотермический процесс.

1.2.3. Влияние стабилизирующих агентов на толщину белковой короны

Различные лиганды, предотвращающие коагуляцию НЧ, могут оказывать заметное воздействие на толщину белковой короны и, в некоторых случаях, препятствовать адсорбции белка. Подобные заключения были сделаны по результатам ДРС в растворе стабилизированных ЗНЧ в присутствии белка и без него [13]. Так, при добавлении к модифицированным бромидом цетитриметиламония ЗНЧ молекул БСА, формируется наиболее широкий многослойный адсорбционный слой, который приводит к агрегации НЧ при повышенной концентрации белка. Однако, если частица стабилизирована незаряженными длинными полимерными цепочками, как в случае полиэтиленгликолей, то адсорбция белка и выстраивание БК оказываются затрудненными, а толщина короны составляет 3 нм, хотя диаметр молекулы БСА колеблется от 6 до 7 нм. В этом случае белок покрывает не всю поверхность ЗНЧ. Для цитрат-стабилизированных и цистеин-стабилизированных ЗНЧ толщина короны составила 10-13 нм, что говорит об образовании двойного слоя молекул белка на поверхности частицы. Из всех исследованных в данной работе систем наибольшая толщина короны была обнаружена для ЗНЧ, стабилизированных

цистеином, так как их поверхность содержит группы разного заряда, что обуславливает дополнительные электростатические взаимодействия с БСА и способствует образованию широкой короны.

1.3. Поверхностные свойства растворов смеси наночастиц с белком

Молекулы белков в общем случае обладают поверхностной активностью и образуют адсорбционные слои на поверхностях раздела фаз. Соответственно, морфология поверхностного слоя растворов белковых молекул может быть зафиксирована экспериментально с помощью различных методов. Как было отмечено ранее, при вхождении белка в БК, меняется его конформация, происходит частичное разрушение глобулярной структуры, модифицированная НЧ приобретает поверхностную активность и может адсорбироваться на границе раздела фаз. Подобные изменения безусловно сказываются на формировании поверхностного слоя и потому могут быть изучены различными методами: межфазная тензиометрия, поверхностная реология, различные оптические методы изучения поверхности. Прежде чем обсудить адсорбцию комплексов НЧ/белок, необходимо рассмотреть поверхностные свойства модифицированных НЧ, самих белков и методологию изучения поверхностей раздела фаз.

1.3.1. Поверхностные свойства модифицированных наночастиц

Так как сами по себе твердые ЗНЧ не адсорбируются на поверхности раздела фаз из раствора, то их поверхностная активность определяется стабилизирующими агентами. Поэтому, если с поверхностью НЧ связаны ПАВ, то поверхностное натяжение раствора таких комплексов будет ниже, чем для исходного раствора НЧ.

В настоящее время известно большое количество материалов и соединений, способных образовывать твердые НЧ, и в последнее десятилетие появилась методика по созданию различных гибридных НЧ. Появились так называемые частицы Януса – анизотропные сферические коллоидные частицы, имеющие разные свойства поверхности на каждой из полусфер. В литературе отмечается, что такие НЧ более эффективно снижают поверхностное натяжение при адсорбции на границе раздела фаз, нежели обычные стабилизированные НЧ. В работе [15] исследовано поверхностное натяжение на границе вода/воздух в присутствии частиц Януса из кремнезема, одна их полусфер которых была модифицирована НЧ меньшего размера.

Синтез такого рода агрегатов сложен в исполнении, но идея достаточно проста: монослой НЧ кремнезема был частично зафиксирован в полидиметилсилоксане и на оставшуюся открытую часть частиц через силоксановую группу привили молекулы (3-аминопропил)-триэтоксисилана. Затем поместили все еще зафиксированные частицы оксида кремния в коллоидную суспензию ЗНЧ, приготовленных по методу Туркевича, и освободили модифицированные НЧ от полидиметилсилоксана с помощью нагревания. Кроме того, измерения проводились для НЧ кремнезема с полностью модифицированной поверхностью и для частиц с привитыми молекулами, но без частичек золота. Измерения поверхностного натяжения проведены методом висящей капли: сначала создается водная висящая капля, затем частицы осаждаются на границе раздела воздух/вода из суспензии. Начальные колебания измеренных значений поверхностного натяжения являлись результатом этапа адсорбции и фиксировали процесс с момента добавления частиц до точки, в которой колебания затухают. Для НЧ Януса размером 1000 нм, модифицированных золотыми частицами, наблюдалось понижение поверхностного натяжения до 57 мН/м, в то время как для всех остальных перечисленных видов НЧ равновесное значение поверхностного натяжения составило около 70 мН/м. Для системы с частицами Януса размером 300 нм, было обнаружено необычно низкое поверхностное натяжение – 49 мН/м, что сравнимо с некоторыми ПАВ. Авторы [15] утверждают, что амфифильность НЧ Януса не является доминирующим фактором, определяющим их поведение в поверхностном слое. Результирующая геометрия «шапки» НЧ аналогична присутствию частиц, захваченных в тонкой жидкой пленке вблизи твердой границы. Близкое расположение ЗНЧ к ядру частицы кремнезема приводит к появлению сил погружения в «шапке» Януса. Эти капиллярные силы, действующие между частицами, захваченными на границе раздела, можно отнести к силам флотации и погружения. Таким образом, каждая НЧ Януса испытывает дополнительные силы погружения в своей «шапке», и как только ЗНЧ пробивают границу раздела воздух/вода, вокруг них формируются мениски, которые стабилизируют тонкую жидкую пленку в крышке Януса. Авторы [15] делают вывод о том, что именно такие необычные взаимодействия между частицами золота в «шапке» и ядром служат причиной сильного понижения поверхностного натяжения в системе с монослоем из частиц Януса на границе раздела фаз.

1.3.2. Поверхностные свойства растворов белков

В большинстве случаев, белки за счет своего строения и наличия в своем составе групп разного заряда и разной степени гидрофобности способны адсорбироваться на поверхности жидкости с образованием устойчивых пленок различного строения в зависимости от свойств белка и внешних условий. В настоящее время исследования поверхностных свойств растворов различных белков достаточно востребованы из-за их биологической активности и указанной выше способности формировать устойчивые поверхностные пленки на поверхности жидкости. Кроме того, добавление белков может служить надежным методом стабилизации дисперсных систем, например пен и эмульсий. Известно множество методов изучения белков в растворах, но не все дают исчерпывающую информацию о вышеупомянутых адсорбционных пленках глобулярных и неглобулярных белков. Чаще всего они исследуются посредством измерения межфазного натяжения, с использованием радиоактивных меток, эллипсометрией, отражением нейтронных и рентгеновских лучей, измерением ИК-отражения и спектроскопией кругового дихроизма [16,17]. Однако зачастую даже использование комбинации из нескольких вышеперечисленных методов не способно предоставить достоверные результаты о конформации белковых молекул в поверхностном слое и степени их развертывания из-за экспериментальных трудностей.

Наиболее информативными в случае рассмотрения адсорбционных пленок на поверхности растворов биомакромолекул представляются методы дилатационной поверхностной реологии. В работе [16] с помощью данных методов рассмотрены конформационные переходы в растворах неглобулярных и глобулярных белковых молекул и описан возможный процесс формирования монослоя в растворах белков.

Глобулярные и неглобулярные белки имеют разные механизмы адсорбции [16], поэтому предложить единую модель формирования адсорбционного слоя в растворах белковых соединений не удастся. Согласно ранним представлениям, некоторые глобулярные белки в поверхностном слое разворачиваются, и гидрофобные группы выходят из глубины глобулы на поверхность, а гидрофильные стремятся внутрь жидкой фазы [17]. При этом отмечается схожее поведение белков в поверхностном слое с амфифильными длинноцепочечными полимерами, состоящими из блоков разной гидрофобности. Данное предположение представляется в значительной

степени грубым, но объясняет схожесть кинетических зависимостей динамической поверхностной упругости для данных двух объектов. Кроме того, и без современных методов анализа поверхностных пленок можно найти другое подтверждение факту разворачивания глобулярной структуры при адсорбции: толщина образующегося слоя меньше среднего диаметра глобулы, хотя впоследствии для некоторых белков показали, что толщина слоя примерно совпадает с размером вытянутой глобулы. Эти и другие новые факты привели к новой гипотезе о частичном разворачивании третичной структуры белка в поверхностном слое. С появлением новых методов исследования, таких как ИК-Фурье спектроскопия отражения-поглощения, стало очевидно, что не все белки разворачиваются при адсорбции, но сохраняют исходную четвертичную структуру.

Растворы неглобулярного белка казеина обладают высокой поверхностной активностью. На кинетической зависимости динамической поверхностной упругости разные авторы указывают на 1 или 2 максимума [16,18,19]. Первый максимум (около 6 мН/м) отвечает формированию петель и хвостов в поверхностном слое, а второй максимум пока не удаётся приписать определенному явлению. Одно из возможных и наиболее правдоподобных объяснений состоит в рассмотрении постадийной адсорбции групп разной гидрофобности. В частности, молекула белка β -казеина неоднородна и состоит из гидрофобного хвоста и гидрофильной сильно заряженной части N-конца, которые, по-видимому, адсорбируются в поверхностном слое ступенчато.

Динамическая поверхностная упругость растворов глобулярных белков монотонно возрастает с течением времени и приходит к некоторому постоянному значению. Такие зависимости характерны для пленок некоторых твердых НЧ, поэтому предполагается, что данные белки на поверхности почти не теряют третичной структуры. Равновесные значения могут меняться даже для растворов одного белка при изменении водородного показателя раствора: глобулы меняют форму, заряд и размер из-за изменения связей между доменами белка. В частности, для БСА известны пять конформеров, три из которых имеют схожие с нейтральным раствором кинетические кривые поверхностной упругости, а остальные два появляются в сильнокислой и сильнощелочной средах и демонстрируют более медленное достижение равновесия до значений примерно вдвое ниже. Известно, что

добавление неограниченных солей увеличивает ионную силу раствора и, как следствие, сильно ускоряет адсорбцию полиэлектролитов за счет экранирования электростатического отталкивания между адсорбирующимися молекулами и поверхностью жидкости. Таким образом, на поверхностные свойства раствора глобулярного белка в значительной степени влияет изменение ионной силы раствора.

Действие денатурирующих агентов может сильно менять динамические поверхностные свойства адсорбционных слоев глобулярных белков на поверхности раздела фаз. Показано, что малые добавки сильных денатурирующих агентов действуют в большей степени как неорганические электролиты, но при увеличении концентрации денатуранта наблюдается ожидаемое различие свойств: увеличивается скорость адсорбции белка и устанавливаются более высокие поверхностные давления, по сравнению с добавкой индифферентного электролита. Далее, при превышении некоторого критического значения концентрации денатуранта свойства поверхности резко меняются и возникает локальный максимум на кинетической зависимости динамической поверхностной упругости. Это говорит о смене механизма адсорбции белка и его более плотной упаковке в поверхностном слое. Этот факт указывает на сходство раствора денатурированного белка с растворами неглобулярных белков. Третичная структура белка разрушена, и цепочки приобрели большую подвижность, что позволило белку образовать дальнюю область поверхностного слоя с петлями и хвостами, погруженными в объемную фазу. Что характерно, дальнейшее увеличение концентрации денатурирующего агента не вызывает сильных изменений в кинетике адсорбции, а значит третичная структура белка при критическом значении концентрации разрушается полностью. На зависимости поверхностной упругости от поверхностного давления появляется всего один максимум, отвечающий формированию хвостов и петель в объемной фазе.

В качестве денатурирующих агентов могут служить также разнообразные поверхностно-активные вещества, что подтверждается различными исследованиями комплексов ПАВ-белок [20]. При этом необходимо отметить, что интерпретация графиков динамической поверхностной упругости для этих систем более сложна, так как нужно учитывать адсорбцию мономеров ПАВ, их комплексов с белком и вытеснение с поверхности белка под действием ПАВ. Итак, добавление катионного ПАВ к растворам глобулярных белков делает кинетические зависимости

динамической поверхностной упругости немонотонными, что соответствует начальной стадии адсорбции и разворачиванию глобул. Добавление избыточного количества ПАВ, превышающего ККМ, приводит к новой монотонной зависимости и вытеснению белковых цепочек с поверхности раствора. В то же время, анионный ПАВ, например додецилсульфат натрия, оказывает влияние на поверхностные свойства растворов белка β -лактоглобулина только при значительных концентрациях, что говорит о специфическом взаимодействии глобул данного белка с анионным ПАВ. В данном случае происходит стабилизация глобул белка за счет проникновения поверхностно-активных анионов в полости, рядом с которыми локализован положительный заряд. Кинетические зависимости растворов комплексов глобулярных белков с додецилсульфатом натрия монотонны во всем диапазоне концентраций ПАВ вплоть до ККМ, что говорит о сохранении глобулярной структуры. Кроме того, в данной работе предложена математическая модель кинетики адсорбции глобулярных белков на поверхности раздела фаз, основанная на уравнении Смолуховского.

Поверхностным свойствам водных растворов глобулярного белка БСА посвящена работа [21]. Методами дилатационной поверхностной реологии изучено поведение БСА в поверхностном слое при различных значениях рН и его денатурация посредством гидрохлорида гуанидина. Поверхностное натяжение измеряли методом пластинки Вильгельми. Были исследованы пять растворов БСА, соответствующих пяти известным конформерам данного белка, существующих при различных уровнях рН. Высокая динамическая поверхностная упругость исследуемых растворов БСА (70-80 мН/м) объясняется формированием в поверхностном слое жесткой структуры и сетки из сильно взаимодействующих жестких глобулярных молекул. Далее, при добавлении денатурирующего агента появляются локальные максимумы на кинетических зависимостях поверхностной упругости, что, как говорилось ранее в работе [16], свидетельствует о смене механизма адсорбции. При этом определено, что денатурация белка в поверхностном слое достигается при меньшей концентрации кислоты, чем требуется для этого процесса в объеме раствора. Изменение ионной силы растворов сильно сказывается на форме кинетических зависимостей динамической поверхностной упругости для различных конформеров, что свидетельствует о разворачивании белка на поверхности, которое происходит в разы

быстрее, чем адсорбция белковых глобул на поверхность. Крайне информативными оказываются также и полученные зависимости поверхностного давления от времени, которые указывают, что по достижении значения поверхностного давления 12 мН/м молекулы образуют петли и хвосты. Таким образом, авторами статьи показана связь между поверхностными реологическими свойствами растворов БСА и структурой, и формой нахождения белковых молекул в поверхностном слое, от адсорбции жестких глобулярных структур до их развертывания, заполнения площади поверхности и образования петель и хвостов.

1.3.3. Поверхностные свойства растворов комплексов наночастица/белок

Согласно литературным данным, НЧ и белковые глобулы имеют сопоставимые размеры, и известны системы, в которых молекула белка оказывается больше НЧ и формируются так называемые белок-инкапсулированные нанокластеры. Такие нанокластеры обычно состоят из малого числа атомов металла и проявляют специфические оптические свойства, что облегчает их детектирование. Адсорбции на границе раздела флюидных фаз нанокластеров золота и белка БСА посвящена работа [22]. Процесс синтеза белок-инкапсулированных нанокластеров, содержащих счетное количество атомов золота, гораздо сложнее классического метода Туркевича. В ходе синтеза несколько раз происходит значительное изменение рН раствора, а это неминуемо меняет конформацию белка, о чем говорилось ранее. Поэтому в работе [22] с помощью спектроскопии кругового дихроизма определили, что присутствие нанокластера золота уменьшает спиральность молекулы белка почти вдвое и увеличивает содержание случайных петель и антипараллельных β -листов. Измерения гидродинамического диаметра, увеличившегося по сравнению с чистым глобулярным белком, позволили авторам предположить, что белок в растворе с нанокластерами склонен к олигомеризации. рН раствора в процессе синтеза сначала равен 3, и БСА находился в форме Е-конформера. Затем происходит восстановление золотохлористоводородной кислоты, что сопровождается установлением нейтрального рН, при котором глобулы должны принять «сердцевидную» форму. Однако, нанокластеры внутри белковой молекулы не дают ей до конца восстановить эту конформацию, что делает белок склонным к олигомеризации. В растворах с

повышенной концентрацией нанокластеров между глобулами формируются дисульфидные мостики. Поверхностные свойства таких систем изучались с помощью метода колебательной спектроскопии суммарной частоты [19]. Полученные спектры указывают, что в поверхностном слое глобулы, инкапсулированные ЗНЧ приобретают другую ориентацию, не характерную для монослоя нативного белка. Авторы повели подобные опыты на границе раздела фаз, когда в поверхностном слое уже присутствует монослой липидов. Показано, что глобулы как чистого белка, так и инкапсулированного нанокластерами, встраиваются в липидный монослой за счет гидрофобных взаимодействий между углеводородным хвостом и незаряженным доменом белка, повышая поверхностное давление.

Поверхностная активность комплексов НЧ с белком может служить удобным инструментом для стабилизации неустойчивых коллоидных систем, таких как пены и эмульсии. В работе [23] проведено исследование по контролю поверхностного натяжения на границе раздела двух жидких фаз в присутствии агрегатов ЗНЧ с модельным белком – ферментом кислой фосфотазой. ЗНЧ были стабилизированы положительно-заряженными лигандами четвертичными аминами разной гидрофобности, и выбор белка объясняется противоположным зарядом. Межфазное натяжение измеряли методом висящей капли. Для стабилизированных частиц без БК были получены кинетические зависимости межфазного натяжения на границе раздела фаз толуол/вода, которые показали, что с уменьшением гидрофобности лиганда (длины его углеводородной цепочки) уменьшается и эффективность стабилизации межфазной границы. Далее, вне зависимости от лиганда, для всех исследованных систем с ЗНЧ в комплексе с белком равновесное значение межфазного натяжения устанавливалось быстрее. Для выяснения кинетического поведения поверхностного натяжения эмульсий типа «вода в масле», стабилизированных ЗНЧ и их комплексами, использовалось эмпирическое уравнение Хуа-Роузен. Оказалось, этому уравнению не подчиняются системы, стабилизированные комплексами НЧ-белок. Соотношение равновесных поверхностных натяжений в системах ЗНЧ и ЗНЧ-белок остается примерно постоянным для всех исследованных стабилизаторов НЧ. Таким образом, ЗНЧ с гидрофобными лигандами и их комплексы с белком существенно меняют межфазное натяжение и позволяют контролировать стабильность эмульсий с помощью быстрой адсорбции агрегатов на границу раздела фаз.

В настоящее время активно изучаются БК не только на металлических наночастицах. В работе [24] белок БСА смешивают с НЧ из оксида кремния с размером около 20 нм. При нейтральном рН белок и НЧ отрицательно заряжены, но взаимодействие происходит за счет положительно заряженных участков на поверхности глобулы. В работе рассмотрены концентрации белка в диапазоне от $5 \cdot 10^{-8}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ М, где растворы смеси НЧ и кремнезема обладают агрегативной устойчивостью. Образование комплексов НЧ-белок оказывает влияние на свойства поверхности раствора, поэтому в данном исследовании провели измерения динамической поверхностной упругости двумя методами: осциллирующей капли и осциллирующего кольца. Оба метода основаны на фиксировании изменения поверхностного натяжения при возмущениях площади поверхности. В первом случае эти возмущения создавались с помощью периодического изменения объема капли на конце тонкого капилляра. Во втором случае использовалась установка с кольцом, частично погруженным в водную фазу и осциллирующим относительно своей оси, нормальной к поверхности жидкости. Перемещение кольца вдоль этой оси в рамках данного метода создает периодические изменения в поверхностном слое как результат изменения кривизны мениска. Сопутствующие колебания поверхностного натяжения фиксировались с помощью пластинки Вильгельми. Измерения этими двумя методами дали разные результаты, но сходились в общих закономерностях расположения кривых разных концентраций. При достаточно высокой концентрации белка ($5 \cdot 10^{-6}$ М) в смеси с НЧ кремнезема динамическая поверхностная упругость достигла значений, характерных для раствора чистого белка. Эллипсометрические данные и данные атомно-силовой микроскопии показали, что в поверхностном слое присутствует лишь небольшое число разрозненных НЧ кремнезема, без агрегатов НЧ-белок. Возможно, такие агрегаты имеют слишком большой отрицательный заряд и не могут преодолеть электростатический барьер адсорбции. При увеличении ионной силы раствора равновесие в поверхностном слое достигалось быстрее. Для растворов НЧ с малой концентрацией белка и повышенной ионной силой равновесное значение динамической поверхностной упругости не достигает значений для чистого раствора белка в той же концентрации, но при увеличении содержания белка превышает его. Присутствие электролита понижает электростатический барьер, и динамическая поверхностная упругость растет из-за адсорбции комплексов НЧ/белок. Кроме того,

кинетические зависимости поверхностной упругости приобретают другую форму: появляется еще одна точка перегиба на уровне, характерном для чистого белка. Это говорит об изменившемся механизме формирования адсорбционного слоя. Сначала адсорбируется несвязанный белок, так как он имеет больший коэффициент диффузии, чем тяжелый комплекс с НЧ кремнезема. Темп изменения динамической поверхностной упругости замедляется, с течением времени свободный белок вытесняется с поверхности комплексами НЧ/БСА, что инициирует еще больший рост поверхностной упругости.

2. Экспериментальные методы и методика измерения

2.1. Синтез наночастиц золота по методу Туркевича

В моей работе был проведен синтез наночастиц золота по методу Туркевича – как упоминалось ранее, самому распространенному и наиболее простому в исполнении и результативному методу. На данный момент механизм синтеза достаточно хорошо изучен. Согласно работе [2], на первой стадии происходит восстановление реагента, содержащего золото, и формирование небольших кластеров из мономеров золота. На второй стадии эти кластеры растут до размера около 3 нм, в то время как оставшиеся ионы притягиваются и присоединяются к двойному электрическому слою крупных частиц в качестве противоионов. Сами частицы формируются на третьей и четвертой стадии, когда происходит восстановление ионов золота из двойного электрического слоя и дальнейший рост формируемых частиц, происходящий исключительно на их поверхности. Данный механизм проиллюстрирован на рис.1. Таким образом, частицы прекращают рост, когда все золото из ионной формы перешло в форму коллоидных наночастиц. Стабилизирует свежеприготовленные наночастицы сам реагент, цитрат натрия, как показано на рис.2 [25]. Несмотря на это, некоторые авторы утверждают, что лигандом выступает и продукт окисления цитрата натрия – ацетондикарбоновая кислота.

Материалы: кристаллогидрат цитрата натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5.5\text{H}_2\text{O}$, золотохлористоводородная кислота HAuCl_4 , тридистиллированная вода.

Приготовили 100 мл раствора золотохлористоводородной кислоты с концентрацией 0.001 М, растворив кристаллы в кипящей воде. К полученному кипящему раствору при постоянном перемешивании прилили 10 мл раствора цитрата натрия с концентрацией 0.0039 М. Таким образом, в конце эксперимента на 1 моль

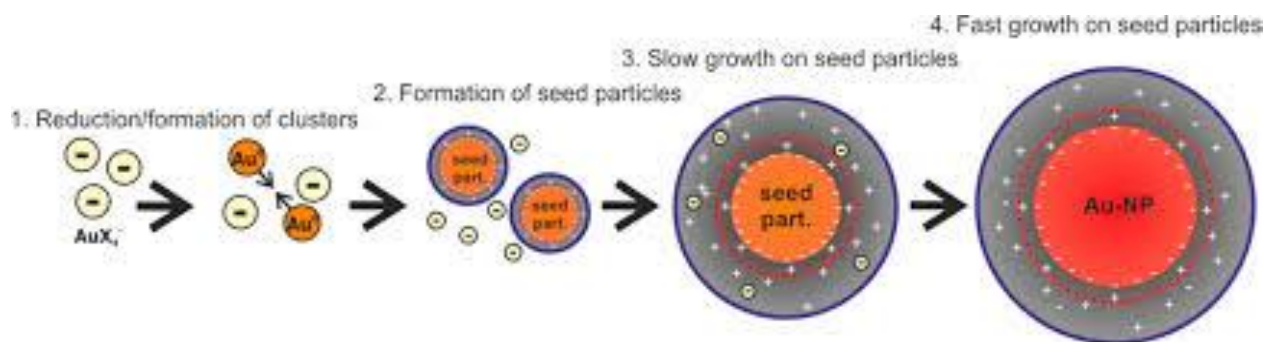


Рис. 1. Механизм формирования ЗНЧ согласно работе [2].

ионов золота приходилось 4 моль цитрат ионов, часть из которых шла на восстановление золота, а часть на стабилизацию образующихся частиц. Сразу после добавления раствора восстановителя бледно-желтый раствор золотохлористоводородной кислоты обесцветился, а через минуту начал темнеть. По прошествии 5 минут синтеза раствор приобрел темно-зеленую окраску, затем начал медленно переходить к темно-синему цвету. Далее, раствор приобрел фиолетовый оттенок, а после того, как он окрасился в темно-красный, его сняли с плиты, охладили при комнатной температуре и поместили в колбу со шлифом. pH полученного раствора составлял 5.7 единиц. Дзета-потенциал составлял порядка -38 мВ, что указывало на присутствие отрицательно заряженных частиц в растворе.

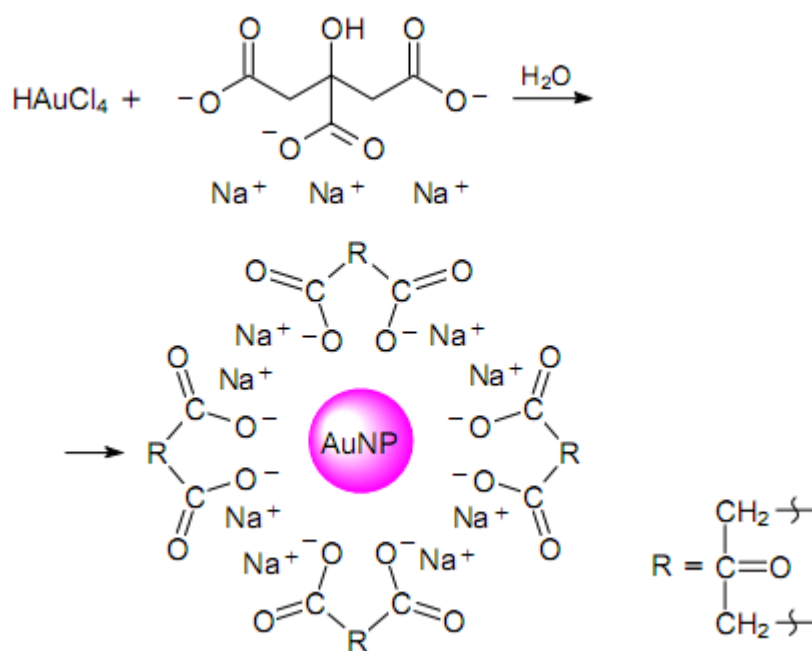


Рис. 2. Схема стабилизации ЗНЧ молекулами цитрата натрия согласно статье [25].

Приготовление растворов наночастиц золота, окруженных БК, проводилось аналогично методике из работы [24]: при постоянном перемешивании к раствору ЗНЧ прибавляли по каплям равный объем раствора белка в фосфатном буфере в нужной концентрации. Необходимо отметить, что добавление белка уменьшило дзета-потенциал ЗНЧ до -20 мВ. Для серии образцов в условиях повышенной ионной силы 0.5 г прокаленного хлорида натрия растворяли в растворе белка, затем прикапывали смесь к раствору ЗНЧ.

Концентрация наночастиц во всех исследованных растворах была постоянной и готовилась разбавлением исходного раствора ЗНЧ в 60 раз фосфатным буфером. При

таком методе разбавления количество наночастиц в литре раствора составляло $3 \cdot 10^{13}$. Данная концентрация была выбрана в качестве основной, так как при меньшем разбавлении при смешении с растворами белка БСА наблюдалось выпадение осадка. Содержание ЗНЧ в растворе БСА в меньшей концентрации не оказывало достаточного влияния на поверхностные свойства растворов белка.

Необходимо отметить, что характерная красная окраска растворов наночастиц золота не изменилась, но растворы с БСА приобрели менее интенсивную окраску, что представляет собой следствие разбавления раствора.

2.2. Анализ синтезированных наночастиц золота

2.2.1. Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Данный метод основан на сканировании образца в вакуумной камере электронами. Микроскоп состоит из источника электронов (металл, с поверхности которого происходит эмиссия электронов), оптической системы фокусировки электронов, камеры с образцом, детектора и системы вакуумирования. Пучок электронов проходит через электронную колонну, фокусирующую луч и отклоняющую систему, позволяющую выбрать произвольное направление сканирования. Детектируются после сканирования вторичные электроны, отраженное излучение и рентгеновское излучение. От детектора поступает информация о координатах луча электронов на образце и величине сигнала. Каждой точке образца приписывается яркость, пропорциональная величине сигнала в момент, когда пучок находился в этой точке. Так строится изображение по методу СЭМ.

2.2.2. Метод атомно-силовой микроскопии

Работа атомно-силового (зондового) микроскопа основана на взаимодействии острия иглы с поверхностью образца. Сила этого взаимодействия вызывает отклонения предварительно откалиброванного кантилевера от горизонтального положения, что фиксируется системой обратной связи. Далее, зонд в каждой сканируемой точке образца перемещается по нормали к поверхности так, чтобы вернуть значение параметра взаимодействия к заранее установленной величине. Отклонения кантилевера регистрируются системой детектирования, которая построена таким образом, что излучение полупроводникового лазера фокусируется на

зондовом датчике, и отраженный пучок лучей попадает в центр чувствительной области фотоприемника.

Данный метод использовался как для анализа размера и формы синтезированных частиц, так и для определения морфологии и состава поверхностного слоя исследуемых растворов с НЧ. В первом случае капля раствора помещалась на свежесколотую поверхность слюды, избыток раствора аккуратно удалялся фильтровальной бумагой, пластинка помещалась в эксикатор для сушки. При изучении морфологии и состава поверхностного слоя пленку с водной поверхности на поверхность слюды перемещали с помощью метода Ленгмюра-Шеффера. Предварительно очищенную слюдяную пластинку опускали сверху вниз на поверхность раствора параллельно, затем после касания жидкости, аккуратно поднимали, переворачивали образец и снимали излишек водного раствора с помощью фильтровальной бумаги.

2.2.3. Метод динамического рассеяния света

Данный метод позволяет определить размер коллоидных дисперсных частиц в жидкости путем анализа времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Из-за Броуновского движения частиц в жидкости интенсивность света, регистрируемого после прохождения через раствор, осциллирует относительно своего среднего значения. Фотоэлектронный умножитель, исходя из данных о частотах осцилляций, позволяет получить функцию автокорреляции в зависимости от времени. Изменение функции, следующее из скорости движения частицы, определено количественно как коэффициент диффузии, а диаметр частиц рассчитывается с помощью уравнения Эйнштейна-Стокса. Необходимо отметить, что применять теорию динамического светорассеяния следует при малых концентрациях частиц, когда можно пренебречь вторичным рассеянием света.

2.3. Определение поверхностного натяжения методом пластинки Вильгельми

Поверхностное натяжение в данном методе определяют при измерении силы, необходимой для удержания тонкой прямоугольной пластинки на поверхности жидкости, если при контакте пластинки с жидкостью образуются устойчивые на протяжении всего опыта мениски. Пластинка, толщина которой мала по сравнению с периметром ее горизонтального сечения, устанавливается таким образом, чтобы

положение ее нижней грани совпадало с уровнем жидкости в кювете, при этом у нижних граней опущенной пластинки образуются мениски. Пластика подвешивалась на одно из коромысел электрических микровесов, уравнивалась противовесом и приводилась в контакт с поверхностью жидкости. Эффективная сила поверхностного натяжения стремится втянуть пластинку в жидкость целиком, поэтому сила, необходимая для удержания пластинки на поверхности жидкости будет отличаться от веса пластинки в воздухе. Эта разность (ΔF) и используется для расчета поверхностного натяжения по формуле:

$$\gamma = \Delta F \cdot k, \quad (1)$$

где γ – поверхностное натяжение (мН/м), k – постоянная пластинки, зависящая от индивидуальных свойств пластинки, определяемая из результатов дополнительного измерения для жидкости с известным поверхностным натяжением, в данном случае использовалась вода. Пластику Вильгельми подвесили на коромысло микровесов и поместили ее нижнюю грань в тридистиллированную воду с предварительно очищенной поверхностью. Определили разность веса пластинки в воздухе и с учетом мениска. Данное значение разделили на известное поверхностное натяжение воды – 72.8 мН/м (25° С).

2.4. Определение динамической поверхностной упругости методом осциллирующего барьера

Измерение дилатационной динамической поверхностной упругости проводились в ванне Ленгмюра (фторопластовая кювета). Для устранения примесей малорастворимых поверхностно-активных веществ и частиц пыли перед каждым измерением поверхность жидкости тщательно очищалась пипеткой, соединенной с водоструйным насосом.

С помощью фторопластового барьера, расположенного на поверхности жидкости, можно создать колебания площади поверхности внутри кюветы с определенной амплитудой и частотой (в данной работе амплитуда составляла 7% от площади поверхности измерительной кюветы, частота – 0.1 Гц). Частота колебаний механического барьера вдоль поверхности не должна превышать 0.2 Гц, тогда длина возникающей при деформации поверхности в кювете продольной поверхностной волны, будет иметь значение много больше рабочей длины кюветы. Так как в данном

случае это условие соблюдается, то колебания поверхностного натяжения можно считать однородными. Данные условия делают возможным определение поверхностной упругости методом осциллирующего барьера. Одновременное получение данных о фазе изменения поверхностного натяжения, площади поверхности и амплитуде делает возможным расчет комплексной динамической поверхностной упругости ε по уравнению:

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d \ln S}; \quad (2)$$

где S – площадь поверхности в ванне Ленгмюра. Соответствующая экспериментальная установка представлена на рис. 4.

Фторопластовый барьер 1 шириной 2 см в данной установке соединен с механическим генератором низкочастотных колебаний 2 с помощью стального

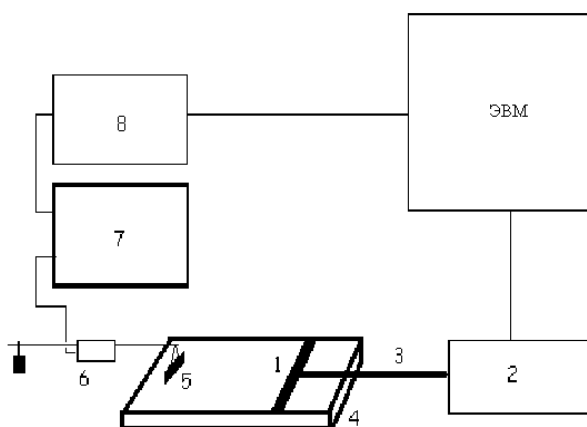


Рис. 3. Схема установки для измерений по методу осциллирующего барьера.

полого стержня 3. Барьер перемещается параллельно поверхности исследуемого раствора, таким образом создавая однородные деформации поверхности жидкости в ванне Ленгмюра 4. Возникающие в результате этого колебания поверхностного натяжения фиксировались с помощью пластинки Вильгельми 5. До использования пластинку очистили хромовой смесью, поместили на коромысло электрических микровесов 6 и опустили так, чтобы вокруг нижней грани возникли устойчивые мениски. Через усилители 7 и 8 сигнал отправлялся на компьютер, туда же подавался и сигнал с генератора механических колебаний 2. Из отношения амплитуд колебаний площади поверхности жидкости и поверхностного натяжения по представленному выше соотношению (2) определялся модуль динамической поверхностной упругости.

Фазовый угол находили из фазового сдвига между колебаниями поверхностного натяжения и площади поверхности жидкости.

Все опыты проводились при температуре 20 ± 1 °С. Для проведения синтеза и приготовления буферного раствора была использована тридистиллированная вода. Растворы белка (БСА) хранились при пониженной температуре (+4 °С). Во избежание денатурации БСА срок хранения растворов составлял не более трех дней. Все использовавшиеся в работе реагенты являлись химически чистыми.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Синтез и анализ наночастиц золота

В работе были синтезированы наночастицы золота по методу Туркевича, представленному в предыдущем разделе. Условия проведения эксперимента были выбраны таким образом, чтобы конечный продукт содержал ЗНЧ с размерами несколько десятков нанометров [26]. На рис. 4 представлены СЭМ изображения ЗНЧ, перенесенных на твердую подложку. На рис. 4а можно видеть отдельные сферические частицы с примерно одинаковым диаметром порядка 20 ± 5 нм, а также скопления данных частиц, которые на изображении в более крупном масштабе (рис. 4б) выглядят как частицы с большим диаметром.

Изображения с диаметром частиц несколько десятков нанометров были получены также с помощью атомно-силовой микроскопии (рис. 5). Как и в случае исследования посредством СЭМ, на рисунке можно увидеть НЧ с размерами в плоскости рисунка порядка 20 ± 5 нм, а также скопления частиц, которые могли образоваться в результате высыхания образца. Небольшие значения высоты ЗНЧ по нормали к поверхности могут быть следствием того, что частицы на слюде могут быть «утоплены» в «подушке» из продуктов реакции и избытка цитрат ионов. Для характеристики полученной дисперсии НЧ необходимо также исследовать распределение агрегатов по размеру. Для этого был использован метод ДРС, который указывает на наличие в полученном растворе ЗНЧ более 60% частиц с размерами от приблизительно 15 до 28 нм (рис. 6).

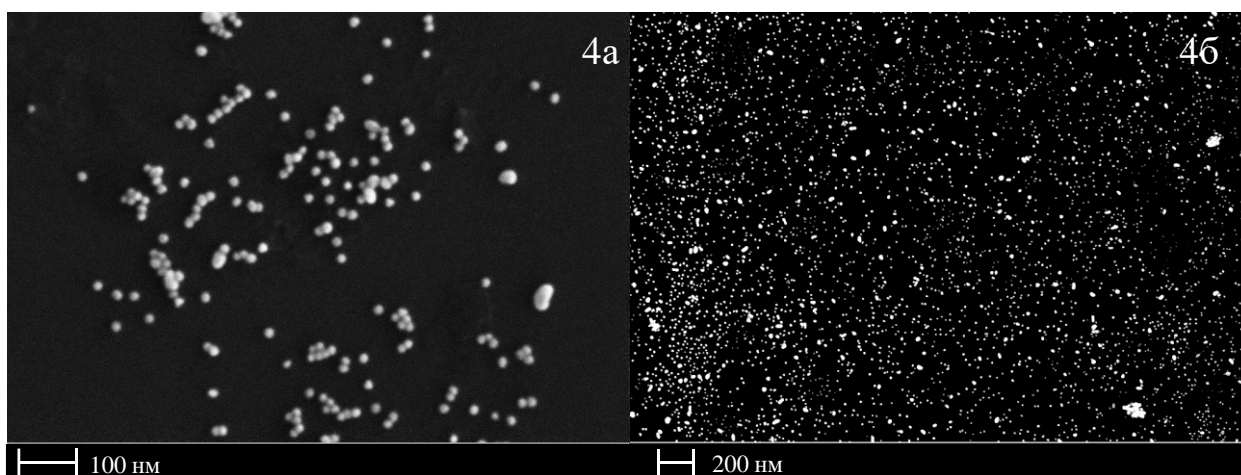


Рис. 4. СЭМ изображения ЗНЧ.

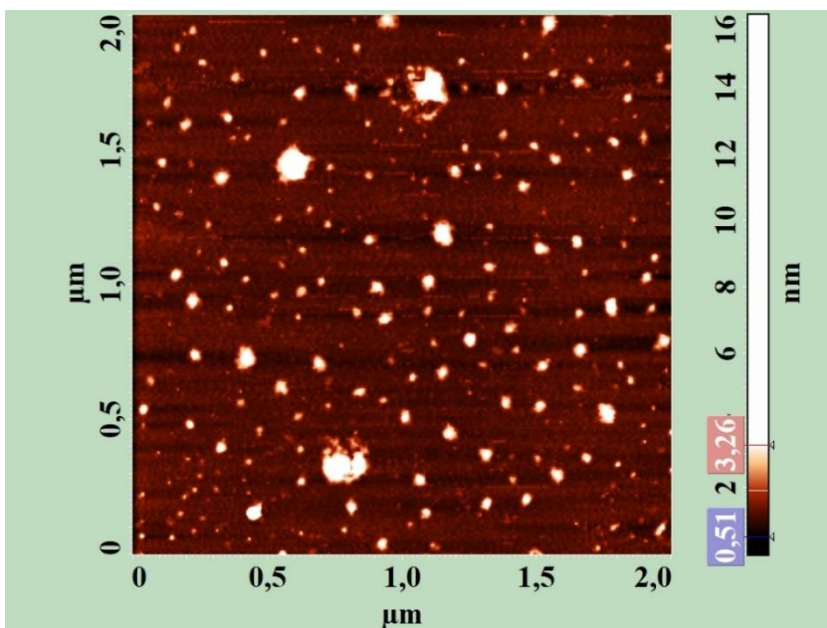


Рис. 5. АСМ-изображение наночастиц золота.

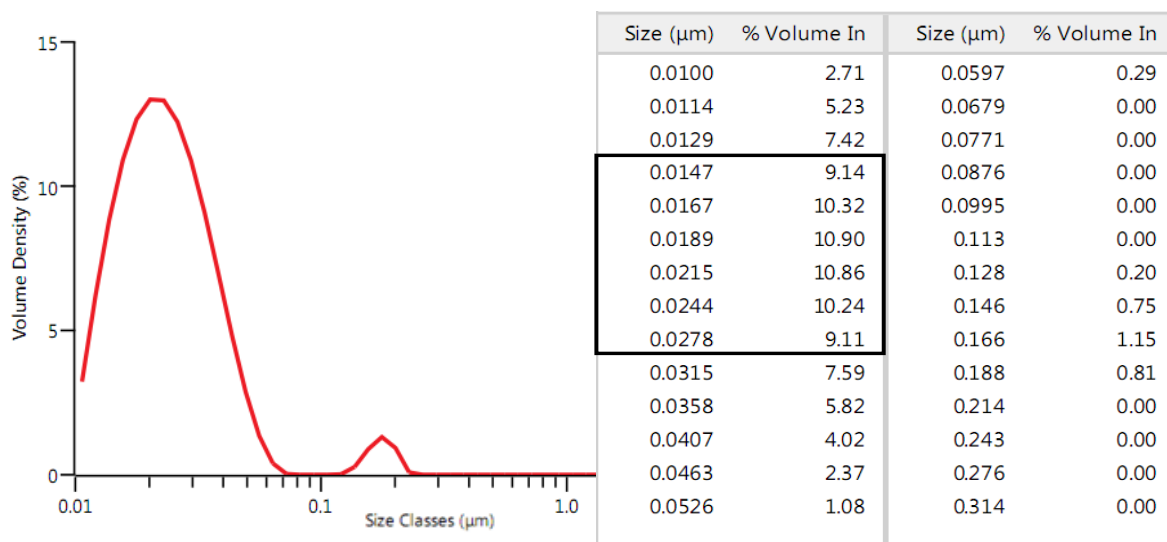


Рис. 6. Распределение ЗНЧ по размерам, полученное методом ДРС.

3.2. Результаты измерения поверхностных свойств

В данной выпускной квалификационной работе были приготовлены растворы смеси ЗНЧ и глобулярного белка бычьего сывороточного альбумина с постоянной концентрацией частиц $5 \cdot 10^{-11}$ моль/л ($3 \cdot 10^{13}$ НЧ в литре) и в диапазоне концентраций белка от $2.5 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ М. При концентрациях белка ниже $1 \cdot 10^{-8}$ М не наблюдалось изменения поверхностных свойств исследованных растворов. При большем его содержании (выше $2.5 \cdot 10^{-7}$ М) присутствие ЗНЧ не оказывало влияния на изменение поверхностных свойств растворов ЗНЧ/БСА. Увеличение концентрации ЗНЧ

приводило к появлению в растворе крупных агрегатов, которые выпадали в виде осадка.

На рисунке 7 представлены кинетические зависимости поверхностного натяжения (рис. 7а) и модуля динамической поверхностной упругости (рис. 7б) растворов БСА в указанном диапазоне концентраций без добавления ЗНЧ. Подобные кинетические зависимости поверхностных свойств были получены для бычьего сывороточного альбумина ранее [21]. Поверхностное натяжение (рис. 7а) монотонно убывает со временем и не достигает равновесных значений даже через пять часов после образования поверхности. Динамическая поверхностная упругость при этом монотонно растет и для концентраций белка выше $2.5 \cdot 10^{-8}$ М достигает практически постоянных значений порядка 70-75 мН/м менее чем за пять часов. Следует отметить, что для всех исследованных в данной работе систем мнимая часть динамической поверхностной упругости не превышала 5 мН/м, то есть адсорбционные пленки можно считать чисто упругими. По этой причине в дальнейшем приведены данные для модуля динамической поверхностной упругости.

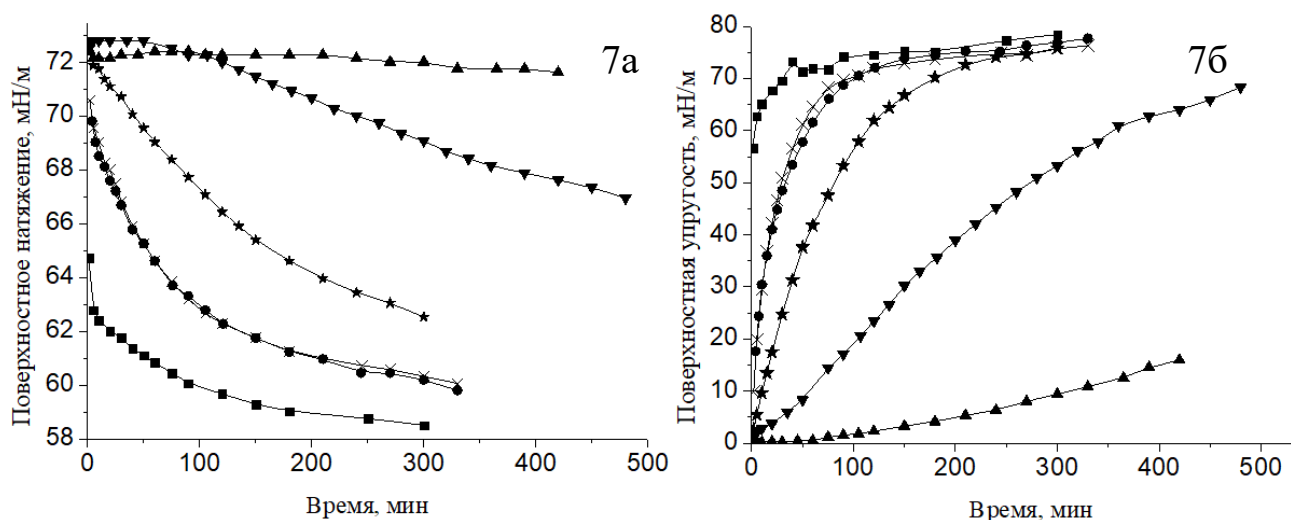


Рис. 7. Зависимость поверхностного натяжения (7а) и динамической поверхностной упругости (7б) от времени для различных концентраций БСА в фосфатном буфере: $1 \cdot 10^{-8}$ М – треугольники; $2.5 \cdot 10^{-8}$ М – перевернутые треугольники; $5 \cdot 10^{-8}$ М – звездочки; $7.6 \cdot 10^{-8}$ М – крестики; $1 \cdot 10^{-7}$ М – круги; $2.5 \cdot 10^{-7}$ М – квадраты.

В целом, данный ход кинетических зависимостей поверхностных свойств характерен для плотной пленки, которая состоит из белковых молекул, сохранивших глобулярную структуру при адсорбции на поверхность раствора.

Добавление к раствору БСА наночастиц золота приводит к появлению в растворе агрегатов из ЗНЧ и белковых молекул. Методом ДРС было установлено, что размер данных агрегатов составляет порядка 30-80 нм (рис. 8).

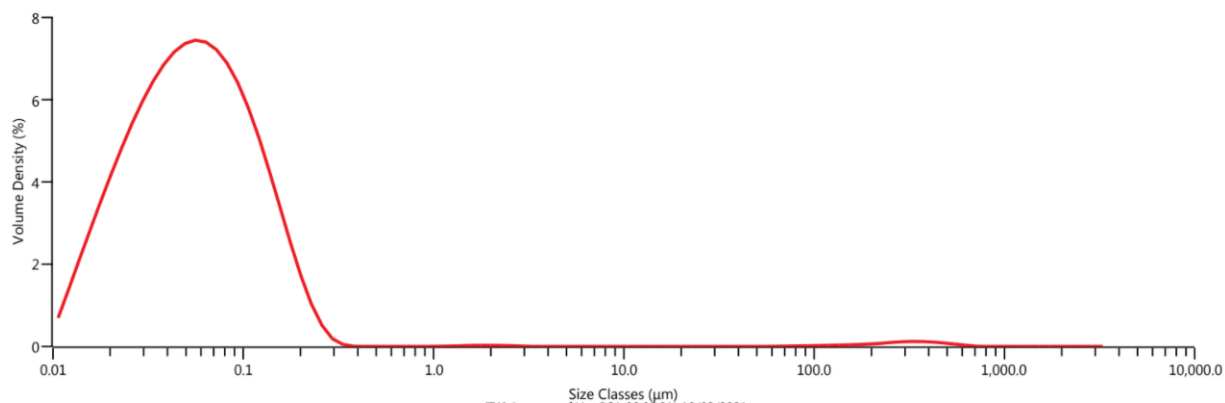


Рис. 8. Распределение агрегатов по размерам в растворе ЗНЧ-белок с концентрацией белка $2.5 \cdot 10^{-8}$ М.

Данный метод не позволяет определить, насколько изменилась структура белковой молекулы при контакте с ЗНЧ. На подобные изменения структуры белковой молекулы может указать иной характер кинетических зависимостей поверхностных свойств данных растворов. На рис. 9а и 9б представлены кинетические зависимости поверхностного натяжения и модуля динамической поверхностной упругости для растворов смеси ЗНЧ постоянной концентрации и БСА в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-8}$ М до $2.5 \cdot 10^{-7}$ М. Добавление ЗНЧ к раствору белка приводит к существенному замедлению изменения поверхностных свойств по сравнению с растворами без наночастиц. В данных системах поверхностное натяжение не достигает равновесных значений за все время проведения эксперимента, что наблюдалось ранее для растворов чистого БСА. Модуль динамической поверхностной упругости за пять часов достигает равновесных значений только для концентраций белка более $1 \cdot 10^{-7}$ М.

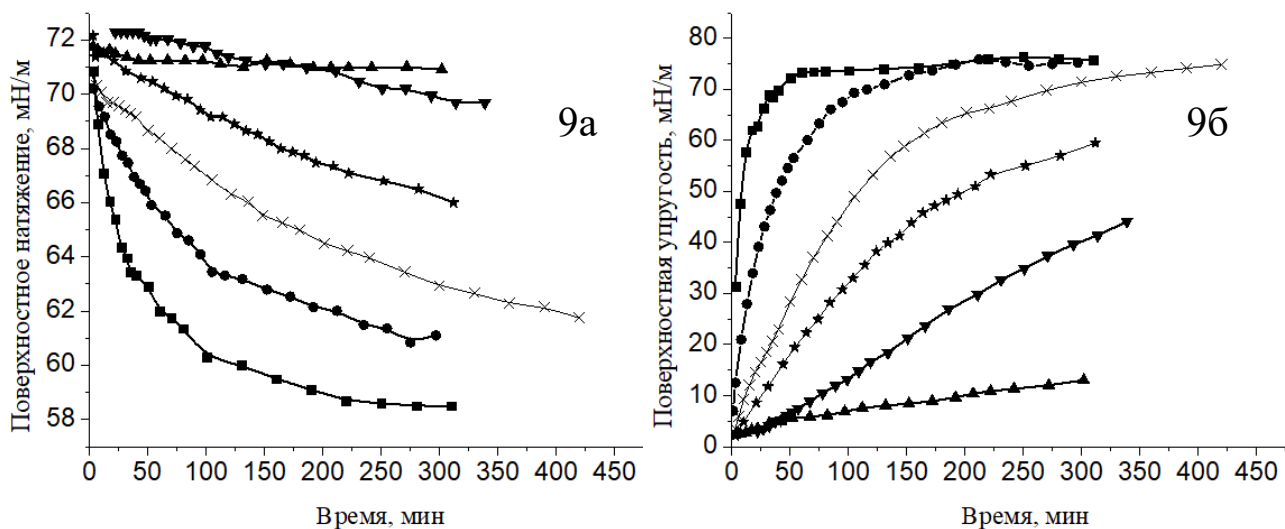


Рис. 9. Зависимость поверхностного натяжения (9а) и динамической поверхностной упругости (9б) от времени для растворов ЗНЧ с различными концентрациями БСА: $1 \cdot 10^{-8}$ М – треугольники; $2.5 \cdot 10^{-8}$ М – перевернутые треугольники; $5 \cdot 10^{-8}$ М – звездочки; $7.6 \cdot 10^{-8}$ М – крестики; $1 \cdot 10^{-7}$ М – круги; $2.5 \cdot 10^{-7}$ М – квадраты.

В то же время монотонный ход кинетических зависимостей поверхностных свойств при добавлении к раствору белка ЗНЧ не нарушается, и данные зависимости ведут к примерно тем же значениям, что и для растворов без добавления ЗНЧ. Это указывает на схожесть структур адсорбционных пленок на поверхности водных растворов БСА и смеси БСА и ЗНЧ.

На рис. 10 для сравнения представлены кинетические зависимости поверхностных свойств растворов БСА, а также смеси БСА и ЗНЧ при концентрации белка $7.6 \cdot 10^{-8}$ М. Обычно на сохранение структур адсорбционного слоя указывают совпадающие зависимости поверхностной упругости от поверхностного натяжения. В данном случае (рис. 10в) в пределах ошибки эксперимента данные зависимости совпадают. Изменение скорости адсорбции в случае добавления наночастиц может быть следствием уменьшения объемной концентрации несвязанного белка в растворе в результате его взаимодействия с ЗНЧ. Образующиеся агрегаты обладают существенно большими размерами, следовательно, их коэффициент диффузии оказывается меньше и происходит в основном адсорбция белковых глобул, не связанных с ЗНЧ.

В то же время, АСМ изображения поверхности раствора смеси ЗНЧ/БСА показывают, что в поверхностном слое присутствует некоторое число наночастиц (рис. 11а). Более крупное изображение (рис. 11б) позволяет различить размытые

невысокие области вокруг ЗНЧ, которые, по-видимому, соответствуют сформированной БК.

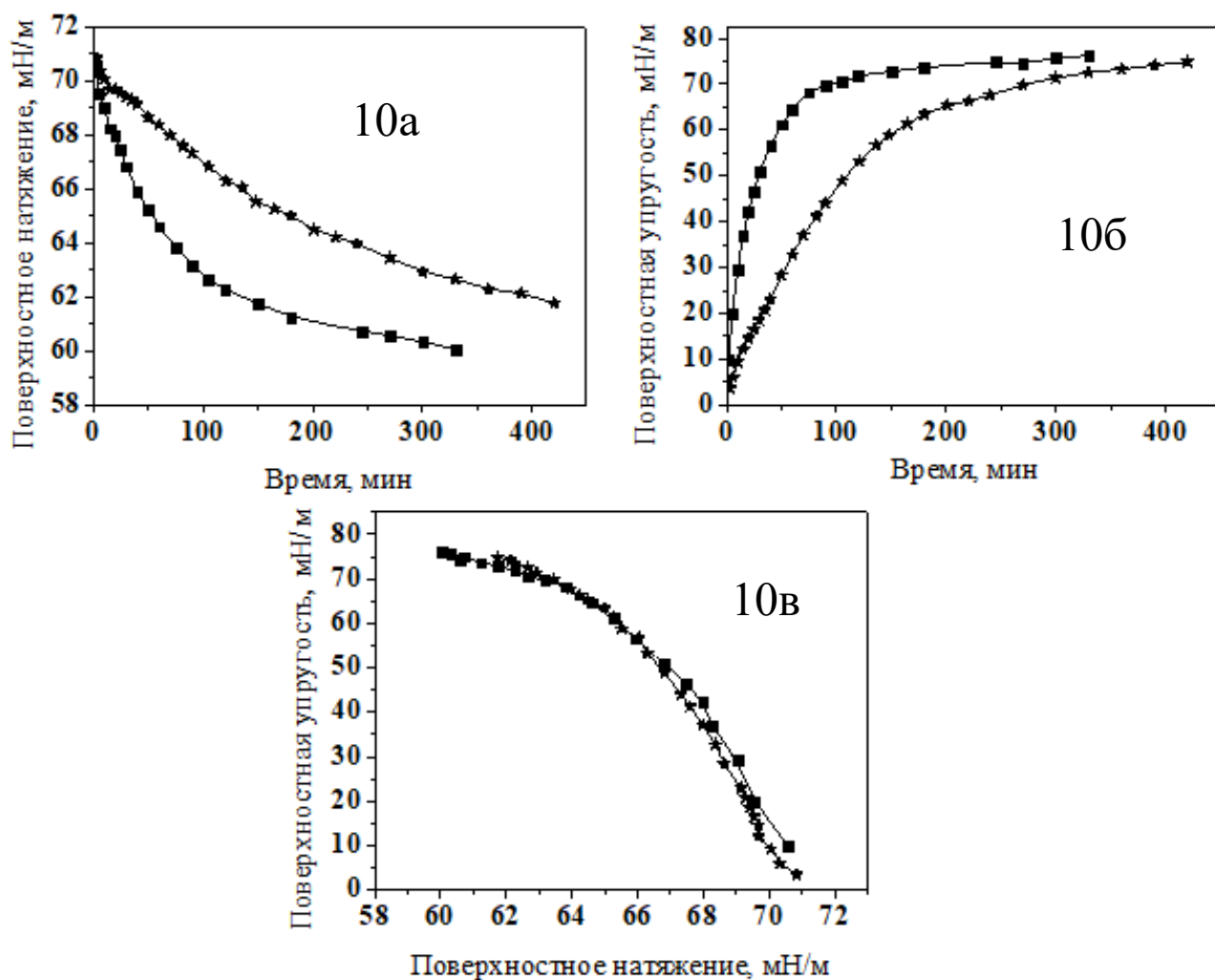


Рис. 10. Сравнительные зависимости поверхностных свойств для системы, содержащей БСА в концентрации $7.6 \cdot 10^{-8}$ М в присутствии ЗНЧ (квадраты) и без них (звездочки).

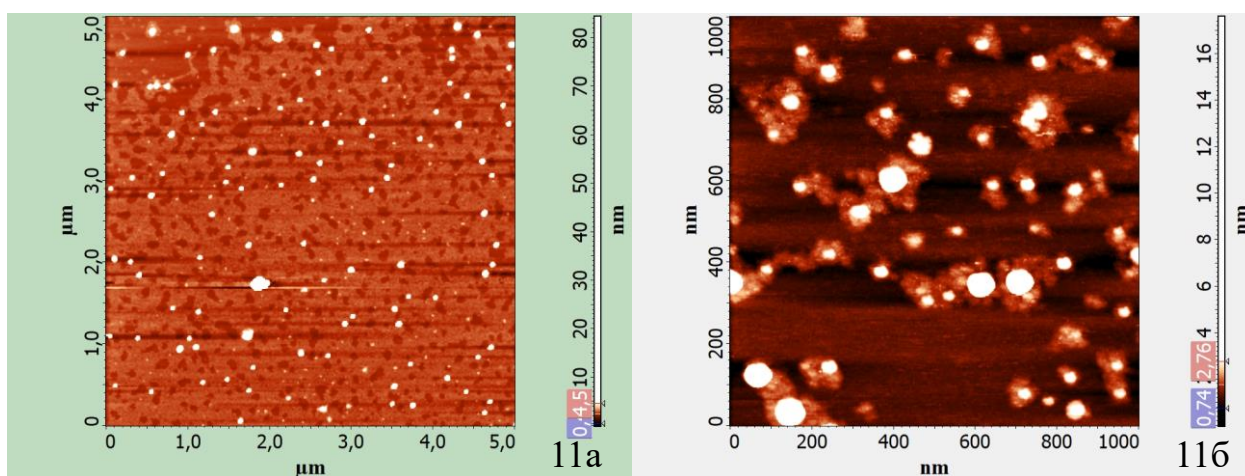


Рис. 11. АСМ изображение поверхностного слоя раствора комплекса ЗНЧ-БСА с концентрацией белка $2.5 \cdot 10^{-8}$ М в масштабе 5×5 мкм (11а) и 1×1 мкм (11б).

Однако, количество наночастиц, окруженных БК, в поверхностном слое оказывается недостаточным для того, чтобы оказать влияние на поверхностные свойства растворов белка. Подобный характер изменения поверхностных свойств наблюдался ранее для растворов смеси бычьего сывороточного альбумина и силикатных НЧ. В работе [24] методом осциллирующего барьера так же не удалось обнаружить существенных отличий поверхностных свойств растворов белка с добавлением и без добавления НЧ. Появление иного хода кинетических зависимостей поверхностных свойств при добавлении НЧ в данной работе было обнаружено с помощью метода осциллирующего кольца, в котором, в отличие от метода осциллирующего барьера, происходит постоянное движение кольца у поверхности. В результате такого движения конвекция раствора в измерительной кювете возрастает, что позволяет большим частицам комплекса подойти к поверхности наравне с несвязанными молекулами белка. В результате, на поверхности находится достаточное количество комплексов белка с наночастицами, и характер зависимости поверхностных свойств меняется.

Добавление к растворам поверхностно-активных веществ сильного низкомолекулярного электролита приводит к изменению ионной силы раствора, что, в свою очередь, может привести к значительному снижению электростатического барьера адсорбции и изменить характер кинетических зависимостей поверхностных свойств. В данной работе были исследованы растворы смеси БСА и ЗНЧ в присутствии хлорида натрия при ионной силе 0.01 М. В качестве примера на рис. 12 представлены кинетические зависимости поверхностного натяжения и динамической поверхностной упругости растворов смеси ЗНЧ/БСА (концентрация белка $7.6 \cdot 10^{-8}$ М) в присутствии NaCl в сравнении с результатами без электролита. Зависимость поверхностных свойств белка в присутствии соли практически совпадает с зависимостью в отсутствие соли для всех измеренных в работе концентраций и не приводится. Из рисунка 12 следует, что добавление низкомолекулярного электролита значительно ускорило процесс адсорбции компонентов раствора смеси белка и ЗНЧ. Равновесные значения поверхностных свойств достигаются даже быстрее, чем в случае чистого белка в отсутствие частиц и соли, и в пределах ошибки совпадают с ними.

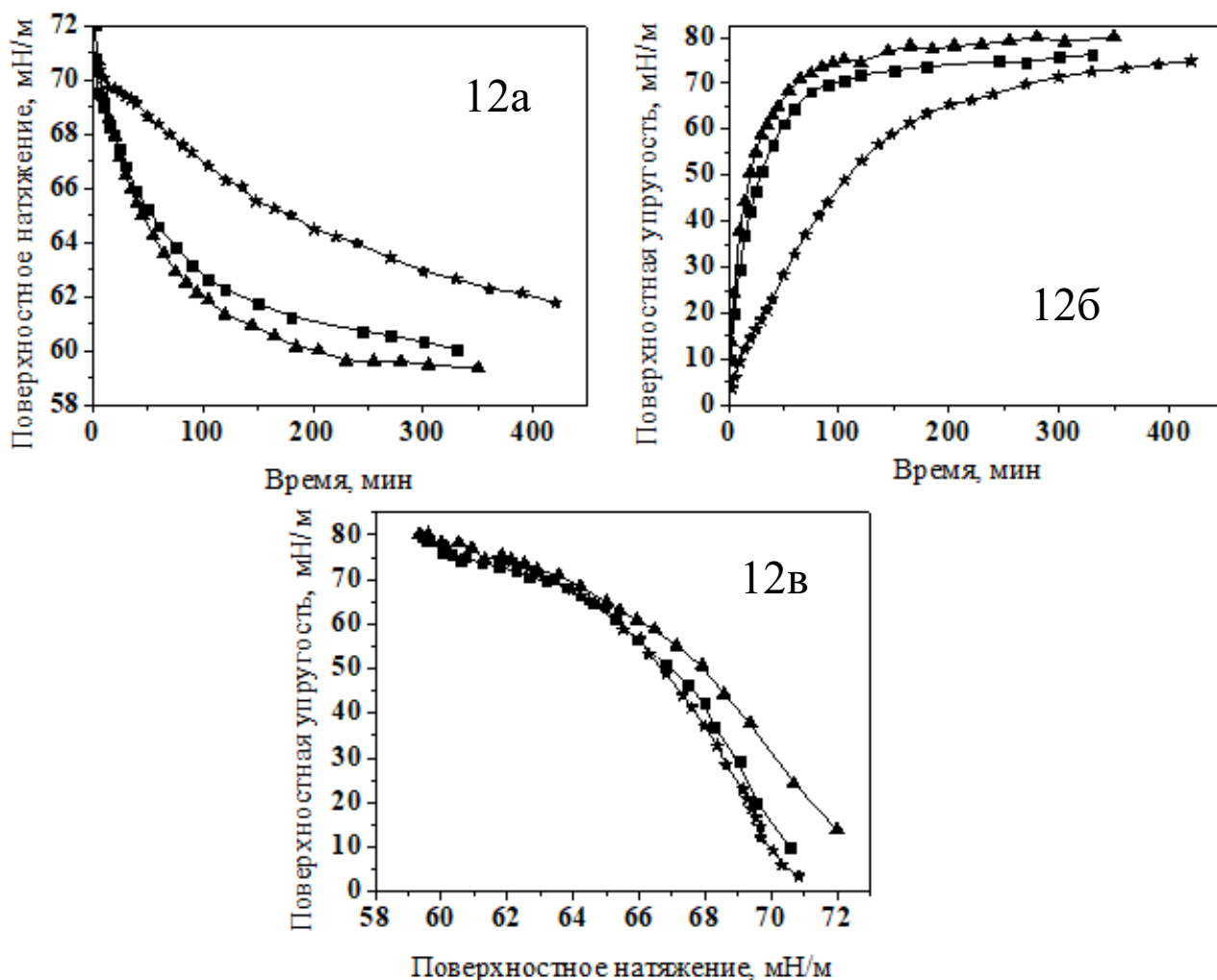


Рис. 12. Кинетические зависимости поверхностных свойств растворов, содержащих БСА с концентрацией $7.6 \cdot 10^{-8}$ М: в отсутствии других компонентов (звездочки), в присутствии ЗНЧ (квадраты), и ЗНЧ и хлорида натрия (треугольники).

Таким образом, добавление низкомолекулярного электролита к растворам смеси ЗНЧ/БСА в области концентрации ниже $1 \cdot 10^{-7}$ М приводит лишь к ускорению процесса адсорбции и не влияет на характеристики адсорбционной пленки. Это подтверждается также зависимостью поверхностной упругости от поверхностного натяжения (рис. 12в). На изображении адсорбционной пленки в данной области концентраций, сделанном с помощью атомно-силовой микроскопии (рис. 13), можно видеть примерно такую же картину, как и в случае пленки на растворе без соли (рис. 11).

В узкой области концентраций белка (около $1 \cdot 10^{-7}$ М) наблюдаются отличия кинетических зависимостей поверхностных свойств растворов смеси ЗНЧ/БСА в присутствии и отсутствии хлорида натрия (рис. 14).

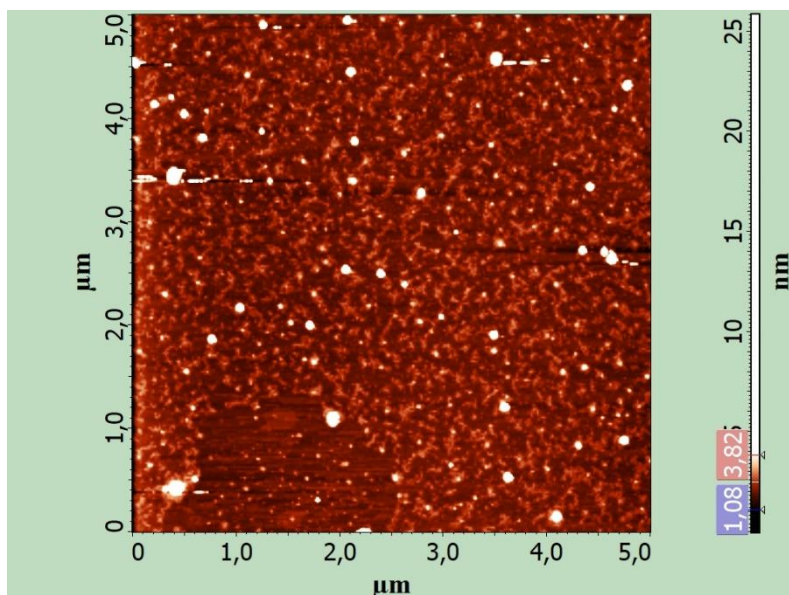


Рис. 13. АСМ-изображение поверхностного слоя раствора ЗНЧ в присутствии соли и БСА с концентрацией $5 \cdot 10^{-8}$ М.

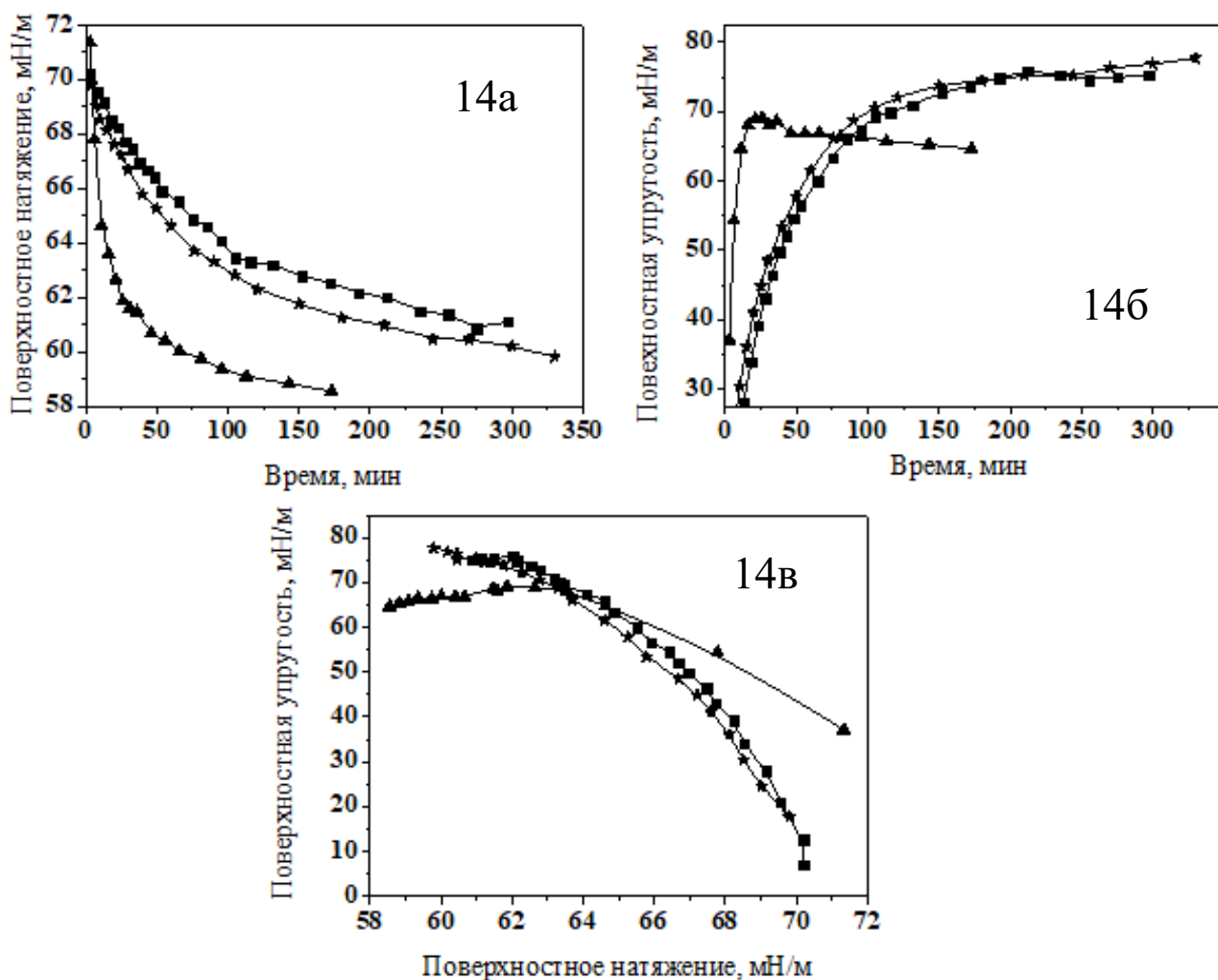


Рис. 14. Кинетические зависимости поверхностных свойств растворов, содержащих БСА с концентрацией $1 \cdot 10^{-7}$ М: в отсутствии других компонентов (звездочки), в присутствии ЗНЧ (квадраты), и ЗНЧ и хлорида натрия (треугольники).

Для данной концентрации компонентов раствора были дважды проведены опыты по определению поверхностных свойств для проверки воспроизводимости, которые показали одинаковые результаты в пределах ошибки эксперимента. Поверхностное натяжение уменьшается значительно быстрее и достигает более низких равновесных значений. Динамическая поверхностная упругость быстро растет до приблизительно 70 мН/м и затем медленно уменьшается до 64 мН/м. Следует отметить, что зависимость поверхностной упругости от времени для БСА в присутствии NaCl, но в отсутствие ЗНЧ совпадала, как и в случае более разбавленных растворов, с подобной зависимостью для растворов чистого белка без добавок соли и ЗНЧ. На рисунке 14в можно видеть, что зависимости поверхностной упругости от поверхностного натяжения для растворов БСА и ЗНЧ/БСА в условиях низкой ионной силы совпадают, но сильно отличаются от зависимости для комплекса в растворе с солью. Такой ход зависимостей поверхностных свойств может указывать на изменение структуры поверхностного слоя раствора смеси ЗНЧ/БСА в данной области концентраций компонентов раствора. Уменьшение динамической поверхностной упругости со временем может указывать на появление в поверхностном слое достаточного количества комплексов ЗНЧ/БСА, в которых молекула белка частично денатурирована. При сжатии-растяжении поверхностного слоя гидрофильные части денатурированной молекулы белка могут проникать в объемную фазу. Это приводит к появлению дополнительных возможностей для релаксации поверхностных напряжений, и динамическая поверхностная упругость начинает медленно уменьшаться. Для концентраций белка выше $2 \cdot 10^{-7}$ М данный эффект пропадает и зависимости упругости от времени для растворов чистого белка, белка в присутствии ЗНЧ и белка в присутствии ЗНЧ при повышенной ионной силе совпадают в пределах экспериментальной ошибки.

Выводы

1. Синтезированы ЗНЧ со средним размером порядка 20 нм и малым индексом полидисперсности.
2. Подобраны оптимальные концентрации компонентов для образования комплекса ЗНЧ/БСА, при которых не происходило осаждение и коагуляция, но в то же время наблюдалось наибольшее отличие хода кинетических зависимостей поверхностных свойств от растворов чистого белка.
3. Образование БК не повлияло на механизм формирования адсорбционного слоя растворов смеси БСА и ЗНЧ, хотя он и включает в себя малое число ЗНЧ. Равновесные значения поверхностных свойств растворов комплексов НЧ/белок и нативного белка совпадают.
4. При повышении ионной силы в растворах комплексов ЗНЧ/БСА значительно ускорилось формирование адсорбционной пленки. В узкой области концентраций белка на кинетической зависимости поверхностной упругости появился локальный максимум, который может быть связан с наличием в пленке достаточного количества комплексов НЧ/белок с частично денатурированной молекулой белка.

4. Благодарность

Измерения размеров частиц в объеме раствора были выполнены на установке Mastersizer 3000 (лазерный гранулометр) в ресурсном центре СПбГУ «Инновационные технологии композитных наноматериалов». Автор работы выражает благодарность ведущему специалисту ресурсного центра Петру Дмитриевичу Колоницкому за оперативную и квалифицированную работу, а также за помощь в интерпретации результатов.

5. Список литературы:

1. Agunloye E. et al. A model for the formation of gold nanoparticles in the citrate synthesis method // *Chem. Eng. Sci.* 2018. Vol. 191. P. 318–331.
2. Wuithschick M. et al. Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, № 7. P. 7052–7071.
3. Agunloye E., Gavriilidis A., Mazzei L. A mathematical investigation of the Turkevich organizer theory in the citrate method for the synthesis of gold nanoparticles // *Chem. Eng. Sci.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 173. P. 275–286.
4. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Methods for chemical synthesis of colloidal gold // *Russ. Chem. Rev.* 2019. Vol. 88, № 3. P. 229–247.
5. Su C.H., Wu P.L., Yeh C.S. Sonochemical Synthesis of Well-Dispersed Gold Nanoparticles at the Ice Temperature // *J. Phys. Chem. B*. 2003. Vol. 107, № 51. P. 14240–14243.
6. Joshi C.P., Bigioni T.P. Model for the phase transfer of nanoparticles using ionic surfactants // *Langmuir*. 2014. Vol. 30, № 46. P. 13837–13843.
7. Fong Y.Y. et al. Influence of surfactant concentration on laser-based gold nanoparticle formation and stability // *Aust. J. Chem.* 2012. Vol. 65, № 2. P. 97–104.
8. Bayee P. et al. Experimental investigations on behaviour of rhamnolipid biosurfactant as a green stabilizer for the biological synthesis of gold nanoparticles // *Int. J. Eng. Trans. C Asp.* 2020. Vol. 33, № 6. P. 1054–1060.
9. Matei I. et al. Bovine Serum Albumin Solution // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № Iii. P. 3395.
10. Lynch I. et al. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2007. Vol. 134–135. P. 167–174.
11. Cedervall T. et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 7. P. 2050–2055.
12. Baimanov D., Cai R., Chen C. Understanding the Chemical Nature of Nanoparticle-Protein Interactions // *Bioconjug. Chem.* 2019. Vol. 30, № 7. P. 1923–1937.

13. Wang G. et al. Surface chemistry of gold nanoparticles determines interactions with bovine serum albumin // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier*, 2019. Vol. 103, № March. P. 109856.
14. Vaishnav S.K. et al. Protein nanoparticle interaction: A spectrophotometric approach for adsorption kinetics and binding studies // *J. Mol. Struct. Elsevier B.V*, 2016. Vol. 1117. P. 300–310.
15. Razavi S. et al. Surface tension anomaly observed for chemically-modified Janus particles at the air/water interface // *J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc.*, 2019. Vol. 558. P. 95–99.
16. Noskov B.A. Protein conformational transitions at the liquid-gas interface as studied by dilational surface rheology // *Adv. Colloid Interface Sci. Elsevier B.V.*, 2014. Vol. 206. P. 222–238.
17. Graham D.E., Phillips M.C. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation // *J. Colloid Interface Sci.* 1979. Vol. 70, № 3. P. 403–414.
18. Hambardzumyan A. et al. β -Casein and symmetrical triblock copolymer (PEO-PPO-PEO and PPO-PEO-PPO) surface properties at the air-water interface // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 3. P. 756–763.
19. Maldonado-Valderrama J. et al. β -Casein adsorption at liquid interfaces: Theory and experiment // *J. Phys. Chem. B.* 2004. Vol. 108, № 34. P. 12940–12945.
20. Noskov B., Mikhailovskaya A. Adsorption kinetics of globular proteins and protein/surfactant complexes at the liquid-gas interface // *Soft Matter*. 2013. Vol. 9, № 39. P. 9392–9402.
21. Noskov B.A. et al. Bovine serum albumin unfolding at the air/water interface as studied by dilational surface rheology // *Langmuir*. 2010. Vol. 26, № 22. P. 17225–17231.
22. Putra R.P. et al. Adsorption and Conformation of Bovine Serum Albumin with Blue-Emitting Gold Nanoclusters at the Air/Water and Lipid/Water Interfaces: research-article // *Langmuir. American Chemical Society*, 2019. Vol. 35, № 50. P. 16576–16582.
23. Rana S. et al. Control of surface tension at liquid-liquid interfaces using nanoparticles and nanoparticle-protein complexes // *Langmuir*. 2012. Vol. 28, № 4. P. 2023–2027.
24. Milyaeva O.Y. Dynamic Surface Properties of Solutions of Bovine Serum Albumin

- Complexes with Silica Nanoparticles // Colloid J. 2020. Vol. 82, № 5. P. 538–545.
25. Zhao P., Li N., Astruc D. State of the art in gold nanoparticle synthesis // Coord. Chem. Rev. 2013. Vol. 257, № 3–4. P. 638–665.
26. А.А. Е. и др. Получение и исследование наноструктур. Лабораторный практикум по нанотехнологиям; 2nd-е изд, М ed. / ed. А.С. ред. С. 2011. 146с р.