



ХИМИЯ

УДК 543.426

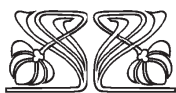
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ДОКСИЦИКЛИНА В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИОНАМИ ЕВРОПИЯ

Т. Д. Смирнова, Е. А. Желобицкая, Т. Г. Данилина

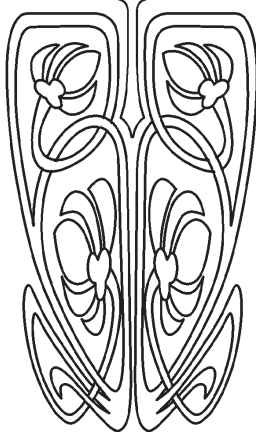
Смирнова Татьяна Дмитриевна, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, доктор химических наук. E-mail: smirnovatd@mail.ru

Желобицкая Елена Александровна, аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: elen34444046@mail.ru

Данилина Татьяна Григорьевна, аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: danilina.tatyana.a@gmail.com



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



В настоящей работе рассмотрено влияние наночастиц серебра на флуоресцентные свойства доксициклина (ДЦ) и его комплекса с европием. Полученные наночастицы имеют сферическую форму, узкий диапазон распределения по размерам со средним диаметром 20 ± 1.5 нм, ζ -потенциал -30 мВ. Стабильность характеристик сохраняется в течение 14 суток. С целью сокращения расстояния между металлической поверхностью и молекулой ДЦ наночастицы серебра модифицированы ионами европия. Ранее нами показано, что ДЦ образует хелат с ионами европия, который характеризуется переносом энергии возбуждения. Особенностью комплексообразования является появление в спектре флуоресценции ДЦ новой полосы, характерной для эмиссии иона европия ($\lambda_{\text{фл}} = 615$ нм). Нами установлено, что ζ -потенциал модифицированных наночастиц зависит от концентрации ионов европия в растворе. В присутствии ионов европия ζ -потенциал наночастиц возрастает от -30 мВ до нулевого значения ($4 \cdot 10^{-4}$ М) и в условиях дальнейшего роста концентрации ионов металла (до $1.25 \cdot 10^{-3}$ М) значение потенциала возрастает ($+85$ мВ), что обуславливает высокую стабильность коллоидной системы. Нами установлено, что сигнал сенсibilизированной флуоресценции в присутствии модифицированных наночастиц зависит от кислотности среды и концентрации серебряных наночастиц. Найдены оптимальные условия получения максимального аналитического сигнала. На основании проведенных исследований разработана флуориметрическая методика определения ДЦ в лекарственном препарате «Доксициклин», ООО «Озон».

Ключевые слова: доксициклин, люминесценция, европий, наночастицы серебра.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-370-375

Флуоресцентная спектроскопия является рутинным инструментом исследования клеточной и молекулярной визуализации, проточной цитометрии, медицинской диагностики, судебно-медицинской экспертизы, генетического анализа, а также аналитическим методом благодаря высокой чувствительности, низкой стоимости, простоте использования. Однако большинство доступных органических красителей, используемых для получения оптического сигнала, имеют ряд важных ограничений, таких как гидрофобность, низкий квантовый выход и невысокая фотостабильность. Дальнейшее развитие люминесцентного метода, связанное с совершенствованием



существующих флуорофоров, не всегда эффективно, поэтому в последние годы исследователи обращаются к применению различных наноматериалов, которые используются в качестве нанореакторов или участников пары донор–акцептор энергии электронного возбуждения.

Особый интерес представляют металлические наночастицы, которые могут увеличить или уменьшить время жизни флуоресценции флуорофоров, повысить эффективность резонансного переноса энергии в системе донор – акцептор в результате взаимодействия возбужденного состояния флуорофора со свободными электронами наночастицы металла. Согласно теории электронного газа электроны внешних валентных оболочек металла свободно перемещаются внутри металлической частицы, обуславливая высокую электропроводность. Под действием переменного электрического поля светового луча подвижные электроны смещаются. Если размер частицы много меньше длины волны падающего света, то перемещение электронов способствует возникновению диполя. В случае совпадения частоты колебаний падающего света с собственной частотой колебаний электронов проводимости наночастицы наблюдается явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Колеблющийся диполь вблизи поверхности частицы называют поверхностным плазмоном. Возникающие заряды вблизи поверхности наночастицы вызывают поляризацию молекул окружения частицы металла. Такие эффекты выражены сильнее при возрастании способности к поляризации адсорбированных молекул и диэлектрической проницаемости окружающей среды.

В настоящей работе рассмотрено влияние наночастиц серебра на флуоресцентные свойства доксициклина и его комплекса с европием.

Широкое использование антибиотиков тетрациклинового ряда в клинике и ветеринарии вызывает опасность в превышении их остаточных концентраций предельно допустимых значений в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. Совершенствование известных флуориметрических способов определения тетрациклинов с использованием наночастиц серебра является задачей настоящего исследования.

Материалы и методы

Реактивы. Доксициклин фирмы «Sigma», содержание основного вещества не менее 98%. Исходный раствор с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-2}$ М готовили растворением точной навески в 0.1 М HCl; кислота уксусная, ГОСТ 61-75, х.ч.; аммиак водный, ГОСТ 3760-79, ч.д.а.; вода бидистиллированная ГОСТ 6709-72; серебро азотнокислое

99,9% ч.д.а. «РеаХим»; натрий лимоннокислый трехзамещенный 5,5-водный, ч.д.а., «РеаХим»; боргидрид натрия, х.ч., «РеаХим»; нитрат европия (III) шестиводный, 99.9% , «AcrosOrganics».

Аппаратура и техника измерений. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CaryEclipse «AgilentTechnologies» (Австралия) с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина щели возбуждения – 10 нм, флуоресценции – 20 нм. Скорость регистрации спектров – 300 нм/мин. Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Сигнал регистрировали под углом 90° к возбуждающему свету. Оптическую плотность растворов в видимой и УФ-области спектра измеряли на спектрофотометре UV-1800 «Shimadzu» (Япония) на кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см, «Shimadzu». Значение pH контролировали на pH-метре (pH-673 M) со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения. Электронные аналитические весы HR-200 фирмы «A&Dcompany», Япония. Измерение размера и ζ -потенциала наночастиц серебра проводили с помощью «ZetasizerNanoZS», Великобритания.

Наночастицы серебра синтезировали по методике [1]: смешивали 1 мл раствора AgNO_3 (10 мМ), 1 мл цитрат-иона (500 мМ) и 47 мл бидистиллированной воды в течение 10 мин при комнатной температуре, добавляли 600 мкл NaBH_4 (10 мМ). Реакция восстановления продолжалась 30 мин, оставляли в холодильнике на 10–12 часов для завершения роста наночастиц. Концентрацию наночастиц рассчитывали согласно закону Бугера – Ламберта – Бера, где ϵ равно $2,87 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [2].

Результаты и их обсуждение

Свойства наночастиц серебра. Полученные наночастицы серебра (AgNPs) стабилизированы цитрат-ионом. Известно, что на положение полосы ППР наночастиц влияют характеристики индивидуальных частиц и диэлектрические свойства окружающей среды [3]. Нами установлена корреляция результатов структурно-фазовых и оптических исследований образцов полученных коллоидных растворов серебра. Так, в спектрах поглощения (рис. 1) синтезированных наночастиц присутствует ярко выраженная резонансная полоса ППР. Сравнительный анализ результатов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и оптической спектроскопии коллоидных растворов позволяет отметить период активного формирования наночастиц (первые 24 часа),



который сопровождается значительным увеличением оптической плотности и bathochromным смещением положения полосы ППР на 15 нм. В последующие 14 дней изменения в спектрах не значительны. По данным ПЭМ, полученные наночастицы имеют сферическую форму, узкий диапазон распределения по размерам со средним диаметром 20 ± 1.5 нм, ζ -потенциал – 30 мВ. Стабильность характеристик сохраняется в течение 14 суток.

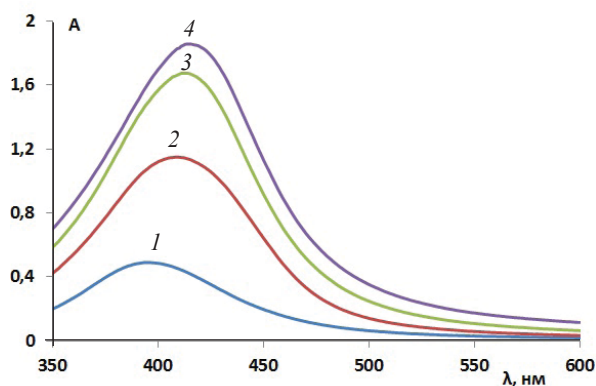


Рис. 1. Спектры поглощения наночастиц серебра, стабилизатор – цитрат-ион, полученные: 1 – через 20 мин после синтеза, 2 – 24 ч, 3 – 14 сут, 4 – 30 сут. $C_{\text{НЧ}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М

Флуориметрические свойства доксициклина. Спектр флуоресценции ДЦ характеризуется невысокой интенсивностью ($\lambda_{\text{возб}} 390$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 520\text{--}550$ нм). Известно [4], что усиление собственной флуоресценции молекулы на поверхности наночастицы серебра возможно, если спектр ППР наночастиц перекрывается со спектром возбуждения флуоресцирующей молекулы (рис. 2). В случае сорбции молекул ДЦ на поверхности наночастицы серебра можно ожидать усиление сигнала флуоресценции ДЦ в результате межмолекулярного переноса энергии возбуждения. Однако в условиях высокой плотности заряда стабилизатора цитрат-ионов значительное расстояние между анионами тетрациклина и поверхностью наночастиц препятствует их взаимодействию и проявлению влияния локального поля поверхностного плазмона на флуориметрические свойства молекулы антибиотика. В таких условиях интенсивность флуоресценции ДЦ практически не изменяется.

Модификация наночастиц серебра ионами европия. С целью сокращения расстояния между донором энергии (металлической поверхностью) и акцептором (ДЦ) осуществлена модификация поверхности наночастиц серебра ионами Eu^{3+} .

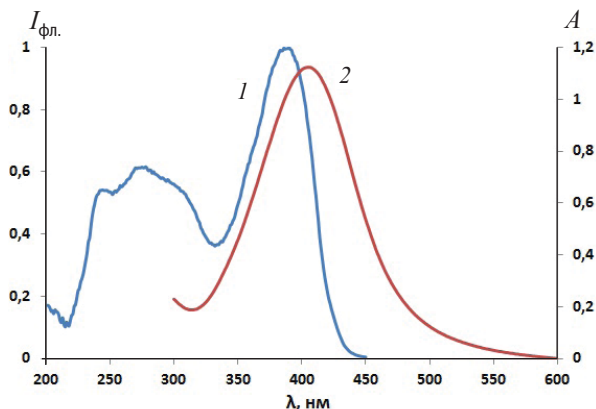


Рис. 2. Спектр возбуждения ДЦ (1); спектр поглощения наночастиц серебра (2). $C_{\text{AgNPs}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ДЦ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ М

Известно [5], что ДЦ образует хелат с ионами европия, который характеризуется переносом энергии возбуждения. Особенностью комплексообразования является появление в спектре флуоресценции ДЦ новой полосы, характерной для эмиссии иона Eu^{3+} ($\lambda_{\text{фл}} = 615$ нм). Механизм возникновения сенсibilизированной флуоресценции заключается в поглощении электромагнитного излучения молекулой ДЦ и дальнейшего внутримолекулярного переноса энергии возбуждения на излучательные уровни иона редкоземельного элемента (РЗЭ) с последующей его флуоресценцией. Спектр флуоресценции комплексов Eu^{3+} характеризуется узкой полосой с $\lambda_{\text{фл}} = 615$ нм (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ переход). При этом интенсивность сенсibilизированной флуоресценции превышает собственную люминесценцию антибиотика и эмиссию самого иона Eu^{3+} до 30 раз. В то же время интенсивность флуоресценции бинарного комплекса европия с тетрациклином недостаточно высока для его эффективного использования во флуориметрическом определении остаточных содержаний антибиотиков в пищевых продуктах и биологических жидкостях. Использование наночастиц благородных металлов во флуориметрии позволяет в некоторых случаях увеличить сигнал эмиссии флуоресцирующих молекул [4].

Модификация наночастиц серебра ионами Eu^{3+} заключается в следующем: в пробирки объемом 2 мл вносят 1 мл раствора наночастиц серебра $2 \cdot 10^{-4}$ М, 1 мл Eu^{3+} 10^{-2} М, перемешивают и центрифугируют (12000 об/мин) 20 мин. Осадок модифицированных наночастиц растворяют в спирте (2 мл).

Нами установлено, что ζ -потенциал модифицированных наночастиц зависит от концентрации ионов Eu^{3+} в растворе (рис. 3). При увели-

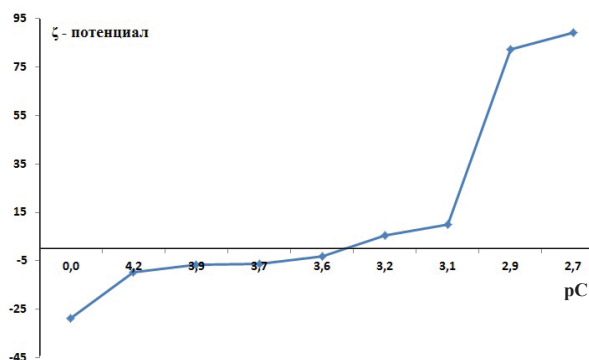


Рис. 3. Зависимость ζ -потенциала наночастиц серебра от концентрации ионов Eu^{3+} . $C_{\text{ДЦ}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

чении концентрации ионов металла ζ -потенциал наночастиц возрастает от -30 мВ до нулевого значения ($4 \cdot 10^{-4} \text{ M Eu}^{3+}$) и в условиях дальнейшего роста концентрации РЗЭ ($1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M Eu}^{3+}$) значение потенциала увеличивается ($+85 \text{ мВ}$), что обуславливает высокую стабильность коллоидной системы.

Комплексообразование положительно заряженной наночастицы серебра, модифицированной ионами европия, с анионами доксициклина способствует сближению компонентов, значительному повышению эффективности как межмолекулярного, так и внутримолекулярного переносов энергии возбуждения и усилению сигнала сенсibilизированной флуоресценции образующегося хелата. способствует также участие цитрат-иона в образовании разнолигандного комплекса европия с ДЦ.

Образование комплексов с переносом энергии в исследуемой системе подтверждается появлением в спектре флуоресценции ДЦ характерной полосы сенсibilизированной эмиссии РЗЭ ($\lambda_{\text{фл}} = 615 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}} = 397 \text{ нм}$). Установлено, что флуоресценция в растворе ДЦ в присутствии модифицированных наночастиц серебра увеличивается в 10 раз (рис. 4).

Изучены оптимальные условия получения максимального сигнала сенсibilизированной флуоресценции ДЦ в присутствии модифицированных наночастиц. Установлено, что интенсивность флуоресценции зависит от кислотности среды (рис. 5) и концентрации серебряных наночастиц.

Методика определения ДЦ. На основании проведенных исследований разработана флуориметрическая методика определения ДЦ в лекарственном препарате «Доксициклин» (ООО «Озон»). Методика определения: 5 таблеток препарата растирают в ступке, навеску, соответ-

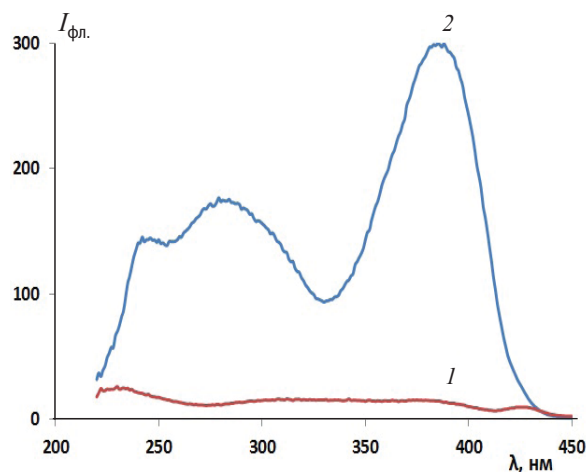


Рис. 4. Спектр возбуждения ДЦ в отсутствие (1) и в присутствии наночастиц серебра, модифицированных ионами Eu^{3+} (2). $C_{\text{AgNPs}} = 3,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $C_{\text{Eu}^{3+}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{ДЦ}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $\lambda_{\text{фл}} = 615 \text{ нм}$

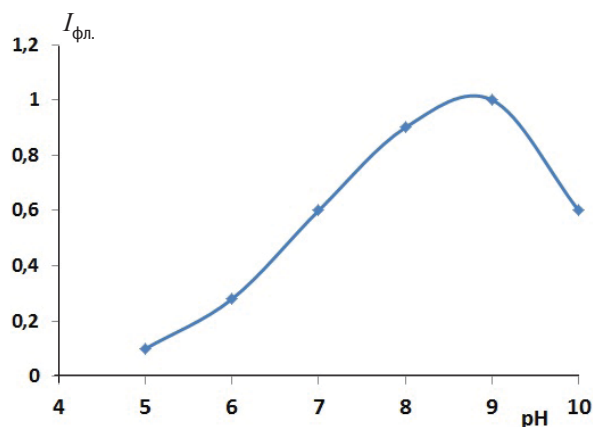


Рис. 5. Влияние кислотности среды на интенсивность флуоресценции ДЦ в присутствии модифицированных наночастиц серебра. $C_{\text{ДЦ}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $C_{\text{AgNPs}} = 3,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. $\lambda_{\text{возб}} = 395 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 615 \text{ нм}$

ствующую одной таблетке, растворяют в колбе емкостью 25 мл, отделяют раствор фильтрованием (фильтр с синей лентой).

К аликвотной части раствора, предварительно разбавленного в 100 раз, добавляют 1 мл буфера (pH 9), 0,4 мл $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ модифицированных наночастиц серебра, 0,4 мл $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ Eu^{3+} , буфер до 4,0 мл. Измеряют интенсивность флуоресценции с временной задержкой 0,03 мс ($\lambda_{\text{возб}} = 397 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 615 \text{ нм}$) и по градуировочному графику определяют содержание ДЦ в лекарственном препарате.

Кроме ДЦ в состав таблетки входит крахмал. Установлено, что при данных соотношениях крахмал не оказывает мешающего действия.



Диапазон определяемых концентраций составляет $5 \cdot 10^{-8} - 6 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Предел обнаружения (3σ) $2 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $S_r = 0.11$.

В табл. 1 представлены результаты определения ДЦ в лекарственном препарате. Правильность контролируют методом «введено – найдено» (табл. 2).

Таблица 1

Результаты определения доксициклина в лекарственном препарате «доксициклин» (ООО «Озон») ($n = 3, p = 0,95$)

Заявленное содержание, мг	Найдено, мг	
	$x \pm \Delta x$	S_r
100	103 ± 14	0.11

Таблица 2

Контроль правильности определения доксициклина методом «введено – найдено» ($n = 3, p = 0,95, t_{\text{табл.}} = 4,30$)

Введено, мг	Найдено, мг	S_r	$t_{\text{экспер}}$
8	8.2 ± 1.6	0.27	2.1
11	11.2 ± 2.8	1.2	2.8
57	49.8 ± 8.9	3.6	3.7

Выводы. Установлено, что эффект увеличения интенсивности флуоресценции раствора ДЦ в 10–30 раз в присутствии наночастиц серебра достигается только в случае предварительной модификации поверхности наночастиц ионами Eu^{3+} .

На основании проведенных исследований предложена флуориметрическая методика определения ДЦ, апробированная в анализе лекарственного препарата. Диапазон определяемых концентраций $5 \cdot 10^{-8} - 6 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Предел обнаружения (3σ) составляет $2 \cdot 10^{-8} \text{M}$, $S_r = 0.11$.

Список литературы

1. *Tan H., Chen Y.* Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk // *Sens. Actuators. B.* 2012. Vol. 173. P. 262–267.
2. *Штыков С. Н., Русанова Т. Ю.* Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения // *Рос. хим. журн.* 2008. Т. LII, № 2. С. 92–100.
3. *Шевцова В. И., Гайду П. И.* Положение полосы поверхностного плазмонного резонанса в коллоидных растворах наночастиц серебра и золота // *Вестн. БГУ. Сер. 1.* 2012. № 2. С. 15–18.

4. *Ghosh D., Chattopadhyay N.* Gold and silver nanoparticle based Superquenching of fluorescence : Areview // *J. Lumin.* 2015. Vol. 160. P. 223–232.
5. *Смирнова Т. Д., Штыков С. Н., Кочубей В. И., Хрякова Е. И.* Перенос энергии возбуждения в хелате европия с доксициклином в присутствии второго лиганда в мицеллярных растворах неионогенных ПАВ // *Оптика и спектроскопия.* 2011. Т. 110, № 1. С. 65–71.

Luminescent Properties of Doxycycline in the Presence of Silver Nanoparticles Modified by Ions of Europium

T. D. Smirnova, E. A. Zhelobitskaya, T. G. Danilina

Tatyana D. Smirnova, ORCID 0000-0002-3391-1092, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, smirnovatd@mail.ru

Elena A. Zhelobitskaya, ORCID 0000-0001-9918-3465, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, elen34444046@mail.ru

Tatiana G. Danilina, ORCID 0000-0001-7956-2716, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, danilina.tatyana.a@gmail.com

Fluorescence spectroscopy is a routine tool for studying cellular and molecular visualization, flow cytometry, medical diagnosis, forensic medical examination, genetic analysis, and also an analytical method. However, most available organic dyes used to produce an optical signal have a number of important limitations, such as hydrophobicity, low quantum yield, and low photostability. Further development of the luminescent method associated with the improvement of existing fluorophores is not always effective, so in recent years researchers have turned to the use of various nanomaterials that are used as nanoreactors or participants in the donor electron acceptor pair of electron excitation energy. Of particular interest are metallic nanoparticles that can increase or decrease the fluorescence lifetime of fluorophores, increase the efficiency of resonant energy transfer in the donor-acceptor system as a result of the interaction of the excited state of a fluorophore with free electrons in metal nanoparticles. In the present work, the influence of silver nanoparticles on the fluorescent properties of doxycycline (DC) and its complex with europium is considered. The nanoparticles obtained are spherical, a narrow range of size distribution with an average diameter of $20 \pm 1.5 \text{ nm}$, and a ζ -potential of -30 mV . The stability of the characteristics is maintained for 14 days. In order to reduce the distance between the metal surface and the DC molecule, the silver nanoparticles are modified by europium ions. Earlier we showed that the DC forms a chelate with europium ions, which is characterized by the transfer of excitation energy. A peculiarity of complexation is the appearance in the fluorescence spectrum of a new band, which is characteristic for the emission of the europium ion ($\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$). We have established, that the ζ -potential of modified nanoparticles depends on the concentration of europium ions in the solution. In the presence of europium ions, the ζ -potential of the nanoparti-



cles increases from -30 mV to zero ($4 \cdot 10^{-4} \text{M Eu}^{3+}$) and under the conditions of further growth of the metal ion concentration (up to $1.25 \cdot 10^{-3} \text{M}$) the potential value increases (+85 mV), which causes a high stability of the colloidal system. We have established, that the signal of sensitized fluorescence in the presence of modified nanoparticles depends on the acidity of the medium and the con-

centration of silver nanoparticles. Optimal conditions for obtaining the maximum analytical signal are found.

Based on the studies carried out, a fluorimetric method for determination of DC in the drug "Doxycycline", LLC "Ozone" was developed.

Key words: doxycycline, luminescence, europium, silver nanoparticles.

Образец для цитирования:

Смирнова Т. Д., Желобицкая Е. А., Данилина Т. Г. Люминесцентные свойства доксициклина в присутствии наночастиц серебра, модифицированных ионами европия // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 4. С. 370–375. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-370-375.

Cite this article as:

Smirnova T. D., Zhelobitskaya E. A., Danilina T. G. Luminescent Properties of Doxycycline in the Presence of Silver Nanoparticles Modified by Ions of Europe. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 4, pp. 370–375 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-370-375.
