

*Софийски университет „Св. Климент Охридски”,  
Факултет по химия и фармация, катедра Физикохимия*

*Александър Симеонов Чаначев*

## **Автореферат**

на дисертационен труд

на тема: Нови методи за получаване и функционализиране  
на златни наночастици с протеини и биополимери

за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор”

Професионално направление 4.2. Химически науки  
(Физикохимия – Биофизикохимия)

Научни ръководители: проф. дн Константин Балашев

проф. д-р Цветанка Иванова

София, 2021



## Съдържание

1. Увод

2. Синтез и функционализиране на златни частици за биосензорни приложения

2.1. Методи и основни цели на изследването

2.2. Експериментални резултати и анализ

2.3. Обобщение на резултатите

3. Синтез на златни наночастици в организирана молекулна система – монослой.

3.1. Основни цели на изследването

3.2. Експериментални резултати

3.3. Теоретична интерпретация на монослойния модел

3.4. Съпоставяне на експерименталните данни  $\Delta A(t)$  и теоретичното предсказание

3.5. Обобщение на резултатите

4. Основни научни приноси и изводи

5. Списък на включените в изследването публикации и участия в конференции

6. Литература

## 1. Увод

Специфичните свойства на златото водят до интерес към този метал още от най-дълбока древност. Като един от най-ранните материали, използвани при изработката на накити, монети и предмети на лукса, той бързо се превръща в символ на високо обществено положение и възможности. Поради това, че се намира трудно, е обяснимо и желанието за някакъв магически път за получаването му, което би довело откривателя на подобен метод до богатство и популярност. Тази, макар и малко повърхностна представа, е вероятно първият стимул, довел до изследвания на свойствата на златото, зараждането на алхимията, а и изобщо на поредицата от химични изследвания на други елементи и съединения, дали тласък в развитието на различни химични експериментални методи и поставили множество практически и чисто теоретични проблеми, чието решение е допринесло за развитието на химията като наука.

Химията и нанохимията на металните, в частност златните наночастици, търси нови свойства, които са зависими основно от размера и формата на частиците. Те определят и специфични нови приложения на тяхната употреба, като например в катализата, като пигменти, като носители на противотуморни лекарства, при употребата им в изработването на слънчеви клетки и много други.

През последните десетилетия, с направените открития в областта на колоидната химия, а също така и с развитието на методите за изследване на наноразмерните обекти, се засили интересът към златните наночастици като подходящ носител на различни биомолекули. Това от своя страна намери приложение както в биологията и химията, така и в медицината, главно за диагностични цели, но също така и при търсенето на нови и подобряването на старите методи за целева доставка и получаване на различни лекарствени форми.

Златните наночастици представляват колоидна суспензия на наночастици, изградени от злато, които са диспергирани в определена флуидна среда, най-често вода. Разтворите им имат различен цвят, като той се определя от големината на златните наночастици, и могат да бъдат обогатени в наситено червен цвят или различни нюанси на червеното (за частици с големина под 100 nm) до синьо и виолетово или отънъци на виолетовото (за по-големи).

Големината и формата на златните наночастици е съществена и определяща техните свойства. Различните методи за получаването им дават различни възможности за контрол както на големината и формата, така и на еднаквостта на получените частици в целия обем на разтвора, и това прави особено важно и при избирането на подходящ

метод за синтезирането им, и при търсенето на различни способности за по-доброто им охарактеризиране, което допринася за лесната им функционализация с различни биомолекули. Това е съществено за тяхното приложение, защото златните наночастици започват все по-активно да се използват в медицината както в диагностиката, така и за целева доставка на различни лекарствени препарати. Те представляват и отличен обект за изследване на различни биологични и биохимични процеси поради специфичните си химични и физични свойства (като например повърхностния плазмонен резонанс) и дават възможност за изследване на различни каталитични реакции, които могат да протичат на повърхността им.

Настоящият дисертационен труд разглежда синтезирането и биофункционализирането на златни наночастици, като той смислово е разделен на няколко основни глави, които логически проследяват научните постижения и методи, които са се превърнали в класически процедури за синтез и изследване на златни наночастици, а също и новите методи за тяхното получаване, охарактеризиране и възможността за използването им като биосензори.

В глава *Литературен обзор* са разгледани методите за синтез на златните наночастици и приложените различни подходи за тяхното охарактеризиране – в обемна фаза и на граничната повърхност вода/въздух. Специално внимание е отделено на биологичните приложения на златните наночастици като сензори за определяне на ензимна активност.

В глава *Материали и методи* са разгледани цитратният синтез на златните наночастици (AuNPs) и тяхното функционализиране със серум албумин (BSA) в течна фаза заедно с приложените експериментални методи за охарактеризиране на тези системи. Обърнато е специално внимание на приложения Лангмюир-Блоджет (LB) метод за получаване на филми от AuNPs/BSA на границата вода/въздух и тяхното охарактеризиране с метода на атомно-силовата микроскопия (AFM) и с Трансмисионна електронна микроскопия (TEM).

В следващите две глави са представени и дискутирани резултати на настоящата дисертация. В глава 4, озаглавена „*Синтез и функционализиране на златни частици за биосензорни приложения*“ са представени синтезът на златните наночастици, функционализирани с BSA, и тяхното морфологично охарактеризиране с UV-VIS спектроскопия, AFM и трансмисионна електронна микроскопия (TEM). Сравнени са методите за охарактеризиране на златни наночастици и такива модифицирани с BSA в

течна фаза. Разгледано е получаването на монослоеве от функционализирани златни наночастици, по-точно техните  $\pi$ -A изотерми и охарактеризирането на LB филми с AFM и ТЕМ. Глава 5 („Синтез на златни наночастици в организирана молекулна система – монослой“) предлага един, по-същество, качествено нов подход за синтез на златни наночастици, при който като редуциращ агент се използва Лангмюировия монослой на граничната повърхност вода/въздух, изграден от молекули на амфифилното съединение хексадециланилин (HDA) или от BSA. Предложен е и кинетичен модел, чрез който се извличат важни кинетични константи и се хвърля светлина върху молекулните механизми на процесите на зародишообразуване и растеж на златните наночастици.

В заключителната част на дисертацията накратко са обобщени и основните приноси в нея.

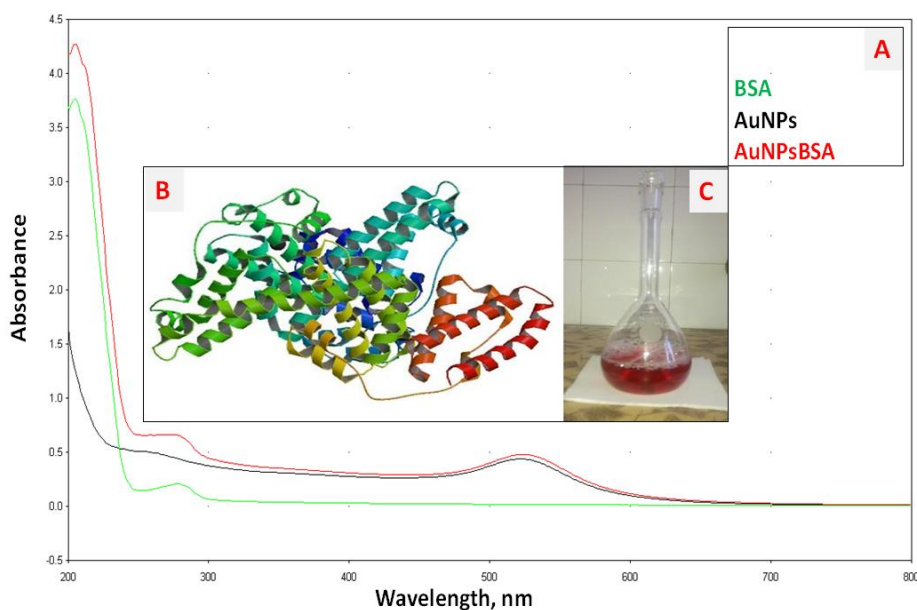
## **2. Синтез и функционализиране на златни частици за биосензорни приложения**

### **2.1. Методи и основни цели на изследването**

Колориметричните тестове, които са базирани на принципите на повърхностния плазмонен резонанс на метални наночастици, са доказали, че са широко приложими при създаване на сензорни системи за изследване на ензимно-каталитични реакции. Причините за това се дължат на опростената им конструкция, високата чувствителност и ниската цена на производство. В основата на тяхната технологична реализация обаче стои преди всичко подготовката на стабилни суспензии от метални, в частност златни, наночастици, които да бъдат подходящо функционализирани с макромолекули или полимери (например протеини, нуклеинови киселини и пр.), така че впоследствие да бъдат използвани като аналитичен инструмент за колориметричен спектрален анализ. В настоящата глава от дисертацията са описани удобни експериментални методи, които водят до възпроизводима процедура на синтез на функционализирани с белтъци (в частност, белтъците BSA и азоказеин) златни наночастици. При тази процедура се създават условия, стабилизиращи суспензията от златни наночастици чрез оптимизиране на концентрацията на протеина. Като пример на Фиг. 4.1А са дадени UV-VIS спектрите, съответно на протеина BSA (молекулната му структура е дадена на Фиг. 4.1В), на златни наночастици, синтезирани по метода на Turkevich, и съответно спектърът им, получен след тяхната модификация с протеина, а на Фиг. 4.1С е дадена снимка на тяхната суспензия.

Също така в настоящата глава от дисертацията е предложен и концептуален подход с използване на модифицирани с азоказеин златни наночастици, който би могъл да се приложи като тест на ензимната активност на протеази, в частност е даден пример с протеолитичното действие на протеаза К.

Като експериментални подходи за изучаване на ензимната реакция са проведени спектрофотометрични изследвания, при което са анализирани отместванията в максимумите на повърхностния плазмонен резонанс. В допълнение на тези изследвания за охарактеризиране на морфологията и размера на функционализираните с азоказеин златни наночастици са направени AFM изображения на топографията на образци, които са взети в началото и в края на протеолитична ензимна реакция, катализирана от протеаза К.



**Фиг. 4.1.** (A) Абсорбционни UV-VIS спектри на протеина BSA, на златни наночастици, синтезирани по метода на Turkevich, и на златни наночастици след тяхната модификация с протеина. (B) Молекулната структура на BSA. (C) Снимка на разтвор от златни наночастици, модифицирани с BSA.

Основна задача на настоящите изследвания е да се предложи една опростена и възпроизводима процедура за функционализиране на метални (в частност, златни) наночастици, която впоследствие да се разработи като протоколна процедура за определяне на ензимна активност. Като първа стъпка е включен класическият синтез на златни наночастици, предложен от Turkevich, тъй като чрез него се получава стабилна суспензия от монодисперсни златни наночастици със среден размер на частиците около  $20\text{ nm}$ . Като втора стъпка, свързана с функционализирането на златните наночастици, е намирането и създаване на подходящи физикохимични условия на колоидния разтвор (рН, йонен състав, температура и пр.), които да осигурят „покриване“ на повърхността на частиците със слой или обвивка от протеин (BSA, или азоказеин). За да бъдат контролирани процесът и условията на провеждане на функционализацията, се снемат абсорбционни спектри на всеки един от двата етапа. Идеята е, че при модификацията на златните частици с азоказеин се очаква получаване на специфично отместване на плазмонния им абсорбционен максимум при  $520\text{ nm}$ , заедно с промени в други характеристични абсорбционни максимуми, като например отместване на абсорбционния максимум на азоказеина при  $340\text{ nm}$ . Впоследствие, за да бъде реализиран тестът за ензимна активност, се очаква, че при добавяне на протеаза К, която катализира специфично реакцията на хидролиза на повърхностния слой от азоказеин, адсорбиран върху златната наночастица, това да доведе до евентуална промяна на двата

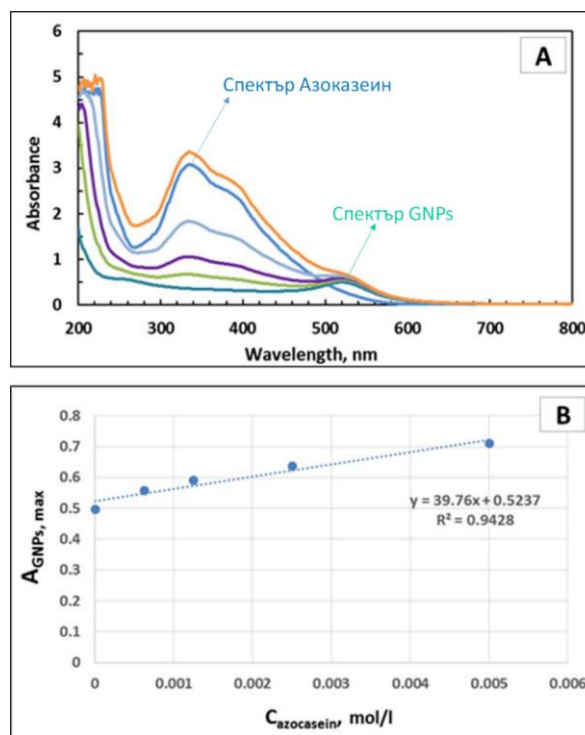


характеристични абсорбционни максимума. Очакванията за подобна промяна на абсорбционния плазмонен максимум (по-вероятно покачване) са свързани с намаляване на дебелината на азоказеиновата обвивка на златните наночастици.

В това изследване като метод за охарактеризиране на размера на частиците преди и след тяхната модификация с азоказеин е включена и Атомно-силовата микроскопия (AFM). Методът е подходящ при охарактеризиране на обекти в нанометричната скала, което означава, че с помощта на AFM промените в размерите на златните частици преди тяхното модифициране с азоказеин и след края на процедурата трябва да бъдат отчетени в рамките на експерименталната грешка на метода, която е около  $0.1 \text{ nm}$ .

## 2.2. Експериментални резултати и анализ

На Фиг. 4.2 са представени UV-VIS абсорбционни спектри на златни наночастици преди и след тяхното функционализиране с азоказеин.



**Фиг. 4.2.** (A) Сравнение между абсорбционни спектри със специфични характеристични максимума: Разтвор на чист азоказеин ( $340 \text{ nm}$ ), златни наночастици – чист разтвор ( $520 \text{ nm}$ ) и функционализирани с различни концентрации на азоказеин. (B) Абсорбционният максимум на интензитета на функционализираните наночастици като функция на концентрацията на азоказеин.

Златните частици, които са синтезирани по метода на Turkevich преди тяхното функционализиране, са с диаметър около 20 nm и с абсорбционен максимум при 520 nm<sup>1</sup>. Съответно абсорбционният максимум на азоказеина се наблюдава при 340 nm. Абсорбционните максимуми в спектрите, съответно на нефункционализираните златни наночастици и на азоказеина, са обозначени със стрелки на Фиг. 4.2А.

Анализирайки плазмонните максимуми при 520 nm от спектрите на Фиг. 4.2А и нанасяйки техните стойности като функция на концентрацията на азоказеина, която е използвана за функционализация на златните наночастици (Фиг. 4.2В), се забелязва, че при процеса на функционализирането им интензитетът на UV-VIS плазмонните максимуми нараства пропорционално на нарастването на концентрацията на азоказеин, следвайки линейна зависимост. Като се използва законът на Беер, може да се запише следната очевидна зависимост:

$$A_{GNPs} = A_{azocasein} + A_{GNPs}^0 = \varepsilon C_{azocasein} + A_{GNPs}^0 \quad (4.1)$$

В уравнение (4.1)  $A_{GNPs}$  е пълният абсорбционен максимум на функционализираните златни наночастици, съдържащи обвивка от молекули на азоказеин, а общата им концентрация в разтвора е  $C_{azocasein}$ . При отделните експерименти тази концентрация е варирана в границите от  $0.8 \times 10^{-3}$  до  $5 \times 10^{-3} \frac{mol}{l}$ . Очевидно е, че след като експерименталните данни (точките от Фиг. 4.2В) се интерполират с линейна зависимост по метода на най-малките квадрати и се направи сравнение с израза (4.1), то  $A_{GNPs}^0$ , ще бъде отрезът на линейната зависимост и ще съответства на стойността на плазмонния максимум на златните частици без азоказеинова обвивка, т. е. преди тяхната функционализация, а наклонът на експериментално получената линейната зависимост, сравнена с (4.1) може да се получи за моларния абсорбционен коефициент на азоказеина, стойност  $\varepsilon = 39$ , която е близка на стойността  $\varepsilon = 38$  от литературни данни<sup>2</sup>.

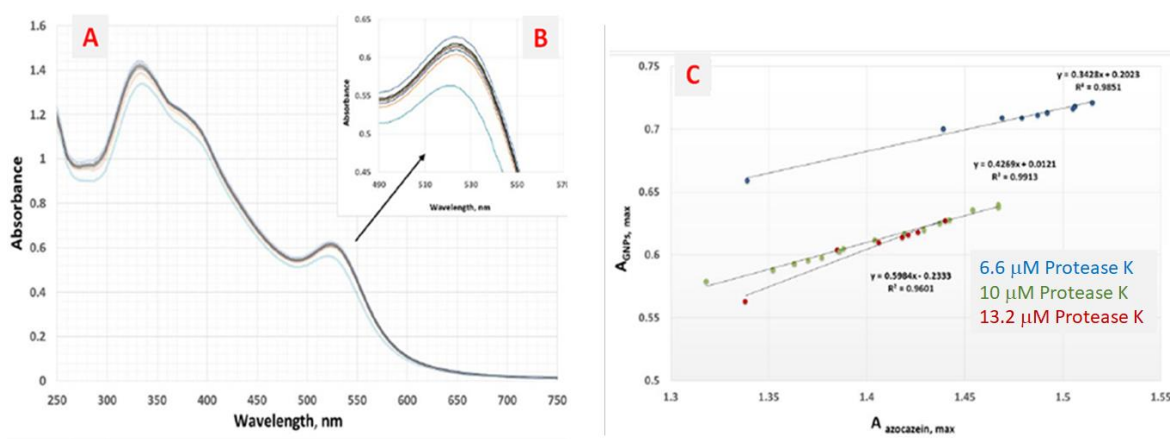
Като следваща стъпка в настоящото изследване се предлага да бъде намерен експериментален подход, който да позволи модифицираните с азоказеин наночастици да бъдат приложени за анализ на каталитичната активност на протеази. За целта в разтвора от функционализираните златни наночастици се добавя протеаза (в настоящото изследване е използвана протеаза К), чийто субстрат е обвивката на наночастиците. В хода на

<sup>1</sup> P. Georgiev, A. Vojinova, B. Kostova, D. Momekova, T. Bjornholm, K. Balashev, Colloid Surf. A, 434, 154 (2013).

<sup>2</sup> J. Charney, J. Biol. Chem. 171, 501 (1947).

хидролизата на тази обвивка под действие на протеазата се очаква да бъдат наблюдавани промени в плазмонния максимум на златните частици. Затова на Фиг. 4.3А са представени спектрите, които са измерени в хода на ензимо-каталитичната реакция, през определени интервали от време след прибавянето на ензима протеаза К към разтвора на модифицираните с азоказеин златни наночастици. От спектрите, представени по-детайлно на Фиг. 4.3В, можем лесно да се убедим с нарастването на интензитета на плазмонния абсорбционен максимум при 520 nm. Най-вероятното обяснение на това нарастване на спектрите е свързано с „изтъняване“ на протеиновата обвивка на златните наночастици, като то трябва да се дължи единствено на протеолитичното разграждане на азоказеиновата обвивка на златните наночастици под каталитичното действие на протеаза К.

Същевременно от спектрите се регистрира и нарастване на абсорбционния максимум на азоказеина при 340 nm, което може да бъде обяснено като резултат на освобождаването на азо-багрилото в хода на ензимно-каталитичната реакция. Това, всъщност е и един добре известен принцип, заложен в класическите тестове за определяне на протеазна активност<sup>3</sup>. Интересно е да се отбележи линейната корелация между интензитетите на двата максимума, което е представено на графиката на Фиг. 4.3С.



**Фиг. 4.3.** (А) Нарастването на абсорбционния максимум (340 nm и 520 nm) след прибавянето на протеаза К с концентрация 2 mg/ml и получаване към разтвора на функционализираните с азоказеин златни наночастици и получаване на съответните крайни концентрации на ензима. (В) Графично увеличение на нарастването на плазмонния максимум на златните наночастици. (С) Линейната зависимост между интензитета на плазмонния максимум при 529 nm с максимум за азоказеин при 340 nm.

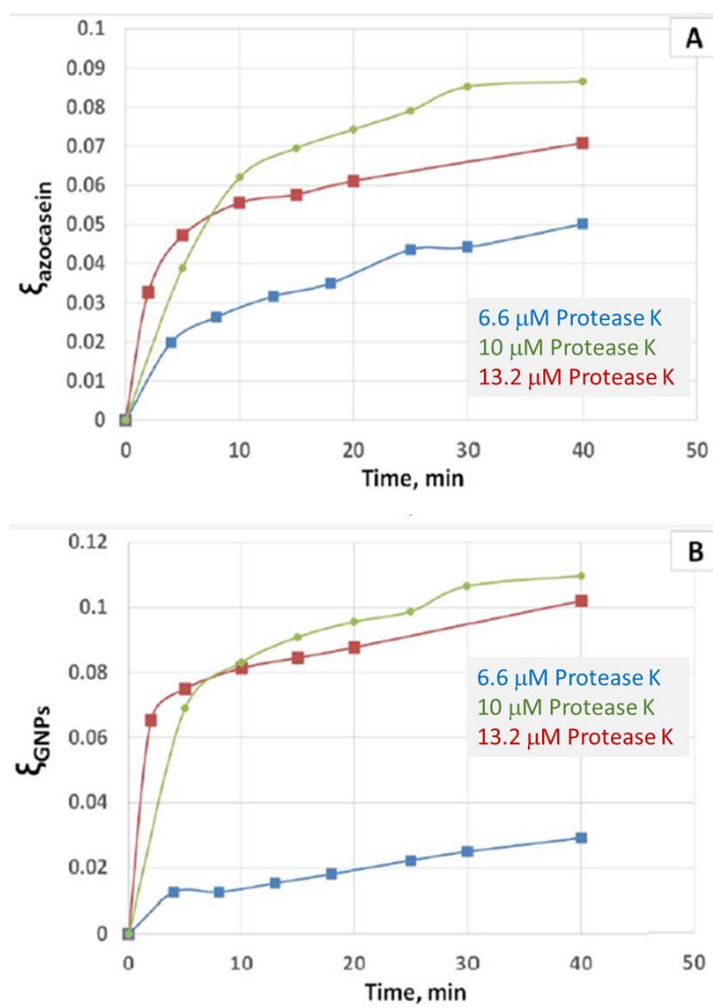
<sup>3</sup> Димитър Колев. Ензимология. Издателство „Наука и изкуство“ (1988).

За изучаването на ензимната кинетика, след добавянето на протеаза К към суспензията от модифицирани с азоказеин златни наночастици, плазмонните максимуми и максимумите в абсорбционните спектри на азоказеина се отчитат през определен интервал от време. Прилага се формулата:

$$\xi_i = \frac{A(t)_i - A(0)_i}{A(\infty)_i} \quad (4.2)$$

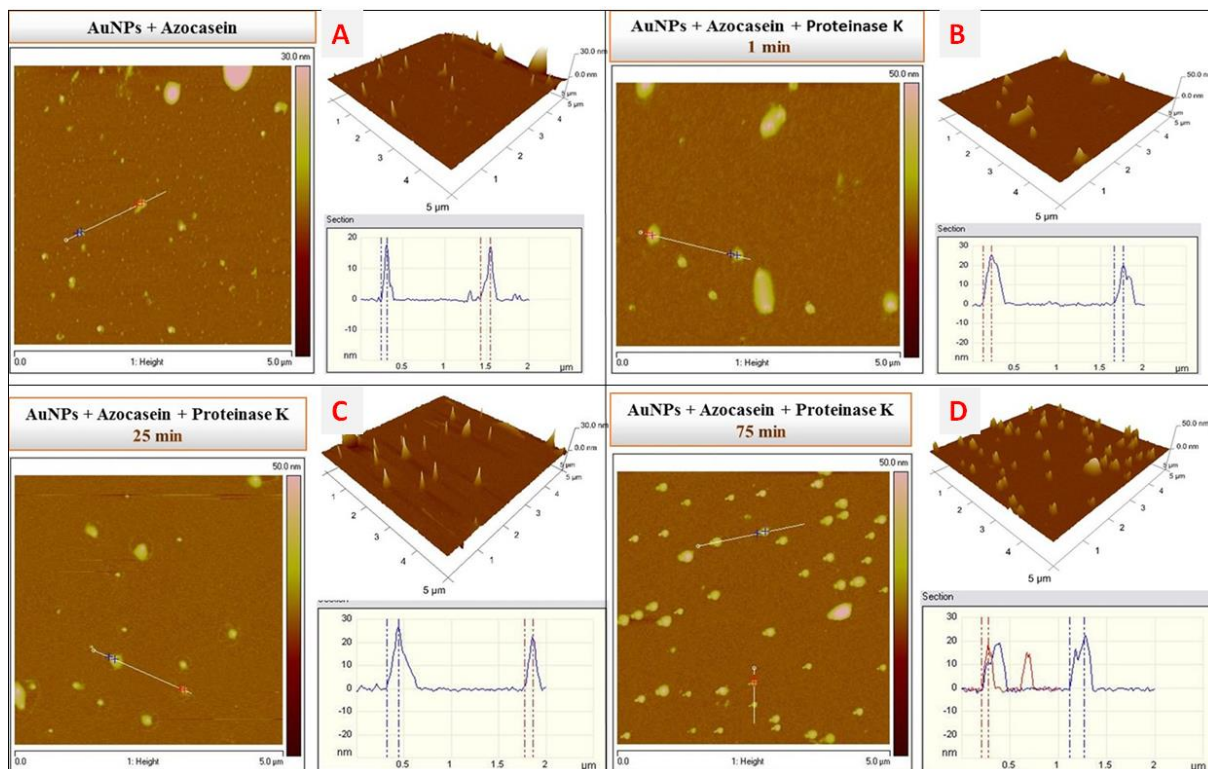
максимум в началния момент  $t_0$  (момента точно преди добавянето на протеаза К) и  $A(\infty)_i$  е абсорбционният максимум в края на протеолитичната реакция (при  $t = 40 \text{ min}$ ).

Кинетичните криви на ензимната реакция, които са обработени, като е приложена формула (4.2), за три отделни експеримента, проведени с различни концентрации на ензима протеаза К, са представени на Фиг. 4.4. От хода на кинетичните криви се вижда, че техният ход следва характерна зависимост с първоначално нарастване на  $\xi_i$ , след която в края на реакцията се наблюдава насищане и достигане на сравнително постоянна стойност в границите на експерименталната грешка. Освен това от графиките на Фиг. 4.4 може ясно да се види, че наклоните на кривите  $\xi_i = \xi(t)_i$ , които в началните моменти са приблизително линейни, нарастват пропорционално с нарастване на концентрацията на ензима, което води до извода, че при по-голямата ензимна концентрация имаме по-голяма скорост на ензимната реакция. Това е само една качествена оценка на кинетичните криви, тъй като по-конкретната количествена интерпретация изисква допълнително познаване и намиране на теоретична зависимост на плазмонния максимум от дебелината на азоказеиновата обвивка, механизма на действие на протезата върху протеиновия слой и пр.



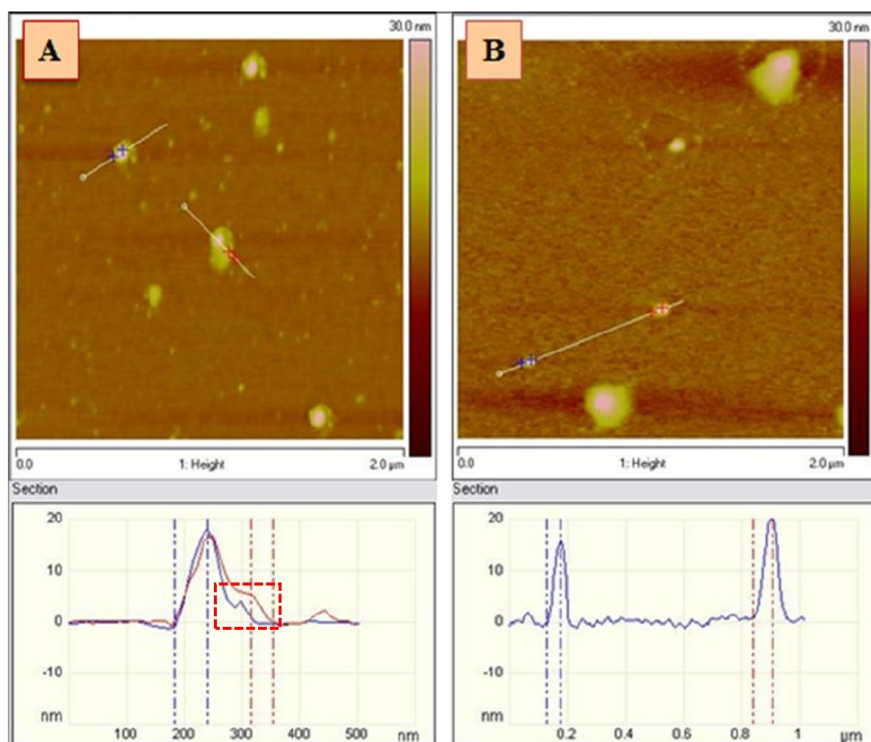
**Фиг. 4.4.** Нормализирани съгласно (4.2) кинетични криви на действието на протеаза К, получени съответно от (А) абсорбционния максимум на азоказеина azocasein при 340 nm и (В) плазмонния максимум на златните наночастици при 520 nm. На графиките са представени и крайните концентрации на протеаза К след добавянето ѝ от разтвор с концентрация 2 mg/ml, към реакционната смес (суспензията от модифицирани с азоказеин златни наночастици).

С цел да се охарактеризират морфологичните промени на модифицираните с азоказеин златни наночастици в началото (преди прибавянето на протеаза К), в хода и в края на ензимната реакция, е използван AFM. Идеята на това изследване е опит с помощта на методиката да се установи евентуално намаляване на размера на азоказеиновата обвивка. На Фиг. 4.5 са представени типични двумерни и тримерни топографски изображения на златни наночастици, отложени на слюдена подложка, при които образците са вземани в хода на ензимо-каталитичната реакция (преди добавянето на протеаза К (Фиг. 4.5А, на 1, 25 и 75 min след добавянето на ензима, съответно Фиг. 4.5В, С, D). На фигурата също са представени и разрезни профили, с които са охарактеризирани размерите на златните частици.



**Фиг. 4.5.** Двумерни и тримерни AFM топографски изображения на златни наночастици, отложени на слюдена подложка (A) преди добавянето на протеаза К; (B) на 1 min, (C) на 25 min, (D) на 75 min след добавянето на ензима. Към снимките са добавени и разрезни профили, с които са охарактеризирани размерите на златните частици.

Размерите на наночастиците в началото на реакцията са около  $22 \pm 2 \text{ nm}$ , а в края на реакцията са  $18 \pm 2.5 \text{ nm}$ . В хода на реакцията обаче е трудно да се направи категорично заключение за намаляване на размера им, тъй като липсват достатъчно статистически данни за такава една оценка. Поради тази причина ще се съсредоточим в анализа на AFM изображенията, получени преди началото на ензимо-каталитичната реакция и в нейния край. За целта са представени на Фиг. 4.6 две такива топографски изображения, в допълнение на които е представен и съответният разрезен анализ.

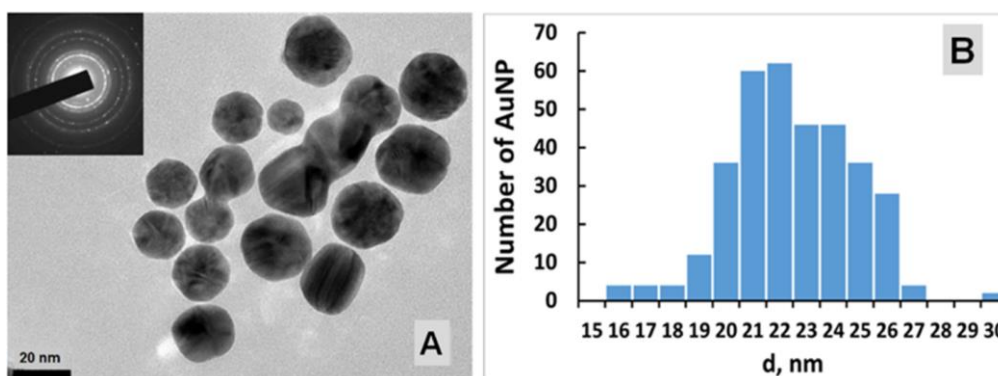


**Фиг. 4.6.** Двумерни AFM топографски изображения на златни наночастици, отложени на слюдена подложка (A) преди добавянето на протеаза К; (B) в края на ензимо-каталитичната реакция. Към снимките са добавени и разрезни профили, с които са охарактеризирани размерите на златните частици.

При сравнението на двете AFM изображения и от придружаващия ги разрезен анализ се наблюдават някои различия. Така например на Фиг. 4.6А в топографията на повърхността на пробата, получена преди добавянето на протеаза К, се наблюдават областите (например такава област е обозначена с пунктир на профила, даден към Фиг. 4.6А), чиито височини са от порядъка на около 5 nm, което е сравнимо с размерите на протеиновите молекули. Това позволява да се допусне, че това са области, които вероятно са формирани от частичната адсорбция на азоказеиновата обвивка върху слюдената повърхност. На AFM снимката, получена от образец в края на ензимо-каталитичната реакция (Фиг. 4.6В) такива области не се наблюдават, което вероятно се дължи на обстоятелството, че протеиновата обвивка на наночастиците е била хидролизирана под действието на протеазата. Размерът на златните наночастици, както беше отбелязано, преди началото на ензимната хидролиза е около 20 nm в началото и малко по-малък, около 18 nm, в края на реакцията.

С цел да бъдат сравнени данните за морфологията на златните наночастици получени от измерванията с AFM са приготвени образци и е използван TEM за получаване на размера на наночастиците със и без BSA.

На Фиг. 4.7А е представена TEM снимка на златни наночастици с висока разделителна способност, която позволява лесното охарактеризиране на златните наночастици по форма и размер. Преобладаващата форма на златните частици е сферична, но се наблюдават и по-малък брой частици с триъгълна и хексагонална форма. На хистограмата, получена от анализа на TEM данните е дадено и разпределението на броя на наночастиците по диаметър  $d$ . Статистиката се основава на измерванията на повече от двеста наночастици и разпределението е типично логнормално със среден диаметър на частиците около  $22 \pm 1.5 \text{ nm}$  (Фиг. 4.7В).

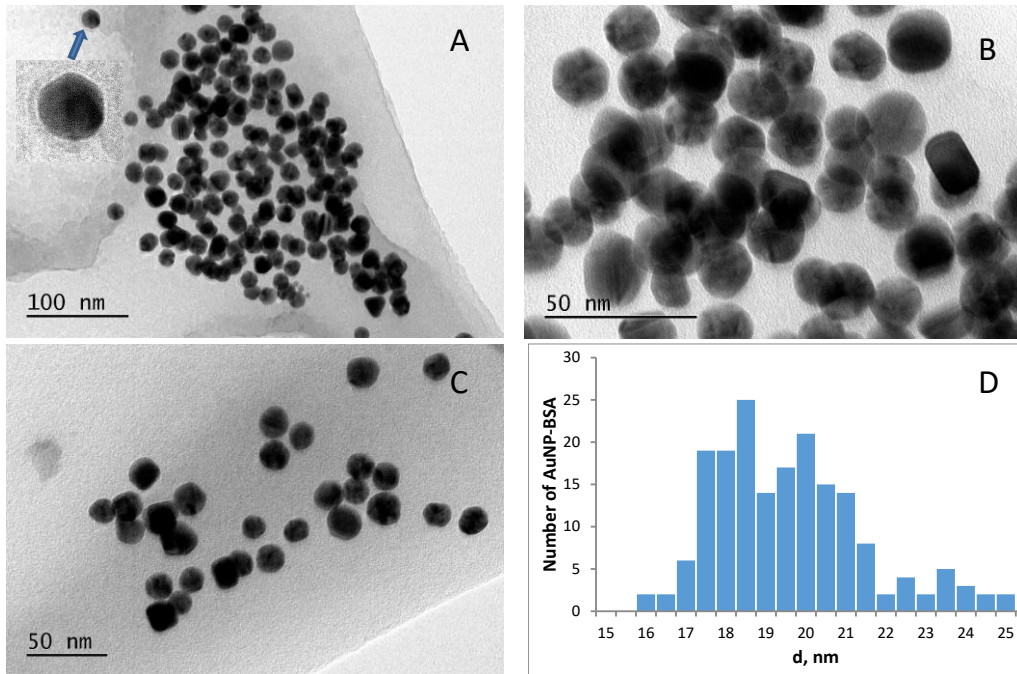


**Фиг. 4.7.** (А) TEM снимка на златни наночастици, синтезирани по цитратния метод в края на реакцията (вмъкнатата снимка е от електронната дифракция от наночастиците). (В) Хистограма на разпределение по размер на наночастиците (от TEM снимки).

На Фиг. 4.8А, В и С са представени TEM снимки на златни наночастици, функционализирани с BSA. На снимките се наблюдава, че повечето от частиците имат форма много близка до сферичната и са с еднакъв размер, т. е. те са монодисперсни. Също така обаче и тук също се наблюдават малък брой частици с хексагонална форма. На TEM снимките на златните наночастици, функционализирани с BSA, ясно се наблюдава и наличието на протеиновата обвивка. След анализа на TEM снимките, като за целите на статистическия анализ са измерени диаметрите на повече от триста златни наночастици, е получено разпределение по техния размер, представено на Фиг. 4.8D. На тази хистограма е даден броят на анализирани от TEM снимки наночастици с измерен диаметър  $d$ . От сравнението на разпределенията по размер на Фиг. 4.7В и Фиг. 4.8D се вижда разликата в диаметрите на златните наночастици, синтезирани по класическия



цитратен метод, и тези, които впоследствие са функционализирани с BSA. В този случай на функционализирани с BSA златни наночастици в обемна фаза ясно се вижда тяхната висока полидисперсност.



**Фиг. 4.8.** (A), (B), (C) TEM снимки на златни наночастици, функционализирани с BSA, с различни увеличения (със стрелката е показана единична частица, на която се наблюдава протеиновата обвивка); (D) разпределение по размер на наночастиците.

#### 4.3. Обобщение на резултатите

Така получените резултати могат да бъдат обобщени със следните основни точки, описващи извършената експериментална работа и анализ на данните:

- Предложената е опростена и възпроизводима процедура за биофункционализиране на златни наночастици с азоказеин, чиито свойства са изследвани с методите на UV-VIS спектроскопия, AFM и TEM.
- Така получените златни наночастици, покрити с азоказеин, са използвани за субстрат на ензима протеаза K, като количествените данни за ензимната кинетика са получени с помощта на UV-VIS спектроскопия.
- С AFM са охарактеризирани морфологичните промени в хода на ензимната реакция.

### 3. Синтез на златни наночастици в организирана молекулна система – монослой

#### 3.1. Основни цели на изследването

През последните десетилетия зародишообразуването и растежът на метални наночастици във водни разтвори се изследват особено активно<sup>4,5,6</sup>. Предлагат се разнообразни методи за проследяването на формирането на подобни наноструктури, а също и за описание на кинетичните механизми свързани с формирането и растежа на металните наночастици. Сред най-популярните и приложими експериментални методи са спектрофотометрията, динамичното лазерно светоразсейване, рентгеновата спектроскопия и много други<sup>7,8</sup>. Същевременно голям брой теоретични модели се опитват да опишат с подходящия за целта математически апарат молекулните механизми, по които се образуват и растат металните наночастици<sup>9</sup>. Сред тези модели, като един от най-утвърдилите се и често цитирани в литературата, а също така и приложим за целта на настоящите изследвания модел, е този на Finke – Watzky или накратко F-W модел<sup>10,11</sup>. При него се дефинират два ясно разграничени етапа – първият се изразява в бавното образуване на златни зародиши, а вторият е свързан с бърз автокаталитичен растеж на златни наночастици.

Приложимостта на F-W модела е демонстрирана<sup>12,13</sup> при изследване кинетиката на растеж на златни наночастици, синтезирани по метода на Turkevich. Експерименталните данни, използвани в тези изследвания, са получени чрез проследяване на интензитета на плазмонните максимуми, измерени със спектрофотометричния метод, а също така и чрез анализиране на размера и формата на частиците в хода на техния растеж с помощта на Атомно-силова микроскопия. Комбинацията на тези два експериментални подхода позволява да се проследи нарастването на златните наночастици в хода на синтеза им и да се определят

---

<sup>4</sup> R. G. Finke, in D. L. Feldheim, C. A. Foss Jr. (Eds.), *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications*, Marcel Dekker, New York, 2001 (Chapter 2).

<sup>5</sup> M. A. Watzky, E. E. Finney, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (36) (2008) 11959–11969.

<sup>6</sup> J. Polte, *CrystEngComm* 17 (36) (2015) 6809–6830.

<sup>7</sup> K. Paclawski, B. Streszewski, W. Jaworski, M. Luty-Błocho, K. Fitzner, *Colloids Surf.: Physicochem. Eng. Aspects* 413 (2012) 208–215.

<sup>8</sup> M. Wuthschick, A. Birnbaum, S. Witte, M. Sztucki, U. Vainio, N. Pinna, K. Rademann, F. Emmerling, R. Kraehnert, J. Polte, *ACS Nano* 9 (7) (2015) 7052–7071.

<sup>9</sup> E. E. Finney, R. G. Finke, *J. Colloid Interface Sci.* 317 (2) (2008) 351–374.

<sup>10</sup> M. A. Watzky, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (43) (1997) 10382–10400.

<sup>11</sup> A. M. Morris, M. A. Watzky, J. N. Agar, R. G. Finke, *Biochemistry* 47 (8) (2008) 2413–2427.

<sup>12</sup> P. Georgiev, A. Bojinova, B. Kostova, D. Momekova, T. Bjornholm, K. Balashev, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 434 (2013) 154–163.

<sup>13</sup> P. Georgiev, S. Simeonova, A. Chanachev, L. Mihaylov, D. Nihtianova, K. Balashev, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 494 (2016) 39–48.

кинетичните константи по F-W модела. Тези резултати също така показват, че Атомно-силовата микроскопия може да бъде използвана, както за охарактеризиране на получените в хода на синтеза на Turkevich златни наночастици, но също така и да бъде удобен експериментален инструмент за изследване на кинетиката на химични реакции и за определянето на различни физикохимични параметри на кинетичната система.

Златни наночастици, функционализирани с Bovine serum albumin (BSA), се смятат за едни от най-подходящите носители на лекарства при тяхното освобождаване в организма. В съвременната литература има примери и данни за златни наночастици, които са били модифицирани с BSA и успешно приложени като експериментална система за лекарствени носители<sup>14</sup>. Макар и перспективни, трудностите с приложимостта на тези нови методи са свързани с контрола на оптичните, каталитичните и електронните свойства на златните наночастици, които са пряко свързани с размера и формата на наночастиците. Това от своя страна поражда и необходимостта от най-пълно и систематично разбиране на процеса на тяхното образуване.

Ето защо в настоящата дисертация се предлага един нов подход, който използва като моделна система Лангмюировия монослой, формиран на граничната повърхност вода/въздух. Тази двумерна молекулна система, в която всяка амфифилна молекула от монослоя на граничната повърхност вода/въздух може да участва във взаимодействия с металните йони от водната фаза и съответно да води до формиране на зародиш и растеж на металните наночастици, е контролирана както от физични, така и от химични фактори<sup>15</sup>. Включването на метални йони в монослоя, при взаимодействието им с изразждащите го молекули, протича на граничната повърхност вода/въздух, като това става в близост до полярната част на амфифилната молекула<sup>16</sup>. Този молекулен механизъм е предложен от Swami et al.<sup>99</sup>, като авторите на това изследване предполагат, че формирането на наночастиците или други структури с подобни наноразмери, възниква непосредствено под монослоя, в присъствие на силни оксидиращи агенти, точно такива каквито са сребърните и златните йони. Впоследствие окислението на амфифилните групи води до получаване на наночастици<sup>17</sup> или други наноструктури<sup>18</sup> под самия монослой.

---

<sup>14</sup> P. Khullar, V. Singh, A. Mahal, P. N. Dave, S. Thakur, G. Kaur, J. Singh, S. S. Kamboj, M. S. Bakshi, J. Phys. Chem. 116 (2012) 8834–8843.

<sup>15</sup> B. M. Rybak, M. Ornatska, K. N. Bergman, K. L. Genson, V. V. Tsukruk, Langmuir 22 (3) (2006) 1027–1037.

<sup>16</sup> A. J. Chung, M. F. Rubner, Langmuir 18 (4) (2002) 1176–1183.

<sup>17</sup> A. Swami, P. R. Selvakannan, R. Pasricha, M. Sastry, J. Phys. Chem. B 108 (50) (2004) 19269–19275.

<sup>18</sup> A. Swami, A. Kumar, P. R. Selvakannan, S. Mandal, R. Pasricha, M. Sastry, Chem. Mater. 15 (1) (2003) 17–19.

За изучаването на тези структури, както и на промените, които те търпят в хода на зародишообразуването и растеж, като моделни системи се използват монослоеве или Лангмюир-Блоджет филми. Като най-популярни и приложими експериментални методики се използват различни методи за рентгеноструктурен анализ. Един от съвременните методи от този тип *in situ* метод е дифракционният рентгеноструктурен анализ при малки ъгли на облъчване (т. нар. *GID-grazing – incidence X-ray diffraction*), който е успешно приложен за изучаването на процесите на зародишообразуване и растежа на златни наночастици в октадеканетиолни монослойни структури<sup>19</sup>. Други рентгеноструктурни изследвания използват октадециламинови LB-филми, които в процеса на формиране на златните наночастици, са били пренесени от границата вода/въздух върху твърди подложки<sup>20</sup>.

Въпреки големия брой публикации за използването на монослоеве като „редукционни подложки“ при синтеза на наночастици на граничната повърхност вода/въздух, механизмът на образуване на зародишите и растеж на самите частици е до голяма степен неизследван. Сериозен научен интерес представлява изясняването на повърхностната организация на самата редукционна реакция, както и по какъв начин тази молекулна организация определя и контролира процеса на нарастване на частиците. За целта в настоящия дисертационен труд се предлага експериментален подход за изучаване на кинетиката на повърхностен синтез на златни наночастици и използване на един модифициран кинетичен F-W модел. Основната идея при него е наночастиците да се образуват и растат в монослойната среда, формирана от 4-хексадециланилин (HDA) или Bovine serum albumin (BSA), на граничната повърхност вода/въздух, като водната подложка (течната фаза) е воден разтвор на тетрахлорзлатна киселина. Появата на златните зародиши и техният растеж се следят и контролират, като се следят промените в свойствата на монослоя чрез измерване на промяната на повърхностната площ ( $\Delta A$ ) с времето ( $t$ ), при поддържане на постоянни стойности за повърхностното налягане ( $\pi$ ), т.е. при тези експерименти се измерват стойностите на  $\Delta A(t)_{\pi}$ . Едновременно, след прехвърляне на монослоя върху твърда подложка, с използването на Лангмюир-Блоджет техника и впоследствие анализ на получените LB филми, са определени размерът и формата на златните наночастици чрез Атомно-силова микроскопия.

---

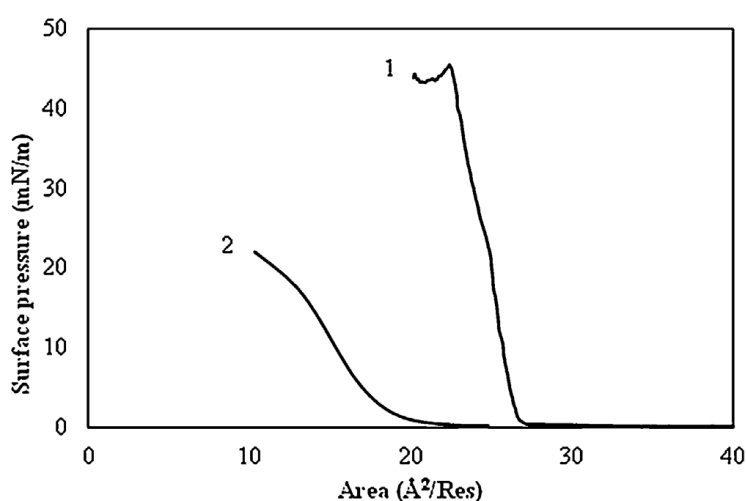
<sup>19</sup> Ahmet Uysal, Benjamin Stripe, Binhua Lin, Mati Meron, Pulak Dutta, Phys. Rev. Lett. 107 (2011) 115503.

<sup>20</sup> Sarathi Kundu, Anindya Das, Chem. Phys. Lett. 508 (2011) 80–85.

Предложената монослойна система има няколко предимства. На първо място, това е по-добрият контрол върху физикохимичните свойства на реакцията на редукция, която протича на границата вода/въздух, като например имаме стриктен контрол върху повърхностната концентрация и съответно върху повърхностната организация на двата компонента HDA (или BSA), степента на разгръщане на молекулите на BSA и съответно броят на молекулните центрове, включени в самото взаимодействие и процеса на редукция, и т. н. На второ място, това е ясното разграничение между двете последователни фази, едната на образуване на зародиши, а втората на техния растеж. Не на последно място, монослойната система дава една уникална възможност за синтезиране на метални наночастици чрез използване на неразтворим редукционен агент, каквито са HDA и BSA, а също така всяка друга подходяща за тази цел амфибилна молекула.

### 3.2. Експериментални резултати

Изотермите повърхностно налягане ( $\pi$ ) – площ ( $A$ ) са получени по описания в глава 3.2.5 (Материали и методи) начин, като монослой се формира чрез нанасяне на малко количество от органичен разтвор на амфибилното съединение и след това посредством подвижната бариера на стандартна тefлонова вана се свива с бавна и постоянна скорост. Две типични изотерми, съответно на монослой от HDA и BSA, са представени на Фиг. 5.1.

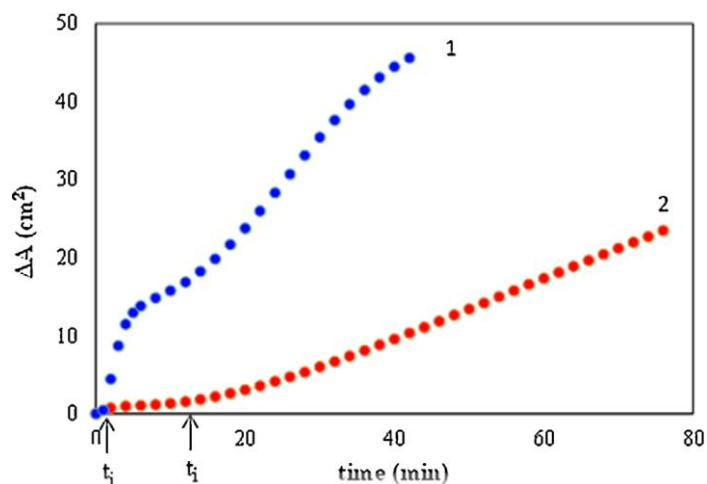


**Фиг. 5.1.** Изотерми повърхностното налягане ( $\pi$ ) – молекулна площ ( $A$ ) за монослой от HDA (крива 1) и за BSA (крива 2).

Зависимостта  $\pi(A)$  за монослой от HDA представлява типична изотерма на течнокондензиран монослой, чийто колапс е ясно разграничим при стойност на повърхностното налягане  $\pi_c \approx 43 \text{ mN/m}$ . Съответно от изотермата може да се определи, че плътна опаковка на монослой е при около  $\pi \approx 5 \text{ mN/m}$ . На същата фигура (крива 2) е нанесена зависимостта  $\pi(A)$  за монослой от BSA. Инфлексната точка при  $\pi(A)$  изотермата съответства на плътната опаковка на монослой при  $\pi \approx 10 \text{ mN/m}$ , при която стойност може да се определи площта, падаща се на аминикиселинен (АК) остатък на повърхността на монослой –  $A \approx 15 \frac{\text{\AA}^2}{\text{АК остатък}}$ .

В проведените кинетичните изследвания е измерено изменението на площта ( $\Delta A$ ) с времето ( $t$ ), като с помощта на баростата на ваната е поддържана постоянна стойност на постоянно повърхностно налягане. Тази стойност за монослой от хексадециланилин (HDA), използван за редуциращ агент, е  $\pi = 5 \text{ mN/m}$ , а при монослой от BSA като редуциращ агент е  $\pi = 10 \text{ mN/m}$ . Постоянните стойности на повърхностно налягане, отново трябва да подчертаем, са избрани от  $\pi(A)$ -изотермите представени на Фиг. 5.1, така че да съответстват на плътна опаковка на молекулите в монослой, съответно от HDA или от BSA, формирани на граничната повърхност вода/въздух.

На Фиг. 5.2 са представени две характерни кинетични  $\Delta A(t)_\pi$  криви, които показват промяната на повърхностната площ с течение на времето при постоянно налягане. Кинетичните криви са получени след инжектирането на разтвор на тетраклорзлатна киселина ( $\text{HAuCl}_4$ ) в началния момент, преди инициране на процеса на зародишообразуване,  $t = 0$ . От двете графики ясно се наблюдава, че малко след инжектирането на прекурсора ( $\text{HAuCl}_4$ ) повърхностната площ започва да расте във времето, което се дължи на протичащите на повърхността процеси на зародишообразуване и съответно растеж на златни наночастици.



**Фиг. 5.2.** Промяната на повърхностната площ  $\Delta A$  като функция на времето ( $t$ ), измерена при постоянно повърхностно налягане  $\pi = 5 \text{ mN/m}$  за монослой от HDA (крива 1), и крива 2 при  $\pi = 10 \text{ mN/m}$  за монослой от BSA, измерени след инжектиране на воден разтвор от ( $\text{HAuCl}_4$ ). Двете времена ( $t_i$ ) (индукционен период), посочени на двете криви, съответстват на началния период, необходим за образуването на критичните зародиши ( $Au_n$ ) и на началото на растежа им.

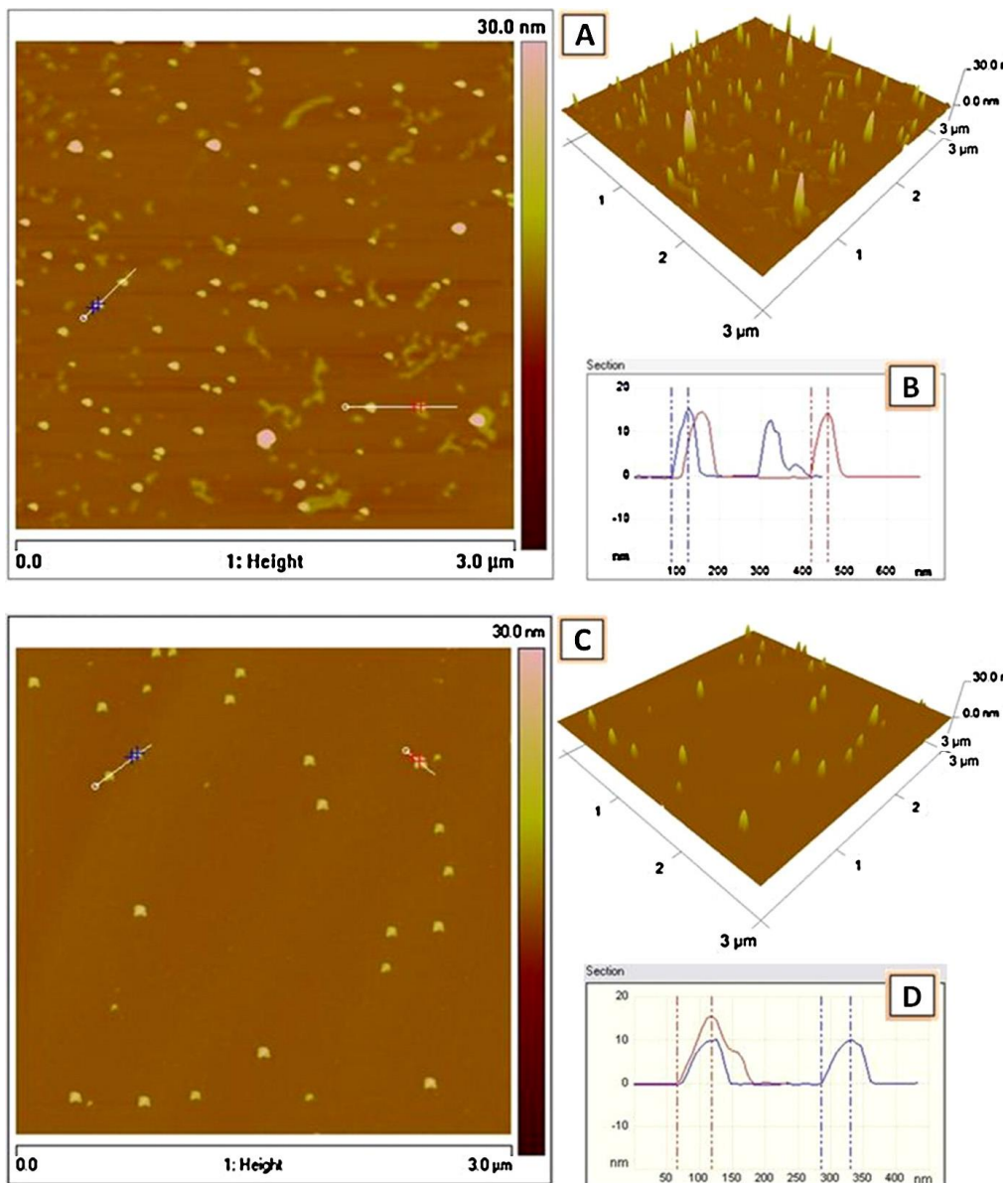
От експериментална гледна точка трябва да отбележим факта, че в случай на монослой от редуциращ агент BSA се наблюдава известно разсейване на експерименталните данни, което не се наблюдава при монослой от HDA. Така както е посочено в литературата<sup>81</sup>, това най-вероятно вероятно се дължи на добре известните трудности, свързани с разтворимостта на белтъците във водни разтвори и съответно възникващите трудности, при нанасянето им на граничната повърхност вода/въздух и формирането на протеинов монослой.

За да бъде визуализирана кинетика на формиране на златните наночастици, е използван AFM. За целта монослоеве се пренасят върху твърди повърхности (в случая това са слюдени подложки) с помощта на Лангмюир-Блоджет техника, при която слюдената подложка се придвижва вертикално през самия монослой. За да се получи „атомно гладка“ и незамърсена повърхност, слюдената повърхност с размери  $10 \times 10 \text{ nm}$  се отцепва непосредствено преди експеримента и се потапя във водната подложка на монослоя. Това също така става и преди да бъде нанесен на повърхността редуциращия агент (BSA или HDA). Като следваща експериментална стъпка следва свиване на монослоя до желаната стойност на повърхностно налягане. След формирането на стабилен повърхностен мономолекулен слой се инжектира прекурсора  $\text{HAuCl}_4$  и в хода на процесите на формиране на златните наночастици се пренасят LB филми, като в хода на този пренос се поддържа постоянна стойност на повърхностното

налягане. За да се поддържа качеството на пренос на LB филмите, се следи така нареченият коефициент на пренос, който представлява отношението на промяната на повърхността на ваната, отнесена към удвоената повърхност на слюдената повърхност, да има стойност близка до 1.

На Фиг. 5.3 са представени като пример две типични AFM изображения, илюстриращи наблюдаваните повърхности. Топографията на тези повърхности е представена на Фиг. 5.3А и Фиг.5.3С с двумерни (2D) и тримерни (3D) AFM изображения на LB филми от златни наночастици, които са синтезирани, съответно в присъствие на редуциращ агент HDA или BSA. И двете изображения са получени при сканиране на LB филми, които са изтеглени на 30 min след инжектирането на прекурсора на синтеза. За анализа на данните от тези изображения чрез т. нар. разрезен анализ са представени и профилите на повърхностите (Фиг. 5.3В и Фиг. 5.3D), от които пък могат да бъдат определени и размерите на самите златни наночастици. По-специално, за интерпретирането на данните и за определяне на диаметъра на златните наночастици е приложен специален подход, който вече е разгледан в дисертационния труд, използвайки за диаметъра на наночастиците само височината на изобразените структури (т. е. само стойността  $z$  от профилите на разрезите на повърхността) и пренебрегвайки вертикалните размери (т. е. размери на профилите по  $X$  и  $Y$ ). От примерите, посочени с Фиг. 3А и Фиг.3С, при анализа на AFM данните са определени типични стойности за диаметъра на синтезираните златни наночастици,  $d = 13.5 \text{ nm}$  за златни наночастици, получени с редуциращ агент HAD, и съответно  $d = 12.2 \text{ nm}$  при редуциращ агент BSA.

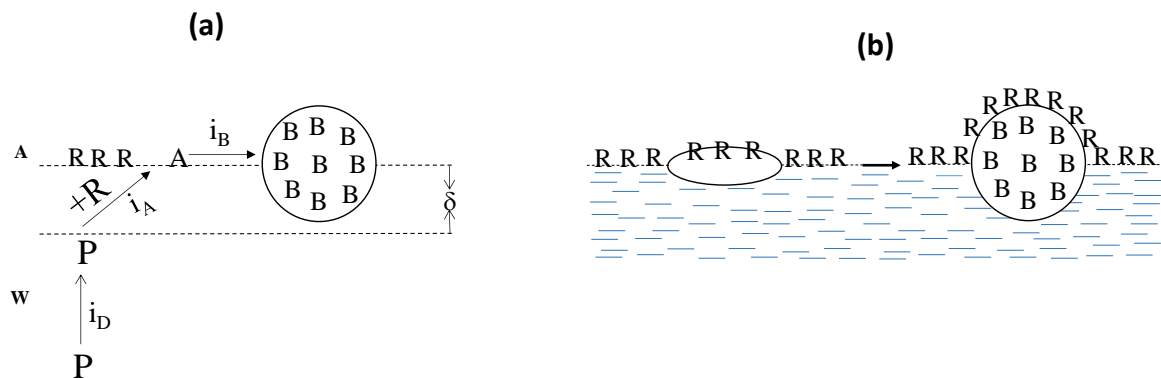




**Фиг. 5.3.** (A) 2D и 3D-AFM изображения на LB филми изтеглени в  $t = 30 \text{ min}$  след инжектиране на прекурсора в подложката на монослой от HDA; (B, D) разрезен анализ на показаните изображения в указаните на снимките места. (C) 2D и 3D-изображения на LB филми изтеглени в  $t = 30 \text{ min}$  след инжектиране на прекурсора в подложката на монослой от BSA. При всички изображения сканираната XY площ е  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , z-30 nm.

### 3.3. Теоретична интерпретация на монослойния модел

На Фиг. 5.4 са представени схематично основните елементи на предложения теоретичен модел на монослой.



**Фиг. 5.4.** (а) Повърхностна организация при образуването на златните наночастици ( $Au^0NPs$ )  $P$  – прекурсор ( $HAuCl_4$ );  $R$  – редуциращи агенти (HDA или BSA);  $A$  – единичен  $Au^0$  атом;  $B$  –  $Au^0$  атом, включен в  $Au^0NPs$  (наночастици);  $i_D$  – дифузионен поток;  $i_A$  – редуциращ поток със скоростна константа  $k_r$ ;  $i_B$  – агрегационен поток на  $A$  в  $B$  (формиращ зародиша със скоростна константа  $k_1$  или по време на нарастването на  $Au^0NPs$  със скоростна константа  $k_2$ );  $\delta$  – дебелина на подповърхностния слой; (б) Геометрична интерпретация на експерименталните данни  $\Delta A(t)_\pi$ .

Отделните процеси и етапи в този модел могат да бъдат формулирани по следния начин:

- Монослой от редуциращ агент  $R$  (HDA или BSA) е нанесен върху воден разтвор от прекурсора за синтеза на златните частици  $P$  ( $HAuCl_4$ ).
- Взаимодействието между  $P$  и  $R$  възниква в подповърхностния слой, който има дебелина ( $\delta$ ), която може да бъде определена от размерите на взаимодействащи си молекули.
- Тъй като процесите на реорганизация, включващи реакцията на редукция и образуването на  $Au^0NPs$ , протичат на граничната повърхност въздух/вода ( $A/W$ ), всички концентрации се изразяват като повърхностни, т. е. или като брой на атомите ( $\Gamma_p$ ,  $\Gamma_A$  и  $\Gamma_B$ ), или на брой на наночастици ( $\Gamma B_n^i$ ) за единица площ. Обемната концентрацията на  $P$  също е преобразувана в повърхностна концентрация чрез очевидната зависимост  $\Gamma_p = C_p \delta$ .

- В процеса на образуване на златните наночастици,  $Au^0$ NPs, повърхностните концентрации на  $R$  и  $P$  се поддържат постоянни. Повърхностната концентрация  $\Gamma_R$  се поддържа постоянна с помощта на баростата на Лангмюировата вана, докато за  $\Gamma_P$  това се осъществява от постоянния дифузионния поток  $i_D$  от обемната фаза.
- В резултат на непрекъснатото разбъркване на водния разтвор на  $HAuCl_4$  дифузионният поток ( $i_d$ ) може да бъде изчислен по уравнението на Fick в стационарното състояние<sup>21</sup>, т. е.  $i_D = D \frac{C_p}{\varepsilon}$ , където  $D$  е дифузионният коефициент на  $HAuCl_4$  молекулите и  $\varepsilon$  е дебелината на слой, който не се разбърква. Получената стойност за  $i_D$  трябва да бъде сравнена с реакционния поток  $i_A$ .
- Индукционното време  $t_i$  съответства на времето, което е необходимо за образуване на критично количество златни зародиши  $Au^0$ , съставени от  $n$  единични  $Au^0$  атоми, а също така това е времето до началото на растежа им, като то също може да бъде определено от експерименталните данни.
- По време на растежа на златните наночастици  $Au^0$ NPs, броят на зародишите остава постоянен, което е в съответствие с общоприетата концепция в модела на Finke – Watzky и е доказана за случай на синтеза на златните наночастици в обема на разтвора им<sup>91</sup>.

Горните предпоставки ни позволяват да опишем кинетиката на зародишообразуване и растеж на златните наночастици в два последователни етапа.

(i) Етап на образуване на зародиша

Следната кинетична система описва етапа на образуване на зародиш при постоянна повърхностна концентрация на прекурсора  $P$  ( $\Gamma_P^0 = const$ ).

$$\begin{array}{l}
 P \xrightarrow{k_r} A \\
 A \xrightarrow{k_1} B \\
 \frac{d\Gamma_A}{dt} = k_r \Gamma_P^0 - k_1 \Gamma_A(t) \\
 \frac{d\Gamma_B}{dt} = k_1 \Gamma_A(t)
 \end{array} \tag{5.1}$$

<sup>21</sup> V. Alahverdijeva, M. Ivanova, R. Verger, I. Panaiotov, Colloids Surf. B: Biointerfaces 42 (1) (2005) 9–20.

След интегриране на горните уравнения в границите от  $t = 0$ , където  $\Gamma_A = \Gamma_B = 0$  до  $t_i$ , (краят на образуване на зародиш) води до изрази за повърхностната концентрация  $\Gamma_A$  на единичен  $Au^0$  атом или повърхностната концентрация  $\Gamma_B$  на атоми, включени в зародиша.

$$\Gamma_A(t_i) = \frac{k_r \Gamma_P^0}{k_1} (1 - e^{-k_1 t_i}) \quad (5.2a)$$

$$\Gamma_B(t_i) = k_r \Gamma_P^0 t_i - \frac{k_r \Gamma_P^0}{k_1} (1 - e^{-k_1 t_i}) \quad (5.2b)$$

За  $k_1 \ll k_r$  и  $e^{-k_1 t_i} \approx 1 - k_1 t_i$  (скоростта на превръщане на А в В е достатъчно малка в сравнение със скоростта на получаване на А),  $\Gamma_B(t_i)$  клони към нула и потокът  $i_A$  изглежда практически неповлиян. Тогава изразът  $\Gamma_A(t_i) = k_r \Gamma_P^0 t_i$  от уравнение (5.2a) може да бъде използван като гранична константа, за да се опише кинетиката на растежа на златните наночастици .

Броят на зародишите за единица площ, които са формирани при време  $t_i$ , остава непроменен през следващия етап и може да бъде определен от уравнение (5.2b), както следва:

$$\Gamma_{B_n}^i = \frac{1}{n} \Gamma_B(t_i) \quad (5.3)$$

където  $n$  е броят на  $Au^0$  атоми , формиращи един зародиш.

Важно е да се отбележи, че уравнение (5.2b) по същество е уравнението за съхранение на веществото, като лявата страна представя количеството на компонента А, който се превръща в компонента В за време  $t$ , докато първият и вторият член в дясната му част дават крайното получено и останало непроменено количество от А.

Както ще се види от разглежданията, които ще бъдат направени и представени по-надолу в текста, стойностите за  $\Gamma_P^0$  и  $\Gamma_{B_n}^i$  при  $t = t_i$  в уравнение (5.2b) могат да бъдат определени и получени по експериментален път. Трябва да отбележим обаче, че проследяването на кинетиката на образуването на зародиш  $\Gamma_{B_n}(t)$  в интервала  $0 < t < t_i$  експериментално е силно затруднена. Стойността на скоростната константа на образуване на зародиша ( $k_1$ ) в посочения интервал може само да бъде оценена от уравнение (5.2b) в един интервал на валидност, заключен между долна граница при  $t_i \leq \frac{1 - e^{-k_1 t_i}}{k_1}$  съответстваща на  $\Gamma_B(t_i) \leq 0$ , което по същество означава, че няма образувани

зародиши и следователно образувани от тях частици и горна граница при  $t_i \geq \frac{1-e^{-k_1 t_i}}{k_1}$ , при която  $\Gamma_B(t_i) = k_r \Gamma_B^0 t_i$ , т.е. всички А (атоми) са се превърнали в В (зародиши). Тъй като обаче и двата гранични случая водят до физически абсурд, то това ни позволява да се оцени  $k_1$  като средна стойност в интервала между тези две граници.

С цел да се сравнят дифузионният ( $i_d$ ) и реакционният ( $i_A$ ) потоци от уравнение (5.2a) е получен следният израз за  $i_A$ :  $i_A(t) \equiv \frac{d\Gamma_A}{dt} = k_r \Gamma_P^0 e^{-k_1 t}$ .

(ii) Етап на растеж

Следната кинетична система описва етапа на нарастването на броя на атомите В, изграждащи растящ зародиш от  $n$  до  $n + j(t)$ :

$$\left| \begin{array}{l} P \xrightarrow{k_r} A \\ A + B_n^i \xrightarrow{k_2'} B_{n+j} \end{array} \right. \quad \left| \begin{array}{l} \frac{d\Gamma_A}{dt} = k_r \Gamma_P^0 - k_2' \Gamma_{B_n^i} \Gamma_A \\ \frac{d\Gamma_B}{dt} = k_2' \Gamma_{B_n^i} \Gamma_A \end{array} \right. \quad (5.4)$$

С предположението, че броят на зародишите за единица площ  $\Gamma_{B_n^i}$  е постоянен, т. е. през този етап нараства само броят на единичните атоми, включени в тях от  $n$  при  $t_i$  до  $n + j$  при  $t > t_i$  и след интегриране в граници от  $t_i$  ( $\Gamma_A = k_r \Gamma_P^0 t_i$ ;  $\Gamma_B = n \Gamma_{B_n^i}$ ) до  $t$  ( $\Gamma_B = (n + j) \Gamma_{B_n^i}$ ) и като вземем под внимание, че  $k_2 = k_2' \Gamma_{B_n^i}$ , получаваме израза за  $j(t) \Gamma_{B_n^i}$ :

$$j(t) \Gamma_{B_n^i} = k_r \Gamma_P^0 [t - t_i e^{-k_2(t-t_i)}] - \frac{k_r \Gamma_P^0}{k_2} [1 - t_i e^{-k_2(t-t_i)}] \quad (5.5)$$

С помощта на така получения израз и от експерименталните данни, представени на Фиг. 5.2, може да се определи  $j(t)$  – брой единични Аи атоми, включващи се в зародишите по време на растежа при  $t > t_i$ .

Интерпретацията на  $\Delta A(t)_\pi$  е направена въз основа на следното геометрично разглеждане, схематично представено на Фиг. (5.4b). Според така предложената геометрична интерпретация се вижда, че нарастването на площта на монослоя в резултат на появата на една златна наночастица с радиус  $r$  е равно на  $\pi r^2$ , тъй като това е

разликата между площите на полукълбо ( $2\pi r^2$ ) и окръжност ( $\pi r^2$ ). От друга страна AFM изображенията ни дават информация за сферичната формата на частиците и съответно ни позволява да оценим техния радиус. Така че броят на частиците за единица площ  $\Gamma_{B_n}$  при  $t \geq t_i$  може да се определи експериментално от  $\Delta A(t)_\pi$  и от AFM данни, като се използва очевидната зависимост:

$$\Gamma_{B_n} = \frac{\Delta A(t)}{A_r \pi r^2(t)} \quad (5.6)$$

където  $A_r$  е площта на реакционното отделение на ваната.

От експерименталните данни  $\Delta A(t)_\pi$ , AFM изображенията, представени на Фиг. 5.3, и използвайки уравнение (5.6) може да се установи, че броят на зародишите за единица площ  $\Gamma_{B_n}^i$ , получени в етапа на нарастването им, остава постоянен. Това от своя страна означава, че по време на растежа е валиден следният израз, необходим за определянето на  $j(t)$ :

$$\Gamma_B(t) = (n + j)\Gamma_{B_n}^i \quad (5.7)$$

където  $(n + j)$  е броят на златните атоми, формиращи златната наночастица по време на етапа на растеж съответно при  $t = t_i$  и  $j = 0$ .

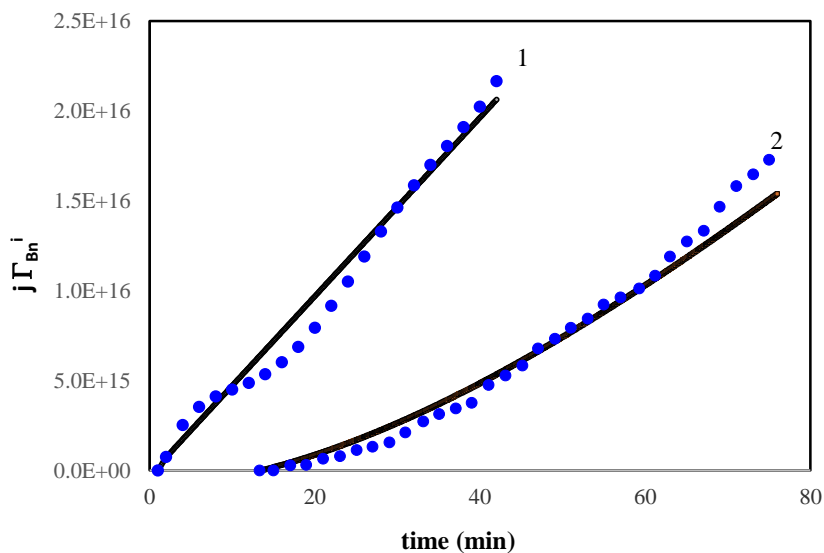
За определянето на  $j(t)$  от експериментално намерения обем на частицата, броят  $n + j(t)$  на  $\text{Au}^0$  атомите, които я изграждат и обема на един  $\text{Au}^0$  атом, взет от кристалографски данни ( $r_{\text{Au}}^0 = 2.04 \times 10^{-8} \text{ cm}$ ), може да се използва следната проста зависимост:

$$V_{NP} = (n + j)V_{\text{Au}^0} \quad (5.8)$$

където  $V_{NP}$  е експериментално наблюдаваният обем на златна наночастица, а  $V_{\text{Au}^0}$  – обемът на  $\text{Au}^0$  атоми, принадлежащи на една златна частица.

### 3.3. Съпоставяне на експерименталните данни $\Delta A(t)_\pi$ и теоретичното предсказание

Теоретичните зависимости за  $j(t)\Gamma_{B_n}^i$ , получени от уравнение (5.5) (с плътна линия) са съпоставени с експерименталните данни (с точки) на Фиг. 5.5 (крива 1 – редуктор HDA, крива 2 – редуктор BSA).



**Фиг. 5.5.** Сравнение на зависимостта  $j(t)\Gamma_{B_n}^i$  от времето  $t$ : крива 1 – редуциращ агент HDA и крива 2-BSA: с точки са представени експерименталните резултати за  $j\Gamma_{B_n}^i(t)$ , получени от  $\Delta A(t)_\pi$  данните, представени на Фиг. 5.2, от AFM измерванията и с помощта на уравнения (5.6) и (5.8); плътната линия – теоретичното предсказание от (5.5). Стойностите за напасващите константи  $k_r$  и  $k_2$  са представени по-нататък в Таблица 1.

Така представените експериментални и теоретични данни демонстрират едно сравнително добро съвпадение между опита и теоретичното предсказание. За всяка от изследваните системи са получени стойности за скоростните константи на образуване на зародишите ( $k_1$ ), на растеж на получените златни наночастици ( $k_2$ ) и на редукция ( $k_r$ ), за дифузионния ( $i_D$ ) и редукционния ( $i_A$ ) потоци и др.

Получените резултати са обобщени в следната таблица:

№	Величини	Означения и измеренията им	Системи	
			HDA/HAuCl <sub>4</sub>	BSA/HAuCl <sub>4</sub>
1.	Индукционно време	$t_i$ [min]	$0.78 \pm 0.3$	$13 \pm 6$
2.	Брой зародиши за единица площ	$\Gamma_{B_n^i}$ [nuclei/cm <sup>2</sup> ]	$(6.8 \pm 0.05) \times 10^{11}$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^{11}$
3.	Брой Au <sup>0</sup> атоми, образуващи един зародиш	$n$ [atoms/nuclei]	$150 \pm 6$	$2285 \pm 55$
4.	Скоростна константа на редукция	$k_r$ [min <sup>-1</sup> ]	$(8.5 \pm 0.3) \times 10^5$	$(5.5 \pm 1.2) \times 10^5$
5.	Скоростна константа на образуване на златни зародиши	$k_1$ [min <sup>-1</sup> ]	$1 \pm 0.1$	$0.01 \pm 0.005$
6.	Скоростна константа на растеж на златни наночастици	$k_2$ [min <sup>-1</sup> ]	$2 \pm 0.5$	$0.02 \pm 0.005$
7.	Максимален брой активни центрове на редуциращите агенти за единица площ	$\Gamma_{max}$ [molecule/cm <sup>2</sup> ]	$4 \times 10^{14}$	$5 \times 10^{14}$
8.	Брой Au <sup>0</sup> -атоми образуващи зародиш за единица площ ( $\Gamma_{B_i} = n\Gamma_{B_n^i}$ )	$\Gamma_{B_i}$ [atoms/cm <sup>2</sup> ]	$2 \times 10^{13}$	$2.3 \times 10^{13}$
9.	Теоретично определен дифузионен поток	$i_D$ [molecule/cm <sup>2</sup> × min]	$1.8 \times 10^{14}$	$1.8 \times 10^{14}$
10.	Максимален редукционен поток на реакцията	$i_A$ [molecule/cm <sup>2</sup> × min]	$1.8 \times 10^{14}$	$2.2 \times 10^{14}$

**Заб.** За да се изследва кинетиката на образуване на златни зародиши и растежа на златни наночастици, константите  $k_r$  and  $k_2$  са използвани като напасващи (fitting) параметри за сравнение между  $\Delta A(t)_\pi$  и AFM измерванията с теоретичното предсказание на уравнение (5.5); Скоростната константа  $k_1$ , заедно със стойностите на  $t_i$ ,  $\Gamma_{B_n^i}$ ,  $n$ ,  $\Gamma_{max}$ ,  $\Gamma_{B_i}$  и стойностите за дифузионния и максималните редукционни потоци ( $i_D$ ,  $i_A$ ) са получени от измерванията  $\pi(A)$ ,  $\Delta A(t)_\pi$  и AFM, като са използвани следните данни:

$$\Gamma_p^0 = 6 \times 10^8 \text{ molec/cm}^2;$$

$$C_p = 1.5 \times 10^{16} \text{ molec/cm}^3; \delta = 4.08 \times 10^{-8} \text{ cm};$$

$$D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}; r_{Au^0} = 2.04 \times 10^{-8} \text{ cm}; \varepsilon = 0.1 \text{ cm}.$$



#### 5.4. Обобщение на резултатите

На базата на представените резултати могат да се направят следните обобщения и заключения.

Предложен е един нов кинетичен модел за синтеза на златни частици, който в същината си използва F-W модела, адаптирайки го за граничната повърхност вода/въздух. На базата на този нов теоретичен подход беше:

- потвърдена общоприетата идея, че броят на златните зародиши остава постоянен по време на фазата на техния растеж;
- установено, че зародишите, които са формирани при реакцията с редуктор BSA, съдържат около петнадесет пъти повече златни атоми, отколкото тези, които са формирани при протичането на синтеза с редуктор HDA;
- установено, че скоростта на редукция е с няколко порядъка по-висока от скоростта на формиране на златните наночастици, докато скоростната константа на етапа на образуване на зародиши е само два пъти по-малка от скоростната константа за процеса на растеж на златните наночастици.
- установено, че образуването на критичен брой зародиши под редуциращото действие на HDA е повече от сто пъти по-бързо в сравнение с действието на BSA като редуциращ агент.
- установено, че скоростта на растеж на златните наночастици, образувани от златните атоми под действието на HDA, е също така сто пъти по-висока, отколкото скоростта на растеж на наночастиците под действието на BSA като редуциращ агент.
- демонстрирано е от сравнението между броя на свободните реакционни центрове, на редуциращите агенти и броя на златните атоми, които формират един зародиш на повърхността, че формирането на един зародиш при редуктор HDA има по-малка ефективност отколкото в случая на редукция с BSA. В първия случай само 5% от реакционните центрове на HDA са включени в процеса на образуване на зародиш, срещу половината от всички намиращи се на повърхността BSA аминокиселинни остатъци. Получените резултати биха могли да бъдат обяснени с различната организация на монослоевите, образувани от редуциращите агенти. Фактът, че монослоят от HDA е в по-кондензирано състояние, дава основание да смятаме, че агрегирането протича по механизъм, свързан с термичното движение

на единични златни атоми по протежението на монослоя. При монослоя от BSA всяка от молекулите на протеина съдържа 564 аминокиселини. Намереният брой на златните атоми, изграждащи един зародиш за системата BSA/HAuCl<sub>4</sub> – 2285, при максимален брой активни центрове на редуктора BSA – 564 аминокиселини за молекула, подсказва, че четири молекули BSA участват във формирането на един зародиш. Едно последващо реологично изследване на свойствата на монослоевите от HDA и BSA би могло да донесе допълнителна информация относно молекулния механизъм на формирането на златни наночастици .

- установено, че дифузионният поток  $i_D$  и максималният редукционен поток  $i_A$  са на практика идентични.
- установено, при сравнението на стойностите на потоците  $i_D$ ,  $i_A$  и  $i_B$ , че агрегационният поток  $i_B$  е по-малък с порядък по отношение на редукционен поток  $i_A$ , което още веднъж потвърждава идеята, че дифузията поддържа постоянна подповърхностна концентрация на прекурсора (HAuCl<sub>4</sub>), т. е. за получените резултати и направените обобщения процесът на дифузия от обема към повърхността не играе съществена роля.

#### 4. Основни научни приноси и изводи

1. Предложената е нова експериментална процедура за биофункционализиране на златни наночастици с обвивка от протеини.
2. Предложена е експериментална концепция с приложимост за бъдещи разработки на сензорни системи, при която модифицираните с протеини златни наночастици да бъдат използвани за субстрат на протеолитични ензими като например, протеаза К, савиназа и др.
3. Приложен е нов експериментален подход за изучаване на кинетиката на повърхностен синтез на златни наночастици.
4. Използвайки класическият модел на F-W е предложен теоретичен кинетичен модел, описващ получаването на златните наночастици на граничната повърхност вода въздух.
5. Кинетичните данни са представени и интерпретирани съгласно предложения теоретичен модел. От сравнението на експерименталните резултати и предложения кинетичен модел са определени скоростните константи на образуване на златните зародиши и на растеж на златните наночастици за двете изследвани системи HDA/HAuCl<sub>4</sub> и BSA/ HAuCl<sub>4</sub>
6. Направеното сравнение показва, че образуването на критичен брой зародиши под редуциращото действие на HDA е в пъти по-бързо в сравнение с действието на BSA като редуциращ агент, както и че скоростта на растеж на златните наночастици, образувани от Au атомите под действието на HDA е в пъти по-висока, отколкото под действието на BSA като редуциращ агент.

## 5. Списък на включените в изследването публикации

1. A. Chanachev, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Balashev, „Study of protein modified gold nanoparticles in bulk phase and at air/water interface”, *Chemistry*, **24** (6), 863-876 (2015).
2. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, K. Balashev, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, „Monolayer kinetic model of formation of gold nanoparticles by reducing agents hexadecylaniline or bovine serum albumin”, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* (2016), **508**, 1-7, doi:10.1016/j.colsurfa.2016.08.005.
3. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, Tz. Ivanova, S. Petrova, K. Balashev, „Characterization by Atomic Force Microscopy of Gold Nanoparticles Functionalized with Azocasein for Protease Colorimetric Enzyme Assay“, *Bulgarian Chemical Communications*, (2018) **50**, (2) 223-227.
4. P. Georgiev, A. Chanachev, S. Simeonova, L. Mihaylov, D. Nihtianova, T. Ivanova, K. Balashev, „A New Method for Studying the Kinetics of Synthesis of Gold Nanoparticles in Hexadecylanilin Monolayer at the Air/Water Interface by Means of Atomic Force Microscopy“, *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, (2020) **73** (2) 197-203.

## Материали по дисертацията са докладвани на следните форуми:

1. A. Chanachev, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Mircheva, K. Balashev and I. Panaiotov, Methods of functionalization of gold nanoparticles with proteins: bulk versus air/water interface approach, Second International Conference Advanced Functional Materials, Nessebar Resort, Bulgaria, 3 – 6 September 2014 poster presentation.
2. A. Chanachev, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Mircheva, K. Balashev, I. Panaiotov, Methods of functionalization of gold nanoparticles with proteins: bulk versus air/water interface approach, Second International Conference Advanced Functional Materials, 2014, poster presentation.
3. A. Chanachev, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Balashev, Comparative studies of protein functionalized Gold Nanoparticles by Atomic Force Microscopy (AFM) and Transmission electron microscopy (TEM), Focus on Microscopy, Gottingen, Germany, March 29-April 1, 2015, poster presentation.
4. A. Chanachev, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Balashev, Functionalization of gold nanoparticles with proteins and characterization of Langmuir-Blodgett films for biosensor

applications, XIV National Conference in Chemistry for Students, May 20-22, 2015, Sofia, Bulgaria, oral presentation.

5. A. Chanachev, P. Georgiev, K. Mircheva, Tz. Ivanova, K. Balashev, I. Panaiotov, Functionalization of gold nanoparticles with bovine serum albumin for bioapplications, Education, Research and Development, 04-08. 2015, Elenite, Bulgaria, poster presentation.

6. A. Chanachev, P. Georgiev, S. Simeonova, K. Mircheva, Tz. Ivanova, K. Balashev, New methods for functionalization of gold nanoparticles with proteins and biopolymers for application in bionanotechnology, Scientific Session of Faculty of Chemistry and Pharmacy, 03.12. 2015, Sofia, Bulgaria, poster presentation.

7. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Balashev, Atomic force microscopy characterization of gold nanoparticles functionalized with azocasein for enzyme assay applications, XV National Conference in Chemistry for Students, May 20-22 2016, Sofia, Bulgaria, oral presentation.

8. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Balashev, Characterisation by atomic force microscopy of gold nanoparticles functionalized with azocasein for protease colorimetric enzyme assay, IX National Conference in Chemistry, 29.09 – 01.10. 2016, Sofia, Bulgaria, poster presentation.

9. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, Tz. Ivanova, K. Balashev, „TEM and AFM characterization of monomolecular films containing gold nanoparticles“, Scientific Session in Faculty of Chemistry and Pharmacy, 24.11.2016, Sofia, Bulgaria, poster presentation.

10. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, S. Petrova, Tz. Ivanova, K. Balashev, „AFM characterization of gold nanoparticles, functionalized with azocasein for colorimetric enzyme assay applications“, XVI National Conference in Chemistry for Students, May 17-19, 2017, Sofia, Bulgaria, oral presentation.

11. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, K. Balashev, I. Panaiotov, Tz. Ivanova „Mechanism of the formation of gold nanoparticles in monolayer environment at the air/liquid interface“, 31st Conference of The European Colloid and Interface Society, September 3-8, 2017, Madrid, Spain, poster presentation.

12. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, L. Mihaylov, D. Nihtianova, K. Balashev, Tz. Ivanova, „Atomic Force Microscopy (AFM) and Transmission electron microscopy (TEM) characterization of monomolecular films containing Gold Nanoparticles (GNPs)“, 19th International Workshop on Nanoscience & Nanotechnology, November 24-25, 2017, Sofia, Bulgaria, poster presentation.

14. A. Chanachev, S. Simeonova, P. Georgiev, K. Balashev, Tz. Ivanova, „Monolayer kinetic model of formation of gold nanoparticles“, 19th International Workshop on Nanoscience & Nanotechnology, November 24-25, 2017, Sofia, Bulgaria, poster presentation.

## 6. Литература

1. Праистория, [https://www.archaeo.museumvarna.com/bg/category/list?category\\_id=3&id=6](https://www.archaeo.museumvarna.com/bg/category/list?category_id=3&id=6), 10.11.2019
2. Варненски халколитен некропол, <http://www.bestbgtrips.com/bg/%D0%B2%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D1%81%D0%BA%D0%B8-%D1%85%D0%B0%D0%BB%D0%BA%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%BD-%D0%BD%D0%B5%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%BB>, 10.11.2019
3. Златото от Варненския некропол тръгва към Брюксел, 06.10.2015, <https://www.archaeo.museumvarna.com/bg/news/37/%D0%97%D0%BB%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%82%D0%BE-%D0%BE%D1%82-%D0%92%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%8F-%D0%BD%D0%B5%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%BB-%D1%82%D1%80%D1%8A%D0%B3%D0%B2%D0%B0-%D0%BA%D1%8A%D0%BC-%D0%91%D1%80%D1%8E%D0%BA%D1%81%D0%B5%D0%BB>, 10.11.2019
4. Киркова, Елена, Химия на елементите и техните съединения. София, Университетско издателство „Св. Климент Охридски“, 2013.
5. Кратка химическа енциклопедия, том 1 А-Л, Държавно издателство „Техника“, 1981.
6. The Lycurgus Cup, [https://research.britishmuseum.org/research/collection\\_online/collection\\_object\\_details.aspx?objectId=61219&partId=1](https://research.britishmuseum.org/research/collection_online/collection_object_details.aspx?objectId=61219&partId=1), 15.11.2019
7. M. C. Daniel, D. Astruc, Chem. Rev. 104 (2004) 293.
8. H. Li, L. Rothberg, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 10958-10961.
9. R. Pool, Science 248 (4960) (1990) 1186-8.
10. M. Faraday, Philos. Trans. R. Soc., London (1857) 147-14.
11. J. Turkevich, P. Stevenson, J. Hillier, Discuss. Faraday Soc. 11 (1951) 55-75.
12. Hauser and Lynn, Experiments in Colloid Chemistry (McGraw Hill, 1940), p. 18.
13. G. Frens, Nature: Phys. Sci. 241 (1973) 20.
14. A. Herrera, O. Resto, J. Briano, C. Rinaldi, Nanotechnology 16 (2005).
15. A. Herrera, Master Thesis, University of Puerto Rico, 2005.
16. J. Perez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan, P. Mulvaney, Coord Chem. Rev. 249 (2005) 1870.
17. J. Wilcoxon, R. Williamson and R. Baughman, Journal of Chemical Physics 98 (1993) 9933-9950.
18. C.-L. Chiang, Journal of Colloid and Interface Science 239 (2) (2001) 334–341.

19. M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* 9 (1993) 3408.
20. M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. J. Whyman, *Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 801.
21. S. W. Chen, R. W. Murray, *Langmuir* 15 (1999) 682.
22. R. C. Price, R. L. Whetten, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 13750.
23. Y. S. Shon, S. M. Gross, B. Dawson, M. Porter, R. W. Murray, *Langmuir* 16 (2000) 6555.
24. S. Antonello, A. H. Holm, E. Instuli, F. J. Maran, *Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 9836.
25. P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *J. Phys.Chem. B* 110 (2006) 7238.
26. Mie, G. *Ann. Phys.* 25 (1908) 377.
27. E. J. Heilweil, R. M. J. Hochstrasser, 82 (1985) 4762.
28. K. H. Su, Q. H. Wei, X. Zhang, J. J. Mock, D. R. Smith, S. Schultz, *Nano Lett.* 3 (2003) 1087.
29. S. Srivastava, B. L. Frankamp, V. M. Rotello, *Chem. Mater.* 17 (2005) 487.
30. L. M. Liz-Marzan, *Materials Today*, February, 7 (2) (2004) 26-31.
31. P. Vasileva et al., unpublished results
32. A. Herrera, E. Vicuna, M. E. Castro, L. Soia, R. Irizarry, J. Briano, *Nanotech. Technical Proceedings of the 2004 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Nanoparticles and Molecules* (2004) p. 394.
33. Paul Drude, „Zur Elektronentheorie der Metalle; II. Teil. Galvanomagnetische und thermomagnetische Effecte”. *Annalen der Physik* 308 (11) (1900) 369.
34. Георгиев, П. Кинетика на синтеза на златни наночастици в присъствие на метални йони, с нов подход за охарактеризирането им и приложения във фотокатализата, Дис.София.2014
35. S. Srivastava, B. L. Frankamp, V. M. Rotello, *Chem. Mater.* 17 (2005) 487.
36. R. R. Liu, R. S. Liew, H. Zhou, B. G. Xing, *Angew. Chem., Int. Ed.* 46 (2007) 8799.
37. X. Yao, X. Li, F. Toledo, C. Zurita-Lopez, M. Gutova, J. Momand, F. M. Zhou, *Anal. Biochem.* 354 (2006) 220.
38. M. K. Fan, M. Thompson, M. L. Andrade, A. G. Brolo, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6350.
39. S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura, K. Yoshida, *Chem. Commun.* (2002) 2866.
40. G. Kalyuzhny, A. Vaskevich, M. A. Schneeweiss, I. Rubinstein, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 3850.
41. P. Englebienne, A. Van Hoonacker, M. Verhas, *Analyst* 126 (2001) 1645.
42. A. Prabhakar, S. Mukherji, *LabChip* 10 (2010) 3422.

43. J. Matsui, K. Akamatsu, N. Hara, D. Miyoshi, H. Nawafune, K. Tamaki, N. Sugimoto, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4282.
44. Y. B. Lin, Y. Zou, Y. Y. Mo, J. P. Guo, R. G. Lindquist, *Sensors* 10 (2010) 9397.
45. W. R. Yang, J. J. Gooding, Z. C. He, Q. Li, G. N. Chen, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2007) 712.
46. Vaikundamoorthy Ramalingam, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 271, September 2019, Article 101989.
47. E. Hutter, D. Maysinger, *Trends in Pharmacological Science* 34, 9 (2013), 497-507.
48. Z. Zhen et al., *Anal. Chem.* 84 (2012) 3614-3620.
49. S. Srivastava, B. L. Frankamp, V. M. Rotello, *Chem. Mater.* 17 (2005) 487.
50. T. M. Sun, Y. C. Wang, F. Wang, J. Z. Du, C. Q. Mao, C. Y. Sun, *Biomaterials* 35, 836 (2014).
51. W. F. Zandberg, A. B. S. Bakhtiari, Z. Erno, D. Hsiao, B. D. Gates, T. Claydon, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8, 908 (2012).
52. T. L. Halo, K. M. McMahon, N. L. Angeloni, Y. Xu, W. Wang, A. B. Chinen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 17104 (2014).
53. A. de la Zerda, S. Prabhulkar, V. L. Perez, M. Ruggeri, A. S. Paranjape, F. Habte, *Clin. Exp. Ophthalmol.* (2014).
54. K. Hayashi, M. Nakamura, K. Ishimura, *Adv. Healthc. Mater.* 2, 756 (2013).
55. J. A. Copland, M. Eghtedari, V. L. Popov, N. Kotov, M. Mamedova, M. Motamedi, A. A. Oraevsky, *Mol. Imag. & Biol.* 6, 341 (2004).
56. J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1959 (1998).
57. G. C. Bond, C. Louis, D. T. Thompson, *Catalysis by Gold* (vol. 6), Imperial College Press, London. 2006.
58. J. Turkevich, P. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55 (1951).
59. P. Khullar, V. Singh, A. Mahal, P. N. Dave, S. Thakur, G. Kaur, *J. Phys. Chem. C* 116, 8834 (2012).
60. A. W. Adamson (1976), „Physical chemistry of surfaces”, John Wiley & Sons, NY.
61. J. T. Davies, E. K. Rideal. *Interfacial phenomena*, Academic press, New York, London, 1961.
62. I. Panaiotov, S. Taneva, A. Bois, F. Rondelez, *Macromolecules* 24 (15) (1991) 4250.
63. M. A. Cooper, H. D. Williams, *Anal Biochem.* 276(1) (1999) 36-47.
64. M. Ivanova, I. Panaiotov, T. Trifonova, M. Echkenazi, *Colloids and Surfaces* 10 (1984) 269.



65. I. Panaiotov, R. Verger – „Enzymatic reactions at the interface”, in *Physical Chemistry of Biological Interfacers*, ed. by W. Norde and A. Baszkin, Marcel Dekker, New York, Basel, (2000) Chapter 11.
66. K. Mircheva, I. Minkov, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, J. E. Proust, R. Verger Verger, *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* 67 (2008) 107-114.
67. И. Панайотов, Увод в биофизикохимията, Университетско издателство „Св. Климент Охридски”, 2007.
68. H. Brockman Verger, *Current Opinion in Structural Biology* 9(4) (1999) 438-443.
69. I. Minkov, K. Mircheva, N. Grozev, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101 (2013) 135-142.
70. A. Henglein, M. Giersig, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 6767.
71. S. Warren, D. Walker, B. Grzybowski, *Langmuir* 28 (2012) 9093-9102.
72. A. Laromaine, L. Koh, M. Murugesan, R. Ulijn, M. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4156-4157.
73. J.-H. Kang, Y. Asami, M. Murata, H. Kitazaki, N. Sadanda, E. Tokunaga, S. Shiotani, S. Okada, Y. Maehara, T. Niidome, M. Hashizume, T. Mori, Y. Katayama, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 1869-1874.
74. C. A. Jaska, I. Manners, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9776.
75. G. Schmid, *Chem. Rev.* 92 (1992) 1709.
76. R. Stark, *Nature Nanotechnology* 2 (2007) 461-462.
77. S. Amelinckx, „*Handbook of Microscopy: Applications in Materials Science, Solid-State Physics and Chemistry*”, Volume 2: Methods II, VCH VerlagsgesellschaftmbH, D-69451 Weinheim (Federal Republic of Germany), 1997.
78. P. West, „*Introduction to Atomic Force Microscopy: Theory, Practice, Applications*”.
79. K. Saha, S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. Rotello, *Chem. Rev.* 112 (2012) 2739-2779.
80. W. Richard Bowen and Nidal Hilal, *Atomic Force Microscopy in Process Engineering: An Introduction to AFM for Improved Processes and Products*, 2009, Elsevier.
81. Bhanu P. Jena, J. K. Heinrich Hörber, „*Force Microscopy: Applications in Biology and Medicine*”, 2006, John Wiley&Sons.
82. J. Guastalla, *Contribution à l'étude des couches monomoléculaires superficielles*, Thesis, Université de Montpellier, 1948.
83. R. Verger, G. H. de Haas, *Chem. Phys. Lipids* 10 (1973) 127–136.
84. P. Georgiev, A. Bojinova, B. Kostova, D. Momekova, T. Bjornholm, K. Balashev, *Colloid Surf. A*, 434, 154 (2013).

85. Charney J., *J. Biol. Chem.*, 171, 501 (1947).
86. Димитър Колев. *ЕНЗИМОЛОГИЯ*. Издателство „Наука и изкуство“ (1988).
87. R. G. Finke, in D. L. Feldheim, C. A. Foss Jr. (Eds.), *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications*, Marcel Dekker, New York, 2001 (Chapter 2).
88. M. A. Watzky, E. E. Finney, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (36) (2008) 11959–11969.
89. J. Polte, *CrystEngComm* 17 (36) (2015) 6809–6830.
90. K. Paclawski, B. Streszewski, W. Jaworski, M. Luty-Błoch, K. Fitzner, *Colloids Surf.: Physicochem. Eng. Aspects* 413 (2012) 208–215.
91. M. Wuithschick, A. Birnbaum, S. Witte, M. Sztucki, U. Vainio, N. Pinna, K. Rademann, F. Emmerling, R. Kraehnert, J. Polte, *ACS Nano* 9 (7) (2015) 7052–7071.
92. E. E. Finney, R. G. Finke, *J. Colloid Interface Sci.* 317 (2) (2008) 351–374.
93. M. A. Watzky, R. G. Finke, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (43) (1997) 10382–10400.
94. A. M. Morris, M. A. Watzky, J. N. Agar, R. G. Finke, *Biochemistry* 47 (8) (2008) 2413–2427.
95. P. Georgiev, A. Bojinova, B. Kostova, D. Momekova, T. Bjornholm, K. Balashev, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 434 (2013) 154–163.
96. P. Georgiev, S. Simeonova, A. Chanachev, L. Mihaylov, D. Nihtianova, K. Balashev, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 494 (2016) 39–48.
97. P. Khullar, V. Singh, A. Mahal, P. N. Dave, S. Thakur, G. Kaur, J. Singh, S. S. Kamboj, M. S. Bakshi, *J. Phys. Chem.* 116 (2012) 8834–8843.
98. B. M. Rybak, M. Ornatska, K. N. Bergman, K. L. Genson, V. V. Tsukruk, *Langmuir* 22 (3) (2006) 1027–1037.
99. A. J. Chung, M. F. Rubner, *Langmuir* 18 (4) (2002) 1176–1183.
100. A. Swami, P. R. Selvakannan, R. Pasricha, M. Sastry, *J. Phys. Chem. B* 108 (50) (2004) 19269–19275.
101. A. Swami, A. Kumar, P. R. Selvakannan, S. Mandal, R. Pasricha, M. Sastry, *Chem. Mater.* 15 (1) (2003) 17–19.
102. Ahmet Uysal, Benjamin Stripe, Binhua Lin, Mati Meron, Pulak Dutta, *Phys. Rev. Lett.* 107 (2011) 115503.
103. Sarathi Kundu, Anindya, *Chem. Phys. Lett.* 508 (2011) 80–85.
104. V. Alahverdijeva, M. Ivanova, R. Verger, I. Panaiotov Verger, *Colloids Surf. Biointerfaces* 42 (1) (2005) 9–20

