

NMR studija pripreve zlatnih nanočestica u prisutnosti citrata

Zlodi, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:886724>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marko Zlodi

**NMR studija pripreve zlatnih nanočestica u
prisutnosti citrata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka, te u suradnji sa Institutom za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Zahvaljujem se kolegama i suradnicima na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu na strpljenju i prenesenom znanju u svrhu izrade eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na stručnom vodstvu i znanstvenom pristupu pri izradi diplomskog rada, te na preciznim i jasnim savjetima i uputama.

Veliko hvala svim kolegama koji su mi pomogli tijekom studiranja i prijateljima koje sam stekao za cijeli život. Hvala kolegi i prijatelju Matku Tokiću na pomoći u izradi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada i na savjetima i uputama na fakultetu i izvan njega.

Posebno hvala mojoj djevojci koja me podržavala i poticala u radu, te bila strpljiva i razumna do kraja mog studiranja.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su me strpljivo i bezuvjetno podržavali tijekom mog školovanja, što su me odgojili, educirali i financirali, ulagali u mene i razumjeli me kada drugi nisu. Hvala i bratu na trudu i uloženom vremenu te pomoći u privatnom i stručnom pogledu.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Limunska kiselina.....	1
1.2. Nanočestice zlata.....	1
1.3. Termička razgradnja limunske kiseline.....	2
1.4. Oksidacija limunske kiseline katalitičkom dehidracijom.....	3
1.5. Reakcije dekarboksilacije 3-ketoglutarata.....	4
1.6. Detaljni mehanizam oksidacije β -keto kiselina.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. Sinteza nanočestica.....	8
3.2. Priprema uzoraka za spektrometriju.....	9
3.3. NMR spektrometrija.....	9
3.4. Mjerni instrument, građa i funkcija.....	12
3.5. Programski alati korišteni u radu.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. NMR spektar suspenzije nanočestica zlata obloženih citratom.....	14
4.2. Dokazivanje acetona dodatkom poznate tvari.....	15
4.3. Signal molekula koje oblažu nanočestice.....	17
4.4. Promjene intenziteta signala u ovisnosti o vremenu	18
4.5. Oksidacijski međuprodukti u sintezi nanočestica.....	19
5. ZAKLJUČAK:	22
6. LITERATURA:.....	23
7. SAŽETAK:.....	26
8. SUMMARY:	27

1. UVOD

1.1. Limunska kiselina

Limunska kiselina (IUPAC nomenklatura: 2-hidroksiopropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina), s $pK_a=2,79$ pripada u skupinu slabih organskih kiselina. Pojavljuje se u obliku bezbojnih kristala ili kao bijeli prah, bez mirisa. Zbog svoje ekonomske i ekološke prihvatljivosti uvelike se koristi u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji, najčešće u obliku anhidrida ili monohidrata. (PubChem: Citric Acid – Use and Manufacturing, 2023.)

Jedan od bitnijih biokemijskih procesa u ljudskom organizmu je Krebsov ciklus ili ciklus limunske kiseline čija je uloga stvaranje energije u obliku ATP (adenozin trifosfat) molekula u procesu staničnog disanja (biološke oksidacije). Ciklus započinje reakcijom acetil-koenzima A (acetyla-CoA) s oksaloacetatom prilikom čega nastaje limunska kiselina. Nastala limunska kiselina ulazi u niz oksidacijskih reakcija, te kao konačni produkti izlaze oksaloacetat i molekule NADH i $FADH_2$ koje su nosioci energije potrebne za stvaranje ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije. (PubChem: Citric Acid – Pharmacology and Biochemistry, 2023.)

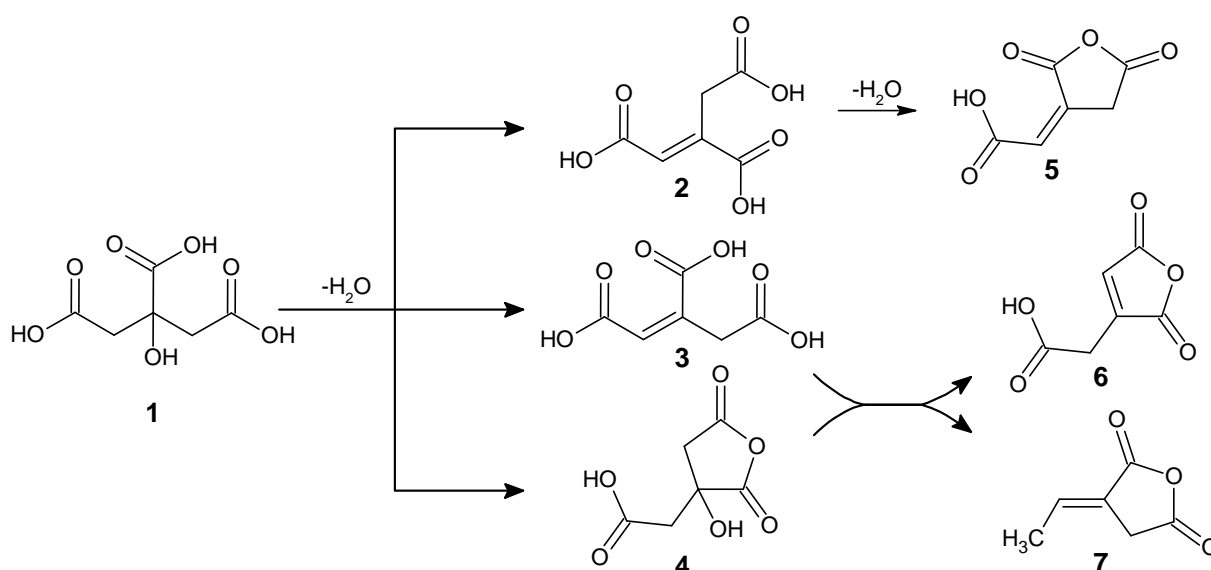
1.2. Nanočestice zlata

Sve čestice reda veličine od 1 do 100 nm nazivaju se nanočestice, a razlikuju se po strukturi i sastavu, odnosno vrsti atoma ili molekula od kojih su građene. Kvalitativni sastav i nanometarske dimenzije određuju fizikalno-kemijska svojstva čestica od kojih su najznačajniji: velika površina u odnosu na volumen, kapacitet vezanja i reaktivnost, pa tako nanočestice nalaze primjenu u proizvodnji elektroničke opreme, stvaranju novih materijala, a sve više se koriste i u medicini i ostalim biomedicinskim znanostima. Zbog svojih superiornih površinskih, mehaničkih i elektrostatskih svojstava u medicini se najčešće upotrebljavaju kao prijenosnici molekula, dijagnostički alati ili katalizatori biokemijskih reakcija. (Ghosh i sur. 2011)

Ranija istraživanja (Kalčec i sur. 2022, Pem i sur. 2021) pripreme metalnih nanočestica u prisutnosti cisteina, glutationa i katehola proširena su ispitivanjem nastalih (nus)produkata tijekom pripreme nanočestica zlata u prisutnosti citrata. Uočeno je da prilikom pripreme metalnih nanočestica u prisutnosti cisteina i glutationa dolazi do oksidacije cisteina u cistin i do oksidacije glutationa u GSSG. To je dokazano primjenom in situ NMR tehnika. Također,

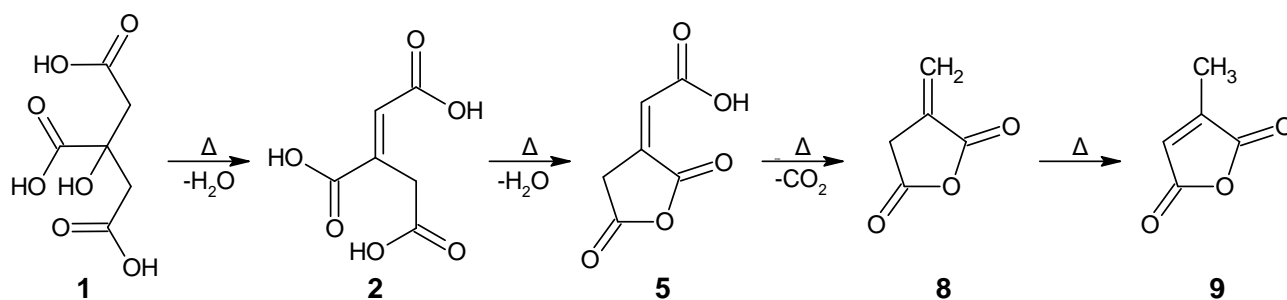
otkriveno je da se u prisutnosti DOPA-e ili dopamina formiraju nanoklasteri obloženi oksidacijskim produktima tih katehola. Sukladno tome, pretpostavka je da nanočestice u prisutnosti citrata nisu obložene isključivo citratom već da dolazi do mogućih redoks reakcija. Stoga je u uvodnom dijelu prikupljena literatura koja opisuje reakcije oksidacije citrata kako bi se definirala biblioteka mogućih produkata tijekom sinteze.

1.3. Termička razgradnja limunske kiseline



Shema 1. Termička razgradnja limunske kiseline (1)

Prvi korak termičke razgradnje limunske kiseline (1) je formiranje anhidrida limunske kiseline (4) ili stvaranje cis- (3) i trans-akonitinske kiseline (2) nastale dehidracijom β – hidroksilne skupine. Nakon toga dobiveni međuprodukti mogu također izgubiti molekulu vode te nastaju cis- (6) / trans- (E(5) i Z(7)) anhidridi akonitinske kiseline. (Vidi Shemu 1.) (Noordover i sur. 2007)

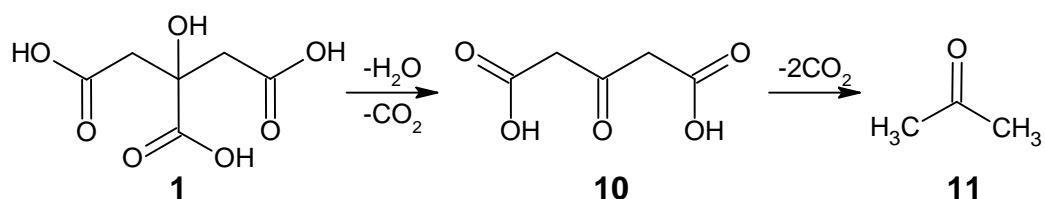


Shema 2. Termička razgradnja limunske kiseline (1) do maleinskog anhidrida (9)

Brzina razgradnje limunske kiseline (**1**) značajno se povećava nakon taljenja na 153°C. Pri 165°C nastaje akonitinska kiselina **2** dok pri višim temperaturama nastaje anhidrid akonitinske kiseline (**5**). Nakon dekarboksilacije nastaje nezasićeni derivat anhidrida (**8**), te konačno maleinski anhidrid **9**. (Vidi shemu 2.) (Barbooti i Al-Sammerrai, 1986)

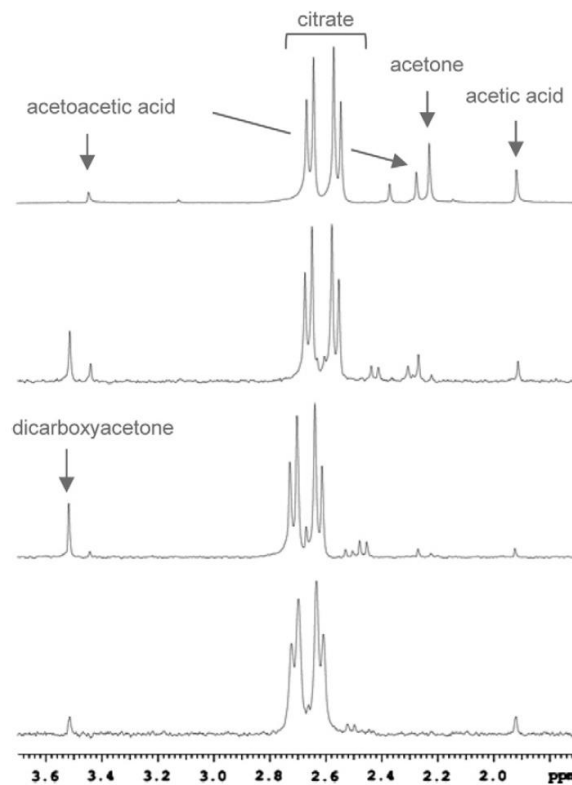
1.4. Oksidacija limunske kiseline katalitičkom dehidracijom

Oksidacija limunske kiseline (**1**) u dikarboksiaceton **10** (3-oksoglutarina kiselina) uključuje dehidrataciju i dekarboksilaciju. Konačni produkt eliminacije dviju molekula CO₂ iz molekule **10** je aceton (**11**) (Vidi Shemu 3). (Umbdenstock i Bruins, 1945)



Shema 3. Oksidacija limunske kiseline (**1**) do acetona (**11**)

Na slici 1. prikazan je ¹H NMR spektar limunske kiseline tijekom sinteze nanočestica. Kako reakcija napreduje signali citrata se pomiču u više magnetsko polje. Zbog povećanja pH reakcijske smjese, protoni metilenske skupine limunske kiseline su sve više zasjenjeni. Porastom pH medija dolazi do ionizacije limunske kiseline i stvaranja dodatnog negativnog naboja u molekuli. (Doyen i sur., 2013)

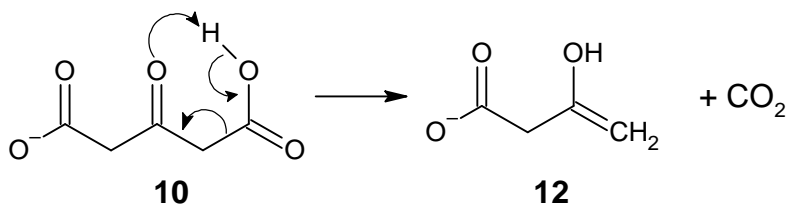


Slika 1. NMR spektar limunske kiseline tijekom sinteze nanočestica (Doyen i sur., 2013)

Signal dikarboksiacetona (oko 3,5 ppm), prvog oksidacijskog produkta, postepeno nestaje jer dolazi do njegove dekarboksilacije, odnosno dolazi do oksidacije dikarboksiacetona u octenu i acetoctenu kiselinu.

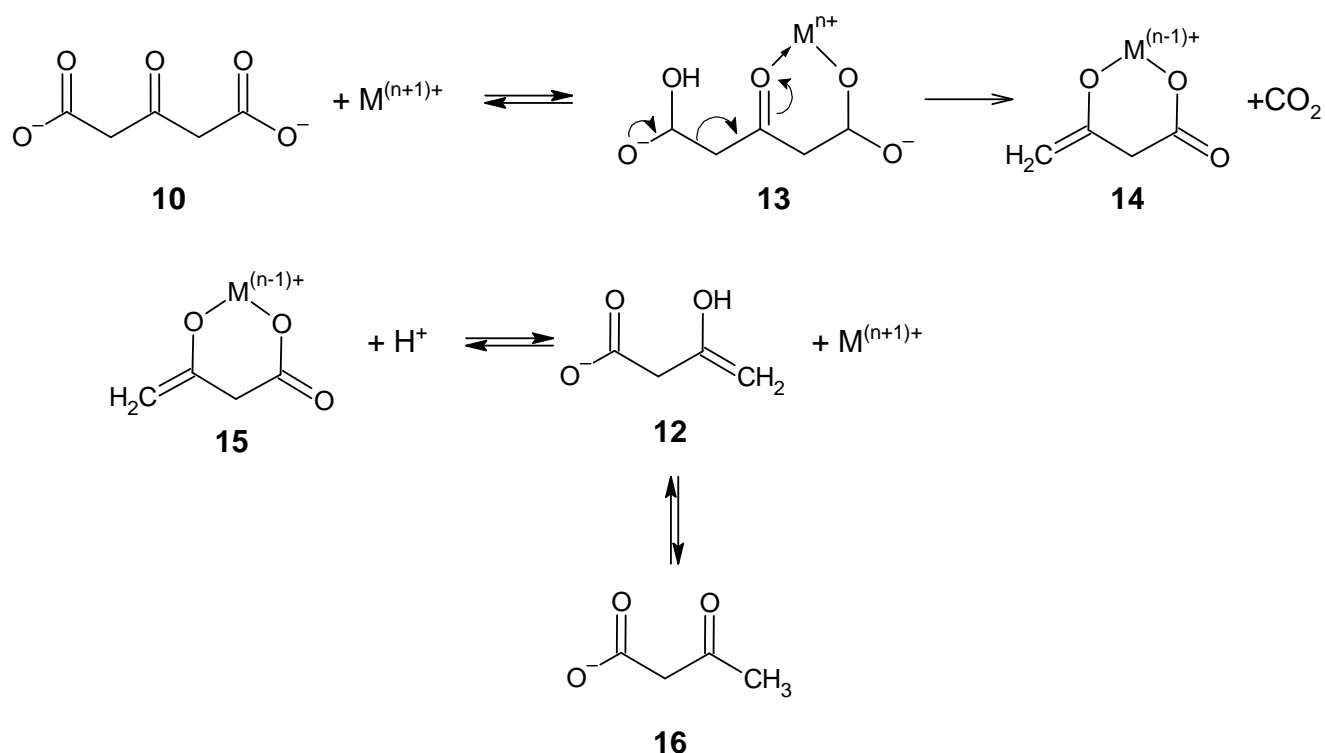
U spektru snimljenom nakon 2 sata vidi se signal acetona kao konačnog oksidacijskog produkta.

1.5. Reakcije dekarboksilacije 3-ketoglutarata



Shema 4. Dekarboksilacija 3-ketoglutarata (**10**)

Poznato je da su organske molekule sa α -hidroksilnom skupinom i α -vodikom podložni dvoelektronskoj oksidaciji u pripadajuće aldehide ili ketone. Međutim limunska kiselina ne posjeduje α -vodik. Unatoč tome CO_2 skupina izlazi uz povlačenje elektrona i stvaranje vodikove veze unutar 3-ketoglutarata (**10**) te tako olakšava oksidaciju i nastanak acetoacetata(**12**).

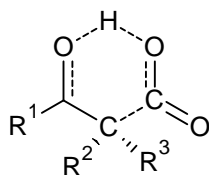


Shema 5. Metalno-ionski katalizirana dekarboksilacija

Na Shemi 5. prikazana je pretvorba 3-ketoglutarata (**10**) u acetoacetat (**12**). Odgovorna su elektron povlačeća svojstva β -karbonilne skupine, koja povlači elektrone tijekom kidanja dvostruke C-C veze. Intramolekulske vodikove veze i stvaranje šesteročlanih prstena u međukoracima odgovorni za ovu kiselo kataliziranu reakciju. Divalentni metalni ioni također kataliziraju dekarboksilaciju. U reakciji nastaje enolni tautomer koji se izomerizira u stabilniji keto oblik (Valliere-Douglass i sur. 2010).

1.6. Detaljni mehanizam oksidacije β -keto kiselina

U teorijskim studijama mehanizma dekarboksilacije β -keto kiselina predložena je ciklička tranzicijska struktura u kojoj dolazi do transfera protona s karboksilne skupine na β -karbonilnu skupinu. Proces uključuje reorganizaciju veza koja se odvija kroz prijelazno stanje cikličke geometrije kao na Shemi 6. Međutim, točni položaj migrirajućeg vodika/protona i doseg kidanja C-C veze u prijelaznom stanju i dalje ostaje nejasno. (Bach i Canepa, 1996)



Shema 6. Prijelazno stanje za mehanizam oksidacije β -keto kiselina

Pregledom literaturnih izvora koji opisuju različite procese oksidativnih transformacija limunske kiseline, može se izdvojiti skupina produkata čije su strukture relevantne za analizu NMR spektara u kojima se prati proces formiranja nanočestica zlata u prisutnosti citrata. Budući da nije poznato koja je kemijska sudbina citrata u reakcijskoj smjesi pripreve nanočestica zlata, prikazane (literaturne) strukture mogu olakšati assignaciju snimljenih NMR spektara. Ukupno je locirano 16 različitih struktura u oksidacijskim procesima, limunske kiseline od kojih su najvažnije: limunska kiselina (**1**), cis- (**3**), trans-akonitinska kiselina(**2**), maleinski anhidrid(**9**), 3-ketoglutarat(**10**), aceton(**11**), i acetoacetat(**12**).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog istraživačkog rada je proučavanje kemijskih reakcija do kojih dolazi prilikom sinteze nanočestica zlata obloženih citratom. U svrhu proučavanja spomenutih kemijskih reakcija provedeno je literaturno pretraživanje reakcija oksidacije limunske kiseline. Pregledom literature pripremljen je katalog mogućih i očekivanih produkata. Eksperimentalno istraživanje provedeno NMR spektroskopijom, odnosno praćenjem kemijskih reakcija koje se odvijaju tijekom pripreme nanočestica zlata u prisutnosti limunske kiseline. Asignacijom signala u spektrima mogu se karakterizirati pojedine funkcionalne skupine i odrediti reakcijski produkti. Svrha ovog rada je steći bolje razumijevanje kemijskih (nuz)reakcija i izbjeći potencijalne probleme pri pripravi i radu sa spomenutim nanočesticama.

Reakcije su provedene korištenjem različitih omjera reaktanata, proučavane su tijekom i nakon odvijanja sinteze, a dodavanjem poznatih tvari određena je prisutnost ili odsutnost reakcijskih produkata u otopini. Uporaba različitih reakcijskih uvjeta omogućuje potpuniji uvid u mehanizam kemijskih reakcija koje su relevantne tijekom pripreme nanočestica zlata.

Nanočestice predstavljaju novu, potentnu tehnologiju za katalizu i za transport organskih molekula, te se istražuju i sintetiziraju na raznim institutima diljem svijeta, među ostalima i na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. U ovom je diplomskom radu korištena NMR spektroskopija, dostupna na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu za detaljan opis produkata reakcija prilikom formiranja nanočestica. Taj je uvid potreban ne samo radi novih znanstvenih spoznaja već daje i određeni sigurnosni profil kojim se može opravdati primjena u medicinske svrhe.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Sinteza nanočestica

Laboratorijsko posuđe očišćeno je zlatotopkom (smjesa dušične i klorovodične kiseline u omjeru 1:3), te isprano MilliQ vodom (proizvođač: Sigma-Aldrich), te nakon toga stavljeno na sušenje u sušionik. Reakcija se provodi u okrugloj tikvici postavljenoj u vodenu kupelj. Na tikvicu se postavi Liebigovo hladilo koje omogućuje refluks otopine tijekom zagrijavanja. Vodena kupelj se zagrijava, a u tikvicu je ubačen magnetski mješač koji osigurava ravnomjerno i ujednačeno miješanje. Priprava nanočestica postiže se redukcijom HAuCl_4 limunskom kiselinom. Moguće je dobiti čestice različitih veličina podešavanjem koncentracija citrata u reakcijskoj smjesi.

U tikvicu se dodaje 0,5 ml, 1%-tna otopina $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i 50 ml destilirane (MilliQ) vode. Nastala smjesa zagrijava se do vrenja, te se zatim naglo dodaje odabrani volumen 34mM otopine trinatrij citrata dihidrata. Odabirom različitih volumena otopine limunske kiseline, u rasponu od 0,25 ml do 2,0 ml, dobivaju se nanočestice različitih veličina. Dodatkom reducensa u smjesu dolazi do nagle promjene boje iz bezbojne do tamnocrvene ili ljubičaste što upućuje na nastanak nanočestica zlata. Otopina se ostavi da vrije i kondenzira u hladilu (refluks) sljedećih 15 minuta, a nakon toga se lagano hladi do sobne temperature miješanjem. (Ghosh i sur., 2011)



Slika 2. Aparatura za sintezu nanočestica

3.2. Priprema uzoraka za spektrometriju

Uzorci za spektrometriju stavljaju se u NMR cjevčice, prije ubacivanja u NMR uređaj. Uzorak je razrijeđen ultračistom MilliQ vodom (proizvođač: Sigma-Aldrich) do željene koncentracije, a za dobivanje kvalitetnih spektara neophodno je u NMR cjevčicu dodati tešku (deuteriranu) vodu ili neko drugo deuterirano otapalo. Deuterirana voda nalazi se u zataljenoj kapilari kako bi se izbjeglo razrjeđenje uzorka, a dodaje se za kalibraciju i optimizaciju deuterijskog signala. Na taj je način magnetsko polje homogeno i stabilno.

3.3. NMR spektrometrija

Jezgre atoma s neparnim atomskim/masenim brojem posjeduju magnetski nuklearni spin, odnosno zbog rotacije jezgre koja posjeduje (pozitivni) naboj, dolazi do stvaranja magnetskog polja. Opisano magnetsko polje posjeduje usmjerenje ovisno o rotaciji (spinu) jezgre, te se može zamisliti kao mali štapićasti magnet, što znači da proton posjeduje magnetski moment. Postavljanjem protona s magnetskim momentom u vanjsko magnetsko polje dolazi do rotacije, odnosno orijentacije protona u stanje niže energije, što znači da magnetski moment zauzima jedno od dva moguća stanja koja su energetske povoljnija od prijašnjih nasumičnih orijentacija. Usmjerenje koje jezgra zauzima može biti paralelno s vanjskim magnetskim poljem (α -spinsko stanje) ili antiparalelno s vanjskim magnetskim poljem (β -spinsko stanje). Paralelno stanje je energetske povoljnije od antiparalelnog, a apsorpcijom zračenja energije jednake razlici ta dva

spinska stanja dolazi do prijelaza jezgre u stanje više energije. Jačina vanjskog magnetskog polja je proporcionalna energetskej razlici između dva spinska stanja za istu jezgru, odnosno pod utjecajem jačeg magnetskog polja potrebna je veća energija za prijelaz iz α - u β - spinsko stanje. (Wade, 2017)

$$\Delta E = \gamma \times \frac{h}{2\pi} \times B_0$$

Jednadžba 1. Prikaz proporcionalnosti ΔE i B_0

ΔE = razlika energija između β - i α -spinskog stanja

B_0 = jakost magnetskog polja

γ = žiromagnetska konstanta, ovisi o magnetskom momentu jezgre

h = Planckova konstanta

Kada jezgra apsorbira zračenje energije koja odgovara razlici između dva spinska stanja, prelazi u stanje više energije (β -spin), tada je jezgra u „rezonanciji“. Jače magnetsko polje olakšava detekciju jezgre jer se povećava energetska razlika, ali također povećava se i razlika frekvencija između signala: raste razlučivost. (Wade, 2017)

Elektroni u omotaču oko jezgre također osjećaju utjecaj vanjskog magnetskog polja, induciraju vlastito magnetsko polje koje se suprotstavlja vanjskome i na taj način „zasjenjuju“ jezgre. Efektivno magnetsko polje oko zasjenjenog atoma uvijek je manje od vanjskog magnetskog polja. (Wade, 2017)

$$B_{\text{efektivno}} = B_{\text{vanjsko}} - B_{\text{zasjenjeno}}$$

Jednadžba 2. Opis efektivnog magnetskog polja

Kemijski pomak predstavlja razliku između frekvencije rezonancije promatranog protona i tetrametilsilana (TMS), koji je u većini slučajeva referentni spoj. Silicij je manje elektronegativan od ugljika pa su protoni u metilnim skupinama više zasjenjeni, i simetrični. Zbog toga je tetrametilsilan uvijek u višem magnetskom polju u odnosu na ostale organske molekule. (Wade, 2017)

$$\text{Kemijski pomak [ppm]} = \frac{\text{pomak u niže polje prema TMS [Hz]}}{\text{ukupna frekvencija spektrometra [MHz]}}$$

Jednadžba 3. Kemijski pomak

Kemijski pomak je standardizirana veličina koja ne ovisi o jakosti magnetskog polja i frekvenciji spektrometra.

Do cijepanja signala dolazi kada se dva različita protona pojave u blizini u molekuli. Susjedna jezgra u vanjskom magnetskom polju orijentirana je u α - ili β - spinsko stanje, a ugrubo polovica jezgara nalazi se u jednom stanju i druga polovica u drugom spinskom stanju. Jezgre u α -spinskom stanju uzrokuju povećanje magnetskog polja na susjedne protone zbog čega oni apsorbiraju u nižem polju. Jezgre u β -spinskom stanju uzrokuju smanjenje magnetskog polja na susjedne protone, te zbog toga dolazi do apsorpcije u višem polju. Zbog ovakvih utjecaja susjednih jezgara dolazi do cijepanja signala u spektru i pojavljuju se dublet, triplet, kvartet ili multiplet ovisno o broju neekvivalentnih susjednih protona. Cijepanje spin-spin je recipročno što znači da ako jedan proton cijepa signal drugog protona, onda i taj drugi cijepa signal prvoga. Kemijski ekvivalentni protoni se ne cijepaju. (Wade, 2017)

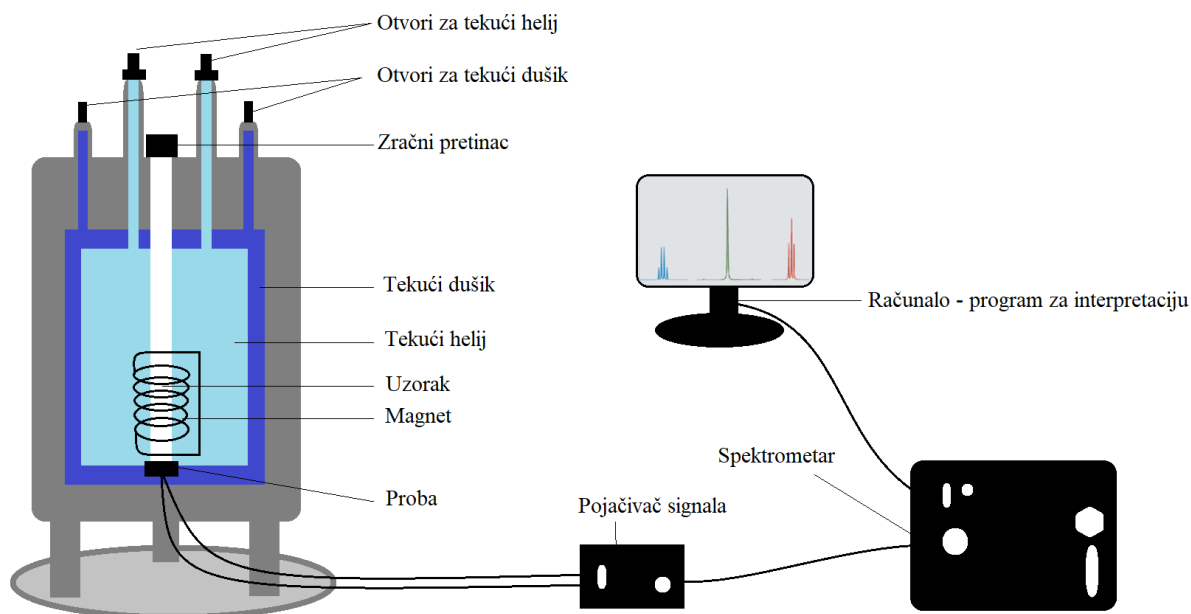
Spin-spin cijepanje uzrokovano magnetskim sprežanjem prenosi se u većini slučajeva kroz molekulske veze. Na susjednim ugljikovim atomima protoni povezani trima vezama pokazuju jasno vidljivo cijepanje, ali već na sljedećem susjednom protonu ne opaža se utjecaj onog najudaljenijeg. Također, protoni vezani za isti ugljikov atom mogu se cijepati samo ako nisu kemijski ekvivalentni. (Wade, 2017)

Protoni, koji su zaključani u konformaciju zbog cikličke strukture ili su vezani za ugljikove atome koji su međusobno povezani dvostrukom (π -vezom), a nalaze se u asimetričnoj molekuli, nisu kemijski ekvivalentni, te će doći do cijepanja signala i na istom i na susjednim ugljikovim atomima. Dijastereotropni protoni, odnosno protoni na ugljikovom atomu pored kojeg se nalazi asimetrični ugljikov atom su također neekvivalentni i u NMR spektru imaju različite pomake. Zbog različitih kemijskih okolina protoni dolaze u rezonanciju pri različitim magnetskim poljima te zbog toga ponovno postoji cijepanje signala iako se nalaze na istom ugljikovom atomu. Limunska kiselina je primjer dijastereotropnih protona koji pokazuju različiti pomak i cijepanje u obliku dva dubleta. Molekula je simetrična, ali protoni na α -ugljiku nalaze se u susjedstvu asimetričnog ugljika u središtu molekule. (Wade, 2017)

3.4. Mjerni instrument, građa i funkcija

Uređaj za mjerenje nuklearne magnetske rezonancije je NMR spektrometar, a sastoji se od više komponenti:

- Supravodljivi stabilni magnet koji stvara snažno homogeno magnetsko polje
- Odašiljač radiofrekvencija koji stvara potrebno elektromagnetno zračenje koje dovodi jezgre u rezonanciju
- Vrlo osjetljiv detektor elektromagnetnog zračenja koji detektira i slabe signale rezonirajućih jezgara (tzv. FID signal)
- Konzola (kontroler), uređaj za preciznu kontrolu emisije elektromagnetnog zračenja i za pretvorbu signala iz detektora u digitalni oblik
- Računalni program koji pomaže u interpretaciji, snimanju i vizualizaciji signala dobivenih iz cijelog sustava



Slika 3. NMR uređaj

Uređaj korišten u ovom istraživačkom radu je NMR spektrometar Varian INOVA 400, koji proizvodi magnetsko polje od 9,4 T što uzrokuje rezonanciju jezgara vodika na frekvenciji od 400 MHz, odnosno jezgara ^{13}C izotopa na frekvenciji od 100 MHz.

3.5. Programski alati korišteni u radu

Za potrebe ovog diplomskog rada korišten je OpenVnmrJ VERSION 3.1 REVISION A programski sustav za interpretaciju i vizualizaciju spektara. Ovaj program omogućuje snimanje i vizualizaciju NMR spektara, a radi pod operativnim sustavom CentOS Linux release 7.9.2009. (Core). Ovaj program omogućuje jednostavno procesuiranje podataka, a neke od korištenih tehnika u radu su: korekcija bazne linije, ugađivanje signala, pozicioniranje i poravnavanje spektara te sparivanje kemijskih pomaka. Također, vrlo korisna funkcija za interpretaciju NMR spektara je integriranje površine ispod signala, međutim u ovom radu je onemogućeno zbog bazne linije koja ulazi u proračun integrala (pre mali je omjer signala i šuma).

Za snimanje ^1H NMR spektara korištena je pulsna tehnika „PRESAT“ koja omogućuje jednostavno, reproducibilno i robusno snimanje kvalitetnijih spektara u vodenim otopinama/suspencijama. Ova tehnika koristi se u svrhu eliminacije signala otapala, kako bi ostali signali u spektru bili lakše vidljivi. Presaturacija se dobiva korištenjem dugog pulsa (trajanja nekoliko sekundi), niske snage (mjerene u mW) tijekom relaksacijske odgode na odabranoj frekvenciji signala kojih treba suprimirati (umanjiti). Takav puls elektromagnetnog zračenja će zasititi neželjenu rezonanciju i tako uvelike umanjiti intenzitet signala otapala. (Solvent Supresion, 2022)

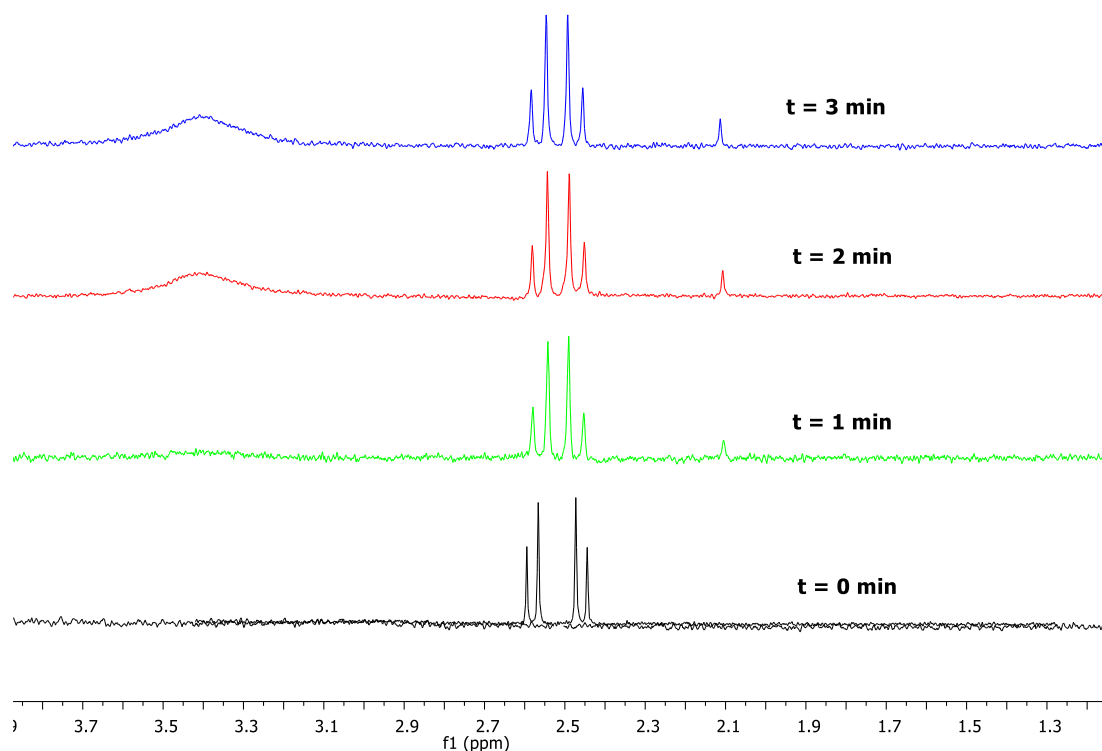
Za prikaz kemijskih struktura korišten je program Chemsketch, besplatni program koji sadrži interaktivno grafičko sučelje, koje omogućuje prikaz struktura, automatsko generiranje IUPAC imena spojeva, predviđanje točke vrelišta, predviđanje NMR ^1H i ^{13}C spektara i brojne druge mogućnosti. U ovom diplomskom radu primarno je korišten za prikaz kemijskih struktura spojeva. Program posjeduje standardne alate za vizualizaciju organskih i anorganskih molekula, također postoje i spremljeni predlošci funkcionalnih skupina koji olakšavaju i ubrzavaju proces crtanja. Strukturiranje molekula je automatizirano, a dodavanje cikličkih skupina, dvostrukih veza i ionskih skupina vrlo jednostavno. Funkcija za generiranje IUPAC imena spoja donosi univerzalnu i stručnu informaciju o molekulama koje se interpretiraju. Osim imena, program detektira i stereokemijske enantiomere, tautomere, daje informaciju o biološkoj aktivnosti i djelovanju na enzime za stvorene strukture. Posebno korisna funkcija je pretvaranje dvodimenzionalnih molekula u trodimenzionalni prikaz koristeći molekulske mehanizme i predviđanje pozicija atoma u prostoru. Zbog svoje jednostavnosti i besplatne uporabe program predstavlja koristan alat za studente i kemičare početnike. (ACD/ChemSketch, 2001)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedene NMR analize prikazuju spektre reakcijske smjese limunske kiseline i soli zlata pripravljene Turkevichevom metodom (Gao i Torrente-Murciano, 2020). To je jedna od najkorištenijih metoda sinteze za pripremu monodispergiranih nanočestica. Cilj analiza spektara je otkrivanje i evidencija nečistoća tijekom sinteze, te razumijevanje mehanizma oksidacije limunske kiseline i asignacija nastalih produkata u procesu. Dvije vrste signala su posebno zanimljive u dobivenim spektrima, po jedan signal u višem i nižem pomaku u odnosu na signal limunske kiseline. Precizno kvalitativno i kvantitativno određivanje tih molekula pomoći će u boljem razumijevanju potencijalnih opasnosti i problema u korištenju nanočestica u medicinske svrhe.

4.1. NMR spektar suspenzije nanočestica zlata obloženih citratom

^1H NMR spektri reakcijske smjese zlatovog(IV) klorida i limunske kiseline u vodi snimljeni su u različitim vremenskim intervalima. Snimljeni spektri prikazuju signale različitih pomaka i intenziteta, odnosno integrala, koji u ^1H NMR spektru koreliraju s koncentracijom.

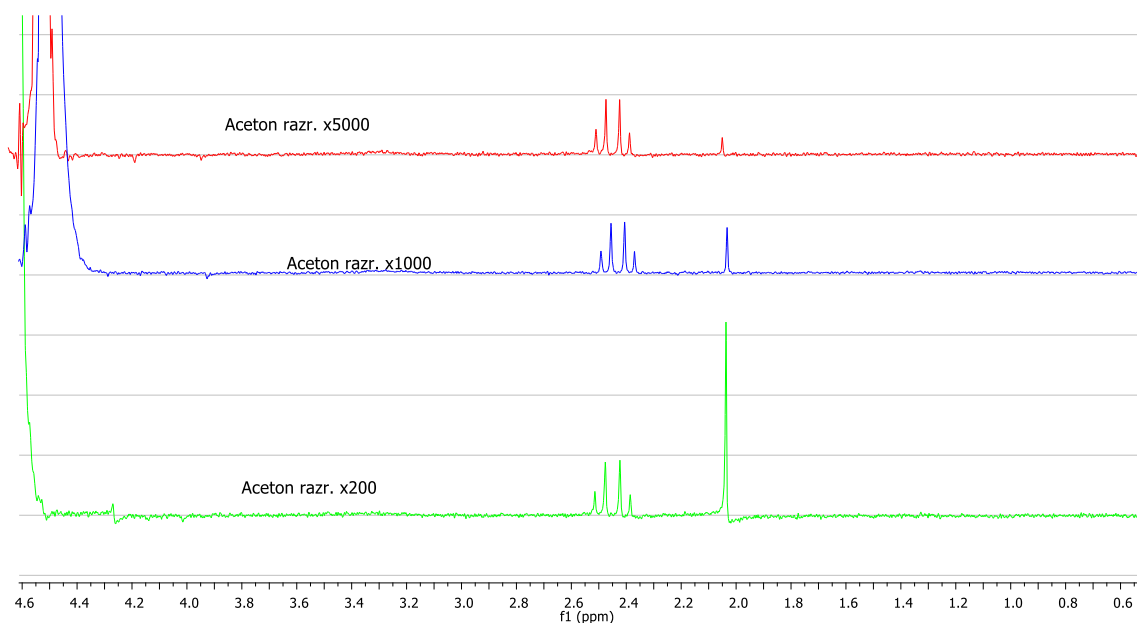


Slika 4. ^1H NMR spektar sinteze nanočestica zlata u prisustvu limunske kiseline prema standardnom protokolu (Turkevicheva metoda).

Na spektrima se pojavljuju dva signala koji s vremenom rastu, što upućuje na povećanje koncentracije u otopini u ovisnosti o vremenu. Signal u višem magnetskom polju od limunske kiseline ima karakteristike (kemijski pomak i multiplicitet) krajnjeg oksidacijskog produkta, acetona, te će u nastavku biti istražen i okarakteriziran. Signal u nižem magnetskom polju od limunske kiseline ima proširen oblik.

Kao što je ranije opisano u uvodu, predviđeni mehanizam reakcije oksidacije limunske kiseline u aceton događa se katalitičkom dehidracijom pri čemu u prvom koraku dolazi do eliminacije vode i ugljikovog dioksida, a u sljedećem koraku eliminiraju se dvije molekule ugljikovog dioksida. Aceton je vidljiv u NMR spektru budući da je on krajnji oksidacijski produkt (vidi Shemu 3.) dok ostali međuprodukti zbog relativno kratkog poluživota nisu vidljivi. Podešavanjem reakcijskih uvjeta i korištenjem različitih koncentracijskih omjera reaktanata moguće je stabilizirati međuprodukte oksidacije i snimiti ih NMR spektroskopijom, o čemu će više govora biti u nastavku.

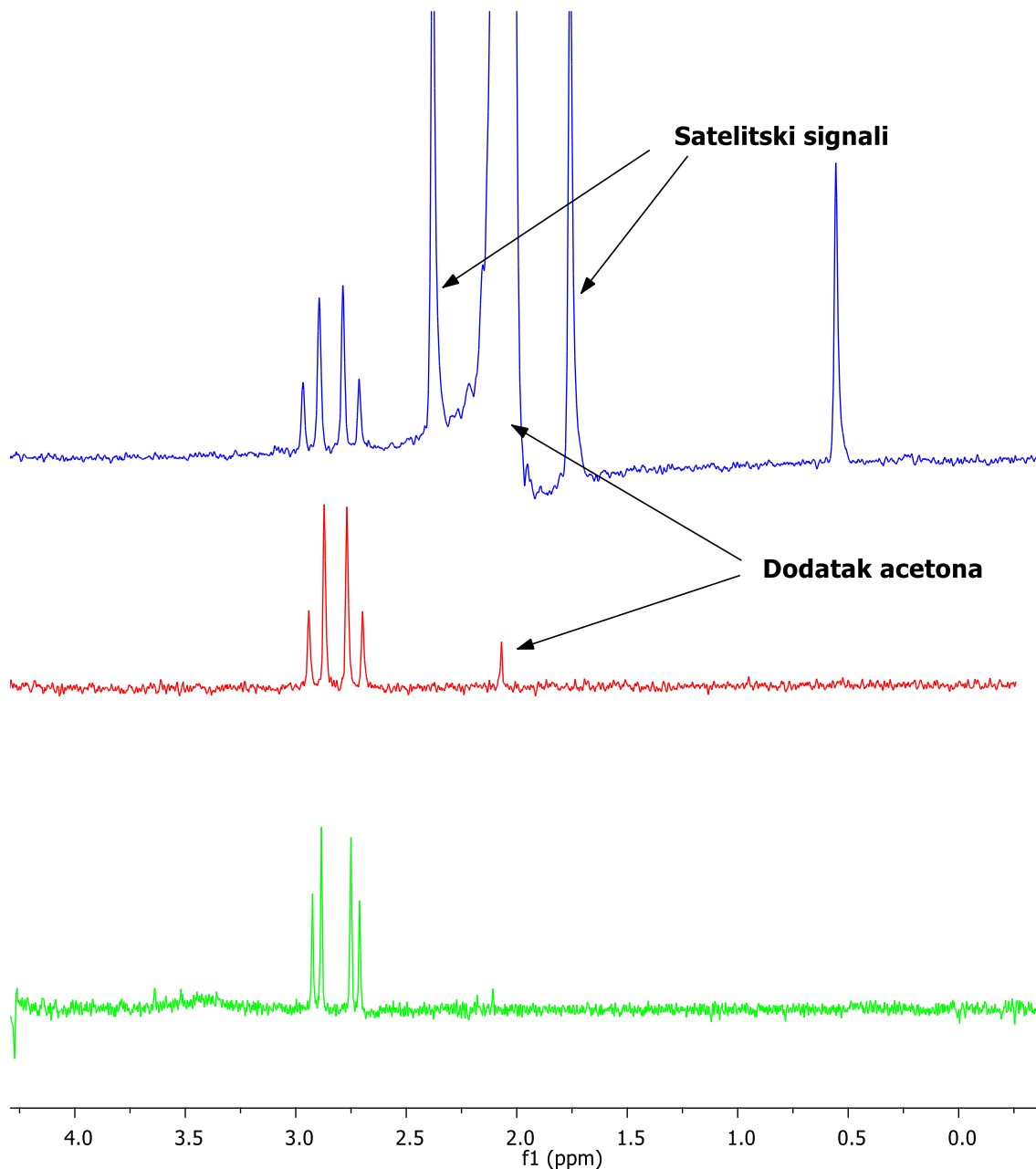
4.2. Dokazivanje acetona dodatkom poznate tvari



Slika 5. NMR spektri reakcijske smjese uz dodatak acetona u otopinu limunske kiseline, razrjeđivanje acetona

U otopinu limunske kiseline dodan je aceton u različitim koncentracijama. Dodatak acetona jasno prikazuje kemijski pomak na kojem se aceton nalazi u NMR spektru. Ovom metodom prikazan je očekivani položaj acetona u reakcijskoj smjesi zlata i limunske kiseline.

Razrjeđivanje acetona u reakcijskoj smjesi stvara signale različitih intenziteta. Ovim postupkom omogućuje se dobivanje kvalitetnijih i jasnijih spektara, odnosno dobiva se informacija o potrebnoj koncentraciji acetona koja će dati dovoljno jak signal za detekciju, a ne prevelik da učini proučavanje spektra otežanim.

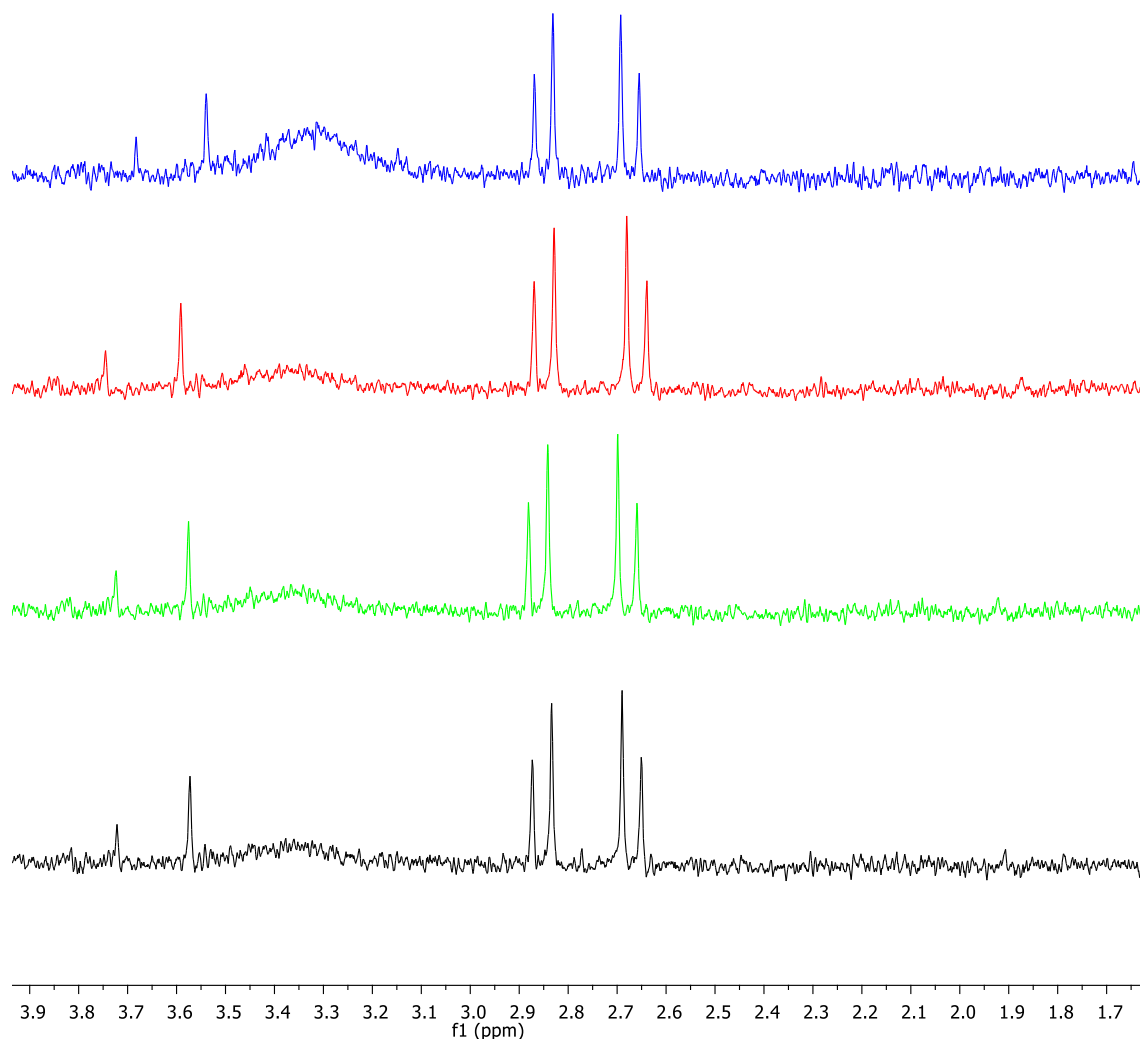


Slika 6. NMR spektri sinteze nanočestica zlata u prisustvu limunske kiseline prema standardnom protokolu (Turkevicheva metoda) i dodatak acetona u reakcijske smjese.

Aceton je krajnji produkt oksidacijskih reakcija limunske kiseline i najvjerojatniji spoj u reakcijskoj smjesi nanočestica zlata obloženih limunskom kiselinom (jer zlato djeluje kao jak

oksidans). Također, po kemijskom pomaku pozicija u snimljenim NMR spektrima odgovara očekivanom položaju acetona u spektru. Dodatkom poznate molekule (acetona) dokazuje se prisustvo kemijskog spoja u reakcijskoj smjesi, budući da dolazi do povećanja intenziteta signala. Velika koncentracija dodanog acetona uzrokuje pojavu prevelikog signala sa satelitima koji nije praktičan za karakterizaciju i proučavanje spektra. Međutim, dodatkom primjerene koncentracije acetona amplificirao se već postojeći signal u spektru, a novonastali signal je prihvatljive veličine za opisivanje spektra. Prisustvo acetona dokazano je ovim eksperimentom, u reakcijskoj smjesi dolazi do potpune oksidacije limunske kiseline.

4.3. Signal molekula koje oblažu nanočestice



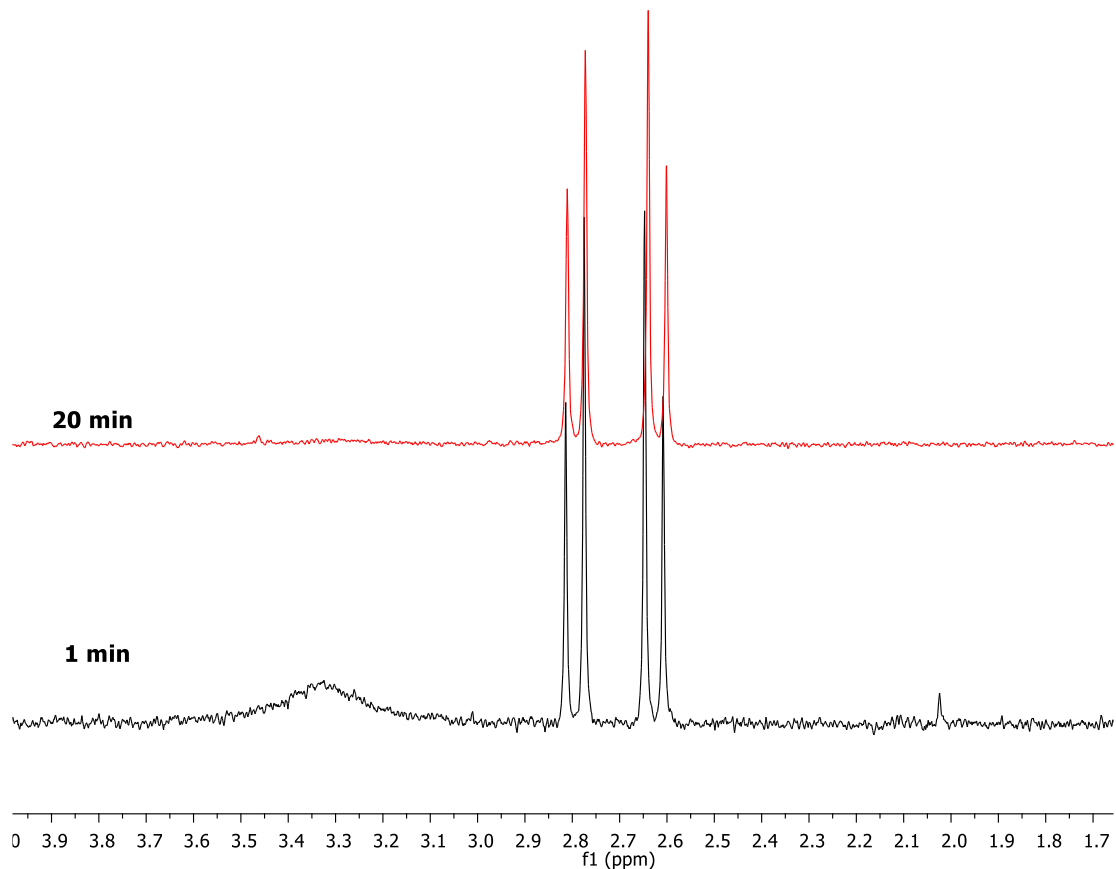
Slika 7. NMR spektri sinteze nanočestica zlata u prisustvu limunske kiseline (u omjeru 5:1) prema standardnom protokolu (Turkevicheva metoda).

Pojavljuje se prošireni signal u području oko 3,3-3,4 ppm te se povećava što upućuje na to da se u reakcijskoj smjesi pojavljuje još jedna vrsta molekula i njena koncentracija raste s vremenom. Osim navedenog proširenog signala, u području oko 3,6 ppm pojavljuje se još jedan signal (singlet). Ovaj signal odgovara signalu iz ^1H NMR spektra opisanog u uvodnom dijelu ovog rada (Slika 1.), odnosno odgovara strukturi dikarboksiacetonu u kojem se nalaze dvije ekvivalentne metilenske skupine.

Dikarboksiaceton (3-oksoglutarina kiselina ili β -ketoglutarina kiselina) je međuprodukt oksidacije limunske kiseline iz kojeg dehidracijom nastaje aceton.

Prošireni signal u spektru indicacija je da su molekule limunske kiseline su vezane za površinu nanočestica i da oblažu formiranu strukturu, odnosno da nisu otopljene u vodi. Ova spektralna pojava često se opisuje u znanstvenim radovima kao „signal broadening“, a vezano sredstvo koje oblaže površinu nanočestica naziva se „coating agent“.

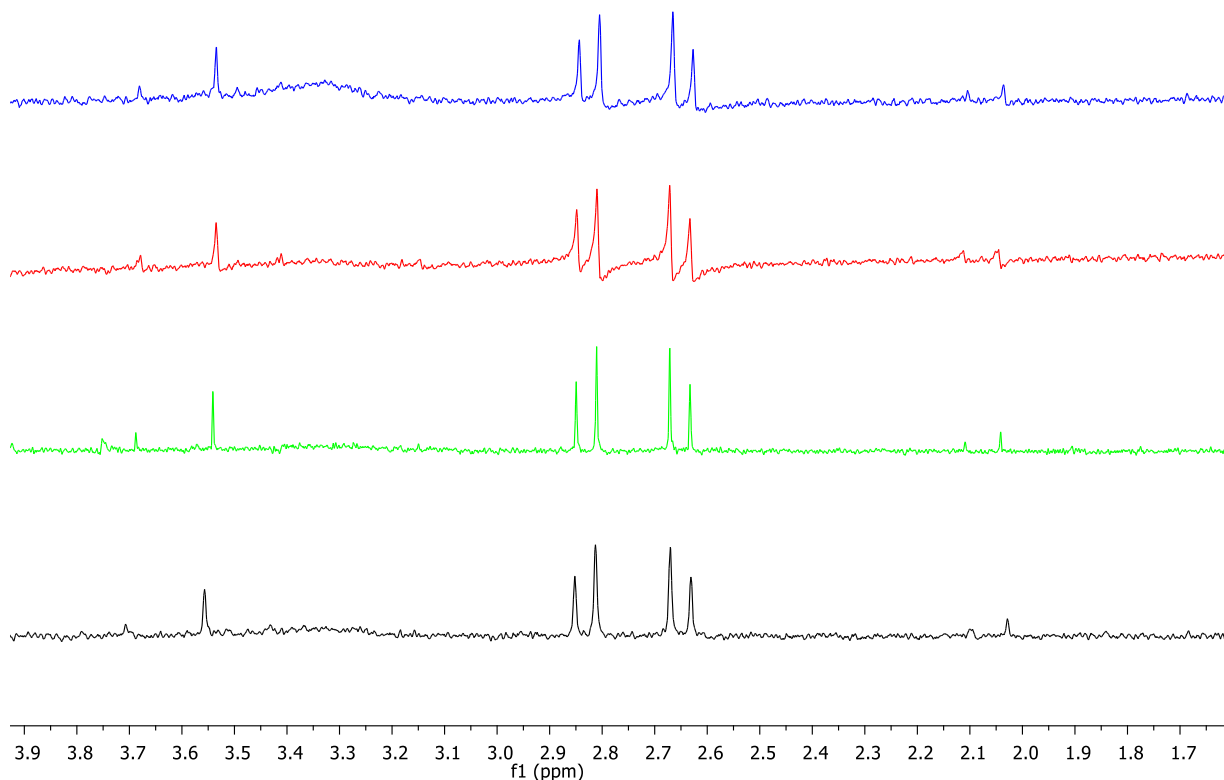
4.4.Promjene intenziteta signala u ovisnosti o vremenu



Slika 8. NMR spektri sinteze nanočestica zlata u prisustvu limunske kiseline (u omjeru 1:10) prema standardnom protokolu (Turkevicheva metoda).

Tijekom sinteze nanočestica pri ovim uvjetima također dolazi do stvaranja acetona i kompleksa nanočestica i vezane limunske kiseline što vidimo kao prošireni signal u nižem magnetskom polju od signala limunske kiseline. Nakon 20 minuta oba signala nestaju, a ostaje samo limunska kiselina otopljena u vodi. Pretpostavka je da je aceton kao lako hlapljivi spoj ispario iz otopine. Prošireni signal se smanjio jer se radi o kompleksiranoj limunskoj kiselini, koja je vezana za nanočestice zlata, a to nije stabilni sustav i s vremenom se taloži, ne ostaje suspendiran u otapalu i zbog toga nestaje prošireni signal u NMR spektru.

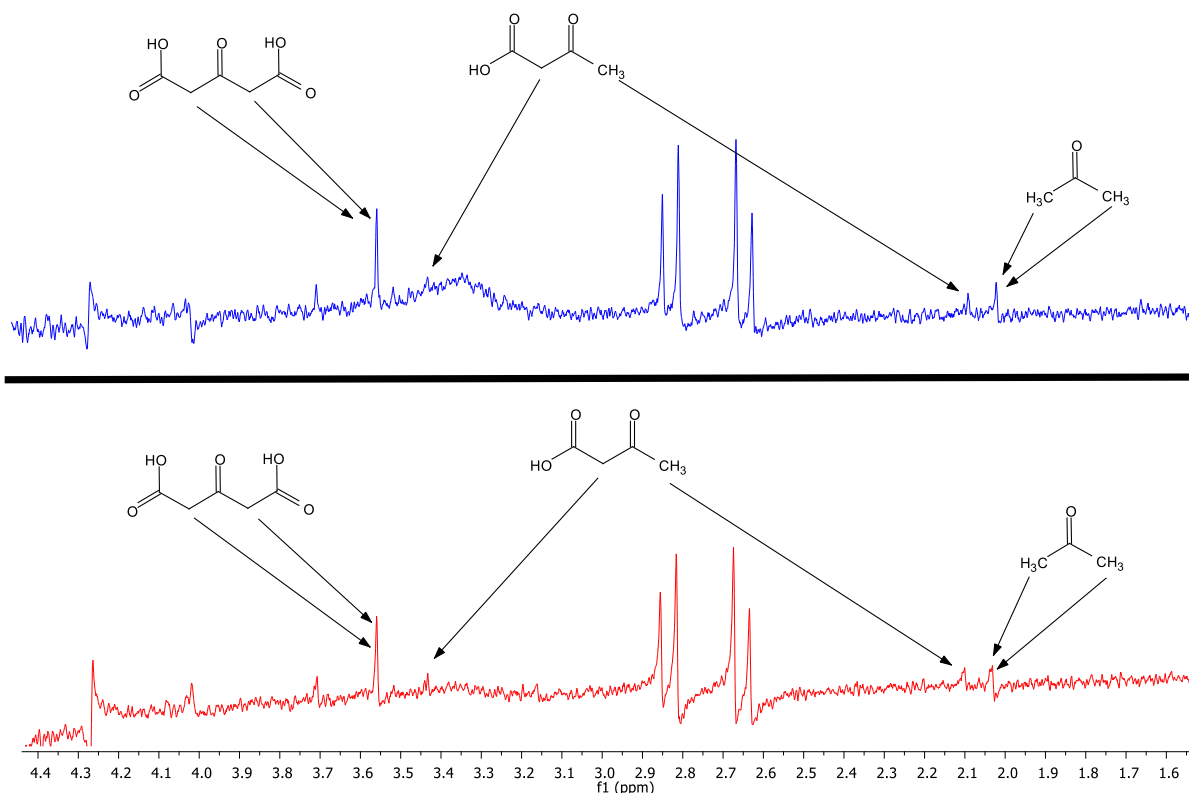
4.5. Oksidacijski međuprodukti u sintezi nanočestica



Slika 9. NMR spektri sinteze nanočestica zlata u prisustvu limunske kiseline (u omjeru 1:2) prema standardnom protokolu (Turkevicheva metoda).

U spektrima (Slika 3.) se pojavljuju signali u području višeg i nižeg pomaka u odnosu na limunsku kiselinu. Osim signala acetona, upareni signali upućuju na međuprodukte opisane u uvodnom dijelu ovog rada. Slika 1. prikazuje NMR spektre s potencijalnim oksidacijskim

produktima limunske kiseline. Signali u prikazanim spektrima (Slika 1.) odgovaraju signalima NMR spektara sa Slike 3., odnosno daju informaciju o vrsti molekula koje su nastale u odabranim uvjetima.



Slika 10. ¹H NMR spektar sinteze nanočestica zlata u prisustvu limunske kiseline (u omjeru 1:2) prema standardnom protokolu (Turkevičeva metoda).

Signali na kemijskom pomaku 2,10 i 3,43 ppm opisuju acetooctenu (acetooctatnu) kiselinu (vidi shemu 5.), a izraženi signal na kemijskom pomaku 3,55 ppm predstavlja dikarboksiaceton(vidi sliku 1.).

Katalitičkom dehidracijom i dekarboksilacijom nastaje dikarboksiaceton, odnosno 3-ketoglutarat, koji se ponovnom dvostrukom dekarboksilacijom pretvara u krajnji oksidacijski produkt; aceton. (vidi shemu 3.) Navedeni reakcijski uvjeti zadržavaju međuprodukt te ne dolazi do potpune i brze oksidacije. Dio 3-ketoglutarata dekarboksilira uz povlačenje elektrona i stvaranje vodikove veze, što olakšava oksidaciju pa nastaje acetooctena kiselina.

Promjenom omjera reaktanata u sintezi nanočestica moguće je podesiti reakcijske uvjete pri kojima su NMR spektroskopijom vidljivi oksidacijski međuprodukti. Izmjenom uvjeta reakcije

može se utjecati na dinamiku reakcije, kinetičku stabilnost međuprodukata, te se dobiva uvid u detaljniji mehanizam reakcije između zlatovog(IV) klorida i limunske kiseline.

5. ZAKLJUČAK:

Priprava nanočestica zlata obloženih citratom Turkevichevom metodom je reproducibilna tehnika dobivanja čestica poželjnih veličina i oblika. Redoks reakcije limunske kiseline i atoma zlata doprinose strukturiranju nanočestica, a nusprodukti mogu utjecati na stabilnost istih.

NMR spektroskopijom mogu se detektirati nano-sustavi obloženi limunskom kiselinom, te se može pratiti učinak stvaranja suspenzije, odnosno sedimentacije obloženih sustava na kvalitetu (osjetljivost i rezoluciju) spektara. Također, mogu se asignirati krajnji produkti oksidacije limunske kiseline otopljeni u mediju, a pažljivim podešavanjem reakcijskih uvjeta mogu se snimiti oksidacijski međuprodukti.

Aceton, nastao katalitičkom dehidracijom limunske kiseline, predstavlja najznačajnije onečišćenje u reakcijskoj smjesi. Pojavljuje se u gotovo svim reakcijskim uvjetima i udio u odnosu na druga onečišćenja mu je najveći. U određenim eksperimentima uočeno je hlapljenje acetona iz reakcijske smjese što je očekivano s obzirom na relativno nisko vrelište tog spoja. Prikladnim izborom uvjeta pri pripravi nanočestica može se ukloniti najznačajnije onečišćenje, što povećava potencijal upotrebe istih u medicini ili farmaciji.

Limunska kiselina koja oblaže zlatne nanočestice uočena kao prošireni signal u ^1H NMR spektru ne predstavlja onečišćenje, već čini sastavni dio pripremljenih nano-sustava. Prošireni oblik i kemijski pomak tog signala daje informaciju o stabilnosti suspenzije u otapalu.

Međuprodukti kao što su acetooctena kiselina i dikarboksiaceton važni su za razumijevanje mehanizma oksidacije limunske kiseline, ali nemaju značajnog utjecaja kao onečišćenja jer su stabilni samo u pažljivo odabranim reakcijskim uvjetima i u većini slučajeva, odnosno pri korištenju Turkevicheve metode, nastaje samo krajnji oksidacijski produkt – aceton.

6. LITERATURA:

Abrahamson H.B., Rezvani A.B., Brushmiller J.G. Photochemical and spectroscopic studies of complexes of iron(III) with citric acid and other carboxylic acids, *Inorg. Chim. Acta* 1994, 117-127.

Bach R.D., Canepa C., Electronic Factors Influencing the Decarboxylation of β -Keto Acids. A Model Enzyme Study, *J. Org. Chem.* 1996, 6346-6353.

Barbooti M.M., Al-Sammerrai D.A., Thermal decomposition of citric acid, *Thermochim Acta* 1986, 119-126.

Doyen M., Bartik K., Bruylants G., UV-Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold-citrate aggregates, *J. Colloid Interface Sci.* 2013, 1-5.

Dykman, L., and Khlebtsov, N., Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 2256–2282.

Fischer J.W., Merwin L.H., Nissan R.A., NMR Investigation of the Thermolysis of Citric Acid, *Appl. Spectroscopy* 1995, 120-126.

Frens G., *Kolloid Z.*, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature, Phys. Sci.* 1972, 20-22.

Gao Y., Torrente-Murciano L., Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol, *R. Soc. Chem.* 2020, 2740-2751.

Ghosh D., Sarkar D., Girigoswami A., Chattopadhyay N., A Fully Standardized Method of Synthesis of Gold Nanoparticles of Desired Dimension in the Range 15 nm-60 nm, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2011, 1141-1146.

Kalčec N., Ljulj A., Božičević L., Vrčec V., Marson D., Priel S., Separovic F., Vinković Vrčec I., Transformation of L-DOPA and Dopamine on the Surface of Gold Nanoparticles: An NMR and Computational Study, *Inorg Chem.* 2022, 61, 28, 10781-10791.

Nguyen, D.T., Kim, D.-J., and Kim, K.-S., Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles, *Micron* 2011, 207–227.

Noordover B.A.J., Duchateau R., van Benthem R.A.T.M., Ming W., Koning C.E., Enhancing the Functionality of Biobased Polyester Coating Resins through Modification with Citric Acid, *Biomacromolecules* 2007, 3860-3870.

Ojea-Jamenez I., Bastus N.G., Puentes V., Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem.* 2011, 15752-15757.

Park J., Shumaker-Parry J.S., Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 1907-1921.

Pem B., Čurlin M., Domazet Jurašin D., Vrčec V., Barbir R., Micek V., Fratila R.M., de la Fuente J.M., Vinković Vrčec I., Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2021, 12, 665-679.

Pem B., Toma M., Vrčec V., Vinković Vrčec I., Combined NMR and Computational Study of Cysteine Oxidation during Nucleation of Metallic Clusters in Biological Systems, *Inorg. Chem.*, 2021, 60, 6, 4144-4161.

Tiwari, P., Vig, K., Dennis, V., and Singh, S., Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications, *Nanomaterials* 2011, 31–63.

Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc* 1951, 55–75.

Umbdenstock R.R., Bruins P.F., Aconitic Acid from Citric Acid by Catalytic Dehydration, *Ind. Eng. Chem.* 1945, 963-967.

Valliere-Douglass J., Connell-Crowley L., Jensen R. Schnier P.D., Trilisky E., Leith M., Follstad B.D., Kerr J., Lewis N., Vunnum S., Treuheit M.J., Balland A., Wallace A., Photochemical degradation of citrate buffers leads to covalent acetonation of recombinant protein therapeutics, *Protein Soc.* 2010, 2152-2163.

Wider G., Technical aspects of NMR spectroscopy with biological macromolecules and studies of hydration in solution, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1998, 193-275

Wade L.G., *Organska kemija*. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 561-624.

ACD/ChemSketch 1.0, 1997., <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed074p905>, pristupljeno 24. 5. 2023.

ACD/ChemSketch, 2001., <https://www.cs.gordon.edu/courses/organic/chemsk.pdf>, pristupljeno 15. 5. 2023.

PubChem: Citric Acid – Use and Manufacturing, 2023., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/311#section=Uses>, pristupljeno 16. 4. 2023.

PubChem: Citric Acid – Pharmacology and Biochemistry, 2023., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/311#section=Pharmacology-and-Biochemistry>, pristupljeno 3. 7. 2023.

Solvent Supresion, 2022., <http://sopnmr.ucsd.edu/solvent-suppression.htm>, pristupljeno 25. 6. 2023.

7. SAŽETAK:

Sve češća upotreba nanočestica u biomedicinske svrhe potaknula je izradu ovog istraživačkog rada kako bi se obogatilo znanje i razumjeli mehanizmi tijekom pripreve istih. Literaturnim pregledom stvoren je katalog oksidacijskih reakcija limunske kiseline koje mogu dati potencijalne produkte u sintezi nanočestica. Eksperimentalni dio pripreve nanočestica zlata u prisutnosti limunske kiseline (Turkevicheva metoda) proveden je u sintetskom laboratoriju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Snimanje NMR spektara reakcijskih alikvota provedeno je u Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta. Proučavanjem NMR spektara reakcijskih smjesa prošireno je razumijevanje mehanizama oksidacije limunske kiseline i razjašnjena je stabilnost suspenzije nanočestica zlata u vodi. Najizraženiji signal nusprodukta u svakom snimljenom spektru odgovara kemijskom pomaku acetona koji nastaje katalitičkom dehidracijom limunske kiseline. Prisutnost acetona eksperimentalno je dokazana dodavanjem poznatog spoja u uzorak, čime se pojačao postojeći signal. U spektru osim acetona, u području nižeg magnetskog polja pojavljuje se prošireni signal koji odgovara limunskoj kiselini u interakciji s formiranim nanočesticama, odnosno predstavlja „coating agent“ kao što je opisano u radu. Uz proširenje signala, vidljivi su i signali koji upućuju na oksidacijske međuprodukte opisane u uvodnom dijelu, a njihovi kemijski pomaci odgovaraju očekivanim ^1H signalima. Radi se o dikarboksiacetonu i acetooctenoj kiselini, koji su dobiveni podešavanjem reakcijskih uvjeta. Na taj način dokazano je postojanje onečišćenja tijekom sinteze nanočestica.

8. SUMMARY:

Increased usage of nanoparticles in biomedicine has inspired the making of this research. Its goal is to enrich the knowledge and improve the understanding of mechanisms during the synthesis of nanoparticles. The potential products of nanoparticles synthesis were chosen from a list of oxidation reactions of citric acid, compiled by studying the literature. The experiment consists of two parts. The first part is Turkevich's method of making nanoparticles in laboratory of Medical research institute in Zagreb, followed by NMR spectroscopy at Institute for organic chemistry on Faculty of Pharmacy and Biochemistry. The understanding of oxidation mechanisms of citric acid was expanded and the stability of nanoparticle water suspension was clarified by analyzing the NMR spectrum of reaction mixtures. The most expressed signal in almost every spectrum corresponds to the chemical shift of acetone, which is created in catalytic dehydration of citric acid. Presence of acetone was experimentally proven by adding the known substance in the sample, which amplified the existing signal. Except acetone, in lower magnetic field region, the expanding signal appeared which represents the citric acid in interaction with formed gold nanoparticles, that is „coating agent“ as described in the paper. Besides the expanding signal, there are some discreet signals which indicate that there are oxidation intermediate products as described in introductory part and their chemical shifts correlate with predicted. The molecules in question are dicarboxyacetone and acetoacetate which are created by modulating the reaction conditions. All these evidence shows that there are impurities in synthesis mixture of nanoparticles.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Organsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

NMR studija pripreve zlatnih nanočestica u prisutnosti citrata

Marko Zlodi

SAŽETAK

Sve češća upotreba nanočestica u biomedicinske svrhe potaknula je izradu ovog istraživačkog rada kako bi se obogatilo znanje i razumjeli mehanizmi tijekom pripreve istih. Literaturnim pregledom stvoren je katalog oksidacijskih reakcija limunske kiseline koje mogu dati potencijalne produkte u sintezi nanočestica. Eksperimentalni dio pripreve nanočestica zlata u prisutnosti limunske kiseline (Turkevicheva metoda) proveden je u sintetskom laboratoriju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Snimanje NMR spektara reakcijskih alikvota provedeno je u Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta. Proučavanjem NMR spektara reakcijskih smjesa prošireno je razumijevanje mehanizama oksidacije limunske kiseline i razjašnjena je stabilnost suspenzije nanočestica zlata u vodi. Najizraženiji signal nusprodukta u svakom snimljenom spektru odgovara kemijskom pomaku acetona koji nastaje katalitičkom dehidracijom limunske kiseline. Prisutnost acetona eksperimentalno je dokazana dodavanjem poznatog spoja u uzorak, čime se pojačao postojeći signal. U spektru osim acetona, u području nižeg magnetskog polja pojavljuje se prošireni signal koji odgovara limunskoj kiselini u interakciji s formiranim nanočesticama, odnosno predstavlja „coating agent“ kao što je opisano u radu. Uz proširenje signala, vidljivi su i signali koji upućuju na oksidacijske međuprodukte opisane u uvodnom dijelu, a njihovi kemijski pomaci odgovaraju očekivanim ^1H signalima. Radi se o dikarboksiacetonu i acetoctenoj kiselini, koji su dobiveni podešavanjem reakcijskih uvjeta. Na taj način dokazano je postojanje onečišćenja tijekom sinteze nanočestica.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 26 stranica, 7 grafičkih prikaza, 0 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: NMR, nanočestice, limunska kiselina

Mentor: **Prof. dr. sc. Valerije Vrčec**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Valerije Vrčec**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Doc. dr. sc. Erim Bešić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Izv. prof. dr. sc. Tin Weitner, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Study: Pharmacy

Department of Organic chemistry

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

NMR study of gold nanoparticles preparation in presence of citric acid

Marko Zlodi

SUMMARY

Increased usage of nanoparticles in biomedicine has inspired the making of this research. Its goal is to enrich the knowledge and improve the understanding of mechanisms during the synthesis of nanoparticles. The potential products of nanoparticles synthesis were chosen from a list of oxidation reactions of citric acid, compiled by studying the literature. The experiment consists of two parts. The first part is Turkevich's method of making nanoparticles in laboratory of Medical research institute in Zagreb, followed by NMR spectroscopy at Institute for organic chemistry on Faculty of Pharmacy and Biochemistry. The understanding of oxidation mechanisms of citric acid was expanded and the stability of nanoparticle water suspension was clarified by analyzing the NMR spectrum of reaction mixtures. The most expressed signal in almost every spectrum corresponds to the chemical shift of acetone, which is created in catalytic dehydration of citric acid. Presence of acetone was experimentally proven by adding the known substance in the sample, which amplified the existing signal. Except acetone, in lower magnetic field region, the expanding signal appeared which represents the citric acid in interaction with formed gold nanoparticles, that is „coating agent“ as described in the paper. Besides the expanding signal, there are some discreet signals which indicate that there are oxidation intermediate products as described in introductory part and their chemical shifts correlate with predicted. The molecules in question are

dicarboxyacetone and acetoacetate which are created by modulating the reaction conditions. All these evidence shows that there are impurities in synthesis mixture of nanoparticles.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 26 pages, 7 figures, 0 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: NMR, nanoparticles, citric acid

Mentor: **Valerije Vrčec, Prof. Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Valerije Vrčec, Prof. Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Erim Bešić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Tin Weitner, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2023.