



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky.

Zlaté nanočástice pro biomedicínské aplikace

Gold nanoparticles for biomedical applications

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor diplomové práce: Martin Kolek

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Anton Fojtík, CSc.

Kladno 2017

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2015/2016

Zadání bakalářské práce

Student: **Martin Kolek**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Zlaté nanočástice pro biomedicínské aplikace**
Téma anglicky: Gold nanoparticles for biomedical applications

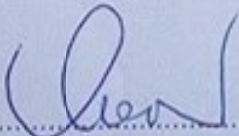
Zásady pro vypracování:

V práci se zaměřte na možnosti přípravy nanočástic, studium jejich vlastností a možnosti využití v biomedicínských oborech. Vyzkoušejte různé technologie přípravy zlatých nanočástic ve vodném prostředí. Zároveň se zaměřte na různé metody studia parametrů získaných zlatých nanočástic a zpracujte získané výsledky. Změřte optická spektra a popište výsledky. Změřte velikosti připravených nanočástic pomocí elektronového mikroskopu a zpracujte statistiku velikosti částic.

Seznam odborné literatury:

[1] Fojtík, A. a kol., NANO fascinující fenomén současnosti, ed. 1, COMTES FHT, 2014, ISBN 978-80-260-7135-8

Zadání platné do: 30.09.2017
Vedoucí: doc. Ing. Anton Fojtík, CSc.
Konzultant: Ing. Zuzana Fílová


vedoucí katedry / pracoviště


děkan

V Kladně dne 20.02.2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Zlaté nanočástice pro biomedicínské aplikace vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 19. 5. 2017

.....

Martin Kolek

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych vyjádřit vděk panu doc. Ing. Antonu Fojtíkovi, CSc. za vzdělání v dané problematice a vedení bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Zuzaně Fílové za poskytnutí prostoru pro realizaci experimentů a konzultace během tvorby bakalářské práce. Také děkuji zaměstnancům Technické Univerzity Liberec za spolupráci.

ABSTRAKT

Zlaté nanočástice pro biomedicínské aplikace

Cílem práce je studium přípravy nanočástic zlata ve vodném roztoku za účelem biomedicínské aplikace. Použil jsem standardní citrátovou redukci s přidáním redukčního činidla. Experimentálně byl zjištěn vliv čerstvosti roztoku zlata na jeho vlastnosti a schopnost tvorby nanočástic. Roztoky zlata jsme analyzovali pomocí optické spektrofotometrie a elektronové mikroskopie. Výsledky z těchto měření byly podrobeny diskuzi.

Klíčová slova

Zlaté nanočástice, citrátová metoda, elektronová mikroskopie, spektrofotometrie

ABSTRACT

Gold nanoparticles for biomedical applications

The aim of the thesis is to study preparation of gold nano particles in aqueous solution for use in biomedical applications. I used standard citrate reduction with addition of reduction agent. Experimentaly I proved influence of date of gold solution preparation on its capability of froming gold nano particles. I analyzed solutions of gold particles with spectrophotometry and electron miscroscopy. Results of the measurements were discussed.

Keywords

Gold nanoparticles, citrate method, electron microscopy, spectrophotometry

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	2
1 Úvod	5
1.1 Úvod do problematiky	5
1.2 Přehled současného stavu	8
1.3 Cíle práce	11
2 Metody	12
2.1 Příprava roztoku	12
2.2 Roztok č. 1 o koncentraci c_1	13
2.3 Elektronová mikroskopie	14
2.4 Zpracování snímků z elektronového mikroskopu	14
3 Výsledky	15
3.1 Roztok č. 1	15
3.2 Roztok č. 2	16
3.3 Roztok č. 4	17
3.4 Roztok č. 5	18
3.5 Roztok č. 6	18
3.6 Roztok č. 7	19
3.7 Roztok č. 8	21
3.8 Roztok č. 9	23
3.9 Roztok č. 10	25
3.10 Roztok č. 11	26
3.11 Roztok č. 12	27
3.12 Analýza snímků z elektronového mikroskopu	29
4 Diskuse	40
5 Závěr	43
Seznam použité literatury	43
Příloha A	46

Seznam symbolů a zkratk

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
λ	nm	Vlnová délka částice
c	m s^{-1}	Rychlost pohybu částice
f	Hz	Frekvence pohybu částice
A	-	Absorbance záření měřena ve spektrofotometru
T	-	Transmitance záření
I_0	W m^{-2}	Intenzita záření před absorbcí vzorkem
I	W m^{-2}	Intenzita záření po průchodu vzorkem
c	mol l^{-1}	Molární koncentrace látky v roztoku
V	l	Objem roztoku
n	mol	Látkové množství látky
m	g	Navážka látky pro přípravu roztoku
M	g mol^{-1}	Molární hmotnost látky
ρ	g l^{-1}	Hustota částic v roztoku

Seznam zkratk

Zkratka	Význam
citrát	vodný roztok $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o různé koncentraci
GNP	Zlaté nano částice (Gold Nano Particle)
SEM	Skenovací Elektronový Mikroskop
TEM	Transmisní Elektronový Mikroskop
UV	Ultra fialové záření (Ultra Violet)
STM	Skenovací Tunelový Mikroskop
AFM	Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
STEM	Skenovací Transmisní Elektronový Mikroskop
AEM	Analytický elektronový mikroskop
NFT	Neurofibrilární spleť (Neurofibrillary Tangle)
MRI	Magnetická rezonance (Magnetic Resonance Imaging)
$A\beta$	Amyloid- β

Seznam obrázků

1.1	Lycurgský pohár [8]	5
1.2	Porovnání principu STM (vlevo) a AFM (vpravo). Modrou barvou je znázorněna skenovací sonda a na povrchu bledě modrou její vlnové vlastnosti, červenou je vyznačen povrch zkoumaného materiálu a bledě červenou vlnové vlastnosti povrchu materiálu.	8
1.3	Absorbanční maxima pro kulovité a tyčinkovité nanočástice [1]	9
1.4	Demonstrace transversálního a longitudálního rozměru	9
3.1	Roztok č. 1 s koncentrací zlatých částic $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ po redukci a stabilizaci	15
3.2	Graf závislosti absorbance na vlnové délce vzorku 1	15
3.3	Snímek roztoku č. 1	16
3.4	Roztok 2 s koncentrací zlatých částic $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ po redukci a stabilizaci	16
3.5	Graf závislosti absorbance na vlnové délce vzorku 2	17
3.6	Snímek roztoku č. 2	17
3.7	Roztok zlata o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$	18
3.8	Absorbční spektrum roztoku č.6	19
3.9	Roztok č. 7 po přidání 10 zrn NaBH_4 vlevo a po přidání 15 zrn vpravo	20
3.10	Roztok č. 7 po přidání 20 zrn NaBH_4 vlevo a po přidání 25 zrn vpravo	20
3.11	Roztok č. 7 po přidání 25 zrn NaBH_4 avychladnutí	21
3.12	Absorbční spektrum roztoku č.7	21
3.13	Výchozí roztok č. 8	22
3.14	Roztok č. 8 po úpravě	22
3.15	Roztok č. 8 po úpravě	23
3.16	Roztok č. 9 před úpravou	23
3.17	Roztok č. 9 po přidání citrátu a varu	24
3.18	Roztok č. 9 s citrátem po vychladnutí	24
3.19	Roztok č. 9 před úpravou	25
3.20	Absorbční spektrum roztoku č.9	25
3.21	Roztok částic zlata o koncentraci $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	26
3.22	Vlevo je roztok zlatých nanočástic o koncentraci $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a vpravo je roztok prosvícen	26
3.23	Graf absorbance v závislosti na vlnové délce vzorku č. 11	27
3.24	Vlevo je roztok zlatých nanočástic o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a vpravo je roztok prosvícen	27
3.25	Graf absorbance v závislosti na vlnové délce vzorku č. 12	28

3.26	Graf absorpance v závislosti na vlnové délce vzorku č. 11 (horní křivka) a č. 12 (dolní křivka)	28
3.27	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	29
3.28	Histogram velikosti částic	29
3.29	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	30
3.30	Histogram velikosti částic	30
3.31	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	31
3.32	Histogram velikosti částic	32
3.33	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	33
3.34	Histogram velikosti částic	33
3.35	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	34
3.36	Histogram velikosti částic	34
3.37	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	35
3.38	Histogram velikosti částic	36
3.39	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	37
3.40	Histogram velikosti částic	37
3.41	Snímek pořízen elektronovým mikroskopem	38
3.42	Histogram velikosti částic	38
4.1	Nosič bez alterace vlevo a nosič s křemíkovým plátem vpravo	41
4.2	Nanesený vzorek nevhodné velikosti vlevo a po odsátí připravený vzorek vpravo	41
4.3	Povlak kapky organického původu způsobující rozostření snímku	42

1 Úvod

1.1 Úvod do problematiky

Úvod do historie nanočástic

Nanočástice byly používány již ve 4. století, kdy sklenáři vyráběli sklo s nanočásticemi zlata a stříbra. Exempláře se objevují v sakrálních stavbách jako dekorativní výplně oken, především v odstínech červené a zelené. Tohoto efektu se využívalo pro zdobné poháry pro vysoce postavené osoby, viz Obr. 1.1.



(a) Foceno s přirozeným osvětlením



(b) Foceno zepředu s bleskem

Obr. 1.1: Lycurgský pohár [8]

Studiem částic velmi malých rozměrů se ovšem začali zabírat až koloidní fyzikové mnohem později. Roku 1915 shrnul dosavadní znalosti koloidní chemie Wolfgang Ostwald a sepsal známou knihu *Svět zapomenutých rozměrů*, ve které rozdělil částice do tří skupin podle velikosti:

1. velkorozměrové disperzní systémy částic větších než $1 \mu m$
2. oblast dispergovaných koloidních částic o rozměrech $1 nm$ až $1 \mu m$
3. oblast molekulárních systémů s rozměrem menším než $1 nm$.

Dlouho se pokládalo za nemožné manipulovat s částicemi rozměrů *nano*, až v padesátých letech 20. století elektroinženýr von Hippel zavedl pojem molekulární inženýrství. Poté laureát Nobelovy ceny fyzik Richard Feynman předpověděl, že částice hmoty mají prostorové rezervy tak velké, že je možné zapsat do krychle o hraně půl milimetru všechny informace světa. Tuto hypotézu uvedl roku 1959 na přednášce *There's Plenty Room at the Bottom*. Tímto položil základ vědě zabývající se částicemi velikosti nanometrů.

Od roku 1981 již byl znám postup k výrobě klastrů kovu pomocí laseru. Roku 1984 byl pozorován jev kvantového omezení, jež byl potvrzen pro polovodiče v Berlínském ústavu Hahn-Meitnerové vědci Hengleinem, Fojtíkem a spol. a také týmem vědců okolo L.E. Bruse v Kalifornii. Následujícího roku byl vytvořen fullerén (C_0). Tyto pokroky následoval rozvoj mikroskopie, která by umožnila zobrazit nanočástice.[3]

Základní pojmy a přehled zobrazovacích systémů

Nejběžnějším přístrojem pro zobrazování a zvětšování vzorků je světelný mikroskop. Paprsky světla jsou zacíleny na vzorek a jejich odraz je zachycen a zpracován soustavou čoček. Předmět pozorujeme v okuláru nebo digitálně zpracováváme. Rozlišovací schopnost určuje paprsek světla, lze tedy zobrazovat předměty zhruba o velikosti 400 nm. Pro zvýšení rozlišení lze využít například UV záření nebo elektronů, ovšem je potřeba jiné aparatury. Elektronová mikroskopie nám umožňuje studium částic světa nanorozměrů. Používá se dvou módů SEM a TEM, které podrobněji popíší níže. Dalšími možnostmi zobrazení jsou AFM nebo STM (viz níže), které umožňují určení kvantových vlastností částic.

Princip elektronového zobrazování [4]

Během posledních padesáti let se začaly používat různé druhy záření, které umožňují zobrazení s větším rozlišením než světelná mikroskopie. Nejvýznamnějším je využití svazku elektronů, který umožňuje pozorování struktur na úrovni jednotlivých atomů.

Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Na počátku 20. století bylo ověřeno, že elektron má vlnové vlastnosti. Tento objev umožnil rozvoj nového odvětví mikroskopie. Energie elektronu 50 keV umožňuje proniknutí pevnou látkou tlustou několik mikrometrů. Můžeme pozorovat difrakci elektronů při průchodu látkou. K zaměření proudu elektronů je využito jejich záporného náboje, lze tedy využít elektrické a magnetické pole k jejich usměrnění. Tento princip známe např. z konstrukce televizí a radarů, které využívají katodové trubice. Právě radary daly vzniku prvním transmisním elektronovým mikroskopům (dále jen TEM). Princip zobrazování je velmi podobný světelným mikroskopům. Z počátku měly elektronové mikroskopy srovnatelné rozlišení se světelnými mikroskopy, ale nyní dosahují rozlišení 0,2 nm při urychlovacím napětí 200 keV.

Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

Nevýhodou TEM zobrazování je nutnost velmi tenkých vzorků, jinak dochází k difrakci až absorpci a znehodnocení obrazu. Příprava takovýchto vzorků je náročná a proto byl vymyšlen způsob, jak využít odražených elektronů či vytvářet emisi

sekundárních elektronů ze vzorku. Tyto mikroskopy se nazývají skenovací elektronové mikroskopy (dále jen SEM) nebo také rastrovací mikroskopy. Generování elektronů probíhá nažhavením vlákna. Princip spočívá v elektromagnetické sondě, která vysílá proud elektronů, jejichž odraz (a také sekundární elektrony) je zachycen. Skenování probíhá ve dvou navzájem kolmých rovinách a poté je obraz spojen. Na rozdíl od TEM neprobíhá ozáření vzorku najednou, ale bod po bodu. Dnešní SEM dosahuje rozlišení 10 až 1 nm.

Skenovací Transmisní elektronový mikroskop (STEM)

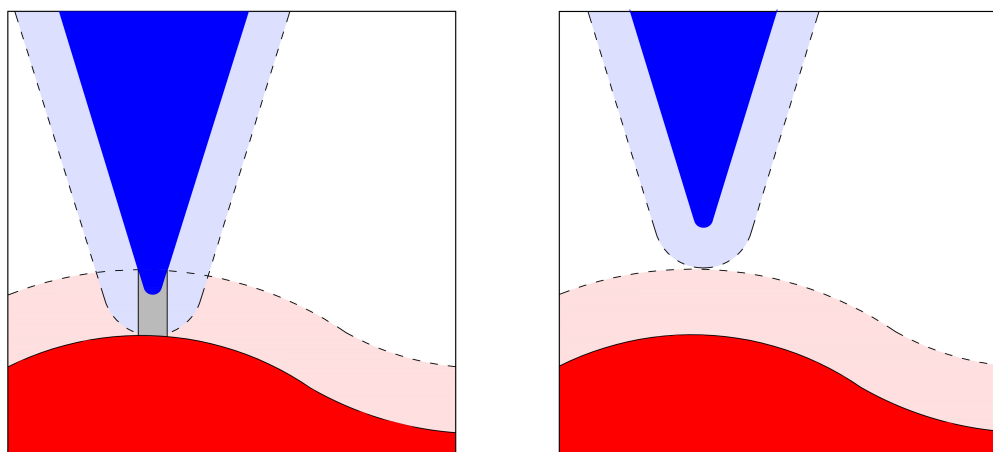
Nyní má mnoho elektronových mikroskopů duální funkci (TEM/SEM). Pro mikroskopování je potřeba velmi tenkých vzorků a namísto sekundárních elektronů se zachycují pronikající elektrony objektem. Princip je založen na ostré wolframové špičce, ze které se emitují elektrony v přítomnosti elektrického pole velké intenzity. K realizaci je ovšem zapotřebí vakua, tedy tlaku 10^{-8} Pa a méně.

Analytický elektronový mikroskop (AEM)

Výše zmíněné zobrazovací techniky nám dávají přehled o struktuře látky, nikoliv o chemickém složení a vazbami mezi atomy. Informace o protonovém atomovém čísle Z nám umožní pochopit tyto vazby, neboť vyjadřuje náboj jádra atomu. V této souvislosti je třeba věnovat pozornost elektronům blízko jádra. Pokud dojde k přesunu elektronu z vyšší do nižší energetické hladiny, vyzáří se rentgenový paprsek. Pokud tedy částici napadneme proudem primárních elektronů, vyzáří se charakteristické rentgenové záření pro danou látku. Přidáním spektrometru rentgenových paprsků k TEM/SEM/STEM tedy získáme AEM. AEM přístroje mohou fungovat také na principu emise Augerových elektronů nebo pozorováním změny energie primárních elektronů po průchodu vzorkem.

Mikroskopy se skenovací sondou [4]

Jiného principu využívají mikroskopy STM (Skenovací Tunelový Mikroskop) a mikroskopy atomárních sil - AFM (z angl. Atomic Force Microscopy). Jsou založeny na mechanické vazbě mezi zkoumaným předmětem a sondou. Nejedná se tedy o žádný zdroj paprsků.



Obr. 1.2: Porovnání principu STM (vlevo) a AFM (vpravo). Modrou barvou je znázorněna skenovací sonda a na povrchu bledě modrou její vlnové vlastnosti, červenou je vyznačen povrch zkoumaného materiálu a bledě červenou vlnové vlastnosti povrchu materiálu.

Skenovací tunelový mikroskop (STM)

První STM vyvinula IBM Zurich Laboratory v roce 1982. Základním předpokladem zkoumání je elektrická vodivost vzorku. Při poklesu vzdálenosti sondy pod úroveň vlivu vlnových vlastností povrchu materiálu vzniká tzv. tunel mezi špičkou sondy a atomem pod ní. V tomto tunelu nepůsobí elektrické síly. Změnou polarity lze *uchopit* atom vzorku a vytrhnout jej. Sonda se přibližuje na vzdálenost až 1 nm. Zápornou zpětnou vazbou je zajištěno udržování vzdálenosti mezi hmotou a sondou. K provedení rastru je použito piezo struktur. Touto metodou dosahujeme rozlišení lepšího než 0,01 nm. Lze také využít spektrometru pro další analýzu.

Mikroskopie atomárních sil (AFM)

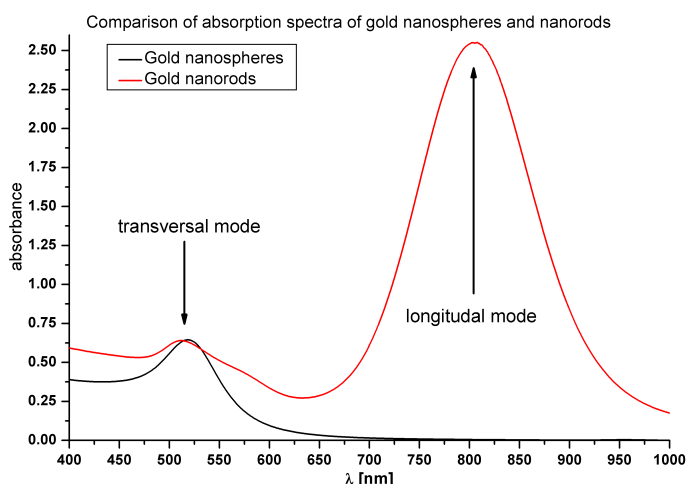
Tato metoda mikroskopování vychází z principu STM. Zde však sonda není tak blízko povrchu atomu, ale nachází se na hranici vlivu kvantových vlastností hmoty. Špička sondy je vyrobena technologií užívanou v polovodičovém průmyslu, je tedy snadněji nahraditelná než u STM. Další výhodou je, že zkoumaný vzorek nemusí být elektricky vodivý a lze provádět měření ve vodném prostředí. [4]

1.2 Přehled současného stavu

Nanočástice lze připravit mnoha způsoby: UV zářením, litograficky, pomocí ultrazvuku, chemicky, laserem nebo aerosolově. Jelikož se často jedná o zdraví škodlivé látky a postupy, existuje snaha se tomuto způsobu přípravy vyhnout a hledat řešení v přírodních materiálech. V posledních letech se rozvíjí tzv. Green nanoparticle synthesis, tedy syntéza nanočástic s použitím organických a přírodních činidel. K použití jsou vhodné například extrakty z čaje, kávy a různých druhů ovoce. Z těchto

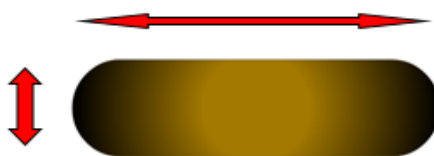
rostlin jsou důležité převážně polyfenoly jako redukční činidla i stabilizátory. Naopak minoritně je využívána syntéza pomocí mikroorganismů. Vliv prostředí syntézy má vliv na morfologii vzniklých částic. Mezi hlavní prvky ovlivňující výsledek patří teplota, přítomné částice. Vliv halogenových prvků, zejména Cl^- a I^- byl studován se zjištěním, že za přítomnosti chloridů vznikají sférické částice a za přítomnosti iodidů trojúhelníkové útvary. Výhodou přírodní syntézy nanočástic je absence ochrany povrchu před shlukováním a jednotlivé postupy jsou použitelné u velké škály kovů, nejsou specifické. Ovšem zatím nejsou zavedené metody výroby zelených nanočástic v průmyslových počtech, jedná se pouze o laboratorní testy. [6]

Za nanočástice jsou považovány materiály s rozměry menšími než 1000 nm, které vykazují odlišné vlastnosti než identický materiál ve větších rozměrech. Mezi nejviditelnější rozdíl patří barevná změna. Proto pro raný popis nanočástic je použita spektrofotometrie, kdy lze srovnávat podobné roztoky. Srovnáním dvou roztoků lze odhadnout vzájemnou velikost částic, tvar částic. Hodnotí se lokace maxima vzhledem k ose vlnové délky, šířka vrcholu absorbanční křivky a počet vrcholů. Počet maxim absorbance charakterizuje tvar vzniklých nanočástic viz Obr. 1.3.



Obr. 1.3: Absorbanční maxima pro kulovité a tyčinkovité nanočástice [1]

Obrázek znázorňuje křivku absorbance pro kulovité částice (černá) a pro tyčinkovité částice (červená). Pokud má částice všechny rozměry srovnatelné velikosti, má tvar koule a vykazuje pouze transversální (příčné) maximum. Pokud jeden rozměr částice výrazně převyšuje zbylé dva, jedná se o tyčinku a na grafu absorbance pozorujeme transversální i logitudální (podélné) maximum viz Obr. 1.4.



Obr. 1.4: Demonstrace transversálního a longitudálního rozměru

Svislá šipka znázorňuje transversální směr tyčinkovité částice. Vodorovná šipka znázorňuje longitudální rozměr. Každá částice hmoty osciluje kolem své rovnovážné polohy. Kulová částice vibruje s určitou frekvencí, pokud tu samou částici prodloužíme, začne oscilovat také na frekvenci charakteristické pro nový rozměr. Výslednou částici tedy charakterizuje frekvence oscilace původní kulovité částice a také frekvence, se kterou osciluje největší rozměr částice. Jelikož vlnová délka souvisí s frekvencí vztahem (1.1)

$$\lambda = \frac{c}{f}, \quad (1.1)$$

kde λ (nm) je vlnová délka v nanometrech, c (m s^{-1}) je rychlost šíření elektromagnetického záření ve vakuu v metrech za sekundu a f (Hz) je frekvence v Hertzích, můžeme dále mluvit o vlnové délce, která je součástí grafu absorbance. Vlnová délka vibrační částice určuje část světelného spektra, která je touto částicí absorbována. Pro pozorovatele je tento jev pozorovatelný jako zbarvení částice barvou doplňkovou k absorbované. Zlaté kulovité nanočástice oscilují na vlnové délce přibližně 540 nm, tyčinkové částice oscilují okolo 540 nm transversální vibrační a okolo 800 nm longitudální vibrační. Nanočástice umožňují další rozvoj v oblasti diagnostiky i terapie a to bezpečnějším a efektivnějším způsobem. Zvláště zlaté nanočástice umožňují využití v biomedicíně. Jsou vhodné k distribuci léčiv přímo do cílové oblasti, jsou vhodné jako kontrastní látky a lze je použít k léčbě nádorových onemocnění různými způsoby. Živým organismem jsou dobře přijaty a snášeny. Pro využití je velmi důležité mít kontrolu nad cirkulací zlatých nanočástic. Mnohé studie popisují využití receptorově řízené endocytózy. Zlaté nanočástice se do buňky dostanou v endosomech, reagují při spojení s lysozomy a opouští buňku v exocytech. Tímto způsobem nedochází k rozptýlení nanočástic do těla a lze kontrolovat cirkulaci. [2]

Alzheimerova choroba

Alois Alzheimer popsal v roce 1907 případ ženy, u níž se projevila gradující ztráta paměti a narušení psychických schopností. Tento její stav se rozvíjel 4 roky a následně zemřela. Ačkoliv existovaly diagnózy s podobnými příznaky, o klasifikaci nové nemoci rozhodl nález nového příznaku, neurofibrinního propletence (neurofibrillary tangle NFT) spolu s brzkým nástupem oproti jiným neurologickým chorobám. Nemoc se projevuje postupnou ztrátou paměti, orientace, schopnosti učení. Jedním z prvních příznaků je neschopnost vykonávat běžné úkony jako vést konverzaci, oblékat se, či nakupovat. Důležitý je postupný pokles aktivity, jelikož velmi podobné příznaky mají i jiné patologické stavy jako mrtvice, infekce nebo nedostatek esenciálních látek. Mezi rizikové faktory patří věk, rodinná anamnéza, vasculární onemocnění a pohlaví, ženy jsou náchylnější k onemocnění. Menší výskyt je pozorován u vysokoškolsky vzdělaných. Riziko výskytu nemoci u jedince se téměř zdvojnásobuje

každých pět let, viz Tabulka 1.1.

Tabulka 1.1: Incidence Alzheimerovy nemoci s narůstajícím věkem

Věk (let)	65-69	70-74	75-79	80-84	85+
Incidence (%)	0,6	1,0	2,0	3,3	8,4

Hlavními znaky jsou senilní plaky, které se s věkem běžně vyskytují, a neurofibrilární uzly. Primární složkou plaků jsou Amyloid- β proteiny, které jsou rozpustné v kyselině mravenčí. Jak jsem již zmínil, existuje menší prevalence u lidí s vyšším vzděláním. Ovšem není doloženo, jestli je to celkově nižším socioekonomickým statusem nebo pouze zvýšenou mentální činností. Se statusem souvisí sklon ke kouření, konzumaci alkoholu a dietní návyky. [9]

Existují farmakologické způsoby léčby, ale hlavním problémem je bariéra mezi mozkovou tkání a krevním řečištěm, která je pro mnoho částic neproniknutelná. Za použití nanočástic zlata se podařilo připravit a dopravit inhibitor auto kompletae Amyloidu- β . [10] Prevencí je úprava životního stylu, rizikové skupiny jsou kuřáci, obézní lidé a lidé s hypertenzí. Jako vhodný dietní směr se ukázala středomořská strava [9]. Myšlenku využití zlatých nanočástic podporuje skupina vědců spolu s Mirsadeghi. Uvádí, že ačkoliv jsme již schopni vyrobit nanočástice, které prostupují bariéru mezi mozkem a krví, stále neexistuje spolehlivá diagnostika. Ta se nyní provádí různými testy kognitivních funkcí, detekcí nespecifických příznaků demence a krevními testy. Jelikož není efektivní léčba, ale pouze oddalování příznaků a zpomalování zhoršování kognitivních funkcí, je detekce Alzheimerovy nemoci v brzkém stádiu nezbytností. Toho lze docílit využitím vyjimečných optických vlastností GNP a navázáním vhodného monomeru můžeme pomocí MRI detekovat $A\beta$. Výhodou při použití tohoto kovu jsou prokázané vlastnosti pro zamezení tvorby $A\beta$. Navíc podporuje vstřebávání ranných shluků těchto polypeptidů a tím zároveň slouží pro detekci i snižování obsahu $A\beta$ v mozkové tkáni. [11]

1.3 Cíle práce

Cílem bakalářské práce je studium a příprava nanočástic zlata o vhodném rozměru pro využití v biomedicíně. Zlaté nanočástice mají potenciál stát se nositeli farmak, mimo jiné pro léčení Alzheimerovy nemoci. Na vytvořenou částici se vhodným způsobem naadsorbují látka, která má schopnosti zflexibilnit ztvrdlé buňky, které jsou postiženy Alzheimerovou nemocí a nejsou schopny vykonávat paměťovou funkci. Počátkem je vytvořit nanočástice ve vodném roztoku, ve vodném proto, aby byly biokompatibilní. Tyto práce jsou prováděny ve spolupráci s Ústavem experimentální medicíny Akademie věd České republiky za účelem vyrobit částice vhodné velikosti a vlastností.

2 Metody

Výchozím roztokem byl standardní roztok zlata navázaný na SRM NIST (kyselina tetrachlorozlatitá v kyselině chlorovodíkové 2 mol l^{-1}) o koncentraci zlatých částic 1000 mg l^{-1} . Aby bylo možné udržet částice zlata separované, je třeba přidat redukční činidlo, v našem případě citrát. Ten se naváže na částice zlata a zabrání jejich zpětnému shlukování do větších částic [5]. Aby byly zdredukovány všechny částice zlata, musí být koncentrace redukčního činidla stejná jako koncentrace zlata. Vyzkouším několik možností adice činidla do roztoku. Například za studena, za varu, postupně nebo všechno najednou. Úspěšné zhotovení roztoku zlatých nanočástic je indikováno barevnou změnou ze žluté do červené. Pokud k této změně nedochází, přidáme jiná redukční a stabilizační činidla. Po vychladnutí roztoku na pokojovou teplotu změříme vůči slepému vzorku destilované vody absorbanci na spektrofotometru. Naměřená data uložíme ve formátu kompatibilním s prohlížečem tabulek pro zpracování výsledků. Graf absorbance vyjadřuje míru pohlcení paprsku při průchodu vzorkem. Vlnová délka paprsku se během měření mění a výsledkem je křivka závislosti absorbance na vlnové délce světelného paprsku.

$$A = -\log_{10}T, \quad (2.1)$$

kde A je absorbance, T je transmitance a je vyjádřena vztahem

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad (2.2)$$

kde I je intenzita světla, která prošla vzorkem a I_0 je intenzita světla do vzorku vstupujícího.

Připravený roztok změříme elektronovým mikroskopem, abychom zjistili velikost nanočástic a data mohli statisticky zpracovat. Při zředování zásobního roztoku zlata (zásobním nazývám roztok připravený ze standardního) na jinou požadovanou koncentraci jsem využil směšovací rovnice:

$$c_x \cdot V_x = c_y \cdot V_y \quad (2.3)$$

$$(2.4)$$

2.1 Příprava roztoku

Při přípravě roztoku zlata o určité koncentraci jsme postupovali následovně. Pro ukázkový výpočet uvádím přípravu 50 ml roztoku zlata o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Odměrnou baňku se zábrusem o objemu 50 ml jsme stříčkou naplnili zhruba do

poloviny destilovanou vodou.

$$n_{Au} = c_{zas} \cdot V_{zas} \quad (2.5)$$

$$m_{Au} = n_{Au} \cdot M_{Au} \quad (2.6)$$

$$\begin{aligned} V_{Au} &= \frac{m_{Au}}{\rho_{Au}} & (2.7) \\ &= \frac{c_{zas} \cdot V_{zas} \cdot M_{Au}}{\rho_{Au}} \\ &= \frac{1 \cdot 10^{-3} \cdot 50 \cdot 10^{-3} \cdot 196,97}{1} \text{ l} \\ &\doteq 9,85 \text{ ml} \end{aligned}$$

n_{Au} (mol) je látkové množství zlatých částic, c_{zas} (mol l^{-1}) je koncentrace zlata ve výsledném roztoku, V_{zas} (ml) je objem výsledného roztoku, m_{Au} (g) je hmotnost zlata, M_{Au} (g mol^{-1}) je molární hmotnost zlatých částic, V_{Au} (ml) je potřebný objem standardního roztoku, ρ_{Au} (g l^{-1}) je hustota zlata ve standardním roztoku. Dle výše uvedeného výpočtu jsem automatickou pipetou přidal 9,85 ml standardního roztoku zlata a dolil destilovanou vodou po rysku.

2.2 Roztok č. 1 o koncentraci c_1

Dále jsem připravil roztok o koncentraci $c_1 = 1 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ v objemu $V_1 = 50 \cdot 10^{-3} \text{ l}$. K výrobě roztoku jsem využil zásobního roztoku a směšovací rovnice (2.3).

$$\begin{aligned} c_{zas} \cdot V_{zas} &= c_1 \cdot V_1 \\ V_{zas} &= \frac{c_1 \cdot V_1}{c_{zas}} \\ &= \frac{1 \cdot 10^{-4} \cdot 50 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-3}} \text{ l} \\ &= 5 \cdot 10^{-3} \text{ l} \end{aligned}$$

Po dosažení požadované koncentrace jsem přidal citrát tak, aby se výsledná koncentrace rovnala koncentraci zlata v roztoku. Úpravou rovnice (2.3) jsem vypočetl množství citrátu (V_{cit}), které musíme přidat ze zásobního roztoku o koncentraci

$c_{cit} = 1 \cdot 10^{-1} \frac{mol}{l}$, abych docílil stejné koncentrace jako je koncentrace zlata:

$$\begin{aligned}c_{cit} \cdot V_{cit} &= c_1 \cdot (V_1 + V_{cit}) \\V_{cit} &= \frac{c_1 \cdot V_1}{c_{cit} - c_1} \\&= \frac{1 \cdot 10^{-4} \cdot 50 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-4}} \\&= 50 \cdot 10^{-6} l\end{aligned}$$

Jelikož je V_{cit} malé vůči celkovému objemu roztoku (tísíckrát menší), budu tento přírůstek v dalších přípravách zanedbávat a koncentraci vypočítám úpravou rovnice (2.3), kde V_y bude objem roztoku před přidáním citrátu.

Citrát přidáváme po kapkách za stálého míchání pomocí magnetické míchačky. Jelikož se nedaří připravit stabilní roztok, je přidána želatina v experimentálním množství potřebném pro udržení červeného zbarvení. Na závěr bylo přidáno želatiny, která působí jako stabilizační prvek proti shlukování redukováných částic.

2.3 Elektronová mikroskopie

Po přípravě velmi čistého roztoku s minimálním obsahem příměsí o vhodné koncentraci částic lze vzorek podrobit mikroskopii. Protože analyzuji kovové částice, které jsou kontrastní, nemusím roztok dále upravovat. Na držák vzorků umístím mřížku určenou pro aplikaci vzorků. Naneseme vzorek, vložíme do elektronového mikroskopu a zahájíme proces přípravy. Komora je evakuována a je vytvořen zaměřovací scan. Po vybrání požadované oblasti následuje skenování v reálném čase, dle potřeby.

2.4 Zpracování snímků z elektronového mikroskopu

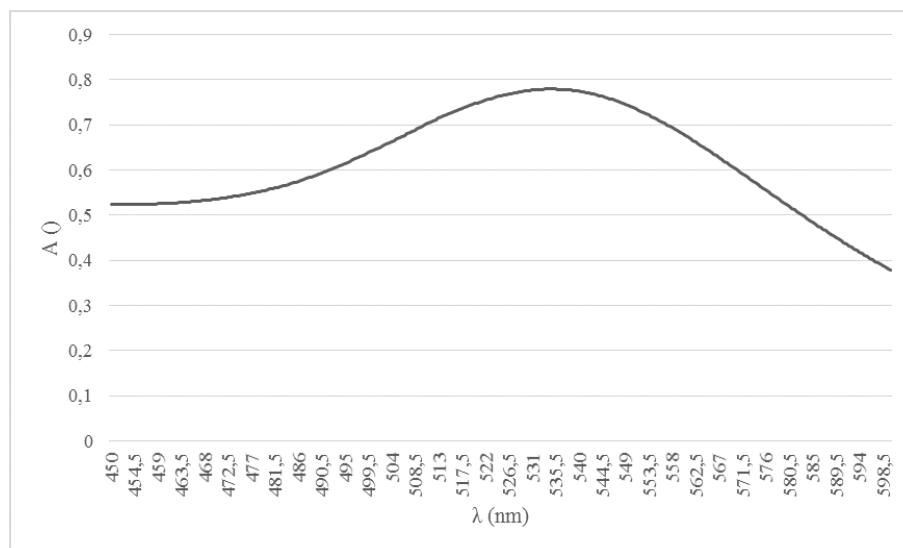
Spočtu průměrnou velikost částic z pořízených snímků. V počítačového programu pro zpracování obrazových dat kalibruji měřítko pro jeden pixel. Použitím nástroje úsečka označíme průměr částice. Abych standardizovali měření, měřím největší průměr částice ve vodorovném směru (pod úhlem 0°). Ze získaných výsledků vypočtu průměr.

3 Výsledky

3.1 Roztok č. 1

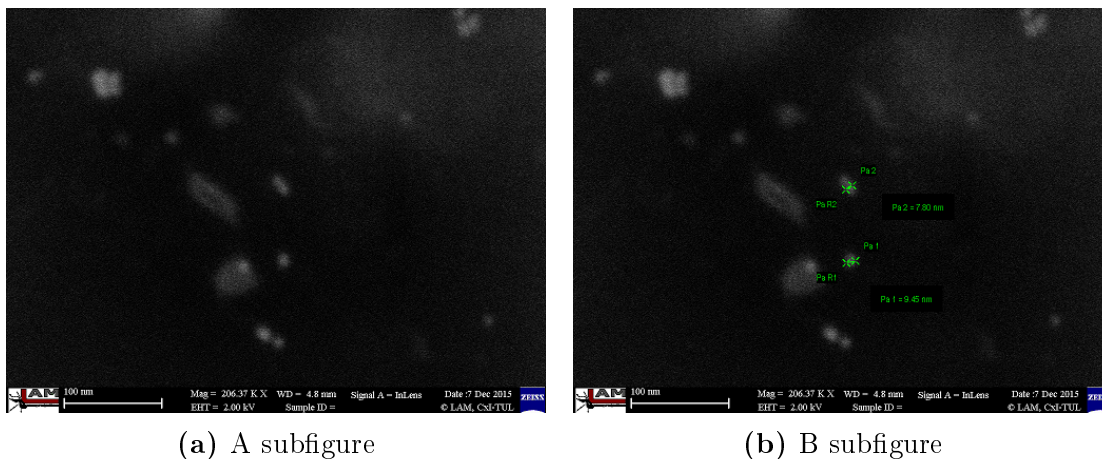


Obr. 3.1: Roztok č. 1 s koncentrací zlatých částic $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ po redukci a stabilizaci



Obr. 3.2: Graf závislosti absorpance na vlnové délce vzorku 1

Z grafu je patrné, že hodnota absorpance je nejvyšší pro vlnovou délku $\lambda = 534,5 \text{ nm}$, což odpovídá vlnové délce zeleného světla. Částice roztoku červené barvy absorbují zelenou část spektra viditelného světla.



(a) A subfigure

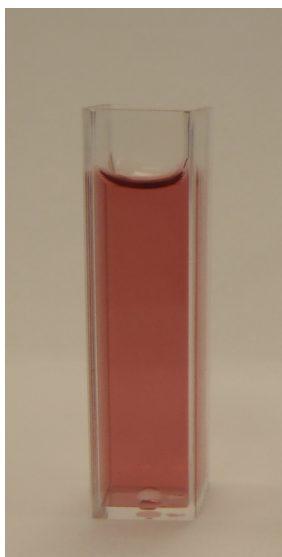
(b) B subfigure

Obr. 3.3: Snímek roztoku č. 1

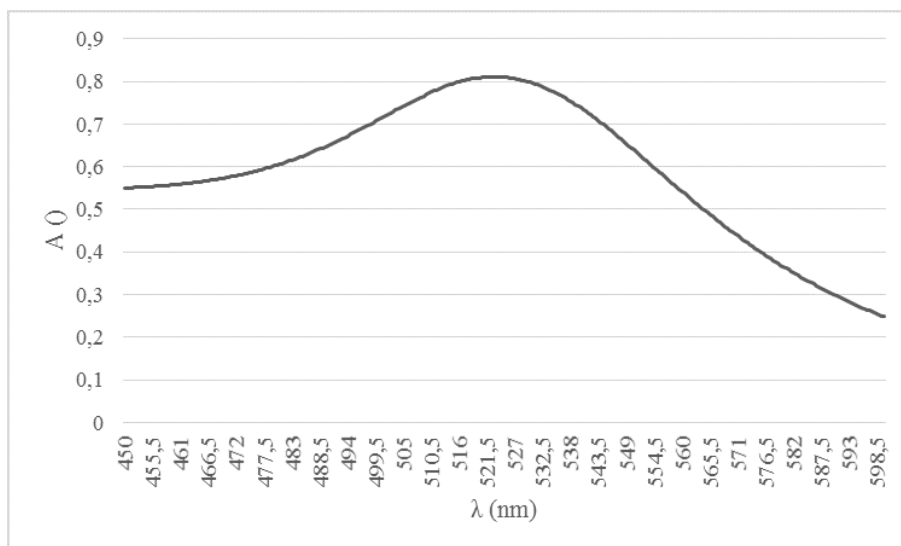
V Ústavu pro Fotoniku a Elektroniku byl vytvořen snímek vzorku pomocí elektronového mikroskopu. Na snímku nelze vidět částice zlata, jelikož je přítomno příliš mnoho stabilizátoru a ten zastíňuje zkoumané částice.

3.2 Roztok č. 2

Roztok o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a objemu 50 ml jsme připravili odměřením 5 ml zásobního roztoku a dolili na 50 ml.

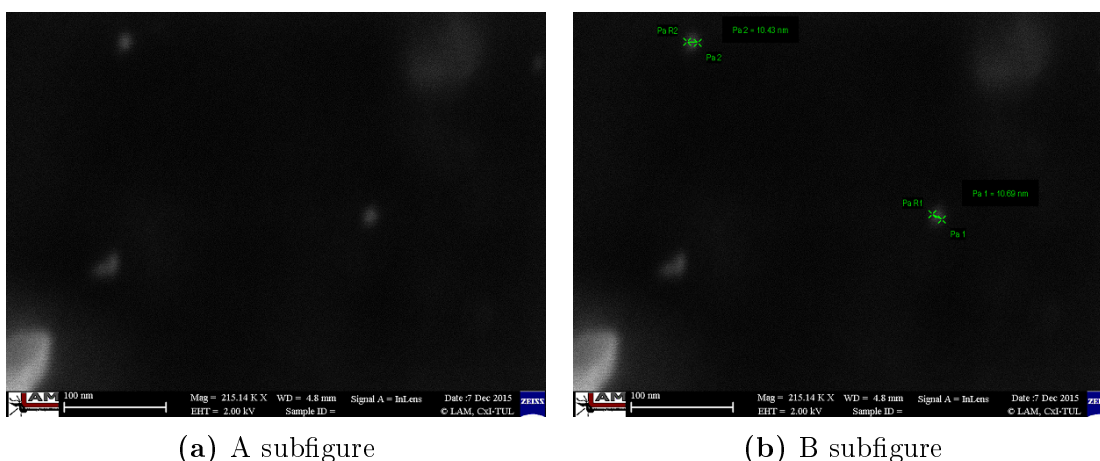


Obr. 3.4: Roztok 2 s koncentrací zlatých částic $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ po redukcí a stabilizaci



Obr. 3.5: Graf závislosti absorpance na vlnové délce vzorku 2

Z grafu můžeme vyčíst, že hodnota absorpance je nejvyšší pro vlnovou délku $\lambda = 523 \text{ nm}$, což je kratší vlnová délka než u vzorku 1.



(a) A subfigure

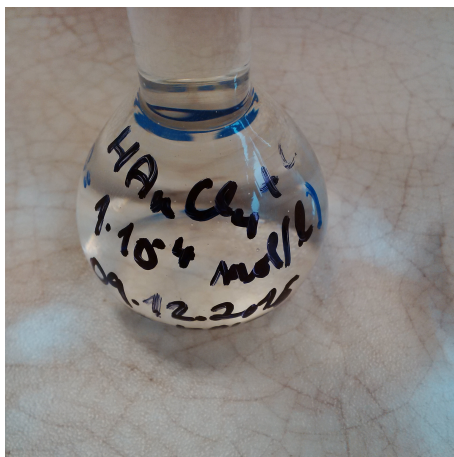
(b) B subfigure

Obr. 3.6: Snímek roztoku č. 2

3.3 Roztok č. 4

Navážením 1,47 g citrátu a dolitím destilovanou vodou do 50 ml jsme získali redukční roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$. Roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ jsme připravili tak, že jsme ze standardního roztoku zlata odebrali automatickou pipetou 490 μl do odměrné baňky a doplnili na 25 ml, viz Obr. 3.7. Roztok jsme po promíchání převedli do kádinky, přidali magnetické míchadlo a zapnuli míchání na 600 rpm. Pasteurovou pipetou jsme po 1 kapce přidávali připravený citrát. Předem

vypočítaný potřebný objem pro redukcí je 25 μl . Při tomto množství citrátu v roztoku nenastala žádná změna, proto jsem opakovaně přidal bolus citrátu o celkovém objemu přibližně 20 μl .



Obr. 3.7: Roztok zlata o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$

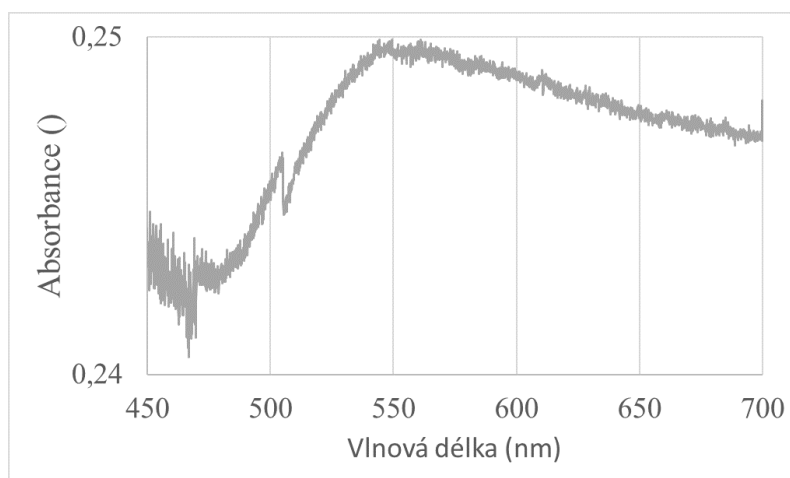
3.4 Roztok č. 5

Tento roztok jsem připravoval dle popisu na straně 2 článku Optimized bio-nano interface using peptide modified colloidal gold nanoparticles (viz [2]). Roztok zlata jsem připravil odměřením 3 ml HAuCl_4 a dolitím destilovanou vodou do 30 ml. Citrát jsem připravil do odměrné baňky o objemu 25 ml odebráním 9,6 ml roztoku citrátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ a dolitím destilovanou vodou. Roztok zlata jsem převedl do kádinky, umístil na magnetickou míchačku a za stálého míchání a ohřívání jsem roztok přivedl k varu. Po dosažení varu jsem přidal 600 μl citrátu a při otáčkách míchadla 500 rpm a teplotě 200°C vařil roztok 5 min. Dle návodu mělo dojít k barevné změně z čiré přes tmavě modrou do červené, ovšem v mém roztoku k této změně nedošlo ani po vychladnutí na pokojovou teplotu.

3.5 Roztok č. 6

Pro tento roztok jsem použil předem připravených roztoků citrátu a zlata vyrobené pro roztok č. 5 dvakrát. Použil jsem 25 μl roztoku citrátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ a doplnil jej do 25 ml destilovanou vodou. Citrát jsem za stálého míchání přilil do předpřipraveného roztoku zlata o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a objemu 25 ml. Jelikož nedošlo k barevné změně, přidal jsem silnější činidlo NaBH_4 . Po každém přidaném krystalku se uvolní vodík a ten způsobí velmi výbušné, ale krátkodobé šumění roztoku. Nejprve jsem přidal 9,16 μg , což způsobilo temně šedomodré zbarvení, které bledlo. Jelikož se mi nepodařilo získat roztok červené barvy, přidal jsem po ustálení

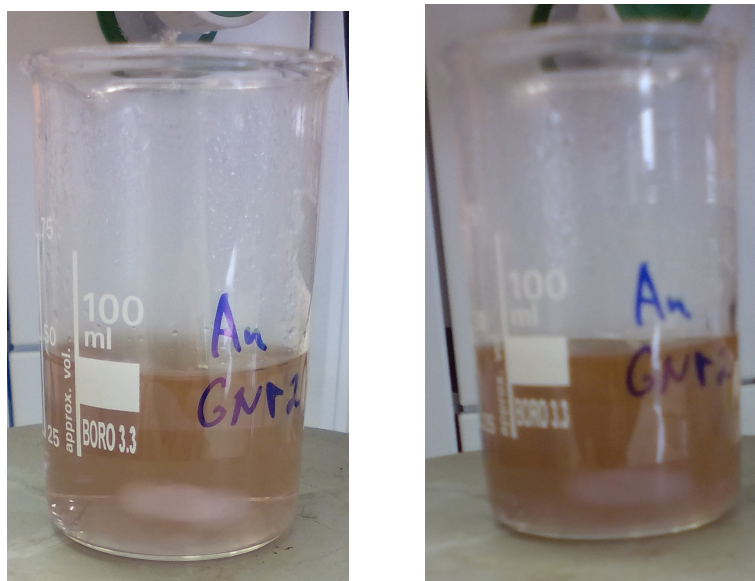
barvy množství 3,06 μg . Nastala opět prudká barevná změna s ustálením na šedo-modrém odstínu. Přidal jsem 8,09 μg a po ustálení byla barva roztoku šedá. Roztok jsem proměřil spektrometrem, viz Obr. 3.8.



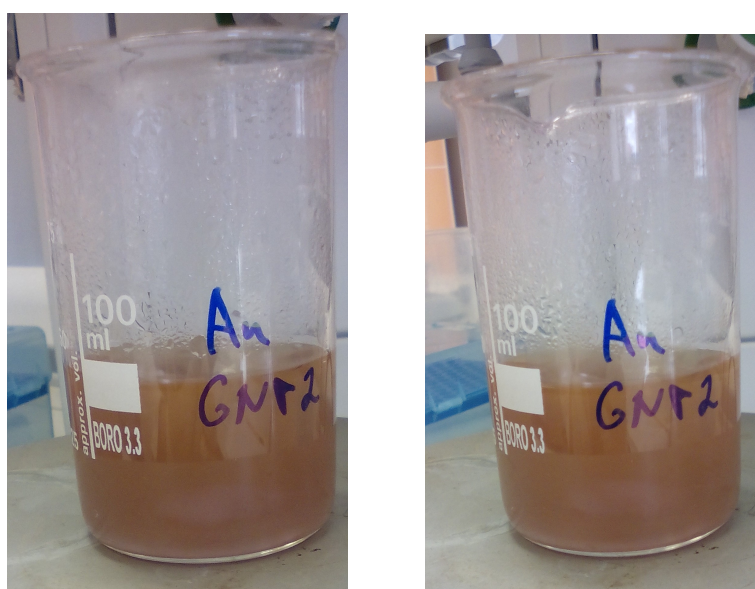
Obr. 3.8: Absorbční spektrum roztoku č.6

3.6 Roztok č. 7

Roztok o koncentraci zlata $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ jsem připravil odměřením 10 ml standardního roztoku a doplněním do 50 ml destilovanou vodou. Navážil jsem 14,95 g krystalického citrátu a rozpustil jej ve zhruba 4 ml. Roztok zlata jsem uvedl do varu a po kapkách přidával Pasteurovou pipetou citrát. Po přidání veškerého citrátu jsem nechal roztok 10 min vařit. Protože nedocházelo ke změně barvy, začal jsem přidávat krystalky NaBH_4 , přičemž jsem vždy vyčkal na ustálení barvy. Ze začátku se zbarvení prudce změnilo na hnědou barvu, ale následně se změnilo zpět do světle žluté. Postupně se bouřlivé zbarvení po přidání činidla zbarvení změnilo z hnědé na červené a po následném blednutí se méně vracelo ke žluté barvě roztoku viz Obr. 3.9 a Obr. 3.10.

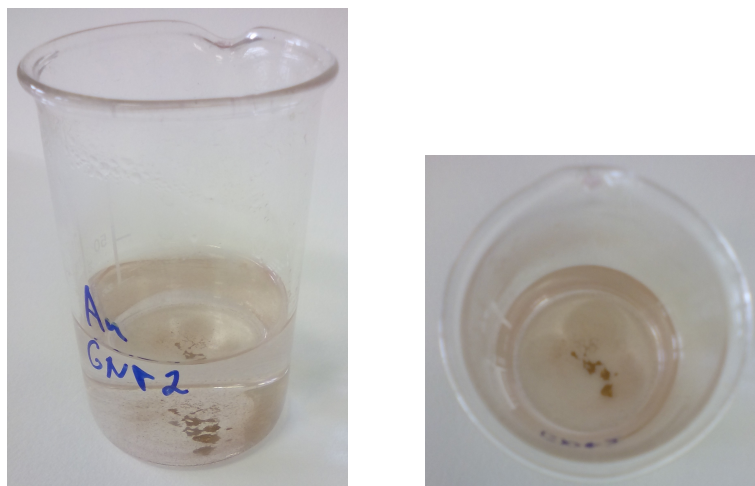


Obr. 3.9: Roztok č. 7 po přidání 10 zrn NaBH_4 vlevo a po přidání 15 zrn vpravo

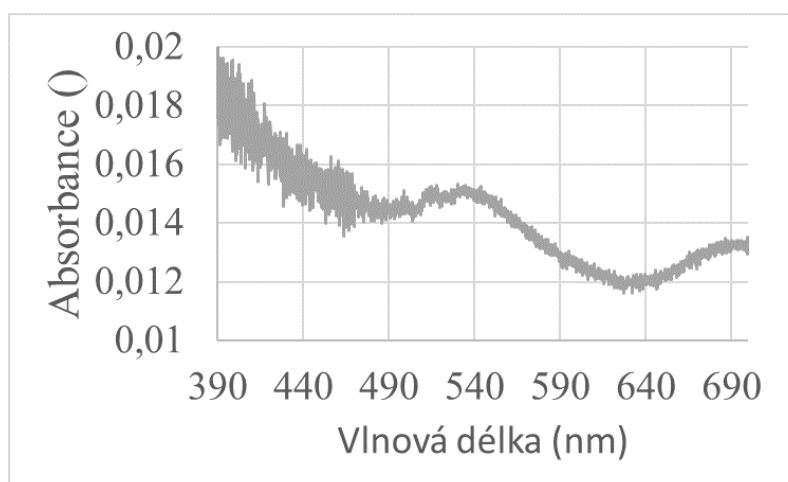


Obr. 3.10: Roztok č. 7 po přidání 20 zrn NaBH_4 vlevo a po přidání 25 zrn vpravo

Poté co se přestala měnit barva roztoku jsem vypnul ohřívání a nechal roztok míchat. Po vychladnutí měl roztok světle růžovou barvu. Tento roztok nanočástic zlata nebyl stabilní, během jednoho týdne se nanočástice rozpadly.



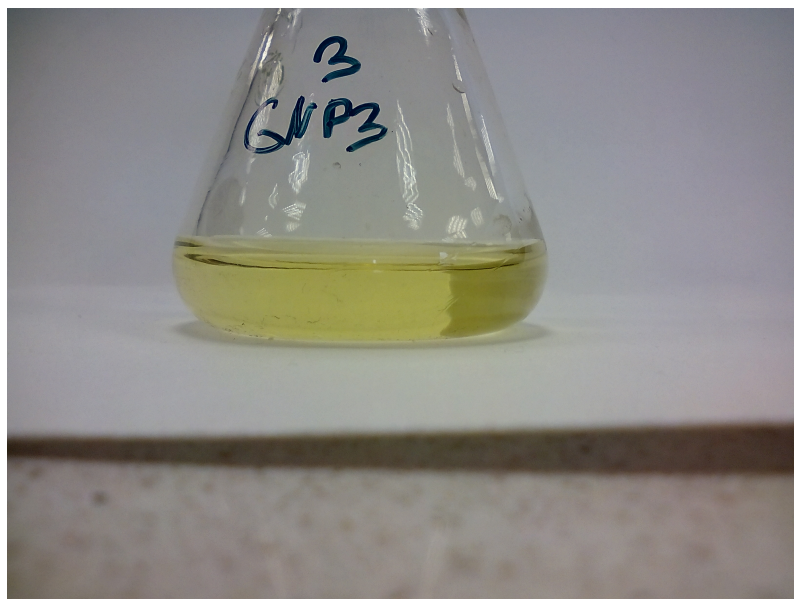
Obr. 3.11: Roztok č. 7 po přidání 25 zrn NaBH_4 avychladnutí



Obr. 3.12: Absorbční spektrum roztoku č.7

3.7 Roztok č. 8

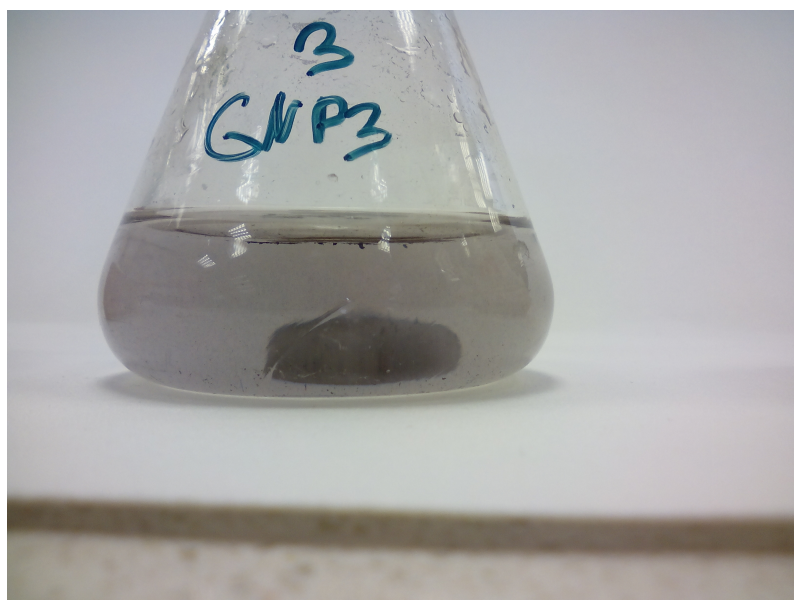
4 ml standardu jsem dolil destilovanou vodou do 20 ml. Roztok jsem uvedl do varu. Připravil jsem roztok *C* citrátu navážením 0,050 g a rozpuštěním v 5 ml. 2 ml roztoku citrátu jsem za varu najednou přidal do roztoku zlata, nechal 12 min vařit a poté nechal zchladnout.



Obr. 3.13: Výchozí roztok č. 8

Poté jsem dolil destilovanou vodou ztráty vzniklé odpařováním a opět přivedl k varu. Jelikož nedocházelo k žádným barevným změnám, zředil jsem roztok zhruba 40 ml destilované vody a roztok rozdělil do dvou kádinek.

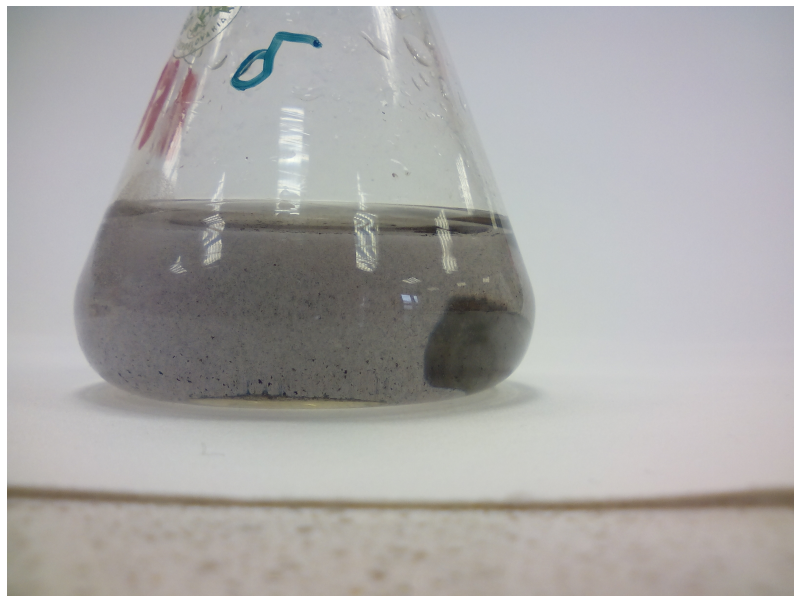
Do první kádinky jsem přidal citrát *C* o objemu zhruba 1,5 ml, poté jsem přidal 0,02 g citrátu rozpuštěného v 6 ml destilované vody. Nechal jsem roztok vychladnout a přidal za studena NaBH_4 . Po bouřlivé reakci se z černé barvy usadil roztok na šedé barvě a vznikly usazeniny.



Obr. 3.14: Roztok č. 8 po úpravě

Roztok ve druhé kádince jsem nechal zchladnout. Za studena jsem přidával NaBH_4 po 1 zrně, kdy roztok okamžitě změnil barvu na tmavě modrou. Postupně

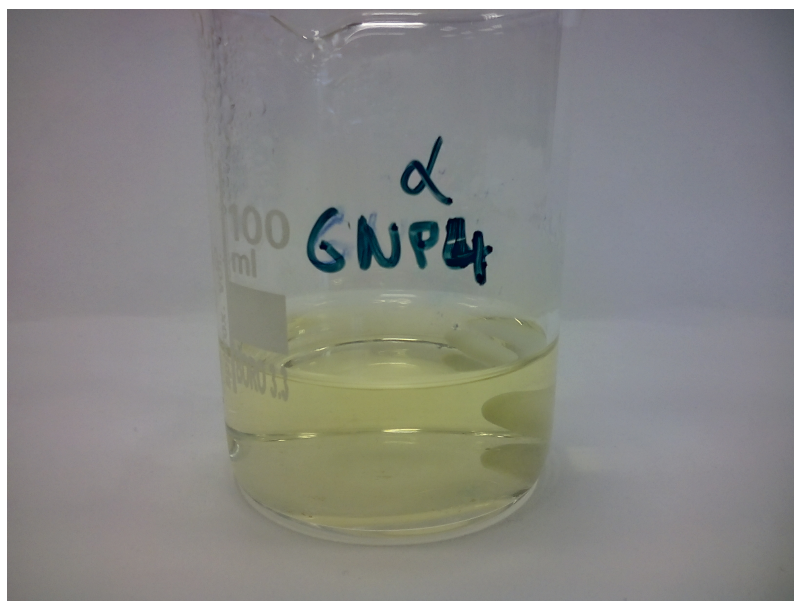
roztok po přidávání NaBH_4 blednul, až se zabarvení usadilo na modrém odstínu a vytvořila se sraženina.



Obr. 3.15: Roztok č. 8 po úpravě

3.8 Roztok č. 9

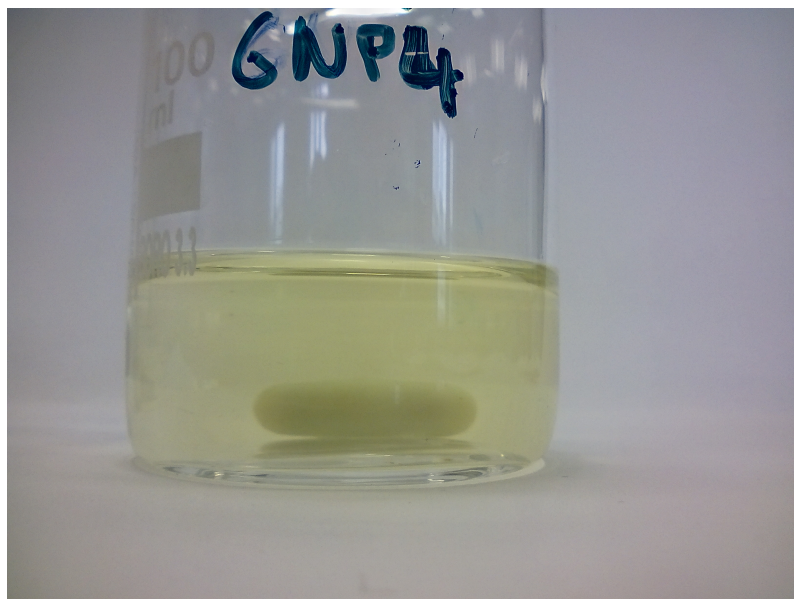
Připravil jsem si roztok o koncentraci zlata $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ odměřením 5 ml standardu a doplněním na 50 ml. Roztok citrátu jsem si připravil navážením 0,0577 g krystalického citrátu a rozpuštěním v 5 ml.



Obr. 3.16: Roztok č. 9 před úpravou

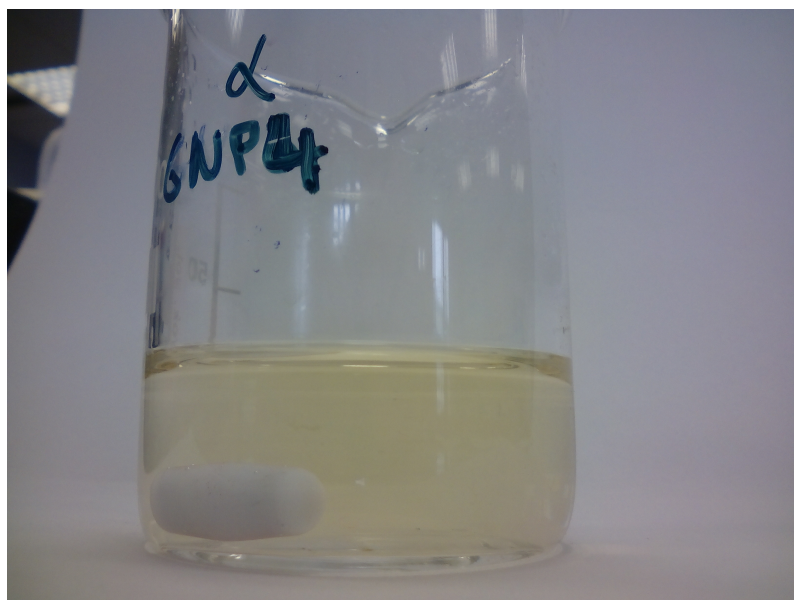
Roztok zlata jsem uvedl do varu a při otáčkách 900 rpm jsem najednou přidal

připravený citrát. Nenastala žádná barevná změna. Roztok jsem nechal 14 min vařit a poté odstavil.



Obr. 3.17: Roztok č. 9 po přidání citrátu a varu

Po ochlazení roztoku jsem jej opět uvedl do varu. Ztráty způsobené výparem jsem dolil destilovanou vodou. Přidal jsem přibližně 1,5 ml citrátu *C* (viz příprava roztoku č. 8) a po chvíli opět 1,5 ml.



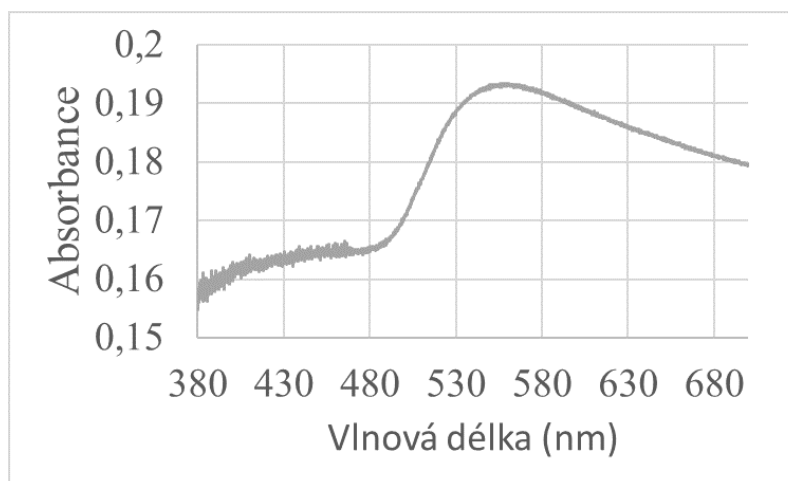
Obr. 3.18: Roztok č. 9 s citrátem po vychladnutí

Protože nenastala změna, uvedl jsem roztok do varu a přidal 2 zrna NaBH_4 . Roztok změnil barvu na černou a poté na hnědou a zpět na žlutou. Roztok jsem odstavil a nechal chladnout. Dolil jsem přibližně 15 ml destilované vody na pokrytí ztrát výparem a přidal 1 zrno NaBH_4 . Získal jsem roztok růžové barvy, který bledne.



Obr. 3.19: Roztok č. 9 před úpravou

Opět jsem přidal 1 zrno NaBH_4 , vzniknul fialový roztok, který stále blednul. Přidal jsem další 4 zrna NaBH_4 a roztok se ustálil na šedomodré barvě.



Obr. 3.20: Absorbční spektrum roztoku č.9

3.9 Roztok č. 10

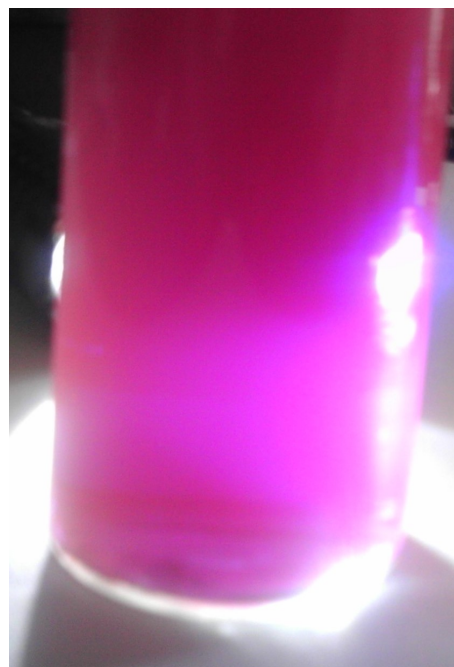
Byl připraven roztok zlata o koncentraci $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Prekurzorem byl silně hygroskopický krystalický $\text{HAuCl}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ o navážce 120 mg. Toto množství bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody.



Obr. 3.21: Roztok částic zlata o koncentraci $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

3.10 Roztok č. 11

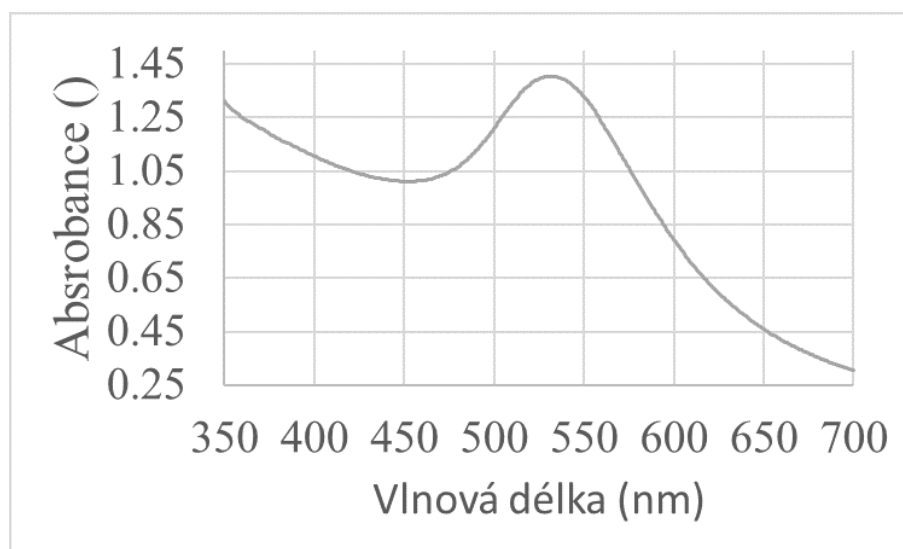
Roztok o koncentraci $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a objemu 25 ml jsem připravil odebráním 14 ml roztoku č. 10 a dolitím do 25 ml. Přidáním velmi malého zrnka NaBH_4 vznikl roztok červené barvy.



Obr. 3.22: Vlevo je roztok zlatých nanočástic o koncentraci $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a vpravo je roztok prosvícen

Podářilo se nám vytvořit nanočástice zlata. Roztok jsme měřili pomocí spektro-

fotometru.



Obr. 3.23: Graf absorbance v závislosti na vlnové délce vzorku č. 11

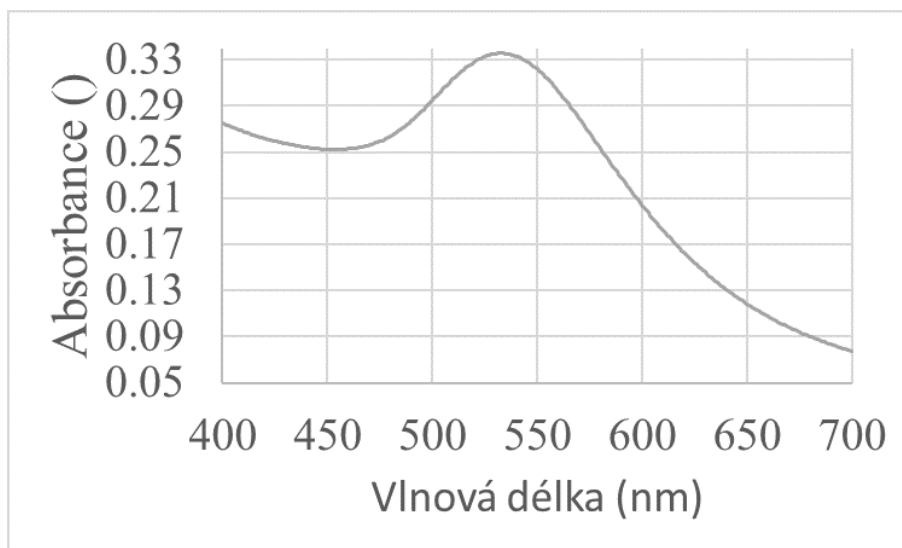
3.11 Roztok č. 12

Roztok o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a objemu 15 ml jsem připravil z roztoku č. 11 odměřením 7,5 ml a dolitím na 15 ml.

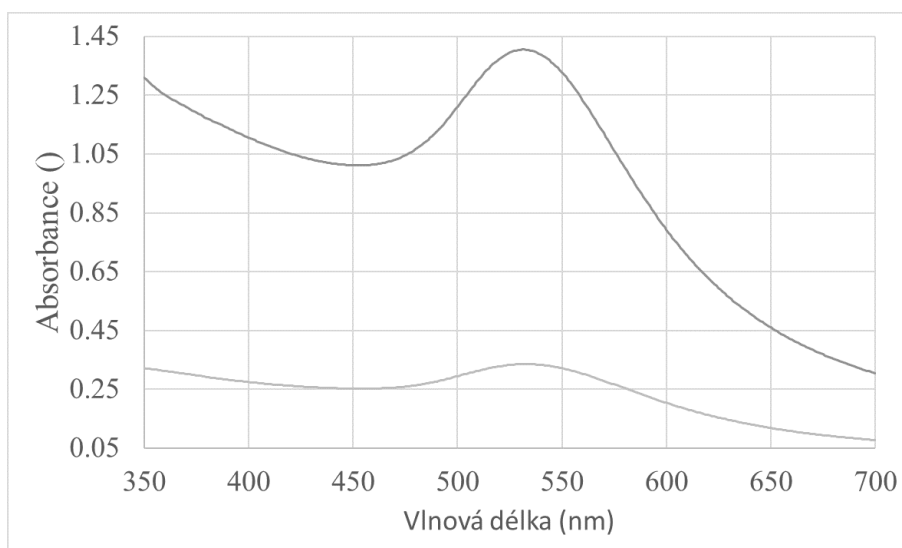


Obr. 3.24: Vlevo je roztok zlatých nanočástic o koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a vpravo je roztok prosvícen

Byla změřena absorbanční křivka spektrofotometrem.



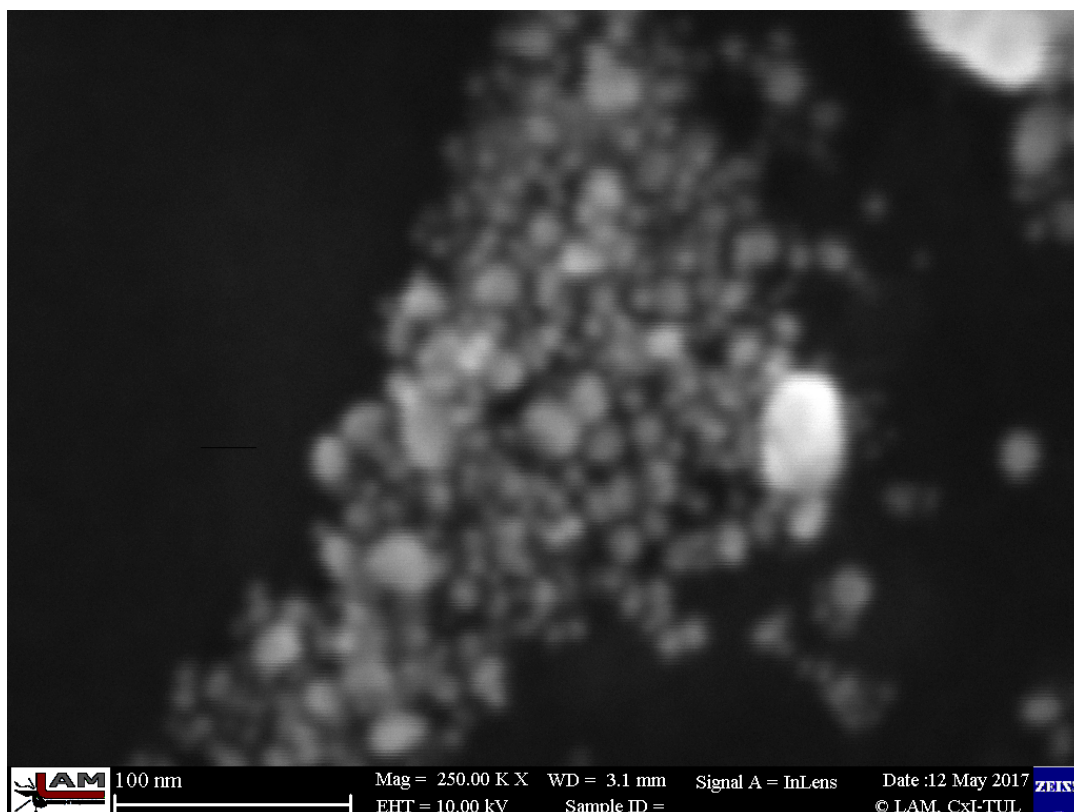
Obr. 3.25: Graf absorbance v závislosti na vlnové délce vzorku č. 12



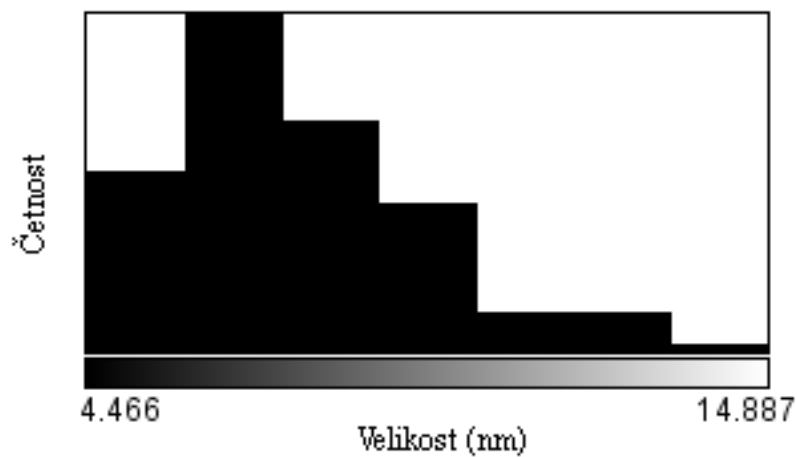
Obr. 3.26: Graf absorbance v závislosti na vlnové délce vzorku č. 11 (horní křivka) a č. 12 (dolní křivka)

Na obrázku Obr. 3.26 vidíme závislost amplitudy absorbance na koncentraci téhož roztoku.

3.12 Analýza snímků z elektronového mikroskopu



Obr. 3.27: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.28: Histogram velikosti částic

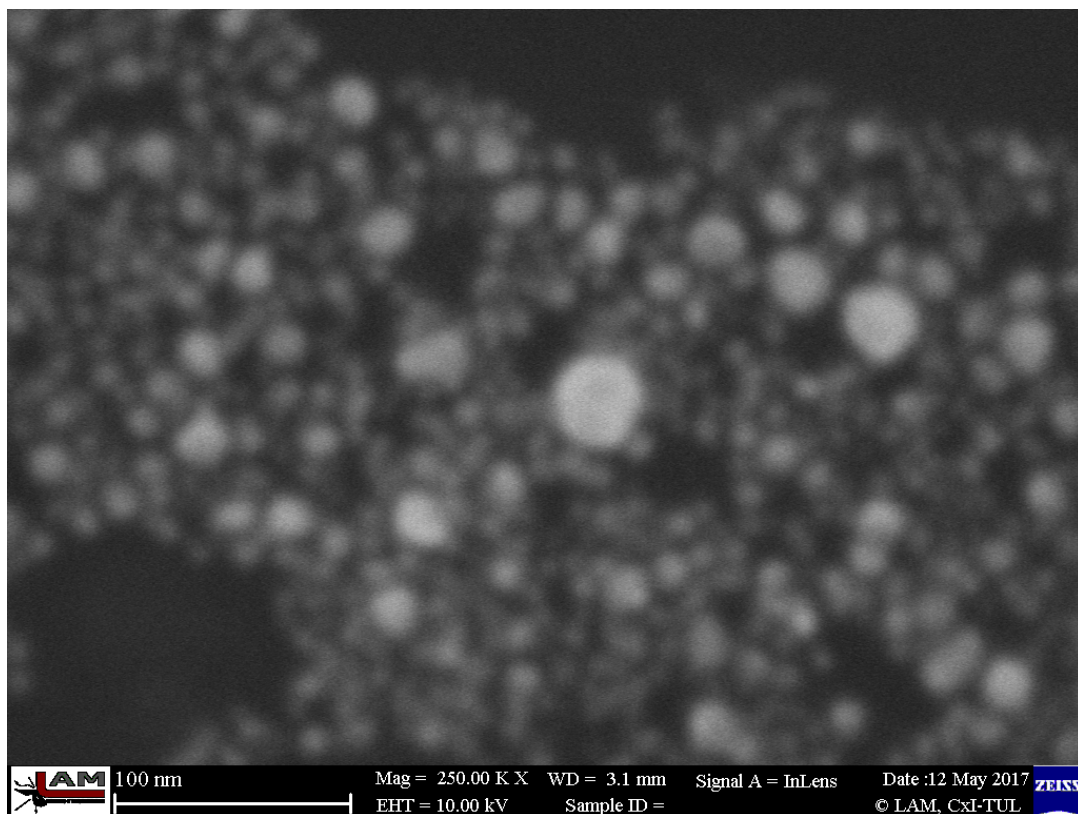
Tabulka 3.1: Hodnoty histogramu Obr. 3.28

Počátek binu (nm)	4,466	5,955	7,443	8,932	10,421	11,909	13,398
Četnost ()	22	41	28	18	5	5	1

Šířka binu je 1,489 nm.

Tabulka 3.2: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	7,7
Směrodatná odchylka (nm)	2,0
Modus (nm)	6,0
Počet částic ()	120



Obr. 3.29: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.30: Histogram velikosti částic

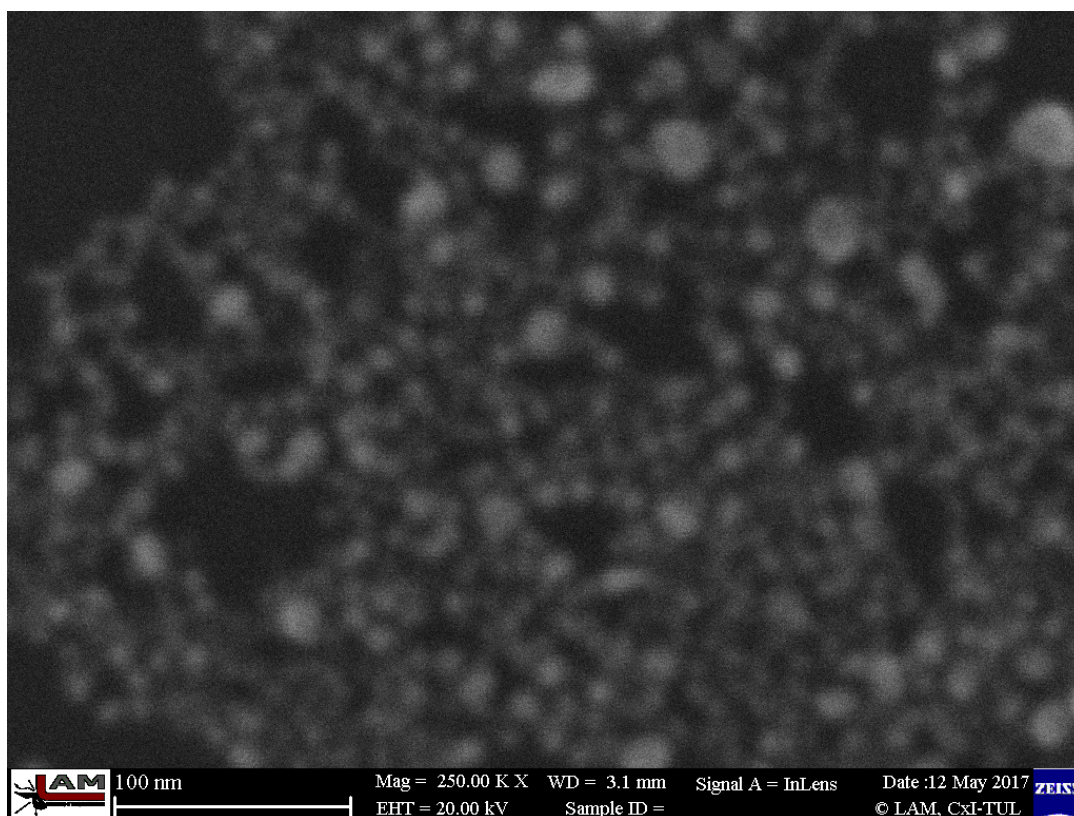
Tabulka 3.3: Hodnoty histogramu Obr. 3.30

Počátek binu (nm)	3,573	5,359	7,146	8,932	10,718	12,505	14,291	16,078
Četnost ()	6	53	37	33	15	7	2	3

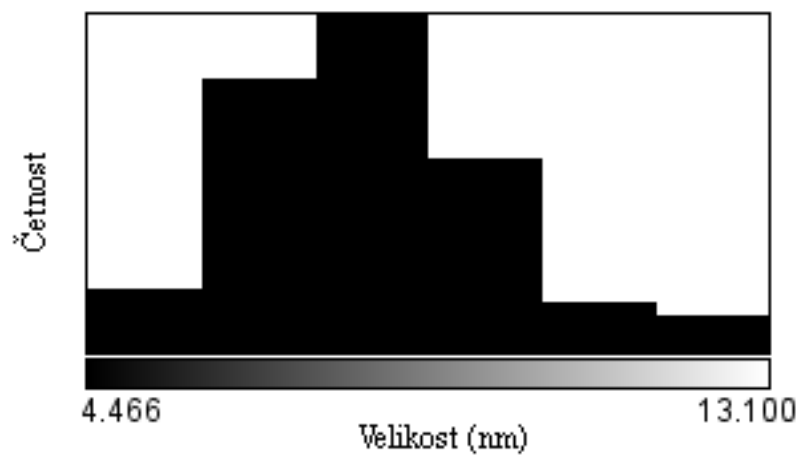
Šířka binu je 1,786 nm.

Tabulka 3.4: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	8,6
Směrodatná odchylka (nm)	2,6
Modus (nm)	5,4
Počet částic ()	156



Obr. 3.31: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.32: Histogram veličnosti částic

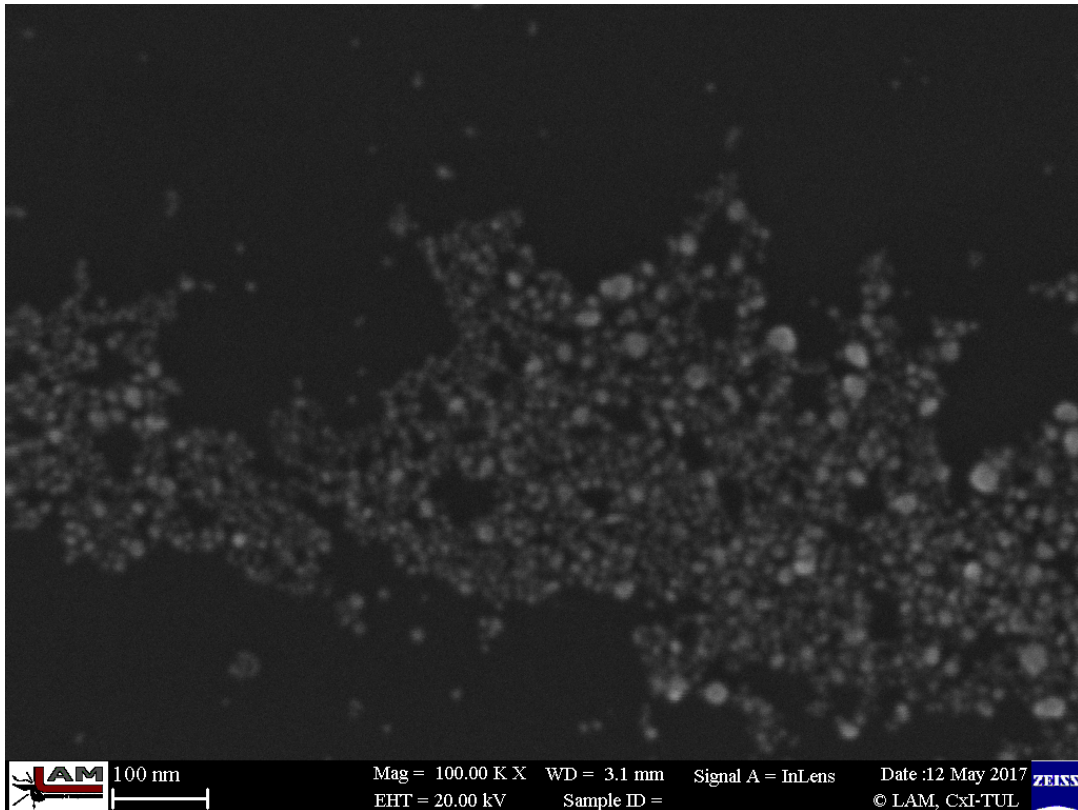
Tabulka 3.5: Hodnoty histogramu Obr. 3.32

Počátek binu (nm)	4,466	5,905	7,344	8,783	10,222	11,661
Četnost ()	5	21	26	15	4	3

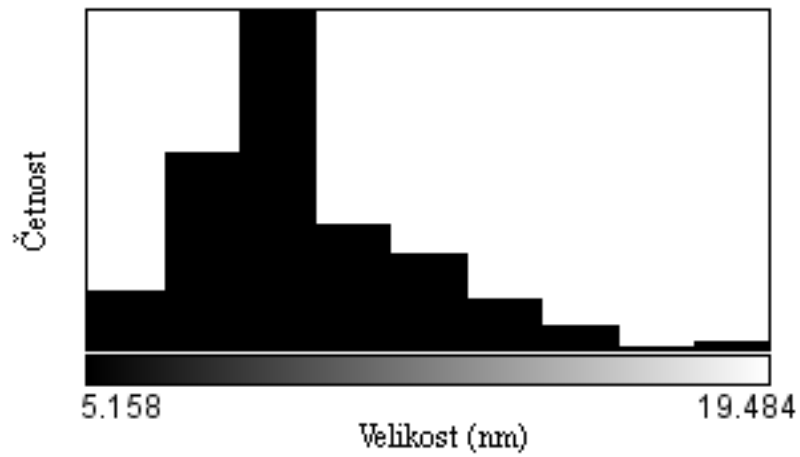
Šířka binu je 1,439 nm.

Tabulka 3.6: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	8,1
Směrodatná odchylka (nm)	1,7
Modus (nm)	7,3
Počet částic ()	74



Obr. 3.33: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.34: Histogram velikosti částic

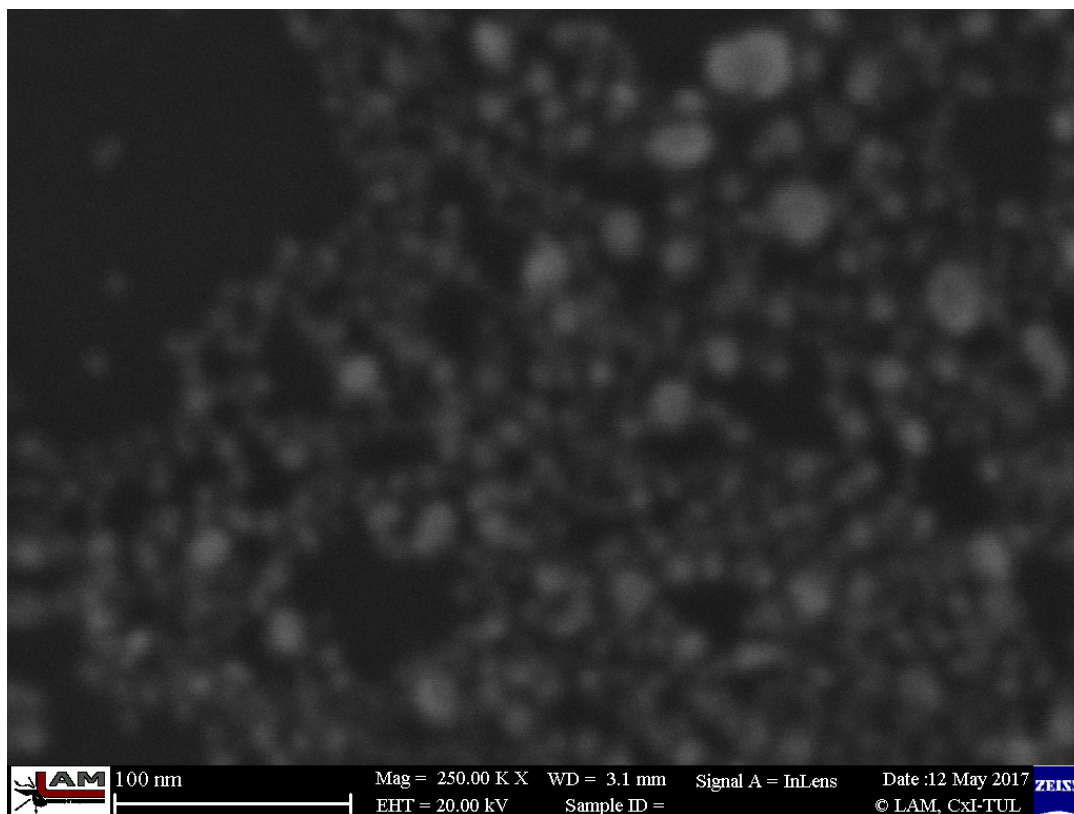
Tabulka 3.7: Hodnoty histogramu Obr. 3.34

Počátek binu (nm)	5,158	6,749	8,341	9,93	11,525	13,117	14,709	16,301	17,892
Četnost ()	12	39	67	25	19	10	5	1	2

Šířka binu je 1,592 nm.

Tabulka 3.8: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	9,703
Směrodatná odchylka (nm)	2,488
Modus (nm)	8,341
Počet částic ()	180



Obr. 3.35: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.36: Histogram velikosti částic

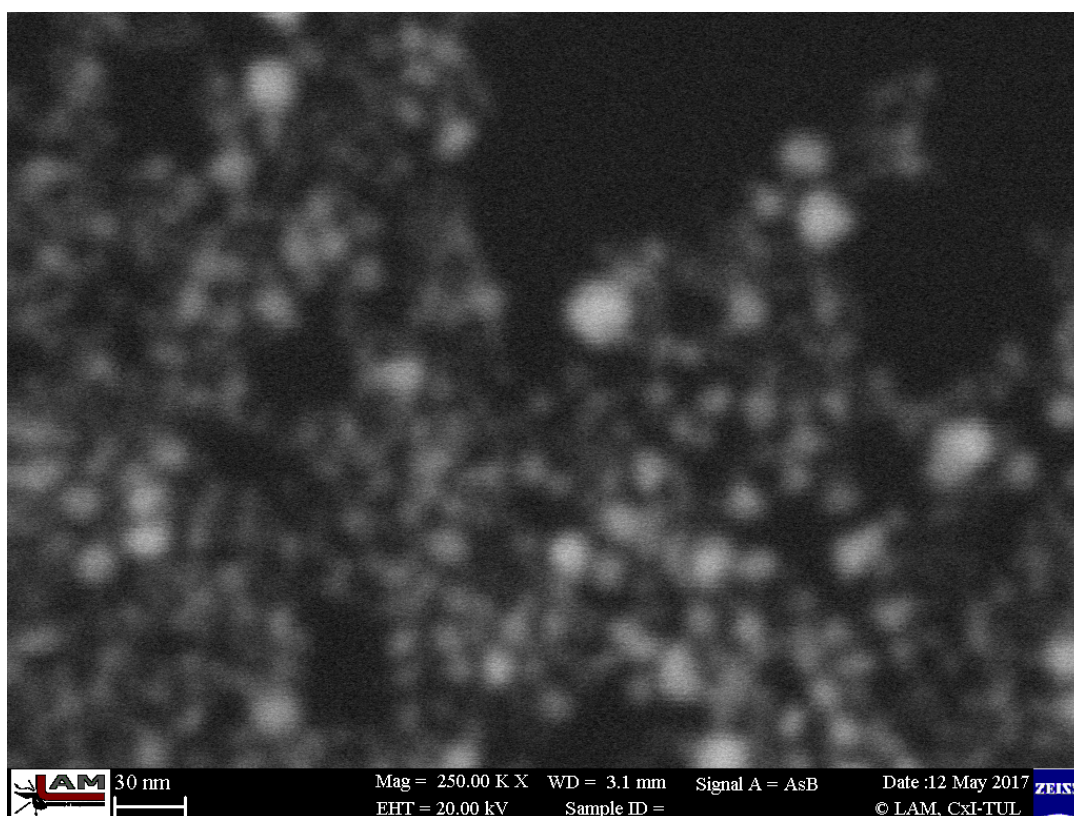
Tabulka 3.9: Hodnoty histogramu Obr. 3.36

Počátek binu (nm)	5,582	7,760	9,937	12,114
Četnost ()	14	18	3	5

Šířka binu je 1,489 nm.

Tabulka 3.10: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	8,8
Směrodatná odchylka (nm)	2,3
Modus (nm)	7,8
Počet částic ()	40



Obr. 3.37: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.38: Histogram velikosti částic

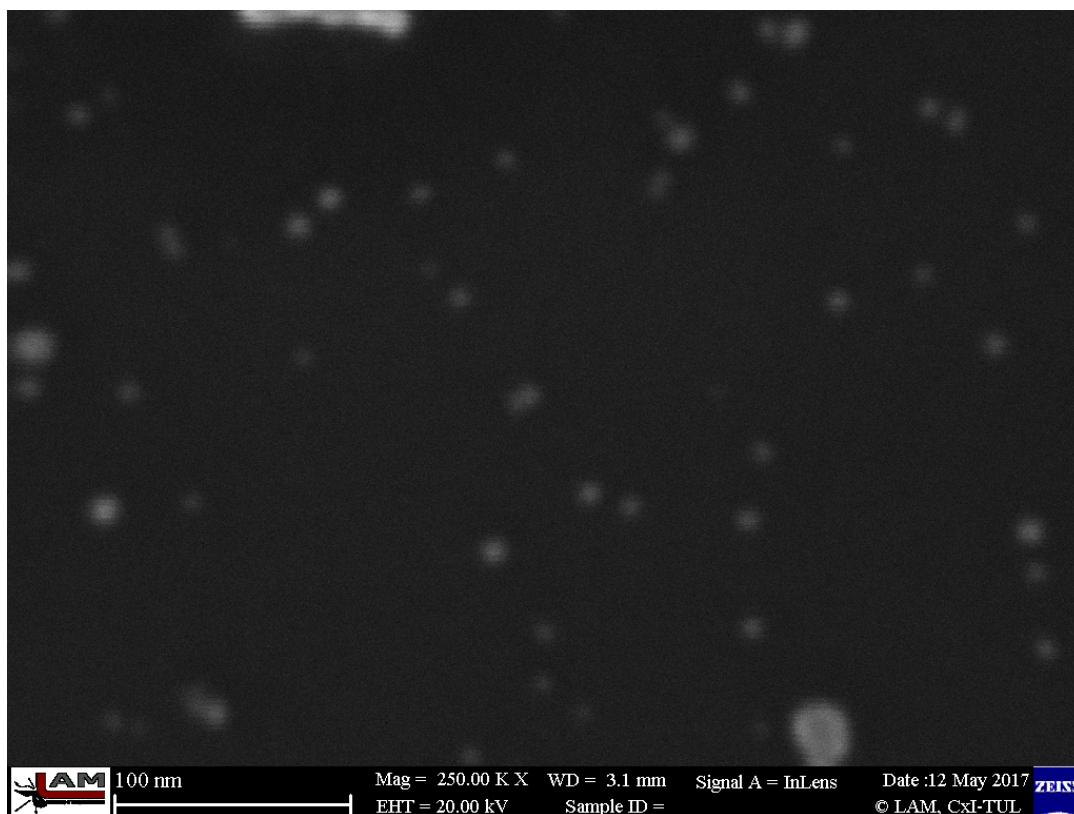
Tabulka 3.11: Hodnoty histogramu Obr. 3.38

Počátek binu (nm)	4,948	7,680	10,412	13,144	15,876	18,608
Četnost ()	2	24	22	7	7	2

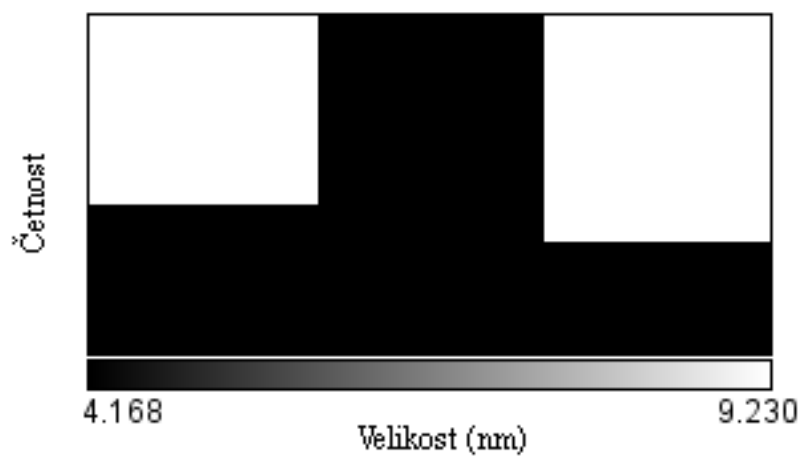
Šířka binu je 2,732 nm.

Tabulka 3.12: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	11,782
Směrodatná odchylka (nm)	3,128
Modus (nm)	7,680
Počet částic ()	64



Obr. 3.39: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.40: Histogram velikosti částic

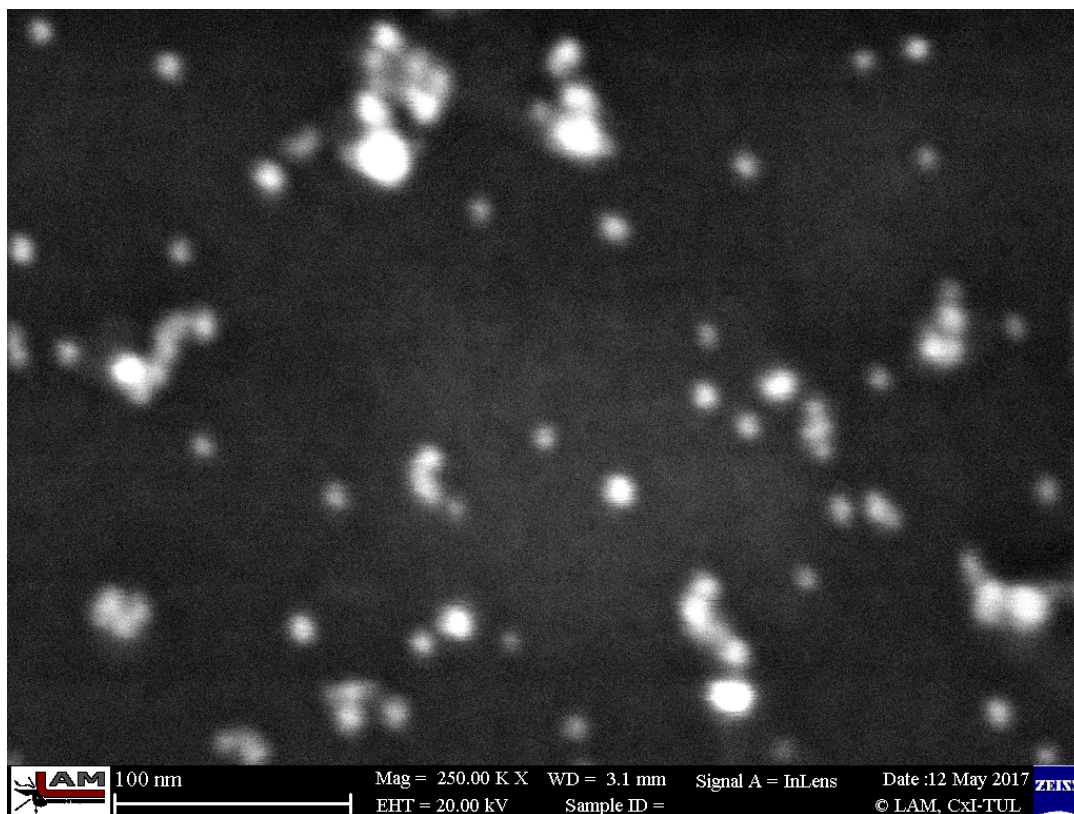
Tabulka 3.13: Hodnoty histogramu Obr. 3.40

Počátek binu (nm)	4,168	5,855	7,543
Četnost ()	8	18	6

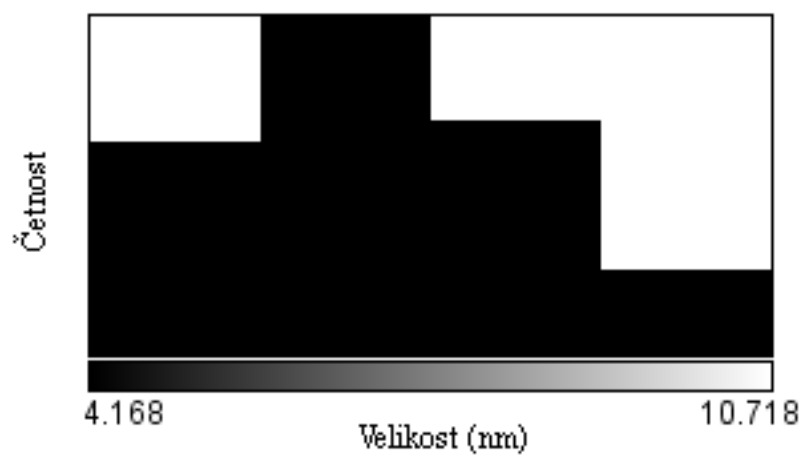
Šířka binu je 1,687 nm.

Tabulka 3.14: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	6,5
Směrodatná odchylka (nm)	1,367
Modus (nm)	5,9
Počet částic ()	32



Obr. 3.41: Snímek pořízen elektronovým mikroskopem



Obr. 3.42: Histogram velikosti částic

Tabulka 3.15: Hodnoty histogramu Obr. 3.42

Počátek binu (nm)	4,168	5,806	7,443	9,081
Četnost ()	10	16	11	4

Šířka binu je 1,638 nm.

Tabulka 3.16: Rozložení částic snímku

Průměrná velikost (nm)	7,1
Směrodatná odchylka (nm)	1,6
Modus (nm)	5,8
Počet částic ()	41

4 Diskuse

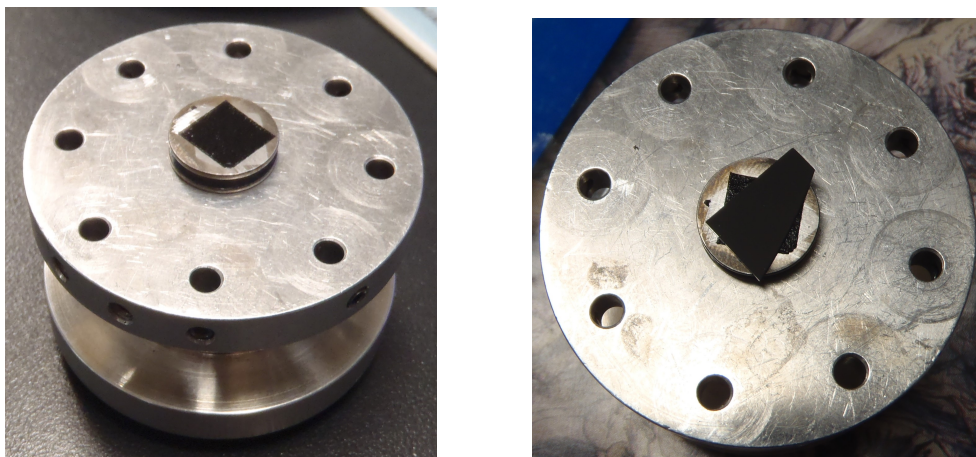
Hlavním zjištěním práce je, že průměrná velikost zlatých nanočástic v roztoku je 6,5 nm - 11,8 nm, ale modus se pohybuje v rozmezí 5,4 nm - 8,3 nm. Z toho vyplývá, že většina částic je velmi blízko hranici pro biologické užití. Vyšší hodnota průměru indikuje většinový výskyt malých částic a okrajový výskyt velmi velkých částic. Pro další zpracování navrhuji prozkoumat využití laboratorní centrifugy pro odstranění výrazně větších částic a tedy zvýšení monodisperzity roztoku.

Dalším poznatkem je velká náchylnost roztoků na nečistoty a příměsi zvláště s ohledem na analýzu snímků pořízených elektronovým mikroskopem. Na tento problém jsem narazil u prvních dvou roztoků, při použití organického stabilizátoru želatiny vznikly roztoky nanočástic stabilní několik měsíců, ale nebyly vhodné k rozboru velikosti částic. Při elektronové mikroskopii vzorků jsem zjistil, že stabilizátor vykrytalizoval při vysoušení vzorků ve vakuové komoře a vzniklé útvary zakryly zlaté nanočástice. Výskyt příměsí je nežádoucí nejen z hlediska analýzy, ale také modifikace povrchu a adsorbce aktivních skupin na povrch nanočástic.

Vlnová délka absorbovaného záření závisí na band gapu atomu a vlnové délce elektronu. [3] Zároveň se zmenšováním dochází k zužování band gapu. Pokud dojde ke změně band gapu, je nucen elektron přejít do vyšší energetické hladiny a to se navenek projeví změnou barvy roztoku. Částice vykazují změnu barvy v závislosti na mnoha faktorech, jako například prekursor použitý pro přípravu nanočástic, redukční činidla a stabilizátory a také látky používané za účelem změny zbarvení. Nejedná se pouze o velikost samotnou, která ovlivňuje zbarvení roztoku, ale ovlivněním Debyeho vzdálenosti [12] lze změnit barvu. Při zmenšení Debyeho vzdálenosti dochází k interakci povrchových plasmonových pásem a změně barvy. [13]

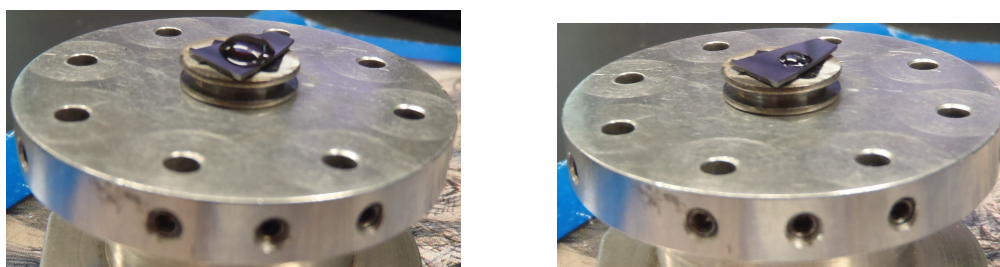
Protože nebylo dosaženo stejných výsledků při použití obdobných postupů jako u roztoků č. 1 a č. 2, byl přidán NaBH_4 , což je velice silné redukční činidlo. Jedná se o látku zdraví škodlivou, proto je nutné dbát zvýšené opatrnosti při manipulaci. Úspěchu bylo dosaženo pouze u některých roztoků. S postupem času se jevilo obtížnějším připravit zlaté nanočástice, což přisuzuji stárnutí zásobního roztoku zejména po jeho otevření. Datumu expirace (31.3.2010) a porušení balení otevřením přisuzuji ztrátu schopnosti vytvořit nanočástice i při používání silnějších redukčních činidel než na počátku práce. Vliv stáří roztoku na rozpad jeho složek roztoku či změnu pH by bylo vhodné dále zkoumat. Využitím alternativního postupu použitím NaBH_4 a absencí citrátu jsem vytvořil roztok nanočástic červené barvy. Tento postup ale není vhodný pro biologické použití. Elektronovou mikroskopii jsme provedli ve spolupráci s Technickou Univerzitou Liberec. Laboratoř analytických metod Oddělení tvorby a hodnocení nanostruktur disponuje elektronovým

mikroskopem Carl Zeiss ULTRA Plus s mikroanalytickým systémem OXFORD Instruments. Je možno měřit až 9 vzorků najednou. Tento systém poskytuje významné urychlení, které spočívá v absenci přípravy skenovací komory pro každé měření jednotlivě. Před každým měřením je komora evakuována a systém je chlazen pro zlepšení kvality snímků redukcí šumu. Na standardní plošku pro nanášení vzorku, umístěnou do držáku, byla na základě zkušeností se zpracováním nanočástic přidána destička z křemíku.



Obr. 4.1: Nosič bez alterace vlevo a nosič s křemíkovým plátem vpravo

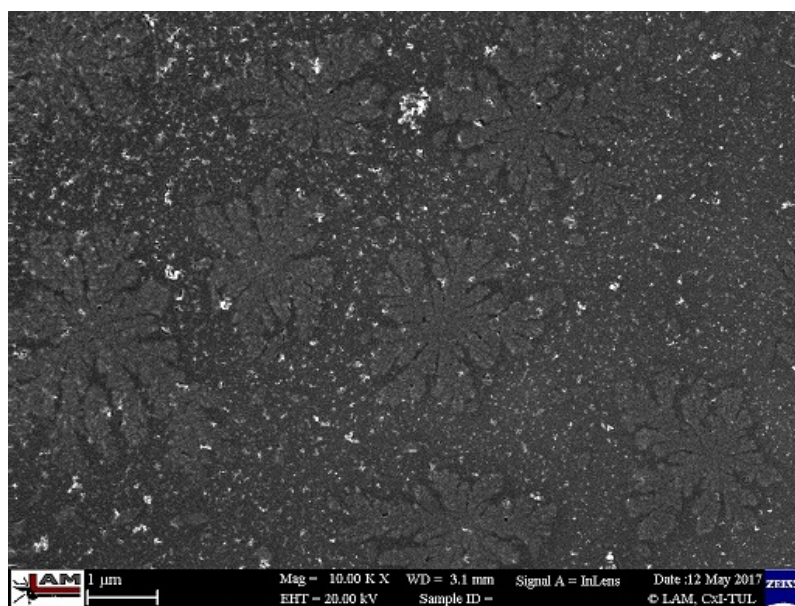
Leštěný křemík vykazuje výrazně lepší vlastnosti pro mikroskopii kovových nanočástic, zejména proto, že částice nejsou zapadlé do mikroskopických prohlubní v povrchu, ale jsou na povrchu křemíkové destičky, která má mnohem hladší povrch než standardní SEM nosič vzorku. Pasteurovou pipetou byla aplikována kapka na destičku a po sedimentaci částic na dno roztoku byla přebytečná tekutina odsáta buničinou.



Obr. 4.2: Nanesený vzorek nevhodné velikosti vlevo a po odsátí připravený vzorek vpravo

Bylo ovšem nezbytné postupovat tak, aby nedošlo ke kontaktu s křemíkovou destičkou. Takto připravený nosič vzorku lze vložit do mikroskopu a zahájit přípravu komory. Časově nejnáročnější je evakuace komory, je potřeba vytvořit tlak menší než 100 nPa. Během tohoto kroku je vzorek dehydratován a na nosiči zůstanou pouze pevné částice. Vakuum omezuje rozptylování elektronového paprsku, které způsobuje menší kontrast a menší rozlišení měření. Po dosažení potřebného podtlaku v

komoře je pořízen snímek v nízkém rozlišení pro účely zaměření oblasti zájmu. Mezi ovlivnitelné parametry patří napětí elektronového děla nebo přiblížení. Pokud na buzení elektronů použijeme vyšší napětí, elektrony jsou schopny penetrovat hlouběji, lze tedy do jisté míry určit ohnisko zaostření. Na našem vzorku se vyskytují organické struktury, které tvoří povlak, který snižuje kvalitu snímků. Vada snímku se projevuje jako vločka (viz Obr. 4.3) rozměrově několikanásobně větší než nanočástice.



Obr. 4.3: Povlak kapky organického původu způsobující rozostření snímku

Při měření velikosti částic bylo nutné zanedbat elipsoidní tvar částic a uvažovat kulový tvar, u kterého lze změřit průměr. Vzhledem ke kvalitě snímků není možné s jistotou určit, zda velké částice jsou shluky nebo jednotlivé částice. Při použití stabilizátorů je možné vytvořit roztoky stabilní více než jeden rok, ale tyto roztoky nejsou vhodné pro použití v biomedicíně, protože obsahují příliš příměsí. Takové roztoky není možno analyzovat elektronovým mikroskopem. Podařilo se vytvořit roztoky nanočástic zlata, které mají většinové zastoupení částic o rozměrech 5 nm - 7 nm.

Prostor pro zlepšení vidím v nahrazení činidla NaBH_4 například přírodními činidly. Dále je potřeba vytvořit postup výroby, který zajistí monodisperzitu velikostí částic. Je potřeba identifikovat původ organických nečistot v roztoku, které znemožňují přesné měření velikosti pomocí elektronového mikroskopu a omezit jejich výskyt.

5 Závěr

Pomocí spektrofotometrie jsme ověřil, že se jedná o zlaté nanočástice, které mají předpoklad pro splnění požadavků práce. Pomocí elektronové mikroskopie jsem ověřil, že byly připraveny roztoky s většinovým podílem částic o rozměrech 5,4 nm - 8,3 nm, což je vhodná velikost pro biomedicínské aplikace. Pro odstranění nadměrných částic je potřeba vypracovat metodiku.

Seznam použité literatury

- [1] NOVOTNÝ, Filip, 2007. *Kovové nanočástice pro detektory životního prostředí*. Praha. Diplomová práce. České Vysoké Učení Technické v Praze.
- [2] YANG, Celina, Darren YOHAN a Devika B. CHITHRANI. 2014. Optimized bio-nano interface using peptide modified colloidal gold nanoparticles. *Colloids and Interface Science Communications* [online]. 2015-11-15, **1**: 54-56 [cit. 2015-11-15]. DOI: 10.1016/j.colcom.2014.07.003. ISSN 22150382. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215038214000168>
- [3] FOJTÍK, Anton. 2014. *Nano - fascinující fenomén současnosti: nanočástice, nanostruktury a nanotechnologie - důmyslné formy hmoty : od objevu fenoménu po biomedicínské aplikace*. 1. vyd. Praha [i.e. Dobřany]: COMTES FHT, 288 s. ISBN 978-80-260-7135-8.
- [4] RAY F. EGERTON. 2005. *Physical principles of electron microscopy an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Corr. 3. print. New York: Springer Science Business Media. ISBN 978-038-7260-167.
- [5] Citrate Synthesis of Gold Nanoparticles. 2015. *MRSEC Education | University of Wisconsin-Madison* [online]. 2015-08-06 [cit. 2016-01-07]. Dostupné z: <http://education.mrsec.wisc.edu/277.htm>
- [6] KHARISSOVA, Oxana V., H.V. Rasika DIAS, Boris I. KHARISOV, Betsabee Olvera PÉREZ a Victor M. Jiménez PÉREZ, 2013. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* [online]. **31**(4), 240-248 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.01.003. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779913000152>
- [7] PATIL, Maheshkumar Prakash a Gun-Do KIM, 2017. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **101**(1), 79-92 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1007/s00253-016-8012-8. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-8012-8>
- [8] Lycurgus Cup, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Lycurgus_Cup
- [9] CASTELLANI, Rudy J., Raj K. ROLSTON a Mark A. SMITH, 2010. Alzheimer Disease. *Disease-a-Month* [online]. **56**(9), 484-546 [cit. 2017-

- 05-09]. DOI: 10.1016/j.disamonth.2010.06.001. ISSN 00115029. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011502910000684>
- [10] YANG, Licong, Tiantian YIN, Yanan LIU, Jing SUN, Yanhui ZHOU a Jie LIU, 2016. Gold nanoparticle-capped mesoporous silica-based H₂O₂-responsive controlled release system for Alzheimer's disease treatment. *Acta Biomaterialia* [online]. **46**, 177-190 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.09.010. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706116304731>
- [11] MIRSADEGHI, Somayeh a Rassoul DINARVAND, 2015. Can nanoparticles be beneficial for the early detection and treatment of Alzheimer disease. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* [online]. **9**(2), 86-87 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.jmhi.2015.08.001. ISSN 22517294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2251729415000129>
- [12] 2.4.2 Debye Length, *Electronic Materials - Script* [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: https://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/elmat_en/kap_2/backbone/r2_4_2.html
- [13] BURNS, C, W SPENDEL, S PUCKETT a G PACEY, 2006. Solution ionic strength effect on gold nanoparticle solution color transition. *Talanta* [online]. **69**(4), 873-876 [cit. 2017-4-30]. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.11.038. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914005007666>

Příloha A: Obsah přiloženého CD

1. Klíčová slova (čj, aj)
2. Abstrakt česky
3. Abstract in English
4. Zadání
5. Bakalářská práce