

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Au anebo Ag nanostruktury: vlastnosti a příprava pomocí vybraných
aminokyselin**



Vypracoval: Bc. Václav Prokůpek

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Karolína Šišková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Radek Ostruzska

OLOMOUC

2023

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Václav Prokůpek

Název práce: Au anebo Ag nanostruktury: vlastnosti a příprava pomocí vybraných aminokyselin

Typ práce: Experimentální

Pracoviště: Katedra biofyziky

Vedoucí práce: doc. RNDr. Karolína Šišková, PhD.

Konzultant: Mgr. Radek Ostruzska

Rok obhajoby: 2024

Abstrakt:

Cílem této experimentální diplomové práce byla příprava a charakterizace zlatých nanočástic pomocí vybraných aminokyselin a jejich směsí, a jejich charakterizace pomocí vybraných metod. Syntéza nanočástic byla zkoumána pro tyrosin, tryptofan, fenylalanin, histidin a cystein, a to za různých teplotních podmínek vývoje. Bylo zjištěno, že cystein nenapomáhá tvorbě nanočástic. Ostatní aminokyseliny ano. Při porovnání výsledků z různých teplot bylo zjištěno, že chladnější teploty dávají vzniku menších nanočástic, naopak vyšší teploty dávají vzniku větším nanočásticím, oproti nanočásticím vzniklým za pokojové teploty. Pro směsi aminokyselin, konkrétně směs cysteinu s ostatními aminokyselinami bylo zjištěno, že nedochází ke vzniku nanočástic, a to ani po navýšení koncentrace NaOH, či teploty při vývoji vzorku.

Klíčová slova: aminokyseliny, zlaté nanočástice, zelená syntéza, teplota vývoje vzorku, absorpční spektroskopie v UV-VIS oblasti, dynamický rozptyl světla, transmisní elektronová mikroskopie, zeta potenciál, tyrosin, tryptofan, fenylalanin, histidin, cystein

Počet stran: 64

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographic identification:

Author's name and surname: Bc. Václav Prokůpek

Title: Au or Ag nanostructures: properties and preparation using selected amino acids

Type of thesis: experimental

Workplace: Department of Biophysics

Thesis supervisor: doc. RNDr. Karolína Šišková, PhD.

Consultant: Mgr. Radek Ostruzska

Year of defence: 2024

Abstract:

The aim of this experimental master thesis was the preparation and characterization of gold nanoparticles using selected amino acids and their mixtures, and their characterization by selected methods. The synthesis of the nanoparticles was investigated for tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine and cysteine, under different developmental temperature conditions. It was found that cysteine does not promote nanoparticle formation. The other amino acids do. Comparing the results from different temperatures, it was found that cooler temperatures gave rise to smaller nanoparticles, while higher temperatures gave rise to larger nanoparticles, compared to nanoparticles formed at room temperature. For mixtures of amino acids, specifically the mixture of cysteine with other amino acids, it was found that no nanoparticles are formed, even after increasing the NaOH concentration or the development temperature.

Keywords: amino acids, gold nanoparticles, green synthesis, sample development temperature, UV-VIS absorption spectroscopy, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, zeta potential, tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine, cysteine

Number of pages: 64

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením doc. RNDr. Karolíny Šiškové PhD., a to za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci

dne.....

Rád bych tímto poděkoval vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Karolíně Šiškové PhD. za odborné vedení diplomové práce, za rady a připomínky, a ochotu během řešení mé práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Radku Ostruzskovi za odbornou pomoc při orientaci v laboratoři, pomoc s nastavením všech přístrojů a rady ohledně vyhodnocení a za celkové přispění k pohodové atmosféře v laboratoři. Za příležitostnou pomoc bych také rád poděkoval Mgr. Veronice Svačinové, která také přispěla za klidný průběh všech měření a příjemně strávený čas v laboratoři. Následně patří díky Mgr. Janě Stráské za změření vzorků pomocí TEM, za trpělivé vysvětlení všech náležitostí s tím spojených. Dále poděkování patří Mgr. Jiřímu Hoškovi za změření vzorků pomocí SEM a EDS metody, a za vysvětlení detailů s tím spojených. V neposlední řadě bych rád poděkoval rodině a přátelům za finanční a psychickou podporu během celé doby mého studia.

Dále děkuji IGA projektu vedeném na Univerzitě Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2023_003 a IGA_PrF_2024_002) za finanční podporu mé práce.

SEZNAM ZKRATEK

BSA	albumin hovězího séra (<i>bovine serum albumin</i>)
CTAB	bromid hexadecyltrimethylamonný (<i>cetyltrimethylammonium bromide</i>)
CTAC	chlorid hexadecyltrimethylamonný (<i>cetyltrimethylammonium chloride</i>)
DLS	dynamický rozptyl světla (<i>dynamic light scattering</i>)
EDL	elektrická dvojvrstva (<i>electric double layer</i>)
EDS	energieově disperzní spektroskopie (<i>energy dispersive spectroscopy</i>)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
LSPR	lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance (<i>localized surface plasmon resonance</i>)
RCPTM	Regionální Centrum Pokročilých Technologii a Materiálů (<i>The Regional Centre of Advanced Technologies and Materials</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>)
SPR	povrchová plasmonová rezonance (<i>surface plasmon resonance</i>)
ssDNA	jednovláknová DNA (<i>single stranded DNA</i>)
UV-VIS	ultrafialové-viditelné (<i>ultraviolet-visible</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (<i>transmission electron microscopy</i>)
XRD	rentgenová difrakce (<i>X-ray diffraction</i>)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část.....	2
2.1	Fyzikální vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů	2
1.1.1	Povrchová plazmonová rezonance (SPR) v kovových nanočásticích.....	2
1.1.2	Rozptyl světla	3
1.1.3	Elektrická dvojvrstva a stabilizace nanočástice	3
1.1.4	Další vlastnosti zlatých a stříbrných nanočástic.....	4
1.2	Metody syntézy kovových nanočástic.....	5
1.2.1	Top down vs. bottom up metody.....	5
1.2.2	Metody zelené syntézy	5
1.2.3	Syntéza Au a Ag nanočástic pomocí aminokyselin	6
1.2.4	Mechanismus působení aminokyselin při syntéze Ag/Au nanočástic.....	9
1.2.5	Užití zlatých a stříbrných nanočástic	10
1.3	Metody charakterizace nanočástic.....	11
1.3.1	UV-VIS absorpční spektroskopie.....	11
1.3.2	Dynamický rozptyl světla (DLS)	12
1.3.3	Měření zeta potenciálu	12
1.3.4	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	13
1.3.5.	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a energiově disperzní spektroskopie (EDS)	13
1.3.5	Fluorescenční spektroskopie	14
1.3.6	Další metody charakterizace nanočástic.....	14
3	Experimentální část	16
3.1	Cíle práce.....	16
3.2	Chemikálie	16
3.3	Syntéza nanočástic	16

3.3.1	Syntéza S1	16
3.3.2	Teplota vývoje systému.....	17
2.3.3	Syntéza S2	18
2.3.4	Syntéza S3	18
2.3.6.	Syntéza S4	18
2.4	Charakterizace nanočástic	19
2.4.1	UV-VIS spektrum	20
2.4.2	Dynamický rozptyl světla a zeta potenciál.....	20
2.4.3	Transmisní elektronová mikroskopie	21
2.4.4.	Skenovací elektronová mikroskopie a energiově disperzní spektroskopie	21
2.5	Výsledky.....	21
2.5.1	Syntéza S1 RT	21
2.5.2	Syntéza S1 50C	34
2.5.3	Syntéza S1 0C	38
2.5.4	Syntéza S2:.....	48
2.5.5	Syntéza S3 RT	54
2.5.6	Syntéza S3 50C	55
2.5.7	Syntéza S4	56
3.4	Diskuze.....	59
4	Závěr.....	62
5	Seznam literatury:	63

1 Úvod

Nanomateriály patří mezi dynamické a rychle se rozvíjející oblasti vědy a techniky. Nanostruktury vzácných kovů, jako jsou zlato a stříbro mají široké uplatnění v oblastech biomedicíny, elektrotechniky, katalýzy a dalších. Mají odlišné fyzikální vlastnosti od svých objemových protějšků, které závisí na mnoha faktorech jako je jejich velikost, typ kovu nebo i dvou a více kovů, z jakého se skládají, jejich povrchová úprava a mnoho dalších. Například zlaté nanočástice jsou obecně netoxické pro buňky, ale když jejich velikost je menší než několik nanometrů, stávají se toxickými. Podobně jsou na tom i stříbrné nanočástice. Velikost a typ náboje také zaujímá důležitost pro cytotoxicitu, stejně tak jako tvar, jaký nanočástice zaujímají.

Kovové nanostruktury lze připravit rozličnými fyzikálními, chemickými či biologickými metodami. Některé z těchto metod však představuje určité riziko pro životní prostředí či pro zdraví člověka. Z toho důvodu byl vyvinut tlak na rozvoj takzvaných zelených metod syntézy, které jsou šetrnější k životnímu prostředí, ať už z pohledu energetické náročnosti, omezení či úplné zrušení používání toxických, karcinogenních a jinak škodlivých látek jak pro člověka, tak i pro přírodu. Dále se ukazuje, že tyto metody jsou také finančně udržitelnější. Mezi zelené metody se řadí i syntéza pomocí aminokyselin, protože jsou netoxické, biokompatibilní a degradabilní. Jejich redukční a stabilizační vlastnosti z nich dělá výborné kandidáty na udržitelnou cestu k syntéze nanostruktur.

V této experimentální diplomové práci se teoreticky zaměříme na fyzikální vlastnosti nanostruktur, co tyto vlastnosti ovlivňuje, a jak se na nich podílí syntéza. Dále si popíšeme některé metody syntézy nanostruktur, ale zaměříme se zejména na metody zelené syntézy, a to hlavně s důrazem na syntézu pomocí aminokyselin. Popíšeme si dále metody, kterými se nanostruktury charakterizují. V experimentální části se pokusíme vytvořit nanostruktury zlata pomocí aminokyselin, které charakterizujeme několika vybranými metodami. Nejprve vyzkoušíme syntézu pomocí několika vybraných aminokyselin a to tyrosinu, tryptofanu, fenylalaninu, histidinu a cysteinu. V další části se pokusíme o syntézu kombinace dvou aminokyselin, a to cysteinu společně s další aminokyselinou. Syntézu navíc provedeme za různých podmínek teploty vývoje, ale za zachování poměru reaktantů. Cílem práce tedy je vytvořit další návod, jakým by šlo jednoduše připravit nanostruktury, a porovnat je s ostatními metodami.

2 Teoretická část

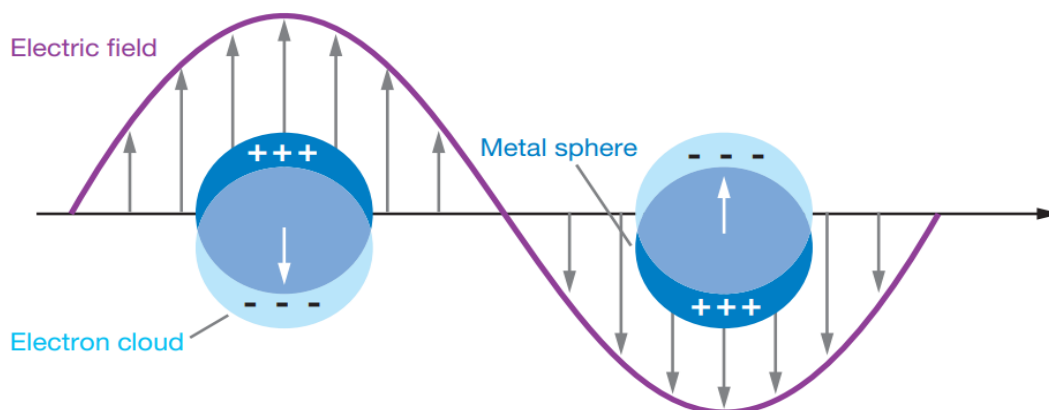
Jako nanočástice jsou označovány struktury s velikostí do 100 nm alespoň v jednom rozměru. Struktury pod 2 nm jsou označovány jako nanoklastry. Velikost nanočástic je velmi důležitá, protože ovlivňuje jejich elektrické, magnetické, optické či chemické vlastnosti. Výslednou velikost nanočástic do velké míry ovlivňuje jejich příprava.

2.1 Fyzikální vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů

Nanočástice ušlechtilých kovů mají jiné vlastnosti než objemové kovy, a to zejména díky své malé velikosti. Mezi některé vlastnosti patří například povrchová plazmonová rezonance (SPR), přítomnost elektrické dvojvrstvy (EDL) a také způsob, jakým jsou nanočástice stabilizovány. Tyto vlastnosti jsou do velké míry ovlivněny velikostí nanočástic, způsobem jejich přípravy a jejich prvkovým složením.

2.1.1 Povrchová plazmonová rezonance (SPR) v kovových nanočásticích.

Povrchová plazmonová rezonance je jev, který se objevuje v kovových nanočásticích, při interakci s elektromagnetickým polem. Dopadající elektromagnetická vlna indukuje oscilaci volných elektronů ve vodivostním energetickém pásmu, kdy všechny volné elektrony oscilují ve fázi s dopadající vlnou (Ghosh a Pal 2007). SPR je velmi důležitý jev, který dává nanočásticím jejich optické vlastnosti. SPR je závislé zejména na velikosti nanočástice (Willets a Dyne 2007), tvaru nanočástice (Katsure a kol. 2010), ale také na vlastnostech okolního dielektrika. Nutno podotknout, že na nanočásticích se projevuje tzv. lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance (LSPR), ale některá literatura pojmy LSPR a SPR zaměňuje.



Obrázek 1: Schématický obrázek LSPR, kde elektrické pole (elektromagnetická vlna – electric field) indukuje oscilaci volných elektronů na kovové nanočástici (metal sphere), zde ve formě oscilace elektronového mraku – electron cloud). (Převzato z Willets a kol 2007).

2.1.2 Rozptyl světla

Jako první vysvětlil teoreticky rozptyl světla na nanočásticích Mie v roce 1908, kdy vyřešil Maxwellovy rovnice pro interakci elektromagnetického záření s kovovými nanočásticemi, které mají stejnou dielektrickou funkci, jako jejich objemový kov, a objasnil tak červenou barvu koloidního zlata. Mieho teorie však přestává platit pro nanočástice větší než 20 nm, kdy přestává fungovat dipólová aproximace, dále nepočítá s absorpcí média a omezuje se pouze na sférický tvar nanočástic. Tyto nedostatky řeší příspěvní Ganse, který započítává tvar nanočástic, Maxwell Garnett dále obohacuje Mieho teorii o efektivní teorii média, která zahrnuje Lorentzovu teorii a Clausiusovu–Mossottiho rovnici (Jana a kol. 2016).

2.1.3 Elektrická dvojvrstva a stabilizace nanočástice

Jorg Polte (2015) popisuje elektrickou dvojvrstvu pomocí Sternovy–Gouyovy–Chapmanovy teorie. Kovové nanočástice v roztoku obecně mají tendenci aglomerovat, díky van der Waalsovým, elektrostatickým nebo magnetickým silám, a pro správnou stabilizaci nanočástic je potřeba odpudivé síly, která je bude negovat. Jakmile je kovová nanočástice dostatečně velká, její povrchový náboj začne působit proti přitažlivým van der Waalsovým silám, a dojde tak k elektrostatickému odpuzování mezi nanočásticemi, což výrazně přispívá k elektrostatické stabilizaci.

Rozpuštěné ionty se v roztoku s nanočásticemi adsorbují na jejich povrch, a vytváří tak první stacionární vrstvu, známou též jako Sternova vrstva. Druhá vrstva je tvořena ionty, na které stále působí elektrický povrchový potenciál, ale již ne tak silně, a mohou se ve vrstvě pohybovat volně. Této vrstvě se říká difúzní vrstva, nebo též Gouyova-Chapmanova vrstva. Velikost takové dvojvrstvy se pak popisuje pomocí Debyeovy délky, a její povrchový potenciál exponenciálně klesá.

Polte dále popisuje sterickou stabilizaci jako proces, kdy jsou na povrch nanočástice adsorbovány velké molekuly například polymery, povrchově aktivní látky a další, které poskytnou ochrannou vrstvu zabráňující aglomeraci. Tato stabilizace nezávisí na velikosti nanočástice, ale spíše na koncentraci stabilizující látky, teplotě, průměrné délce řetězce a její rozpustnosti.

2.1.4 Další vlastnosti zlatých a stříbrných nanočástic

Cytotoxicita je vlastnost nanočástic, která je ovlivněná mnoha fyzikálními a chemickými faktory. Například tvar stříbrných nanočástic ovlivňuje jejich cytotoxicitu, kde bylo pozorováno, že stříbrné nanodráty měly vyšší cytotoxický efekt na buňky plicního karcinomu, zatímco kulaté nanočástice neměly prakticky žádný efekt, což bylo pozorováno několika metodami, jako například ve změně koncentrace laktátu dehydrogenázy, pozorováním morfologických změn a pozorováním změn koncentrace vápníku (Stoehr a kol. 2011). Cytotoxicitu zlatých a stříbrných nanočástic také výrazně ovlivňuje náboj, a to nejen jeho velikost, ale i polarita, kdy se ukazuje, že vysoké kladné náboje nanočástic indukují produkci ROS (reaktivní formy kyslíku – reactive oxygen species) v buňkách (Schlinkert a kol. 2015). Velikost je další vlastností, která ovlivňuje cytotoxicitu. Čím menší je stříbrná nanočástice, tím vyšší má cytotoxické vlastnosti, a to pravděpodobně díky vyššímu poměru povrchových atomů ku objemovým (Sriram a kol. 2012). Obdobně to platí i pro zlaté nanočástice, kdy se má za to, že zlaté nanočástice větší než 5 nm se považují za netoxické za podmínky, že jejich koncentrace je nižší než nanomolární, ale je třeba mít na paměti také to, že cytotoxicita není ovlivněna jen fyziokemickými vlastnostmi, jako je velikost nebo povrchová úprava, ale také na typu buněk, na které nanočástice působí, protože povrchová úprava biokompatibilními látkami může snížit jejich cytotoxické působení (Li a kol. 2015). Zlaté nanoklastry jsou však velmi toxické (Pan a kol. 2007) a to takovým mechanismem, že se ireverzibilně naváží na biomarkomolekuly v buňce, ať už na DNA nebo na enzymy a další (Li a kol. 2015). Za

zmínku však stojí to, že zlaté nanočástice mají výbornou stabilitu pod vlivem ionizujícího gama záření, které se užívá v radioterapii, a zlaté nanočástice se tak jeví jako dobrý radiosenzitizér (Zhang a kol. 2009).

Zlaté nanočástice jsou efektivní ve zhášení fluorescence (Hammami a kol. 2021). Mají však též magnetické vlastnosti, na rozdíl od své objemové formy (Harish a kol. 2018).

2.2 Metody syntézy kovových nanočástic

2.2.1 Top down vs. bottom up metody

Obecně jsou známy dva druhy přípravy nanočástic, top-down a bottom-up. Top-down příprava zahrnuje většinou fyzikální metody, ve kterých dochází ke zmenšování objemového kovu na prach (částice o velikosti milimetrů až mikrometrů) až na nanočástice. Mezi metody patří například drcení, leptání, škvaření, laserová ablace, a další (Baig a kol, 2021).

Bottom-up je metoda opačná, tedy z jednotlivých atomů (resp. iontů) dojde k vystavení nanočástice. Jedná se o metodu chemickou, případně biologickou, při použití živých organismů nebo extraktů z nich. Jako prekurzory se používají soli, komplexy či kyseliny ušlechtilých kovů. Po rozpuštění, je třeba ionty redukovat. K tomu slouží redukující činidla. Po redukci začnou neutrální atomy agregovat, dokud elektrická dvojvrstva nezabrání další agregaci, nebo nedojde ke sterické stabilizaci. Mezi bottom-up metody se řadí například velmi známá Turkevitchova metoda, kde se užívá HAuCl_4 jako prekurzoru a citrátu sodného jako redukčního činidla (Turkevitch a kol. 1951) nebo Brustova-Schiffrinova metoda založená na redukci pomocí borohydridu sodného na dvojfázovém rozhraní kapalina/kapalina (Burst a kol. 1994).

2.2.2 Metody zelené syntézy

Jako metody zelené syntézy jsou označovány ty metody, které splňují 12 principů zelené chemie, které popsal Anastas a Warner v knize *Green Chemistry: Theory and Practise*, a daly by se shrnout do několika pouček. Zabránit tvorbě nadbytečného chemického odpadu, všechny chemikálie použité před, během a po syntéze by se měly maximálně využít, měly by být netoxické vůči životnímu prostředí nebo člověku, a použité metody by neměly být

energeticky náročné kvůli zvýšené produkci oxidu uhličitého, a také bezpečné kvůli ochraně životního prostředí a zdraví člověka.

Mezi zelené metody se řadí hlavně metody využívající bakteriální, rostlinné a kvasinkové extrakty, či přímo živé mikroorganismy k syntéze kovových nanočástic (Houston a kol. 2021). Jedná se tedy výhradně o metody bottom-up, ačkoliv by se mezi ně mohly řadit i určité specifické metody laserové ablace v roztoku (Amendola a Meneghetti 2009).

2.2.3 Syntéza Au a Ag nanočástic pomocí aminokyselin

Syntéza nanočástic pomocí aminokyselin se řadí mezi zelené syntézy, protože aminokyseliny nejsou toxické, karcinogenní, jsou biodegradabilní, biokompatibilní a přívětivé pro životní prostředí, a navíc se nachází v mikroorganismech, které je využívají k syntéze nanočástic (Houston a kol. 2021). Aminokyseliny slouží jako redukční činidlo, ale mohou posloužit i jako stabilizační činidlo.

2.2.3.1 Syntéza Au nanočástic s využitím aminokyselin

Selvakaan a kol (2003) objevili redukční schopnost tryptofanu redukovat tetrachlorozlatité ionty v roztoku, a formovat tak nanočástice obalené tryptofanem. Pro syntézu použili HAuCl_4 a tryptofan v poměru 10:1, a roztok zahřívali při 50 °C, což významně urychlilo redukci chlorozlatitých iontů. K redukci použili i tetrahydridoboritan sodný a nanočástice stabilizovali tryptofanem. V obou případech vznikly nanočástice snadno dispergovatelné ve vodě. Tetrahydridoboritan sodný je však toxický a nebezpečný pro lidské zdraví, proto se jeho použití nedá považovat za součást zelené syntézy.

Redukční vlastnosti tryptofanu zaznamenali Katsure a kol. (2009), ale neobjevili jeho stabilizační potenciál, protože použili CTAC (chlorid hexadecyltrimethylamonný) a CTAB (bromid hexadecyltrimethylamonný) jako stabilizační činidla. Poměr zlata a tryptofanu byl 100:1 a roztok byl ponechán za stabilních pokojových podmínek. Při použití CTAB vznikly nanočástice trojúhelníkového tvaru, kdy při excitaci UV světlem (365 nm) došlo k emisi bílého světla, což vysvětlují tím, že oxidovaný tryptofan navázaný na hranách trojúhelníkové nanočástice zvyšuje elektrické pole, čemuž se říká efekt hromosvodu. Použití CTAC dalo

vzniku sférickým nanočásticím. CTAC a CTAB jsou však nebezpečné jak pro člověka, tak i pro životní prostředí, a nelze je tedy považovat za součást zelené syntézy.

Jednodušší způsob předvedli Maruyama a kol. (2014), kdy směs vybrané aminokyseliny a vodného roztoku kyseliny tetrachlorozlatité v poměru 1:100 (1:50 pro Asn, Asp, Glu, Ile, Leu, Phe, Trp a Tyr, kvůli jejich nízké rozpustnosti) inkubovali v olejové lázni při 80 °C po dobu 20 minut. pH roztoku bylo poté upraveno pomocí NaOH nebo HCl na hodnoty 7,1-7,8. Z 20 zkoumaných aminokyselin vyprodukovali nanočástice následující – asparagin, kyselina aspargová, glycin, kyselina glutamová, histidin, serin, tryptofan, tyrosin a valin. Alanin, lysin, leucin, methionin, fenylalanin a tryptofan sice vytvořili nanočástice, ale ty po čase precipitovaly. Arginin, cystein a threonin nevyprodukovali žádné nanočástice. Tento článek tak opět ukázal redukčně-stabilizační vlastnost aminokyselin. Autoři blíže popsali syntézu pomocí histidinu, kde zkoumali vliv pH na tvorbu nanočástic, kdy velmi kyselé prostředí (pH 1,2 a 3) způsobilo aglomeraci nanočástic a vytvořily se tak nanopláty a nanotyče o velikosti v řádu mikrometrů. Příliš zásadité prostředí (pH 13) zase zabránilo v redukci zlata, a tedy nedošlo ke vzniku nanočástic. Dalším faktorem byla koncentrace histidinu, kdy vyšší koncentrace znamenala syntézu menších nanočástic.

Podobný pokus provedli Zare a kol (2014) s tím rozdílem, že jejich poměr koncentrací kyseliny tetrachlorozlatité a aminokyseliny byl 1:5 (dá se tedy říci poměr reaktantů nastavený ve prospěch aminokyseliny, tudíž opačný než u předchozího kolektivu autorů), a roztok povařili, dokud bezbarvý roztok nezměnil barvu. Na syntéze nanočástic se podílela kyselina glutamová, tryptofan a fenylalanin. V tomto výzkumu také ukázali, že s rostoucí koncentrací kyseliny tetrachlorozlatité roste velikost syntetizované nanočástice, s výjimkou koncentrace kyseliny tetrachlorozlatité 5 mM, kde došlo k poklesu velikosti. Při zvyšování koncentrace aminokyseliny došlo obecně ke snížení velikosti nanočástice, kromě kyseliny glutamové, kde došlo ke zvýšení velikosti nanočástice.

Zdá se, že poměr reaktantů, hlavně tedy poměr kovového prekursoru a aminokyseliny, je důležitým faktorem pro výslednou velikost nanočástice. To ostatně ukázal i Wangoo a kol. (2014), kde bylo 20 esenciálních aminokyselin v rozmezí koncentrací od 0,1 mM do 5 mM spolu s kyselinou tetrachlorozlatitou o koncentraci 3 mM, použito k syntéze zlatých nanočástic. Kyselina glutamová, fenylalanin, kyselina aspartová, threonin, serin, leucin, valin, asparagin a tyrosin úspěšně vytvořili nanočástice, a bylo dokázáno, že jejich poměr vůči zlatitým iontům dává vzniknout poměrně velkým nanočásticím; konkrétně, čím vyšší byla

koncentrace aminokyseliny, tím menší nanočástice vznikly. Ostatní aminokyseliny buďto nesyntetizovaly nanočástice vůbec (cystein, methionin, histidin, glutamin, prolin), nebo jen částečně, v tom smyslu, že nanočástice krátce po svém vzniku agregovaly.

2.2.3.2 Syntéza Ag nanočástic pomocí aminokyselin

Syntézu stříbrných nanočástic pomocí tryptofanu a tyrosinu provedli Shankar a Rhim (2015), kde do vroucího vodného roztoku aminokyseliny s KOH přidali vodný roztok AgNO₃ v poměru koncentrací 1:2. Směs vařili, dokud se roztok nezbarvil do žluta, což značilo úspěšnou syntézu nanočástic stříbra. Nanočástice vytvořené pomocí tyrosinu byly menší než ty vytvořené pomocí tryptofanu. Tímto byla prokázána redukčně-stabilizační vlastnost tyrosinu a tryptofanu i pro stříbrné nanočástice.

Pomocí tryptofanu také vytvořili nanočástice Thabaiti a kol (2016), kteří je použili pro zkoumání interakce s BSA (albumin hovězího séra – bovine serum albumin). Nanočástice měly velikost 20 nm, a interagovaly i proteinem BSA což dotyční dokázali pozorováním zhášení fluorescence pocházejícího od BSA. Contino a kol. (2015) použili tyrosin k tvorbě malých nanočástic stříbra (5-10 nm), kdy syntéza probíhala za nízkých teplot. Nicméně, tyrosin byl použit jen jako stabilizační činidlo, pro redukci použili NaBH₄, což vylučuje tuto metodu z metod zelené syntézy

Syntézu stříbrných nanočástic pomocí aminokyselin či jejich oxidovaných forem a ozářením xenonovou lampou provedli Matos a Couroll (2017). Z 21 zkoumaných aminokyselin vytvořili nanočástice roztoky s tyrosinem, methioninem, tryptofanem, cystinem a histidinem. Světlo indukovalo redukci stříbrných iontů Ag⁺ na Ag⁰ tak, že došlo ke zvýšení teploty roztoku a změně pH, čímž došlo k oxidaci aminokyselin, které tak mohly redukovat stříbrné ionty. Po redukci iontů se začaly formovat stříbrné klastry, které dále aglomerovaly do nanočástic. Aminokyseliny dále zabránily aglomeraci pomocí elektro-sterické stabilizace, čímž se ukázala jejich redukčně-stabilizační vlastnost. Zajímavostí bylo, že tryptofan nevyžadoval ozáření lampou, ale stačilo do roztoku přidat NaOH, a došlo tak k redukci stříbra. Získané nanočástice měly sférický tvar, byly od 16 nm do 30 nm velké a byly stabilní. Ukázalo se také, že syntéza touto metodou není efektivní pro arginin a fenylalanin, které ačkoliv nanočástice vytvořily, tak po ozáření aglomerovaly.

Obdobný experiment s ozařováním roztoku xenonovou lampou, provedli dříve Tomita a kol (2014). Ti však použili pouze tryptofan, ale v různých koncentračních poměrech ke stříbrnému prekursoru, kdy prokázali, že se zvyšující se koncentrací stříbrného prekursoru dochází k tvorbě větších nanočástic. Obdobně prokázali i vliv délky ozáření xenonovou lampou, kdy se s delší dobou ozáření zvyšovala absorbance roztoku stříbrných nanočástic.

Aminokyseliny nemusí být použity pouze k syntéze nanočástic, ale také k jejich povrchové úpravě, jako je tomu například u Shumi a kol. (2023), kde pro povrchovou úpravu použili histidin a fenylalanin, zatímco stříbrné nanočástice syntetizovali zelenou metodou pomocí extraktu z listu *Lippia abyssinica*, který slouží jako redukční i stabilizační činidlo zároveň.

2.2.4 Mechanismus působení aminokyselin při syntéze Ag/Au nanočástic

Při syntéze nanočástic slouží aminokyseliny zároveň jako redukční a stabilizační činidlo. Každá aminokyselina má jiný redukční potenciál, který závisí na její velikosti a prostorovém uspořádání atomů. Existuje korelace mezi polarizovatelností aminokyseliny a její míře oxidovatelnosti. (Matos a Couroll 2017).

Důležité je pH prostředí, v jakém se aminokyseliny nacházejí. Tyrosin a tryptofan redukuje Ag^+ na Ag^0 v zásaditém prostředí. U tyrosinu je za redukci zodpovědná hydroxylová skupina na fenolu (Xie a kol 2007), u tryptofanu pyrolová skupina na indolu (Katsure a kol. 2009). Oxidovaný tyrosin a tryptofan se poté chovají jako stabilizační činidla. (Shankar a Rhim). V kyselém prostředí existuje tryptofan ve formě zwitterionu, kdy redukuje Ag^+ na Ag^0 , sám se stává radikálem, který umožňuje další redukci jiného Ag^+ iontu a vzniká tak iminová forma tryptofanu a dva neutrální stříbrné atomy, které mohou reagovat se dvěma Ag^+ ionty za vzniku Ag_4^{2+} formy (Al-Thabaiti a kol. 2016).

Podle zjištění Wangoo a kol. (2014), aminokyseliny s nukleofilním postranním řetězcem (Ser, Thr, Cys) se ukazují být dobrými redukčními činidly. Alifatické aminokyseliny (Gly, Ala) sice redukuje zlatité ionty, ale již nevytváří nanočástice. Hydrofóbní aminokyseliny (Val, Leu) redukuje zlatité ionty a tvoří zlaté nanočástice, izoleucin ale tvoří nanočástice v menší míře. Methionin a prolin neredukují zlatité ionty. Aminokyseliny s aromatickým kruhem dobře redukuje zlatité ionty, a to i v malé koncentraci, a dobře vytváří nanočástice. Ve větší koncentraci mají tendenci agregovat. Asparagin dobře redukuje zlatité ionty a tvoří monodisperzní nanočástice. Podobná aminokyselina glutamin však zlatité ionty neredukuje.

Aminokyseliny s kyselým postranním řetězcem dobře redukují zlatité ionty, oproti tomu bazické aminokyseliny neredukují zlatité ionty. Bazická aminokyselina histidinu však dokáže redukovat AuCl_4^- ionty v kyselém prostředí (Maruyama a kol 2014).

2.2.5 Užití zlatých a stříbrných nanočástic

Zlaté a stříbrné nanočástice mají širokou škálu využití, od kosmetiky a úpravě textilu přes elektrotechniku, až po biomedicínské aplikace.

Zajímavým využitím stříbrných nanočástic je detekce jiných kovů v roztoku (Contino a kol. 2016). Zlaté nanočástice zase dokáží detekovat gama záření, a to vlivem rozpadu adsorbovaných ssDNA (jednovláknová DNA – single stranded DNA) vláken na jejich povrchu, a následné agregaci nanočástic, které se nachází v solném prostředí. (Wang a kol. 2020). Agregace nanočástic v solném prostředí se využívá i pro detekci kontaminace halal produktů vepřovým masem v muslimských zemích (Subara a Jaswir 2018). Detekovat lze i léčiva v krevní plasmě, zlaté nanočástice obalené patuletinem se ukázaly být vhodné pro detekci léčiva piroxicamu v krevní plasmě, a to díky vlastnosti piroxicamu zhaset fluorescenci patuletinu (Ateeq a kol. 2014).

Nanočástice mají také antibakteriální aplikace. Zlaté nanočástice je možné použít k ošetření různých textilií, kdy přítomnost nanočástic ve vláknech textilu má antibakteriální účinky, přičemž textilie se dají využít i pro syntézu *in situ* (Velmurugan a kol. 2016). Stříbrné nanočástice usmrcují gram negativní/pozitivní bakterie, což naznačuje jejich využití v dezinfekci povrchů, osobní hygieně, či v čištění vod nebo vzduchu (Tomita a kol. 2014). Proto mohou mít stříbrné nanočástice využití při obalování potravin, kdy zajišťují ochranu před bakteriemi a UV zářením, které zkracuje trvanlivost potravin, nicméně je třeba mít na paměti riziko pozření nanočástic člověkem, kdy zatím nejsou přesně známy dopady, které by to mohlo mít (Shankar a Rhim 2015). Stříbrné nanočástice totiž vykazují cytotoxický efekt také na savčí tkáň, jako například na endoteliální buňky hovězí sítnice (Sriram a kol. 2012) nebo na alveolární epitelové buňky (Stoehr a kol. 2011).

Předmětem výzkumu je i mechanismus, jakým se nanočástice do buněk dostávají, aby bylo možné poté upravit jejich povrch, a doručovat tak léčiva (Yen a kol 2009). S průnikem do buněk souvisí také jejich protinádorové působení. Zlaté nanočástice vykazují proti rakovinovou aktivitu, a to zejména, pokud k jejich syntéze byly použity metabolity dané

rakovinné linie (Soliman a kol. 2020). Zlaté nanočástice mají potenciální využití při fototermální terapii, která si klade za cíl neinvazivně ničit nádorové bujení pomocí zlatých nanočástic jako fototermálních činidel, které přeměňují elektromagnetickou energii z blízké infračervené oblasti na tepelnou energii, čímž způsobí smrt nádorových buněk v důsledku tepelného stresu tzv. hypertermie. Použití zlatých nanočástic však stále nese jistá úskalí v podobě dlouhé retence v orgánech, nechtěné vyvolání nekrózy a další (Yang a kol. 2019).

2.3 Metody charakterizace nanočástic

2.3.1 UV-VIS absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie v UV-VIS oblasti elektromagnetického spektra záření je běžně používaná technika pro zjišťování koncentrace látek v roztoku, na základě snižování intenzity elektromagnetického záření při průchodu absorbujícím prostředím, což je nejčastěji charakterizováno prostřednictvím veličiny absorbance $A(\lambda)$, definované podle vztahu

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda) = -\log \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

kde $T(\lambda)$ je propustnost, která se vyjadřuje jako poměr intenzity záření ze vzorku vycházejícího $I(\lambda)$ a intenzity záření do vzorku vstupujícího $I_0(\lambda)$, a dále lze absorbanci definovat podle Lambertova-Beerova zákona, jako přímou úměru extinkčního koeficientu $\varepsilon(\lambda)$, koncentrace látky absorbující záření c a dráhou průchodu záření vzorkem l . (Prosser a kol., 1989).

Nanočástice ušlechtilých kovů vykazují absorpční pás ve viditelné oblasti světla, a to díky SPR jevu. Poloha absorpčního pásu závisí na velikosti, tvaru (Al-Thabaiti a kol 2016) a dielektrickém prostředí (Zarabi a kol., 2013), ale obecně se dá říci, že zlaté nanočástice mají maximum absorpčního pásu v rozmezí od 500 nm do 550 nm (Hammami a kol. 2021) a stříbrné nanočástice od 390 nm do 450 nm, za předpokladu, že nejsou nijak povrchově upravené (Li a kol. 2010). Díky bathochromnímu či hypsochromnímu posunu můžeme pozorovat povrchové úpravy nanočástic, například navázání peptidů či proteinů, za podmínky zachování jejich stability, či navázání nanočástic na agar. (Havaladar a kol. 2020, Shankar a Rhim, 2015).

2.3.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Základním principem DLS techniky je rozptyl elektromagnetického záření po průchodu prostředím s nanočásticemi, které se v roztoku pohybují Brownovým pohybem. Takto rozptýlené záření interferuje, a jeho intenzita v čase fluktuuje, což zaznamenává detektor. Z těchto fluktuací je získána autokorelační funkce, díky které získáme translační difúzní koeficient D_t , který dosadíme do Stokesovy-Einsteinovy rovnice

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}, \quad (1)$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta, T je teplota roztoku, η je absolutní viskozita, a R_H je hydrodynamický poloměr, což je hledaná veličina. Výsledkem je však distribuce velikostí. (Bhattacharjee 2016).

DLS měření se používá k zjištění odhadu velikosti nanočástic přímo v roztoku, jejich distribuce velikosti a porovnání různých vlivů na velikost nanočástic při/po jejich syntéze.

2.3.3 Měření zeta potenciálu

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál mezi elektrickou dvojvrstvou nanočástice a okolním dielektrikem. Zeta potenciál nelze měřit přímo, a vypočítává se z Henryho rovnice pomocí elektroforetické mobility μ_E . Pokud se na roztok s nanočásticemi aplikuje elektrické pole, budou se nanočástice pohybovat k elektrodě s opačným nábojem. Rychlost tohoto pohybu lze měřit například laserovou dopplerovskou velocimetrií, a vydělit jí aplikovanou intenzitou elektrického pole, čímž se získá elektroforetická mobilita, pomocí které se vypočítá zeta potenciál jako

$$\zeta = \frac{3\eta\mu_E}{2\varepsilon_r\varepsilon_0 f(Ka)}, \quad (1)$$

kde η je viskozita při teplotě měření, ε_r je relativní permitivita, ε_0 je permitivita vakua a $f(Ka)$ je Henryho funkce (Bhattacharjee 2016).

Hodnoty zeta potenciálu se užívají ke stanovení náboje nanočástic a jejich stability v kontextu použitého média (Matos a Courrol 2017). Hodnota zeta potenciálu také nastiňuje schopnost nanočástice pronikat do buněk, kdy vyšší hodnoty zeta potenciálu naznačují vyšší

pravděpodobnost průniku do buňky, zatímco nižší hodnoty naznačují aglomeraci nanočástic, a tedy horší průnik skrze membránu buněk (Kettler a kol. 2013). Za dobré hodnoty se považují hodnoty $|20|$ mV a vyšší.

2.3.4 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronová mikroskopie je zobrazovací metoda, založená na průchodu urychleného proudu elektronů ve vakuu vzorkem na nosné síťce, a dopadu těchto elektronů na luminiscenční stínítko, kde se vytváří obraz, přičemž prošlé elektrony vytvářejí na stínítku jasná místa, zatímco elektrony vzorkem rozptýlené vytvářejí na stínítku místa tmavá (Prosser a kol., 1989). Příprava vzorku probíhá tak, že se nakápne roztok s nanočásticemi na měděnou mřížku potaženou uhlíkovou vrstvou. Vzorek se poté ponechá na vzduchu, aby se médium vypařilo (Wangoo a kol. 2014), popřípadě se vloží do vakuové komůrky (Maruyama a kol. 2014).

Dalo by se říci, že je tato metoda velmi důležitá při charakterizaci nanočástic, protože poskytuje informaci o velikosti, rozdělení velikostí a tvaru nanočástic, a potvrzuje tak měření UV-VIS spektroskopie a DLS. Někdy se však může stát, že i zobrazování pomocí TEM není správné, například v případě, kdy se nanopláty tváří jako nanotyčinky, protože byly na nosné síťce kolmo k proudu elektronů (Xie a kol. 2007). Taktéž výše zmíněné vysychání může měnit charakter vzorku. Dále byly pozorovány případy, kdy došlo ke změně velikosti nanostruktur: například nanostruktury obsahující kationtové zlato byly ze svazku elektronů redukovány a výsledná velikost nanostruktur pak vycházela větší, než by odpovídalo jejich luminiscenčnímu charakteru (Ostruzska a kol. 2022).

2.3.5 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a energiově disperzní spektroskopie (EDS)

Skenovací elektronová mikroskopie využívá svazku urychlených elektronů ke skenování povrchu vzorku v bodové stopě, tlusté několik nanometrů, po řádcích, kdy se urychlené elektrony od povrchu odrážejí, čímž vznikají primární elektrony, anebo vyrážejí sekundární elektrony, přičemž oba typy elektronů jsou zachyceny scintilačním detektorem ve stejném

sledu, jako probíhá řádkování a díky tomu vzniká plastický obraz studovaného povrchu (Prosser a kol. 1989).

Energiově disperzní spektroskopie, někdy též známá jako energiově disperzní rentgenová spektroskopie (EDXS), je metoda, která založená na detekci charakteristických rentgenových fotonů emitovaných vzorkem. Pokud na vzorek působí elektronový svazek nebo rentgenové záření, dojde k vyražení nějakého elektronu z nějaké vnitřní elektronové slupky, čímž dojde k vytvoření elektronové díry, která je rychle zaplněná elektronem z vyšší elektronové slupky, během čehož dochází k emisi charakteristického rentgenového fotonu, jehož energie je dána rozdílem energií vyšší elektronové slupky a nižší elektronové slupky. Tímto způsobem můžeme změřit prvkové složení vzorku (Goldstein a kol. 2003).

2.3.6 Fluorescenční spektroskopie

Fyzikálním principem fluorescenční spektroskopie je zářivý přechod zpravidla z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu na nějakou vibrační hladinu základního stavu (Prosser a kol., 1989). Fluorescence, jako vlastnost nanostruktur ušlechtilých kovů stojí na principu malého počtu atomů v jejich struktuře (velikosti do 2 nm), a tudíž jejich podobnosti s molekulami, se využívá v detekci jiných kationtů kovů (Contino a kol. 2016) nebo určení interakce s proteiny (Thabaiti a kol. 2016).

2.3.7 Další metody charakterizace nanočástic

Termogravimetrická analýza je kvantitativní analytická metoda založená na pozorování změn fyzikálních nebo chemických vlastností vzorku v čase při vystavení teplotní změně. Výsledkem analýzy je termogram, což je grafická reprezentace změny hmotnosti v závislosti na teplotě nebo čase. Termogravimetrická analýza poskytuje informaci o termální stabilitě, oxidativní stabilitě, době života, složení a kinetice rozkladu (Saadatkhan a kol. 2020). Díky této technice lze určit, jakým způsobem se na povrch nanočástic váží například aminokyseliny (Selvakannan a kol. 2004).

Další metodou je FTIR neboli infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, která je založená na interakci infračerveného záření s analytem, za využití interferometru, přičemž absorpce takového záření závisí na vibračních stavech molekul. Tato metoda se používá

k potvrzení povrchové úpravy nanočástic (Havaladar a kol. 2020). Obdobně se může užít i Ramanova spektroskopie či gelová elektroforéza (Zare a kol. 2014).

Metoda rentgenové difrakce (XRD) se používá k získání informace o krystalové struktuře nanočástic, a to za použití Braggovy rovnice, která popisuje difrakci rentgenového záření na rovinné mřížce krystalu (Prosser a kol. 1989).

3 Experimentální část

3.1 Cíle práce

Cílem této experimentální diplomové práce je jednak sepsat poznatky z literární rešerše o známých metodách syntézy Au anebo Ag nanostruktur pomocí aminokyselin, jednak syntetizovat nanočástice zlata pomocí vybraných aminokyselin za různých teplotních podmínek, charakterizovat je pomocí vybraných metod a diskutovat výsledky s dostupnou literaturou a mezi sebou, pokud je to relevantní.

3.2 Chemikálie

K syntéze zlatých nanočástic jsme použili následující chemikálie. Aminokyseliny: L-tyrosin, 99% (Carl Roth, Německo), L-tryptofan, 99% (Carl Roth, Německo), L-fenylalanin, 99% (Sigma-Aldrich, USA), L-histidin, 99% (Sigma-Aldrich, USA) a L-cystein, 99% (Carl Roth, Německo). Dále tetrachlorzlatitá kyselina, 99,9% (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich, USA), hydroxid sodný, 98% (NaOH , Sigma-Aldrich, USA) a deionizovanou vodu (diH_2O) z filtračního a demineralizačního přístroje Milli-Q (Millipore Corp., USA).

3.3 Syntéza nanočástic

Syntéza probíhala dvěma způsoby, které si označíme jako syntézu S1 a syntézu S2. Jejich průběh je podobný, liší se jen použitými aminokyselinami a jejich koncentracemi.

3.3.1 Syntéza S1

K syntéze S1 byly použity vodné roztoky aminokyselin v koncentracích, které udává tabulka 1. Vodný roztok $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mM, sloužil jako prekurzor zlata. Aminokyseliny fungovaly jako redukční i stabilizační činidlo zároveň. Při výběru aminokyselin byl zohledněn jejich obsah v molekule BSA, a jejich koncentrace byly vypočítány s ohledem na syntézu nanoklastrů podle Ostruszka a kol. (2022). Vodný roztok NaOH , 0,2 mM, pak upravoval pH vzorku na hodnotu 12, čímž aktivoval redukční vlastnosti příslušných aminokyselin.

Tabulka 1: *Koncentrace zásobních roztoků použitých chemikálií a objemy použité na syntézu vzorků pro syntézu S1.*

	Cys	Phe	His	Tyr	Trp	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	NaOH
c [mM]	3,5	2,7	1,7	2	0,2	2,5	100
V [ml]	1	1	1	1	1	0,8	0,2

Do kádinky s magnetickým míchátkem jsme napipetovali 1 ml vybrané aminokyseliny. K ní jsme přidali 0,8 ml vodného roztoku HAuCl₄ a nechali jsme 90 sekund míchat. Poté jsme přidali 0,2 ml vodného roztoku NaOH a opět jsme nechali míchat po dobu 90 sekund. Vzorek, o celkovém objemu 2 ml, jsme přepipetovali do ependorfky. Syntéza byla zopakována 3x pro každou aminokyselinu. Takto připravené nanočástice budeme dále označovat jako AuNP(X)_Y, kde X označuje jednopísmennou zkratku aminokyseliny, a Y označuje zkratku teploty vývoje systému (RT – pokojová teplota, 50C – zvýšená teplota, 0C – snížená teplota).

3.3.2 Teplota vývoje systému

Nejprve jsme provedli evaluační syntézu, abychom zjistili, které nanočástice se vyvíjejí rychle, a které pomalu. Připravili jsme tedy podle výše uvedeného návodu 5 vzorků nanočástic, každý s jinou aminokyselinou, a ty jsme umístili do termobloku (Bionsan TDB-100, Litva) zahřátém na 50 °C. Po několika minutách se nanočástice vyvinuly v systému s tyrosinem a tryptofanem, následoval fenylalanin. Pro tyto tři aminokyseliny jsme se proto rozhodli provést syntézu nanočástic za chladu. Po asi jednom dni se vyvinul systém s histidinem. Systém s cysteinem se nevyvinul ani po dvou dnech. Pro histidin a cystein jsme se rozhodli provést syntézu za zvýšené teploty. Syntéza za pomoci všech aminokyselin byla provedena za pokojové teploty.

Všechny syntézy jsme provedli třikrát. Během syntézy za pokojové teploty jsme nechali vzorky v laboratoři. Během syntézy za zvýšené teploty jsme nechali vzorky v termobloku zahřátém na 50 °C. Pro syntézu za chladu jsme použili polystyrenovou krabici naplněnou drceným ledem. Kádinku s magnetickým míchátkem pro syntézu jsme ponořili do ledu, a syntéza probíhala podle postupu uvedeném výše. Vytvořené vzorky jsme během měření uchovávali v ledu, v mezidobí v lednici, kde byla teplota 4 °C.

3.3.3 Syntéza S2

Syntéza S2 probíhala obdobně, jako syntéza S1. V této syntéze jsme použili kombinaci dvou aminokyselin, a to cysteinu s ostatními aminokyselinami. Pro tento účel jsme museli změnit koncentrace použitých látek, a to způsobem popsaným v tabulce 2 níže. Do kádinky jsme napipetovali 0,4 vodného roztoku cysteinu, 1 ml vodného roztoku vybrané aminokyseliny a 0,4 ml vodného roztoku HAuCl_4 a nechali jsme 90 sekund míchat. Dále je postup stejný, jako u syntézy S1. Takto připravené vzorky jsme pojmenovali CX RT, kde X je použitá aminokyselina jiná než cystein. Charakterizace probíhala stejně, jako u syntézy S1.

Jak bude vidět na výsledcích, nevznikaly nám v této syntéze nanočástice, ale spíše zlaté komplexy. Proto jsme neprováděli již měření TEM. Vzorky byly kalné a mírně nažloutlé, po 168 hodinách od začátku syntézy se vzorek zagregoval na dno, a po protřepání byl opět kalný, a mírně žlutý.

3.3.4 Syntéza S3

3.3.4.1 Syntéza S3 RT

Pokračovali jsme syntézou S3, která byla rozdílná od S2 pouze tím, že namísto 100 mM NaOH jsme použili 200 mM NaOH. Během této syntézy byl však vzorek čirý, bez náznaku vzniku nanočástic nebo zlatých komplexů.

3.3.4.2 Syntéza S3 50C

Zkusili jsme vzorky vložit do termobloku. Syntézu jsme pojmenovali S3 50C. Tato syntéza byla také neúspěšná. Roztok velmi mírně zežloutl, a takový zůstal po celý týden.

3.3.5 Syntéza S4

Po syntéze S3 50C následovala syntéza S4, kde jsme místo 200 mM NaOH použili 500 mM NaOH. Vzorky však po jednom dni zagregovaly, a usadily se na dně ependorfy ve formě černého agregátu.

Pro úplnost ještě uvádíme tabulku s použitými koncentracemi a objemy jednotlivých komponentů.

Tabulka 2: *Koncentrace zásobních roztoků použitých chemikálií a objemy použité na syntézu vzorků pro syntézy S2 až S4. Tlustě jsou vyznačeny změny v koncentraci pro NaOH.*

S2	Cys	Phe	His	Tyr	Trp	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	NaOH
c [mM]	8,75	2,7	1,7	2	0,2	5	100
V [ml]	0,4	1	1	1	1	0,4	0,2
S3 RT	Cys	Phe	His	Tyr	Trp	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	NaOH
c [mM]	8,75	2,7	1,7	2	0,2	5	200
V [ml]	0,4	1	1	1	1	0,4	0,2
S3 50C	Cys	Phe	His	Tyr	Trp	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	NaOH
c [mM]	8,75	2,7	1,7	2	0,2	5	200
V [ml]	0,4	1	1	1	1	0,4	0,2
S4	Cys	Phe	His	Tyr	Trp	HAuCl ₄ ·3H ₂ O	NaOH
c [mM]	8,75	2,7	1,7	2	0,2	5	500
V [ml]	0,4	1	1	1	1	0,4	0,2

3.4 Charakterizace nanočástic

Harmonogram charakterizace nanočástic se lišil v závislosti na teplotě vývoje systému. Tímto harmonogramem jsme koordinovali charakterizaci nanočástic pomocí metod UV-VIS spektroskopie, DLS a měření zeta potenciálu. Tento harmonogram charakterizace nanočástic se týká pouze syntézy S1.

Pro pokojovou teplotu jsme měřili charakteristiky nanočástic v časech 0 hodin, 1 hodina, 2 hodiny, 24 hodin, 48 hodin, 168 hodin (alias 1 týden) a 1 měsíc od začátku syntézy. Tuto syntézu jsme označili jako S1 RT.

Pro syntézu v 50 °C jsme měřili charakteristiky nanočástic v časech 0 hodin, 1 hodina, 2 hodiny, 24 hodin, 48 hodin, 168 hodin (alias 1 týden) a 240 hodin (10 dnů) od začátku syntézy. Tuto syntézu jsme označili jako S1 50C.

Pro syntézu v chladu jsme měřili charakteristiky nanočástic v časech 0 minut, 30 minut, 60 minut, 90 minut, 120 minut, 24 hodin, 48 hodin, 168 hodin a 1 měsíc od začátku syntézy. Tuto syntézu jsme označili jako S1 0C.

3.4.1 UV-VIS spektrum

Pro měření UV-VIS spekter jsme použili absorpční spektrofotometr Specord 250 PLUS – 223G1032 (Analytik Jena, Německo) s následujícími parametry měření:

- Rozsah – 250-750 nm
- Šířka štěrbinu monochromátoru – 2 nm
- Rychlost měření – 2 nm/s
- Krok měření – 1 nm

Vzorek jsme napipetovali do křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm, a 20x jej naředili deionizovanou vodou. Deionizovaná voda byla ve druhé kyvetě, jako reference.

Výsledný graf je průměrem tří takto naměřených vzorků.

3.4.2 Dynamický rozptyl světla a zeta potenciál

Přístroj Zetasizer, NanoZS (Malvern Instrument, UK) poskytl měření hydrodynamického průměru a zeta potenciálu.

Pro zjištění hydrodynamického průměrů jsme umístili 20x zředěný vzorek do polystyrenové kyvety s optickou dráhou 1 cm. Kyveta byla vložena do přístroje, kde byla temperovaná teplota 22 °C. Přístroj poté provedl 5 měření po deseti cyklech. Jedno měření tedy obsahuje průměrnou hodnotu z 10 cyklech. Těchto 5 měření bylo poté zprůměrováno na jednu hodnotu pro jeden vzorek. Uvedené hodnoty v kapitole Výsledky jsou poté průměrem tří těchto průměrů. Jako dobré hodnoty zeta potenciálu se považují hodnoty $|20 \text{ mV}|$ a vyšší.

Pro zjištění zeta potenciálů jsme umístili 20x zředěný vzorek do mikrokyvety s elektrodami (DTS1070). Počet cyklech na jedno měření jsme omezili na 35, nicméně přístroj sám vyhodnotí, jestli se hodnota zeta potenciálů mění, a podle toho měření přeruší, takže počet cyklech tedy není pevný. Celkem proběhlo 5 měření. Každé měření nám poskytlo jednu hodnotu zeta potenciálu, dohromady bylo získáno 5 hodnot. Tyto hodnoty byly průměrovány na jednu hodnotu pro každé měření.

3.4.3 Transmisní elektronová mikroskopie

Pro měření elektronovým mikroskopem jsme vybrali jeden vzorek každé aminokyseliny z každé teploty vývoje ze syntézy S1. Dohromady tedy 8 vzorků. Tyto vzorky byly 3x zředěny, a malá kapka byla nakápnuta na měděnou síťku potaženou uhlíkovou vrstvičkou. Kapka vzorku na vzduchu schla několik desítek minut. Takto připravené vzorky byly poté odeslány na RCPTM (Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů), kde byly proměřeny Mgr. Janou Stráskou. Měření bylo realizováno na přístroji JEOL-2100 (JEOL, Japonsko) s urychlovacím napětím 120 kV. Měření velikostí nanočástic bylo provedeno ze získaných obrázků pomocí softwaru ImageJ, vždy ze sta nanočástic, každá byla měřena jednou.

3.4.4 Skenovací elektronová mikroskopie a energiově disperzní spektroskopie

Toto měření jsme provedli pro černé agregáty ze syntézy S4. Agregát jsme nejprve 10–15 vteřin sonikovali, vzorek jsme poté 3x zředili, nakápli na měděnou síťku potaženou uhlíkovou vrstvou, a nechali na vzduchu vyschnout. Vybrali jsme všechny 4 vzorky, protože ve všech se nanočástice zagregovaly. Takto připravené vzorky byly odeslány na RCPTM, kde byly přeměřeny Mgr. Jiřím Hoškem. Měření probíhalo na skenovacím elektronovém mikroskopu SCIOS 2 (ThermoFisher Scientific, USA). Vzorky byly pomocí uhlíkové vodivé pásky upevněny na hliníkový držák, a byly přeměřeny urychlovacím napětím 5 kV.

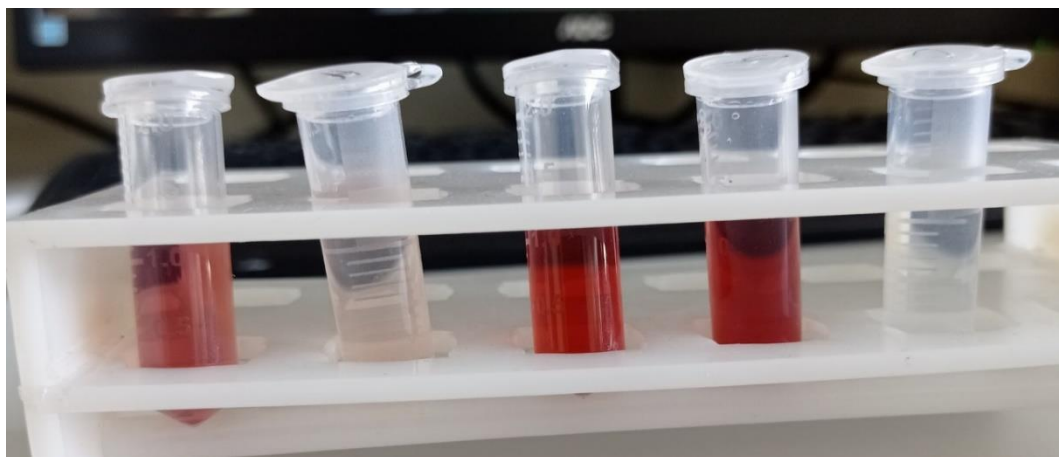
EDS analýza byla provedena pomocí UltraDry Silicon drift x-ray detektoru od stejné firmy, s urychlovacím napětím 15 kV po dobu 60 sekund.

3.5 Výsledky

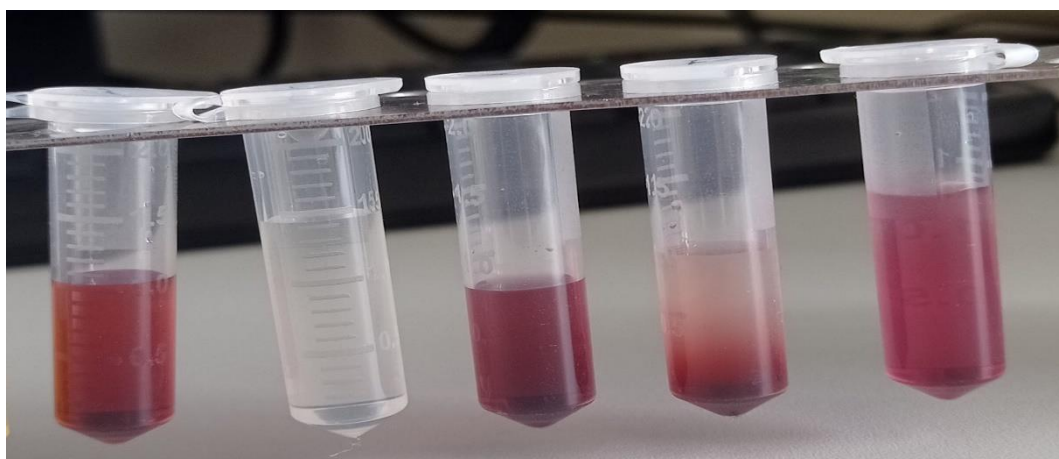
3.5.1 Syntéza S1 RT

Roztok s tyrosinem dal vzniku nanočástic prakticky okamžitě během syntézy, respektive po nalití NaOH roztok mírně zružověl, a v čase dále tmavnul. V případě tryptofanu a fenyylalaninu došlo v tvorbě nanočástic po asi 15–20 minutách od začátku syntézy, pozorovatelným červeným nádechem roztoku. Po 48 hodinách od začátku syntézy (obr. 2) roztok s histidinem velmi mírně zružověl, po čase přešel do tmavší růžové barvy. Cystein byl stále čirý, beze změny, po celou dobu syntézy, tedy po dobu jednoho měsíce. Po jednom

měsíci od začátku syntézy (obr. 3) všechny vzorky sedimentovaly, ale neagregovaly. Při orientačním měření pH měly vzorky $\text{pH} = 12$.

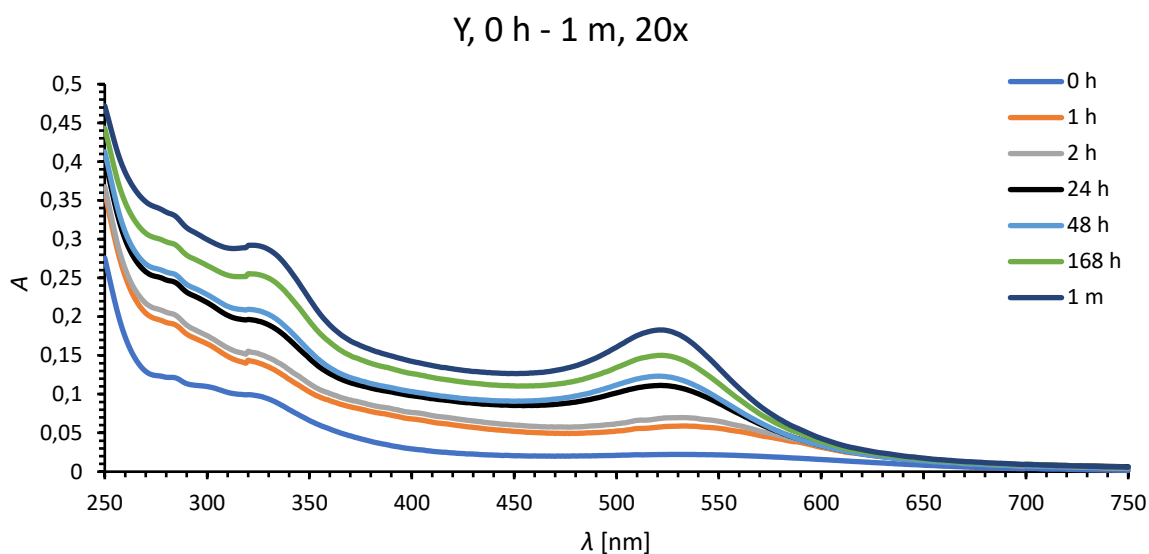


Obrázek 2: Fotografie vzorků po 48 hodinách od začátku syntézy. Jedná o vzorky zleva s fenylalaninem, histidinem, tryptofanem, tyrosinem a cysteinem.



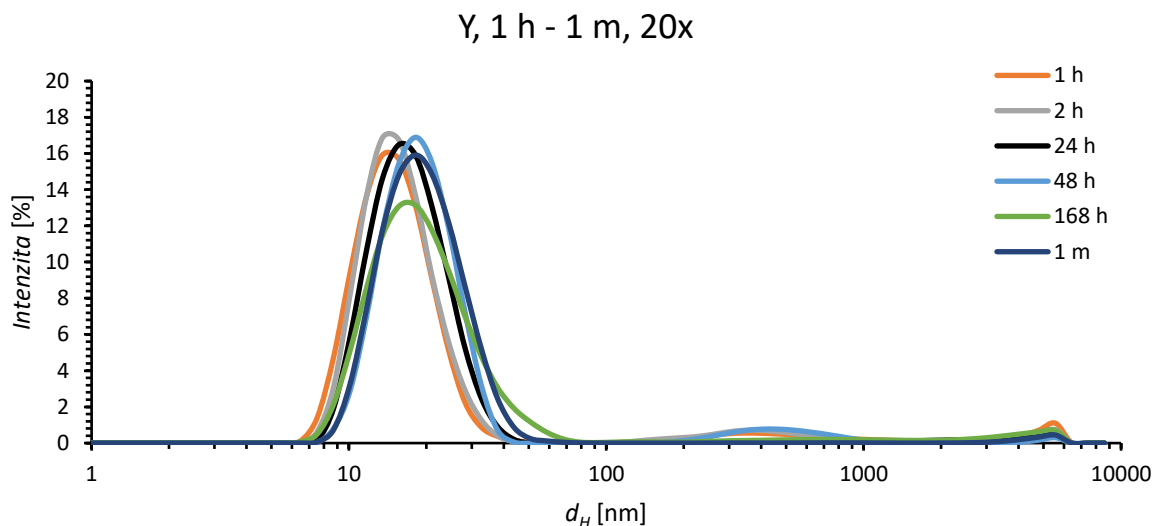
Obrázek 3: Fotografie vzorků po 1 měsíci od začátku syntézy. Je zde znatelná sedimentaci nanočástic. Jedná se o vzorky zleva s tyrosinem, cysteinem, tryptofanem, fenylalaninem a histidinem

3.5.1.1 AuNP(Y)_RT



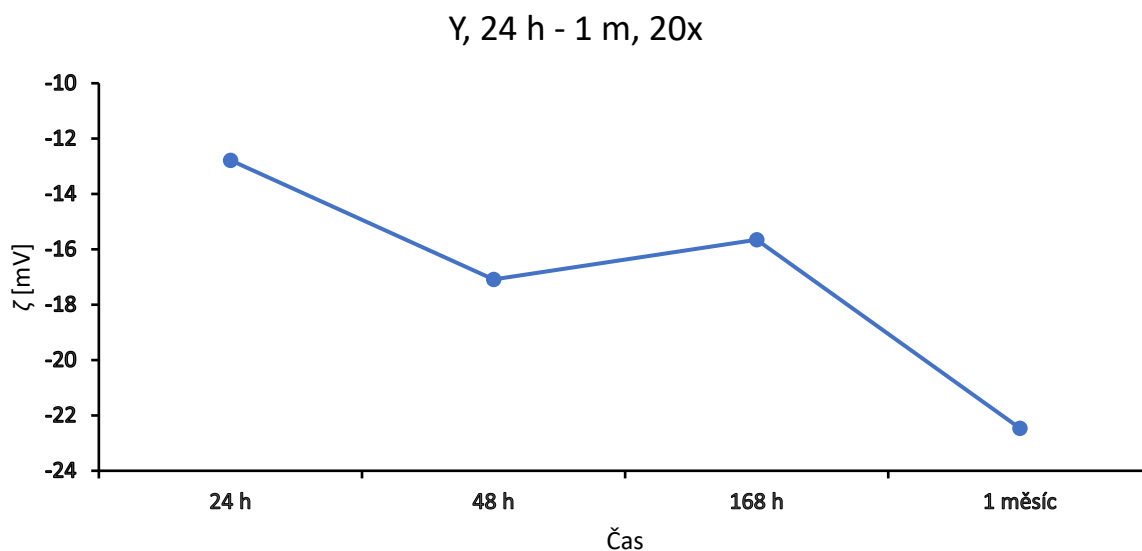
Obrázek 4: UV-VIS spektra AuNP(Y)_RT. Spektra jsou průměrem tří spekter.

Z UV-VIS spektra pro AuNP(Y)_RT (obr. 4) vidíme, že se nanočástice začaly formovat již od jedné hodiny od začátku syntézy. Jejich růst pokračoval formací charakteristického SPR píku pro zlaté nanočástice v rozmezí od 470 nm do 570 nm. Maximum vlnové délky se v tomto píku ustálilo na hodnotě okolo 521 nm.



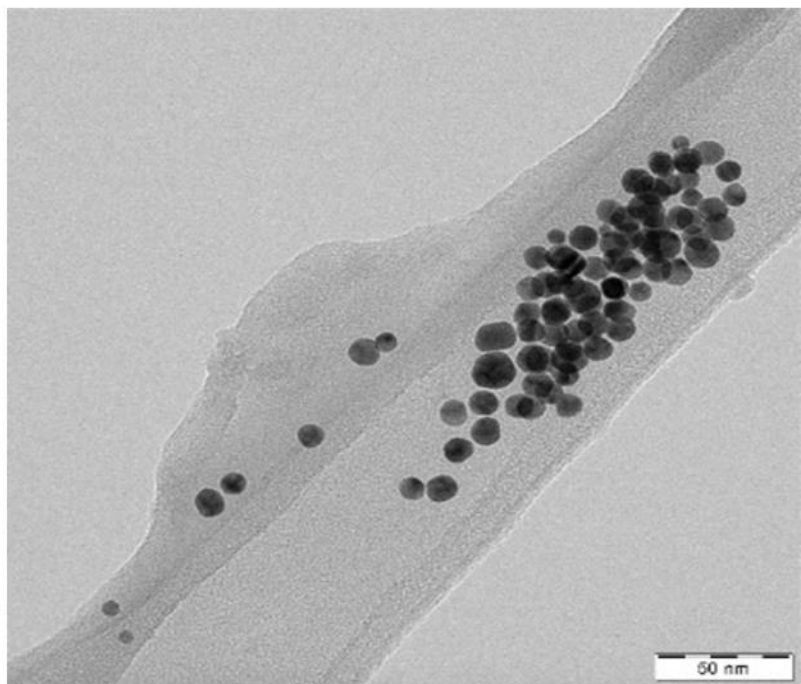
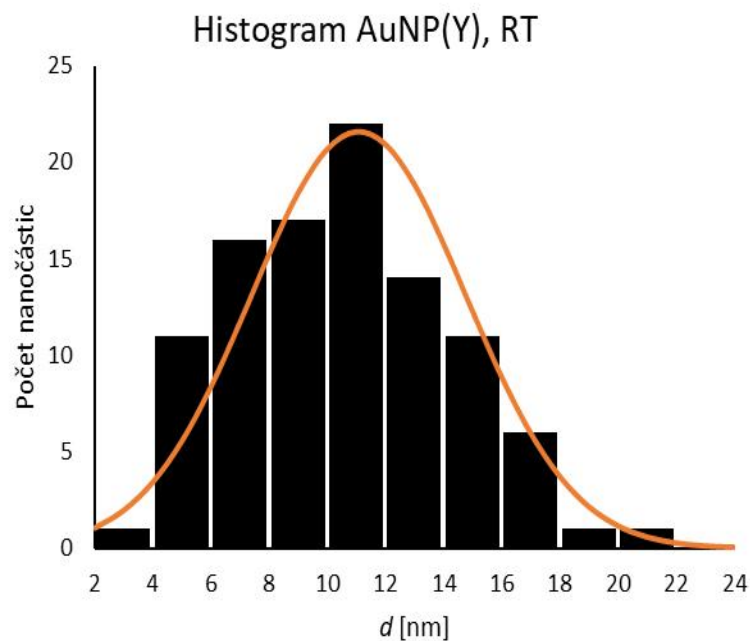
Obrázek 5: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(Y)_RT (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

DLS výsledky pro AuNP(Y)_RT (obr. 5) ukazují, že distribuce velikostí nanočástic se pohybuje okolo jednoho píku v oblasti desítek nm. Středů tohoto píku v průběhu času (vývoj systému) dosahují hodnoty 18,2 nm.



Obrázek 6: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(Y)_RT. Každý bod je průměrnou hodnotou dvou průměrných hodnot ze syntéz RT2 a RT3.

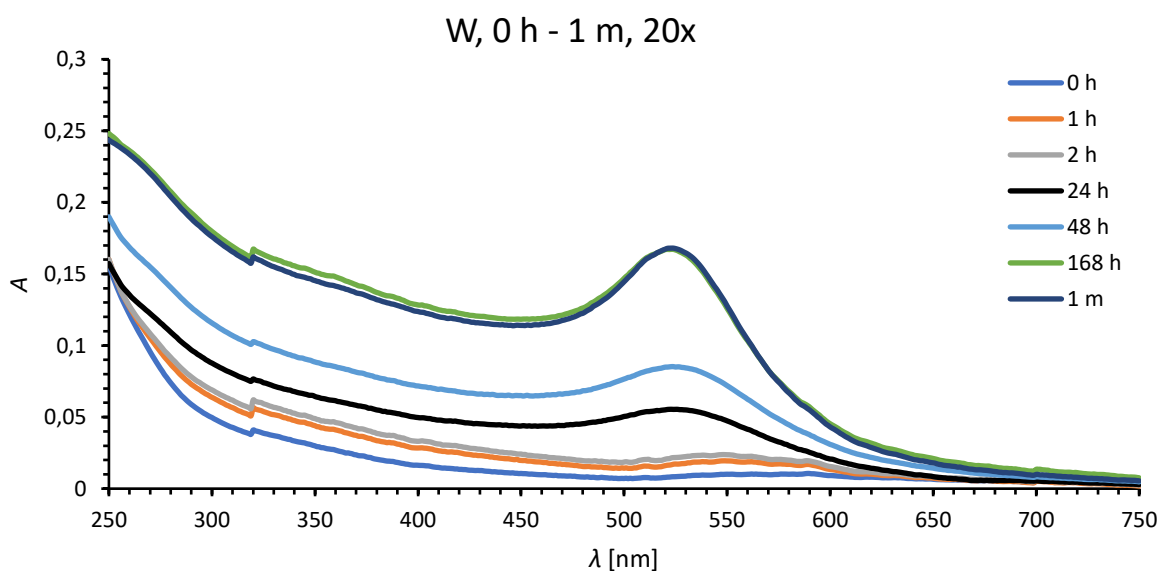
Hodnoty zeta potenciálu pro AuNP(Y)_RT (Obr. 6) jsou záporné, v čase klesaly, což naznačuje vznik záporně nabitých nanočástic. Na základě hodnot zeta potenciálu lze říci, že AuNP(Y)_RT se postupně vyvíjel a vykazoval dobrou stabilitu po měsíci od začátku syntézy.



Obrázek 7: Histogram rozložení velikostí AuNP(Y)_RT, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

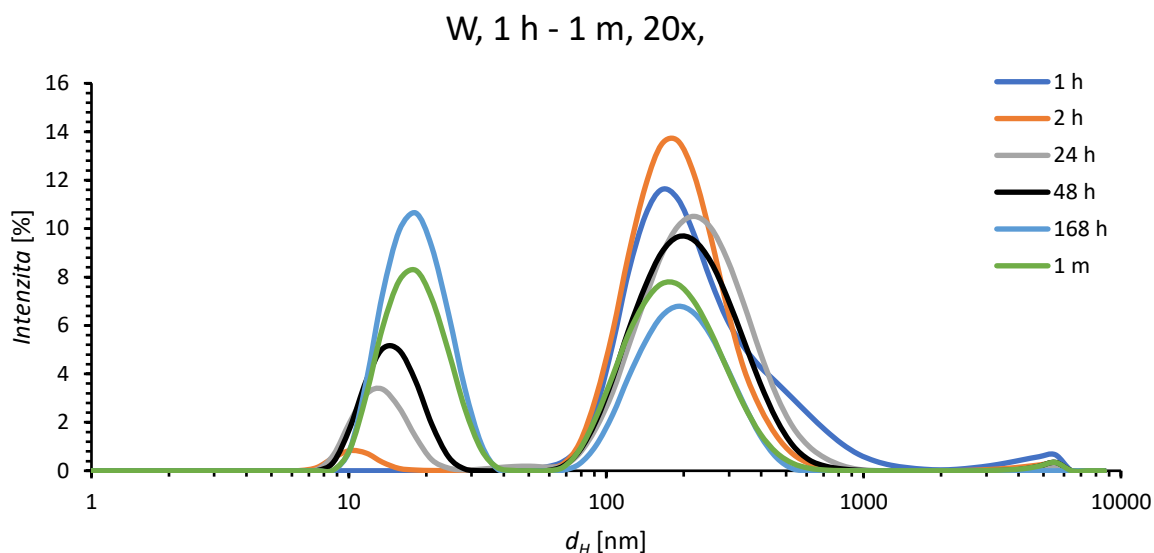
Histogram rozdělení velikostí částic odvozený z TEM snímků pro AuNP(Y)_RT (obr. 7 vlevo) ukazuje vznik nanočástic s velikostmi v rozmezí od 4 do 20 nm. Obrázek z TEM (obr. 7 vpravo) ukazuje, že jsou nanočástice kulovitěho tvaru.

3.5.1.2 AuNP(W)_RT



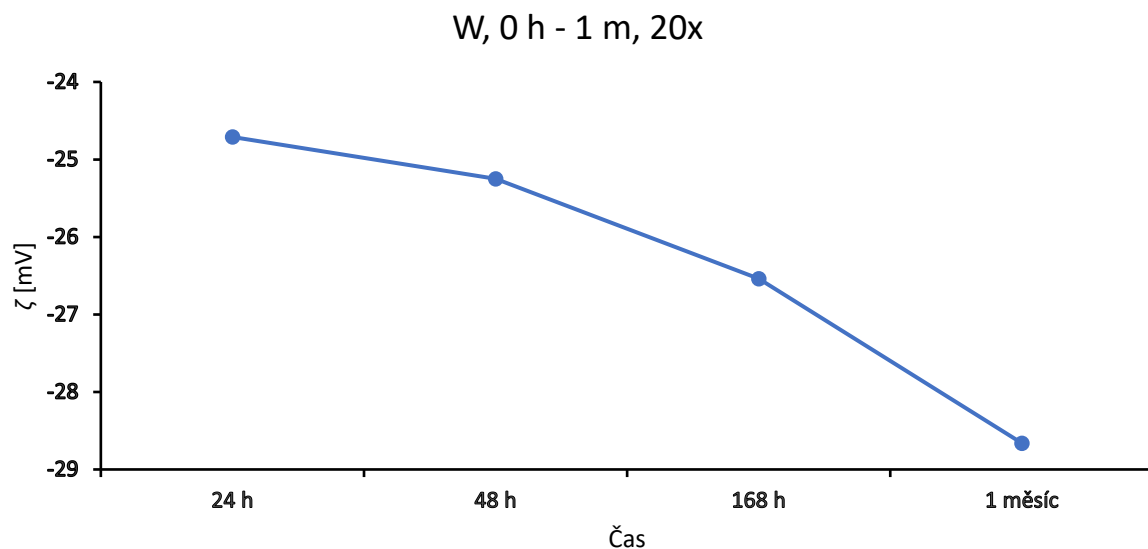
Obrázek 8: UV-VIS spektra AuNP(W)_RT. Spektra jsou průměrem tří spekter.

Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 8), že SPR pík je dobře viditelný až po 24 hodinách od začátku syntézy, ale nanočástice začaly růst již od asi 1 hodiny od začátku syntézy. SPR pík má hodnoty 470-570 nm s maximem okolo 522 nm.



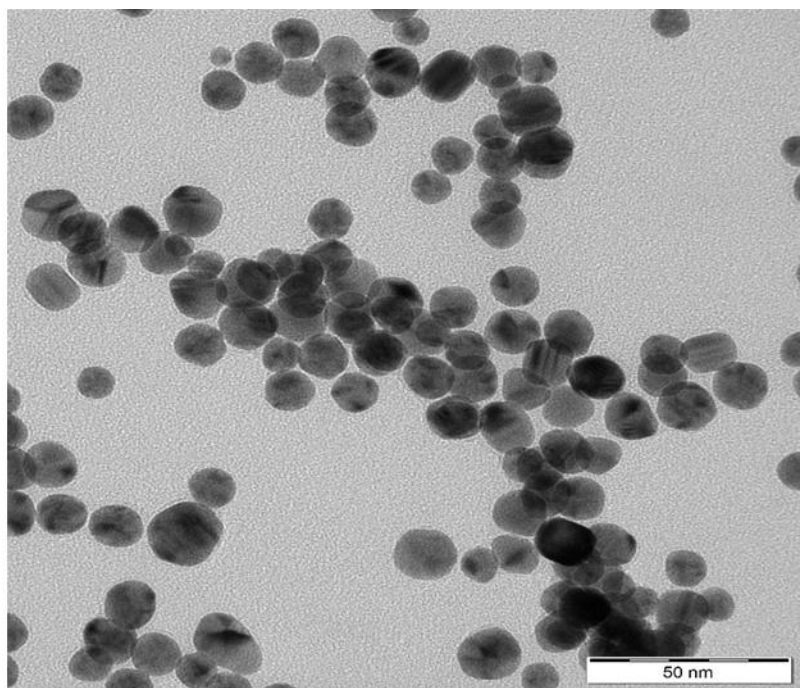
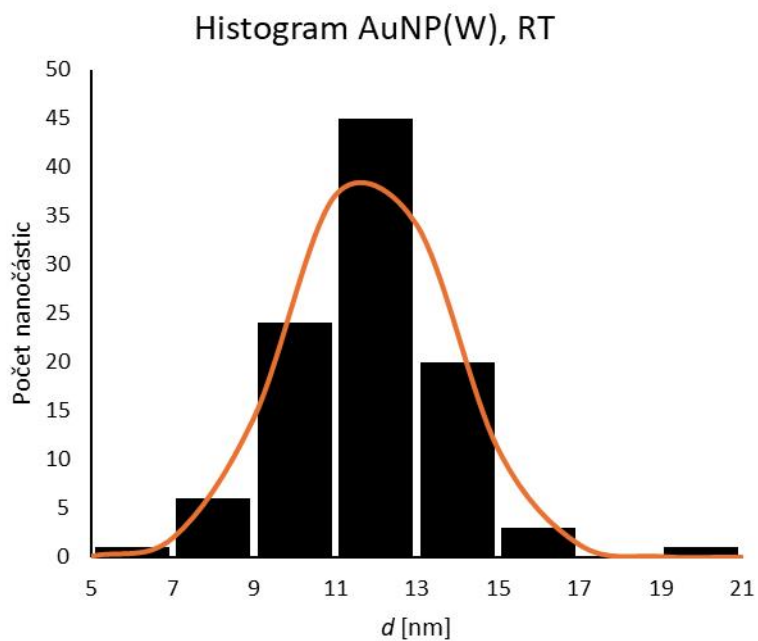
Obrázek 9: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(W)_{RT} (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem dvou nezávislých měření.

V případě syntézy pomocí tryptofanu byly jedny spektra nekonzistentní s ostatními dvěma, a proto byly odstraněny, a tedy graf (obr. 9) je výsledkem průměru pouze dvou spekter. Přítomnost dvou píků, kdy jeden je v oblasti desítek nm, a druhý je v oblasti stovek nm, naznačuje vznik dvou velikostí nanočástic. Středů těchto píků se v průběhu času ustálily na hodnotách 18,2 nm a 190 nm.



Obrázek 10: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(W) _RT. Každý bod je průměrnou hodnotou dvou průměrných hodnot ze syntéz RT2 a RT3.

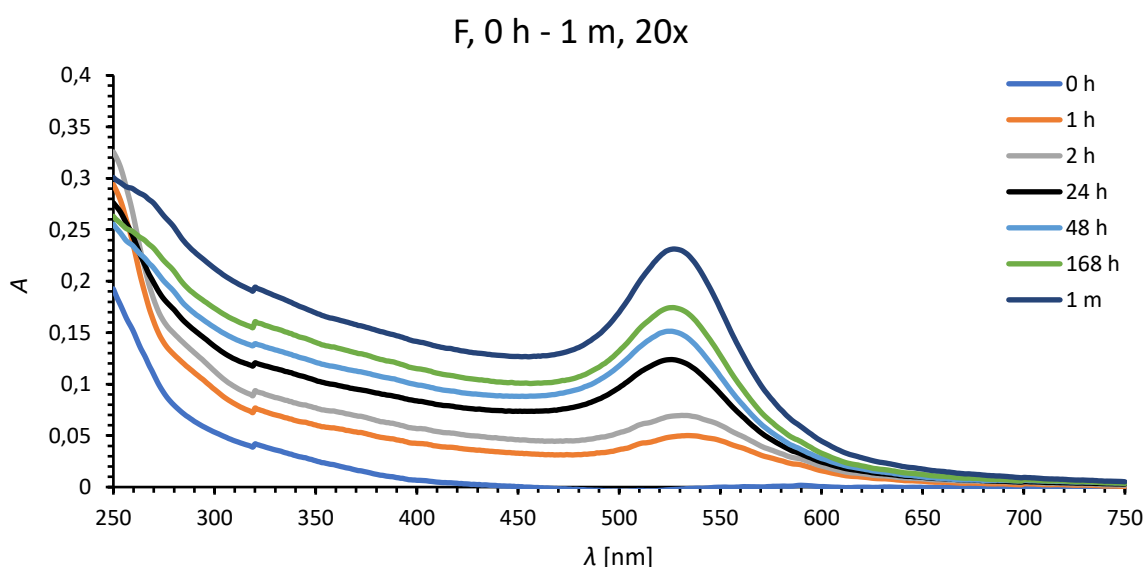
Podle obrázku č. 10 hodnoty zeta potenciálu v čase klesaly, což naznačuje postupný vývoj nanočástic, se zlepšující se stabilitou. Podle záporných hodnot usuzujeme, že jsou nanočástice záporně nabitě.



Obrázek 11: Histogram rozložení velikostí AuNP(W) _RT, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

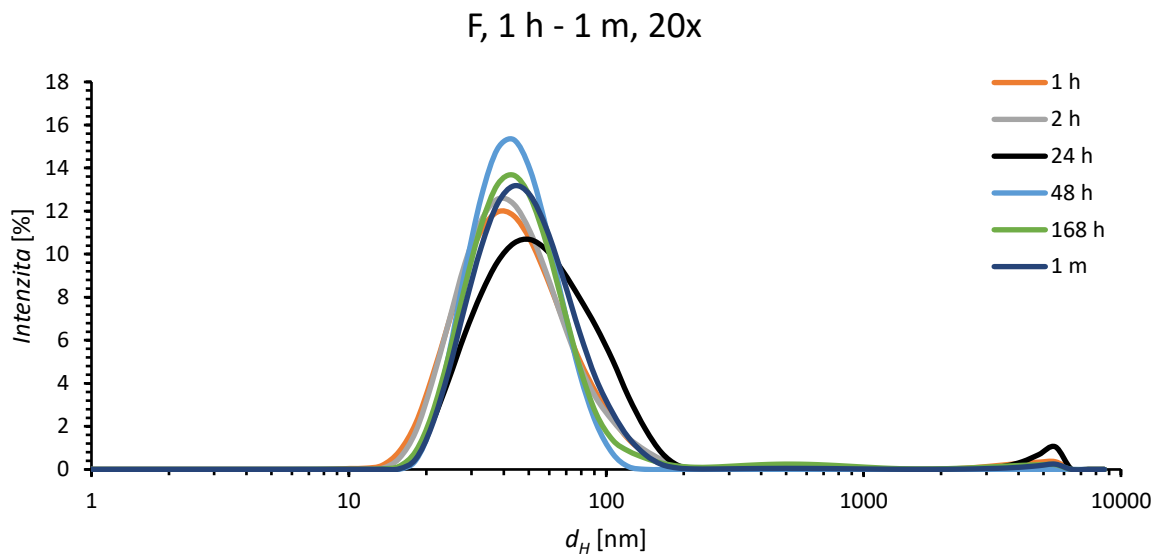
Histogram rozdělení velikostí (obr. 11 vlevo) ukazuje vznik nanočástic s velikostmi v rozmezí od 5 do 21 nm, Na obrázku z TEM (obr. 11 vpravo) je vidět, že AuNP(W)_RT jsou kulovitého tvaru.

3.5.1.3 AuNP(F)_RT



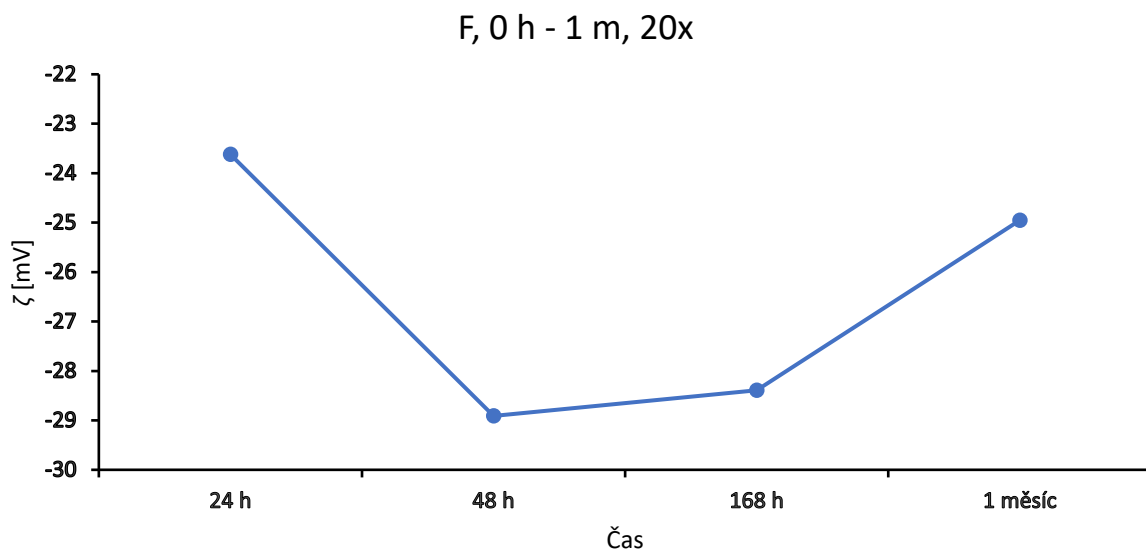
Obrázek 12: UV-VIS spektra AuNP(F)_RT. Spektra jsou průměrem tří spekter.

Z UV-VIS spekter (obr. 12) vidíme, že se zlaté nanočástice začaly syntetizovat až po asi 1 hodině od začátku syntézy, kde se začíná objevovat SPR pík pro zlaté nanočástice okolo 480-580 nm, s maximem okolo 525 nm po 24 hodinách od začátku syntézy.



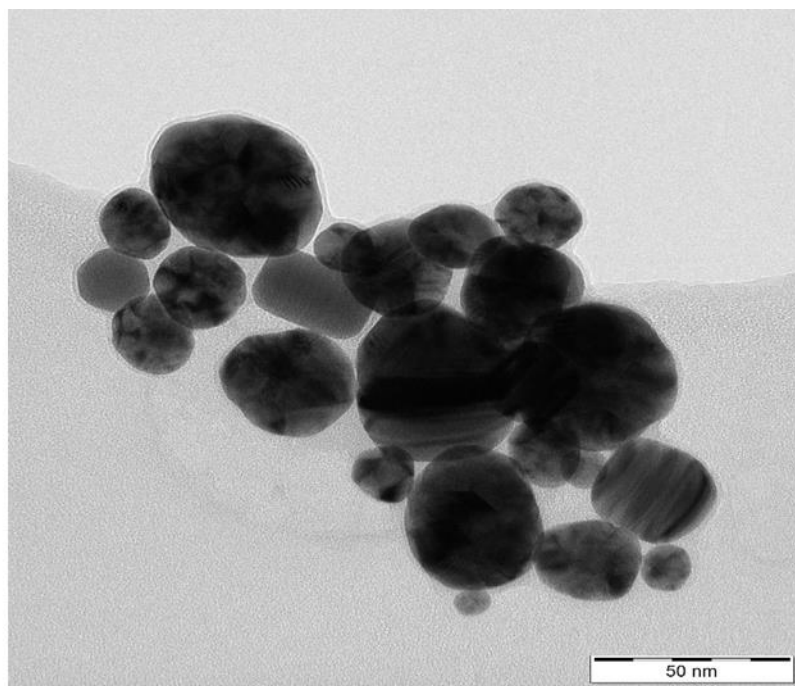
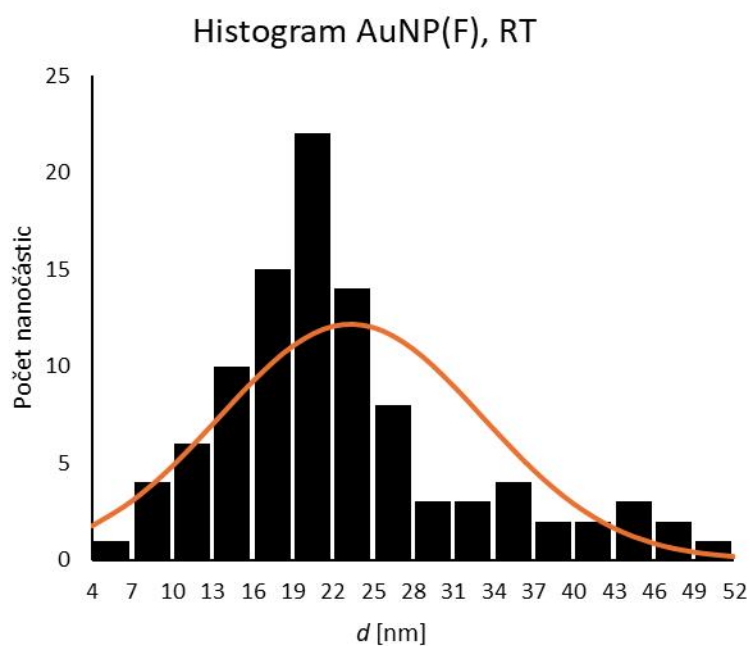
Obrázek 13: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(F)_RT (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

DLS výsledky pro AuNP(F)_RT (obr. 13) ukazuje jeden pík pro jednu distribuci rozdělení hydrodynamického průměru s velikostmi v desítkách nanometrů. Hodnoty se průběhu času měnily, a to od 32,7 nm do 43,8 nm.



Obrázek 14: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(F)_RT. Každý bod je průměrnou hodnotou dvou průměrných hodnot ze syntéz RT2 a RT3.

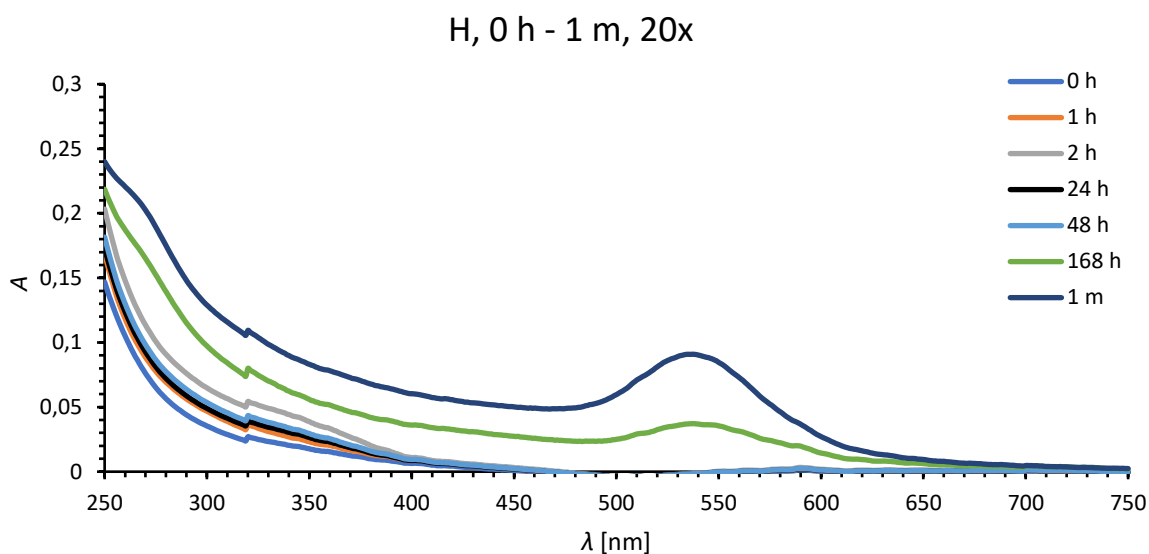
Podle obrázku č. 14 byl zeta potenciál v čase záporný a klesal, ale po týdnu opět začal růst, nicméně jeho hodnoty jsou stále dobré a ukazují na dobrou stabilitu záporných nanočástic.



Obrázek 15: Histogram rozložení velikostí AuNP(F) RT, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

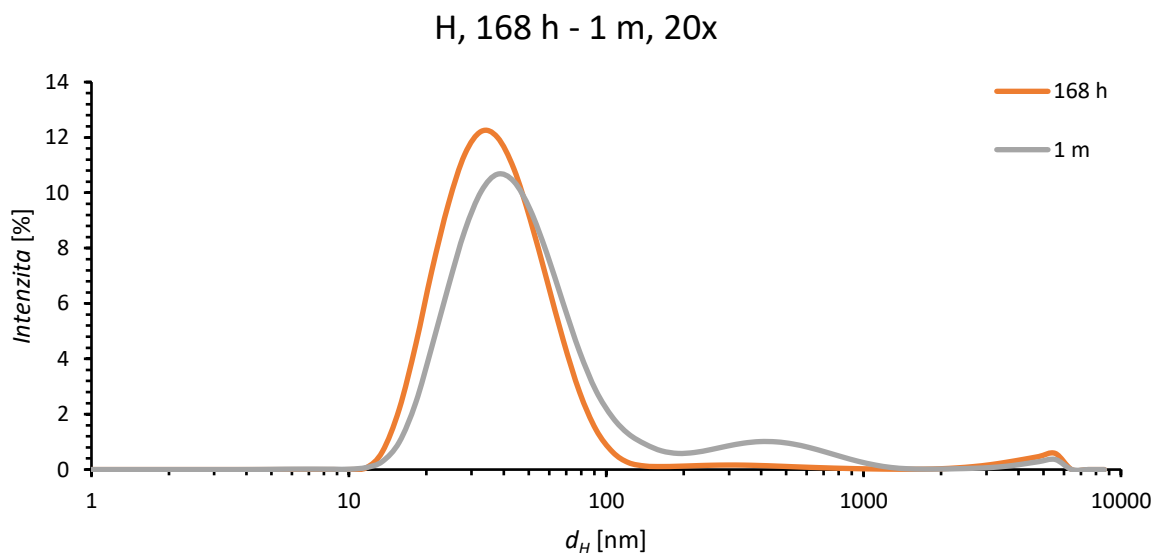
Histogram rozdělení velikostí (obr. 15 vlevo) ukazuje, že nanočástice mají široký rozptyl velikostí od 4 nm do 52 nm, nejvíce jich však je od 16 nm do 25 nm. Na obrázku z TEM (obr. 15 vpravo) je vidět, že jsou víceméně kulovitěho tvaru, ale velmi ojediněle vznikly i hranaté nanočástice.

3.5.1.4 AuNP(H)_RT



Obrázek 16: UV-VIS spektra AuNP(H)_RT. Spektra jsou průměrem tří spekter.

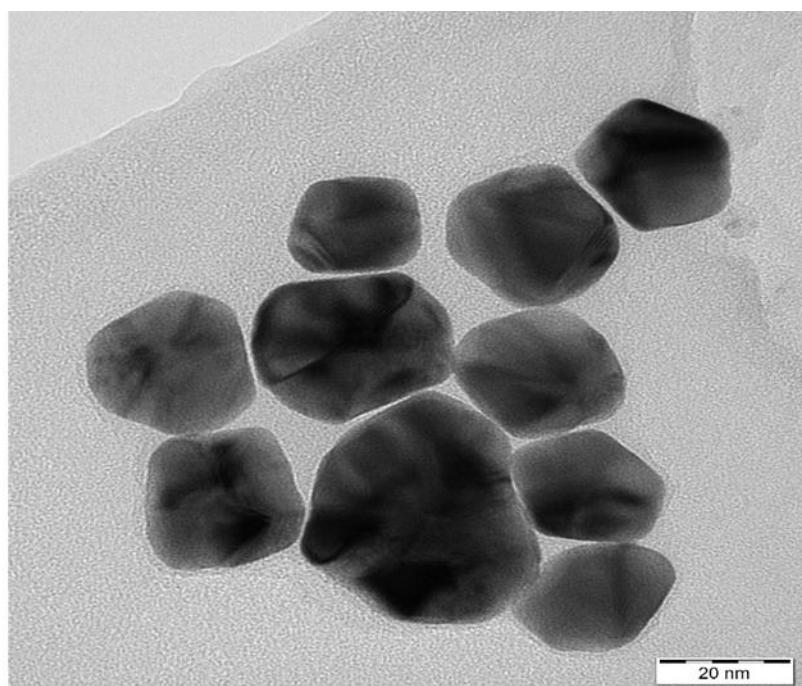
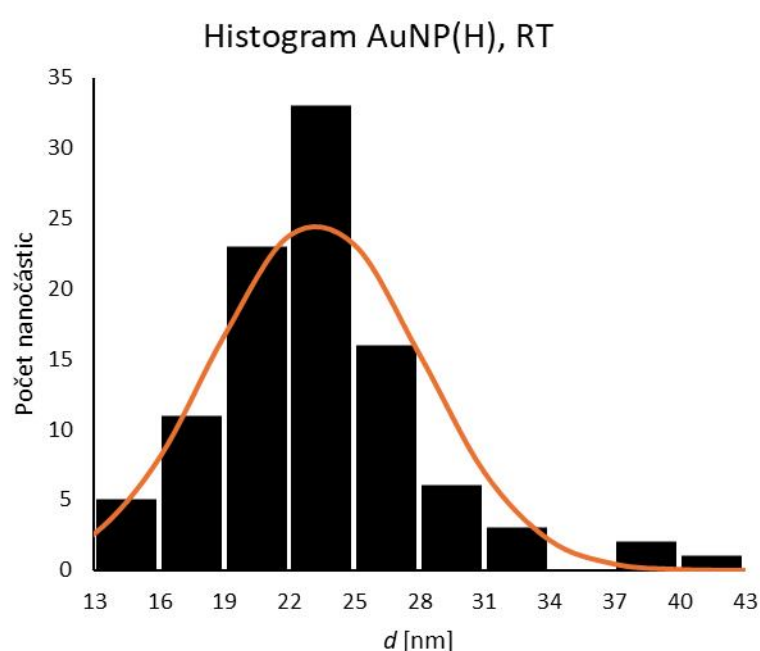
Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 16), že se nanočástice začaly vyvíjet až po jednom týdnu od začátku syntézy, kdy se objevuje SPR pík. Ten dále roste, a jeho maximum je na hodnotě 538 nm.



Obrázek 17: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(H)_RT (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

Vzhledem k tomu, že se nanočástice vyvinuly až po jednom týdnu od začátku syntézy, měřili jsme DLS spektra pro AuNP(H)_RT (obr. 17) až po této době. Středů píků distribuce velikosti částic se pohybují v desítkách nm, po jednom měsíci od začátku syntézy se ustálily na hodnotě 37,8 nm.

Při měření zeta potenciálu nanočástic syntetizovaných pomocí histidinu se ukazovala jejich velká nestabilita, kdy ani 100 cyklů jednoho měření nestačilo pro získání kvalitních dat. Pevných výsledků jsme dosáhli až při měření po jednom měsíci. Průměrná hodnota zeta potenciálu ze dvou syntéz (RT2 a RT3) po jednom měsíci je tedy $\zeta = -19,51 \pm 1,95$ mV.

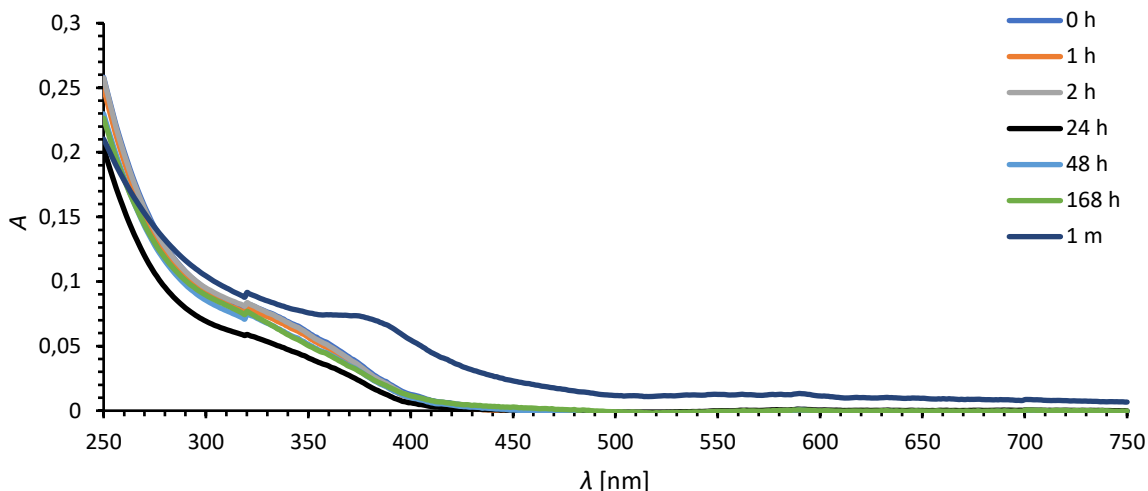


Obrázek 18: Histogram rozložení velikostí AuNP(H)_RT, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

Histogram rozdělení nanočástic (obr. 18 vlevo) ukazuje vznik nanočástic o velikosti od 13 do 34 nm, výjimečně vznikaly nanočástice větší. Podle obrázku z TEM (obr. 18 vpravo) nanočástice nejsou kulovité, ale jsou spíše mnohostěnné.

3.5.1.5 Syntéza S1 RT – Cystein

C, 0 h - 1 m, 20x



Obrázek 19: UV-VIS spektra AuNP(C) _RT. Spektra jsou průměrem tří spekter.

Jak je zřejmé z obrázku 19, žádné nanočástice se pomocí cysteinu nevyvinuly. Jediný pík, který se na spektrech projevil, je po měsíčním vývoji systému na hodnotě 380 nm, kdy pravděpodobně došlo ke vzniku komplexů Au-Cys. Ty však nejsou cílem této diplomové práce, a další měření (DLS, zeta potenciál atd.) nebyly provedeny.

Pro úplnost ještě uvádíme souhrnné tabulky měření UV-VIS spekter (tabulka 3), DLS spekter (tabulka 4) a průměrné velikosti nanočástic naměřených pomocí TEM (tabulka 5) pro syntézu za pokojové teploty.

Tabulka 3: Souhrnná tabulka pozic a hodnot maxim SPR píků pro jednotlivé nanočástice připravené pomocí jednotlivých aminokyselin za pokojové teploty.

RT	AuNP(Y)		AuNP(W)		AuNP(F)		AuNP(H)		AuNP(C)	
Čas od syntézy	λ [nm]	A	λ [nm]	A	λ [nm]	A	λ [nm]	A	λ [nm]	A
0 h	542	0,027159	589	0,010845	590	0,001691	-	-	-	-
1 h	534	0,053648	548	0,018240	534	0,050044	-	-	-	-
2 h	534	0,063083	548	0,022203	532	0,069527	-	-	-	-
24 h	522	0,106573	523	0,052501	526	0,123884	-	-	-	-
48 h	521	0,115520	523	0,087412	525	0,151355	-	-	-	-
168 h	520	0,147271	521	0,170939	527	0,173426	538	0,036100	-	-
1 měsíc	521	0,178037	524	0,152897	526	0,174953	537	0,090584	380	0,080153

Tabulka 4: Souhrnná tabulka hodnot hydrodynamického průměru d_H zlatých nanočástic, které byly připravené pomocí aminokyselin, kromě cysteinu. DLS měření pro AuNP(Y)_RT, AuNP(F)_RT a AuNP(H)_RT vycházelo s monomodální distribucí velikosti částic, zatímco, AuNP(W)_RT se projevil bimodální distribucí.

RT	AuNP(Y)	AuNP(W)		AuNP(F)	AuNP(H)
Čas od syntézy	d_H [nm]	d_{H2} [nm]	d_{H1} [nm]	d_H [nm]	d_H [nm]
1 h	$15,7 \pm 1,3$	-	190 ± 93	$43,8 \pm 13,1$	-
2 h	$15,7 \pm 1,3$	$10,1 \pm 0,0$	190 ± 18	$37,8 \pm 13,1$	-
24 h	$18,2 \pm 1,4$	$13,5 \pm 1,0$	220 ± 64	$58,8 \pm 21,0$	-
48 h	$18,2 \pm 1,4$	$13,5 \pm 1,6$	190 ± 21	$43,8 \pm 3,5$	-
168 h	$18,2 \pm 5,8$	$18,2 \pm 1,4$	190 ± 17	$43,8 \pm 3,5$	$32,7 \pm 2,9$
1 měsíc	$18,2 \pm 1,6$	$18,2 \pm 1,4$	190 ± 18	$43,8 \pm 7,4$	$37,8 \pm 7,4$

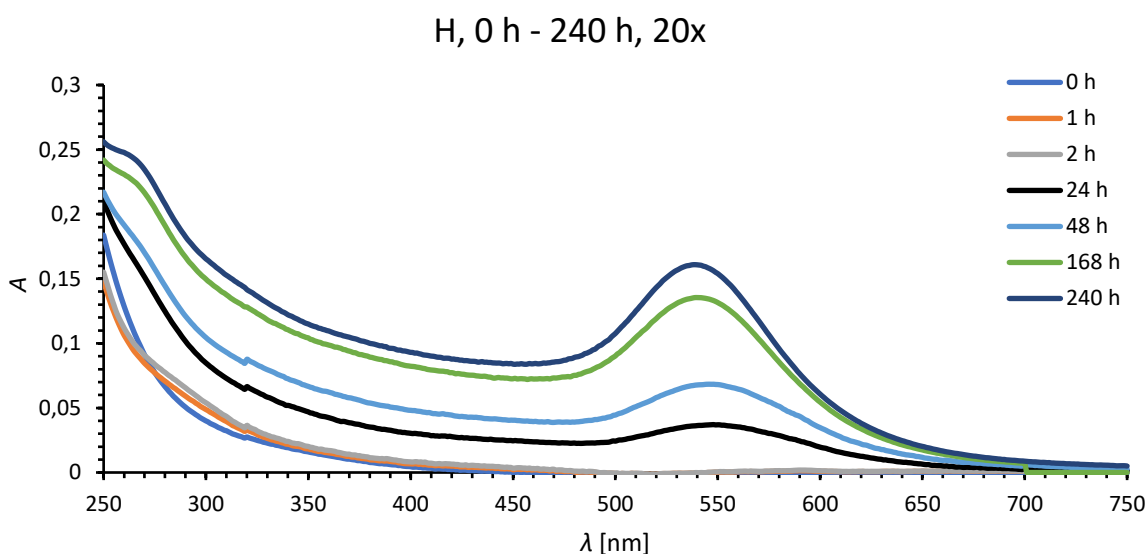
Tabulka 5: Souhrnná tabulka naměřených průměrných velikostí nanočástic (v jednotkách nm) z obrázků získaných pomocí TEM, které byly měřeny pomocí softwaru ImageJ.

RT	AuNP(Y)	AuNP(W)	AuNP(F)	AuNP(H)
Průměr	11,08	11,84	23,35	23,27
Směrodatná odchylka	3,69	1,96	9,84	4,86

3.5.2 Syntéza S1 50C

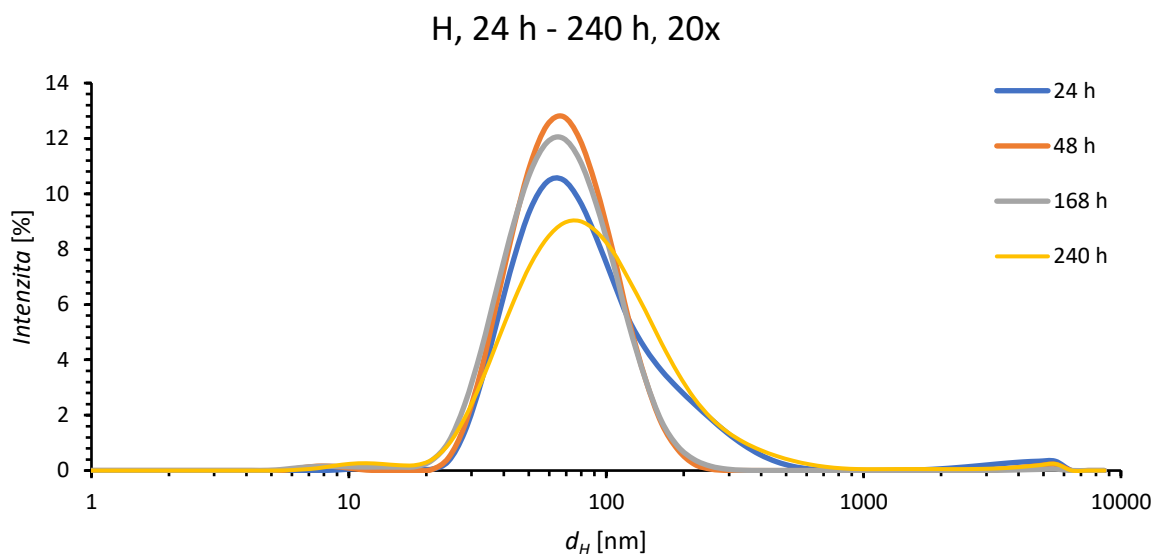
Roztok s histidinem zrudověl po 24 hodinách od začátku syntézy a v čase dále tmavnul až do tmavě růžové. Barvy dosáhl podobně, jako u syntézy S1 RT. Cystein byl po čirý, ale po měsíci velmi mírně zežloutl.

3.5.2.1 AuNP(H)_50C



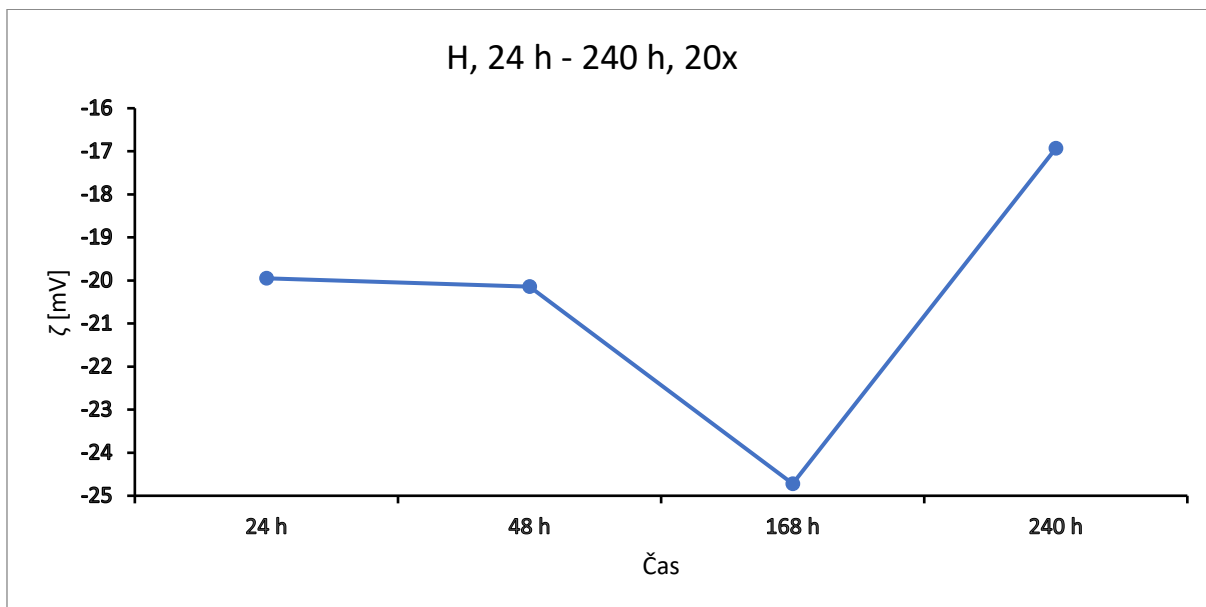
Obrázek 20: UV-VIS spektra AuNP(H)_50C. Spektra jsou průměrem tří spekter.

Z UV-VIS spekter (Obr. 20) vidíme, že se Au nanočástice formovaly již od 24 hodin od začátku syntézy, pík dosahuje maxima v hodnotě 539 nm.



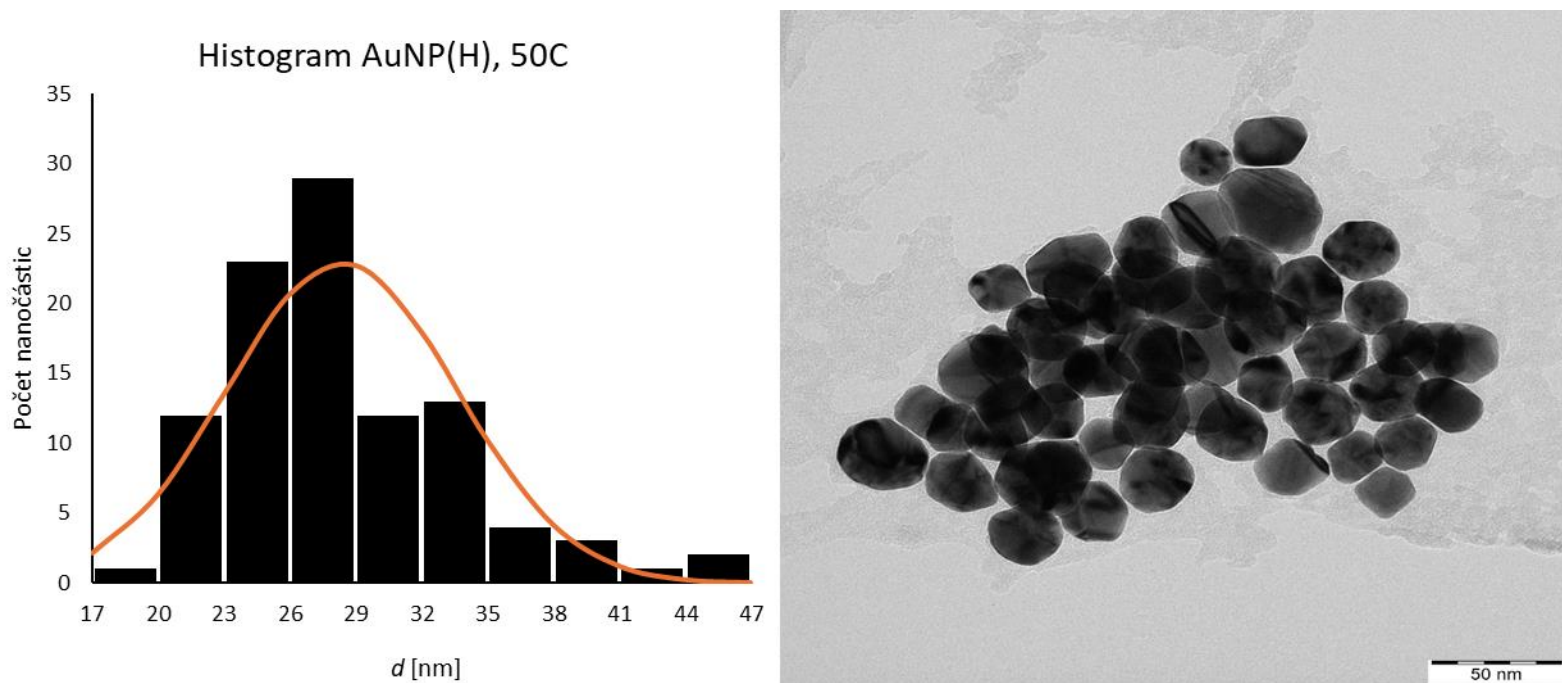
Obrázek 21: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(H)_50C (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

DLS výsledky pro AuNP(H)_50C (Obr. 21) ukazují širokou distribuci velikostí nanočástic od desítek nm do stovek nm, nicméně maximum dosahuje hodnot od 68,1 nm do hodnoty 78,8 nm po 240 hodinách od syntézy.



Obrázek 22: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(H)_50C. Každý bod je průměrnou hodnotou tří průměrných hodnot.

Naměřený zeta potenciál (obr. 22) byl v čase stále záporný a klesal, dokud se po 240 hodinách od začátku syntézy nezvýšil. Hodnoty do jednoho týdne od syntézy byly dobré, ale poté (během 10. dne) dosáhly hodnot nižších než $|20 \text{ mV}|$, což naznačuje mírnou nestabilitu záporných nanočástic.



Obrázek 23: Histogram rozložení velikostí AuNP(H)_50C, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

Histogram rozdělení velikostí (obr. 23 vlevo) ukazuje rozptyl velikostí nanočástic od 17 nm do 47 nm. Podle obrázku z TEM (obr. 23 vpravo) jsou nanočástice spíše nepravidelné mnohostěny než kulovité.

Pro úplnost ještě uvádíme souhrnné tabulky s UV-VIS a DLS měřením (tabulka 6) a TEM měření (tabulka 7) s výsledky pro AuNP(H)_50C.

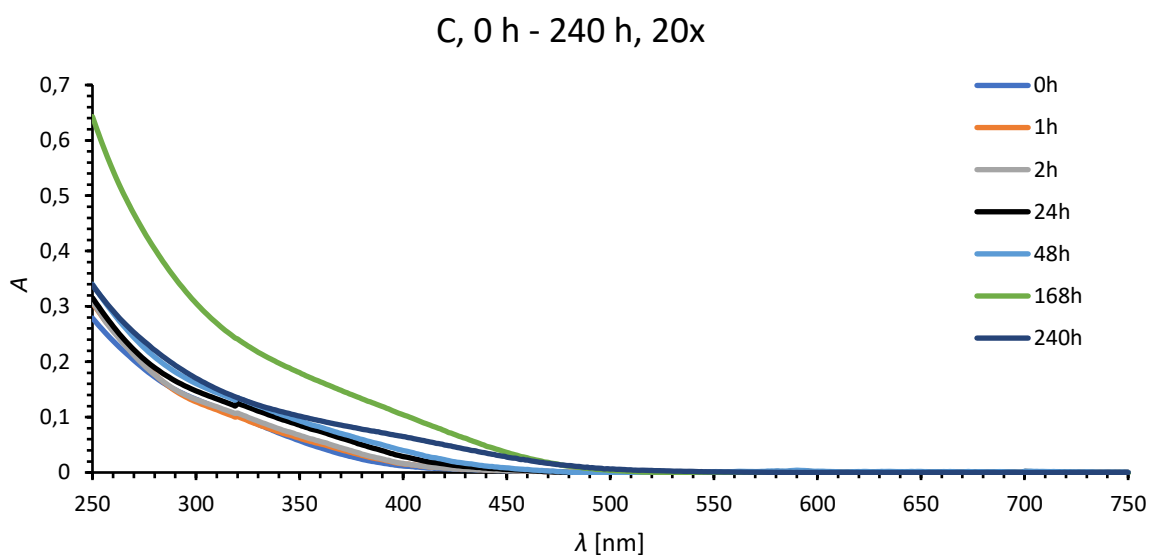
Tabulka 6: Souhrnná tabulka pro AuNP(H)_50C. V tabulce jsou shrnuty výsledky UV-VIS spektroskopie s maximy vlnové délky a jejich absorbance, hodnoty hydrodynamického průměru d_H z měření DLS.

50C	UV-VIS		DLS
Čas od syntézy	λ [nm]	A	d_H [nm]
24 h	548	0,037002	$68,1 \pm 27,3$
48 h	546	0,068346	$68,1 \pm 4,7$
168 h	539	0,135430	$68,1 \pm 5,4$
240 h	539	0,160870	$78,8 \pm 6,2$

Tabulka 7: Průměrná velikost nanočástic (v jednotkách nm) z TEM měření pro AuNP(H)_50C.

50C	AuNP(H)
Průměr	28,36
Směrodatná odchylka	5,23

3.5.2.2 Syntéza S1 50C – Cystein

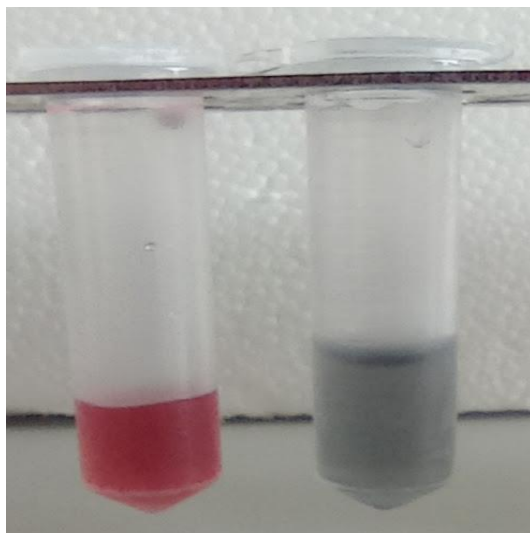


Obrázek 24: UV-VIS spektrum vzorku s cysteinem.

Jak je vidět z UV-VIS spekter (obr. 24), žádné nanočástice se nevyvinuly ani za zvýšené teploty při použití cysteinu.

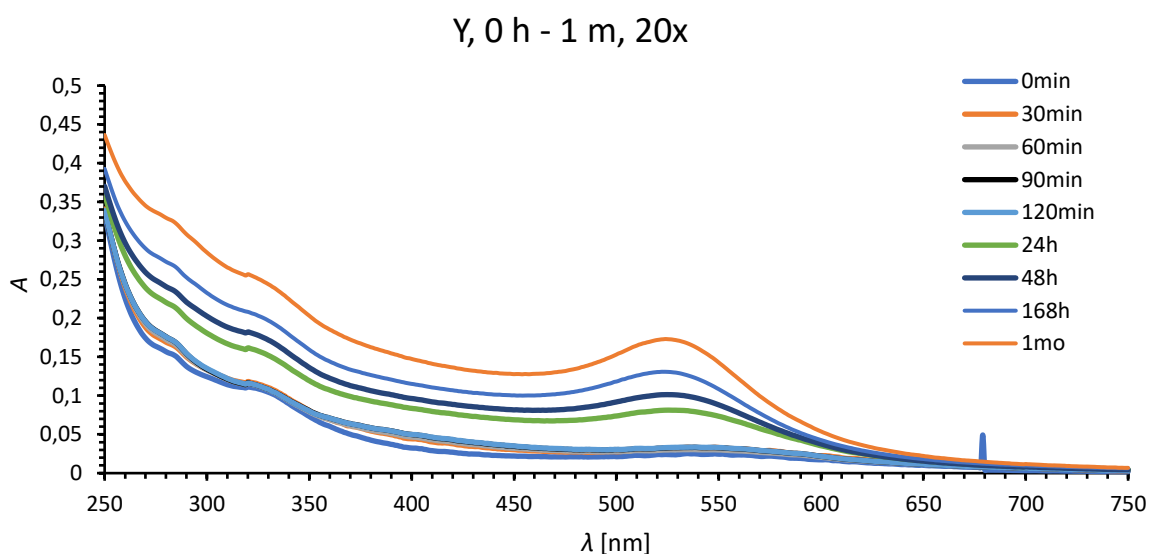
3.5.3 Syntéza S1 0C

Během syntézy za chladu jsme pozorovali velmi mírné zrůžovění pouze u roztoku s tyrosinem. Po 24 hodinách od začátku syntézy zrůžověly všechny vzorky, postupně v čase červenaly. Je důležité zmínit, že jeden ze tří vzorků, obsahující tryptofan zagregoval, a změnil barvu na šedo-černou (obr. 25). Z tohoto důvodu byl z experimentu po jednom měsíci vyřazen.



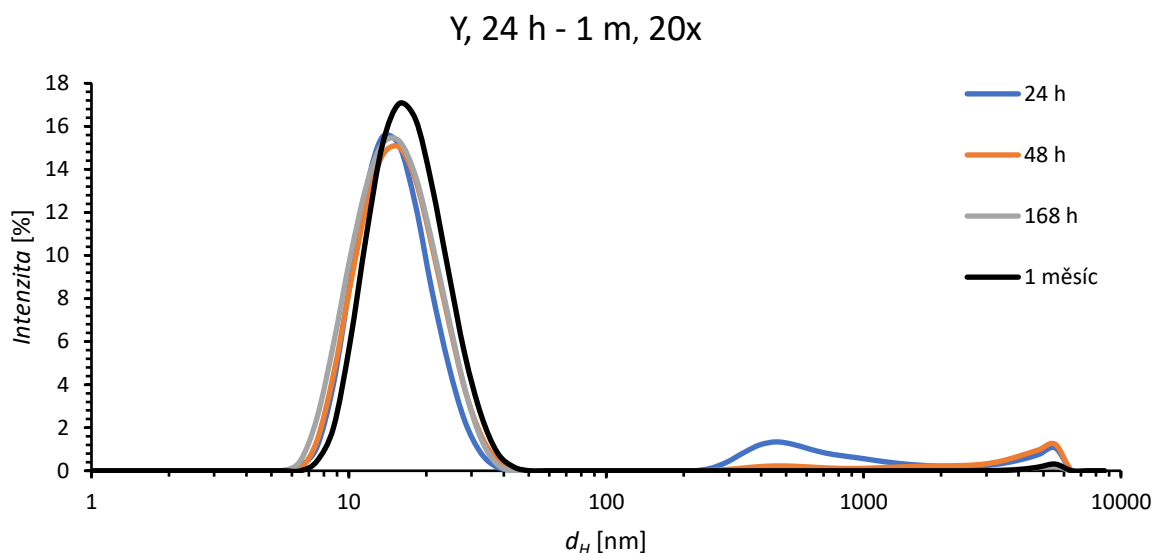
Obrázek 25: Fotografie vzorků obsahující tryptofan ze syntéz 0C1 a 0C2. Jeden vzorek obsahující tryptofan asi po měsíci zagregoval, proto má šedo-černou barvu.

3.5.3.1 AuNP(Y)_0C



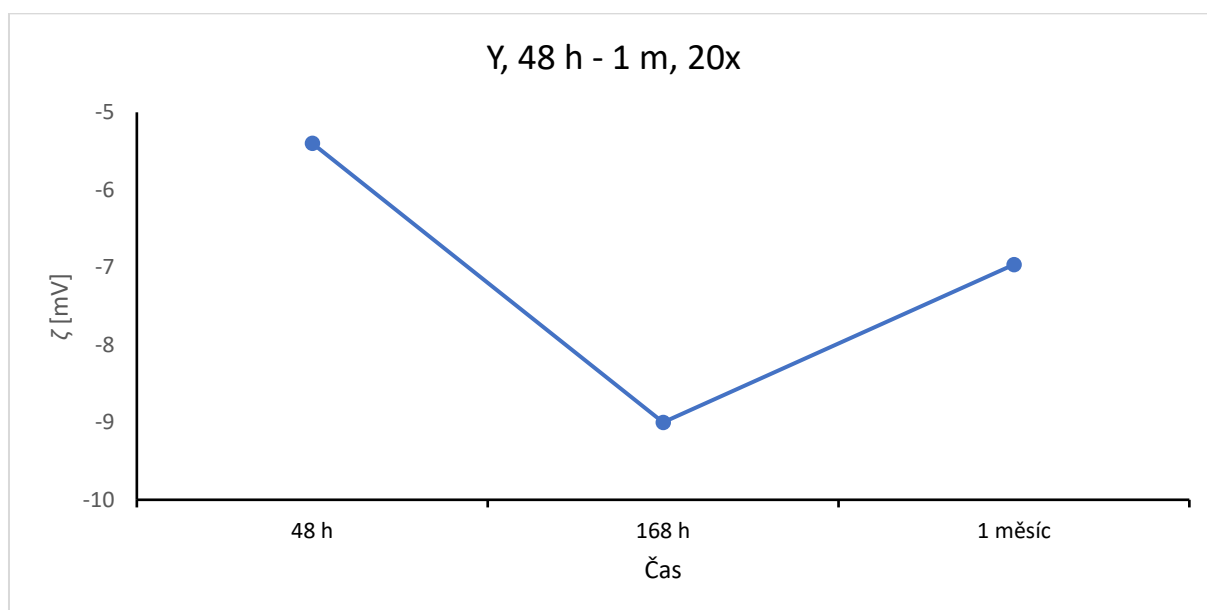
Obrázek 26: UV-VIS spektra AuNP(Y)_0C. Spektra jsou průměrem tří spekter.

Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 26), že se nanočástice začaly formovat až po jednom dni od začátku syntézy. Maximum vlnové délky SPR píku se posouvalo k menším hodnotám, až se ustálilo na hodnotě 523 nm.



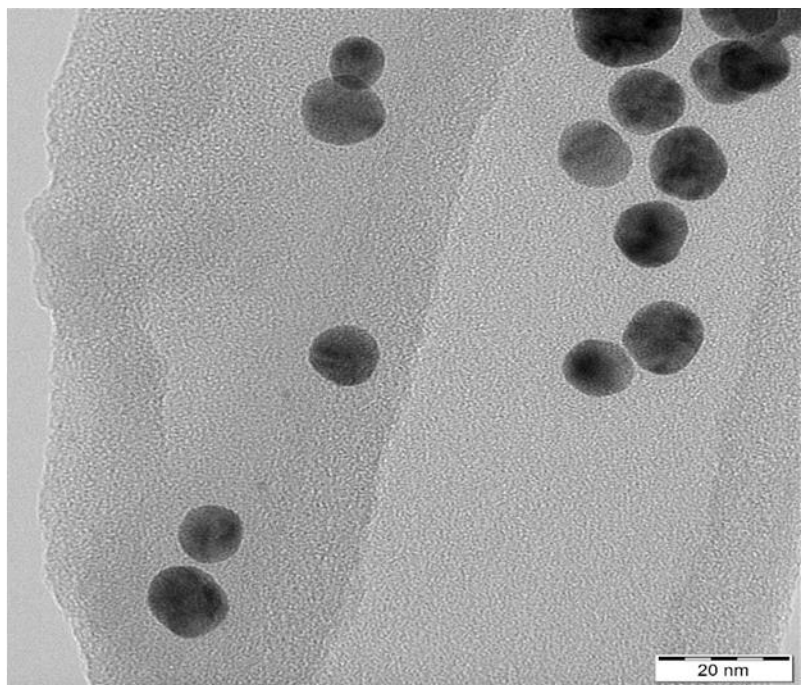
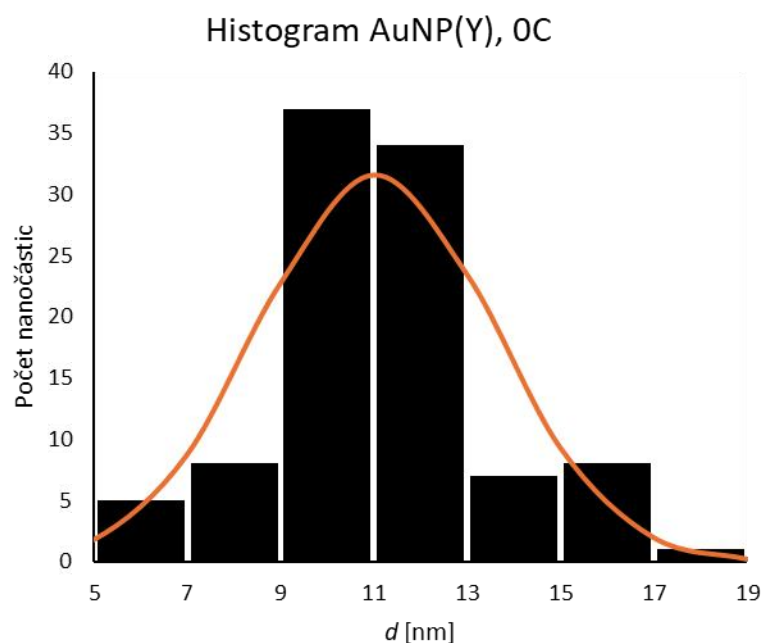
Obrázek 27: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(Y)₀C (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

U DLS výsledků (obr. 27) pozorujeme jeden pík v oblasti desítek nm, jehož maximum se v čase posouvá 13,5 nm na 18,2 nm. Jeden pík naznačuje vznik jednoho druhu nanočástic, co se velikosti týče.



Obrázek 28: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(Y)₀C. Každý bod je průměrnou hodnotou tří průměrných hodnot.

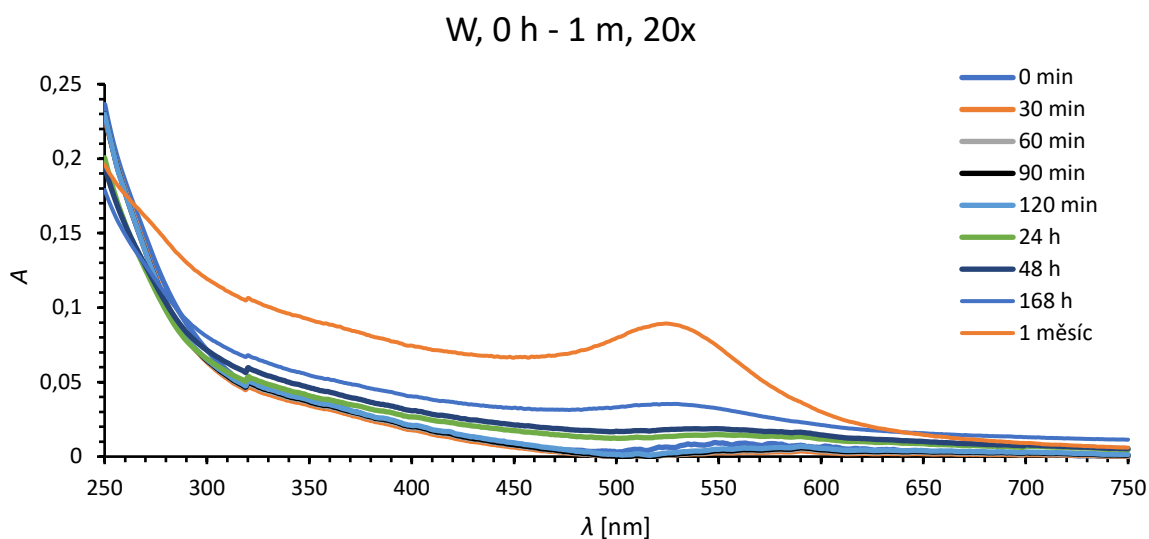
Obrázek 28 ukazuje časový průběh zeta potenciálu pro AuNP(Y)_0C. Zeta potenciál bylo možné měřit až po 48 hodinách, jeho hodnoty jsou záporné, v čase klesají, ale nedosáhnou dobrých hodnot, kdy můžeme považovat nanočástice za stabilní.



Obrázek 29: Histogram rozložení velikostí AuNP(Y)_0C, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

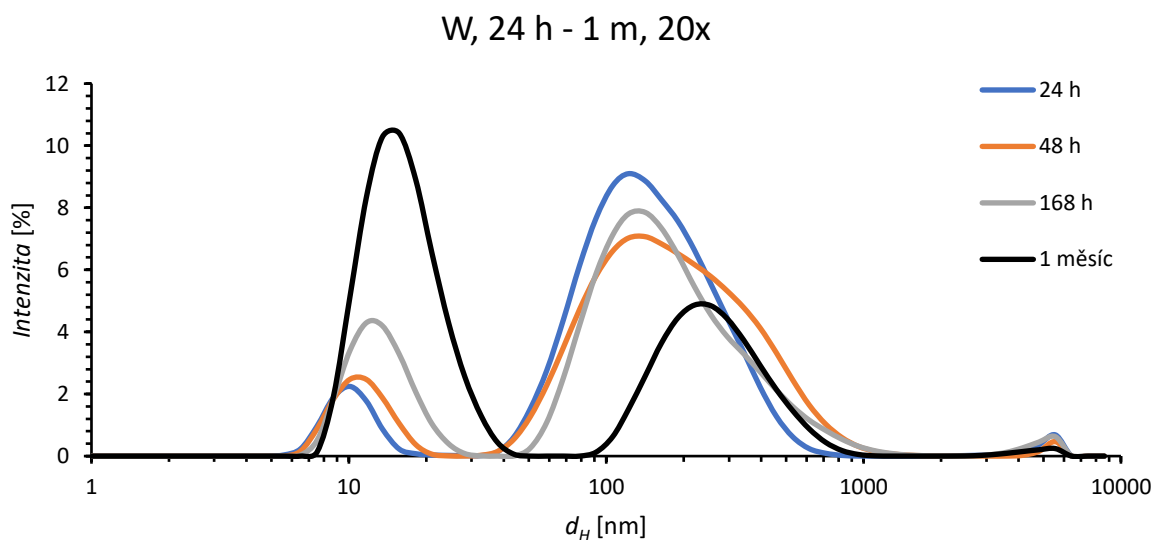
Histogram rozdělení velikostí (obr. 29 vlevo) ukazuje rozptyl velikostí nanočástic od 5 do 19 nm, ale nejvíce jich bylo od 9 do 13 nm, což je celkem úzký rozptyl. Obrázek z TEM (obr. 29 vpravo) ukazuje, že nanočástice jsou kulovitěho a mnohostěnného tvaru.

3.5.3.2 AuNP(W)_0C



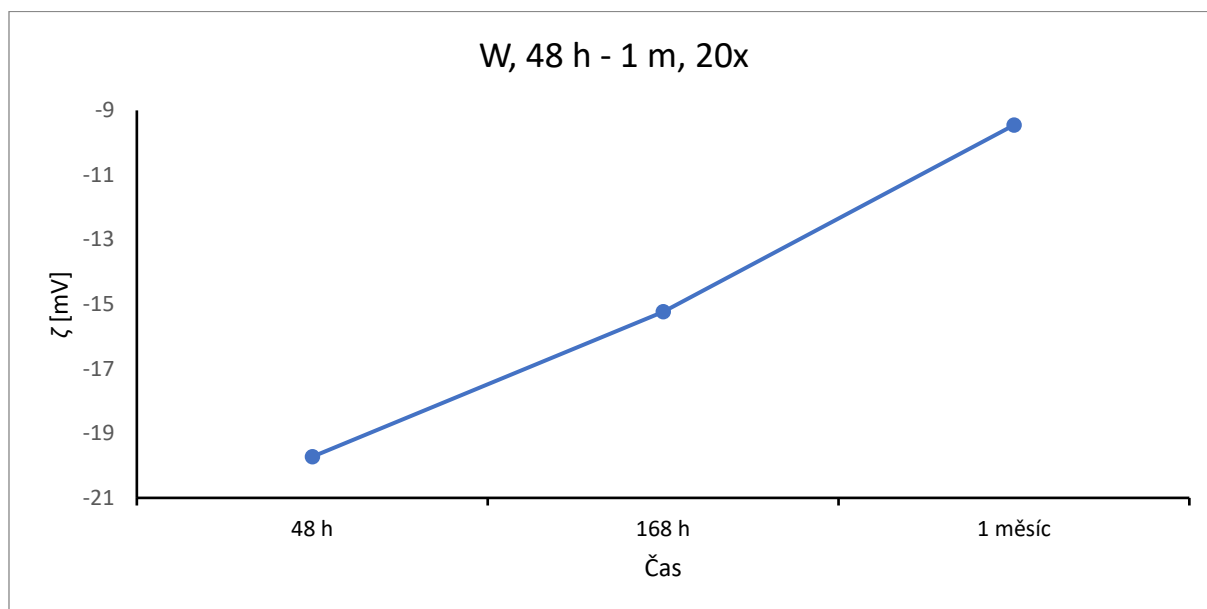
Obrázek 30: UV-VIS spektra AuNP(W)_0C. Spektra jsou průměrem tří spekter, kromě měření po jednom měření od začátku syntézy, kdy jeden vzorek zagregoval.

Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 30), že formace nanočástic se plně projevila až po jednom týdnu od začátku syntézy, ale zárodky nanočástic se formovaly již od 24 hodin od začátku syntézy, které mají maximum vlnové délky na hodnotě 548 nm, a plně zformované nanočástice na hodnotě okolo 527 nm.



Obrázek 31: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(W)_0C (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření, kromě měření po jednom měsíci od syntézy, kdy jeden vzorek zagregoval.

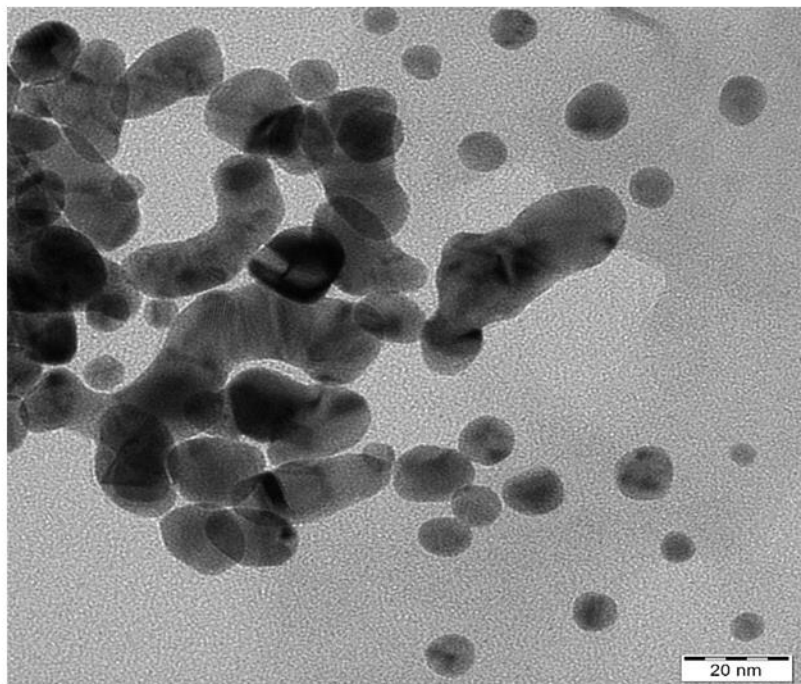
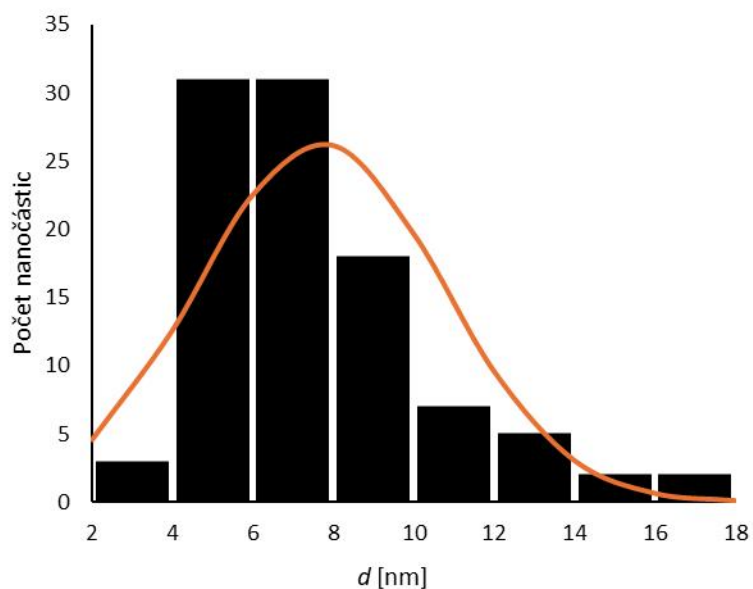
DLS výsledky (obr. 31) prakticky kopírují situaci během syntézy za pokojové teploty, kdy postupně roste jeden pík v menších hodnotách hydrodynamického průměru, a pík u vyšších hodnot hydrodynamického průměru klesá. Toto opět naznačuje přítomnost dvou typů nanočástic.



Obrázek 32: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(W)_{0C}. Každý bod je průměrnou hodnotou tří průměrných hodnot, kromě měření po jednom měsíci od začátku syntézy, kdy jeden vzorek zagregoval.

Zeta potenciál na obrázku 32 se jeví jako nejsilnější po 48 hodinách od začátku syntézy, a v čase jeho hodnota klesá. Je záporný, což naznačuje záporně nabitě částice, a konečná hodnota po jednom měsíci ukazuje na nestabilní nanočástice.

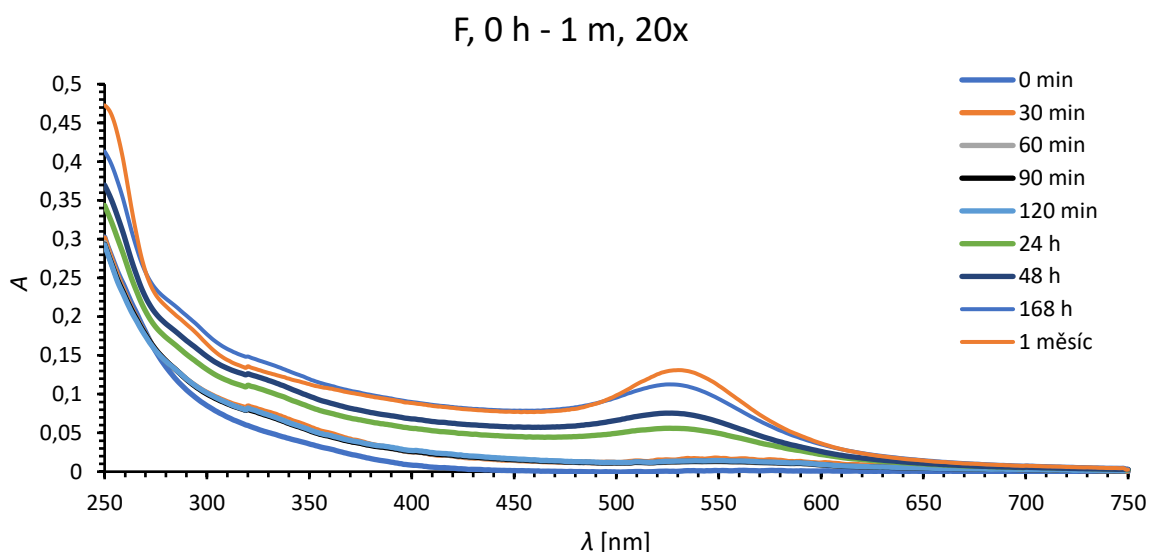
Histogram AuNP(W), OC



Obrázek 33: Histogram rozložení velikostí AuNP(W)_OC, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 20 nm.

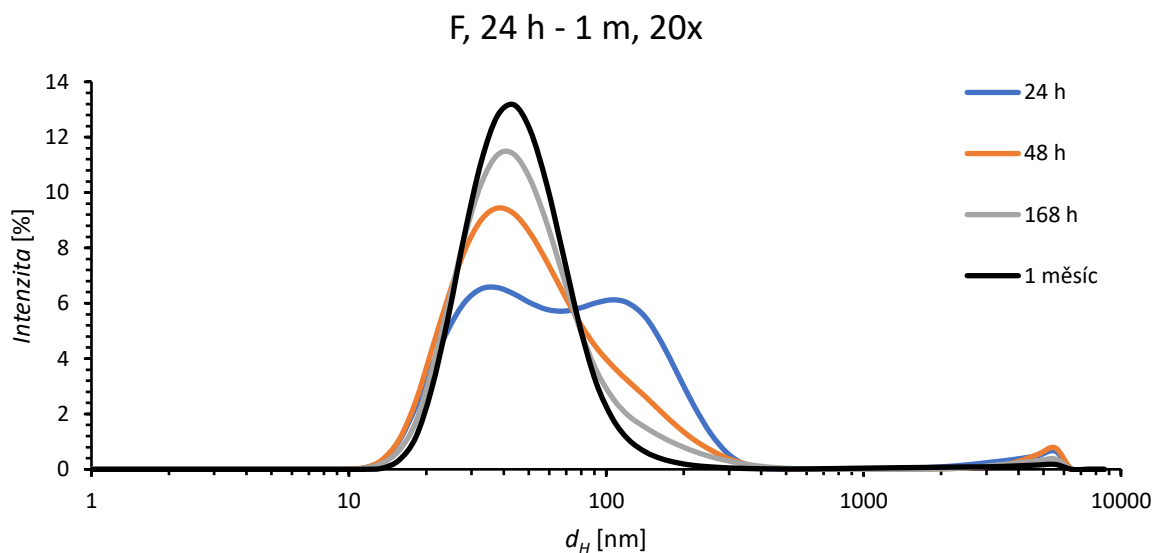
Histogram rozdělení velikostí (obr. 33 vlevo) ukazuje rozptyl od 2 do 18 nm. To naznačuje, že jsme dosáhli vzniku malého množství nanoklastrů. Na obrázku z TEM (obr. 33 vpravo) vidíme jeden vzorek, který zagregoval, a sférické a mnohastěnné částice tak začaly prorůstat a vytvářet spíše válcovité až beztvaré komplexní útvary. Mezi nimi však plavaly nezagregované nanočástice.

3.5.3.3 AuNP(F)_0C



Obrázek 34: UV-VIS spektra AuNP(F)_0C. Spektra jsou průměrem tří spekter.

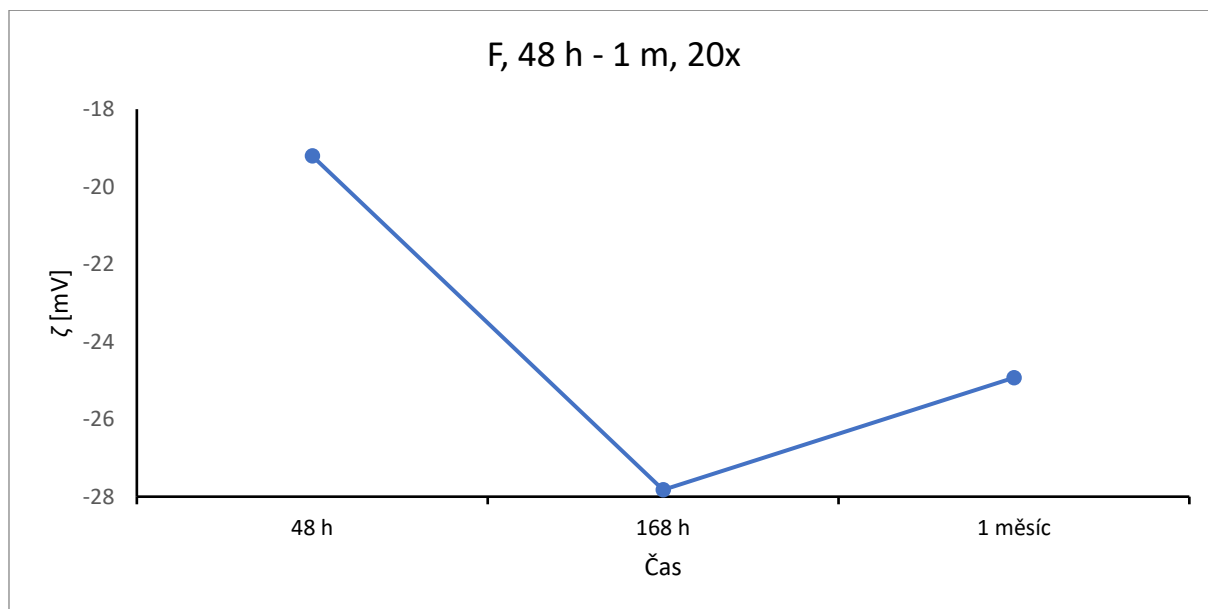
Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 34), že se nanočástice začaly formovat od 24 hodin od začátku syntézy s relativně stabilním píkem s maximem na hodnotě 526 nm, po měsíci od začátku syntézy se však hodnota píku posunula na hodnotu 531 nm.



Obrázek 35: Distribuce velikostí částic odvozená z DLS měření pro AuNP(F)_0C (alias změna intenzity rozptýleného záření vzorkem nanočástic v čase, z níž je odvozena zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru částic). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

DLS výsledky (obr. 35) ukazují, že během 24 hodin vznikly dva typy nanočástic, ale po čase jako by se spojili do jednoho typu v oblasti desítek nm. Docházelo k tomu, že pík ve větších

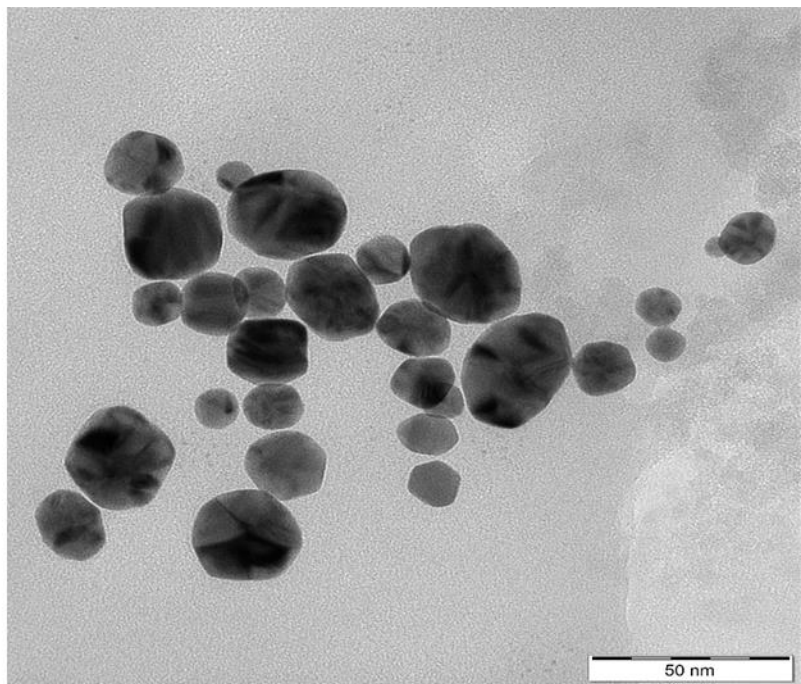
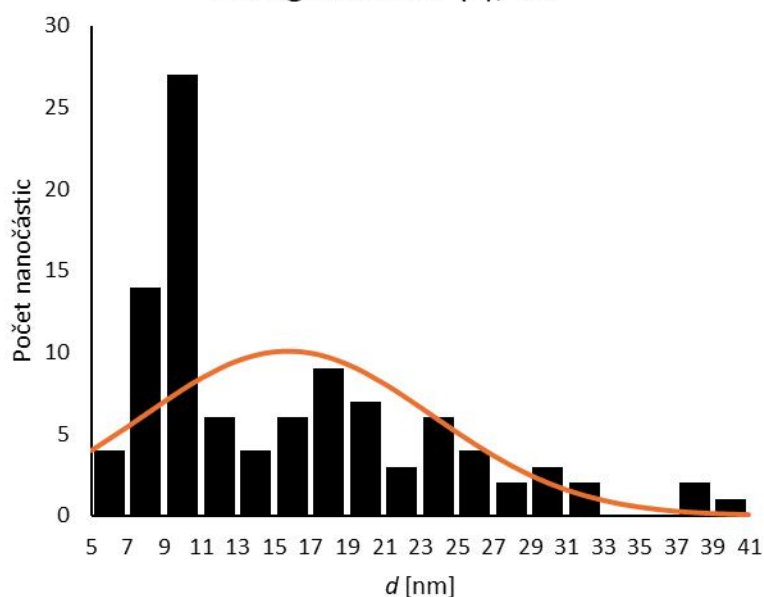
hodnotách hydrodynamického průměru se postupně snižoval, až po měsíci zmizel, ve prospěch píku v nižších hodnotách hydrodynamického průměru. Sedimentace nebyla pozorována.



Obrázek 36: Časový průběh zeta potenciálu AuNP(F)₀C. Každý bod je průměrnou hodnotou tří průměrných hodnot.

Zeta potenciál na obrázku 36 je záporný, což naznačuje záporné nanočástice, v čase klesající, s mírným nárůstem po jednom měsíci od začátku syntézy. Hodnota zeta potenciálu po jednom měsíci od začátku syntézy je dobrá a nanočástice jsou tedy stabilní.

Histogram AuNP(F), 0C



Obrázek 37: Histogram rozložení velikostí AuNP(F)_0C, oranžově je vyznačeno normální rozdělení. V rohu je obrázek z TEM, s měřítkem 50 nm.

Histogram rozložení velikostí nanočástic (obr. 37 vpravo) ukazuje široký rozptyl, kdy vznikly nanočástice od 5 nm do 41 nm. Nejvíce jich však bylo od 7 nm do 9 nm a poté od 15 nm do 21 nm. Obrázek z TEM (obr. 37 vlevo) ukazuje, že nanočástice jsou kulovitého, mnohostěnného až hranatého tvaru.

Pro úplnost ještě uvádíme souhrnné tabulky z UV-VIS měření (tabulka 8), DLS měření (tabulka 9) a TEM měření (tabulka 10).

Tabulka 8: Souhrnná tabulka hodnot maxim SPR píků pro jednotlivé nanočástice připravené pomocí jednotlivých aminokyselin za snížené teploty

OC	AuNP(Y)		AuNP(W)		AuNP(F)	
Čas od syntézy	λ [nm]	A	λ [nm]	A	λ [nm]	A
0 min	534	0,025145	-	-	-	-
30 min	534	0,033277	590	0,0038262	548	0,017403
60 min	537	0,030351	590	0,0050771	548	0,012888
90 min	538	0,033256	590	0,0058931	548	0,013674
120 min	538	0,033583	590	0,0068078	549	0,014376
24 h	525	0,081263	548	0,014731	525	0,055981
48 h	526	0,101250	548	0,018731	526	0,075461
168 h	523	0,130770	529	0,035359	526	0,112600
1 měsíc	524	0,172940	525	0,089292	531	0,13101

Tabulka 9: Souhrnná tabulka hydrodynamických průměrů d_H z DLS měření.

OC	AuNP(Y)	AuNP(W)		AuNP(F)
Čas od syntézy	d_H [nm]	d_{H1} [nm]	d_{H2} [nm]	d_H [nm]
24 h	$13,5 \pm 1,3$	$10,1 \pm 1,0$	122 ± 70	$37,8 \pm 5,5$
48 h	$15,7 \pm 1,3$	$10,1 \pm 1,1$	142 ± 123	$37,8 \pm 3$
168 h	$15,7 \pm 1,3$	$11,7 \pm 1,3$	142 ± 95	$43,8 \pm 12,1$
1 m	$18,2 \pm 1,4$	$15,7 \pm 1,6$	220 ± 53	$43,8 \pm 3,5$

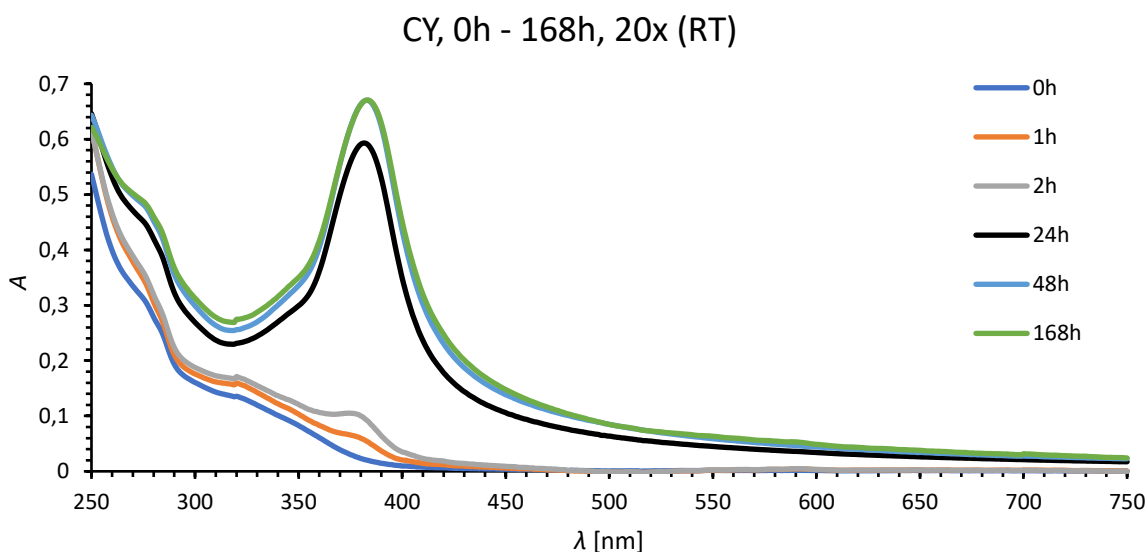
Tabulka 10: Souhrnná tabulka naměřených průměrných velikostí nanočástic (v jednotkách nm) z obrázků získaných pomocí TEM, které byly měřeny pomocí softwaru ImageJ.

OC	AuNP(Y)	AuNP(W)	AuNP(F)
Průměr	11,05	7,69	15,77
Směrodatná odchylka	2,53	3,04	7,92

3.5.4 Syntéza S2:

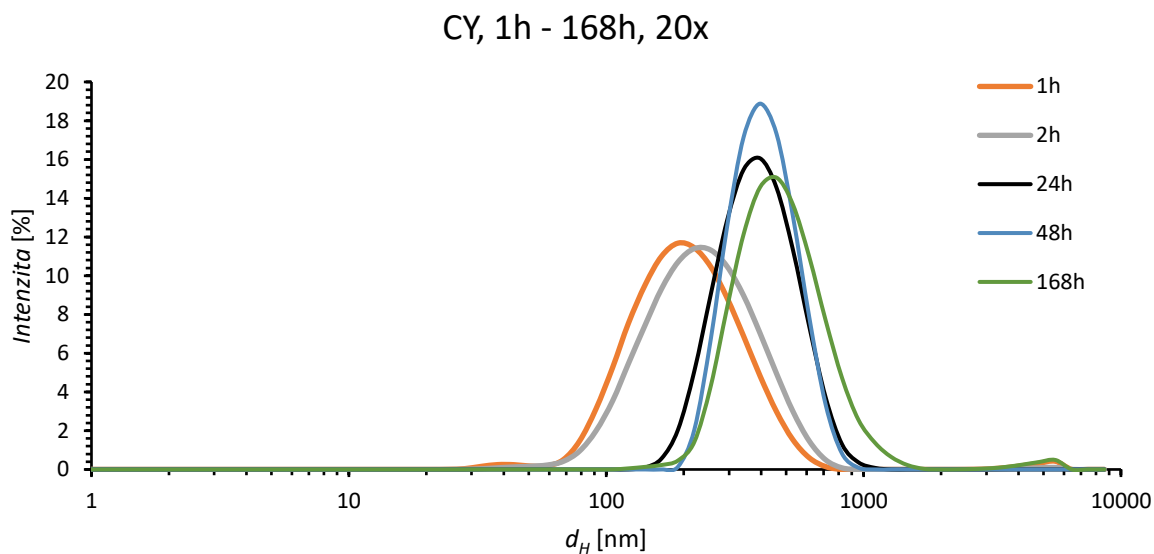
Vzorky po dvou hodinách od začátku syntézy mírně zežloutly. Po jednom dni od začátku syntézy se vzorky zakalily, po jednom týdnu od začátku syntézy vzorek zagregoval ve formě žlutého agregátu na dno ependorfky, po protřepání byly vzorky mírně žluté a zakalené.

3.5.4.1 Syntéza S2 – Cystein a tyrosin



Obrázek 38: UV-VIS spektra zlata s kombinací cysteinu a tyrosinu.

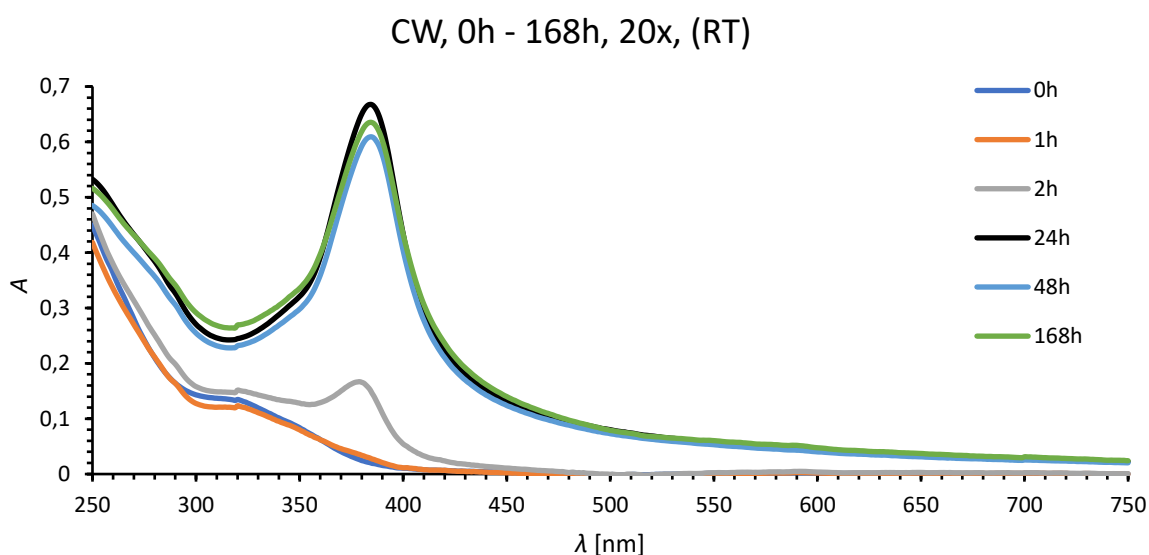
Z UV-VIS spekter (obr. 38) vidíme, že SPR pík pro zlaté nanočástice nevznikl. Namísto toho vznikl pík pro zlaté komplexy, a to na hodnotě vlnové délky 383 nm, který se začal formovat od první hodiny od začátku syntézy.



Obrázek 39: Distribuce velikostí komplexů odvozená z DLS měření pro kombinaci cysteinu s tyrosinem (neboli změna intenzity rozptýleného záření vzorkem komplexů v čase, z níž je odvozená zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru komplexů). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

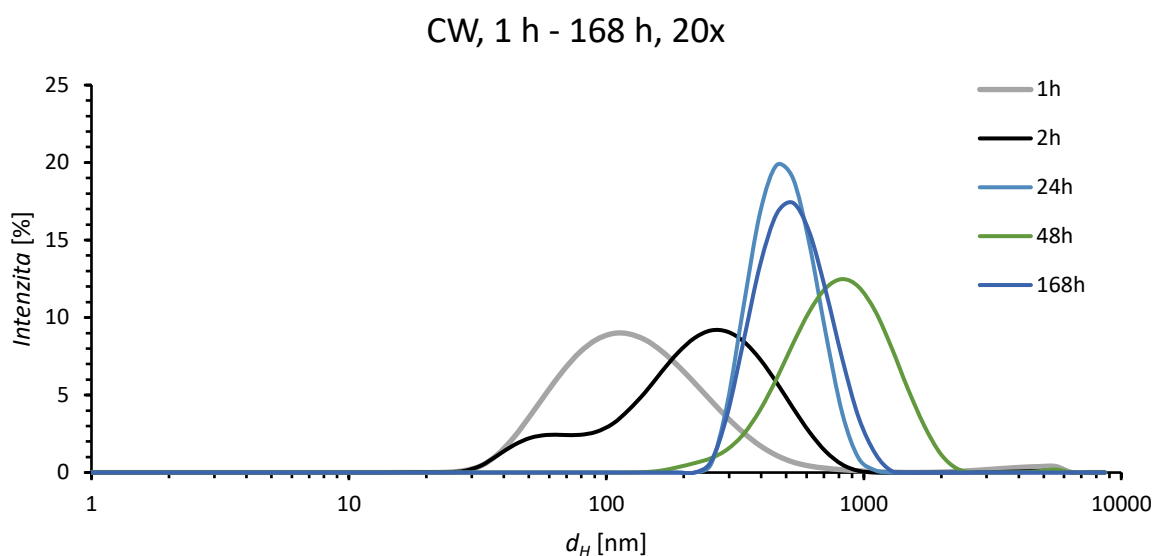
Z DLS měření (obr. 39) vidíme, zlaté komplexy měly hodnoty hydrodynamického průměru od 190 nm, a dále rostly až do hodnoty 459 nm.

3.5.4.2 Syntéza S2 – Cystein a tryptofan



Obrázek 40: UV-VIS spektra zlata s kombinací cysteinu a tryptofanu.

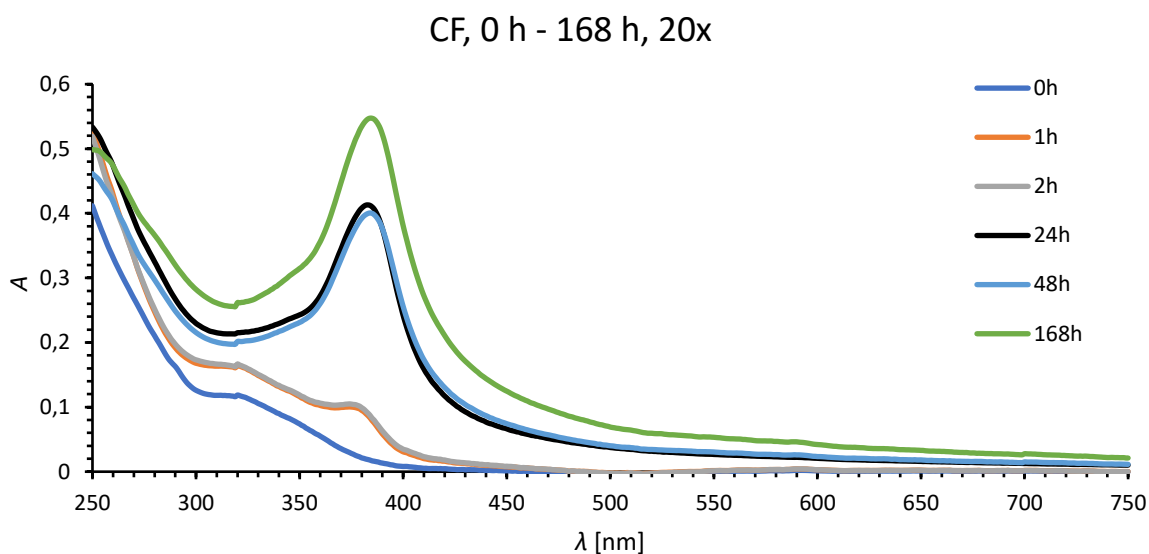
Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 40), že pík pro zlaté komplexy se začal formovat od druhé hodiny od začátku syntézy a dosáhl hodnot 384 nm.



Obrázek 41: Distribuce velikostí komplexů odvozená z DLS měření pro kombinaci cysteinu s tryptofanem (neboli změna intenzity rozptýleného záření vzorkem komplexů v čase, z níž je odvozená zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru komplexů). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

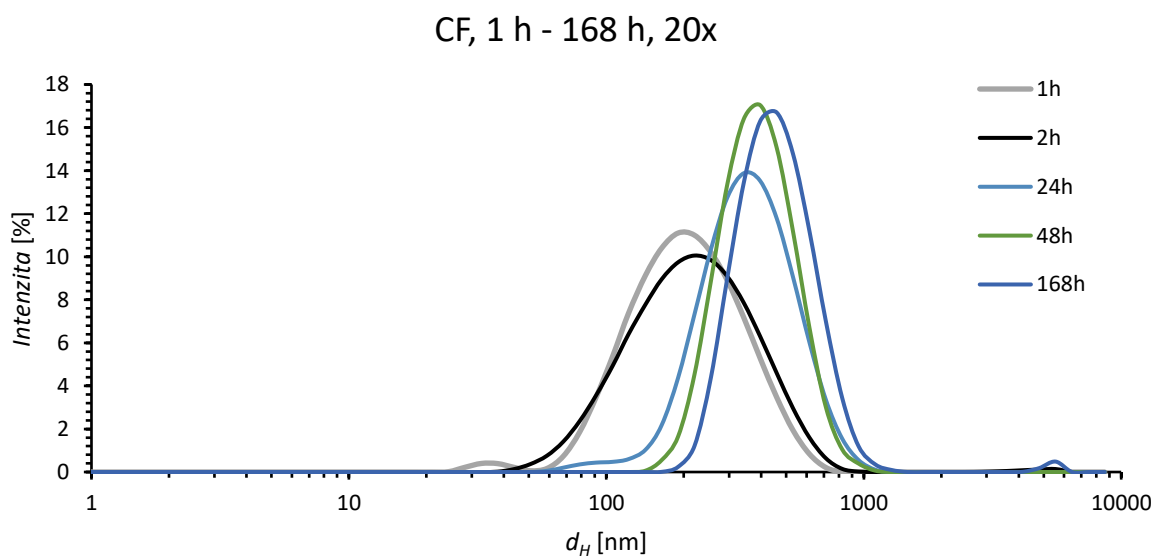
Z DLS měření (obr. 41) vidíme, že zlaté komplexy dosahovaly postupně hodnot hydrodynamického průměru od 106 nm do 531 nm, ale maximální hodnoty dosáhly po 48 hodinách od začátku syntézy, a to 825 nm.

3.5.4.3 Syntéza – Cystein a fenylalanin



Obrázek 42: UV-VIS spektra zlata s kombinací cysteinu a fenylalaninu.

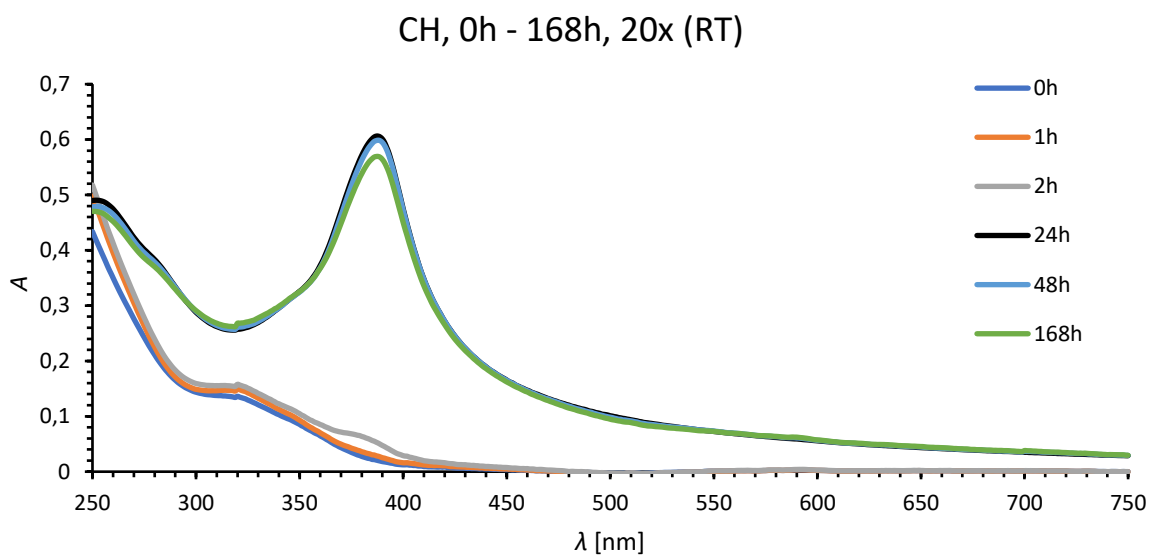
Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 42), že komplexy zlata s aminokyselinami dosahovaly hodnot maxima v 384 nm, a pík se začal formovat od 1 hodiny od začátku syntézy.



Obrázek 43: Distribuce velikostí komplexů odvozená z DLS měření pro kombinaci cysteinu s fenylalaninem (neboli změna intenzity rozptýleného záření vzorkem komplexů v čase, z níž je odvozená zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru komplexů). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

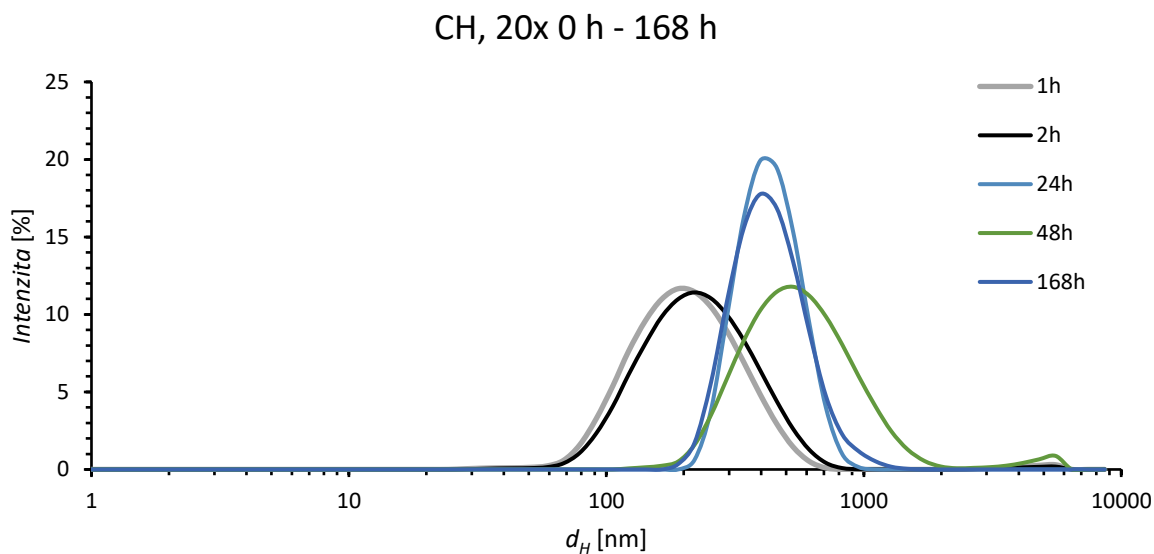
Z DLS měření (obr. 43) vidíme, že hodnoty hydrodynamického průměru pro komplexy zlata s aminokyselinami dosahovaly postupně hodnot od 190 nm do 459 nm.

3.5.4.4 Syntéza S2 – Cystein a histidin



Obrázek 44: UV-VIS spektra zlata s kombinací cysteinu a histidinem.

Z UV-VIS spekter vidíme (obr. 44), že komplexy zlata s aminokyselinami dosahovaly hodnot maxima v 388 nm, a pík se začal formovat od 2 hodin od začátku syntézy.

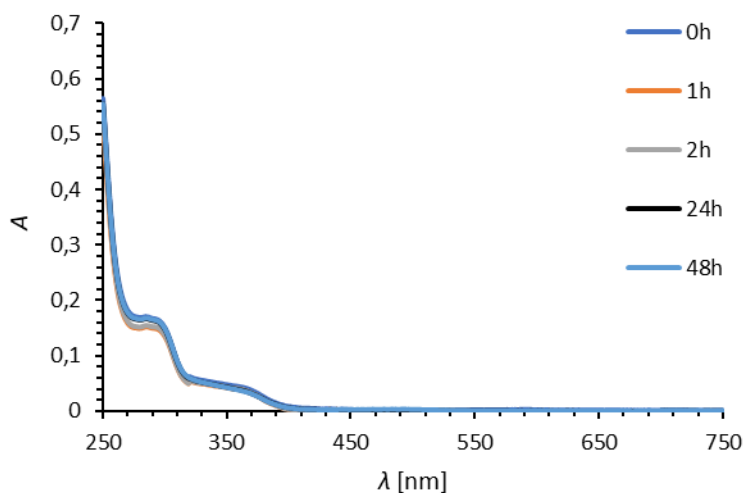


Obrázek 45: Distribuce velikostí komplexů odvozená z DLS měření pro kombinaci cysteinu s histidinem (neboli změna intenzity rozptýleného záření vzorkem komplexů v čase, z níž je odvozená zobrazená závislost intenzity v procentech na hydrodynamickém průměru komplexů). Distribuce velikostí částic je průměrem tří nezávislých měření.

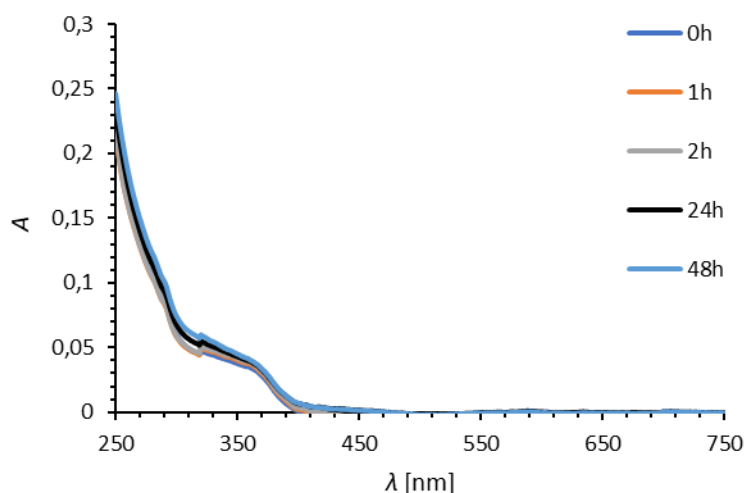
Z DLS spekter (obr. 45) vidíme, že hodnoty hydrodynamického průměru pro komplexy zlata s aminokyselinami dosahovaly postupně hodnot od 190 nm do 396 nm.

3.5.5 Syntéza S3 RT

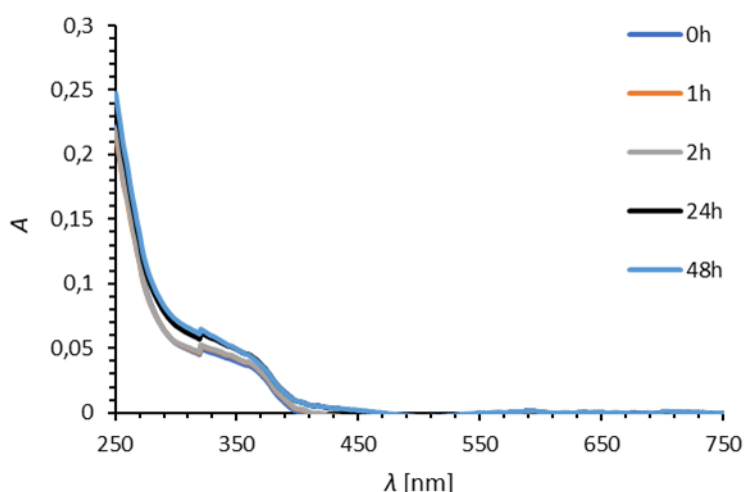
CY, 0 h - 48 h, 20x



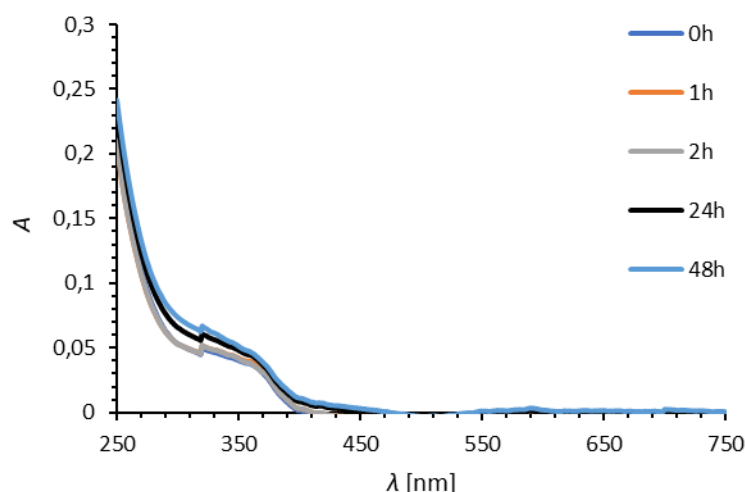
CW, 0 h - 48 h, 20x



CF, 0 h - 48 h, 20x



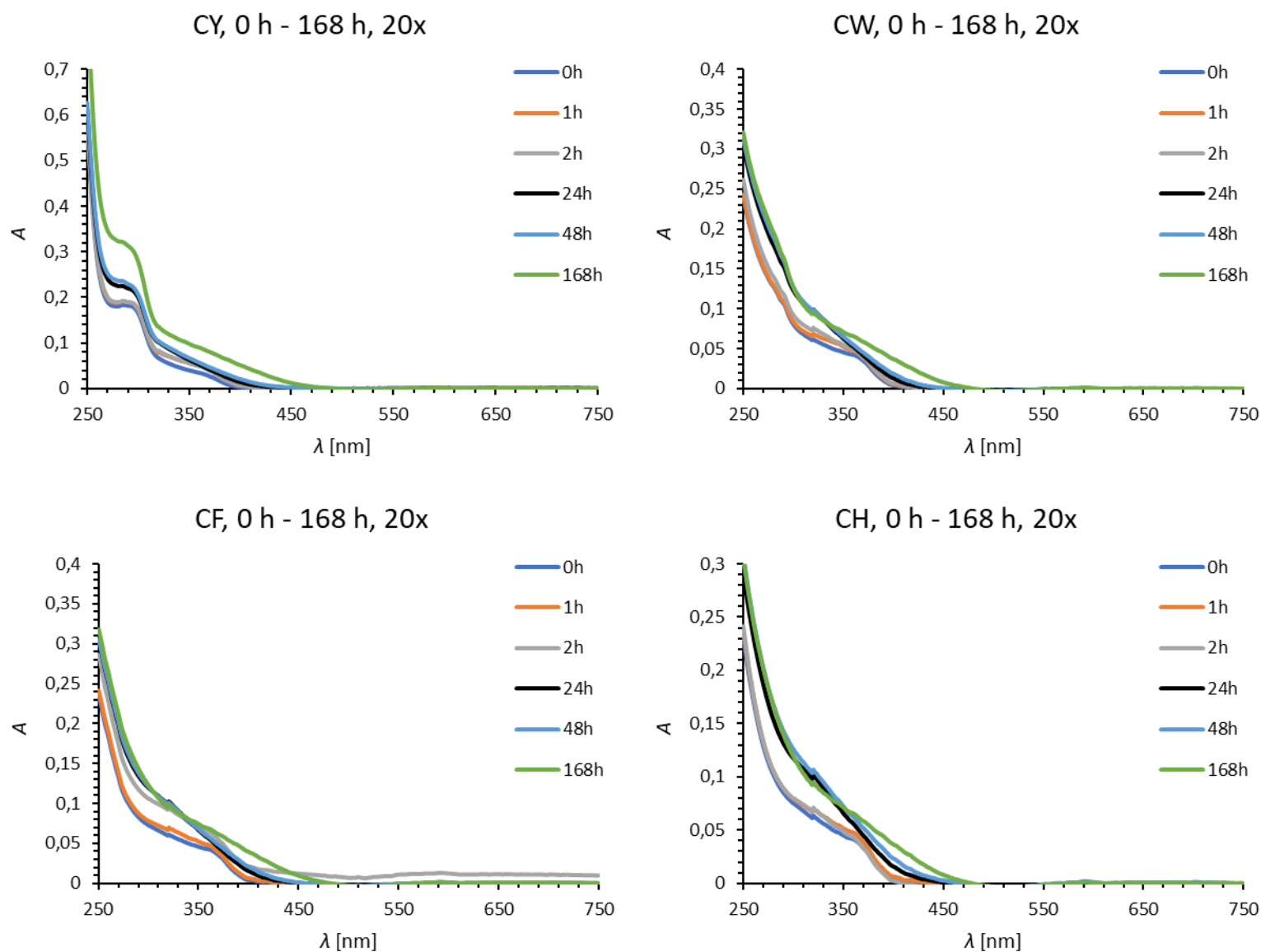
CH, 0 h - 48 h, 20x



Obrázek 46: UV-VIS spektra pro syntézu S3 RT, pro všechny kombinace aminokyselin.

Jak je vidět z UV-VIS spekter (obr. 46), nevznikly nanočástice, ale jakési komplexy zlata s aminokyselinami jsou naznačeny (zvýšená absorpance v okolí 360 nm). Vzorky byly po celou dobu od začátku syntézy čiré, beze změny. Z toho důvodu nebylo provedeno měření DLS, zeta potenciálu a TEM, a experiment byl ukončen po 48 hodinách od začátku syntézy.

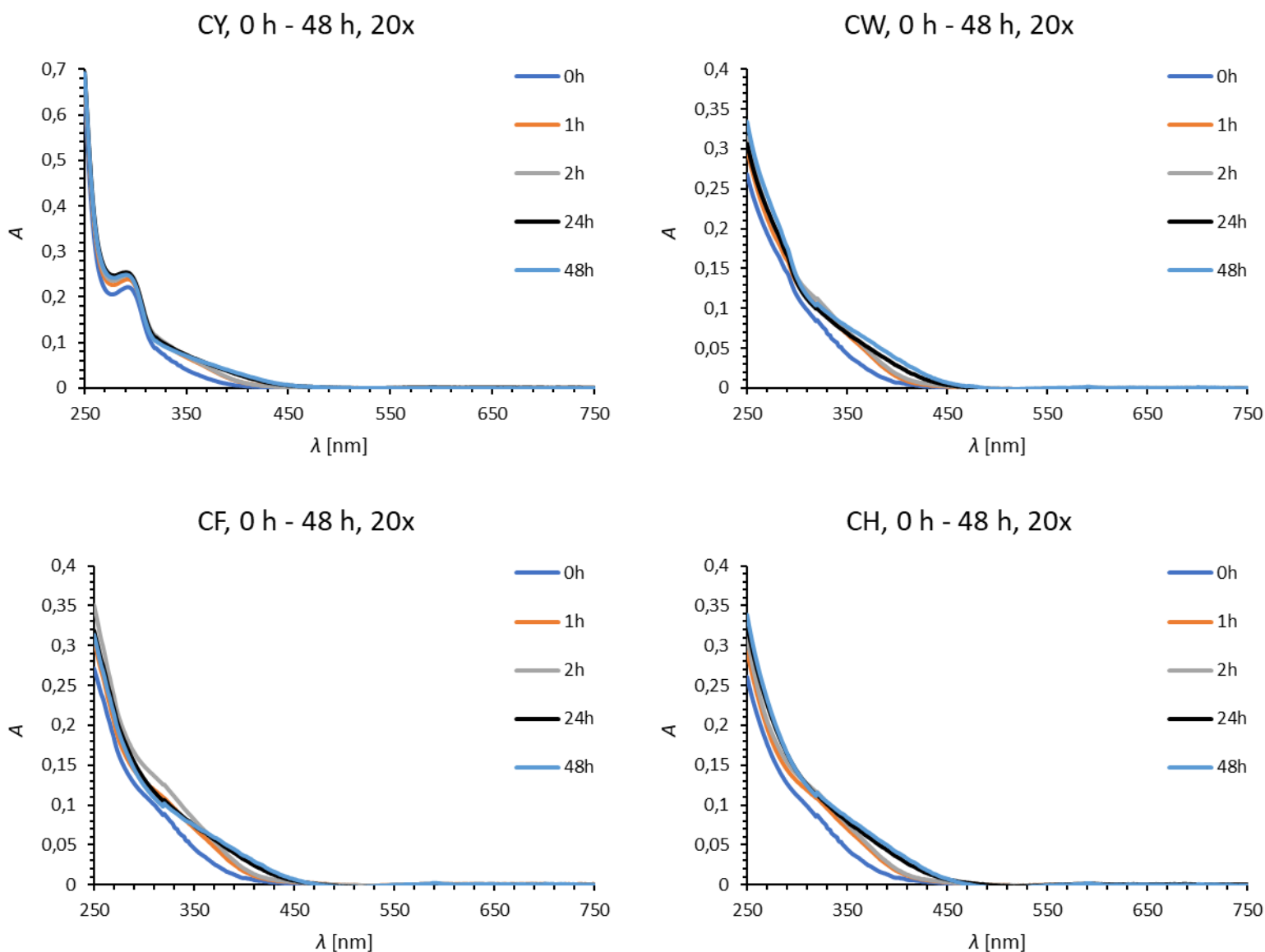
3.5.6 Syntéza S3 50C



Obrázek 47: UV-VIS spektra pro syntézu S3 50C, pro všechny kombinace aminokyselin.

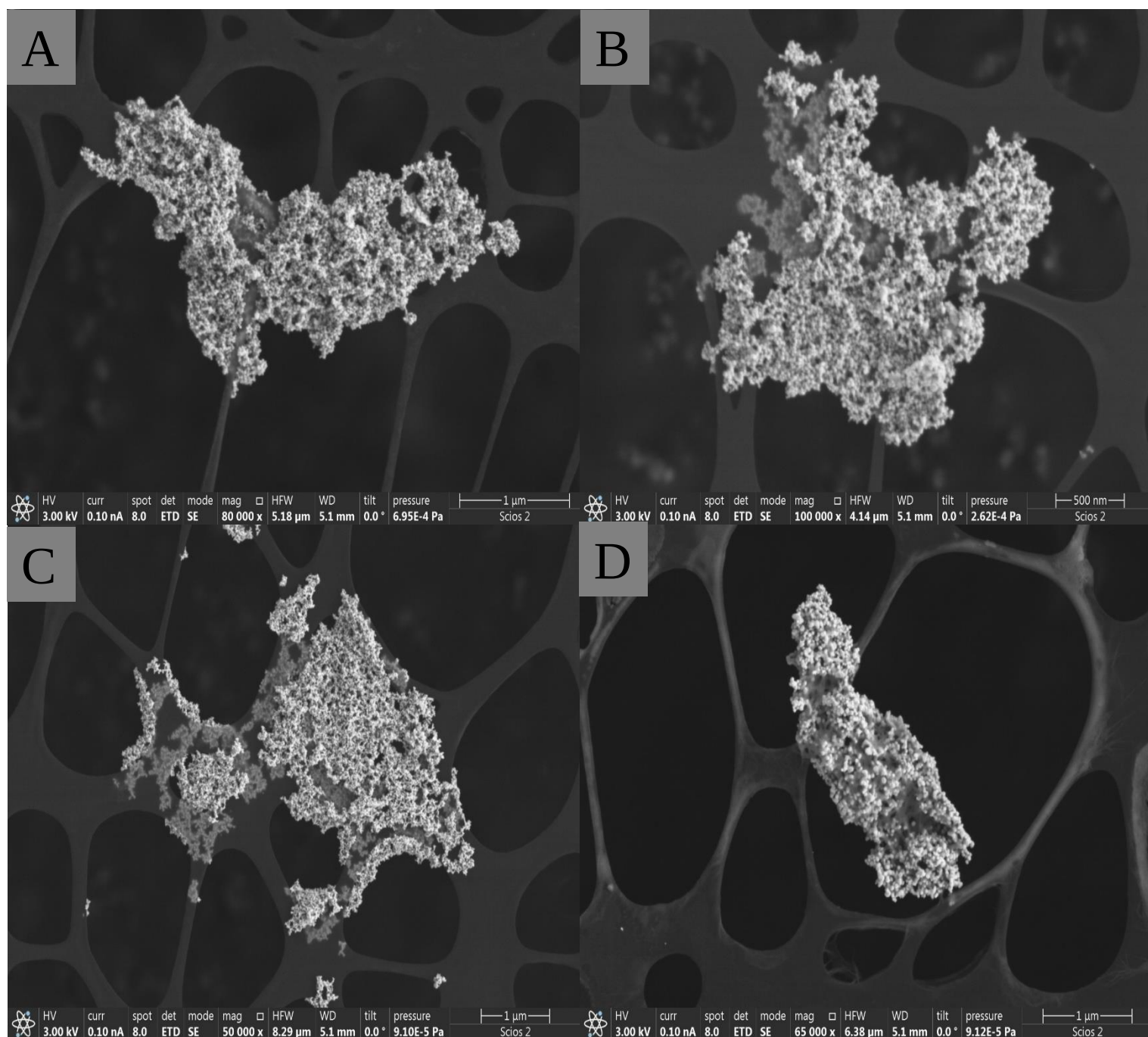
Z UV-VIS spektra vidíme (obr. 47), že opět nevznikly nanočástice, ale jakési komplexy. Vzorky byly čiré, po 48 hodinách od začátku syntézy velmi mírně zežloutly (méně výrazně než u syntézy S2). Z toho důvodu nebylo provedeno měření DLS, zeta potenciálu a TEM a experiment byl ukončen po 168 hodinách.

3.5.7 Syntéza S4



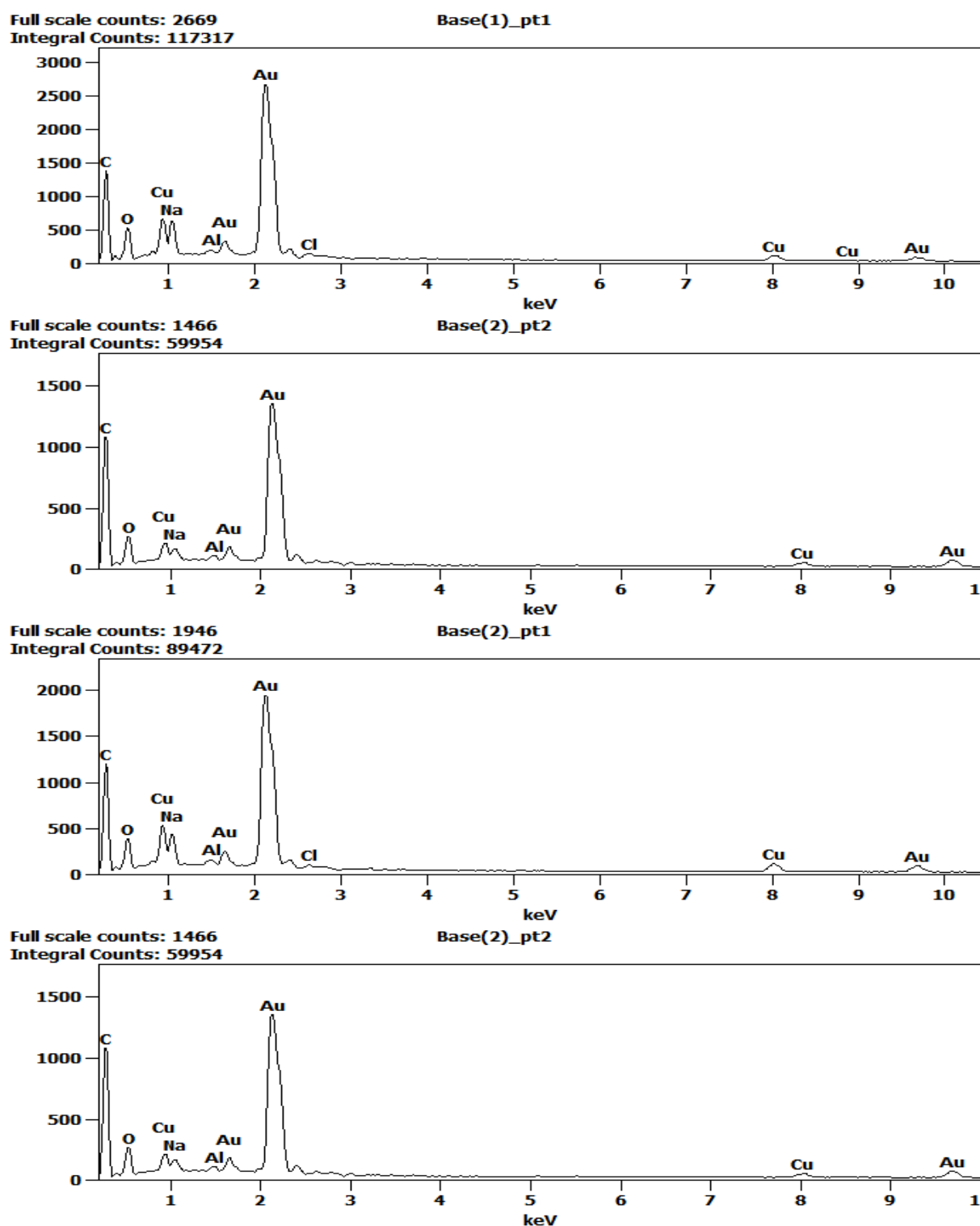
Obrázek 48: UV-VIS spektra pro syntézu S2 50C1A, pro všechny kombinace aminokyselin.

Z UV-VIS spekter je patrné (obr. 48), že situace je obdobná jako u syntézy S2 50C1. Vzorky pouze velmi mírně zežloutly, ale žádné nanočástice nevznikly, pouze komplexy. Na dně ependorfků se usadil černý agregát. Z toho důvodu jsme opět neměřili DLS, zeta potenciál a TEM. Experiment jsme ukončili po 48 hodinách od začátku syntézy.



Obrázek 49: Snímky ze SEM měření. *A* představuje vzorek s cysteinem a tyrosinem, *B* s cysteinem a tryptofanem, *C* s cysteinem a fenylalaninem, *D* s cysteinem a histidinem.

Snímky pořízené pomocí SEM (obr. 49) ukazují agregované nanočástice. Mají amorfní strukturu, nicméně je vidět, že se skládají z nanočástic, které drží u sebe. Velikost agregátů se pohybuje od několika stovek nanometrů do několika jednotek mikrometrů.



Obrázek 50: EDS spektra pro agregáty. První z vrchu je pro vzorek obsahující cystein a tyrosin, druhý je pro vzorek obsahující cystein a tryptofan, třetí je pro vzorek obsahující cystein a fenylalanin a čtvrtý je pro vzorek obsahující cystein a histidin.

EDS měření ukazuje, že vzorky se skládají hlavně ze zlata. Jsou zde vidět i píky odpovídající sodíku a chlóru, velice pravděpodobně navázané na agregátu po NaOH a HAuCl₄. Dále se zde objevují prvky uhlík, kyslík, měď a hliník.

3.4 Diskuze

Během syntézy S1 RT se nám podařilo nasyntetizovat nanočástice pomocí všech aminokyselin, kromě cysteinu. V případě cysteinu došlo pravděpodobně pouze k tvorbě komplexů Au-Cys, a to dokonce pouze v jednom ze tří syntéz. Nanočástice pomocí cysteinu se nepodařilo vytvořit ani skupině Maruyama a kol. (2014), nicméně zde pravděpodobně použili asi 100x menší poměr zlata:cysteinu, než tomu bylo v našem případě. O tvorbě komplexů cysteinu se zlatitou solí pomocí thiolové skupiny píše Wangoo a kol (2014), kterým se také nepodařilo vytvořit nanočástice pomocí cysteinu, jejich vzorek agregoval ve formě černého precipitátu. Jejich poměr zlata:cysteinu byl rozsahu od 1:20 do 1:0,4. Námi použitý poměr byl 1:1,4, čili přibližně stejný, jako použili Wangoo a kol (2014). Závěrem pro cystein tedy můžeme říct, že nepodporuje tvorbu zlatých nanočástic v koncentraci a molárním poměru, které jsme použili. Ostatní aminokyseliny vedly ke vzniku Au nanočástic. Malé nanočástice byly nasyntetizovány pomocí tyrosinu a tryptofanu, a to o průměrné velikosti okolo 11 nm. Tyrosin jako redukující a stabilizační činidlo pro tvorbu AuNP(Y)_RT potvrzují Ju a kol. (2012), a to i s námi použitými koncentracemi. Jejich výsledky UV-VIS spekter a TEM měření se shodují s našimi.

Tryptofan jako redukující a stabilizační činidlo potvrzuje například Zarabi a kol. (2014), ti však syntetizovali nanočástice za zvýšené teploty, podobně jako Maruyama a kol. (2014). Ačkoliv byl jejich poměr zlata k tryptofanu výrazně nižší než v našem případě (1:50 pro Maryama a kol.; 1:(0,2-5) pro Zarabi a kol.; 1:0,08 pro náš experiment), jejich nanočástice byly v roztoku modré až fialové, což značí jejich velkou velikost a v čase agregovaly. Nám se však podařilo nasyntetizovat menší nanočástice, srovnatelně velké s AuNP(Y)_RT, roztok byl červený. Zdá se tedy, že velmi vysoký poměr zlata k tryptofanu produkuje menší nanočástice, které jsou stabilnější v čase (náš zeta potenciál byl více než -20 mV).

Pomocí fenylalaninu jsme nasyntetizovali nanočástice asi dvakrát větší. Redukční a stabilizační vlastnosti fenylalaninu potvrzuje i studie od Figat a kol. (2023) nebo Wangoo a kol. (2014). Oba opět použili syntézu za zvýšené teploty, ale v poměrech zlata k aminokyselině blízkým našemu poměru. Výsledky obou studií se blíží našim výsledkům, co se polohy UV-VIS píku týče, tak i velikosti nanočástic jsme dosáhli podobných (mezi 20 nm a 25 nm).

Ačkoliv se histidin zpočátku nezdál vhodný pro syntézu nanočástic za pokojové teploty, po čase se ukázalo, že nanočástice tvoří. Wangoo a kol (2014) nevytvořili AuNP(H), ačkoliv měli jen o polovinu menší poměr reaktantů a použili zvýšenou teplotu. Při syntéze však nepoužili NaOH na aktivaci redukčních vlastností histidinu. Možná, kdyby syntézu předčasně neukončili, tak by jim histidin nanočástice vyprodukoval. Takto to udělali Figat a kol (2023), kde použili také zvýšené teploty, ale v jejich protokolu čekají dostatečně dlouho na to, aby vzorek změnil barvu, a tu si zachoval po dobu 5 minut, bez přídavku NaOH. Zdá se tedy, že NaOH hraje důležitou roli při syntéze nanočástic za použití histidinu. Nicméně jejich (Figat a kol (2023)) AuNP(H) měly nepravidelný tvar s velikostí kolem 10 nm. Na rozdíl od toho se nám podařilo vygenerovat nanočástice o velikosti okolo 23 nm. Když jsme u histidinu zvýšili teplotu vložením vzorku do termobloku, došlo k syntéze větších nanočástic (o 5 nm), bez posunu maxima vlnové délky UV-VIS absorpce. Pík však byl výrazně širší (asi o 20 nm). Zdá se tedy, že na syntézu má vliv vedle přítomnosti NaOH i teplota vývoje.

Toto jsme zkusili ověřit i u tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu, a to syntézou za snížené teploty. U všech aminokyselin došlo ke zpomalení vývoje, kde se SPR pík, a tedy i první nanočástice, objevil až po jednom dni od začátku syntézy pro tyrosin a fenylalanin, u tryptofanu došlo ke zpoždění dokonce o týden od začátku syntézy. U tyrosinu nedošlo k výrazné změně velikosti nanočástic. U tryptofanu došlo ke zmenšení nanočástic a to o 4 nm. Jeden vzorek nám dokonce zagregoval, což je vidět na obrázku 26, kde kulovité nanočástice začaly tvořit spíše zakroucené, prorostlé, nepravidelné útvary. Stalo se to však pouze v jednom případě ze tří syntéz. U AuNP(F) došlo k výraznějšímu zmenšení nanočástic, i ke změně histogramu rozdělení velikostí, kde došlo k posunu od normálního rozdělení směrem k menším hodnotám velikostí nanočástic. Zajímavé však je, že se změny velikosti nanočástic neprojevili výrazněji na UV-VIS spektrech, kromě tryptofanu, kde došlo k posunu o 15 nm. Patrně je tomu proto, že tak malá změna na tak malých nanočásticích nemá takový výrazný projev ve spektru, jako třeba změna o desítky nanometrů.

DLS měření bývají většinou prováděna na dialyzovaném nebo centrifugovaném vzorku nanočástic. Toto jsme však neprováděli, a proto byly výsledky DLS hodnot hydrodynamického průměru tak odlišné od reálné velikosti nanočástic. Kolem nanočástic se pravděpodobně vlivem coulombovských sil pohybovaly nezdredukované zlatité ionty a aminokyseliny, což mohlo výrazně zvětšit solvatační obálku kolem nanočástice, a ovlivnit tak výsledky DLS měření. To se ukázalo být problematické hlavně u AuNP(W), kde DLS výsledky ukazovaly dva píky, což by naznačovalo dvě různé velikosti nanočástic. Zdá se, že

AuNP(W) mají tendenci mírně agregovat, a tvořit tak lineární superstruktury (Selvakaan a kol. 2003), a to za pomoci polymerizovaného tryptofanu. DLS měření jsou tedy spíše jen orientační, aby byl vidět vývoj koloidních systémů v čase, a jak se kvalitativně mění.

Při syntéze S2 jsme použili cystein, který redukuje zlatité ionty (Ostruszka a kol. 2022), v kombinaci s ostatními aminokyselinami. Toto se však ukázalo jako neúčinné pro tvorbu nanočástic. Pouze při syntéze S2 RT1 se zřejmě vytvořily komplexy Au-Cys, s píkem okolo 385 nm, ale ty jsme se rozhodli dále nezkoumat. DLS měření se zdá bezvýznamné, ale provedli jsme jej jen jako podpůrný důkaz, že se opravdu nic nesyntetizovalo, protože data jsou víceméně chaotická. Doufali jsme, že zvýšení koncentrace NaOH pomůže ostatním aminokyselinám v tvorbě nanočástic, ale to se ukázalo, jako neúčinné, neboť vymizel i pík pro komplexy. Zkusili jsme tedy vzorky vložit do termobloku v domněnání, že teplota by mohla být klíčová pro tvorbu nanočástic, bez výsledku. Zdá se, že cystein zredukuje všechny zlatité ionty, a naváže si je na sebe, čímž jim znemožní nukleaci a růst do nanočástice, a další aminokyseliny tak nemají co redukovat či stabilizovat. V příštích experimentech by tedy bylo vhodné cystein vynechat, nebo zmenšit jeho koncentraci, případně použít teplotu syntézy vyšší než 50 °C. Nakonec jsme zkusili ještě zvýšit koncentraci NaOH na 500 mM, a vložit vzorky do termobloku, což mělo pravděpodobně za následek vznik černého agregátu na dně ependorfy. Agregát jsme analyzovali pomocí SEM v kombinaci EDS, kde je vidět, že agregáty jsou amorfní, ale je vidět, že skládají z nanočástic. Pravděpodobně tedy došlo ke tvorbě nanočástic, ale vlivem přítomnosti NaOH ve vysoké koncentraci došlo k agregaci. Přítomnost sodíku ukazuje i EDS analýza. Přítomnost hliníku, mědi a uhlíku lze vysvětlit přítomností hliníkové destičky, na které je pomocí vodíkové uhlíkové pásky nalepená měděná mřížka, která je potažená uhlíkovým filmem. Uhlík se navíc vyskytuje u aminokyselin. Přítomnost chlóru lze vysvětlit použitím H_{AuCl}₄ k syntéze.

4 Závěr

V této diplomové práci jsme se soustředili na Au anebo Ag nanostruktury a jejich přípravu pomocí vybraných aminokyselin. V teoretické části jsme se zaměřili na fyzikální vlastnosti Au a Ag nanočástic, co je ovlivňuje, a to jakým způsobem syntéza ovlivňuje tyto vlastnosti. Dále jsme se v krátkosti zaměřili na již známé metody syntézy, a detailněji jsme se zaměřili na metody zelené syntézy, do které patří právě syntéza pomocí aminokyselin a využití nanočástic v různých odvětvích. V poslední části jsme se zaměřili na několik vybraných metod charakterizace nanočástic, a to na jejich velikost, náboj, tvar a způsoby modifikace povrchu nanočástic.

V experimentální části jsme provedli syntézu Au nanočástic při pevně dané koncentraci reaktantů, ale ve třech různých teplotách vývoje – pokojová teplota, chlad a zvýšená teplota. Syntézu Ag nanočástic jsme z časových důvodů neprovedli. Pro pokojovou teplotu jsme syntetizovali nanočástice pomocí všech vybraných aminokyselin, ve chladu pouze za pomoci tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu, a za zvýšené teploty pomocí histidinu a cysteinu. Cystein jako jediná aminokyselina není vhodná pro syntézu Au nanočástic, všechny ostatní aminokyseliny nanočástice tvořily. Nanočástice syntetizované pomocí tyrosinu, tryptofanu, fenylalaninu a histidinu za pokojové teploty měly velikosti $11,08 \pm 3,69$ nm, $11,84 \pm 1,96$ nm, $23,35 \pm 9,84$ nm, $23,27 \pm 4,86$ nm, s maximy SPR píků na hodnotách 521 nm, 523 nm, 526 nm a 538 nm, postupně, počítáno od 24 hodin od začátku syntézy. Nanočástice syntetizované pomocí histidinu za zvýšené teploty měly velikost $28,36 \pm 5,23$ nm, s maximem SPR píku na hodnotě 539 nm, počítáno od 168 hodin od začátku syntézy. Nanočástice syntetizované pomocí tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu za snížené teploty měly velikost $11,05 \pm 2,53$ nm, $7,69 \pm 3,04$ nm, $15,77 \pm 7,92$ nm, s maximy SPR píků na hodnotách 525 nm, 538 nm a 527 nm postupně. Tím jsme prokázali vliv teploty na syntézu nanočástic.

V druhém až čtvrtém typu syntéz jsme se pokusili o syntézu nanočástic pomocí kombinace dvou aminokyselin, a to cysteinu a další aminokyseliny ze zbývajících. Zde však nedošlo k syntéze nanočástic, ale v případě S2 syntézy pouze pravděpodobně k tvorbě blíže neurčených komplexů Au-Cys-Tyr/Trp/Phe/His, v syntéze S4 nám vznikly černé agregáty velké od několika stovek nanometrů do několika mikrometrů, podle SEM měření. Ostatní experimenty byly neúspěšné, a celkově tedy nelze říci, že by bylo možné tímto způsobem syntetizovat nanočástice.

5 Seznam literatury:

- Al-Thabaiti N. S., Malik M. A., Khan Z. (2016) Protein interactions with silver nanoparticles: Green synthesis, and biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, **95**, 421-428.
- Amendola V., Meneghetti M. (2009) Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 3805-3821.
- Anatas P. T., Warner J. Ch., (1998) Green chemistry: Theory and Practise, ilustrované vydání, Oxford University Press, Oxford, UK, 135 stran.
- Ateeq M., Shah M. R., Ain N. Bano S., Anis I., Lubna, Faizi S., Bertino M. F., Naz S. S. (2014) Green synthesis and molecular recognition ability of patuletin coated gold nanoparticles *Biosensors and Bioelectronics* **63**, 499-505.
- Bhattacharjee S. (2016) DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337-351.
- Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D. J., Whyman R. (1994) Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **7**, 801-802.
- Contino A., Maccarrone G., Zimbone M., Reitano R., Musumeci P., Calcagno L., Oliveri I. P. (2016) Tyrosine capped silver nanoparticles: A new fluorescent sensor for the quantitative determination of copper(II) and cobalt(II) ions. *Journal of Colloid and Interface Science* **462**, 216-222.
- Figat A. M., Bartosiewicz B., Liszewska M., Budner B., Norek M., Jankiewicz B. J. (2023) α -Amino Acids as Reducing and Capping Agents in Gold Nanoparticles Synthesis Using the Turkevich Method. *Langmuir* **39**, 8646-8657.
- Ghosh S. K., Pal T. (2007) Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chemical Reviews*, **107**, 4797-4862
- Goldstein J. I., Newbury D. E., Echlin P., Joy D. C., Lyman Ch. E., Lifshin E., Sawyer L., Michael J. R. (2003) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. 3. vydání. Springer, New York, USA, 690 stran.
- Hammami I., Alabdallah N. M., Jomaa A. A., Kamoun M. (2021) Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University – Science*, **33**, 101560-101569.
- Harish K. K., Nagasamy V., Himangshu B., Anuttam K. (2018) Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technological Research* **4(2)**, 3765-3775.
- Havaladar D. V., Patil R. V., Moholkar D. N., Magdum P. S., Vadrle A. P., Pawar, K. D. (2020) Differently synthesized gold nanoparticles respond differently to functionalization with L-amino acids. *Particuology*, **52**, 97-104.
- Houston M., DeBella M., DiBella M., Gupta A., (2021) Synthesis of Nanomaterials. *Nanomaterials* **11**, 2130-2159.
- Jana J., Ganguly M., Pal T. (2016) Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. *The Royal Society of Chemistry* **6**, 86174-86211.
- Ju J.-J., Lu Ch.-X., Jan J.-S. (2012) Synthesis of Gold Nanowire Networks and Nanoparticles by Tyrosine Reduction of Chloroaurate. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **12(3)**, 2802-2809.
- Katsure M., Sastry M., Prasad B.L.V. (2010) Halide ion controlled shape dependent gold nanoparticle synthesis with tryptophan as reducing agent: Enhanced fluorescent properties and white light emission. *Chemical Physics Letters*, **484**, 271-275.
- Kettler K., Veltman K., Meent D., Wezel A., Hendriks A. J. (2013) Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **33(3)**, 481-492.
- Li X., Lenhart J. J., Walker H. W. (2010) Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles. *Langmuir*, **26(22)**, 16690-16698.
- Li Z., Lei Z., Zhang J., Liu D., Wang Z. (2015) Effect of Size, Shape, Surface Charge and Functionalization on Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Nano LIFE* **5(1)**, 1540003-1540014.
- Maruyama T., Fujimoto Y., Maekawa T. (2014) Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. *Journal of Colloid and Interface Science* **447**, 254-257.
- Matos R. A., Courrol L. C. (2017) Biocompatible silver nanoparticles prepared with amino acids and a green method. *Amino Acids*, **49**, 379-388.
- N. Baig, I. Kammakam, W. Falath (2021) Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Material advances* **2**, 1821
- Ostruzska R., Zoppellaro G., Tomanec O., Pinkas D., Filimonenko V., Šišková K., (2022) Evidence of Au(II) and Au(0) States in Bovine Serum Albumin-Au Nanoclusters Revealed by CW-EPR/LEPR and Peculiarities in HR-TEM/STEM Imaging *Nanomaterials* **12(9)**, 1425
- Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahn-Dechent W. (2007) Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*, **3**, 1941-1949.

- Prosser V., Bakule R., Balgavý P., Beneš K., Čápek V., English J., Janáček O., Jelínek O., Jelínková E., Ludvík J., Nešpůrek S., Pančoška P., Pilař J., Pilný J., Sedlák B., Šichová H., Štěpánek J., Valvoda V., Vondrejs V., Zachová J. (1989) Experimentální metody biofyziky. 1. vydání, Academia, Praha, Česká republika, 716 stran.
- Saadatkhan N., Garcia A. C., Ackermann S., Leclerc P., Latifi M., Samih S., Patience G. S., Chaouki J. (2020) Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **98**, 34-43.
- Selvakannan P. R., Mandal S., Phadtare S., Gole A., Pasricha R., Adyanthaya S. D., Sastry M. (2004) Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *Journal of Colloid and Interface Science* **269**, 97,102.
- Shankar S., Rhim J.-W. (2015) Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. *Carbohydrate Polymers*, **130**, 353-363.
- Sharma N. K., Vishwakarma J., Rai S., Alomar T. S., AlMasoud N., Bhattarai A. (2022) Green Route Synthesis and Characterization Techniques of Silver Nanoparticles and Their Biological Adeptness. *ASC Omega* **7**, 27004-27020.
- Shumi G., Demissie T. B., Eswaramoorthy R., Bogale R. F., Kesana G., Desalegn T. (2023) Biosynthesis of Silver Nanoparticles Functionalized with Histidine and Phenylalanine Amino Acids for Potential Antioxidant and Antibacterial Activities. *ACS Omega*, **8** 24371-24386.
- Schlinkert P., Casals E., Boyels M., Tischler U., Hornig E., Ngoc T., Zhao J., Himly M., Riediker M., Oostigh G. J., Puentes V., Duschl A. (2015) The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. *Journal of Nanobiotechnology* **13**, 1-18.
- Soliman S. S. M., Alhamidi T. B., Abdin S., Almeheidi A. M., Semreen M. H., Alhumaidi R. B., Shakartalla S. B., Haider M., Hussein M. I., Omar H. A. (2020) Effective targeting of breast cancer cells (MCF7) via novel biogenic synthesis of gold nanoparticles using cancer-derived metabolites *Plos One* **15**(10), e0240156
- Stoehr L.C., Gonzales E., Stampfl A., Casals E., Duschl A., Puentes V., Oostigh G., J. (2011) Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* **8**, 36-51.
- Sriram M. I., Karishwaralal K., Barathmanikant S., Gurunathan S. (2012) Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. *Nanoscience methods* **1**, 56-77.
- Subara D. Jaswir I., (2018) Gold nanoparticles: Synthesis and application for halal authentication in meat and meat products. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* **8**, 1633-1641.
- Tomita R. J., Matos R. A., Vallim M. A., Courrol L. C. (2014) simple and effective method to synthesize fluorescent nanoparticles using tryptophan and light and their lethal effect against bacteria *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **140**, 157-162.
- Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. (1951) A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **11**, 55-75.
- Velmurugan P., Shim J., Bang K.-S., Oh B.-T. (2016) Gold nanoparticles mediated coloring of fabrics and leather for antibacterial activity *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* **160**, 102-109.
- Wang K., Zhang W., Zhang X., Hu X., Chang S., Zhang H. (2020) Highly Sensitive Gold Nanoparticles–DNA Nanosensor for γ -Radiation Detection *ACS Applied Materials & Interfaces* **12**, 42403-42409.
- Wangoo N., Kaur S., Bajaj M., Jain D., V., S., Sharma R., K. (2014) One pot, rapid and efficient synthesis of water dispersible gold nanoparticles using alpha-amino acids. *Nanotechnology* **25**, 435608-435615.
- Willeks K. A., Dwyne R.P.V., (2007) Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, **57**, 267-297.
- Xie J., Lee J. Y., Wang D. I. C., Ting Y. P. (2007) Silver Nanoplates: From Biological to Biomimetic Synthesis *ACS Nano*, **1**(5), 429-439.
- Yen H.-J., Hsu S.-H., Tsai Ch.-L. (2009) Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small* **5**(13), 1553-1561.
- Yang W., Liang H., Ma s., Wang D., Huang J. (2019) Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment *Sustainable Materials and Technologies* **22**, e00109.
- Zarabi M. F., Arshadi N., Farhangi A., Akbarzadeh A. (2013) Preparation and Characterization of Gold Nanoparticles with Amino Acids, Examination of Their Stability. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **29**(3), 306-314.
- Zare D., Khoshnevisan K., Barkhi M., Tahami H. V. (2013) Fabrication of capped gold nanoparticles by using various amino acids. *Journal of Experimental Nanoscience* **9**(9), 957-965.
- Zhang X., Guo M., Wu H., Sun Y., Ding Y., Feng X., Zhang L. Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. *International Journal of Nanomedicine*. **2009**(4), 165-173.