



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Příprava nanočástic zlata laserovými technikami a jejich in situ funkcionalizace

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály

Autor práce: **Bc. Marcel Havrda**

Vedoucí práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Laser-assisted synthesis of gold nanoparticles and their in situ functionalisation

Master thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942T002 – Nanomaterials

Author: **Bc. Marcel Havrda**
Supervisor: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.





Zadání diplomové práce

Příprava nanočástic zlata laserovými technikami a jejich in situ funkcionalizace

Jméno a příjmení: **Bc. Marcel Havrda**
Osobní číslo: M17000149
Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Zadávající katedra: Katedra chemie
Akademický rok: **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši na téma přípravy nanočástic laserovými technikami.
2. Připravit nanočástice zlata za použití pulzního laseru a in situ je funkcionalizovat.
3. Charakterizovat připravené materiály.

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran
Forma zpracování práce: tištěná



Seznam odborné literatury:

1. Sakamoto M. a kol. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 10 (2009) 33-56.
2. Eustis S. a kol. The Journal of Physical Chemistry B, 109 (2005) 4811-4815.
3. Zhang. D a kol. Chemical Reviews, 117 (2017) 3990-4103.

Vedoucí práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce: 10. října 2018

Předpokládaný termín odevzdání: 30. dubna 2019

L. S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci 10. října 2018

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

16. 4. 2019

Bc. Marcel Havrda

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval všem, kteří se jakoukoli měrou podíleli na vzniku této diplomové práce. Veliký dík patří bezesporu mému vedoucímu panu RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D. za jeho trpělivé vedení, množství cenných a podnětných rad týkajících se nejen organické syntézy. Velice si vážím podpory, které se mi dostalo od Ing. Michala Kotka, Ph.D. a M.Sc. Rafaela Omara Torrese Mendiety, Ph.D., kteří mi pomáhali při manipulaci s pulzním laserem. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Vítu Novotnému za měření MS spekter, Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D. a Mgr. Jaroslavě Novákové, Ph.D. za pořízení snímků nanočástic.

Bezpochyby by se mi nepracovalo tak dobře, nebýt příjemné atmosféry, kterou tvořili všichni členové laboratoře funkcionalizace nanomateriálů. Jmenovitě bych rád poděkoval Mgr. Veronice Mákové, Ph.D. a Ing. Janu Lukáškoví za velice užitečné rady.

Děkuji své úžasné manželce Mgr. Elišce Havrdové, kterou nadevše miluji, že je mi již několik let oporou v dobrém i ve zlém. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům, bratru Josefovi a sestře Mileně, kteří mě podporovali nejen při studiu na vysoké škole. Nesmím opomenout pomoc všech ostatních členů mé početné rodiny.

Abstrakt

V rámci této diplomové práce byl syntetizován 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD, jenž sloužil k in situ funkcionalizaci zlatých nanočástic díky afinitě síry ke zlatu. Dále byla provedena příprava zlatých nanočástic fotochemickou syntézou pomocí pulzního laseru. Částice byly charakterizovány transmisní elektronovou mikroskopií a testovány na odezvu biologicky aktivní látky propamidinu 2-hydroxyethansulfonátu.

Literární rešerše je rozdělena do čtyř hlavních kapitol. První z nich se zabývá nanotechnologiemi. Další kapitola je cílena konkrétně na zlaté nanočástice. Třetí část se zaměřuje na možnosti přípravy nanočástic pomocí laseru a závěr literární rešerše je věnován základním informacím o cyklodextrinech.

Klíčová slova: cyklodextriny, funkcionalizace, laser, zlaté nanočástice

Abstract

In this diploma thesis, 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD was synthesized and served for in situ functionalization of gold nanoparticles due to the affinity of sulfur to gold. Further, the preparation of gold nanoparticles by photochemical synthesis using a pulsing laser was performed. The particles were characterized by transmission electron microscopy and tested for the response of the biologically active substance propamide 2-hydroxyethanesulfonate.

The literary research is divided into four main chapters. The first chapter deals with nanotechnology. The next chapter is aimed specifically at gold nanoparticles. The third part is focused on the possibilities of a preparation of nanoparticles using the laser and the conclusion of the literary research is devoted to basic information about cyclodextrins.

Keywords: cyclodextrins, functionalization, laser, gold nanoparticles

Obsah

Seznam zkratk.....	11
1 Úvod.....	13
2 Teoretická část	14
2.1 Nanotechnologie.....	14
2.2 Zlaté nanočástice	16
2.2.1 Historie.....	16
2.2.2 Chemická příprava zlatých nanočástic	18
2.2.3 Vlastnosti zlatých nanočástic.....	18
2.2.4 Funkcionalizace AuNPs.....	21
2.3 Příprava nanočástic pomocí laserových technik	22
2.3.1 Laserová ablace v kapalinách	23
2.3.2 Laserová fotochemická syntéza	26
2.4 Cyklodextriny	28
2.4.1 Struktura a vlastnosti	28
2.4.2 Výroba	30
2.4.3 Tvorba inkluzních komplexů	30
2.4.4 Deriváty	31
3 Experimentální část.....	33
3.1 Příprava 6 ^A - <i>O</i> -tosyl-β-CD.....	33
3.2 Příprava 6 ^A -sulfanyl-6 ^A -deoxy-β-CD.....	34
3.3 Příklad přípravy zlatých nanočástic v dimethylformamidu.....	34
3.4 Příklad přípravy zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6 ^A -sulfanyl-6 ^A -deoxy-β-CD ve vodě.....	35
3.5 Testování odezvy zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6 ^A -sulfanyl-6 ^A -deoxy-β-CD na biologicky aktivní látku	35

4	Výsledky a diskuze	36
4.1	Syntéza monosubstituovaného β -CD	36
4.2	Příprava zlatých nanočástic a in situ funkcionalizace	38
4.3	Charakterizace zlatých nanočástic v dimethylformamidu.....	41
4.4	Charakterizace zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6 ^A -sulfanyl-6 ^A -deoxy- β -CD ve vodě.....	42
4.5	Test odezvy zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6 ^A -sulfanyl-6 ^A -deoxy- β -CD na biologicky aktivní látku	44
5	Závěr	46
	Seznam literatury	47

Seznam zkratek

(M ⁰)	atom kovu v oxidačním čísle 0
Ac	acetyl
AuNPs	zlaté nanočástice
CD	cyklodextrin(y)
DEE	diethylether
DLS	dynamický rozptyl světla
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EG	ethylenglykol
Et	ethyl
GOD	glukózooxidáza
LAL	laserová ablace v kapalině
LD ₅₀	smrtná dávka pro 50 % jedinců
Me	methyl
MS	hmotnostní spektrometrie
MUA	kyselina 11-merkaptoundekanová
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NPs	nanočástice
ot.	otáčky
Pr	propyl
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie

SERS	povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Ts	tosyl

1 Úvod

Historii nanotechnologií jako vědního oboru lze datovat od konce 50. let minulého století. Za jednoho z prvních průkopníků této vědní disciplíny se považuje nositel Nobelovy ceny americký fyzik Richard Phillips Feynman. Tento vědec se mimo jiné zabýval přírodními ději a zaměřoval se především na fungování těchto procesů na úrovni atomů a molekul. Svoji základní myšlenku představil v přednášce „Tam dole je spousta místa“ (z anglického *There's Plenty of Room at the Bottom*), kterou přednesl roku 1959 na výroční schůzi Americké společnosti fyziků, která se konala na Kalifornském technologickém institutu (Feynman 1960).

Od vyslovení Feynmanovi myšlenky bylo v průběhu let vyrobeno velké množství nových materiálů, jejichž velikost se pohybuje v řádu nanometrů. Tyto materiály se dostaly rychle do popředí zájmu především díky unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem. Z tohoto důvodu je v dnešní době kladen veliký důraz na optimalizování již známých procesů a vývoj nových metod přípravy nanomateriálů. V posledních letech se dostávají ke slovu metody, které k výrobě nanočástic používají různé typy laserů (Zhang et al. 2017; Sakamoto et al. 2009). Lze takto vyrobit nanočástice požadovaných velikostí s dobrou reprodukovatelností, přičemž výhodou je šetrnost většiny laserových procesů k životnímu prostředí. Další výzvou je příprava funkcionalizovaných nanočástic, které lze využít například k transportu léčiv (Ghosh et al. 2008) či jako senzorové systémy (Yue et al. 2016) atd.

V teoretické části této diplomové práce jsou popsány vlastnosti zlatých nanočástic, možnosti využití laseru při jejich výrobě a poslední část je věnována cyklodextrinům, které lze použít k funkcionalizaci. V experimentální části je cíleno na přípravu monosubstituovaného derivátu β -CD, který slouží k in situ funkcionalizaci zlatých nanočástic připravených fotochemickou syntézou pomocí pulzního laseru. V závěru práce je popsána charakterizace a testování částic na odezvu biologicky aktivní látky.

2 Teoretická část

2.1 Nanotechnologie

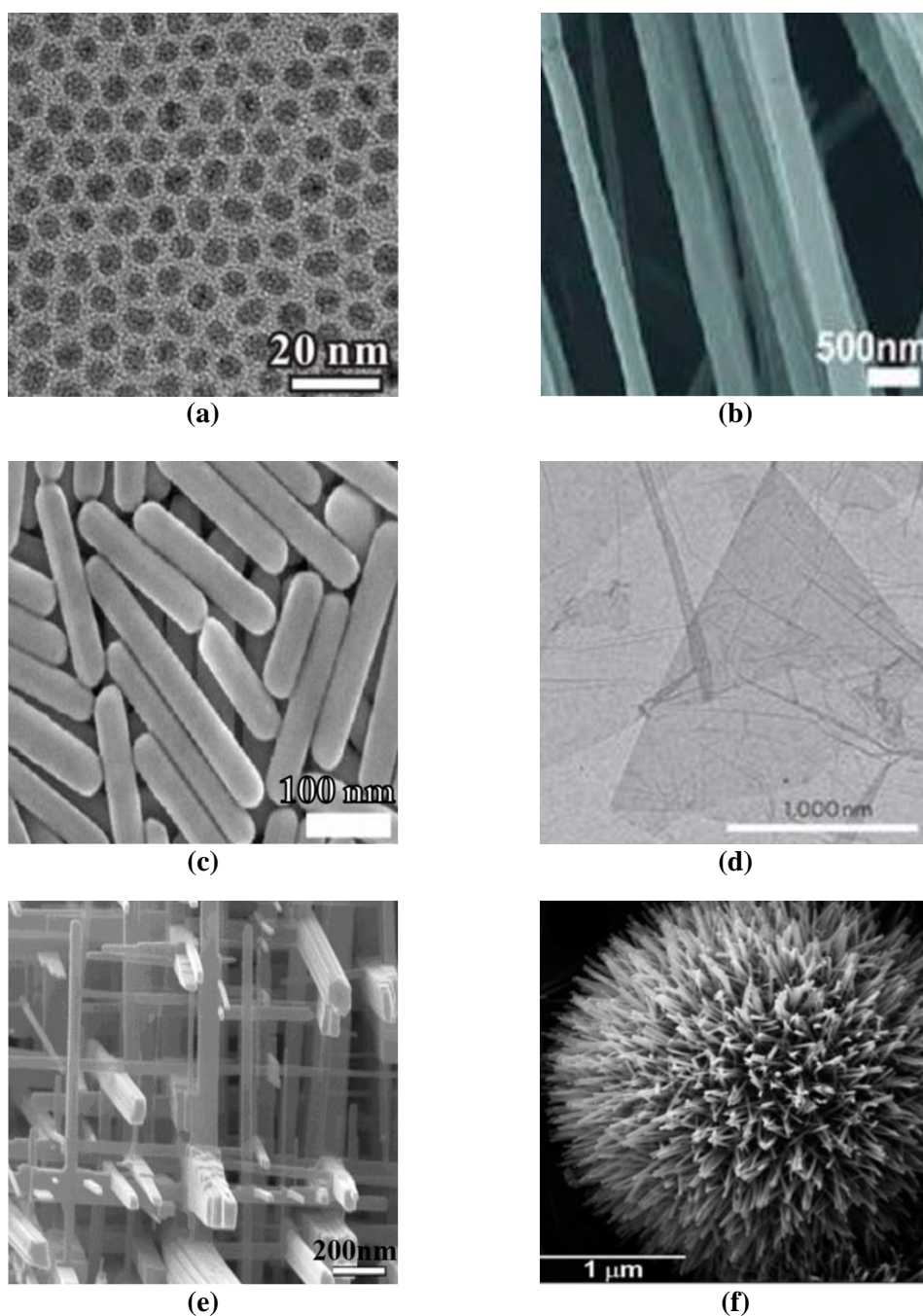
Pojem nanotechnologie označuje jakýkoli postup, který je implementován na úrovni nanometrů (1 nanometr = 10^{-9} metru). Jedná se o kontrolovanou reorganizaci hmoty na atomové a molekulární úrovni v rozmezí velikostí přibližně 1 až 100 nm.

Nanotechnologie představují v dnešní době 21. století velmi dynamicky se rozvíjející obor, díky kterému je lidstvo schopno připravit materiály s jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako jsou: dobrá smáčivost, elektrická a tepelná vodivost, katalytická aktivita, absorpce či rozptyl světla aj. Tyto vlastnosti lze využívat nejen ve vědeckých oborech, ale také v nejrůznějších průmyslových odvětvích – například v biotechnologiích, informačních technologiích, materiálovém inženýrství a dalších (Bhushan 2017; Jeevanandam et al. 2018).

Nanomateriály lze obecně připravit dvěma základními metodami: tzv. „bottom-up“ a „top-down“. První zmíněná metoda je založena na reakcích, při nichž z jednotlivých atomů nebo molekul vznikají větší struktury. Příkladem jsou procesy zahrnující spontánní sestavování molekulových klastrů (angl. self-assembly), ať už se jedná o sestavování jednoduchých sloučenin v roztoku nebo složitější sestavování biomolekul např. DNA. Dalším příkladem metody „bottom-up“ je laserová fotochemická syntéza (viz kapitola 2.3.2), která je založena na agregaci jednotlivých atomů kovu, fotochemicky vyredukovaných z jeho prekurzoru. Metoda „top-down“, takzvaně shora dolů, využívá litografických i dalších technologií výroby a tento přístup se využívá například při výrobě mikroprocesorových komponentů. Velikost struktur se pohybuje od desítek nanometrů až po jednotky mikrometrů (Bhushan 2016).

Jak již bylo zmíněno, nanotechnologie se rozvíjí velmi rychle a z tohoto důvodu prochází vývojem i klasifikace vyrobených nanomateriálů. V roce 2007 vědci V. V. Pokropivny a V. V. Skorokhod (2007) publikovali odborný vědecký článek, ve kterém rozdělili nanomateriály z pohledu prostorového uspořádání do čtyř skupin. V první skupině hovoříme o 0D nanomateriálech, ty se vyznačují tím, že mají v nula dimenzích makroskopický rozměr. Příkladem jsou nanočástice palladia, které lze vidět na obrázku 1a, kvantové tečky či fulereny. Tyto materiály mají ve

všech třech rozměrech velikost v řádu nanometrů. Druhou kategorií jsou 1D útvary, do nichž jsou řazena nanovlákna, např. polyethylenglykolová (obrázek 1b) nebo stříbrné tyčinky (obrázek 1c). Další skupinou jsou 2D struktury, což jsou nejčastěji nanopovrchy, tenké filmy nebo planární útvary, jako je například grafen (obrázek 1d). Poslední třídou jsou 3D útvary, mezi které můžeme řadit polykrystaly, jejichž jednotlivé části jsou v řádu nanometrů, ale dohromady tvoří mikrometrové útvary např. WO_3 (obrázek 1e). Dalším příkladem může být ježovitá struktura ZnO (obrázek 1f) (Jeevanandam et al. 2018).



Obrázek 1 – Příklady nanomateriálů v prostorovém uspořádání 0D (obrázek a), 1D (b, c), 2D (d) a 3D (e, f). Převzato z (Jeevanandam et al. 2018) a upraveno.

2.2 Zlaté nanočástice

Zlato je známé již tisíce let a bylo předmětem jednoho z nejstarších témat vědy. Mohlo by se zdát, že v této oblasti jsou již všechna fakta a zajímavosti dokonale prozkoumané a popsané, ale není tomu tak. V posledních letech se zlato dostává do popředí vědeckého zájmu, a to především v souvislosti s rychlým rozvojem nanotechnologií, což dokazuje exponenciálně rostoucí počet vědeckých publikací. Přehled v následujících kapitolách bude omezen zejména na zlaté nanočástice (AuNPs), tedy 0D útvary a koloidní zlato, což je disperzní soustava, která je tvořena částicemi zlata o velikosti 1 nm až 100 nm rozptýlených v kapalném médiu nejčastěji ve vodě (Daniel a Astruc 2004).

2.2.1 Historie

Vznik nejstarších doposud objevených zlatých artefaktů se zařazuje do historického období přibližně 5. tisíc let před naším letopočtem. První zlaté výrobky byly nalezeny v oblasti dnešního Bulharska, přesněji v blízkosti jezera Varna, u kterého v dnešní době leží stejnojmenné město. Dalším důležitým důkazem toho, že člověk se zlatem pracuje již několik tisíc let, je nádherná zlatá maska kryjící mumii jedenáctého faraona osmnácté dynastie Nebcheperura Tutanchamona, která byla vyrobena v Egyptě okolo roku 1300 až 1200 před Kristem. Zabýváme-li se však historií nanočástic zlata, respektive zlatých koloidů, jinak nazývaných také jako „rozpuštné zlato“, musíme zavítat do doby okolo 5. až 4. století před naším letopočtem do oblasti Egypta a Číny.

Ve starověku byly zlaté koloidy používány jak z estetického hlediska, tak pro léčebné účely. Koloidní zlato bylo používáno k výrobě rubínového skla či barvení keramiky a některé z těchto metod přetrvaly až dodnes (Daniel a Astruc 2004). Nejznámějším příkladem historického artefaktu je Lykurgův pohár (obrázek 2), na kterém je vyobrazen thrácký král svádějící boj s Ambrosií, chůvou řeckého boha Dionýsa (Buxton 2004). Tento pohár vykazuje silný dichroismus, který se projevuje podle umístění zdroje světla. Jestliže je zdroj světla umístěn vně poháru, odražené paprsky zbarvují pohár do zelené barvy, jestliže je však pohár osvětlován z vnitřku, transmitované paprsky jeví pohár jako rubínově červený. Za tento fenomén jsou zodpovědné přítomné nanočástice zlata, stříbra a mědi v přibližném poměru 26:12:1, které jsou ve skle dispergovány (Freestone et al. 2007; Barber a Freestone 1990).



Obrázek 2 – Lykurgův pohár v odraženém světle (vlevo) a v transmitovaném světle (vpravo). Převzato z (Kaushik 2016).

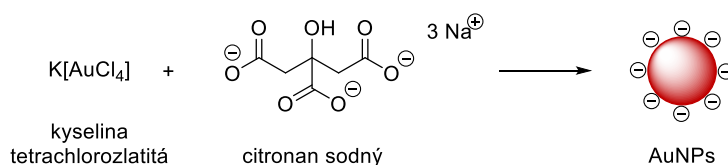
Lidé se rovněž domnívali, že zlato má blahodárné léčebné účinky na srdeční onemocnění, různé typy úplavice, epilepsii, že s ním lze detekovat syfilis či jiná venerická onemocnění. To vše je detailně popisováno v knize, kterou publikoval F. Antonii v roce 1618. Tato kniha je uznávána jako první kniha popisující koloidní zlato (Antonii 1618). Výše uvedené domněnky se však nezakládají na pravdě.

Následoval pozvolný rozvoj využití a zkoumání zlatých koloidů, o které se zasloužil například anglický fyzik a chemik M. Faraday. Tento známý vědec roku 1857 dokázal popsat přípravu koloidního roztoku zlata pomocí redukce vodného roztoku kyseliny tetrachlorozlatité za použití fosforu v sirouhlíku. Zabýval se také optickými vlastnostmi tenkých vrstev, které byly připravené z vysušených koloidních roztoků a popsal reverzibilní změny barvy těchto tenkých filmů při mechanickém stlačování (Faraday 1857). V roce 1861 byl zaveden termín „koloid“ vědcem T. Grahamem (1861), který podrobněji zkoumal vlastnosti a chování koloidních roztoků. Následující 20. století přineslo rozkvět v této vědní oblasti a vznikala řada významných objevů, například Turkevitchova metoda přípravy zlatých nanočástic a tento výzkum AuNPs se nezastavil dodnes (Turkevich et al. 1951).

2.2.2 Chemická příprava zlatých nanočástic

Nejčastěji používaným postupem pro přípravu zlatých nanočástic je již zmíněná metoda objevena roku 1951 J. Turkevitchem, která byla v roce 1973 zdokonalena G. Frensem (Turkevich et al. 1951; Frens 1973).

Tato metoda využívá redukci trojmocného zlatého kationtu, který je přítomný v kyselině tetrachlorozlatité, či v její soli, pomocí citronanu sodného ve vodě (obrázek 3). Vodný roztok kyseliny tetrachlorozlatité je nejprve zahřán na bod varu a za stálého míchání je k němu přidán předeřtý roztok citronanu sodného. Po definovaném čase, obvykle v řádu minut, je výsledný produkt ochlazen na pokojovou teplotu. Koncentrace citronanu má zásadní vliv na finální velikost AuNPs. Citronan sodný zastává v reakci dvě funkce, roli redukčního a zároveň stabilizačního činidla (Kimling et al. 2006).



Obrázek 3 – Schéma vzniku zlatých nanočástic redukcí citronanem.

Výše popsany postup lze modifikovat použitím kyseliny askorbové či askorbátu sodného místo citronanu a reakci provést při pokojové teplotě (Kimling et al. 2006). Další využívanou metodou pro přípravu AuNPs je Brust-Schiffrinova syntéza, která využívá dvoufázový systém toluen-voda (Brust et al. 1994). V poslední době se začínají prosazovat metody, jenž využívají k redukcí zlata laserové techniky, kterým bude věnována samostatná kapitola.

2.2.3 Vlastnosti zlatých nanočástic

Povrchové vlastnosti

Nanočástice o rozměrech od jednoho až do několika set nanometrů vykazují řadu vlastností kvantitativně i kvalitativně odlišných od makroskopických materiálů. Jedním ze základních důvodů odlišnosti je vzrůstající podíl povrchových atomů se zmenšujícími se rozměry objektu. Povrchové atomy mají nižší počet sousedů, to znamená, že vytvářejí menší počet vazeb než atomy v objemu materiálu. Tento jev má vliv na vazebné energie atomů, prostorové uspořádání či lišící se meziatomové vzdálenosti. Velikost částic ovlivňuje například hustotu nebo teploty fázových

přeměn materiálu (Řezníčková et al. 2014; Siegel et al. 2014). Jedním ze speciálních případů jsou nanočástice menší než 2 nm, které se často označují jako klastry. Jedná se o soubor až několika tisíc molekul. Příkladem lze uvést Schmidovy klastry $\text{Au}_{55}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_{12}\text{Cl}_6$. Tyto malé částice představují pomyslnou hranici mezi klasickým a kvantovým chováním nanočástic (Sapsford et al. 2013).

Optické vlastnosti

Již M. Faraday zaznamenal, že zlaté nanočástice mají specifické optické vlastnosti. Zlaté nanočástice absorbují a rozptylují světlo s dobrou účinností. Jejich silná interakce se světlem nastává z důvodu excitace elektronů na kovovém povrchu, které procházejí kolektivní oscilací, známou také jako povrchová plazmonová rezonance. Ta způsobuje, že nanočástice zlata vykazují vyšší intenzitu absorpce a rozptylu, než je tomu u podobně velkých nanočástic jiných kovů. Absorpce a rozptyl světla je závislý na velikosti, tvaru částic i indexu lomu prostředí v blízkosti povrchu částice.

U monodisperzních koloidních roztoků zlata lze pozorovat barevnou odlišnost podle velikosti AuNPs. Zlaté nanočástice s průměrem okolo 20 nm se jeví jako růžové či světle červené, zatímco větší nanočástice přibližně 100 a více nanometrů se jeví jako fialové. Tento jev je způsoben odlišnou absorpcí a rozptylem jednotlivých vlnových délek viditelného světla, které začínají na 390 nm u fialové barvy a končí vlnovou délkou 800 nm, jenž se jeví jako barva červená. Vlnové délky v oblasti rozhraní barev modré a zelené, což je okolo 500 nm, jsou absorbovány koloidními systémy různých velikostí, na rozdíl od barvy červené s vlnovou délkou, která začíná na 650 nm. V této vlnové oblasti malé nanočástice, cca 20 nm a menší, absorbují jen minimálně a většina těchto vlnových délek je odražena, či propuštěna a koloidní roztok se jeví jako červený. U větších AuNPs či agregovaných částic je tato vlnová oblast silně absorbována a koloidní roztok má fialovou barvu (Sapsford et al. 2013).

Katalytické vlastnosti

V 70. letech 20. století skupina vědců v čele s G. Parravanovem využívala aktivitu zlata při transferových reakcích kyslíku a vodíku, ale tyto studie se neprosadily do povědomí širší veřejnosti (Cha a Parravano 1970; Parravano 1970). Z tohoto důvodu bylo velikým překvapením, když se v roce 1987 publikovalo použití AuNPs spolu s Co_3O_4 , Fe_2O_3 a TiO_2 jako vysoce aktivního katalyzátoru k oxidaci

CO na CO₂. Mechanismus oxidace nebyl tehdy ještě dokonale popsán, avšak výsledky reakce nesporně potvrdily katalytickou aktivitu, která je podmíněna výrazným podílem povrchových atomů, což je splněno pouze u malých AuNPs (Haruta et al. 1987). Na makroskopických částicích zlata či větších AuNPs katalytická aktivita není pozorována.

V posledních letech se s rostoucím zájmem o katalyzátory na bázi zlata rozšířila i aplikační oblast. Zlaté katalyzátory už se využívají v oblastech chemie, ve vývoji palivových článků či v boji proti znečištění přírody. Kromě schopnosti snížení aktivační energie u chemických reakcí jsou u katalyzátorů další důležité aspekty: životnost, tepelná stabilita a schopnost regenerace. Schopnost degradovat zlatý katalyzátor mají většinou pouze sloučeniny síry a fosforu, což bude vysvětleno v následujícím textu (Veith et al. 2009; Hussain 2010).

Interakce zlata a síry

Kovalentní vazba mezi zlatem a sírou vede k silné interakci, která má mimořádný význam pro stabilizaci i využití AuNPs. Kovalentní interakce, zprostředkované obvykle pomocí organosírných sloučenin jako jsou alkylthioly, dialkyl sulfidy, dialkyl disulfidy a další, se používají ve velmi širokém spektru oborů: molekulární biologii, anorganické i organické chemii, povrchových či materiálových vědách aj. (Hakkinen 2012). Vazba mezi atomem síry a zlatem není vždy žádoucí. V některých případech je síra označována za katalytický jed, protože inhibuje katalytickou aktivitu AuNPs (Pensa et al. 2012).

V současné době je všeobecně uznáváno, že kovalentní interakce na rozhraní síry a zlata vyžaduje tvorbu vazby zlato-síra. Znamená to, že thiolová skupina (-SH skupina) je deprotonována, čímž se formálně vytvoří thiolový radikál. Síla vazby RS-Au byla stanovena experimenty na 40 až 50 kcal/mol, takže lze pomocí ní připojit na povrch AuNPs další funkční skupiny a tím zlaté nanočástice funkcionalizovat. Skupina SH může interagovat se zlatem pouze slabšími koordinačními vazbami prostřednictvím volných elektronů síry (Hakkinen 2012; Pensa et al. 2012).

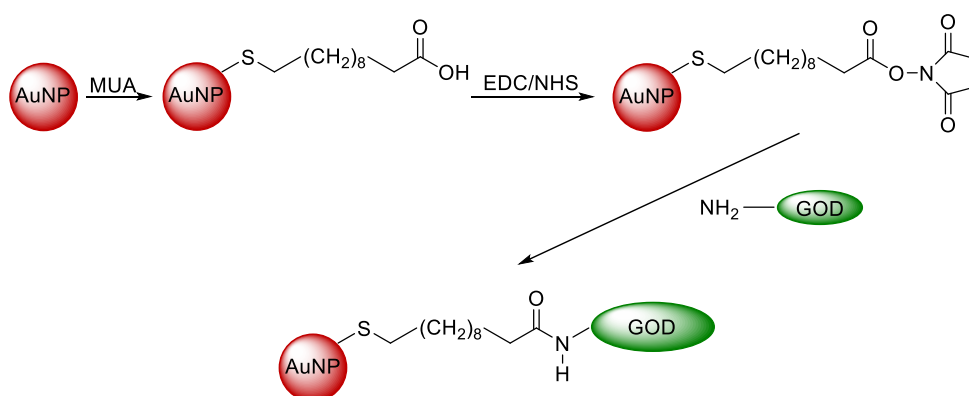
Alespoň stručný popis většiny vlastností zlatých nanočástic by vydal na samostatnou diplomovou práci, na což v tomto případě není cíleno. Pro zájemce, kteří se chtějí o zlatých nanočásticích dozvědět více informací, mohou doporučit

rozsáhlý přehled, kde se čtenář může dozvědět informace o vlastnostech AuNPs v kapitolách o fluorescenci, elektrochemii aj. (Daniel a Astruc 2004).

2.2.4 Funkcionalizace AuNPs

Rozmanitá funkcionizace AuNPs pomocí vazby mezi sírou a zlatem umožňuje mnoho různých aplikací především v oborech zahrnující biosenzory. Jedním takovým biosenzorem je i monovrstva glukózooxidázy (GOD) kovalentně imobilizována na povrchu zlaté nanočástice. Příprava tohoto biokonjugátu, která probíhá ve vodném prostředí, je schematicky znázorněna na obrázku 4.

Citronanem stabilizované AuNPs byly nejprve modifikovány kyselinou 11-merkaptoundekanovou (MUA). Kyselina obsahuje ve své struktuře síru, přes kterou byla kovalentně navázána na zlatou částici. V druhém kroku byly periferní karboxylové skupiny MUA aktivovány pomocí *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimidu (EDC) a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS). V posledním kroku proběhla reakce aktivovaného esteru s aminoskupinami na povrchu proteinu GOD a došlo ke kovalentnímu navázání GOD na AuNPs (Li et al. 2007).



Obrázek 4 – Schéma vzniku biokonjugátů GOD/AuNPs.

Imobilizovaný enzym glukózooxidáza na povrchu AuNPs si stále udržuje enzymatickou aktivitu a má vyšší termostabilitu ve srovnání s volným enzymem. V budoucnu by takto imobilizované enzymy mohly být široce využívány k výrobě chemických biosenzorů nejen v oblasti medicíny, ale také v potravinářském a environmentálním odvětví (Liang et al. 2000).

2.3 Příprava nanočástic pomocí laserových technik

Konvenční metody chemické syntézy nanočástic a koloidů jsou založeny na reakcích s prekurzory nebo na výměně ligandů, což nevyhnutelně vede ke kontaminaci připravených NPs jinými chemickými látkami. Kontaminace může mít za následek agregaci (Levy et al. 2004; Ojea-Jimenez a Puentes 2009) či deaktivaci katalytických vlastností nanočástic (Lopez-Sanchez et al. 2011). V biomedicínských i katalytických aplikacích vyžaduje chemická příprava stabilních a čistých nanočástic, myšleno bez povrchově aktivních látek, vždy další čistící postupy k odstranění zbytkových reakčních složek nebo nechtěných povrchově aktivních látek. Stále častěji je kladen důraz na nové způsoby přípravy NPs, díky kterým lze získat nemodifikované elektrostaticky stabilizované nanočástice, či takové, jež obsahují přesně stanovené povrchové látky, jejichž zásluhou jsou částice stabilizovány a zároveň modifikovány k dalšímu použití. Velký důraz je kladen také na škálovatelnost a reprodukovatelnost vzniku NPs.

Po několika desetiletích vývoje se laserová syntéza a zpracování koloidů jeví jako vhodná, reprodukovatelná a škálovatelná metoda pro přípravu nanomateriálů. Hlavním důvodem rychlého rozvoje laserových technik v posledních letech je neustále rostoucí výstupní výkon pulzních laserových systémů, které umožňují zvýšit produkci připravovaných nanomateriálů. Zároveň výrazně klesají investiční náklady na pořízení laseru. V současnosti je kladen důraz rovněž na vývoj udržitelných výrobních procesů, v tomto ohledu je velikou výhodou, že většina laserových technik je v souladu s 12 principy k přírodě šetrných chemických procesů (Zhang et al. 2017).

Těchto dvanáct principů bylo představeno v roce 1998 P. T. Anastasem a J. C. Warnerem (1998). Tyto principy jsou určujícím rámcem pro navrhování nových chemických produktů a procesů, vztahují se na všechny aspekty životního prostředí. Zkráceně tyto principy pojednávají o následujících ideách: 1) Je lepší zabránit vzniku nového odpadu, než řešit jeho následnou recyklaci. 2) Nové metody by měly být navrženy tak, aby maximalizovaly začlenění všech materiálů použitých v procesu do konečného produktu. 3) Metody syntézy by měly být navrženy tak, aby používaly a vytvářely látky, které představují malé nebo nulové nebezpečí pro lidské zdraví a životní prostředí. 4) Chemické produkty by měly být navrženy tak, aby zachovávaly účinnost funkce při současném snížení toxicity. 5) Pomocné chemikálie

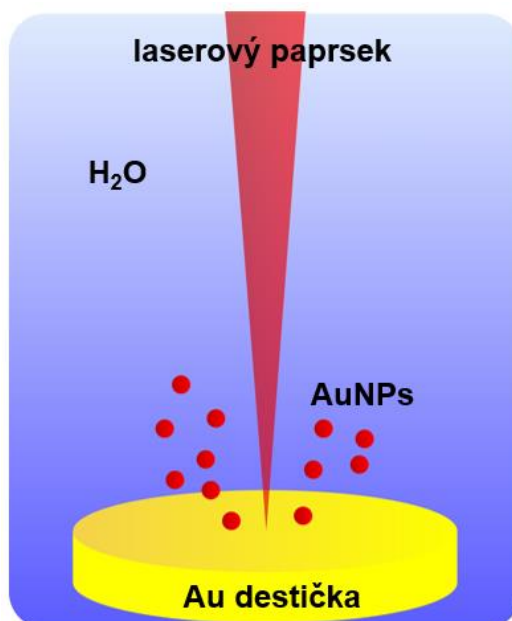
např. rozpouštědla, separační činidla apod., by měla být používána jen tehdy, je-li to nezbytně nutné. 6) Chemické procesy by měly být šetrné z hlediska jejich environmentálních a ekonomických dopadů. Pokud je to možné, veškeré postupy by se měly provádět při okolní teplotě a tlaku. 7) Chemikálie a vybavení by mělo být z obnovitelných zdrojů. 8) Měla by být minimalizována derivatizace, použití chránících skupin či dočasná úprava fyzikálních a chemických parametrů. 9) Katalytická činidla by měla být nadřazena stechiometrickým činidlům. 10) Chemické produkty by měly být navrženy tak, aby se na konci své životnosti rozpadly na neškodné produkty. 11) Analýza produktu by měla probíhat v reálném čase, aby se zabránilo vzniku nebezpečných látek. 12) Látky používané v chemickém procesu by měly být zvoleny tak, aby se minimalizovala možnost vzniku chemických havárií, výbuchů a požárů.

V následujícím textu jsou popisovány pouze laserové techniky, které při vzniku nanočástic využívají kapalně prostředí, ve kterém jsou vznikající NPs zachyceny a splňují tak výše vypsané principy. Při laserové syntéze v bezvodém prostředí hrozí výrazná zdravotní rizika pro pracovníky tím, že může docházet ke kontaminaci pracoviště nanočásticemi. Od prvních průkopnických článků P. P. Patila, jeho spoluautorů (1987) a A. Hengleina (1993) bylo prokázáno, že laserové techniky umožňují přesnou kontrolu velikosti syntetizovaných koloidních NPs v širokém rozmezí od několika mikrometrů (Zhang et al. 2015) až do 1 nm (Castro et al. 2016). V budoucnu je očekávaný vznik knihovny pro tvorbu různě velikých NPs z odlišných materiálů, ve které by byly popsány parametry přípravy: objem, chemikálie, teplota, tlak systému i nastavení laseru: vlnová délka, doba i energie pulzu, frekvence a počet laserových pulzů (Amendola a Meneghetti 2013). Laserovou syntézu NPs a zpracování koloidů lze rozdělit do čtyř metodik: laserová ablace v kapalinách (LAL), laserová fragmentace v kapalinách, tavení laserem v kapalinách a laserová fotochemická syntéza. Obecně se jedná o interdisciplinární procesy zahrnující chemii, fyziku a jejich subdisciplíny.

2.3.1 Laserová ablace v kapalinách

Laserová ablace v kapalině je metodou „top-down“, díky které lze připravit z makroskopického materiálu např. zlaté destičky zlaté nanočástice ve formě koloidu. Na rozdíl od laserového obrábění, ve kterém je cíleno na opracování

makroskopického produktu, je v tomto případě kýženým výsledkem vznik nanočástic, které jsou zachyceny v kapalném médiu (obrázek 5).

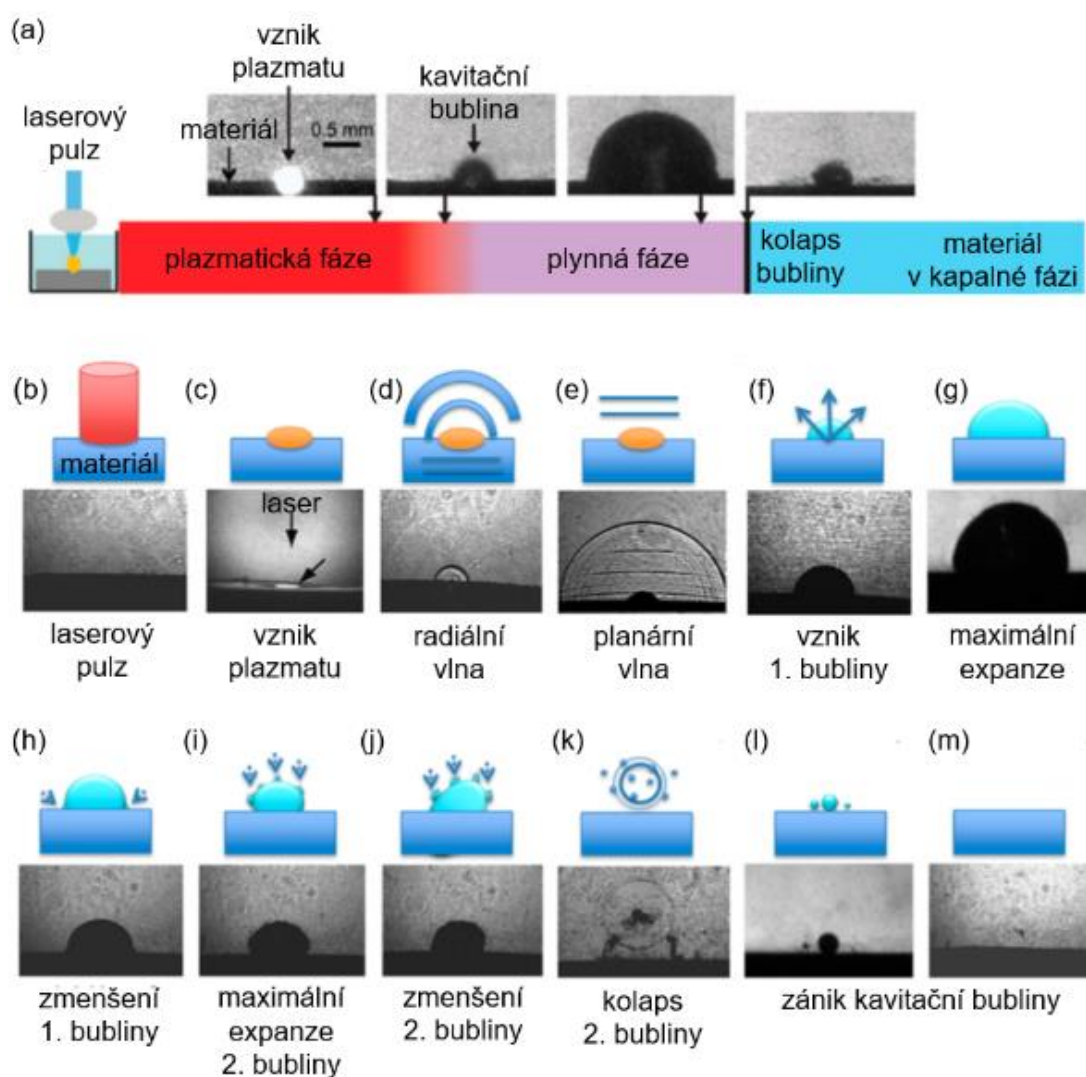


Obrázek 5 – Schéma laserové ablace v kapalině.

Vlnové délky laserového paprsku potřebné pro LAL se pohybují od ultrafialového (Yan et al. 2010) přes viditelné (Giusti et al. 2007) až po blízké infračervené záření (Vaccaro et al. 2014). Dalším požadavkem pro tuto metodu je výstupní výkon laseru $0,1-100 \text{ J/cm}^2$ a doba trvání pulzu v řádu femtosekund (Menendez-Manjon et al. 2010) až milisekund (Tian et al. 2013). Z tohoto pohledu lze tedy využít širší spektrum pulzních laserů.

V rámci procesu laserové ablace v kapalině probíhá řada velice složitých dějů. Tyto události lze rozdělit do tří základních fází (obrázek 6a): plazmatická fáze, plynná fáze neboli kavitace bublin a fáze, ve které jsou částice materiálu rozptýleny a reagují s molekulami kapaliny po kolapsu bubliny. Když laserový pulz interaguje s makroskopickým materiálem ponořeným do kapaliny (obrázek 6b), začne na povrchu materiálu vznikat plazma (obrázek 6c). Doba trvání plazmatu je obvykle v rozmezí desítek nanosekund (Kim et al. 2015) až mikrosekund (Lam et al. 2014) pro každý laserový pulz a závisí na druhu kapaliny a parametrech laseru. Během rozpadu plazmatu se energie přenáší na kapalinu, čímž se vytvoří vrstva páry, která má přibližně stejný objem jako plazma. S expanzí materiálu je generována první radiální rázová vlna (obrázek 6d), která je přibližně po $1 \mu\text{s}$ doprovázena druhou planární akustickou vlnou (obrázek 6e). Tato akustická vlna se obvykle šíří rychlostí

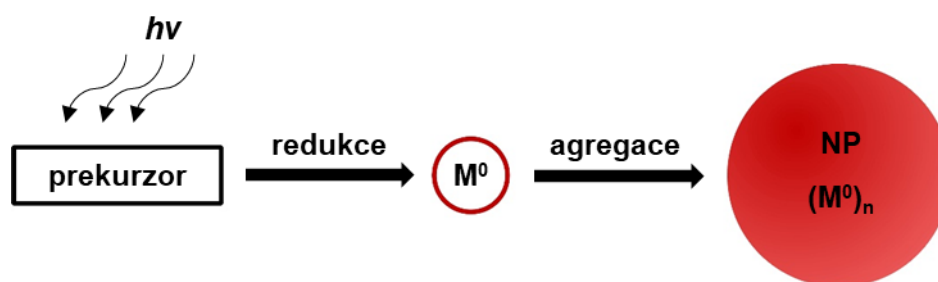
přibližně 1500 m/s ve vodě (Tanabe et al. 2015), 1200 m/s v acetonu (O'Malley et al. 2014) a prochází anizotropní expanzí ve směrech rovnoběžných a kolmých na cílový povrch. Následně vzniká kavitační bublina (obrázek 6f) tvořena párou v oblasti, která byla původně pokryta kapalnou látkou. V tomto místě dochází k ablací makroskopického materiálu a následné krystalizaci, která vede ke vzniku atomových klastrů (Shih et al. 2017). Kavitační bublina prochází vývojem expanze a zmenšením (obrázek 6g, h), což vyvolá další hemisférickou rázovou vlnu a vznik druhé kavitační bubliny. Druhá kavitační bublina není během celé její evoluce hemisferická ani symetrická (obrázek 6i, j), po jejím zmenšení dochází k definitivnímu kolapsu a zániku (obrázek 6k-m). S novým laserovým pulzem dochází k opakování celého popsaného procesu (Zhang et al. 2017).



Obrázek 6 –Schéma laserové ablace v kapalině. Převzato z (Zhang et al. 2017) a upraveno.

2.3.2 Laserová fotochemická syntéza

Laserová fotochemická syntéza je další metoda, kterou lze použít k přípravě NPs. Jedná se o tzv. „bottom-up“ metodu, která využívá agregaci jednotlivých atomů kovu (M^0) za vzniku nanočástic. Podstatou fotochemického přístupu je vyredukování atomů kovu z molekulárních nebo iontových prekurzorů, například solí či komplexů kovu, za použití laserového ozařování (obrázek 7). Velká všestrannost fotochemické syntézy umožňuje vyrobit NPs v různých médiích např.: emulzi, buněčném mediu, polymerních filmech atd. (Sakamoto et al. 2009).



Obrázek 7 – Schéma laserové fotochemické syntézy NPs.

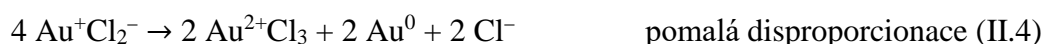
Již roku 1983 skupina vědců v čele s K. Kuriharou publikovala článek, ve kterém zkoumali přípravu zlatých koloidů pomocí laserové fotochemické syntézy. Jako prekurzor zlata sloužila kyselina tetrachlorozlatitá, jejíž vodný roztok byl ozařován laserem s následujícími parametry: vlnová délka 353 nm, frekvence 10 Hz, délka pulzu 5 ns a celkový výstupní výkon 60 mJ. Také byl navržen reakční mechanismus (I) redukce zlata za vzniku AuNPs. V prvním kroku je kyselina tetrachlorozlatitá excitována pomocí energie laserového pulzu (I.1). Po excitaci dochází k redukci zlatitého kationtu za vzniku dvojmocného zlata (I.2). Následně dochází k disociaci (I.3) a disproportionaci (I.4) kationtů zlata. V předposledním kroku dochází k fotoredukci jednomocného zlata (I.5) a následně nenabitě atomy zlata agregují a tvoří AuNPs (I.6) (Kurihara et al. 1983).





V roce 2005 S. Eustis se spoluautory publikovali článek, ve kterém se zabývali fotochemickou redukcí zlatitých kationtů s přidáním stanoveného množství ethylenglykolu (EG). K fotoredukci není v tomto případě používán laser, ale xenonová lampa s pásovým filtrem pro vlnové délky 250-400 nm. Mechanismus redukce je citlivý na koncentraci EG následkem jeho redukčních vlastností a viskózní povahy. Autoři předpokládají, že redukční vlastnosti EG jsou s velkou pravděpodobností využívány také u redukce dvoumocného a jednomocného kationtu zlata (Eustis et al. 2005).

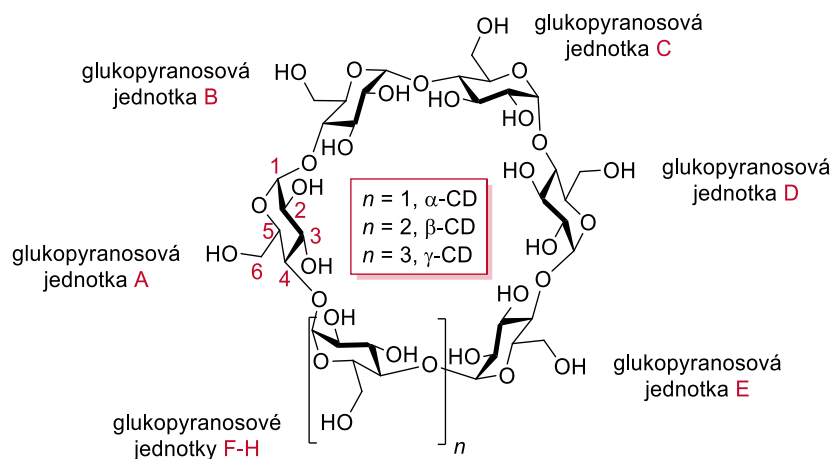
Z pozorovaných výsledků a dříve navrhovaných mechanismů autoři navrhli následující reakční mechanismus (II). Počáteční krok je stejný jako uvedli K. Kurihara a kolegové (1983) – zlatitý kationt přijme energii ve formě fotonu a dochází k jeho excitaci (II.1). Excitovaný stav je redukován na dvoumocný kationt zlata. Excitované stavy lze redukovat pomocí EG za pokojové teploty, jak je znázorněno v krocích (II.2, 6), na rozdíl od neexcitovaných stavů, který EG redukuje pouze za zvýšené teploty. Dvoumocný kationt zlata je nestabilní, a proto dochází k první disproportionaci (II.3), která vede k dalším dvěma dismutacím (II.4, 5). V předposledním kroku dochází k redukcí (II.6) fotoaktivovaných kationtů zlata pomocí EG a následné agregaci vyredukovaných atomů zlata za vzniku NPs (II.7) (Eustis et al. 2005).



2.4 Cyklodextriny

2.4.1 Struktura a vlastnosti

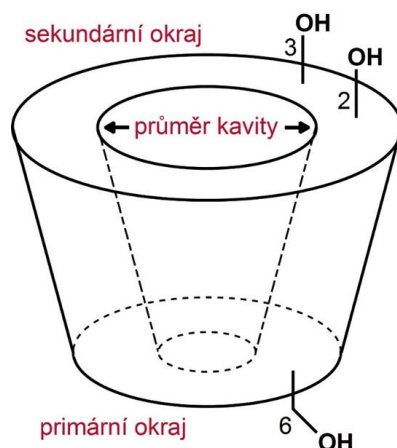
Cyklodextriny (CD) dříve nazývané též jako cykloamylosy nebo cyklomaltodextriny, jsou cyklické oligosacharidy složené z α -D-glukopyranosových jednotek v židličkové konformaci 4C_1 dohromady propojených pomocí $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby. Na základě počtu spojených glukopyranosových jednotek v cyklu dělíme CD na tři nejčastěji používané typy (obrázek 8): α -CD (6 jednotek), β -CD (7 jednotek) a γ -CD (8 jednotek). Mimo těchto tří převládajících typů byly připraveny CD i s jinými počty jednotek, například s pěti, devíti a deseti glukopyranosovými jednotkami, tyto oligosacharidy jsou označovány po řadě jako pre- α -, δ - a ε -CD.



Obrázek 8 – Struktura cyklodextrinů (Řezanka 2016).

Cyklodextriny mají tvar dutého komolého kužele (obrázek 9). Sekundární okraj je širší a nacházejí se na něm sekundární hydroxylové skupiny (-OH skupiny), které jsou kovalentně vázané na atomech uhlíku v poloze 2 a 3 na glukopyranosové jednotce. Na primárním okraji, který je užší, se nacházejí primární -OH skupiny navázané na uhlíku v poloze 6. Do dutiny, jinak nazývané kavita, jsou orientovány C-H vazby a atomy kyslíku glykosidických vazeb. Díky těmto nepolárním vazbám má kavita lipofilní charakter. Hydroxylové skupiny jsou nasměrovány ven z CD, což zapříčiňuje rozpustnost CD ve vodě i dalších polárních rozpouštědlech. Z tabulky 1 je patrné, že rozpustnost β -CD ve vodě je řádově nižší než u zbylých dvou uvedených typů CD. To je pravděpodobně dané vznikem vodíkových vazeb – ty v případě β -CD tvoří celý pás, který napomáhá rigiditě celé struktury na rozdíl od α -,

γ -CD. Tvorba vodíkové vazby nastává prostřednictvím OH skupiny na C-2 jedné glukopyranosové jednotky s OH skupinou na C-3 sousední glukopyranosové jednotky (Szejtli 1998).



Obrázek 9 – Tvar cyklodextrinu.

Cyklodextriny jsou za standardních podmínek bílé krystalické látky a základní tři typy uvedené v tabulce 1 jsou běžně komerčně dostupné. Cyklodextriny jsou považovány za nejedovaté. LD₅₀ při perorálním podání u myši, krys a psů nabývá po řadě hodnot 12,5, 18,8 a 5 g na jeden kg tělesné váhy (Irie a Uekama 1997). Výhodou CD je jejich biodegradabilita. Nehrozí tedy riziko hromadění a tím způsobení znečištění životního prostředí. Toxikologické studie, které se zabývaly nezávadností derivátů cyklodextrinů (viz kapitola 2.4.4) ukázaly, že některé deriváty, například methylované, mohou zapříčinit podráždění očí a alkylované deriváty mají nežádoucí toxické účinky na biologické membrány a ledviny (Stella a He 2008).

Tabulka 1: Rozměry a základní vlastnosti α -, β - a γ -CD (Jambhekar a Breen 2016; Szejtli 1998).

	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukosových jednotek	6	7	8
Molární hmotnost [g.mol ⁻¹]	973	1135	1297
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/100 ml]	14,5	1,85	23,2
Průměr kavity (primární/sekundární okraj) [nm]	0,47/0,52	0,60/0,64	0,75/0,83
Výška kavity [nm]	0,79	0,79	0,79
Přibližný objem kavit v 1 g CD [ml]	0,10	0,14	0,20
Krystalová voda [hmotnostní %]	10,2	13,2-14,5	8,1-17,7

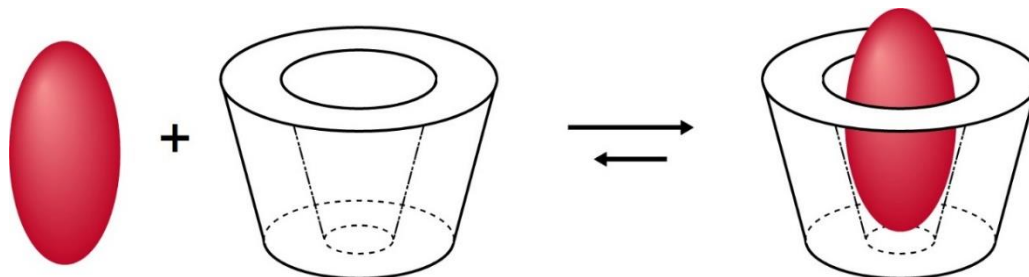
2.4.2 Výroba

Cyklodextriny se nejčastěji získávají pomocí enzymatické degradace škrobu. V prvním kroku při výrobě CD je rozpuštěn škrob za zvýšené teploty, tím dojde ke snížení viskozity roztoku a zároveň hydrolyze škrobu. Hydrolyzovaný škrob by neměl obsahovat glukózu nebo nízkomolekulární oligosacharidy, a to z důvodu snížení výtěžku vytvořených CD. Po ochlazení se k roztoku škrobu přidá enzym cyklomaltodextrin glukanotransferáza (EC 2.4.1.19) (Qi a Zimmermann 2005), který je produkován řadou mikroorganismů: *Bacillus macerans*, *B. stearothermophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Micrococcus leuteus* a další (Tonkova 1998). Tento enzym štěpí $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby ve škrobu. Výsledkem enzymatické degradace je směs různých CD, ve které z termodynamické příčiny převládá β -CD. Vzniklé cyklodextriny je následně nutné separovat ze směsi. Pro zlepšení selektivnosti lze do reakce přidat komplexační činidlo: pro separaci α -CD je používán dekan-1-ol, je-li cíleno na β -CD toluen a pro oddělení γ -CD se osvědčil cyklohexadekanol. Čistota průmyslově vyráběných cyklodextrinů je 97 % a více (Szejtli 1998).

2.4.3 Tvorba inkluzních komplexů

Hlavní výhodou cyklodextrinů je jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy (hostitel-host z anglického host-guest) se širokým spektrem látek různého skupenství. Hosté musí mít vhodnou velikost a vlastnosti, které jim umožňují obsadit lipofilní dutinu cyklodextrinu, nebo alespoň interagovat s jejími vnějšími okraji. Při tvorbě komplexu (obrázek 10) dochází pouze k nevazebným interakcím, proces vzniku je reverzibilní a má dynamický charakter, kdy dochází k nepřetržitému vzniku a zániku nekovalentních vazeb mezi hostitelem a hostem. Síla nevazebné interakce závisí na sterické shodě mezi hostem a vnitřkem dutiny, interakcích mezi atomy CD a hosta. Dlouhou dobu se předpokládalo, že ve vodných roztocích je nepolární dutina CD naplněna polárními molekulami vody, pro které je tato poloha energeticky nevýhodná. Vstup nepolárního hosta vhodné velikosti a tvaru do dutiny CD by pak snížil celkovou energii systému (Szejtli 1998). L. Liu a Q.-X. Guo (2002) však uvádějí, že hnací silou komplexačního procesu nejsou pouze hydrofobní interakce, jak bylo předpokládáno, ale také Van der Waalsovi i elektrostatické interakce, indukční a disperzní síly a také vodíková vazba.

Příkladem vhodných hostů pro komplexaci v cyklodextrinové kavitě je široké spektrum organických látek lipofilního charakteru například: lineární či větvené uhlovodíkové řetězce, aldehydy, ketony a další. Stechiometrie komplexů hostitel-host nabývá nejčastěji poměru 1:1. Byl však pozorován vznik komplexů i v poměru 1:2, 2:1 či jiných (Rekharsky a Inoue 1998). Na principu inkluzních komplexů mohou vznikat velmi komplikované supramolekulární útvary jako katenany, rotaxany, polyrotaxany a pseudorotaxany (Harada et al. 2009).



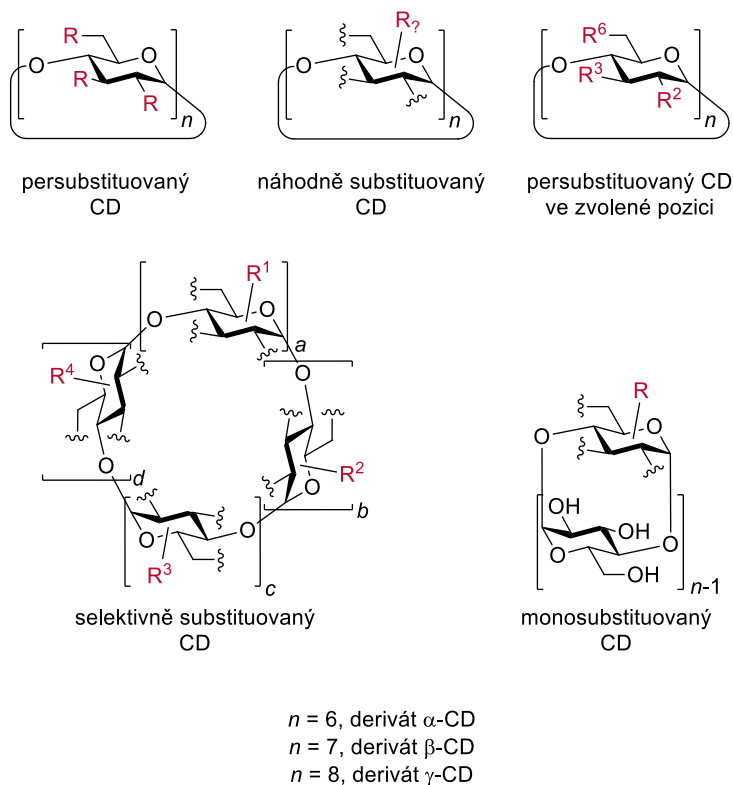
Obrázek 10 – Vznik inkluzního komplexu host-hostitel v poměru 1:1.

2.4.4 Deriváty

K modifikaci cyklodextrinů je přistupováno z několika důvodů. Lze takto měnit rozpustnost, komplexační vlastnosti či správně modifikovanou skupinou CD ukotvit na jiném materiálu atd. Základní tři typy CD obsahují velký počet hydroxylových skupin 18 (α -CD), 21 (β -CD) a 24 (γ -CD), které lze libovolně modifikovat a získávat tak nepřeberné množství derivátů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Do současné doby bylo připraveno tisíce derivátů CD, z nichž většina však zatím nenašla své praktické uplatnění, a to především z důvodu složitých několikakrokových syntéz, které s sebou nesou nízké výtěžky a vysoké výrobní náklady. Každý nově připravený derivát pro biologické použití musí projít toxikologickou studií, aby byla potvrzena jeho zdravotní nezávadnost. Od průmyslově vyráběných a prodávaných derivátů CD se očekává nekomplikovaná výroba, v ideálním případě jedнокrokovou syntézou, což by se mělo příznivě projevit na ceně derivátů. Dalším kritériem je zachování komplexačních vlastností a výrazné zvýhodnění využití derivátů ke specifickým aplikacím oproti běžným cyklodextrinům.

Připravené deriváty mohou být klasifikovány podle jejich polarit, velikosti nebo počtu a polohy substituentů (obrázek 11) apod. Pro monosubstituovaný derivát je možný vznik tří odlišných izomerů, přičemž záleží, zdali bude modifikována

OH skupina na uhlíku v pozici 2, 3 nebo 6. Pro disubstituované deriváty existuje možnost vzniku desítek izomerů a pro trisubstituované deriváty toto číslo dále narůstá. Pokud při reakci vznikají různé izomery, jsou po připravení často separovány, přičemž tento proces je většinou velice náročný a drahý. Z tohoto pohledu se jeví jako vhodné především persubstituované deriváty, u kterých jsou nahrazeny všechny OH skupiny jinou chemickou skupinou a odpadá tak problém se vznikem izomerů (Szejtli 1998; Řezanka 2018).



Obrázek 11 – Jednotlivé typy derivátů CD podle navázaných substituentů (Řezanka 2018).

3 Experimentální část

Použité chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od běžných komerčních dodavatelů Sigma-Aldrich, s.r.o., Ing. Petr Švec – Penta, s.r.o. a Lach-Ner, s.r.o. Léčivo propamidin 2-hydroxyethansulfonát bylo poskytnuto doc. RNDr. Ing. Pavlem Řezankou, Ph.D. z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

Průběh reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC), ke které sloužila hliníková destička s naneseným silikagelem 60 F254 (Merck, Německo). Vzorek byl na TLC nanášen skleněnou kapilárou a jako mobilní fáze byl použit roztok *n*-PrOH:H₂O:EtOAc:NH₃ v poměru 6:3:1:1. Po vyvinutí TLC v mobilní fázi byla destička smočena v 50% kyselině sírové a karbonizována horkovzdušnou pistolí. Při filtracích byla použita fritta S4 s velikostí pórů 5-15 μm a membránová vývěva.

K měření hmotnostních spekter byl použit hmotnostní spektrometr AB Sciex 3200 QTRAP a kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000, přičemž bylo 5 μl vzorku manuálně nastříkáváno dávkovací smyčkou do proudu mobilní fáze. Tento roztok byl složen z 0,1% kyseliny mravenčí v 90% methanolu ve vodě. Průtok mobilní fáze činil 0,2 ml/min. Byl použit ESI iontový zdroj v pozitivním režimu se sprejovacím napětím +5500 V a teplota iontového zdroje byla nastavena na 300 °C. Spektra byla měřena v rozmezí *m/z* 500–1500 Da.

Při ozařování vzorků byl použit pulzní Nd:YAG laser Evergreen od firmy Quantel, přičemž parametry laseru byly následující: vlnová délka 532 nm, doba pulzu 10 ns, frekvence 20 Hz a výstupní energie 40 mJ. Výstupní energie byla měřena pomocí přístroje VEGA od výrobce Ophir. Optické čočky, zrcadla a další optické vybavení bylo vyrobeno firmou Thorlabs a Standa.

3.1 Příprava 6^A-*O*-tosyl-β-CD

Syntéza 6^A-*O*-tosyl-β-CD byla provedena dle dříve uvedeného postupu (Zhong et al. 1998). Jako první byly β-CD (11,3 g, 10 mmol) a Ts₂O (5,0 g, 15 mmol) suspendovány v 250 ml destilované H₂O a tato suspenze byla míchána při r.t. 2 hodiny. Následně byl do suspenze přidán roztok NaOH (50 ml) o koncentraci 2,5 mol/dm³ a reakční směs byla dalších 10 minut míchána. Dále byla tato směs filtrována a filtrát neutralizován pomocí 35% HCl na pH 8. Bílá sraženina byla

odfiltrována a sušena na RVO. Surový produkt (3,5 g) byl charakterizován pomocí TLC a bylo přistoupeno k jeho čištění. První rekrystalizace produktu proběhla v roztoku MeOH (15 ml) a H₂O (15 ml). Po zahřátí na bod varu a vychladnutí na r.t. byla sraženina odfiltrována a sušena na RVO. Rekrystalizace proběhla ještě dvakrát, vždy obdobným postupem jako v prvním případě. Množství roztoku bylo voleno v poměru 10 ml 50% MeOH na 1 g produktu. Po třetí rekrystalizaci a usušení na RVO byl získán výsledný bílý krystalický produkt (1,4 g, výtěžek 11 %).

3.2 Příprava 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD

Příprava 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD byla provedena postupem uvedeným v literatuře (Martinelli et al. 2014). Do baňky byl odvážen výchozí 6^A-*O*-tosyl-β-CD (761 mg, 0,6 mmol) a rozpuštěn v DMF (27,4 ml). Následně byla přidána thiomočovina (449 mg, 5,9 mmol) a reakční směs byla míchána 2 dny při teplotě 75 °C. Po vychladnutí na r.t. byla tato směs nalita do 125 ml DEE a míchána po dobu 10 minut. Sraženina byla odsáta na fritě a propláchnuta vychlazeným DEE, následně byla sraženina suspendována do 40 ml acetonu a refluxována 2 hodiny při teplotě 75 °C. Potom byla suspenze ochlazená na r.t., sraženina zfiltrována a usušena na RVO. Dále byl bílý prášek přidán do roztoku Na₂S₂O₅ (30 mg, 0,16 mmol) v 25 ml NaOH s koncentrací 1 mol/dm³ a reakční směs byla míchána 30 minut za r.t. Roztok byl okyselen pomocí 35% HCl na pH 3 a následně bylo přidáno 1,4 ml trichlorethylenu. Reakční směs byla sonifikována po dobu 10 minut za r.t., zfiltrována na fritě a propláchnuta trichlorethylenem. Následovalo sušení na RVO a surový produkt (352 mg) byl charakterizován dle TLC. Produkt byl čištěn pomocí rekrystalizace v 3 ml H₂O a propláchnut na fritě vychlazeným acetonem. Filtrát byl odpařen na RVO a výsledným produktem se stal bílý krystalický prášek (204 mg, výtěžek 30 %). Spektrální data byla shodná s publikovanými (Nelles et al. 1996).

3.3 Příklad přípravy zlatých nanočástic v dimethylformamidu

Nejprve byl připraven zásobní roztok 3 mg KAUCl₄ v 1 ml DMF. Do vialky bylo odváženo 5,8 mg per-6-sulfanyl-per-6-deoxy-β-CD, který byl rozpuštěn v 2,9 ml DMF. Následně bylo do vialky přidáno 0,1 ml zásobního roztoku zlatité sole. Poté byl vzorek MH89 za stálého míchání ozařován laserem po dobu 10 minut.

Charakterizace proběhla pomocí dynamického rozptylu světla (DLS), rastrovací a transmisní elektronové mikroskopie.

3.4 Příklad přípravy zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD ve vodě

Jako první byl připraven zásobní roztok 3 mg KAuCl₄ v 1 ml H₂O. Následně bylo do vialky naváženo 0,45 mg 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD a rozpuštěno v 2,9 ml H₂O. Dále bylo přidáno do vialky 0,1 ml zásobního roztoku. Vzorek MH101 byl ozařován laserem za stálého míchání po dobu 20 minut. Během této doby došlo k barevné změně z jemně nažloutlé po světle červenou. Vzorek byl centrifugován (15 min., 25 000 ot./min.), promyt v 3 ml H₂O a rozdispergován pomocí ultrazvuku. Velikost částic a jejich stabilita byla charakterizována pomocí dynamického rozptylu světla, rastrovací a transmisní elektronovou mikroskopií.

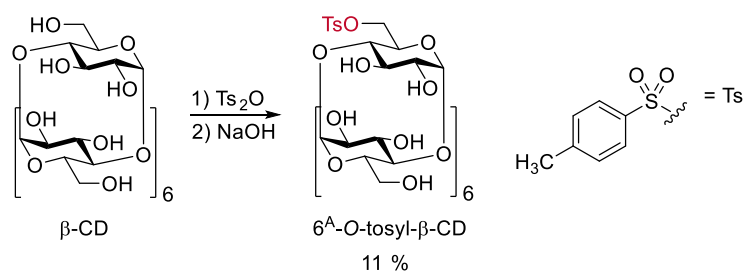
3.5 Testování odezvy zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD na biologicky aktivní látku

Byly připraveny čtyři roztoky léčiva propamidinu 2-hydroxyethansulfonátu ve vodě o koncentraci 0,2 mmol/dm³, 0,02 mmol/dm³, 2 μmol/dm³ a 0,2 μmol/dm³. Z těchto roztoků bylo odebráno vždy 25 μl a přidáno k 250 μl koloidního roztoku zlatých nanočástic. Každý vzorek byl homogenizován protřepáním a ponechán 24 hodin při laboratorní teplotě.

4 Výsledky a diskuze

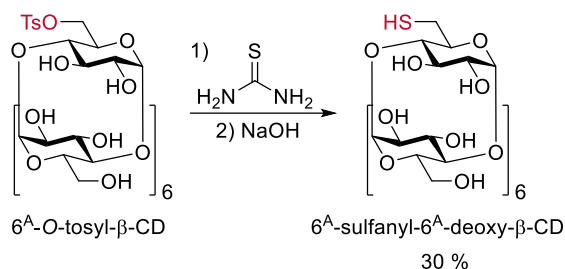
4.1 Syntéza monosubstituovaného β -CD

Příprava 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy- β -CD byla provedena dvoukrokovou syntézou. V prvním kroku byl z výchozího β -CD syntetizován 6^A-*O*-tosyl- β -CD (obrázek 12), protože je tato reakce vysoce selektivní. Tosylová skupina je v této reakci kovalentně vázaná přes kyslík výhradně na uhlík v pozici 6 glukopyranosové jednotky. Přestože bylo postupováno dle popsané přípravy v článku (Zhong et al. 1998), výsledný produkt nebyl čistý a obsahoval i výchozí β -CD a disubstituovaný derivát, což bylo možné určit z TLC. Skutečnost, že tento postup nevede k čistému produktu, ale ke směsi výchozího β -CD, finálního 6^A-*O*-tosyl- β -CD i více substituovaných derivátů, byla potvrzena v literatuře (Popr et al. 2014). V tomto vědeckém článku byla také navržena metoda separace výsledného 6^A-*O*-tosyl- β -CD pomocí rekrystalizace. Separace produktu proběhla výše zmíněným procesem v roztoku MeOH a H₂O v poměru 1:1, který proběhl celkem třikrát, aby byla zajištěna čistota výsledného produktu. Výtěžek reakce 11 % se odchyľuje od výtěžku 61 % uvedeného v literatuře (Zhong et al. 1998). Uváděný výtěžek z tohoto článku však nelze považovat za objektivní, protože výsledný produkt nebyl čistý. Důvěryhodná data z článku (Popr et al. 2014) uvádějí, že výtěžek čistého 6^A-*O*-tosyl- β -CD po třech rekrystalizacích je 26 %. Odchyľka výtěžku 11 % od uvedeného 26 % v tomto článku může být způsobena několika faktory. Při neutralizaci filtrátu na pH 8 pomocí 35% HCl byla tato hodnota překročena až na pH 5, proto byl přidán NaCO₃ na korekci a dosažení výsledného pH 8. Nepřesná neutralizace mohla vést k nedokonalému vysrážení výsledného produktu z roztoku. Další ztráta byla zapříčiněna čištěním, kdy při každé rekrystalizaci byl produkt vždy propláchnut, což s sebou neslo ztrátu výsledného produktu.



Obrázek 12 – Schéma přípravy 6^A-*O*-tosyl- β -CD.

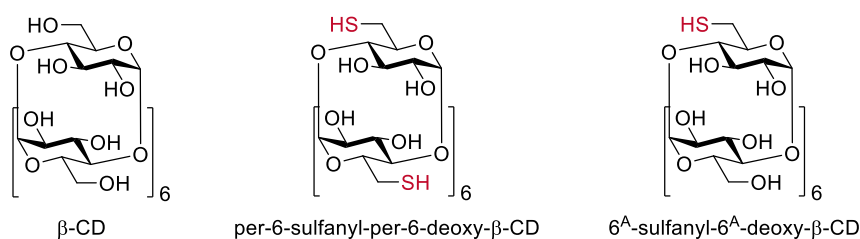
V druhém kroku vstupoval do reakce jako reaktant připravený 6^A-*O*-tosyl-β-CD, tosylová skupina byla při reakci substituována thiolovou skupinou za vzniku 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD (obrázek 13). Syntéza byla inspirována článkem (Martinelli et al. 2014). Výsledný produkt byl charakterizován pomocí TLC a vyžadoval další čištění, tudíž bylo přistoupeno k rekrystalizaci v H₂O. První rekrystalizace neproběhla dle očekávání a produkt se vůbec nevysrážel, důvodem byl zřejmě velký objem H₂O (6 ml). Roztok byl odpařen na RVO a následovala druhá rekrystalizace v objemu 3 ml H₂O a propláchnutí vychlazeným acetonem. Po odpaření filtrátu byl získán finální 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD (204 mg, výtěžek 30 %), který byl spektrálně charakterizován. V literatuře (Martinelli et al. 2014) se udává výtěžek reakce 94 %, spektrální data však nejsou uvedena. V článku je pouze odkázáno na shodnost výsledků s literaturou (Nelles et al. 1996). Z tohoto důvodu lze předpokládat, že finální produkt nebyl čistý. V článku (Nelles et al. 1996) je uveden výtěžek výsledného produktu 27 %, který lze pokládat za pravdivý, a s tímto článkem se shodovala pořízená spektrální data.



Obrázek 13 – Schéma přípravy 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD.

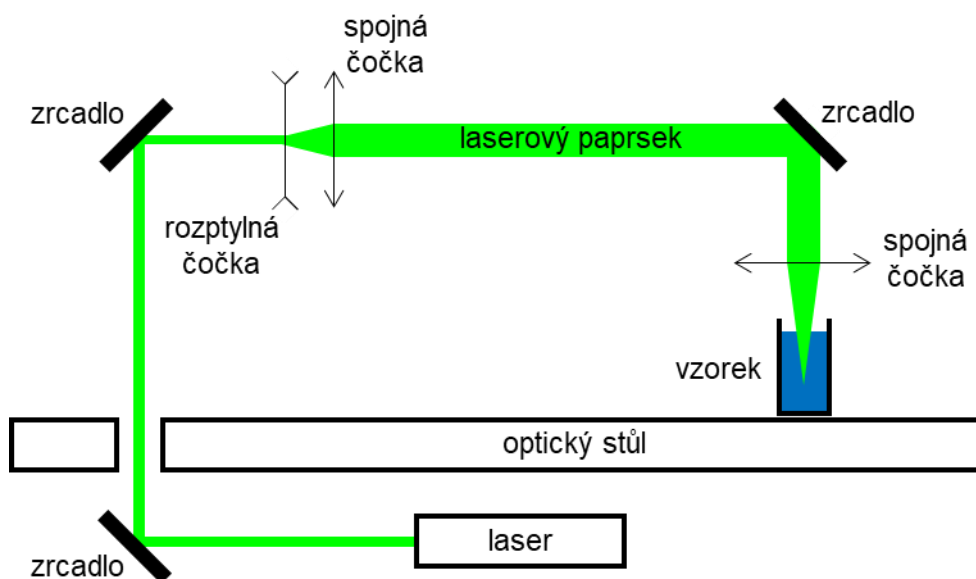
4.2 Příprava zlatých nanočástic a in situ funkcionalizace

Příprava zlatých nanočástic za použití pulzního laseru a jejich in situ funkcionalizace vyžadovala otestování několika vzorků s řadou proměnných. Při pilotní studii (tabulka 2) byly použity dva typy zlatého prekurzoru, přičemž byl měněn použitý rozpouštědlový systém a k funkcionalizaci byl použit β -CD a jeho dva deriváty (obrázek 14). Byly měněny koncentrace reaktantů, doba laserového ozařování, avšak objem vzorků zůstal ve všech případech stejný (3 ml).



Obrázek 14 – Činidla použité k funkcionalizaci.

Při ozařování všech připravených vzorků bylo použito vždy stejné nastavení Nd:YAG laseru (vlnová délka 532 nm, doba pulzu 10 ns, frekvence 20 Hz a výstupní energie 40 mJ) i optická cesta laserového paprsku zůstala beze změn. Laser byl umístěn pod optickým stolem, laserový paprsek byl pomocí zrcadel a optických čoček fokusován do vialky se vzorkem (obrázek 15). Všechny vzorky se během ozařování nepřetržitě míchaly pomocí magnetického míchadla.



Obrázek 15 – Schéma fokusace laserového paprsku.

Tabulka 2: Testované vzorky pro přípravu in situ funkcionalizovaných AuNPs.

označení	prekurzor	hmotnost [mg]	rozpouštědlový systém	funkcionalizace *	hmotnost [mg]	čas [min]
MH69	AuCl ₃	30	H ₂ O	β-CD	45	40
MH70	KAuCl ₄	30	H ₂ O	β-CD	45	40
MH75	KAuCl ₄	3	H ₂ O	-	-	20
MH76	KAuCl ₄	3	H ₂ O	β-CD	4,5	20
MH77	KAuCl ₄	3	H ₂ O + NaOH	β-CD-perSH	4,5	20
MH78	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O	β-CD	4,5	20
MH79	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O	β-CD	0,45	20
MH84	KAuCl ₄	3	H ₂ O + NaOH	β-CD-perSH	4,5	20
MH85	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O + NaOH	β-CD-perSH	4,5	20
MH86	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O + NaOH	β-CD-perSH	0,45	20
MH89	KAuCl ₄	0,3	DMF	β-CD-perSH	5,8	10
MH90	KAuCl ₄	0,3	DMF	β-CD-perSH	0,58	10
MH95	KAuCl ₄	0,3	DMSO	β-CD-perSH	5,8	30
MH96	KAuCl ₄	0,3	DMSO	β-CD-perSH	0,58	10
MH100	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O	β-CD-SH	4,5	10
MH101	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O	β-CD-SH	0,45	20
MH109	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O	β-CD-SH	0,045	10
MH110	KAuCl ₄	0,3	H ₂ O	β-CD-SH	0,0045	10

* β-CD-perSH: per-6-sulfanyl-per-6-per-deoxy-β-CD

β-CD-SH: 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD

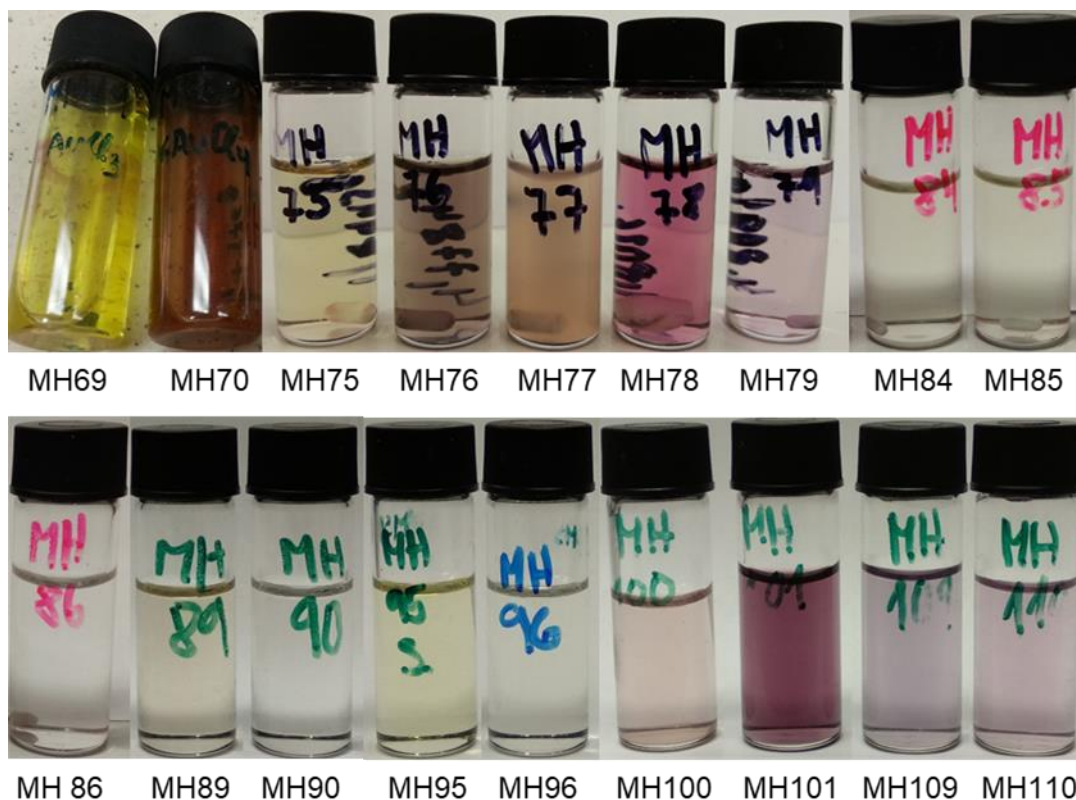
V prvních dvou pilotních vzorcích MH69 a MH70 byl hledán vhodný prekurzor zlata, ze kterého lze pomocí pulzního laseru zlato vyredukovat. Dále byl do těchto vzorků přidán β-CD. Tento krok byl inspirován článkem (Kabashin et al. 2003), kde jsou cyklodextriny využity jako stabilizační činidlo vznikajících nanočástic. Vysoké koncentrace obou zlatitých solí AuCl₃ i KAuCl₄ v roztoku s β-CD se ozařovaly po dobu 40 minut, barevná změna však nastala pouze u roztoku KAuCl₄ (obrázek 16 MH70), a z tohoto důvodu se používal v dalších vzorcích jako prekurzor pouze KAuCl₄. Předpoklad, že β-CD neslouží při laserové fotochemické syntéze pouze jako stabilizační činidlo, ale také jako redukční činidlo, byl potvrzen porovnáním vzorků MH75 a MH76 (obrázek 16). Zatímco první vzorek (bez CD)

během ozařování vůbec nereagoval, u druhého vzorku (s CD) došlo ke změně barvy ze světle žluté na světle hnědou.

Po ověření, že lze AuNPs s dostupným vybavením fotochemicky připravit, bylo cíleno na funkcionizaci částic. Motivací se stala in situ funkcionizace nanočástic, tedy jednokroková příprava, během které dojde ke vzniku a zároveň modifikaci povrchu nanočástic. Z tohoto pohledu se zdály vhodné k funkcionizaci částic především deriváty β -CD, které obsahují SH skupiny, díky kterým lze CD přes atom síry kovalentně navázat na povrch AuNPs. Jako první byl použit per-6-sulfanyl-per-6-deoxy- β -CD, který syntetizoval Bc. Jaroslav Grof v rámci jeho bakalářské práce (Grof 2018). Potvrdily se však obavy ohledně malé rozpustnosti persubstituovaného derivátu ve vodě. Proto došlo ke změně rozpouštědlového systému, u vzorku MH77 byl použit roztok NaOH s koncentrací $6,6 \text{ mol/dm}^3$ a u vzorků MH84-86 roztok NaOH o koncentraci $24,4 \text{ mol/dm}^3$. V zásaditém prostředí nedošlo ke vzniku nanočástic, proto byla použita jiná rozpouštědla DMF a DMSO. Přestože u vzorku MH89 nedošlo během ozařování k výrazné změně barvy z DLS, bylo usouzeno, že vzorek obsahuje nanočástice.

Po nezdaru s per-6-sulfanyl-per-6-deoxy- β -CD bylo přistoupeno k testování vzorků s 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy- β -CD. Ten na rozdíl od prvně uvedeného derivátu obsahuje pouze jednu SH skupinu, která sníží rozpustnost ve vodě jen nepatrně. Tento derivát se jevil jako vhodné funkcionizační činidlo a vzorek MH101 byl příslibem dobrého výsledku již během ozařování, kdy byla pozorována barevná změna ze světle žluté na červenou barvu.

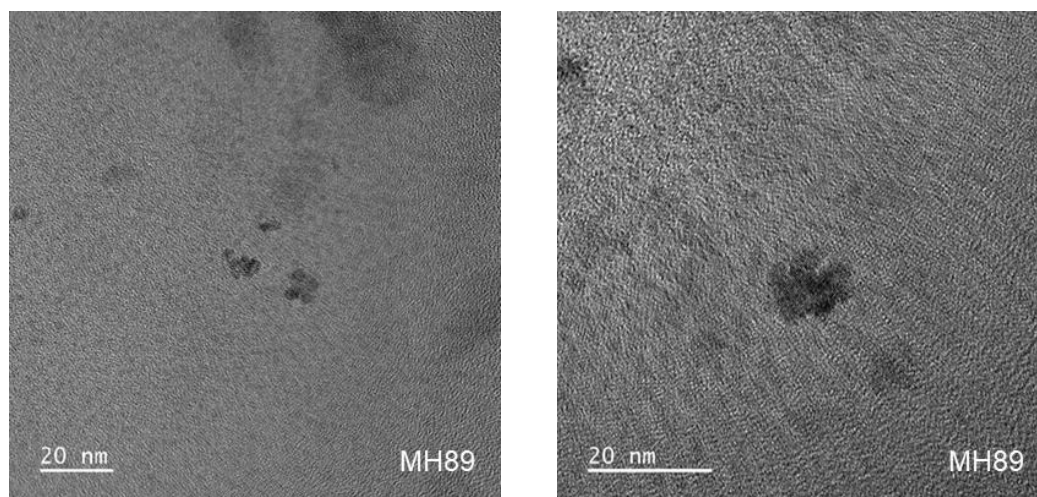
Všechny ozařované vzorky kromě vzorků MH69, 70, 75, 84-86 byly podrobeny DLS a vzorky s nejlepšími výsledky následně charakterizovány pomocí SEM i TEM.



Obrázek 16 – Vzorky po ozáření pulzním laserem.

4.3 Charakterizace zlatých nanočástic v dimethylformamidu

Z DLS byl detekován vznik nanočástic, ačkoli vzorek MH89 nevykazoval viditelnější barevnou změnu. Následně došlo k charakterizaci pomocí SEM, bohužel nebylo možné nanočástice dobře zaostřit z důvodu jejich velmi malých rozměrů, a proto byly částice změřeny na TEM. Ze snímků lze určit velikost částic od 10 do 30 nm (obrázek 17), počet vzniklých nanočástic byl však velice malý. Stabilita zlatého koloidu byla určena pomocí zeta potenciálu, který činil (27 ± 5) mV, přičemž za hraniční hodnotu stability je považováno 30 mV. Proto je možné, že částice ještě dále agregovaly. Jelikož další pilotní test jevil lepší výsledky, nebyl tento vzorek testován na odezvu s biologicky aktivní látkou a nelze tedy říci, zda jsou zlaté nanočástice funkcionalizované či nikoli. Jedna z nevýhod tohoto koloidního vzorku je rozpouštědlo DMF, které je hořlavé, toxické a může způsobovat respirační problémy. Výhodu vodného prostředí splňoval vzorek MH101, kterému byla věnována větší pozornost.



Obrázek 17 – Snímky zlatých částic (vzorek MH89) pořízené pomocí TEM.

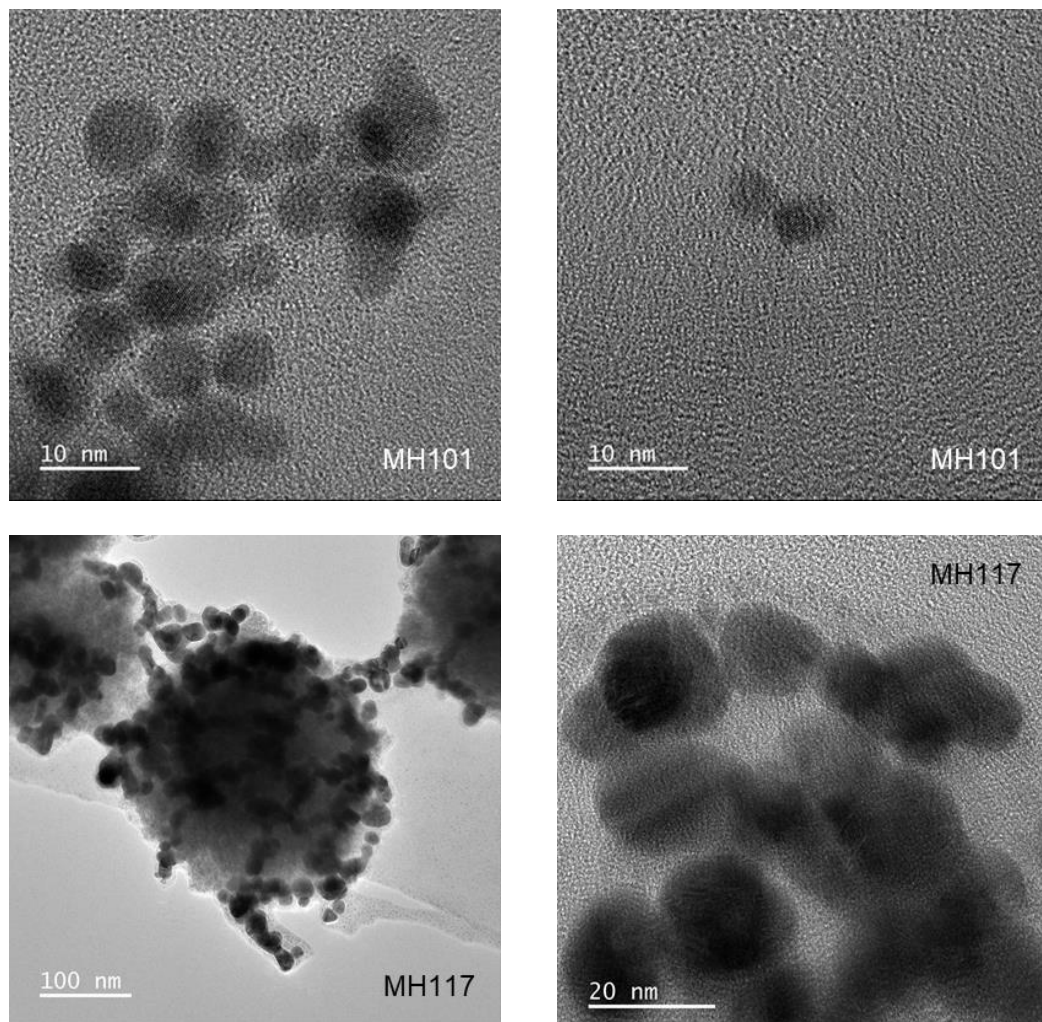
4.4 Charakterizace zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy- β -CD ve vodě

Již barevná změna vzorku MH101 signalizovala vznik nanočástic, což potvrdilo i měření koloidního roztoku pomocí DLS. První charakterizace částic proběhla na SEM. Velikost částic byla opět příliš malá a dobré zaostření i pořízení snímků nebylo možné. Proto i pro tento vzorek následovalo charakterizování pomocí TEM (obrázek 18 MH101). Velikost částic určená ze snímku je v rozmezí 8 až 15 nm. Stabilita částic byla zjištěna pomocí zeta potenciálu, který byl (48 ± 12) mV, z tohoto pohledu bylo předpokládáno, že částice budou stabilní. Tento předpoklad se potvrdil a koloidní roztok neměnil barvu ani nesedimentoval po dobu delší, nežli jsou dva měsíce.

Ověření funkcionalizace připravených AuNPs bylo provedeno pomocí metody SERS. Z výsledků však nebylo dostatečně prokazatelné, že skutečně došlo k navázání β -CD přes atom síry na povrch AuNPs. Ing. Michal Kalát (2017) ve své diplomové práci zkoumal chování funkcionalizovaných AuNPs cyklodextriny na biologicky aktivní látky a těchto poznatků bylo využito k důkazu, že připravené AuNPs jsou skutečně funkcionalizované viz kapitola 4.5.

Ač lze považovat laserové techniky za dobře reprodukovatelné, je neustále nutné pracovat přesně a pečlivě. Při jednom z opakování přípravy vzorku MH101 nejspíše nebyla dodržena správná navážka reaktantů a míchání vzorku při ozařování bylo zapnuto později. Již během ozařování se barva vzorku měnila z červené barvy

na fialovou, což značilo agregaci zlatých částic (obrázek 19). Agregace byla potvrzena jak metodou DLS, tak snímkem pořízeným na TEM. Agregované nanočástice tvořily i mikrometrové shluky (obrázek 18 MH117).



Obrázek 18 – Snímky AuNPs pořízené pomocí TEM, vzorek MH101 neagregované NPs a vzorek MH117 agregované NPs.

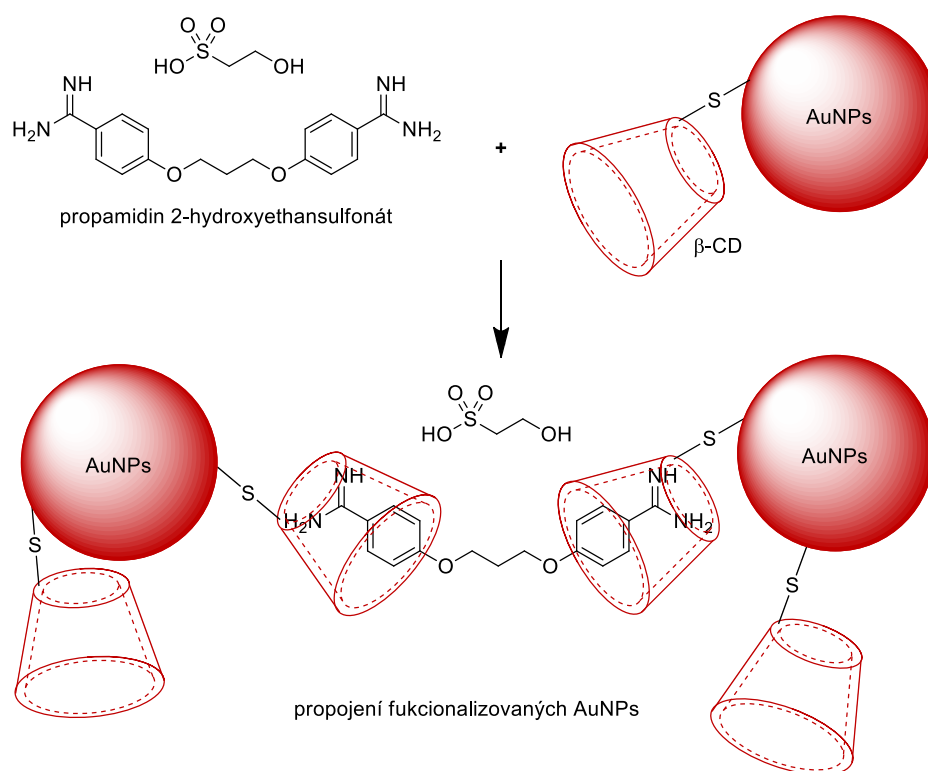


Obrázek 19 – Vzorčky připravené stejným postupem MH101 neagregované AuNPs, MH117 agregované AuNPs.

4.5 Test odezvy zlatých nanočástic funkcionalizovaných 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD na biologicky aktivní látku

Ing. Michal Kalát testoval odezvu funkcionalizovaných AuNPs cyklodextriny na reakci s léčivem. Zatímco u nemodifikovaných AuNPs po přidání léčiva nedošlo k sedimentaci nanočástic, v některých případech po přidání léčiva k modifikovaným AuNPs došlo k vysrážení a změně barvy koloidního roztoku. Následně bylo ověřeno, že funkcionalizované nanočástice reagovaly pouze na léčiva, která mají vhodné vlastnosti ke vzniku inkluzního komplexu s β-CD. Navržený mechanismus při komplexaci léčiva s cyklodextrinami předpokládá propojení jednotlivých nanočástic a shluknutí, což vede k sedimentaci částic v koloidním roztoku. Tato teorie byla také studována v práci Bc. Jaroslava Grofa (2018).

Pro testování odezvy AuNPs vyrobených pomocí pulzního laseru na biologicky aktivní látku bylo zvoleno léčivo propamidin 2-hydroxyethansulfonát, o kterém je známo, že s β-CD tvoří inkluzní komplex. Teoretický předpoklad zněl, že pokud jsou AuNPs doopravdy funkcionalizované β-CD, dojde ke vzniku inkluzního komplexu a tím propojení AuNPs (obrázek 20), což zapříčiní sedimentaci a odbarvení koloidního roztoku.

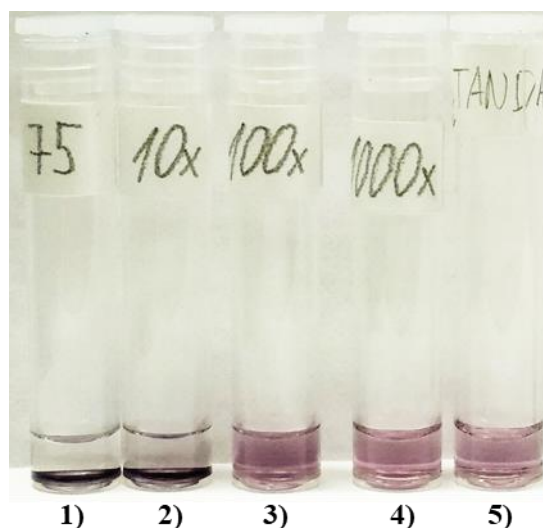


Obrázek 20 – Schéma vzniku inkluzního komplexu léčiva s β-CD a propojení AuNPs.

Pro ověření funkcionalizace byly připraveny čtyři různě koncentrované roztoky propamidinu 2-hydroxyethansulfonátu s AuNPs ve vodě (tabulka 3). Po 24 hodinách došlo k sedimentaci dvou vzorků s největší koncentrací léčiva (obrázek 21), což potvrdilo navázání β -CD na povrch AuNPs. V tomto konkrétním případě lze považovat in situ funkcionalizované AuNPs za sensorový systém. Pomocí tohoto systému je možné rozpoznat přítomnost propamidinu 2-hydroxyethansulfonátu ve vodném roztoku do koncentrace $0,02 \text{ mmol/dm}^3$.

Tabulka 3: Testování odezvy funkcionalizovaných AuNPs na léčivo.

vzorek	1)	2)	3)	4)	5)
koncentrace propamidin 2-hydroxyethansulfonátu	0,2 mmol/dm^3	0,02 mmol/dm^3	2 $\mu\text{mol/dm}^3$	0,2 $\mu\text{mol/dm}^3$	-
sedimentace (obrázek 21)	ANO	ANO	NE	NE	NE



Obrázek 21 – Testování odezvy funkcionalizovaných AuNPs na propamidinu 2-hydroxyethansulfonátu.

5 Závěr

Cílem práce bylo připravit nanočástice zlata za použití pulzního laseru a in situ je funkcionalizovat. Laserová příprava funkcionalizovaných zlatých nanočástic v jednom kroku se jeví jako vhodná, avšak dosud dostatečně neprobádaná část nanotechnologií, a proto věřím, že diplomová práce posunula výzkum v této oblasti opět o malý krůček vpřed.

V rámci experimentální části byl nejprve syntetizován 6^A-*O*-tosyl-β-CD, který sloužil jako meziprodukt při přípravě monosubstituovaného thiolového derivátu 6^A-sulfanyl-6^A-deoxy-β-CD, jenž byl použit jako funkcionalizační činidlo. Následně bylo přistoupeno k optimalizaci přípravy nanočástic pomocí laserové fotochemické syntézy. Tento proces zahrnoval provedení pilotní studie, během které došlo k vyzkoušení odlišných prekurzorů za různých podmínek. Výsledkem je popsána příprava zlatých nanočástic v DMF a H₂O. Na nanočásticích připravených ve vodném prostředí bylo provedeno testování sensorové odezvy pomocí propamidinu 2-hydroxyethansulfonátu. Při koncentraci léčiva 0,02 mmol/dm³ a vyšší byla pozorována sedimentace a odbarvení roztoku, což potvrdilo in situ funkcionalzaci připravených zlatých nanočástic.

Seznam literatury

AMENDOLA, Vincenzo a Moreno MENEGHETTI, 2013. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Physical Chemistry Chemical Physics*, **15**(9), 3027–3046. ISSN 1463-9076. DOI: 10.1039/c2cp42895d

ANASTAS, Paul T a John Charles WARNER, 1998. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford [England]; New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-850234-0.

ANTONII, Francis, 1618. *Panacea Aurea-Auro Potabile*. Hamburg: Bibliopolio Frobeniano.

BARBER, David J. a Ian C. FREESTONE, 1990. An Investigation of the Origin of the Color of the Lycurgus Cup by Analytical Transmission Electron-Microscopy. *Archaeometry*, **32**(1), 33–45. ISSN 0003-813X. DOI: 10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x

BHUSHAN, Bharat, ed., 2016. *Encyclopedia of Nanotechnology*. 2. vyd. B.m.: Springer Netherlands. ISBN 978-94-017-9779-5.

BHUSHAN, Bharat, 2017. *Springer Handbook of Nanotechnology*. B.m.: Springer. ISBN 978-3-662-54357-3.

BRUST, Mathias, Merryl WALKER, Donald BETHELL, David J. SCHIFFRIN a Robin WHYMAN, 1994. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 7(7), 801–802. ISSN 0022-4936. DOI: 10.1039/c39940000801

BUXTON, Richard, 2004. *The Complete World of Greek Mythology Hardcover*. B.m.: Thames & Hudson. ISBN 978-0-500-25121-8.

CASTRO, Hemerson P. S., Virginia S. SOUZA, Jackson D. SCHOLTEN, Janine H. DIAS, Jesum A. FERNANDES, Fabiano S. RODEMBUSCH, Roberto DOS REIS, Jairton DUPONT, Sergio R. TEIXEIRA a Ricardo R. B. CORREIA, 2016. Synthesis and Characterisation of Fluorescent Carbon Nanodots Produced in Ionic Liquids by Laser Ablation. *Chemistry-a European Journal*, **22**(1), 138–143. ISSN 0947-6539. DOI: 10.1002/chem.201503286

DANIEL, Marie-Christine a Didier ASTRUC, 2004. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, **104**(1), 293–346. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr030698+

EUSTIS, Susie, Hsan-Yin HSU a Mostafa A. EL-SAYED, 2005. Gold nanoparticle formation from photochemical reduction of Au³⁺ by continuous excitation in colloidal solutions. A proposed molecular mechanism. *Journal of Physical Chemistry B*, **109**(11), 4811–4815. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp0441588

FARADAY, Michael, 1857. X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **147**, 145–181. DOI: 10.1098/rstl.1857.0011

FEYNMAN, Richard P., 1960. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, **23**, 22–36. ISSN 0013-7812.

FREESTONE, Ian, Nigel MEEKS, Margaret SAX a Catherine HIGGITT, 2007. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, **40**(4), 270–277. ISSN 2190-7579. DOI: 10.1007/BF03215599

FRENS, G., 1973. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, **241**(105), 20–22. ISSN 2058-1106. DOI: 10.1038/physci241020a0

GHOSH, Partha, Gang HAN, Mrinmoy DE, Chae Kyu KIM a Vincent M. ROTELLO, 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**(11), 1307–1315. ISSN 0169-409X. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.016

GIUSTI, Anna, Emilia GIORGETTI, Simona LAZA, Paolo MARSILI a Francesco GIAMMANCO, 2007. Multiphoton fragmentation of PAMAM G5-capped gold nanoparticles induced by picosecond laser irradiation at 532 nm. *Journal of Physical Chemistry C*, **111**(41), 14984–14991. ISSN 1932-7447. DOI: 10.1021/jp072611k

GRAHAM, Thomas, 1861. X. Liquid diffusion applied to analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **151**, 183–224. DOI: 10.1098/rstl.1861.0011

GROF, Jaroslav, 2018. *Příprava cyklohextriny modifikovaných zlatých nanočástic pro senzorové aplikace*. Liberec. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Vedoucí práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.

HAKKINEN, Hannu, 2012. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry*, **4**(6), 443–455. ISSN 1755-4330. DOI: 10.1038/NCHEM.1352

HARADA, Akira, Akihito HASHIDZUME, Hiroyasu YAMAGUCHI a Yoshinori TAKASHIMA, 2009. Polymeric Rotaxanes. *Chemical Reviews*, **109**(11), 5974–6023. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr9000622

HARUTA, Masatake, Tetsuhiko KOBAYASHI, Hiroshi SANO a Nobumasa YAMADA, 1987. Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0 °C. *Chemistry Letters*, **16**(2), 405–408. ISSN 0366-7022. DOI: 10.1246/cl.1987.405

HENGLEIN, Armin, 1993. Physicochemical Properties of Small Metal Particles in Solution - Microelectrode Reactions, Chemisorption, Composite Metal Particles, and the Atom-to-Metal Transition. *Journal of Physical Chemistry*, **97**(21), 5457–5471. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100123a004

HUSSAIN, A., 2010. A computational study of catalysis by gold in applications of CO oxidation. DOI: 10.6100/IR685817

CHA, D. Y. a G. PARRAVANO, 1970. Surface reactivity of supported gold: I. Oxygen transfer between CO and CO₂. *Journal of Catalysis*, **18**(2), 200–211. ISSN 0021-9517. DOI: 10.1016/0021-9517(70)90178-8

IRIE, Tetsumi a Kaneto UEKAMA, 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **86**(2), 147–162. ISSN 0022-3549. DOI: 10.1021/js960213f

JAMBHEKAR, Sunil S. a Philip BREEN, 2016. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discovery Today*, **21**(2), 356–362. ISSN 1359-6446. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.11.017

JEEVANANDAM, Jaison, Ahmed BARHOUM, Yen S. CHAN, Alain DUFRESNE a Michael K. DANQUAH, 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **9**, 1050–1074. ISSN 2190-4286. DOI: 10.3762/bjnano.9.98

KABASHIN, Andrei V., Michel MEUNIER, Christopher KINGSTON a John H. T. LUONG, 2003. Fabrication and characterization of gold nanoparticles by femtosecond laser ablation in an aqueous solution of cyclodextrins. *Journal of Physical Chemistry B*, **107**(19), 4527–4531. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp034345q

KALÁT, Michael, 2017. *Nanočásticové senzorové systémy*. Liberec. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Vedoucí práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.

KAUSHIK, 2016. Lycurgus Cup: A Piece of Ancient Roman Nanotechnology. *Amusing Planet*, [vid. 2019-02-03]. Dostupné z: <https://www.amusingplanet.com/2016/12/lycurgus-cup-piece-of-ancient-roman.html>

KIM, Kuk Ki, Madhusudan ROY, Hyejin KWON, Jae Kyu SONG a Seung Min PARK, 2015. Laser ablation dynamics in liquid phase: The effects of magnetic field and electrolyte. *Journal of Applied Physics*, **117**(7), 074302. ISSN 0021-8979. DOI: 10.1063/1.4913253

KIMLING, J., M. MAIER, B. OKENVE, V. KOTAIDIS, H. BALLOT a A. PLECH, 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B*, **110**(32), 15700–15707. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp061667w

KURIHARA, Kazue, Jerzy KIZLING, Per STENIUS a Janos H. FENDLER, 1983. Laser and Pulse Radiolytically Induced Colloidal Gold Formation in Water and in Water-in-Oil Microemulsions. *Journal of the American Chemical Society*, **105**(9), 2574–2579. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja00347a011

LAM, Julien, David AMANS, Frederic CHAPUT, Mouhamed DIOUF, Gilles LEDOUX, Nicolas MARY, Karine MASENELLI-VARLOT, Vincent MOTTO-ROS a Christophe DUJARDIN, 2014. gamma-Al₂O₃ nanoparticles synthesised by pulsed laser ablation in liquids: a plasma analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **16**(3), 963–973. ISSN 1463-9076. DOI: 10.1039/c3cp53748j

LEVY, Raphaël, Nguyen T. K. THANH, R. Christopher DOTY, Irshad HUSSAIN, R. J. NICHOLS, David J. SCHIFFRIN, Mathias BRUST a David G. FERNIG, 2004. Rational and combinatorial design of peptide capping Ligands for gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, **126**(32), 10076–10084. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja0487269

LI, Dongxiang, Qiang HE, Yue CUI, Li DUAN a Junbai LI, 2007. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **355**(2), 488–493. ISSN 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.01.183

LIANG, Jun F., Yong T. LI a Victor C. YANG, 2000. Biomedical application of immobilized enzymes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **89**(8), 979–990. ISSN 1520-6017. DOI: 10.1002/1520-6017(200008)89:8<979::AID-JPS2>3.0.CO;2-H

LIU, Lei a Qing-Xiang GUO, 2002. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **42**(1), 1–14. ISSN 0923-0750. DOI: 10.1023/A:1014520830813

LOPEZ-SANCHEZ, Jose A., Nikolaos DIMITRATOS, Ceri HAMMOND, Gemma L. BRETT, Lokesh KESAVAN, Saul WHITE, Peter MIEDZIAK, Ramchandra TIRUVALAM, Robert L. JENKINS, Albert F. CARLEY, David KNIGHT, Christopher J. KIELY a Graham J. HUTCHINGS, 2011. Facile removal of stabilizer-ligands from supported gold nanoparticles. *Nature Chemistry*, **3**(7), 551–556. ISSN 1755-4349. DOI: 10.1038/nchem.1066

MARTINELLI, Jonathan, Kalaivani THANGAVEL, Lorenzo TEI a Mauro BOTTA, 2014. Dendrimeric beta-Cyclodextrin/Gd-III Chelate Supramolecular Host-Guest Adducts as High-Relaxivity MRI Probes. *Chemistry-a European Journal*, **20**(35), 10944–10952. ISSN 0947-6539. DOI: 10.1002/chem.201402418

MENENDEZ-MANJON, Ana, Boris N. CHICHKOV a Stephan BARCIKOWSKI, 2010. Influence of Water Temperature on the Hydrodynamic Diameter of Gold Nanoparticles from Laser Ablation. *Journal of Physical Chemistry C*, **114**(6), 2499–2504. ISSN 1932-7447. DOI: 10.1021/jp909897v

NELLES, Gabriele, Michael WEISSER, Roberta BACK, Peter WOHLFART, Gerhard WENZ a Silvia MITTLER-NEHER, 1996. Controlled Orientation of Cyclodextrin Derivatives Immobilized on Gold Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, **118**(21), 5039–5046. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja9539812

OJEA-JIMENEZ, Isaac a Victor PUNTES, 2009. Instability of Cationic Gold Nanoparticle Bioconjugates: The Role of Citrate Ions. *Journal of the American Chemical Society*, **131**(37), 13320–13327. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja902894s

O'MALLEY, S. M., B. ZINDERMAN, J. SCHOEFLING, R. JIMENEZ, J. J. NADDEO a D. M. BUBB, 2014. Nanosecond laser-induced shock propagation in and above organic liquid and solid targets. *Chemical Physics Letters*, **615**, 30–34. ISSN 0009-2614. DOI: 10.1016/j.cplett.2014.09.061

PARRAVANO, G., 1970. Surface reactivity of supported gold: II. Hydrogen transfer between benzene and cyclohexane. *Journal of Catalysis*, **18**(3), 320–328. ISSN 0021-9517. DOI: 10.1016/0021-9517(70)90326-X

PATIL, P.P., D.M. PHASE, S.A. KULKARNI, S.V. GHASIAS, Sk KULKARNI, S.M. KANETKAR, S.B. OGALE a V.G. BHIDE, 1987. Pulsed-Laser Induced Reactive Quenching at a Liquid-Solid Interface: Aqueous Oxidation of Iron. *Physical Review Letters*, **58**(3), 238–241. ISSN 0031-9007. DOI: 10.1103/PhysRevLett.58.238

PENSA, Evangelina, Emiliano CORTES, Gaston CORTHEY, Pilar CARRO, Carolina VERICAT, Mariano H. FONTICELLI, Guillermo BENITEZ, Aldo A. RUBERT a Roberto C. SALVAREZZA, 2012. The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Accounts of Chemical Research*, **45**(8), 1183–1192. ISSN 0001-4842. DOI: 10.1021/ar200260p

POKROPIVNY, V. V. a V. V. SKOROKHOD, 2007. Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, **27**(5–8), 990–993. ISSN 0928-4931. DOI: 10.1016/j.msec.2006.09.023

POPR, Martin, Simona HYBELBAUEROVÁ a Jindřich JINDŘICH, 2014. A complete series of 6-deoxy-monosubstituted tetraalkylammonium derivatives of α -, β -, and γ -cyclodextrin with 1, 2, and 3 permanent positive charges. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **10**(1), 1390–1396. ISSN 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.10.142

QI, Qingsheng a Wolfgang ZIMMERMANN, 2005. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **66**(5), 475–485. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-004-1781-5

REKHARSKY, Mikhail V. a Yoshihisa INOUE, 1998. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, **98**(5), 1875–1917. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr970015o

ŘEZANKA, Michal, 2016. Monosubstituted Cyclodextrins as Precursors for Further Use. *European Journal of Organic Chemistry*, **2016**(32), 5322–5334. ISSN 1434-193X. DOI: 10.1002/ejoc.201600693

ŘEZANKA, Michal, 2018. Synthesis of substituted cyclodextrins. *Environmental Chemistry Letters*. ISSN 1610-3661. DOI: 10.1007/s10311-018-0779-7

ŘEZNÍČKOVÁ, A., Z. NOVOTNÁ, Z. KOLSKÁ, P. ULBRICH a V. ŠVORČÍK, 2014. Preparation, Functionalization and Grafting of Noble Metals Nanoparticles to Activated Polymer. *Chemické listy*, **108**(9). ISSN 1213-7103.

SAKAMOTO, Masanori, Mamoru FUJISTUKA a Tetsuro MAJIMA, 2009. Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, **10**(1), 33–56. ISSN 1389-5567. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2008.11.002

SAPSFORD, Kim E., W. Russ ALGAR, Lorenzo BERTI, Kelly Boeneman GEMMILL, Brendan J. CASEY, Eunkeu OH, Michael H. STEWART a Igor L. MEDINTZ, 2013. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews*, **113**(3), 1904–2074. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr300143v

SHIH, Cheng-Yu, Chengping WU, Maxim V. SHUGAEV a Leonid V. ZHIGILEI, 2017. Atomistic modeling of nanoparticle generation in short pulse laser ablation of thin metal films in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, **489**, 3–17. ISSN 0021-9797. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.10.029

SIEGEL, J., M. STASZEK a V. ŠVORČÍK, 2014. Nanočástice ušlechtilých kovů připravené v kapalinách. *Chemické listy*. **108**(12), 1102–1112. ISSN 1213-7103.

STELLA, Valentino J. a Quanren HE, 2008. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, **36**(1), 30–42. ISSN 0192-6233. DOI: 10.1177/0192623307310945

SZEJTLI, József, 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, **98**(5), 1743–1753. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr970022c

TANABE, Rie, Thao T. P. NGUYEN, Takahiro SUGIURA a Yoshiro ITO, 2015. Bubble dynamics in metal nanoparticle formation by laser ablation in liquid studied through high-speed laser stroboscopic videography. *Applied Surface Science*, **351**, 327–331. ISSN 0169-4332. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.05.030

TIAN, Fei, Junchao AN, Hongmei CAO a Shizhen GUO, 2013. Large scale synthesis of PbS tipped ZnS nanorods heterostructures by long-pulse-width laser ablation in liquid. *Journal of Alloys and Compounds*, **574**, 161–164. ISSN 0925-8388. DOI: 10.1016/j.jallcom.2013.04.050

TONKOVA, Alexandra, 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**(8), 678–686. ISSN 0141-0229. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00263-9

TURKEVICH, John, Peter C. STEVENSON a James HILLIER, 1951. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society*, **11**, 55-75. DOI: 10.1039/df9511100055

VACCARO, Lavinia, Luisa SCIORTINO, Fabrizio MESSINA, Gianpiero BUSCARINO, Simonpietro AGNELLO a Marco CANNAS, 2014. Luminescent silicon nanocrystals produced by near-infrared nanosecond pulsed laser ablation in water. *Applied Surface Science*, **302**, 62–65. ISSN 0169-4332. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.01.041

VEITH, Gabriel M., Andrew R. LUPINI, Sergey RASHKEEV, Stephen J. PENNYCOOK, David R. MULLINS, Viviane SCHWARTZ, Craig A. BRIDGES a Nancy J. DUDNEY, 2009. Thermal stability and catalytic activity of gold nanoparticles supported on silica. *Journal of Catalysis*, **262**(1), 92–101. ISSN 0021-9517. DOI: 10.1016/j.jcat.2008.12.005

YAN, Zijie, Ruqiang BAO, Yong HUANG, A. N. CARUSO, Syed B. QADRI, Cerasela Zoica DINU a Douglas B. CHRISEY, 2010. Excimer Laser Production, Assembly, Sintering, and Fragmentation of Novel Fullerene-like Permalloy Particles in Liquid. *Journal of Physical Chemistry C*, **114**(9), 3869–3873. ISSN 1932-7447. DOI: 10.1021/jp911566a

YUE, Guozong, Song SU, Na LI, Maobing SHUAI, Xinchun LAI, Didier ASTRUC a Pengxiang ZHAO, 2016. Gold nanoparticles as sensors in the colorimetric and fluorescence detection of chemical warfare agents. *Coordination Chemistry Reviews*, **311**, 75–84. ISSN 0010-8545. DOI: 10.1016/j.ccr.2015.11.009

ZHANG, Dongshi, Bilal GOEKCE a Stephan BARCIKOWSKI, 2017. Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, **117**(5), 3990–4103. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00468

ZHANG, Dongshi, Bilal GOEKCE, Christian NOTTHOFF a Stephan BARCIKOWSKI, 2015. Layered Seed-Growth of AgGe Football-like Microspheres via Precursor-Free Picosecond Laser Synthesis in Water. *Scientific Reports*, **5**, 1-10. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/srep13661

ZHONG, Ning, Hoe-Sup BYUN a Robert BITTMAN, 1998. An improved synthesis of 6-*O*-monotosyl-6-deoxy- β -cyclodextrin. *Tetrahedron Letters*, **39**(19), 2919–2920. ISSN 0040-4039. DOI: 10.1016/S0040-4039(98)00417-1