

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

PŘÍPRAVA KOMPOZITŮ NANOČÁSTIC STŘÍBRA S FOSFOREČNANEM VÁPENATÝM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2015

Barbora Vršanová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

PŘÍPRAVA KOMPOZITŮ NANOČÁSTIC STRÍBRA S FOSFOREČNANEM VÁPENATÝM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Barbora Vršanová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Libor Kvítek, Csc.

Olomouc 2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

.....

.....

Vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji katedře fyzikální a analytické chemie za poskytnutí zázemí a prostředků k vykonání bakalářské práce. Nemalé díky za trpělivost, cenné rady a nadhled patří vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, Csc.

SOUHRN

Tato práce se zabývá syntézou kompozitu hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra. Je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

Teoretická část je zaměřena na obecné charakteristiky jednotlivých komponent, jimiž jsou nanočástice stříbra, kompozity, hydroxyapatit a povrchově aktivní látky. V teoretické části je také zahrnuta stručná charakteristika koloidních soustav, jejichž podskupinou nanočástice jsou. V závěru teoretické části jsou stručně popsány instrumentální metody charakterizace nanočástic a jejich principy.

Praktická část je zaměřena na studium metod přípravy mikročástic hydroxyapatitu jednoduchou srážecí reakcí vycházející z roztoků fosforečnanu amonného a dusičnanu vápenatého. Tato metoda byla dále modifikována přidávkem různých typů povrchově aktivních látek s cílem efektivní přípravy kompozitu mikročástic hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Barbora Vršanová
Název práce: Příprava kompozitů hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra

Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce: Doc.RNDr Libor Kvítek, Csc.
Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Práce je zaměřena na studium metod přípravy mikročástic hydroxyapatitu jednoduchou srážecí reakcí vycházející z roztoků fosforečnanu amonného a dusičnanu vápenatého. Tato metoda byla dále modifikována přidáním různých typů povrchově aktivních látek s cílem efektivní přípravy kompozitu mikročástic hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra. Největšího obsahu stříbra v kompozitu bylo dosaženo při redukci stříbrné soli v přítomnosti mikročástic hydroxyapatitu modifikovaných kationickou povrchově aktivní látkou. Tento kompozit vykazoval současně nejvyšší antibakteriální aktivitu díky synergickému účinku nanočástic stříbra a kationického tenzidu.

Klíčová slova: stříbro, nanočástice, příprava, hydroxyapatit, kompozit, povrchově aktivní látky

Počet stran: 45
Počet příloh: 0
Jazyk: čeština

OBSAH

	Strana	
1	ÚVOD	1
2	PRAKTICKÁ ČÁST	2
2.1	KOLOIDNÍ SOUSTAVY	2
2.1.1	CHARAKTERISTIKA KOLOIDNÍCH SOUSTAV	2
2.1.2	NANOČÁSTICE	2
2.1.3	HISTORIE VYUŽITÍ STRĚBRA	3
2.1.4	NANOČÁSTICE STRĚBRA	3
2.1.5	METODY PŘÍPRAVY NANOČÁSTIC STRĚBRA	4
2.1.6	CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC STRĚBRA	4
2.2	KOMPOZITY	5
2.2.1	KOMPOZITY S NANOČÁSTICEMI STRĚBRA	6
2.2.2	METODY PŘÍPRAVY KOMPOZITŮ HYDROXYAPATITU NANOČÁSTICEMI STRĚBRA	S 6
2.3	HYDROXYAPATITY	8
2.3.1	PŘÍPRAVA HYDROXYAPATITŮ	10
2.4	POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY	10
2.4.1	ORGANICKÉ POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY	11
2.5	INSTRUMENTÁLNÍ METODY POUŽÍVANÉ PŘI NANOMATERIÁLŮ	12
3	PRAKTICKÁ ČÁST	15
3.1	CHEMIKÁLIE	15
3.2	PŘÍSTROJE	15
3.3	EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY	16
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	19
4.1	ROZPTYL SVĚTLA	19
4.2	TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE KOMPOZITU	21
4.3	DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA A UV/VIS SPEKTROSKOPIE	24

4.4	STANOVENÍ OBSAHU STŘÍBRA V KOMPOZITECH POMOCÍ ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROSKOPIE (AAS)	25
4.5	TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE KOMPOZITŮ	26
4.6	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE KOMPOZITŮ A ENERGIOVĚ-DISPERZNÍM ANALÝZA	29
4.7	ZMĚNA POVRCHOVÉ ENERGIE	35
4.8	BIOLOGICKÁ AKTIVITA	37
4.9	RENTGENOVÁ PRÁŠKOVÁ DIFRAKCE KOMPOZITŮ	39
5	ZÁVĚR	41
6	SEZNAM ZKRATEK	43
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44

1 ÚVOD

Hydroxyapatit je minerál, jenž patří do třídy fosforečnanových hornin (apatitů). Jeho hlavní složkou je orthofosforečnan vápenatý. Hydroxyapatit je zajímavým minerálem nejen z hlediska své stability, ale také proto, že je hlavní složkou kalcifikovaných tkání. Je to biokompatibilní a osteokonduktivní materiál. Vzhledem k těmto faktům se hydroxyapatit široce užívá v medicíně např. při rekonstrukci kostních defektů nebo v širokém měřítku ve stomatologii. V některých případech ovšem hydroxyapatity způsobují infekci. Hydroxyapatity způsobené infekce jsou hnacím motorem pro výzkum syntéz kompozitů s antibakteriálními vlastnostmi právě pro použití v medicíně.

Biologická aktivita stříbra je známá již dlouhou dobu. Stříbro ve své makroskopické formě bylo užíváno již ve starověku. Tato forma je ovšem při vnitřním užití toxická. Bylo zjištěno, že koloidní forma stříbra a to především nanočástice stříbra nezpůsobují v malém množství intoxikaci a jsou stále biologicky aktivní. Tato vlastnost se jeví vhodná právě pro tvorbu kompozitů např. s již zmíněným hydroxyapatitem.

Tato práce se zabývá syntézou hydroxyapatitu včetně vlivu povrchově aktivních látek na tvar a velikost připravovaných částic hydroxyapatitu. Hlavním cílem práce je studium vlivu použitých povrchově aktivních látek na adsorpci nanočástic stříbra na hydroxyapatit při přípravě kompozitu nanoAg@hydroxyapatit^{1,2,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16}.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KOLOIDNÍ SOUSTAVY

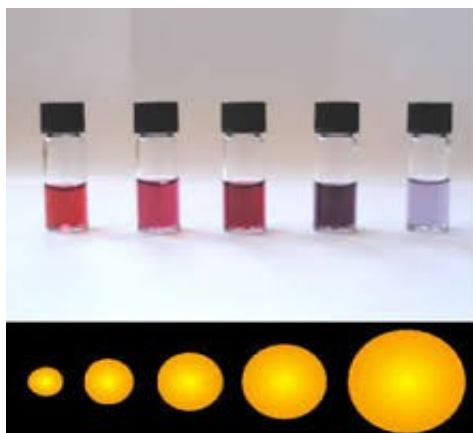
2.1.1 CHARAKTERISTIKA KOLOIDNÍCH SOUSTAV

Koloidní soustavy se řadí mezi disperzní systémy, jejichž specifické chování je podmíněno zejména velikostí částic a jejich tvarem. Koloidní soustavy mají díky rozměrům částic disperzní fáze v rozmezí 1nm až 1 μm rozdílné vlastnosti jednak od pravých analytických disperzí, ale také od hrubých disperzí. Jedná se především o velký obsah volné povrchové energie a s tím související povrchové jevy. Povrchové jevy probíhají na koloidních částicích velmi intenzivně¹.

V soustavě mohou být všechny částice buď stejně velké a tento systém se nazývá monodisperzní, nebo jsou částice různě velké, pak se jedná o polydisperzní systém².

2.1.2 NANOČÁSTICE

Nanočástice jsou dle definice částice, které mají rozměr v minimálně jednom směru pod 100 nm a jsou podmnožinou koloidních částic. Na rozměrech obecně závisí jednotlivé fyzikální vlastnosti soustav s nanočásticemi. Rozdíl se může objevovat například v barvě, elektrické konduktivitě nebo velikost rozptylu světla.



Obr. 1: Závislost barvy soustavy na velikosti částic zlata³

Historicky významným objevem pro rozvoj nanotechnologie a nanomateriálů byl fulleren C_{60} dříve zvaný buckminsterfullerene či zkráceně “Bucky Ball“ (objevený britským astrochemikem Harrym Krotou). Objev fullerenu vedl s postupem let k objevu uhlíkových nanotrubiček⁴. Uhlíkové nanotrubičky lze charakterizovat jako jednu vrstvu grafitu (= grafen) srolovanou do trubice⁵. Nanotrubičky jsou nyní integrální součástí nanotechnologií s potenciálními aplikacemi zejména v elektronice .

Současný výzkum nanomateriálů lze rozdělit na dvě skupiny. První skupinou je vývoj v oblasti nanostrojírnosti. Druhou skupinou je hledání aplikací nanočástic⁴.

2.1.3 HISTORIE VYUŽITÍ STŘÍBRA

Stříbro bylo díky svým léčivým účinkům užíváno již starověkými Egypťany a Řeky. V této době bylo užíváno ve své makroskopické formě. V 19. století bylo stříbro užíváno v koloidní formě ve fotografických emulzích, ale také jeho pro antimikrobiální aktivitu. Ve 20. století bylo koloidní stříbro však nahrazeno digitálními fotografiemi a antibiotiky a na čas vymizelo z povědomí lidstva. Jelikož s postupem času rostla rezistence bakterií vůči antibiotikům, lidstvo se znovu začalo zabývat antibakteriálními účinky koloidního stříbra, resp. nanočástic stříbra⁶.

2.1.4 NANOČÁSTICE STŘÍBRA

Objevy posledních desetiletí jasně prokázaly, že elektromagnetické, optické a katalytické vlastnosti nanočástic stříbra jsou silně ovlivněny tvarem a velikostí částic, které je možno měnit způsobem syntézy, volbou redukčního činidla aj⁷. Nejvyužívanější vlastností nanočástic stříbra je v posledních letech jeho antimikrobiální aktivita, díky které v tomto odvětví došlo k intenzivnímu rozvoji aplikací zejména při antibakteriálních úpravách různých povrchů⁸. Nanočástice stříbra se v současné době mimo jiné užívají například v textilním průmyslu jako antibakteriální modifikátory vláken. S antimikrobiální účinností je spjato užívání nanočástic v medicíně⁶.

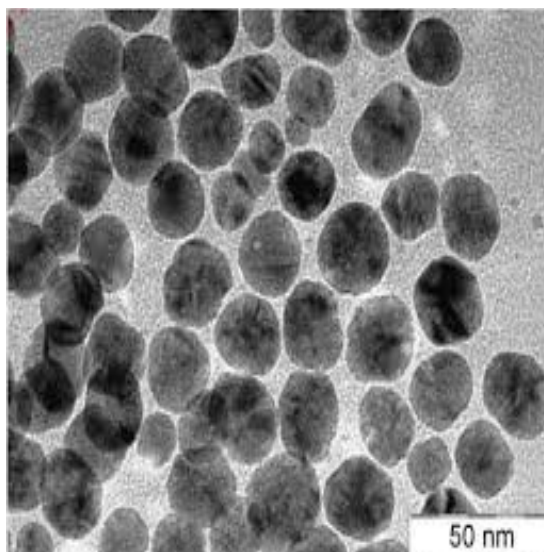
2.1.5 METODY PŘÍPRAVY NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Disperze nanočástic se připravují nejčastěji redukcí roztoku dusičnanu stříbrného. Jako redukční činidla se užívají například redukující cukry. Je – li požadováno menších rozměrů částic (okolo 20 nm) užívá se maltosa, není – li požadována tak malá velikost, užívá se glukosa (vznik částic o rozměrech okolo 50 nm). Obě tyto redukce probíhají v zásaditém prostředí (pH nad 10). Výsledné disperze nanočástic stříbra mají rezavo-hnědou barvu⁹.

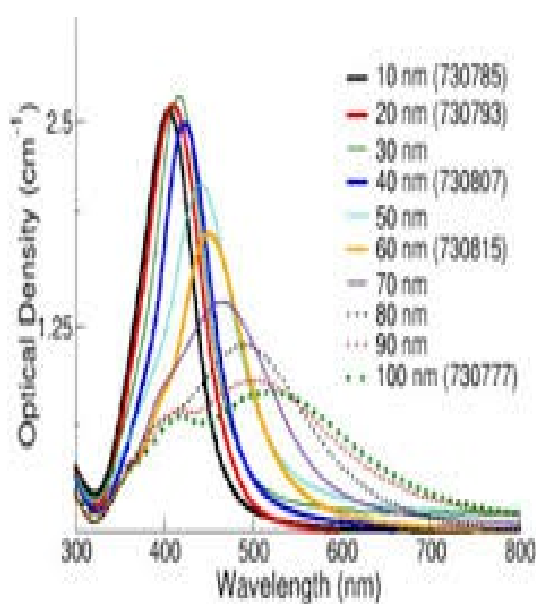
Nanočástice stříbra se dají připravit i některými fyzikálními metodami. Typickým příkladem je laserová ablace (rozmělnění), přičemž vznikají chemicky čisté nanočástice¹⁰. Dalším možným způsobem přípravy je redukce působením γ – záření. Výhodou této metody je to, že se do roztoku zavádí minimum rušících látek, které by se mohly adsorbovat na povrch částic a tím měnit jejich vlastnosti⁶.

2.1.6 CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Nanočástice stříbra se nejčastěji charakterizují pomocí transmisního elektronového mikroskopu¹¹. K určování velikosti nanočástic lze využít i metodu dynamický rozptyl světla (DLS)¹². Alternativními způsob charakterizace je UV/VIS spektroskopie. Nanočástice stříbra absorbují elektromagnetické záření okolo vlnové délky 400 nm (pro velikost částic několika desítek nm). Hodnota vlnové délky absorpčního maxima však závisí na velikosti částic – se zvětšující se velikostí se absorpční maximum posouvá směrem k dlouhovlnné oblasti spektra¹¹. Další možností charakterizace nanočástic stříbra je pak povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)⁶.



Obr. 2: Snímek z TEM – nanočástice stříbra¹³



Obr. 3: UV/VIS absorpční spektra nanočástic stříbra závislosti na velikosti¹⁴

2.2 KOMPOZITY

Kompozity jsou materiály skládající se ze dvou a více látek. Kompozity jsou užívány například ve stavebnictví (železobeton), automobilovém průmyslu nebo ozbrojených složkách (neprůstřelné vesty) a jiné. Kompozitní materiály hrají důležitou roli protože nejen

sdužují výhodné vlastnosti dvou materiálů do jednoho celku, ale mnohdy dávají výslednému materiálu i nové užité vlastnosti¹⁵. Typický příklad představují kompozity kombinující biokompatibilní materiály s dalšími složkami, dodávajícími původnímu materiálu nové vlastnosti (mechanická odolnost, antibakteriální vlastnosti apod.).

Syntéza kompozitů hydroxyapatitu jakožto typického biokompatibilního materiálu používaného v medicíně s různými kovy se provádí pro zvýšení jeho užitečných vlastností. Mezi tyto používané kovy řadíme jsou například stříbro nebo titan. Stříbro se kombinuje s hydroxyapatity díky své antibakteriální aktivitě. Titan je naopak pevný, přilnavý a má vysokou mechanickou odolnost, která je výhodná například při povlaku kloubu, neboť odolává tření¹⁶.

2.2.1 KOMPOZITY S NANOČÁSTICEMI STŘÍBRA

Kompozity s nanočásticemi stříbra mohou vytvářet i další organické i anorganické látky. Jako příklad organické látky lze uvést například polyanilin nebo polypyrrol, používané např. pro modifikaci povrchu elektrod v elektrochemii¹⁷. Jako anorganické látky jsou používány například již zmíněný hydroxyapatit¹⁸ nebo uhličitán vápenatý¹⁹. Díky biokompatibilitě, bioaktivitě a osteokonduktivitě jsou hydroxyapatity užívaným materiálem v medicíně jako materiál používaný pro přípravu kostních implantátů. Bylo ale zjištěno, že hydroxyapatity mohou v některých případech způsobit infekci.

Volba stříbra jako druhé složky kompozitu s hydroxyapatitem je vhodná především jako prevence proti infekci během chirurgických zákroků, s ohledem na narůstající rezistenci bakterií vůči antibiotikům, což nepředstavuje problém pro antibakteriální účinky nanočástic stříbra²⁰.

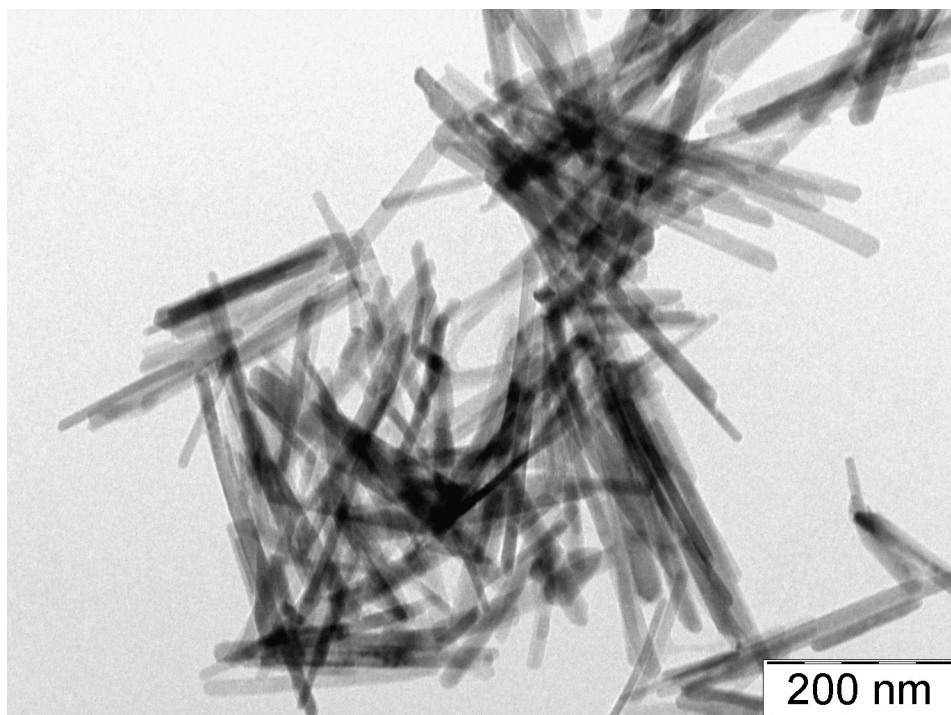
2.2.2 METODY PŘÍPRAVY KOMPOZITŮ HYDROXYAPATITU S NANOČÁSTICEMI STŘÍBRA

Příprava kompozitů hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra je obecně možná několika způsoby. Jedním z nich je reakce směsi tetrahydrátu dusičnanu vápenatého a dusičnanu stříbrného s hydrogenfosforečnanem diamonným. Reakce probíhá za zvýšené

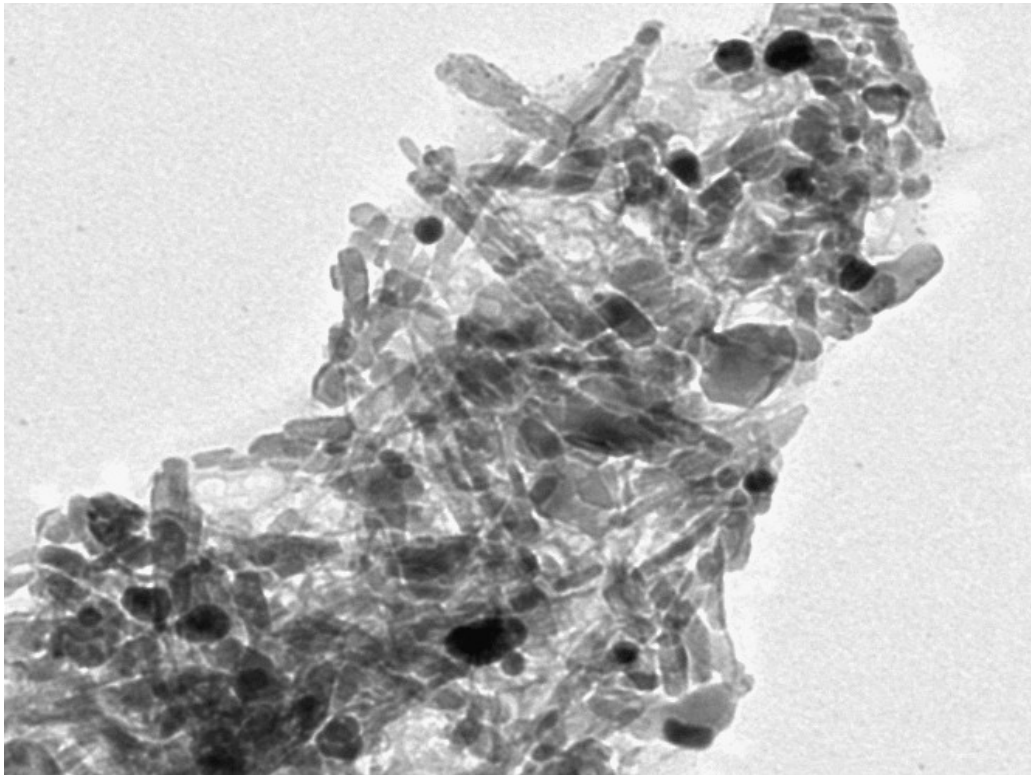
teploty a neustálého míchání – po dobu 24 hodin z důvodu narůstání zárodků krystalizačních center¹⁸.

Dalším z možných postupů přípravy je syntéza uvedeného kompozitu za pomoci laseru. Princip této metody spočívá v otáčení terčem z tenké vrstvy hydroxyapatitu a stříbra na nějž je fokusován paprsek laseru o vlnové délce 248 nm. Substrát se udržuje buď při pokojové teplotě, přičemž vzniká amorfni forma. Naopak při zahřívání substrátu na 600 °C vzniká při této metodě krystalická forma²¹.

Výsledné kompozity lze charakterizovat pomocí rentgenové práškové difrakce (XRD), infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) spektrometrií a zobrazovacími technikami – TEM, skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM)⁸.



Obr. 4: TEM snímek hydroxyapatitu připraveného dle kapitoly 3.3



Obr. 5: TEM snímek kompozitu hydroxyapatitu + nanočástic stříbra připravených v této práci

2.3 HYDROXYAPATITY

Hydroxyapatit je zástupcem apatitů. Apatity jsou horniny obsahující hlavní složku orthofosforečnan vápenatý. Orthofosforečnany vápenaté jsou hojně zastoupeny v horninách rovněž také mezi živými organismy. Všechny orthofosforečnany vápenaté se dle definice skládají ze třech hlavních prvků: vápník (v oxidačním stavu +II), fosfor (v oxidačním stavu +V) a kyslík (v oxidačním stavu -II). Všechny ortofosforečnany vápenaté jsou v čistém stavu bílé krystalické látky střední tvrdosti, špatně rozpustné ve vodě, nerozpustné v alkalickém prostředí a snadno rozpustné v kyselinách.

Geologické přírodní orthofosforečnany vápenaté lze nalézt po celém světě, zejména jako ložiska apatitů (magmatické horniny). Nejčastěji se vyskytující je fluorapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). Orthofosforečnany vápenaté lze nalézt i jako ložiska fosforitů, která řadíme k sedimentárním horninám.

Atomová struktura chemicky čistých apatitů je postavena tak, že atomy vápníku jsou umístěny kolem sítě ortofosforečnanových skupin, což zaručuje vysokou stabilitu.

Žádný z přírodních apatitů se nevyskytuje čistý. Apatity vždy obsahují příměsi jiných prvků nebo skupin (v závislosti na lokalitě), které mohou částečně substituovat vápenaté kationty (Sr, Ba, Mg, Mn, K, Na, Fe), orthofosforečnanové anionty (AsO_4^{3-} , CO_3^{2-} , VO_4^{3-}), nebo fluoridy z přírodních apatitů (OH^- , Cl^- , Br^-). Substituce jsou důvodem rozdílného zbarvení apatitů. Fosforečnan vápenatý je v čistém stavu bílá krystalická látka¹⁶.



Obr. 6: Substituovaný přírodní apatit¹⁶



Obr. 7: Fosforečnan vápenatý čistý²²

Vzhledem k chemické podobnosti s kalcifikovanými tkáněmi (zuby, kosti) mají anorganické biomateriály na bázi apatitů širokou oblast užití v medicíně a stomatologii. Mezi nimi je také hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), druhý nejstabilnější a nejméně rozpustný po fluorapatitu. Hydroxyapatit je stabilní v rozmezí pH 9,5 – 12 s rozpustností 0,0003 g/l (při

25 °C)¹⁶.

Hydroxyapatit je slibným materiálem pro svou biokompaktibilitu a osteokonduktivitu (= vlastnost materiálu, který svým složením a strukturou podporuje vrůstání okolních kostních buněk). Díky těmto vlastnostem se užívá k výplni široké škály kostních defektů v ortopedické a maxilofaciální chirurgii. Hydroxyapatit je také široce užíván jako pokrývací materiál na kovové protézy z důvodu zlepšení jejich biologických vlastností²³.

2.3.2 PŘÍPRAVA HYDROXYAPATITŮ

Synteticky lze hydroxyapatity vyrobit několika způsoby. Jedním z nich je například reakce vodného roztoku laktátu vápenatého s vodným roztokem hydrogenfosforečnanu diamonného za přítomnosti vodného roztoku polyethyleniminu ($H(NHCH_2CH_2)_nNH_2$) jako stabilizátoru²⁴.

Dalším z možných postupů syntézy hydroxyapatitu je postupné přikapávání vodného roztoku hydrogenfosforečnanu diamonného do vodného roztoku dusičnanu vápenatého, ve kterém je přítomen polyethylenglykol jako stabilizátor²⁵. Existuje varianta syntézy hydroxyapatitu, kdy se pouze přikapává roztok hydrogenfosforečnanu amonného do roztoku dusičnanu vápenatého za neustálého míchání, bez přítomnosti stabilizátoru, což má ovšem za následek vznik částic o různé velikosti.

Hydroxyapatity lze charakterizovat RTG, FTIR a Ramanovou spektrometrií s Fourierovou transformací (FT – Raman). Morfologickou strukturu lze sledovat transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) či variantou skenovacího elektronového mikroskopu (FE – SEM)²⁶.

2.4 POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY

Povrchově aktivní látky, nebo-li detergenty (tenzidy, surfaktanty) jsou chemické sloučeniny, které se ochotně koncentrují na fázovém rozhraní a snižují povrchové napětí mezi fázemi. Molekuly povrchově aktivních látek mají dvě části: lyofilní (vysoká afinita k rozpouštědлу – zajišťuje rozpustnost) a lyofobní (nerozpustná v rozpouštědle).

Povrchově aktivní látky lze členit do několika skupin podle:

- a) chemické povahy na anorganické, organické a organosilikátové
- b) elektrolytické disociace na ionické a neionické
- c) povahy povrchově aktivního iontu na anionické, kationické a amfionické.

2.4.1 ORGANICKÉ POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY

V současnosti mají organické tenzidy největší aplikační rádius. Tyto tenzidy pocházejí z přírodních zdrojů a jsou proto velmi šetrné k životnímu prostředí. Z tohoto důvodu roste jejich význam z hlediska jejich využití v praxi, zejména pak v osobní hygieně. Do skupiny organických neionických tenzidů patří například alkylpolyglykosidy a přírodní molekuly jako jsou glykosidy či sacharidy.

Soli karboxylových kyselin, alkylsulfáty (estery kyseliny sírové), fosfáty a estery kyseliny fosforečné spadají do podskupiny organických anionických povrchově aktivních látek. Zástupcem esterů kyseliny sírové je například dodecylsírán sodný (SDS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), který se uplatňuje například v elektroforéze.

Do skupiny organických kationických tenzidů se řadí soli kvartérních amoniových zásad a soli pyridiniových zásad. Tyto tenzidy mají antibakteriální účinky. Nejznámějším zástupcem kvartérních amoniových solí je cetyltrimethylammonium bromid (CTAB, $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$) a zástupcem solí pyridiniových zásad je například cetylpyridinium bromid, (CPB, $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{BrN}$).

Organické amfionické povrchově aktivní látky obsahují bazickou i kyselou disociovatelnou skupinu. Disociace amfionických látek závisí na pH prostředí. Hodnota pH při které se disociuje rovnocenný počet kyselých i zásaditých skupin se nazývá izoelektrický bod. V tomto bodě se molekula jeví elektroneutrálně. Zástupcem amfionických povrchově aktivních látek jsou například aminokyseliny, resp. bílkoviny.

Důležitými vlastnostmi surfaktantů jsou: snižování povrchového napětí, tvorba micel a solubilizace. Micela je útvar, ve kterém se molekuly tenzidů orientují svými lyofilními částmi směrem k rozpouštědлу a lyofobní konce se uzavírají uvnitř micely. Solubilizace je schopst povrchově aktivních látek rozpouštět látky, které jsou v čistém rozpouštědle nerozpustné. Na principu solubilizace je založeno čištění znečištěných povrchů – tzv. detergence. Původně nerozpustná látka se do roztoku dostává v jádře micel, vytvořených

asociací molekul tenzidu při koncentraci vyšší než je kritická koncentrace tvorby micel (CMC)¹².

2.5 INSTRUMENTÁLNÍ METODY POUŽÍVANÉ PŘI STUDIU NANOMATERIÁLŮ

INVERZNÍ PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE (IGC)

Inverzní plynová chromatografie je instrumentální technika, jejíž použití spočívá ve studování povrchu a celkových vlastností pevných a vláknitých materiálů. IGC má potenciál k řešení složitějších fyzikálně chemických měření jako jsou prášková povrchová energie, povrchová heterogenita, acidobazické vlastnosti povrchů.

IGC je reverzní ke konvečním plynovým chromatografiím, které slouží především k separaci. IGC je naopak technika určená k charakterizaci materiálů. Prázdňá kolona je jednotně naplněná zkoumanou pevnou látkou, typicky práškem, vlákny nebo filmem. Mobilní fáze (plyn nebo výpary rozpouštědla) je pak vpouštěna na kolonu naplněnou vzorkem.

V průběhu měření je na kolonu vpravována konstantní či měnící se koncentrace známého plynu (nebo výparů) pod konstantním průtokem. Sledovanou veličinou je retenční čas. Série měření s různými plyny nebo výpary poskytuje rozsáhlé informace o fyzikálně-chemických vlastnostech pevného vzorku. Ze sérií měření retenčního objemu je možno získat informace o termodynamických a kinetických parametrech vzorku. Z nich lze získat zejména informace o povrchové energii studovaného vzorku a o jeho acido-bazických vlastnostech²⁷.

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP (TEM)

Elektronový mikroskop je instrumentální technika, která k zobrazení předmětů využívá vlnových vlastností elektronu. Od optického mikroskopu, využívajícího pro dosažení požadovaného zvětšení soustavu optických čoček, se liší tím, že se používají nikoli světelné paprsky, ale svazek elektronů²⁸. V TEM je vzorek ve formě tenké folie ozařován elektrony o

energii řádově stovek kV²⁹. Elektrony jsou při průchodu vzorkem pohlcovány na základě rozdílné tloušťky vrstvy materiálu ve vzorku a také na základě rozdílné atomové hmotnosti prvků přítomných ve vzorku. Po dopadu prošlých elektronů na fluorescenční stínítko či na CCD zobrazovací prvek je viditelný obraz vzorku v procházejícím svazku elektronů podobně jako obraz vzorku v procházejícím světelném paprsku optického mikroskopu³⁰.

SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie pracuje na jiném principu než transmisní elektronová mikroskopie. Obraz je vytvářen postupně, užitím ostře fokusovaného svazku elektronů jako pomocného prostředku k vyvolání fyzikálního signálu, jenž je vlastním zdrojem informací o místě, na něž primární elektronový svazek dopadá. Svazek elektronů z vhodného zdroje, urychlený napětím až 50 kV, je zaostřen na plošku tuhého vzorku.

Elektrony elektronového svazku dopadají v SEM na povrch pevného vzorku s energií tisíců až desítek tisíc eV. Pronikají do určité hloubky pod povrch a jsou látkou rozptylovány a absorbovány.

Při dopadu elektronů dochází současně k několika procesům: část elektronů je absorbována, část odražena, dochází k emisi sekundárních elektronů a k emisi rentgenového záření. Některé primární elektrony po ztrátě části energie opouštějí vzorek jako odražené elektrony s nižší energií.

Odražené elektrony mají energii poněkud menší než elektrony dopadající, ale řádově srovnatelnou, zatímco sekundární elektrony mají energii podstatně nižší. Sekundární elektrony se mohou dostat maximálně z hloubky několika nanometrů, proto zobrazení sekundárními elektrony přináší informaci pouze o povrchové vrstvě. Získávání obrazu pomocí sekundárních elektronů, který dokumentuje topografické změny na povrchu vzorku, je hlavním a nejčastějším užitím SEM.

K SEM je možno zařadit přídatná zařízení. Pro laboratorní účely se používá energiově-disperzní spektroskopie (EDS). Smyslem kvalitativní bodové mikroanalýzy je buď prokázat přítomnost určitého, předem vytypovaného prvku, nebo provést spektrální analýzu²⁸.

DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS), rovněž nazývaný jako kvazielastický rozptyl světla (QELS), je metoda vhodná pro měření velikosti částic. Základem této techniky je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Tyto fluktuace souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na částicích disperzní fáze, podléhajících Brownovu pohybu. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Tento pohyb software přepočítává na velikost částic. Metoda je vhodná pro měření částic od jednotek nanometrů až po $1 - 2 \mu\text{m}^3$.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části byly zkoumány dvě z možných syntéz kompozitů hydroxyapatitu (HAP) s nanočásticemi stříbra. V jednom případě byly předem připravené nanočástice stříbra adsorbovány na povrch mikročástic HAP, ve druhém případě pak byly nanočástice stříbra redukovány z roztoku stříbrné soli přímo na povrchu mikročástic HAP. Současně byl studován vliv povrchově aktivních látek na tvar a velikost mikročástic HAP i na následnou adsorpci či redukci nanočástic stříbra na HAP.

3.1 CHEMIKÁLIE:

Pro experiment byly použity následující chemikálie

Dusičnan stříbrný, ČL2009 (Fagron, Nizozemí)

Hydroxid sodný, p.a. (Lachner, ČR)

Vodný roztok amoniaku, 28-30% (ACS reagent, Sigma-Aldrich, Německo)

Maltosa monohydrát (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina askorbová, p.a (Penta, ČR)

Hydrogenfosforečnan amonný, p.a (Penta, ČR)

Dodecylsírán sodný, >98,5% (SDS; Sigma-Aldrich, Německo)

Cetylpyrimidium bromid, >98,5% (CPB; Sigma-Aldrich, Německo)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát, p.a.(Penta, ČR)

Polyoxyethylensorbitanmonooleát, >98,5% (TWEEN; Sigma-Aldrich, Německo)

Demineralizovaná voda, (vodivost $0.05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) z přístroje Aqual 29 (Merci, ČR)

3.2 PŘÍSTOJE

Velikost připravených mikročástic fosforečnanu vápenatého byla změřena na laserovém granulometru Analysette 22 MicroTec plus (Fritsch, Německo) s rozsahem měření 0,08-2000 μm . Tvar částic fosforečnanu vápenatého byl zjištěn na transmisním elektronovém

mikroskopu JEM 2010 (Jeol, Japonsko) s urychlovacím napětím 160 kV.

Disperze stříbrných nanočástic byla analyzována pomocí UV/VIS spektroskopie na přístroji Specord S 600 firmy Analytik Jena (Německo). Velikost nanočástic stříbra byla změřena pomocí přístroje, který pracuje na principu DLS Zeta potential Analyzer Zeta Plus od firmy Brookhaven Instruments Corporation (USA)

Připravené kompozity byly snímkovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEM 2010 (Jeol, Japonsko) a pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Hitachi SU6600 (Japan). Kvalitativní analýza byla provedena pomocí energiově-disperzního spektrometru Thermo Scientific NORAN System 7 X-ray Microanalysis System.

U připravených kompozitů byla otestována antibakteriální aktivita vůči standardní sadě patogenních bakterií na Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc. Obsah stříbra v kompozitech byl stanoven po rozkladu v kyselině dusičné pomocí atomové absorpční spektroskopie na spektrofotometru ContrAA 300 (Analytik Jena, Německo).

3.3 EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

PŘÍPRAVA HYDROXYAPATITU

Příprava mikročástic hydroxyapatitu probíhala podle následujícího postupu. Nejprve byl připraven roztok dusičnanu vápenatého rozpuštěním 11,8072 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého v 50 ml odměrné baňce a doplněním po rysku destilovanou vodou (koncentrace připraveného roztoku je 1 mol/l).

Dále byl připraven roztok hydrogenfosforečnanu diamonného rozpuštěním 3,9617 g pevné látky v 50 ml odměrné baňce a doplněním po rysku destilovanou vodou (koncentrace vzniklého roztoku je 0,6 mol/l). 50 ml roztoku dusičnanu vápenatého bylo nalito do varné baňky. Následně byl do baňky po kapkách, za míchání na magnetické míchačce s ohřevem

(typ D – 55122, SI analytics GmbH, Německo), přidán celý objem připraveného roztoku fosforečnanu diamonného za vzniku bílé sraženiny.

Pomocí vodného roztoku amoniaku se upravilo pH výsledné suspenze na 10,5. Po úpravě pH byl na varnou baňku nasazen zpětný kuličkový chladič, pod nímž byla směs míchána při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin.

Hydroxyapatit byl připraven ve čtyřech verzích. Jeden čistý a tři, které byly na povrchu modifikovány povrchově aktivními látkami (SDS, TWEEN, CPB).

Uvedené povrchově aktivní látky byly přidány již do roztoku hydrogenfosforečnanu amonného při přípravě hydroxyapatitu. Bylo naváženo 0,2884 g SDS, 1,1280 g TWEEN, 0,3400 g CPB.

Výsledná suspenze byla bílá. Koncentrace povrchově aktivních látek suspenzi byla 0,01 mol/l, koncentrace hydroxyapatitu byla 1,8 mol/l.

PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Do kádinky umístěné na magnetické míchačce bylo napipetováno 12,75 ml destilované vody. K destilované vodě bylo dále napipetováno 5 ml dusičnanu stříbrného o koncentraci 0,00495 mol/l, 1,25 ml vodného roztoku amoniaku o koncentraci 0,3429 mol/l, 1 ml hydroxidu sodného o koncentraci 0,2390 mol/l a 5 ml roztoku maltosy o koncentraci 0,5000 mol/l. Maltosa slouží jako redukční činidlo. Směs byla na míchačce intenzivně míchána do změny barvy (zhnědne), což indikuje konec reakce. Koncentrace koloidních částic stříbra v roztoku byla 0,001 mol/l.

PŘÍPRAVA KOMPOZITŮ

Kompozity hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra byly syntetizovány 2 způsoby – adsorpčně a redukčně.

Redukční způsob tkvěl v tom, že se 12,5 ml předem připravených suspenzí hydroxyapatitů (kapitola 3.3 - příprava hydroxyapatitu) napipetovalo namísto vodného podílu do kádinky umístěné na magnetické míchačce. Dále byl postup téměř totožný s přípravou samotných nanočástic stříbra (kapitola 3.3 - příprava nanočástic stříbra). Rozdíl spočíval v

použitým redukčním činidlem. Namísto maltosy byla použita kyselina askorbová, která je silnějším redukčním činidlem. Maltosa se ukázala v prvních experimentech jako příliš slabé redukční činidlo pro redukcí nanočástic stříbra na povrchu mikročástic HAP .

Adsorpční způsob syntézy byl uskutečněn tak, že se 25 ml předem připravené disperze nanočástic stříbra (vizte kapitola 3.3 – příprava nanočástic stříbra) smíchalo v Erlenmayerově baňce s 25 ml suspenze mikročástic HAP (kapitola 3.3 – příprava HAP). Baňka byla umístěna do orbitálního rotátoru na 2 hodiny.

Vzniklý kompozit byl poté zfiltrován pomocí Büchnerovy nálevky a odsávací baňky přes filtrační papír s velikostí pórů 0,2 μm . Vysušený filtrát byl užíván na další analýzy.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

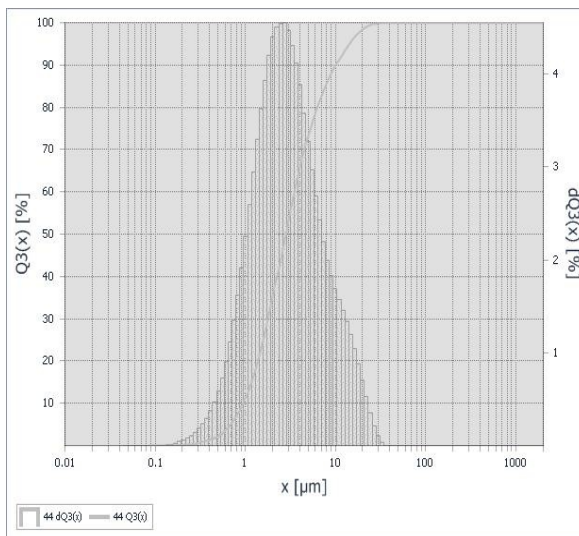
4.1 ROZPTYL SVĚTLA (RS)

Všechny disperze mikročástic HAP byly ihned po přípravě charakterizovány na granulometru Analysette 22, pracujícím na principu rozptylu světla. Pro měření velikosti částic HAP bylo do přístroje napipetováno 0,5 ml od každé verze hydroxyapatitu, vzniklého při syntéze (vizte kapitola 3.3 – příprava hydroxyapatitu). Výsledky těchto měření jsou uvedeny na obr. 8-11.

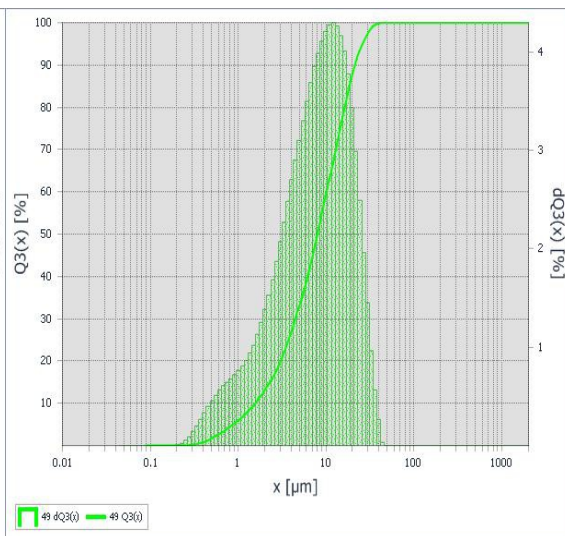
Z obr. 8 vyplývá, že nejčtenější velikosti částic HAP nemodifikovaného povrchově aktivními látkami jsou v intervalu velikostí 1 – 10 μm . U HAP modifikovaného CPB se nejčastěji vyskytují částice o velikosti 5 – 10 μm (obr. 9), u HAP modifikovaného SDS v intervalu 8 – 50 μm (obr. 10) a u HAP modifikovaného TWEEN v intervalu velikostí 10 – 70 μm (obr. 11).

Na obr. 12 jsou znázorněny všechny 4 připravené disperze mikročástic HAP porovnané v rámci distribuce velikostí částic

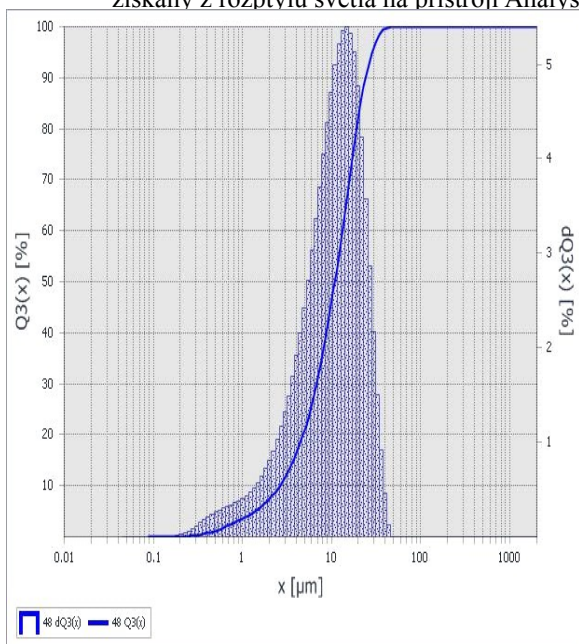
Rozdíl velikosti částic různě modifikovaných hydroxyapatitů je způsoben užitím povrchově aktivních látek a pravděpodobně kvůli specifické adsorpci těchto látek na povrchu rostoucích částic dochází k ovlivnění kinetiky jejich růstu a tím pádem i k ovlivnění jejich výsledné velikosti



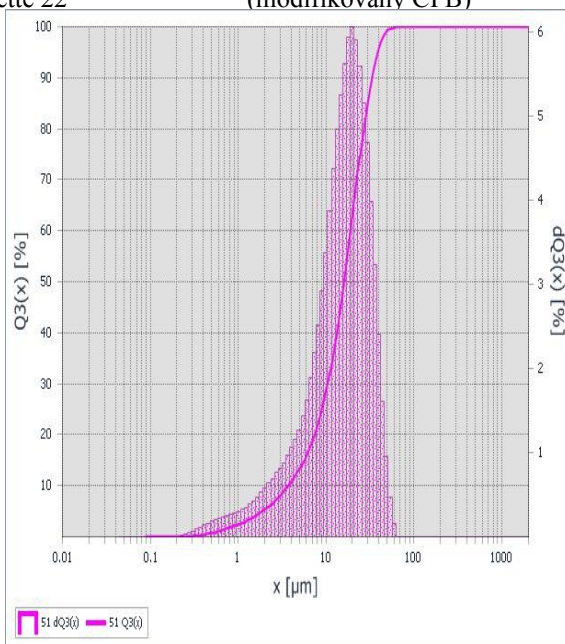
Obr. 8: Distribuční diagram velikosti mikročastic nemodifikovaného HAP získaný z rozptylu světla na přístroji Analysette 22



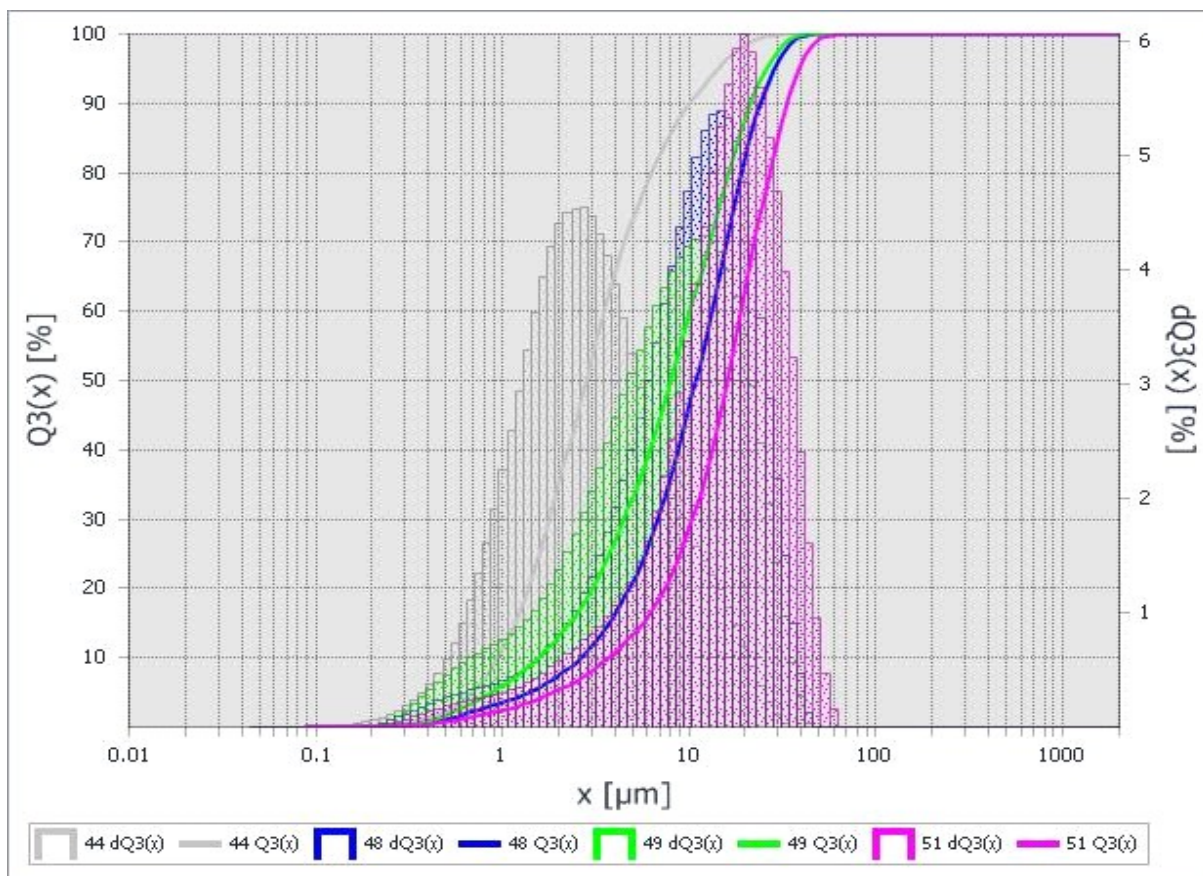
Obr. 9: Distribuční diagram velikosti mikročastic HAP (modifikovaný CPB)



Obr. 10: Distribuční diagram velikosti mikročastic HAP (modifikovaný SDS)



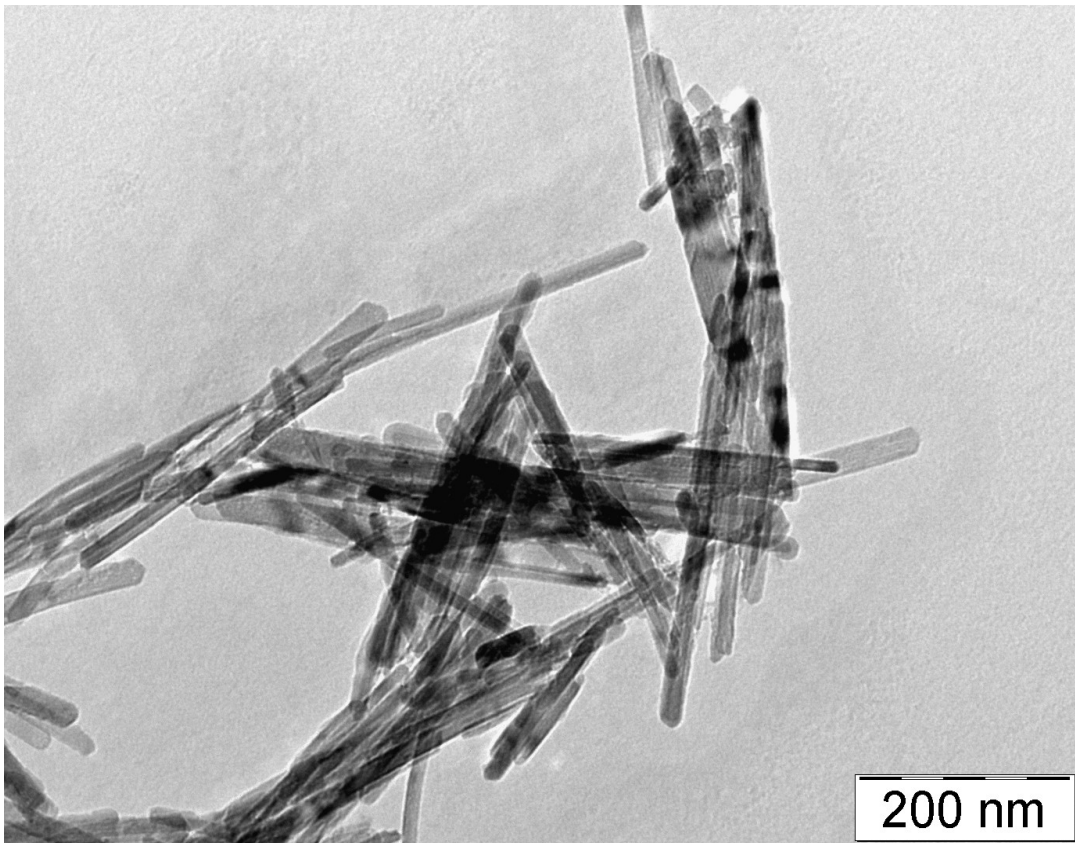
Obr. 11: Distribuční diagram velikosti mikročastic HAP (modifikovaný TWEEN)



Obr.12: Porovnání distribuce částic u různých apatitů

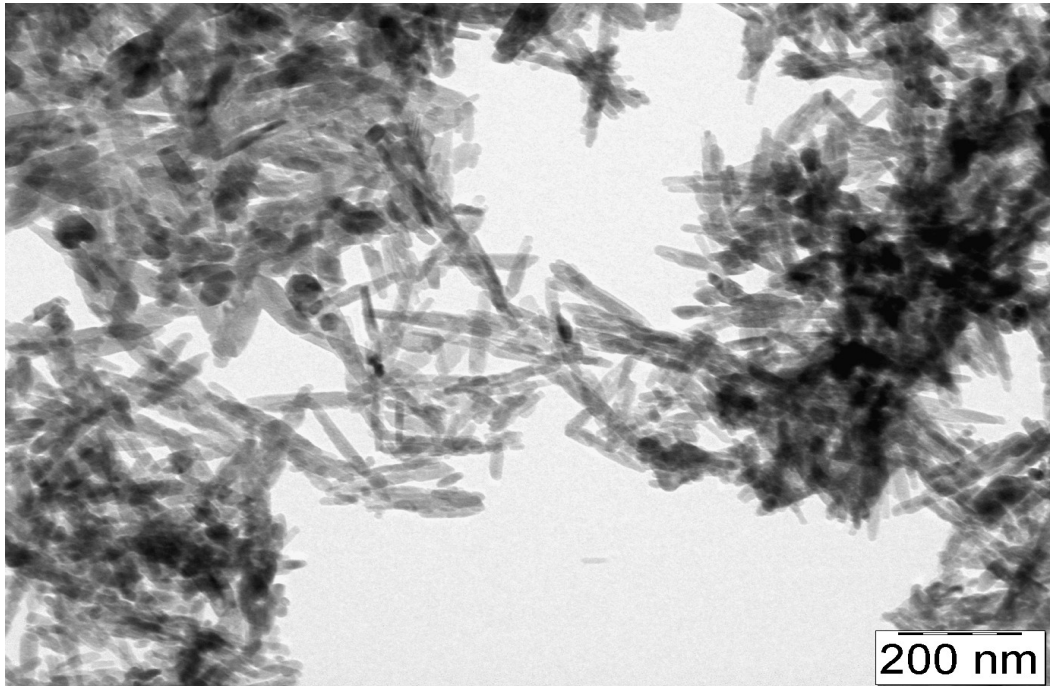
4.2 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSPIE HYDROXYAPATITU

Na analýzu pomocí TEM bylo od každého předem připraveného HAP odebráno 0,1 ml a napipetováno do 50 ml odměrné baňky. Vzorky byly v baňkách doplněny po rysku a dodány a po tomto naředění nakápnuty na nosnou síťku pro elektronovou mikroskopii. Po zaschnutí byly síťky se vzorky prohlédnuty v elektronovém mikroskopu. Příslušné snímky jsou uvedeny na následujících obrázcích



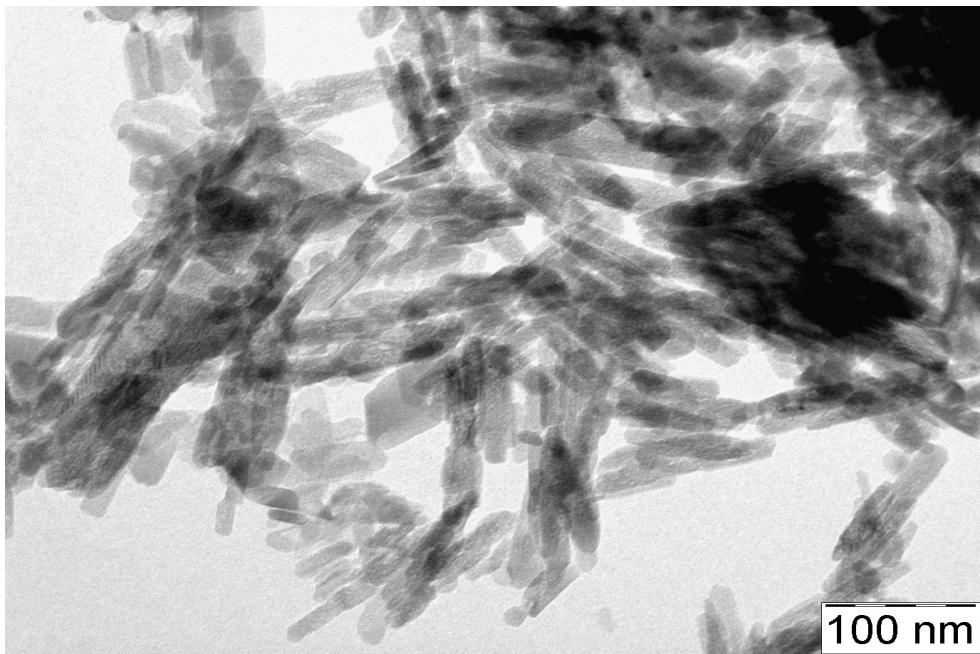
Obr. 13: TEM snímek povrchově aktivními látkami nemodifikovaného hydroxyapatitu

Z obrázku 13 je patrné, že povrchově aktivní látkou nemodifikovaný HAP má částice ve tvaru tyčinek, které jsou převážně úzké a dlouhé, přibližně o rozměrech 2 μm na délku a 80 nm v průměru.



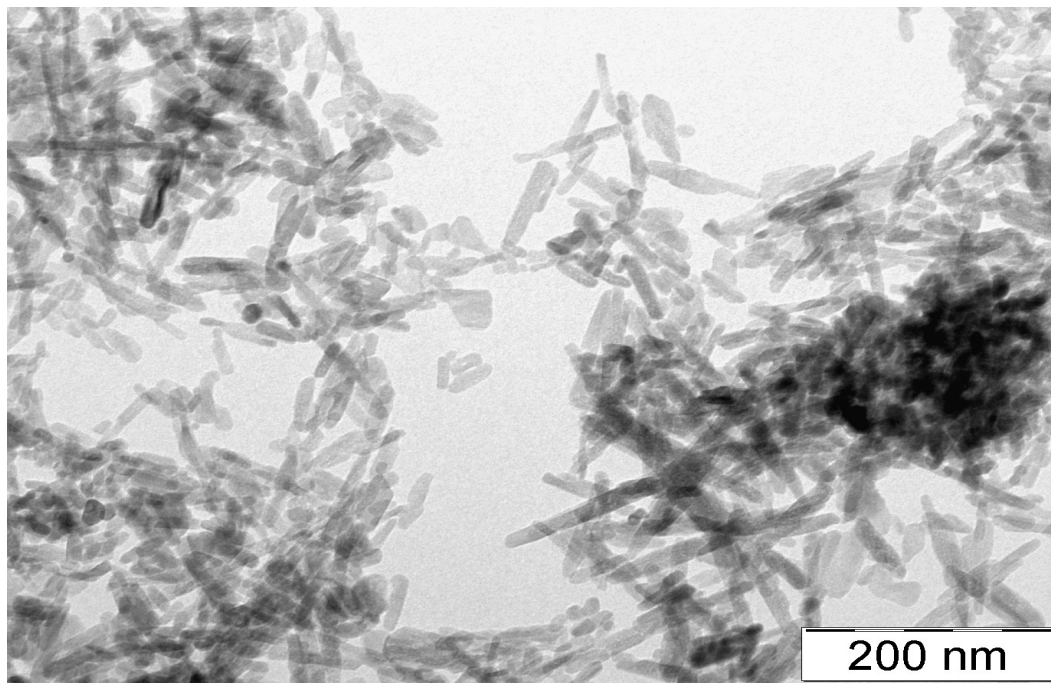
Obr.14: TEM snímek HAP modifikovaného CPB

Z obr. 14 je patrné, že tvar částic HAP modifikovaných CPB je tyčinkovitý, stejně jako u čistého HAP (vizte obr. 13). Přibližné rozměry částic, viditelných na obr. 14, jsou 1 μm na délku a 120 nm v průměru



Obr. 15: TEM snímek HAP modifikovaného SDS

Na obr. 15 je možno vidět, že částice HAP modifikovaného SDS již nemají tyčinkovitý tvar, ale spíš elipsoidní. Přibližné rozměry jsou v tomto případě 0,5 μm na délku a 150 nm v průměru



Obr. 16: TEM snímek HAP modifikovaného TWEEN

Na obr. 16 lze vidět, že částice modifikované TWEEN mají nejméně pravidelné tvary. Vyskytují se zde tvary částic od kulovitý přes tyčinkovité až po nepravidelné útvary neurčitého tvaru. Rozměry těchto částic se pohybují od 0,5 μm do 2 μm na délku a od 80 nm do 120 nm v průměru.

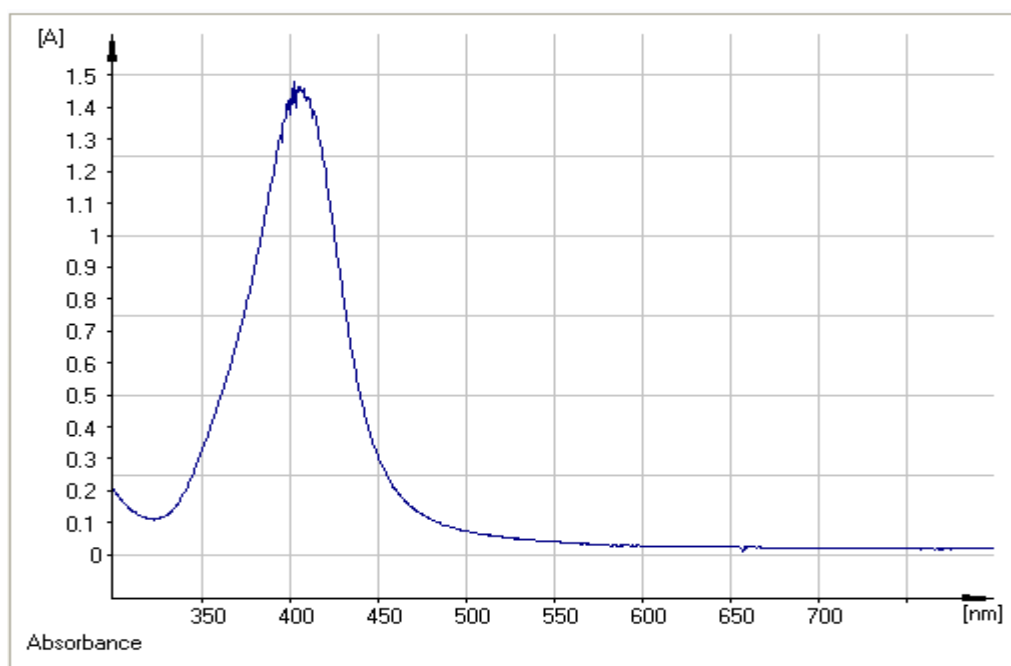
4.3 DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA A UV/VIS SPEKTROSKOPIE

V rámci studia připravené disperze nanočástic stříbra byla studována velikost částic pomocí dvou technik – DLS a UV/VIS spektroskopii. Velikost částic se v případě UV/VIS určuje podle polohy absorpčního maxima. Výsledky DLS jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka I) a UV/VIS spektrum na obr. 17

Tabulka I: Velikosti a polydisperzita nanočástic stříbra

Velikost (nm)	Polydisperzita
31,5	0,203
31,1	0,149
30,7	0,181

V tabulce I jsou uvedeny hodnoty velikostí částic, změřené pomocí DLS a také jsou zde uvedeny hodnoty polydisperzity.



Obr. 17: UV/VIS spektrum nanočástic stříbra

Na obr. 17 je zobrazeno UV/VIS spektrum nanočástic stříbra. Hodnota absorpčního maxima leží nad 400 nm. Tato hodnota potvrzuje hodnoty velikosti částic změřené pomocí DLS.

4.4 STANOVENÍ OBSAHU STŘÍBRA V KOMPOZITECH POMOCÍ ATOMOVÉ ABSORČNÍ SPEKTROSKOPIE (AAS)

Pro stanovení obsahu stříbra v kompozitech bylo naváženo a kvantitativně převedeno 0,0100 g každého kompozitu do 10 ml odměrných baněk. K vzorkům v odměrných baňkách byl přidán 1 ml kyseliny dusičné na mineralizaci a po rozpuštění

kompozitu byly baňky doplněny destilovanou vodou po rysku.

AAS není metodou absolutní, tudíž byla nejdříve změřena kalibrační přímka, složená z blanku a 4 kalibračních standardů. Primární výsledek obsahu stříbra v kompozitu z AAS v jednotkách v mg/l byl přepočítán na obsah stříbra v mg na 1 g kompozitu. Tyto přepočítané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka II).

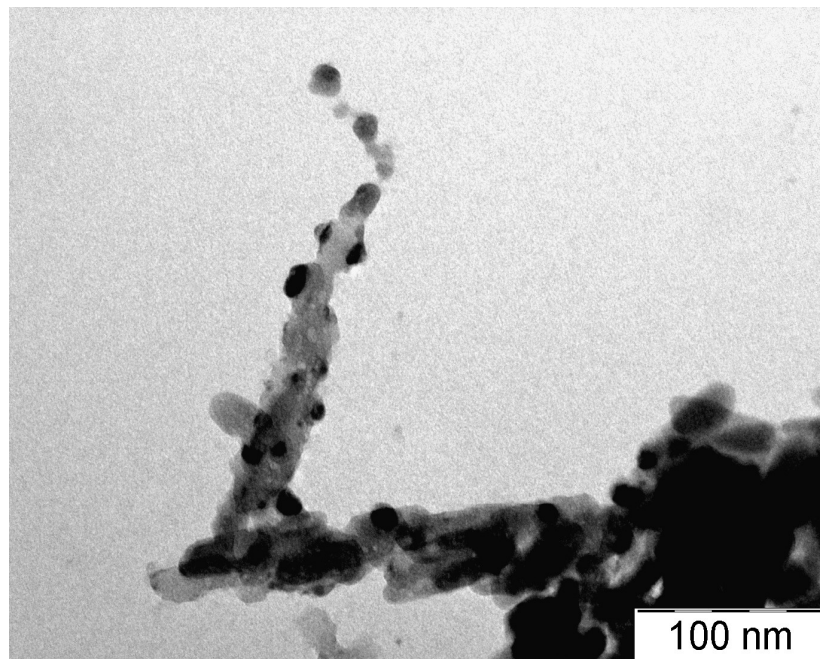
Tabulka II: Obsah stříbra v mg/g kompozitu nanoAg@HAP

Typ kompozitu	Obsah stříbra (mg/g)
HAP (nemodifikovaný)	6,4
HAP (modifikovaný CPB)	778,9
HAP (modifikovaný SDS)	154,4
HAP (modifikovaný TWEEN)	168,6

Z tabulky II vyplývá, že nejvyšší obsah stříbra byl v kompozitu HAP modifikovaný CPB. Důvodem pro tento výsledek je pravděpodobně fakt, že CPB obsahuje dusíkový heteroatom, o němž je známo, že jakožto Lewisovská báze velmi silně interaguje s ionty či atomy stříbra, které jsou naopak Lewisovskou kyselinou. Naopak nejmenší množství stříbra bylo nalezeno v kompozitu, kde HAP nebyl modifikován žádnou povrchově aktivní látkou. Evidentně tak povrchová úprava mikročástic HAP libovolným typem povrchově aktivní látky zvyšuje schopnost povrchu vázat nanočástice stříbra.

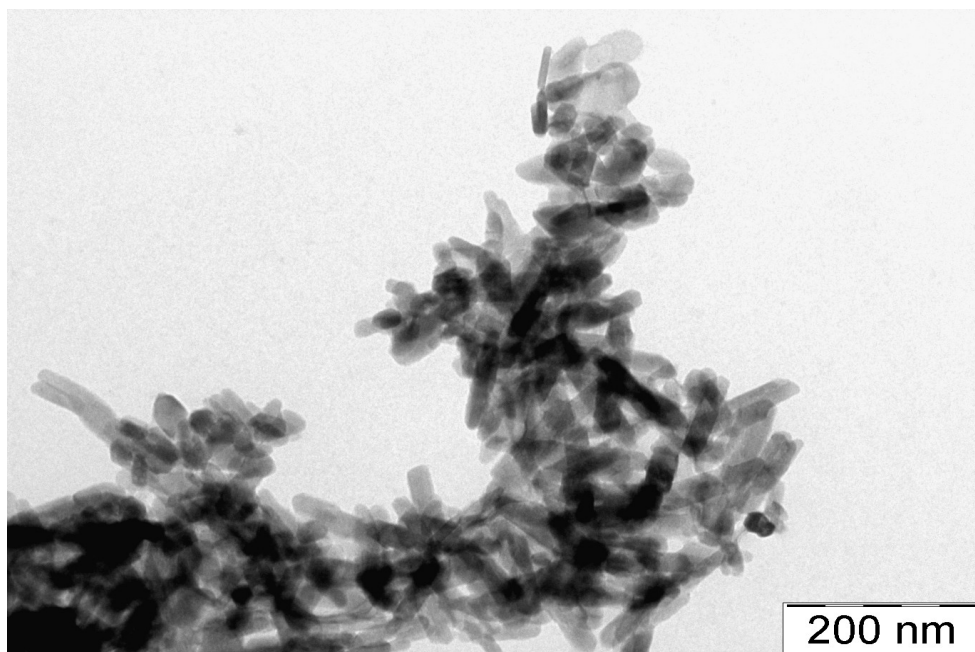
4.5 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSPÍE KOMPOZITŮ

Pro pořízení snímků pomocí TEM bylo od každého kompozitu napipetováno 0,5 ml suspenze do 50 ml odměrné baňky a doplněno po rysku.

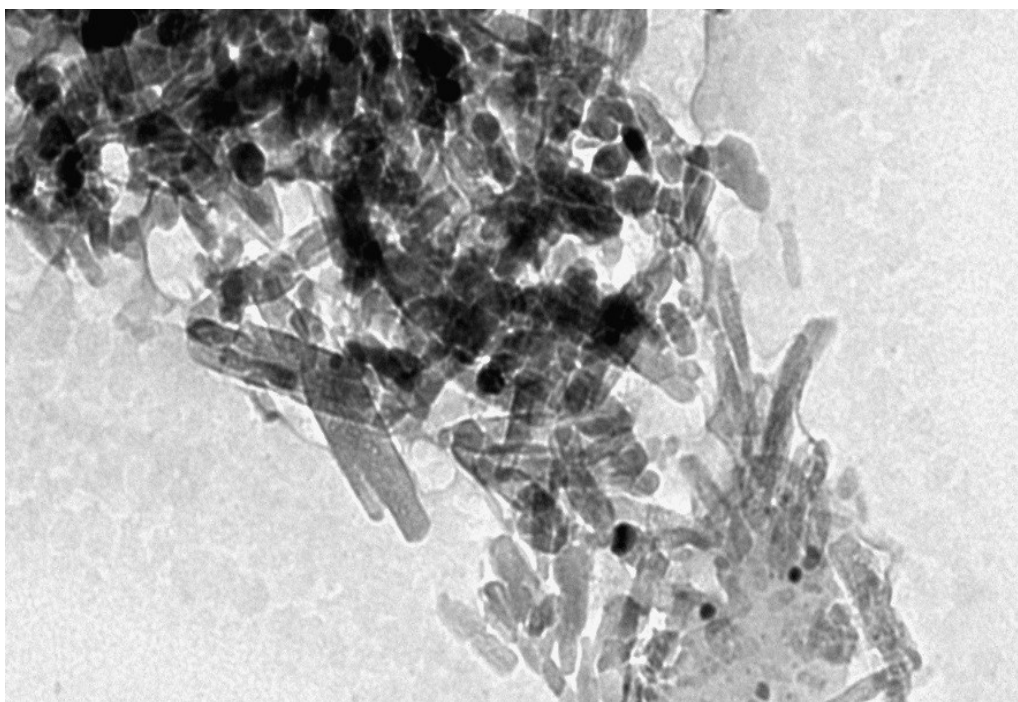


Obr. 18: TEM snímek kompozitu HAP (povrchově aktivní látkou nemodifikovaný) s nanočásticemi stříbra

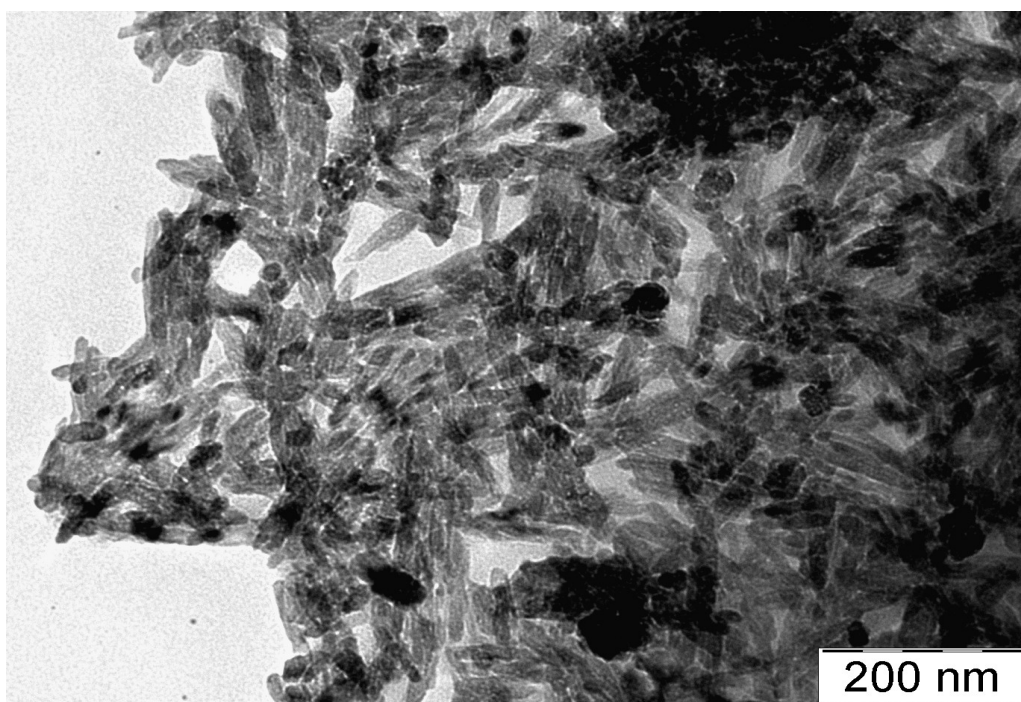
Na snímku pořízeném pomocí TEM (obr. 19) lze vidět nanočástice stříbra, které se jeví jako černé tečky, na částicích nemodifikovaného HAP (šedé tyčinky). Naředěná disperze byla nakápnuta na mikroskopickou síťku a po vysušení byla podrobena mikroskopickému zkoumání



Obr. 19: TEM snímek kompozitu HAP (modifikovaného SDS) s nanočásticemi stříbra



Obr. 20: TEM snímek kompozitu HAP (modifikovaný TWEEN) s nanočásticemi stříbra



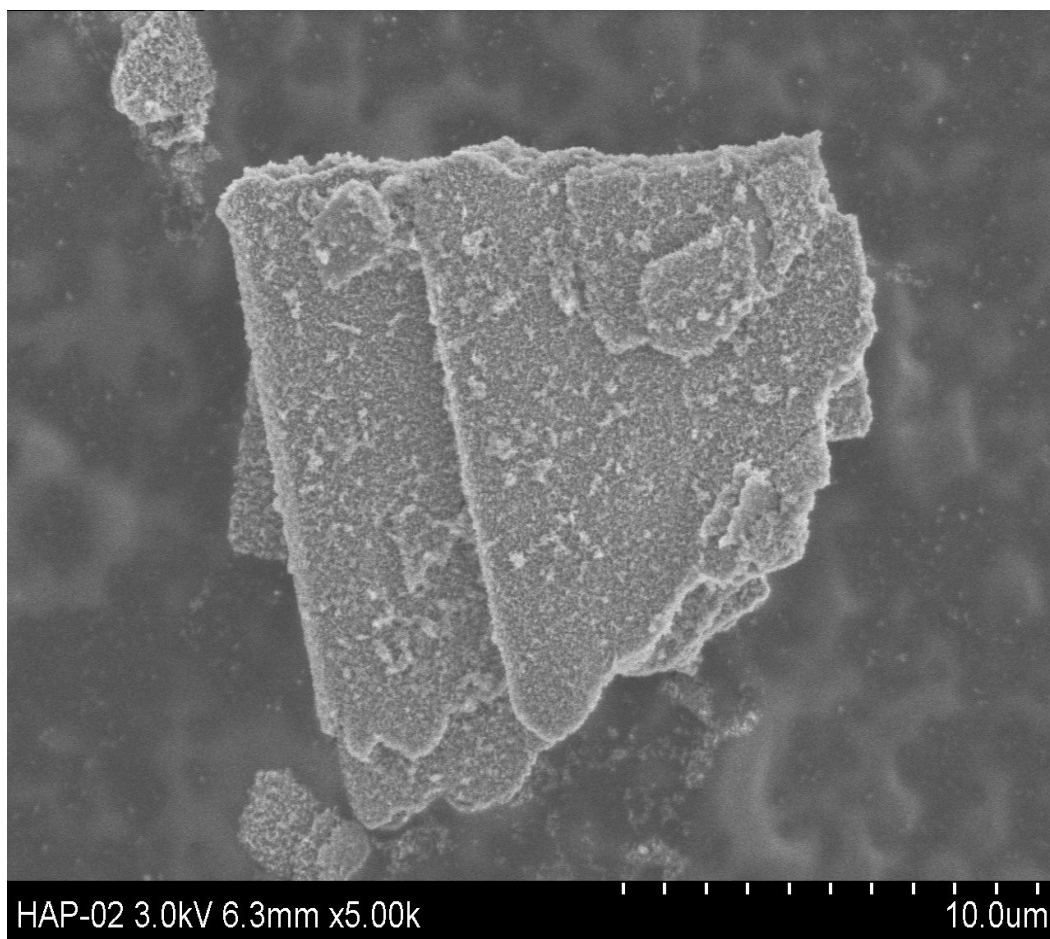
Obr. 21: TEM snímek kompozitu HAP(modifikovaný CPB) s nanočásticemi stříbra

Na obr. 19 – 21 lze vidět snímky pořízené pomocí TEM, dokumentující přítomnost nanočástic stříbra v kompozitu . Nanočástice stříbra jsou patrné na snímcích kompozitů jako

černé skvrny kulovitěho tvaru, menších rozměrů než částice HAP, zbarveny šedě.

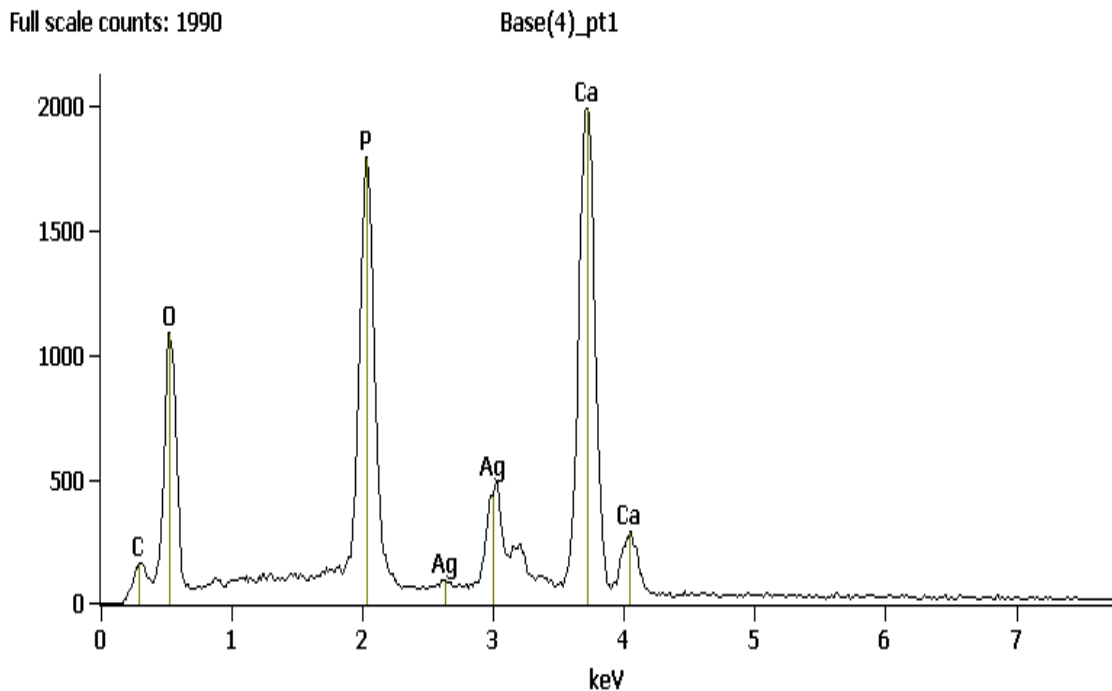
4.6 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE KOMPOZITŮ A ENERGIOVĚ-DISPERZNÍM ANALÝZA

Pro analýzu kompozitů pomocí SEM byly vzorky kompozitů přefiltrovány pomocí Büchnerovy nálevky a odsávací baňky přes filtrační papír s velikostí pórů 0,2 μm a vysušeny v sušárně při teplotě 95 $^{\circ}\text{C}$.



Obr. 22: SEM snímek kompozitu HAP (nemodifikovaný povrchově aktivními látkami) s nanočásticemi stříbra

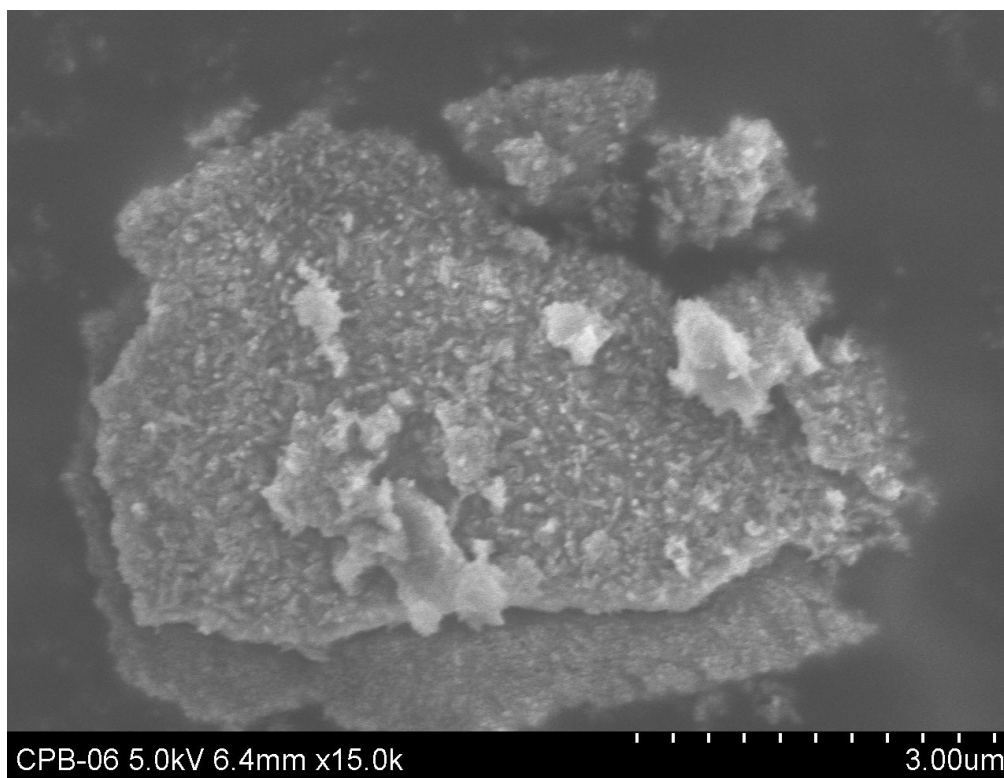
Na snímku (obr. 22) lze vidět částice HAP, na kterou se naadsorbovaly nanočástice stříbra. Stříbro se jeví jako světlejší tečky, a to z důvodu odražení většího množství elektronů od povrchu nanočástic stříbra.



Obr. 23: Graf EDS – prvkové zastoupení v kompozitu HAP (nemodifikovaném povrchově aktivními látkami) s nanočásticemi stříbra

Na obr. 23 je vyobrazeno prvkové zastoupení kompozitu HAP s nanočásticemi stříbra, které bylo pořízeno pomocí techniky EDS. Na ose x je vyobrazeno napětí v keV a na ose y je znázorněna odezva.

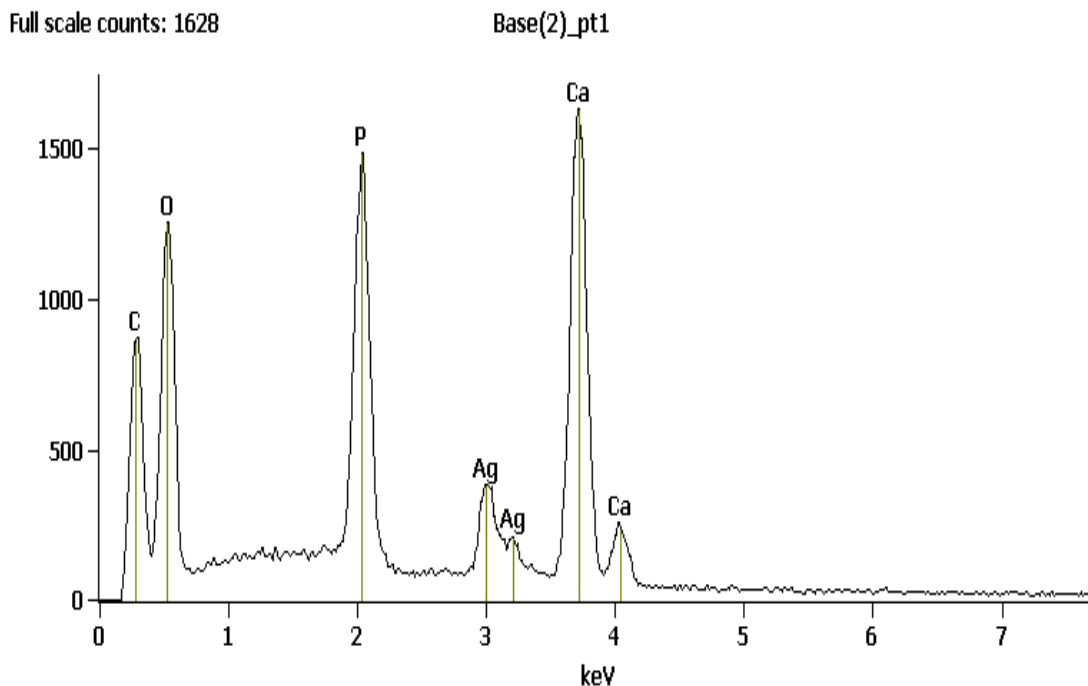
Jelikož není EDS kvantitativní metoda, není možno z grafu vyčíst množství naadsorbovaného stříbra. Množství stříbra v kompozitech bylo stanoveno metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) (kapitola 4.4).



Obr. 24: SEM snímek kompozitu HAP (modifikovaný CPB) s nanočásticemi stříbra

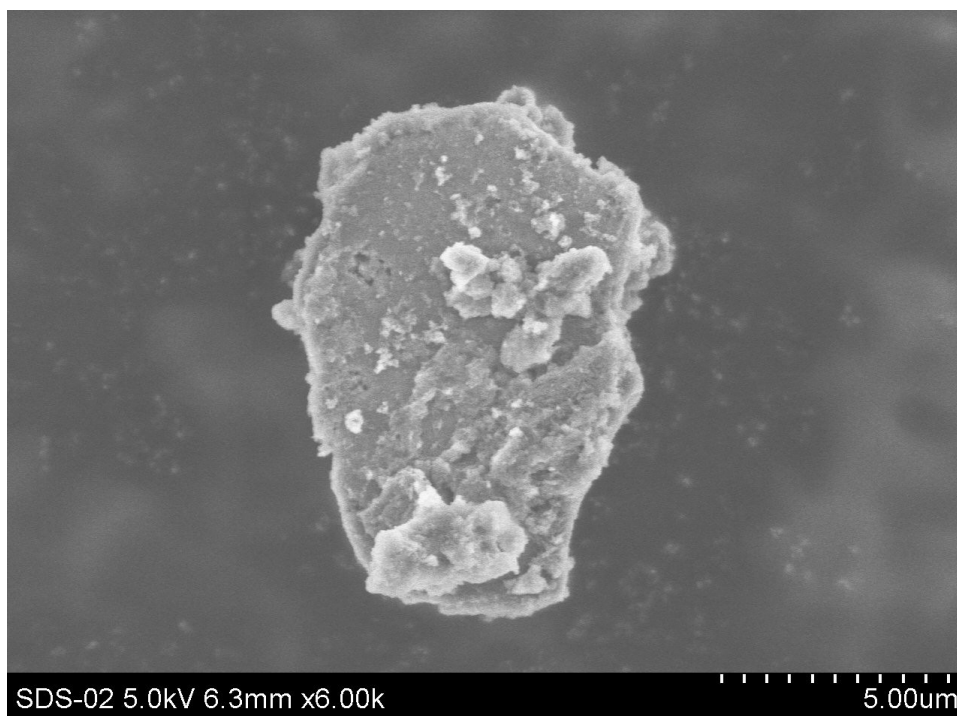
Na obr. 24 je vyobrazen snímek kompozitu HAP (modifikovaného CPB). Narozdíl od kompozitu HAP (povrchově aktivními látkami nemodifikovaného) s nanočásticemi stříbra (obr. 22) je na obr. 24 patrné, že nanočástice stříbra se na povrch HAP naadsorbovaly více.

Zvýšená adsorpce nanočástic stříbra na povrch HAP byla pravděpodobně způsobena přítomností CPB, což je kationická povrchově aktivní látka a má tedy opačný náboj než nanočástice stříbra. Navíc zde pozitivně působí interakce dusíkové heteroatomu s Ag, jak již bylo diskutováno dříve.



Obr. 25: Graf EDS – prvkové zastoupení v kompozitu HAP (modifikovaný CPB) s nanočásticemi stříbra

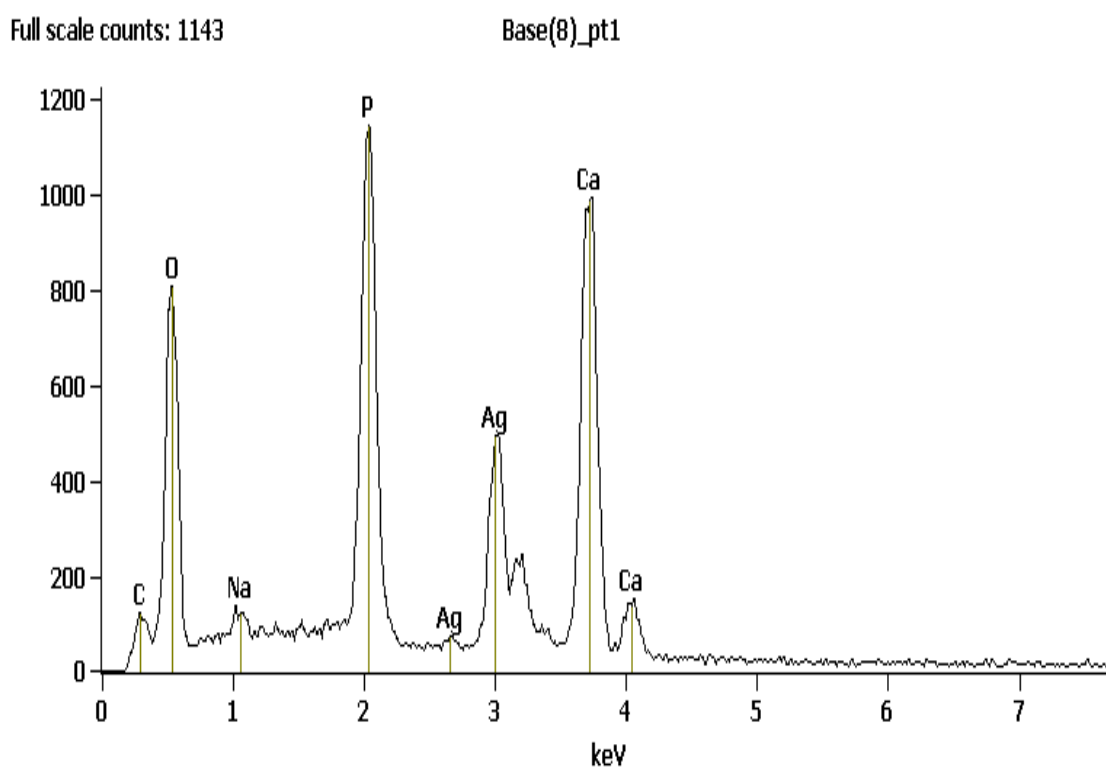
Obr. 25 poskytuje informace o prvcích přítomných ve vzorku kompozitu HAP (modifikovaný CPB) s nanočásticemi stříbra. Na ose x je napětí v keV a na ose y signál.



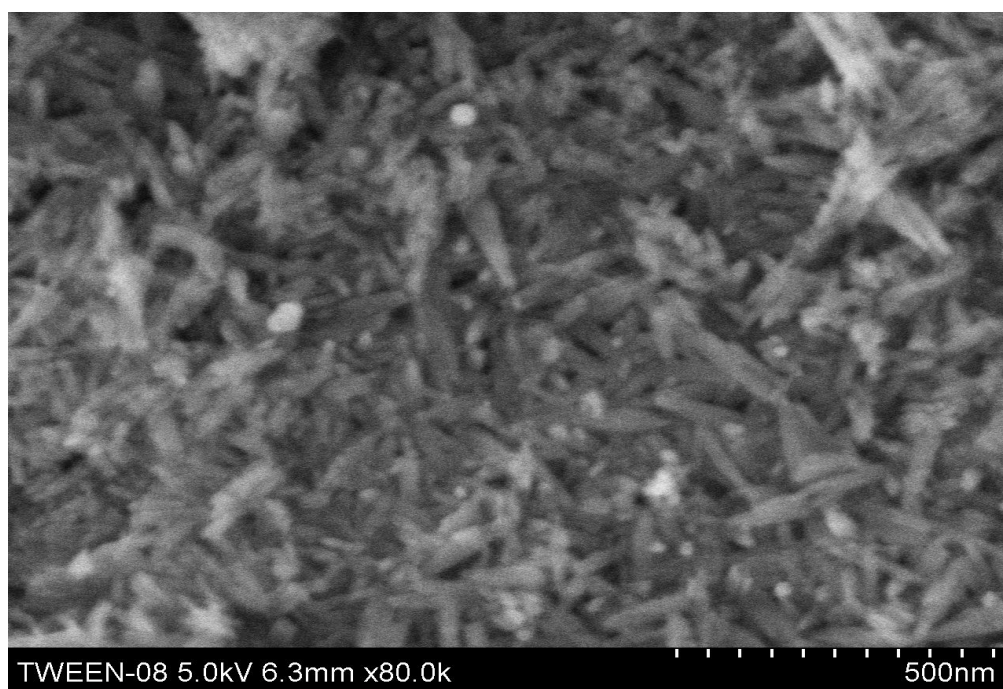
Obr. 26: SEM snímek kompozitu HAP (modifikovaný SDS) s nanočásticemi stříbra

Na obr. 26, na kterém je vyobrazen kompozit HAP (modifikovaný SDS) s nanočásticemi stříbra, je patrné že adsorpce nanočástic stříbra není tak markantní jako v případě kompozitu HAP (modifikovaného CPB) a stříbra (obr. 24).

Adsorpce nanočástic stříbra na tento HAP (modifikovaný SDS) je větší než na povrchově aktivními látkami nemodifikovaný HAP. Tento jev byl pravděpodobně způsoben snížením povrchového napětí HAP pomocí tenzidu (SDS), tudíž se nanočástice adsorbovaly lépe. Důležitou roli hraje v případě tohoto tenzidu i jeho sulfátová funkční skupina, zvyšující interakci této molekuly s atomy stříbra.

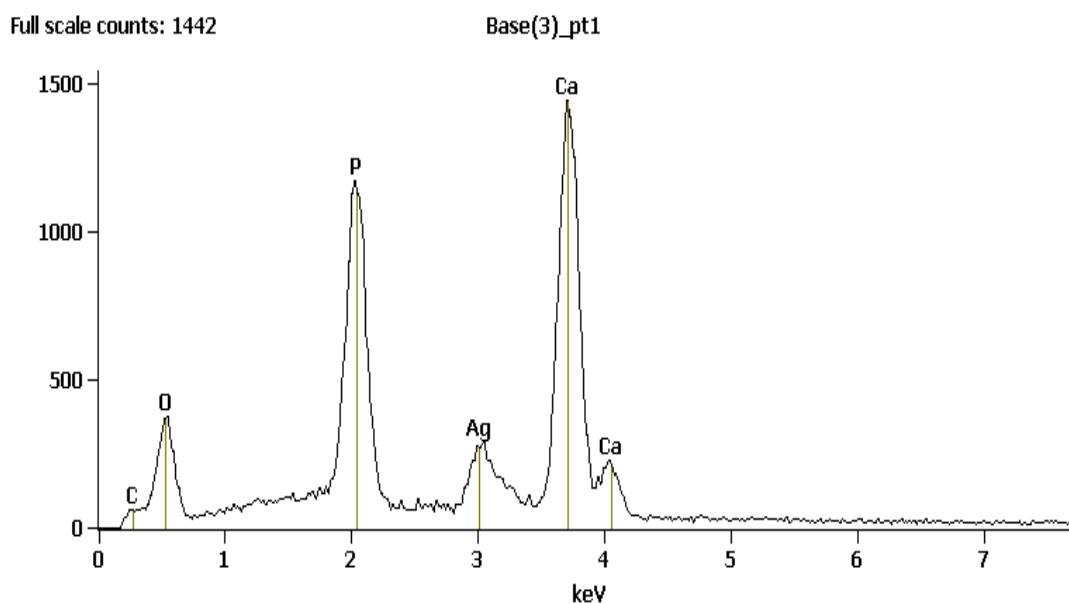


Obr. 27: Graf EDS – prvkové zastoupení v kompozitu HAP (modifikovaný SDS) s nanočásticemi stříbra



Obr. 28: SEM snímek kompozitu HAP (modifikovaný TWEEN) s nanočásticemi stříbra

Na obr. 28 lze vidět HAP modifikovaný tenzidem TWEEN. V tomto případě je výskyt nanočástic stříbra v kompozitu v obdobném množství jako u kompozitu HAP, modifikovaného SDS, s nanočásticemi stříbra (kapitola 4.4 – stanovení obsahu stříbra)



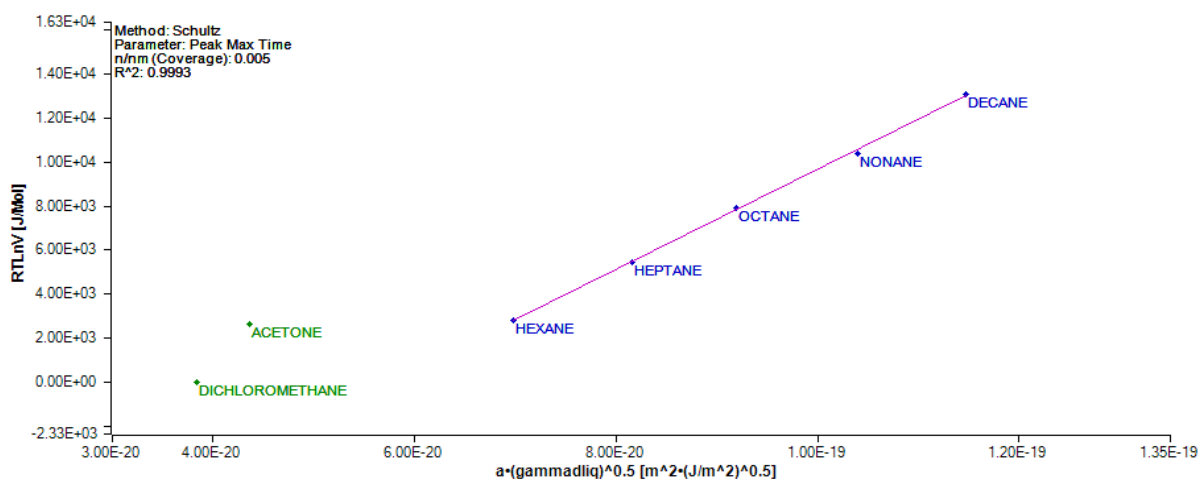
Obr. 29: Graf EDS – prvkové zastoupení v kompozitu HAP (modifikovaný TWEEN) s nanočásticemi stříbra

Výskyt uhlíku na grafech 3 – 6 je zapříčiněn prostředím neboť analýza byla provedena na nosné síťce s uhlíkovou vrstvou

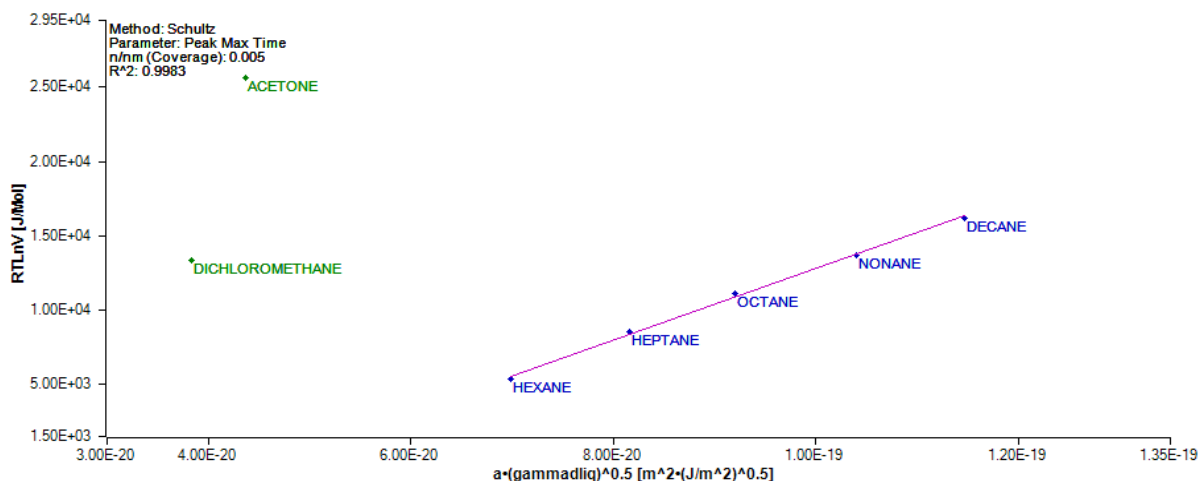
4.7 ZMĚNA POVRCHOVÉ ENERGIE

V rámci studia vlastností připravených kompozitů byla za využití metody inverzní plynové chromatografie studována povrchová energie studovaných práškových materiálů a rovněž acido-bazické vlastnosti jejich povrchu. Pro toto časově náročné měření byl vybrán kompozit nanoAg@HAP připravený v přítomnosti tenzidu CPB, u něhož bylo metodou AAS zjištěno největší množství stříbra ze všech připravených kompozitů. Vzorek kompozitu byl připraven pro toto měření v práškové podobě po zfiltrování a vysušení

Získané výsledky jsou prezentovány na obr. a příslušné hodnoty v Tabulce III.



Obr. 30: Graf Gibbsovy energie adsorpce ($\Delta G=RT \ln V$) pro adsorpci par použitých testovacích rozpouštědel na povrchu mikročástic HAP připraveného v přítomnosti tenzidu CPB



Obr. 31: Graf Gibbsovy energie adsorpce ($\Delta G=RT\ln V$) pro adsorpci par použitých testovacích rozpouštědel na povrchu mikročástic kompozitu HAP a nanočástic stříbra. HAP byl připraven v přítomnosti tenzidu CPB.

Tabulka III: Parametry charakterizující stav povrchu výchozích mikročástic HAP a kompozitu HAP s nanočásticemi stříbra pro případ modifikace tenzidem CPB.

Látka/parametr	γ^d [mJ/m ²]	K_a	K_b	K_a/K_b
Ca ₃ (PO ₄) ₂	35,4	0,042	0,265	0,158
Ag@Ca ₃ (PO ₄) ₂	39,8	0,233	0,941	0,25

kde γ^d je disperzní složka povrchové energie testovaného materiálu, K_a konstanta acidity a K_b konstanta bazicity povrchu podle Gutmannovy teorie.

Získané výsledky prokazují zásadní změnu povrchových vlastností HAP při jeho kombinaci s nanočásticemi stříbra v kompozitu. Výchozí HAP je z pohledu hodnot Gutmanových čísel acidity a bazicity slabou Lewisovou bází. Ovšem modifikace jeho povrchu nanočásticemi stříbra významně mění jeho chování. Na základě cca 5násobného nárůstu hodnot Gutmanových čísel acidity a bazicity oproti původnímu fosforečnanu vápenatého lze usuzovat na prudké zvýšení polaritu kompozitu oproti výchozímu HAP.

Současně dochází ke sblížení kyselých a bazických vlastností kompozitu, i když bazicita nadále převládá. Vzrůst kyselosti kompozitu oproti výchozímu HAP velmi pravděpodobně souvisí s přítomností nanočástic stříbra, které lze obdobně jako kovové stříbro charakterizovat jako slabou Lewisovu kyselinu. Vzhledem k obsahu stříbra v kompozitu je ale tento vliv minoritní a v kompozitu nadále převládá acido-bazický

charakter výchozího HAP.

4.8 BIOLOGICKÁ AKTIVITA KOMPOZITŮ NANOAg@HAP

K testování biologické aktivity byly použity vzorky kompozitů (kapitola 3.3). Vzorky byly připraveny roztředněním 0.05 g přefiltrovaného a vysušeného kompozitu v 10 ml destilované vody.

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky biologické aktivity vůči sadě bakterií. 1, 2 jsou standardy (1 je AgNO₃, 2 jsou čisté nanočástice stříbra o velikosti 30 nm).

Tabulka IV: Antimikrobiální účinnost vzorků

	Inhibice růstu									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Enterococcus faecalis CCM 4224	≥128	8	8	8	≥128	≥128	8	8	4	4
Staphylococcus aureus CCM 3953	≥128	64	-	-	≥128	≥128	-	-	-	-
Escherichia coli CCM 3954	64	16	-	-	64	64	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	≥128	64	-	-	8	8	4	8	-	-
Pseudomonas aeruginosa	≥128	64	-	-	8	8	4	4	-	-
Staphylococcus epidermidis 1	64	64	-	-	≥128	≥128	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis 2	64	64	-	-	≥128	≥128	-	-	N	N
Staphylococcus aureus (MRSA)	64	8	-	-	32	32	-	-	-	-
Enterococcus faecium (VRE)	≥128	8	-	-	≥128	≥128	8	8	-	-
Klebsiella pneumoniae (ESBL)	≥128	32	-	-	32	32	8	8	2	2

Vystvětlení popisů:

„-“ *inhibice růstu neprokázána*

„N“ *nelze hodnotit*

V tabulce uvedená čísla:

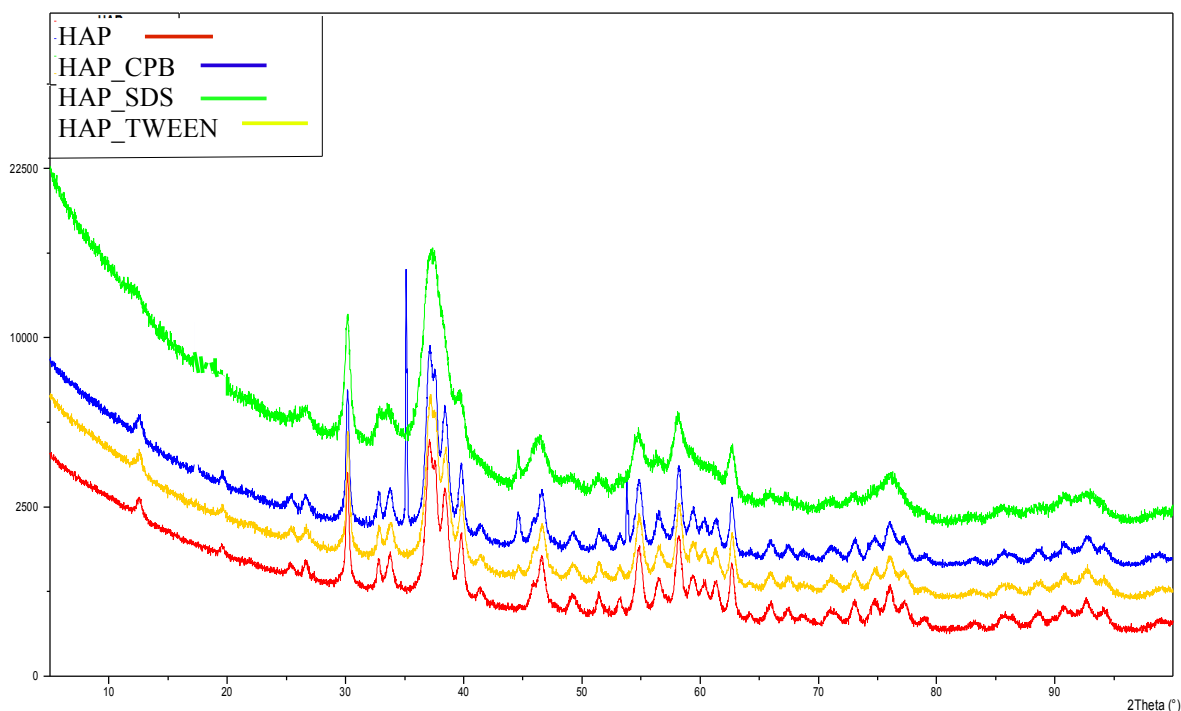
- 1 – Nanočástice stříbra (kapitola 3.3 – příprava nanočástic stříbra).
- 2 – Dusičnan stříbrný (koncentrace 10^{-3} mol/l)
- 3 – HAP s nanočásticemi stříbra
- 4 – HAP s nanočásticemi stříbra pokus 2
- 5 – HAP s povrchem modifikovaným CPB s nanočásticemi stříbra
- 6 – HAP s povrchem modifikovaným CPB s nanočásticemi stříbra, pokus 2
- 7 – HAP s povrchem modifikovaným SDS s nanočásticemi stříbra
- 8 – HAP s povrchem modifikovaným SDS s nanočásticemi stříbra, pokus 2
- 9 – HAP s povrchem modifikovaným TWEEN s nanočásticemi stříbra
- 10 – HAP s povrchem modifikovaným TWEEN s nanočásticemi stříbra, pokus 2

Z uvedené tabulky (tabulka III) vyplývá, že všechny testované kompozity jsou biologicky aktivní vůči bakterii *Enterococcus faecalis*. Vůči dalším testovaným kmenům patogenních bakterií jsou pak aktivní již jen dva kompozity .

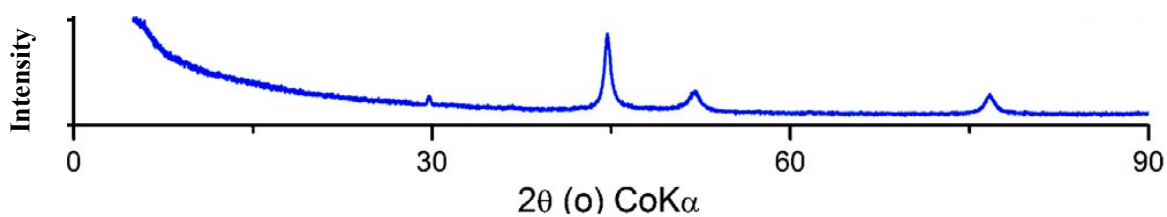
Největší antibakteriální aktivitu vykazuje kompozit HAP s nanočásticemi stříbra, jehož povrch byl modifikovaný CPB. Tato vysoká antibakteriální aktivita je jednoznačně daná vysokým obsahem nanočástic stříbra v tomto kompozitu a antibakteriální aktivitou samotného tenzidu. Kationické tenzidy jsou známé svou antibakteriální aktivitou, pro kterou jsou používány v dezinfekčních přípravcích. V některých případech vykazuje antibakteriální aktivitu i kompozit HAP s nanočásticemi stříbra, jehož povrch byl modifikovaný tenzidem SDS. O SDS je známo, že efektivně narušuje buněčnou stěnu bakterií, takže i v tomto případě je antibakteriální aktivita kompozitu spojena se synergickým účinkem nanočástic stříbra a použitého tenzidu.

4.9 RENTGENOVÁ PRÁŠKOVÁ DIFRAKCE KOMPOZITŮ

K vyhodnocení vzorků pomocí rentgenové práškové difrakce (XRD) bylo dodáno 0,2 g kompozitů. Výsledky jsou zobrazeny na následujícím obrázku.



Obr. 32: XRD spektrum kompozitů



Obr. 33: XRD spektrum stříbra³²

Na obr. 32 lze vidět spektrum XRD, kde na ose x je úhel dopadajícího paprsku a na ose y je signál. Identifikace jednotlivých křivek je následující: kompozit Ag@HAP

nemodifikovaný tenzidem (červená barva), kompozit modifikovaný TWEEN (žlutá barva), kompozit modifikovaný CPB (modrá barva) a kompozit modifikovaný SDS (zelená barva).

Na všech spektech jsou identifikované píky charakteristické pro dané materiály, vedle charakteristických píků pro hydroxyapatit jsou zde přítomny i charakteristické píky odpovídající nanočásticím stříbra, z nichž je nejvíce zřetelné difrakční maximum při úhlu 40°.

5 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala přípravou a charakterizací mikročástic HAP a jeho kompozitu s nanočásticemi stříbra. Studován byl vliv povrchově aktivních látek na tvar a velikost částic hydroxyapatitu a vliv rovněž na adsorpci nanočástic stříbra na hydroxyapatit při přípravě hydroxyapatitu. Kompozity hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra byly připraveny dvěma způsoby – adsorpčně a redukčně. Adsorpční způsob byl po prvotních neúspěšných experimentech zavrhnut z důvodu velmi nízké adsorpce nanočástic stříbra na povrch částic HAP.

Hydroxyapatity modifikované i nemodifikované byly charakterizovány z hlediska morfologie a velikosti pomocí TEM. Nemodifikovaný HAP měl nejvíce pravidelné částice ve tvaru tyčinek. HAP modifikovaný tenzidem CPB měl také tyčinkovité tvary, ale na rozdíl od čistého HAP měly tyto tyčinky menší rozměr na délku. HAP modifikovaný tenzidem SDS měl částice ve tvaru spíše elipsy, na rozdíl od tyčinkovitých tvarů částic čistého a tenzidem CPB modifikovaného HAP. HAP modifikovaný tenzidem TWEEN měl nejméně pravidelné tvary. U hydroxyapatitů byly změřeny i velikosti částic pomocí přístroje Analysette 22, pracujícím na principu rozptylu světla. Četnosti velikostí částic byly vyneseny do distribučního diagramu. Dle velikostí částic získaných na tomto přístroji je pořadí mikročástic HAP následující: tenzidem nemodifikovaný HAP, HAP modifikovaný CPB, HAP modifikovaný SDS a HAP modifikovaný TWEENem.

Nanočástice stříbra byly pro adsorpční metodu přípravy kompozitu byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou a byly charakterizovány na DLS a pomocí UV/VIS spektrometrie. Tyto nanočástice stříbra měly rozměr okolo 30 nm, což bylo potvrzeno polohou absorpčního maxima v UV/VIS spektru (okolo 410 nm).

Kompozity HAP a nanočástic stříbra, připravené redukční metodou s kyselinou askorbovou (obdoba Tollensova procesu), byly charakterizovány pomocí TEM a SEM s EDS. Obě tyto metody potvrdily přítomnost nanočástic stříbra v kompozitech. Rovněž rentgenová prášková difrakce potvrdila přítomnost stříbra ve vzorcích kompozitů. Množství stříbra bylo stanoveno pomocí metody AAS. Z těchto výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah stříbra v kompozitu byl dosažen s HAP modifikovaným CPB. Kompozity HAP modifikované tenzidy SDS a TWEEN obsahovaly stříbro v obdobném množství, ovšem oproti kompozitu s CPB,

byl obsah stříbra v kompozitech 5x nižší. Nejméně stříbra bylo nalezeno v kompozitu s HAP nemodifikovaném povrchově aktivní látkou. Dále byl u kompozitů studován rozdíl povrchové energie a acido-bazických vlastností povrchu mezi HAP a kompozitem HAP s nanočásticemi stříbra. Protože je IGC časově náročná metoda byl vybrán pouze HAP modifikovaný tenzidem CPB. Měření prokázalo zásadní změny uvedených vlastností s přítomností nanočástic stříbra.

Testování biologické aktivity kompozitů nanoAg@HAP vůči sadě patogenních bakterií prokázalo jejich rozdílnou biologickou aktivitu. Všechny kompozity prokázaly pozitivní aktivitu vůči bakteriím *Enterococcus faecalis*. Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazoval kompozit nanoAg@HAP, modifikovaný tenzidem CPB nejen kvůli vysokému obsahu stříbra, ale také díky antibakteriální aktivitě samotného CPB.

6 SEZNAM ZKRATEK

HAP – hydroxyapatit

SEM – skenovací elektronový mikroskop

EDS – energiově-disperzní spektrometrie

DLS – dynamický rozptyl světla

IGC – inverzní plynová chromatografie

RS – rozptyl světla

TEM – transmisní elektronový mikroskop

TWEEN – polyoxyethylensorbitanmonooleát

SDS – dodecylsírán sodný

CPB – cetylpyrimidium bromid

CTAB – cetyltrimethylammonium bromid

XRD – rentgenová prášková difrakce,

FTIR - infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

SERS – povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

AFM – mikroskopie atomárních sil

FT-Raman – Ramanova spektrometrie s Fourierovou transformací

QELS – kvazielastický rozptyl světla

CMC – kritická micelární koncentrace

nanoAg@HAP – kompozit hydroxyapatitu s nanočásticemi stříbra

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 – N. Kašíková, Z. Marek, A. Sovová, J. Tulach: Analytická a koloidní chemie, Vysoká škola zemědělská v Praze, Státní pedagogické nakladatelství Praha 1971
- 2 – J. Pouchlý: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2001
- 3 – www.gate2biotech.cz/jak-nanocastice-zlata-v-polymerovem-obalu-prochazeji-bunecnou-membranou/ (staženo 21.4.2015)
- 4 – L.Tilstra, S.A.Broughton, R.S.Tanke, D. Jelski, V. French, G. Zhang, A.K.Popov, A.B. Western, T.F.George: The science of Nanotechnology An Introductory Text, Nova Science Publishers, Inc., New York 2008
- 5 – CH. P. Pool, F. J. Owens: Introduction to nanotechnology, Wiley-Interscience, USA (2003)
- 6 – R. Prucek, L. Kvítek, J. Hrbáč: Acta Univ Palacki Olomuc Fac Rerum Nat, Chem **43**, 58 – 67 (2004)
- 7 – K. M. M. A. El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan: Arabian journal of chemistry, **3**, 135 – 140,(2010)
- 8 – R. de Lima, A B. Seabra, N. Durán: J Appl Toxicol **32**, 867-879 (2012)
- 9 – J. Soukupová, L. Kvítek, M. Kratochvilová, A. Panáček, R. Prucek: J Chem Educ, **87**, 1094 – 1097 (2010)
- 10 – I. Lee; S. W. Han; K. Kim: J Raman Spectrosc **32**, 947-952, (2001)
- 11 – Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **74**, 328–335 (2009)
- 12 – E. D. Ščukin, A. V .Percov, E. A. Amelinová: Koloidní chemie. Academia 1990
- 13 – J. Soukupova, R. Zbořil, I. Medřík, J. Filip, K. Šafářova, R. Ledl, M. Mashlan, J. Nosek , M. Černík: Chem. Eng. J., **262**, 813-822 (2015).
- 14 – www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html (staženo 21.4.2015)
- 15 – X. Bai, K. More, Ch. M. Rouleau, A. Rabiei: Acta Biomaterialia, **6**, 2264–2273 (2010)
- 16 – S. V. Dorozhkin: Materials, **2**, 399 – 498 (2009)
- 17 – J. Stejskal: Chem. Listy **67**, 814–848 (2013)

- 18 – A. Mocanu, G.Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitz, Ch. Flore, C. Garbo, A. Danisteanu, G. Rapuntean, C. Prejmerean, M. Tomoaia-Cotisel: *Appl Surf Sci*, **298**, 225-235 (2014)
- 19 – V. Apalangya, V. Rangari, B. Tiimob a kol.: *Appl Surf Sci*, **295** 108-114 (2014)
- 20 – X. Liu, Y. Mou, S. Wu, H.C. Man: *Appl Surf Sci*, **273**, 748– 757 (2013)
- 21 – M. Jelinek, T. Kocourek, J. Remsa, M. Weiserová, K. Jurek, J. Mikšovský, J. Strnad, A. Galandáková, J. Ulrichová: *Mater Sci Eng C*, **33**, 1242 – 1246 (2013)
- 22 – <http://ujjain.all.biz/cs/> (staženo 28.4.2015)
- 23 – V. Stanić, D. Janačković, S. Dimitrijević, S. B. Tanasković, M. Mitrić, M. S. Pavlović, A. Krstić, D. Jovanović, S. Raičević: *Appl Surf Sci*, **257**, 4510 – 4518 (2011)
- 24 – D. Kozlova, V. Sokolova, M. Zhong, E. Zhang, J. Yang, W. Li, Y. Yang, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, H. Yan: *Viol Sin*, **29**, 33 – 39, (2014)
- 25 – R. Palanivelu, A. Mary Saral, A. Ruban Kumar: *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectros*, **131**, 37 – 41 (2014)
- 26 – R. Palanivelu, A. R. Kumar: *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectros*, **127**, 434 – 438 (2014)
- 27 – <http://surfacemeasurementsystems.com/downloads/sea-application-notes> (staženo 24.11.2014)
- 28 – http://www.ateam.zcu.cz/sosnova_metal06.pdf (staženo 20.4.2015)
- 29 – http://rumcajs.fjfi.cvut.cz/fyzport/FT/2004/Difrakce/05_Karlik_CsCAsFyz_man_u.pdf (staženo 20.4.2015)
- 30 – <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf> (staženo 21.4.2015)
- 31 – P. Ševčíková, V. Kašpárková, j. Krejčí, p. Vltavská: *chem. Listy* **108**, 479–482 (2014)
- 32 – A. Panáček, A. Balzerová, R. Prucek, V. Ranca, R. Večeřová, V. Husičková, J. Pechoušek, J. Filip, R. Zbořil, L. Kvítek: *Colloids Surf B*, **110**, 191-198 (2013).