

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Nanočástice v interakci s aminokyselinami studované spektroskopickými
technikami**



Vypracoval: Erik Dostál
Studijní obor: Biofyzika
Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

Olomouc 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Erik Dostál

Název práce: Nanočástice v interakci s aminokyselinami studované spektroskopickými technikami

Typ práce: Experimentální

Pracoviště: Katedra biofyziky

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

Rok obhajoby práce: 2019

Abstrakt:

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo přehledně popsat aromatické aminokyseliny a zjistit jejich chování coby fluoroforů v blízkosti nanočástic. Také byly podrobně popsány samotné nanočástice stříbra a zlata, především jejich výjimečné optické vlastnosti. Zároveň byly interpretovány vlastnosti plazmonů a jejich chování při ozařování světlem. Experimentální cíl práce byl založen na proměření extinkčních, absorpčních a fluorescenčních spekter zkoumaných látek, které tkvělo ve zjištění, zdali probíhá interakce mezi nanočásticemi stříbra a zlata s aromatickými aminokyselinami. Dále bylo diskutováno, které faktory mohou ovlivňovat interakci aromatických aminokyselin s nanočásticemi stříbra a zlata. Posledním cílem této bakalářské práce bylo vysvětlit jakým způsobem a proč dochází ke změnám v emisních spektrech při interakci aromatických aminokyselin s nanočásticemi stříbra a zlata.

Klíčová slova: extinkční spektra, absorpční spektra, emisní spektra, nanočástice stříbra, nanočástice zlata, fenylalanin, tryptofan, tyrosin, histidin

Počet stran: 54

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Erik Dostál

Title of thesis: Nanoparticles in the interaction with amino acids studied by spectroscopic techniques

Type of thesis: Experimental

Department: Department of biophysics

Supervisor: doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

The year of defence: 2019

Abstract:

One of the aims of this bachelor thesis was to clearly describe aromatic amino acids and determine their behavior as fluorophores in the vicinity of nanoparticles. Also, the silver and gold nanoparticles themselves were described in detail, especially their exceptional optical properties. At the same time, the properties of plasmons and their light irradiation behavior were interpreted. The experimental aim of the work was based on the measurement of extinction, absorption and fluorescence spectra of the investigated compounds, which was based on the determination of whether the interaction between silver and gold nanoparticles with aromatic amino acids. Furthermore, it was discussed which factors may influence the interaction of aromatic amino acids with silver and gold nanoparticles. The last aim of this bachelor thesis was to explain how and why there are changes in emission spectra in interaction of aromatic amino acids with silver and gold nanoparticles.

Keywords: extinction spektra, absorption spectra, emission spectra, nanoparticles silver, nanoparticles gold, phenylalanine, tryptophan, tyrosine

Number of pages: 54

Number of attachments: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením doc. RNDr. Karolíny Machalové Šiškové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne.....

.....

Mé uctivé poděkování patří vedoucí této bakalářské práce doc. RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph.D. Děkuji jí za trpělivé vedení, odborné rady a pomoc během práce v laboratoři a v neposlední řadě za cenné připomínky při psaní mé bakalářské práce. Velice si vážím jejího přístupu. Zároveň chci poděkovat i doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D., který byl mým konzultantem. Dále také děkuji za pomoc Ing. Tereze Štenclové při získávání potřebných informací a podkladů.

SEZNAM ZKRATEK

F	fenylalanin
W	tryptofan
Y	tyrosin
H	histidin
NP	nanočástice
SPP	povrchový plazmonový polariton
TIR	celkový vnitřní odraz
SPR	povrchové plazmonové rezonance
LSW	ztrátovým povrchovým vlnám
RP	vyzařující plazmon
SIF	stříbrné ostrovní filmy
SPCE	emise povrchových plazmonů
Q _s	rozptylový člen nanočástice
Q _A	absorpční člen nanočás

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Přehled problematiky.....	3
2.1. Aminokyseliny	3
2.1.1. Fenylalanin	4
2.1.2. Tryptofan	4
2.1.3. Tyrosin.....	5
2.1.4. Histidin	6
2.2. Fluorescenční vlastnosti některých aminokyselin	7
2.3. Fluorescenční zhášení.....	8
2.4. Fluorescenční techniky	9
2.5. Nanočástice	9
2.5.1. Rozhraní kov-dielektrikum a povrchové plazmony	10
2.5.2. Optické a elektronické vlastnosti nanočástic zlata a stříbra	14
2.5.3. Využití optických vlastností nanočástic ušlechtilých kovů.....	16
2.5.4. Interakce mezi nanočásticemi ušlechtilých kovů s fluorofory	17
3. Cíle práce.....	22
4. Materiál a metody	23
4.1. Měření absorpčních spekter.....	23
4.2. Měření emisních spekter	24
5. Výsledky	25
5.1. Výpočty	25
5.2. Extinkční spektra	31
5.2.1. Nanočástice stříbra	31
5.2.2. Nanočástice zlata	31
5.3. Absorpční spektra aminokyselin	32
5.3.1. Fenylalanin	32
5.3.2. Tryptofan	33
5.3.3. Tyrosin.....	34
5.3.4. Histidin	35
5.4. Emisní spektra	36
5.4.1. Fenylalanin	36
5.4.2. Tryptofan	38
5.4.3. Tyrosin.....	40
6. Diskuze	43
6.1. Fenylalanin	43

6.2.	Tryptofan.....	47
6.3.	Tyrosin.....	48
7.	Závěr.....	50
8.	Seznam použité literatury.....	51
9.	Internetové zdroje.....	54

1. Úvod

Nanotechnologie je v posledních desetiletích jedním z nejskloňovanějších termínů v řadě vědních oborů, v medicíně, technice, ve strojírenství, ale i u laické veřejnosti. Pojem „nano“ je v praxi znám a vyjadřuje násobek – jednu miliardtinu základní jednotky. Pojem nanotechnologie je pak relativně nový výraz obsahující jevy, techniky, zařízení nebo struktury, jejichž rozměry odpovídají úrovni nanometrů – jedné miliardtiny metru, tedy atomové a molekulární úrovni. Ovšem celý hmotný svět včetně nás samých je složen z atomů a molekul, jejichž stavy a ději se již dlouhodobě zabývají obory jako je fyzika, chemie, biochemie, elektronika, optika, mikrosystémové inženýrství a další. Nový pojem „nanotechnologie“ je snaha napodobit postupy přírody skládáním jedné molekuly k druhé, podobně jako příroda tím, že konstruuje nový objekt z jeho základních složek. Tím se odlišuje od typických výrobních procesů výrobků z dílčích komponent, protože pracuje s rozměry lidskému zraku nedostupnými.

Nanotechnologie čím dál více postupně ovlivňuje všechny oblasti vědy, ale také náš každodenní život. V současnosti jsou nanotechnologie mladým oborem, přesto velice inovativním, který sice posouvá lidstvo kupředu, ale zároveň vyvolává i otázky.

V této bakalářské práci jsme se snažili odpovědět na jednu z nich.

Jednotlivé fyzikálně chemické, optické, elektrické, katalytické, snímací a antimikrobiální funkce nanočástic stříbra a zlata ve srovnání s objemem kovu přilákaly v posledních desetiletích značnou pozornost odborné veřejnosti. Přes všechny tyto výhody ale existují a přetrvávají zvěsti o toxicitě a ekotoxicitě nanočástic, a to spolu s obavami o jejich uvolňování do životního prostředí. Přes nepopíratelný užitek nanotechnologií v mnoha oborech lidské činnosti se vědci snaží posoudit i jejich rizika.

Aminokyseliny fungují jako stavební bloky proteinů. Musí se spojit 100 a více aminokyselin, aby vznikl protein. Proteiny katalyzují převážnou většinu chemických reakcí, které probíhají v buňce. Poskytují buňce mnoho strukturních prvků a také pomáhají vázat buňky do tkání. Jiné proteiny jsou zodpovědné za extracelulární a intracelulární transport životně důležitých materiálů v buňkách. Aminokyseliny jsou také prekurzory pro neurotransmitery jako serotonin, melatonin atd.

Jak již bylo řečeno výše, nanočástice možná mohou vykazovat toxicitu a ekotoxicitu, proto jsme zvolili nanočástice stříbra a zlata, protože právě tyto se začínají hojně využívat v medicíně. Z uvedených informací je jasné, že aminokyseliny jsou pro nás životně důležité

struktury, a to je jeden z hlavních důvodů, proč jsme si je vybrali pro zkoumání v této bakalářské práci. Zabývali jsme se pouze třemi z dvaceti jedna aminokyselin, jsou to fenylalanin, tryptofan a tyrosin, protože tyto aminokyseliny jsou aromatické a vykazují fluorescenci. (Též jsme zkusili prověřit histidin, o němž jsme našli dva články přisuzující mu fluorescenční vlastnosti, které se však v našich experimentech nepotvrdily, a proto ho pouze uvádíme pro úplnost v teoretické části, ale ve výsledkové části se jím zabývat nebudeme). Předpokládali jsme, že fluorescence příslušných vybraných aminokyselin nám pomůže podhalit možné interakce mezi nimi a nanočásticemi stříbra a zlata. Pro jednodušší měření byly nanočástice stříbra a zlata ve formě koloidů.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zdali probíhá interakce mezi nanočásticemi stříbra a zlata s vybranými aminokyselinami. Dále vysvětlit chování těchto interakcí, proč v určitých případech dochází ke snížení intenzity fluorescence, nebo naopak ke zvýšení intenzity fluorescence.

2. Přehled problematiky

Eukaryotické a prokaryotické buňky obsahují řadu sloučenin, které vykazují fluorescenci s excitací UV světlem. Proteiny a peptidy, s aromatickými aminokyselinami, jsou při osvětlení UV zářením samovolně fluoreskující. Dalšími biomolekulami jsou například nukleotidy, které obsahují adeninovou bázi a druhý nikotinamidovou, a porfyriny, které jsou také samovolně fluoreskující, zvyšují proteinovou fluorescenci. Tyto skupiny mají společný rys v tom, že všechny obsahují aromatické kruhové struktury, které absorbují v UV oblasti.

2.1. Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou organické sloučeniny obsahující funkční skupiny amin ($-\text{NH}_2$) a karboxyl ($-\text{COOH}$) spolu s postranním řetězcem (skupina R) specifickým pro každou aminokyselinu. Aminokyseliny obsahující α -aminoskupinu (která je v biologických podmínkách v protonované formě $-\text{NH}_3^+$) a karboxylovou skupinu (za biologických podmínek je v deprotonované formě $-\text{COO}^-$). Aminokyseliny se používají jako stavební kameny při biosyntéze proteinu a tyto proteiny jsou nutné k udržení života (Fernstrom 1983, Slominski a kol. 2002). Klíčovými prvky aminokyseliny jsou uhlík (C), vodík (H), kyslík (O) a dusík (N), v postranních řetězcích určitých aminokyselin se mohou nacházet i jiné prvky. Aminokyseliny jsou klasifikovány podle umístění funkčních skupin na uhlíkovém řetězci jako alfa- (α -), beta- (β -), gama- (γ -) nebo delta- (δ -) a to v závislosti na vzdálenosti příslušného uhlíku od karboxylové skupiny.

Dvacet proteinogenních aminokyselin je kódováno přímo tripletovými kodony v genetickém kódu a jsou známé jako "standardní" aminokyseliny. Další dvě ("nestandardní" nebo "non-kanonické") jsou selenocystein (přítomný u mnoha prokaryot i většiny eukaryot, ale nejsou kódovány přímo DNA) a pyrolysin (nachází se pouze u některých archeí a jedné bakterie).

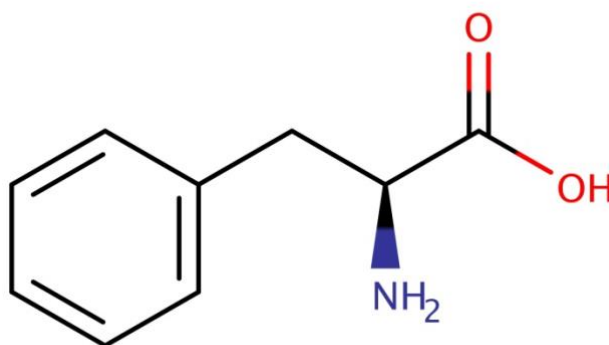
Víme, že člověk má ve svém organismu devět proteinogenních aminokyselin (esenciálních), což znamená, že nemohou být lidským tělem vyrobeny z jiných sloučenin, a proto musí být přijímány do těla v potravě. Jiné mohou být podmíněně nezbytné pro určitý věk nebo zdravotní stav. Esenciální aminokyseliny se mohou mezi jednotlivými druhy lišit.

Vzhledem k jejich biologickému významu jsou aminokyseliny důležité ve výživě a běžně se používají ve výživových doplncích, hnojivech a potravinářské technologii. Průmyslová použití zahrnují výrobu léků, výrobu biologicky odbouratelných plastů a chirálních katalyzátorů.

2.1.1. Fenylalanin

Fenylalanin (zkráceně jako Phe nebo F, kódován kodony UUU a UUC, $^1pK_a = 1,83$; $^2pK_b = 9,13$ při 25 °C (převzato z [4])) je α -aminokyselina s vzorcem $C_9H_{11}NO_2$, jeho chemický vzorec je ukázán na obrázku 3. Může být považován za benzylovou skupinu substituovanou místo methylové skupiny alaninu v pozici β , nebo fenylovou skupinu místo koncového vodíku alaninu. Tato esenciální aminokyselina je klasifikována jako neutrální a nepolární vzhledem k inertní a hydrofobní povaze benzylového postranního řetězce. L-isomer se používá k biochemické tvorbě proteinů kódovaných DNA. Fenylalanin je prekurzor tyrosinu a také monoaminových neurotransmiterů: dopaminu, norepinefrinu (noradrenalinu), epinefrinu (adrenalin) a pigmentu kůže melaninu (Roy a kol. 2015).

Fenylalanin se přirozeně vyskytuje v mateřském mléce savců, používá se při výrobě potravin a nápojů a prodává se jako výživový doplněk pro své známé analgetické a antidepressivní účinky (Broadley 2010). Je přímým předchůdcem neuromodulátoru fenethylaminu, běžně používaného doplňku stravy.



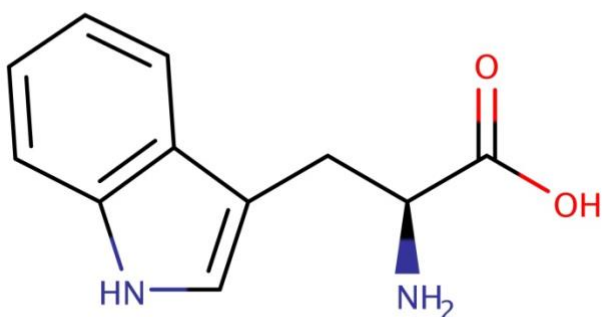
Obrázek 1: Chemická struktura fenylalaninu.

2.1.2. Tryptofan

Tryptofan (zkráceně jako Trp nebo W, kódovaný kodonem UGG, $^1pK_a = 2,83$; $^2pK_b = 9,39$ při 25 °C (převzato z [4])) je α -aminokyselina, která hraje zásadní roli při biosyntéze proteinů, jeho chemický vzorec je ukázán na obrázku 1. Obsahuje α -aminoskupinu, skupinu α -karboxylové kyseliny a indol z bočního řetězce, což z něj činí nepolární aromatickou aminokyselinu. Je to esenciální aminokyselina, což znamená, že si ji tělo neumí samo syntetizovat, tudíž musí být získávána ze stravy. Tryptofan je důležitým prekurzorem biosyntézy různých biologicky aktivních sloučenin jako je kyselina chinolinová a koenzymů

NAD a NADP, je také předchůdcem neurotransmiteru serotoninu (Slominski a kol. 2002). Tryptofan je jednou z méně obvyklých aminokyselin, které se nacházejí v proteinech, ale hraje důležitou strukturální nebo funkční roli. Například tryptofan a tyrosinové zbytky hrají zvláštní roli při "zakotvení" membránových proteinů v buněčné membráně (Schaechter a kol. 1990). Kromě toho funguje tryptofan jako biochemický prekurzor pro další sloučeniny: niacin, také známý jako vitamin B₃ a auxiny (třída fytohormonů) (Fernstrom 1983). Porucha fruktosové absorpce souvisí s nesprávnou absorpcí tryptofanu ve střevě, tím se sníží hladina tryptofanu v krvi a dochází k následné depresi v organismu (Ledochowski 1998).

Tryptofan díky své vlastní fluorescenci je důležitou vnitřní fluorescenční sondou, která může být použita k odhadu povahy mikroprostředí kolem tryptofanového zbytku. Většina vnitřních fluorescenčních emisí skládaného proteinu je způsobena právě excitací tryptofanových zbytků.



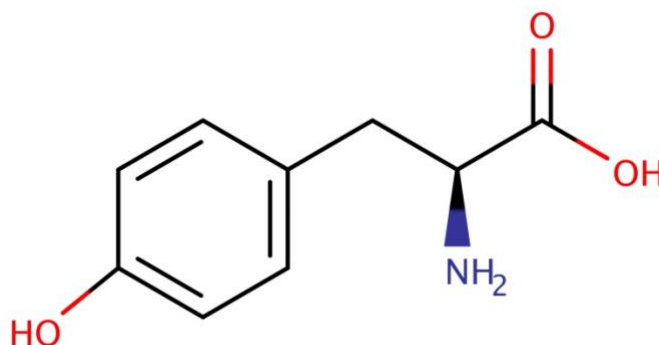
Obrázek 2: Chemická struktura tryptofanu.

2.1.3. Tyrosin

Tyrosin (zkráceně jako Tyr nebo Y, kódován kodony UAC a UAU, $^1pK_a = 2,20$; $^2pK_b = 9,11$; $^3pK_x = 10,07$ při 25 °C (převzato z [4])) nebo 4-hydroxyfenylalanin je jednou ze 20 standardních aminokyselin, které používají buňky k syntéze proteinů, jeho chemický vzorec je ukázán na obrázku 2. Jedná se o neesenční aminokyselinu s polární boční skupinou. Tyrosin je obecně klasifikován jako hydrofobní aminokyselina, přičemž je více hydrofilní než fenylalanin.

Tyrosin je proteinogenní aminokyselina, která ve své struktuře obsahuje fenol. Objevuje se v proteinech, které jsou součástí procesů signální transdukce. Funguje jako příjemce fosfátových skupin, které jsou přenášeny prostřednictvím proteinkináz. Fosforylace hydroxylové skupiny tak může změnit aktivitu cílového proteinu, nebo může tvořit část signalizační kaskády prostřednictvím vázání SH2 domény.

Tyrosin je prekurzor neurotransmiterů a zvyšuje hladiny plazmatických neurotransmiterů (zejména dopamin a norepinefrin) (Rasmussen a kol. 1983). Ty mají nepatrný vliv na náladu u normálních subjektů, zatímco u lidí vystavených stresovým podmínkám jsou účinky na náladu nezanedbatelné (Leathwood a kol. 1982). Zdá se, že tyrosin nemá za normálních okolností žádný významný vliv na kognitivní nebo fyzickou výkonnost, ale napomáhá udržet pracovní paměť (Thomas a kol. 1999).

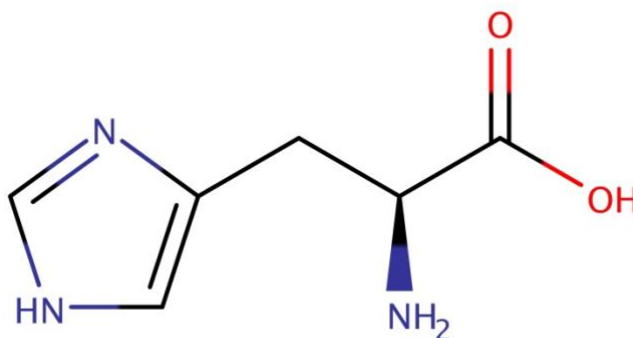


Obrázek 3: Chemická struktura tyrosinu.

2.1.4. Histidin

Histidin (zkráceně jako His nebo H, kódovaný kodony CAU a CAC, $^1pK_a = 1,82$; $^2pK_b = 9,17$; $^3pK_x = 6,00$ při 0 °C (převzato z [4])) je α -aminokyselina, která se používá při biosyntéze proteinů, jeho chemický vzorec je ukázán na obrázku 4. Histidin má imidazolový postranní řetězec, který je částečně protonován při pH <6; $pK_a = 5,97$. Původně byl histidin považován za nezbytný pouze pro kojence, dlouhodobější studie však prokázaly, že je také důležité pro dospělé (Kopple a kol. 1975). Histidin je nezbytný pro růst a opravu tkáně stejně jako pro kontrolu přenosu kovových elementů v biologických bázích (Nan a kol. 1999).

Histidin je také prekurzorová aminokyselina pro histamin, která je důležitým neurotransmiterem podílejícím se na buněčném růstu, diferenciaci, regulaci syntézy nukleových kyselin, bílkovin a stabilizaci lipidů (Su a kol. 2000, Paproski a kol. 2002, Zhang a kol. 2004b, Zeng a kol. 2009). Nedávné studie ukázaly, že při nedostatku histidinu v plazmě může docházet k porušení výživového stavu u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (Watanabe a kol. 2008). Acylový radikál je histidyl.



Obrázek 4: Chemická struktura histidinu.

2.2. Fluorescenční vlastnosti některých aminokyselin

Mezi různými metodami, které se aplikují pro detekci aminokyselin, jsou hojně využívány absorpční a fluorescenční spektroskopické techniky. Výhody těchto spektroskopických technik jsou především v jejich jednoduchosti, nízké ceně, vysoké citlivosti (to platí především o fluorescenci), rychlé době odezvy, snadné přípravě vzorku, neinvazivní a nedestruktivní povaze, analýze v reálném čase a různých způsobech výstupního signálu (Wang a kol. 2015).

Tři aminokyselinové zbytky, které primárně zodpovídají za vlastní fluorescenci proteinů jsou tryptofan, tyrosin a fenylalanin (obrázek 1,2,3). Tyto zbytky mají odlišné absorpční a emisní vlnové délky a liší se i v kvantových výtěžcích (tabulka 1). Tryptofan vykazuje mnohem vyšší fluorescenci než tyrosin nebo fenylalanin. Avšak nutno podotknout, že fluorescenční vlastnosti tryptofanu jsou silně závislé na rozpouštědle. Když se polarita rozpouštědla snižuje, ve spektru se maximum posune ke kratším vlnovým délkám, a zvýší se jeho intenzita. Z tohoto důvodu vykazují tryptofanové zbytky, které pocházejí z hydrofobních domén složených proteinů, spektrální posun 10 až 20 nm. Tento jev byl využit ke studiu denaturace proteinů (Lakowicz 1999).

Tyrosin může být excitován při vlnových délkách podobných tryptofanu, ale emituje zřetelně odlišnou vlnovou délku. Zatímco tyrosin je méně fluorescenční než tryptofan (tzn. má nižší kvantový výtěžek), může poskytnout významnou část signálu, protože je často přítomen v mnoha proteinech, a to ve větším množství, než je tryptofan. Bylo zjištěno, že tyrosinová fluorescence je potlačena přítomností blízkých tryptofanových skupin, a to vlivem přenosu energie rezonancí. Stejně tak dochází k potlačení fluorescence tyrosinu ionizací jeho aromatické hydroxylové skupiny (Lakowicz 1999).

Fenylalanin je velmi slabě fluorescenční a může být pozorován pouze v nepřítomnosti jak tryptofanu, tak tyrosinu. Vzhledem k větší absorpci a vyššímu kvantovému výtěžku tryptofanu a též díky přenosu energie rezonancí, fluorescenční spektrum proteinu obsahujícího všechny tři aminokyseliny se obvykle podobá emisnímu spektru samotného tryptofanu (Lakowicz 1999).

Tabulka 1: *Fluorescenční charakteristiky aromatických aminokyselin. (Převzato z [1])*

Aminokyseliny	Absorpce		Fluorescence	
	Vlnová délka [nm]	Absorpční molární koef. [M ⁻¹ .cm ⁻¹]	Vlnová délka [nm]	Kvantový výtěžek
Tryptophan	280	5,600	348	0,20
Tyrosine	274	1,400	303	0,14
Phenylalanine	257	200	282	0,04

Při měření peptidů je důležité mít na paměti, že místní prostředí aromatických aminokyselin může mít vliv na jejich spektrum. Tryptofan, nejvýznamnější fluorescenční emitor, bude mít emisní pík při nižších vlnových délkách, pokud je „ukotven“ uvnitř hydrofobních vnitřních oblastí proteinu (Lakowicz 1992). Tyrosinové skupiny často přenášejí svou energii na sousední tryptofanové aminokyseliny, navíc ionizovaný tyrosinát také vykazuje vlnové délky podobné tryptofanu, což naznačuje, že pro mnoho proteinů jsou dobrým výchozím bodem pro volbu excitační a emisní vlnové délky hodnoty známé pro tryptofan (Lakowicz 1999).

2.3. Fluorescenční zhášení

Fluorescenční zhášení označuje jakýkoli proces, který snižuje intenzitu fluorescence vzorku. Fluorescenční zhášení může být dynamické – kvůli kolizním setkáním mezi fluoroforem a zhášedlem, nebo statické – kvůli vytvoření komplexu základního stavu mezi fluoroforem a zhášedlem.

Statické a dynamické zhášení lze diferencovat na základě studií o interakci s variací teploty a viskozity nebo dobu života excitovaného stavu. Vyšší teploty budou mít za následek rychlejší difuzi a tím i větší množství kolizního zhášení, které je důsledkem disociace slabě vázaných komplexů. Možný mechanismus zhášení může být reprezentován Stern–Volmerovou rovnicí.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q], \quad (11)$$

kde F_0 a F označují intenzitu fluorescence v nepřítomnosti a přítomnosti zhasěče. K_q je konstanta bimolekulární rychlosti zhasění; τ_0 je průměrná doba života excitovaného stavu molekuly bez zhasědla, která je asi 10^{-8} s. K_{SV} je Stern-Volmerova konstanta ochlazování; $[Q]$ je koncentrace zhasěče. Hodnoty K_{SV} klesají se stoupající teplotou pro statické zhasění a pro dynamické zhasění bude pozorován opačný efekt. V případě dynamického zhasění je známo, že maximální rozptyl zhasěcí kolizní konstanty pro různé zhasěče, které mají biomolekulu je přibližně 1×10^{10} L/mol/s. Bylo zjištěno, že experimentální dynamická zhasěcí konstanta se snižuje postupně s nárůstem teploty (Roy 2017).

2.4. Fluorescenční techniky

Fluorescenční techniky byly vždy považovány jako poměrně citlivé a spolehlivé, a to zejména při jejich aplikaci ve studii a pochopení chemických a biologických reakcí. Údaje získané fluorescenčními technikami byly shledány spolehlivými při získávání nejen vazebných konstant mezi molekulami, ale také při stanovení rychlosti tvorby takové vazby a výsledného mechanismu. To je zvláště důležité při vazbě biologických molekul na enzymy, pro katalýzu, v bioaktivitách (Iwunze 2007).

V nedávné době se objevily i studie založené na interakci nanočástic s biomolekulami (např. aminokyselinami) studované prostřednictvím fluorescenčního zhasění například v publikaci (Roy a kol. 2015). Ne vždy se však jeví být provedení těchto experimentů a interpretace výsledků zcela korektní. Proto byly provedeny ověřovací experimenty pro systémy vybraných aminokyselin a nanočástic stříbra a zlata coby zhasěčů s využitím fluorescenční spektroskopie.

2.5. Nanočástice

Nanomateriály a nanotechnologie jsou v posledních desetiletích velmi zkoumané a mnohdy aplikované v různých vědních a technických oborech. Nanočástice jsou unikátní svými jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V poslední době jsou také rozsáhle studovány kovové nanočástice. Značnou pozornost přitahují například nanočástice zlata a stříbra. Syntéza nanočástic zlata a stříbra může být dosažena různými metodami: chemicky (homogenní nukleace), fyzikálně (laserová ablace) a „zelenou“ syntézou, tzn. za využití organismů a biosloučenin (Šišková 2013). Nanočástice zlata a stříbra lze úspěšně aplikovat v oblasti biologického značení, senzorů, distribuce léků, polarizačních filtrů, elektrických baterií, barviv a zdravotních věd ve formě antimikrobiálních a protirakovinných látek (Roy a kol. 2015).

Ačkoli nanočástice stříbra a zlata mohou vykazovat cytotoxicitu a mohou zapříčinit oxidační stres, trh s nanočásticemi stříbra a zlata se rychle rozšiřuje, a to především na základě poptávky po spotřebních výrobcích, které používáme v každodenním životě. Bohužel, spotřebitelé stále příliš nevědí o vlivu nanočástic stříbra a zlata na životní prostředí a na jejich zdraví (Roy 2017).

V lékařských aplikacích jsou nanočástice využívány například jako transportní médium pro přenos léků (liposomy, fullereny). Nanočástice stříbra se používají pro impregnaci šicího materiálu, protože mají antimikrobiální efekt, pravděpodobně bez rezistenční odezvy. Nanočástice zlata jsou využívány jako kontrastní látky pro zobrazovací metody (radiodiagnostika, NMR). U zobrazovacích metod jsou nanočástice zlata pacientovi zpravidla vpraveny intravenózně do krevního řečiště, díky nim můžeme charakterizovat perfúze a funkce biologických bariér (Mustansar a kol. 2016). Při cirkulaci krví může docházet k interakci mezi nanočásticemi zlata a plazmatickými bílkovinami, které nemusí být tolerovány organismem.

2.5.1. Rozhraní kov-dielektrikum a povrchové plazmony

Optické vlastnosti kovových povrchů jsou komplexní a v této bakalářské práci nemohou být zcela popsány. Místo toho budeme tyto vlastnosti popisovat způsobem, který umožní intuitivní pochopení povrchových plazmonů. Termín plazmon nebo povrchový plazmon je používán k popisu kolektivní oscilace skupiny elektronů v kovu (Vossen a kol. 1977). Plazmon označuje, že elektrony mohou volně migrovat v kovu způsobem, který je podobný u iontů v plynném plazmonu. Termín povrchový plazmonový polariton (SPP) byl navržen tak, aby popisoval opticky indukované elektronové oscilace. Termín povrchový plazmon je nyní běžně používán se stejným významem. Při optické excitaci je frekvence kmitání elektronů stejná jako frekvence dopadajícího světla.

Povrchové plazmony se mohou vyskytovat na rovných kovových površích nebo v kovových částicích. Schéma 1 znázorňuje povrchové plazmony na plochem kovovém povrchu, lze je vytvořit osvětlením kovového povrchu p-polarizovaným světlem. Povrchové plazmony jsou však indukovány dopadajícím světlem pouze za speciálních optických podmínek (níže). Když jsou osvětleny stříbrné povrchy nebo zrcadla, plazmony se nevytvářejí, a proto tyto povrchy spíše odrážejí, než aby zobrazovaly absorpci plazmonu. Pro vytvoření povrchových plazmonů se musí osvětlit tenký kovový film skrz skleněný hranol nebo nějaký vyšší dielektrický materiál.

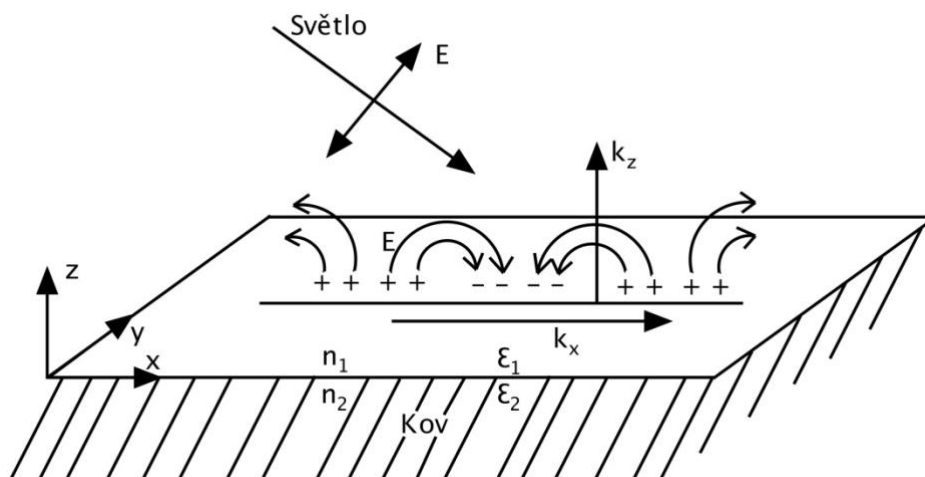


Schéma 1: Schéma povrchových plazmatů na kovovém povrchu.

Povrchové plazmony se také vytvářejí přímým osvětlením kovových koloidů (Schéma 2), což má za následek rychlou oscilaci prostorově vázaných elektronů (Link a kol. 2000). Kovové koloidy (tj. roztoky kovových nanočástic) vykazují zářivé barvy díky kombinaci absorpce a rozptylu (Kerker 1985). V koloidech, na rozdíl od planárních kovových povrchů, nejsou nutné žádné zvláštní podmínky pro pozorování povrchové plazmonové absorpce. Termín „absorpce“ je často používán k popisu koloidů, ale správnější je termín extinkce, protože k barvám koloidů přispívají jak absorpce, tak rozptyl.

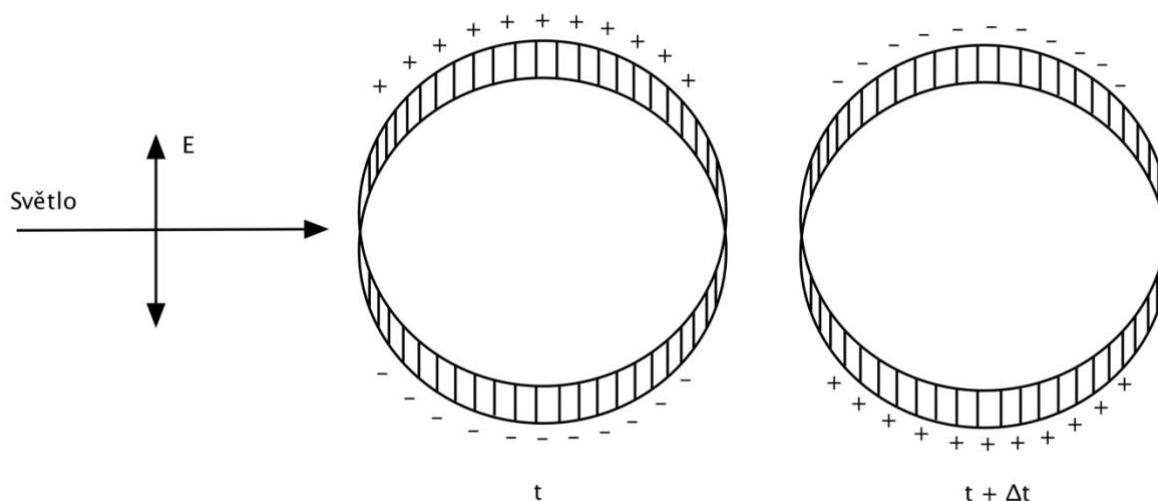


Schéma 2: Povrchové plazmonové oscilace v kovových nanočásticích.

(Lakowicz 2005) Při diskusi o interakcích mezi fluoroforem a kovem se používají termíny záření z dálkového nebo vzdáleného pole k označení vlny šířící se v prostoru od jejího zdroje. Pro označení pole kolem oscilujícího dipólu ve vzdálenosti blížíci se vlnové délce

používáme termín mez blízkého pole. Když diskutujeme o excitovaných fluoroforech, předpokládáme, že blízké pole je přítomné, zatímco molekula je v excitovaném stavu. Když molekula uvolní foton a vrátí se do základního stavu, poté můžeme říct, že existuje vlna vzdáleného pole (Lakowicz 2005).

Interakce fluoroforů s kovy může být modelována jako interakce oscilačního dipólu s vodivým kovovým povrchem. Úplný popis této teorie je velice složitý s důležitými výsledky z komplexních rovnic. Pro tyto interakce také neexistuje jediná teorie, ale spíše existuje celá řada teorií od nejjednodušších klasických reflexních modelů až po kvantově mechanické popisy. Dále existuje několik teoretických modelů, které lze použít k popisu povrchových vlastností kovů. V tuto chvíli si jednoduše povšimneme, že fluorofory vyzařují energii jako oscilující dipóly. Stejně jako v případě jakéhokoliv vyzařujícího dipólu mohou existovat interakce v blízkém poli nebo může docházet k záření na vzdáleném poli. Dále budou přiblíženy alespoň základní rovnice s popisem pojmů (Lakowicz 2005).

Ve spektroskopii biochemických systémů je zvykem uvažovat molekulární interakce fluoroforů s jejich prostředím, například účinky polarizace na emisní maxima nebo molekulární kontakt mezi fluoroforem a zhašedly. Pro popis molekulární fluorescence biochemických vzorků se obvykle nespolehá na fyzikální a Maxwellovy rovnice, což je pochopitelné, protože složitost a specifčnost molekulárních interakcí je obtížné vysvětlit pomocí Maxwellových rovnic. V literatuře se uvádí, že interakce fluoroforů s kovovými povrchy a částicemi lze přesně popsat klasickou elektrodynamikou. Toto tvrzení fyzika nepřekvapí, ale může být méně zřejmé praktikům, kteří používají fluorescenční spektroskopie. Elektrodynamika může být použita k popisu fluoroforů v blízkosti kovů, protože je uvažována pouze interakce v prostoru. Specifické chemické interakce a interakce přenosu elektronů mohou nastat, když jsou fluorofory velmi blízko nebo v přímém kontaktu s kovovým povrchem (Lakowicz 2005).

Pro porozumění vyzařujících plazmonů, se nejdříve musí porozumět přizpůsobení vlnového vektoru na rozhraní. To vyžaduje matematický popis elektromagnetických vln jak v dielektrickém vzorku, tak v kovu. Světlo šířící se v prostoru lze popsat jako oscilační vlnu. Elektrické pole elektromagnetické vlny šířící se ve směru z může být popsáno jako

$$E(z, t) = E_0 \cos(k_z z - \omega t + \delta), \quad (1)$$

kde k_z je vlnový vektor, ω je kruhová frekvence (2π násobek frekvence v Hertz), t je čas a δ je konstanta popisující fázi světla v $t = 0$ a $z = 0$. Vlnový vektor se vztahuje k vlnové délce $k_z = \frac{2\pi}{\lambda_1}$; kde λ_1 označuje vlnovou délku v médiu, kde se šíří světlo, které má index lomu

n_1 . Ve vakuu je index lomu $n_0 = 1,0$ a vlnová délka je dána hodnotou λ_0 . V médiu 1 s indexem lomu n_1 je vlnová délka dána hodnotou $\lambda_1 = \frac{\lambda_0}{n_1}$. Když se elektromagnetická vlna pohybuje z vakua na médium s vyšší dielektrickou konstantou n_1 ; vlnová délka klesá z λ_0 na λ_1 , ale frekvence zůstává stejná. V molekulární fluorescenci je obvykle vlnová délka označována jako jedna hodnota, když se světlo pohybuje ze vzduchu do vzorku. Ve skutečnosti je to světelná frekvence, která zůstává konstantní a vlnová délka se mění s indexem lomu (Lakowicz 2005).

Je užitečné mít intuitivní chápání vlnových vektorů. Vlnový vektor k_z lze chápat jako rychlost změny elektrického pole se vzdáleností podél osy z . Vlna prochází jednou kompletní oscilací, když je změna na ose $z = \frac{2\pi}{k_z}$. Ve vakuu je vlnové číslo dáno $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$. V médiu 1 s indexem lomu n_1 vlnový vektor je $k_1 = \frac{2\pi}{\lambda_1} = \frac{n_1 2\pi}{\lambda_0} = n_1 k_0$. Elektrické pole pro kratší vlnové délky osciluje rychleji se vzdáleností, takže vlnový vektor je větší. Použitím $c = \frac{\lambda_0 \omega}{2\pi}$, kde c je rychlost světla ve vakuu, je snadné ukázat, že vlnový vektor ve vakuu pro libovolnou frekvenci je dán $k_0 = \frac{\omega}{c}$ (Lakowicz 2005).

(Lakowicz 2005) Když se popisuje chování elektromagnetických vln na rozhraní, výrazy jako je rov. (1) se následně stávají komplexními. Z tohoto důvodu formalizmy používají komplexní zápis podle Eulerovy rovnice

$$e^{i\theta} = \cos \theta + i \sin \theta, \quad (2)$$

kde $i = \sqrt{-1}$. Použití tohoto zápisu se z rov. (1) stává

$$\tilde{E}(z, t) = \tilde{E}_0 e^{i(k_z z - \omega t + \delta)}. \quad (3)$$

Rozumí se, že fyzikální veličiny popisující elektrické pole jsou dány reálnou částí rov. (3). Méně často se uvádí, že komplexní termín v rov. (3) popisuje faktory, které tlumí svazek podél jeho dopadové dráhy, včetně absorpce světla a celkového vnitřního odrazu (TIR), což má za následek exponenciálně se rozpadající pole (Lakowicz 2005).

Při popisu světla na rozhraní je vhodné paprsku umožnit šířit se v libovolném směru. Proto je osa z nahrazena libovolným směrem \vec{r} tak

$$\tilde{E}(\vec{r}, t) = \vec{m} \tilde{E}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}, \quad (4)$$

kde \vec{m} je jednotkový vektor podél směru elektrického pole a

$$\tilde{E}_0 = E_0 e^{i\delta}, \quad (5)$$

kde \tilde{E}_0 obsahuje fázový posun, který může nastat na rozhraní.

Je nutno připomenout, jak je útlum světla popsán pomocí exponenciálního zápisu a vlnových vektorů. Pokud médium absorbuje světlo, rov. (4) lze stále používat s výjimkou toho,

že se vlnový vektor stává komplexním číslem. Pro vlnu pohybující se podél osy z rov. (4) se stává

$$\tilde{E}(z, t) = \tilde{E}_0 e^{i(\tilde{k}_z z - \omega t)}, \quad (6)$$

kde je číslo komplexní vlny dáno

$$\tilde{k}_z = k_z + i\kappa. \quad (7)$$

Proto rov. (6) lze psát jako

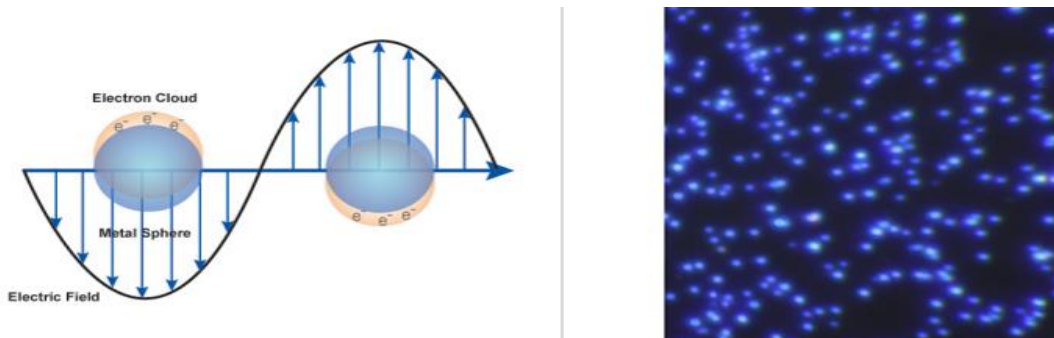
$$\tilde{E}(z, t) = \tilde{E}_0 e^{(-\kappa z)} e^{i(k_z z - \omega t)}. \quad (8)$$

První exponenciální termín popisuje útlum pole, když vlna prochází absorbujícím médiem. Druhý termín popisuje rychlost oscilace podél osy z . Intenzita světla je úměrná čtverci elektrického pole, takže intenzita klesá s $e^{(-2\kappa z)}$. Absorpční koeficient je dán vztahem $\alpha = 2\kappa$ (Lakowicz 2005).

Tyto dobře známé rovnice pro oscilační vlnu umožňují objasnit význam vlnového vektoru (\tilde{k} nebo k_z), také nazývaný konstantou šíření vlny. Většina popisů odrazu a lomu světla předpokládá, že hybnost vlny je zachována na rozhraní. Moment hybnosti fotonu je úměrný frekvenci. Zákony odrazu a lomu jsou odvozeny pomocí zachování hybnosti, což je ekvivalentní s vlnovým vektorem, který odpovídá rozhraní. Přizpůsobení vlnového vektoru vyžaduje, aby elektrické pole bylo spojitě přes rozhraní. Vlny, které se nemohou šířit v médiu jsou často popisovány jako imaginární nebo evanescentní. Dosažení shody vlnového vektoru kov–dielektrikum, který je na rozhraní vzorku určuje schopnost kovu absorbovat nebo plazmonu vyzařovat. Dosažení shody vlnového vektoru na rozhraní kov–dielektrikum je středně složité, ale lze ho pochopit nejprve zkoumáním rozhraní dvou dielektrik (Lakowicz 2005).

2.5.2. Optické a elektronické vlastnosti nanočástic zlata a stříbra

Interakce nanočástic zlata a stříbra se světlem je silně diktována jejich prostředím, velikostí, tvarem a povrchovou modifikací (tj. přítomností sloučenin na povrchu nanočástic). Oscilační elektrická pole světelného paprsku šířícího se v blízkosti koloidní nanočástice interagují s volnými elektrony, způsobují společné oscilace elektronového náboje, které jsou v souladu s frekvencí dopadajícího světla (Mustansar a kol. 2016). Na tento jev v roce 1908 poprvé poukázal Gustav Mie v *Annalen der Physik*. Tyto rezonanční oscilace jsou známé jako povrchové plazmonové rezonance (SPR)—obrázek 5 vlevo.



Obrázek 5: Vlevo – povrchová plazmonová rezonance (SPR), kde volné elektrony v kovové nanočástici jsou poháněny do kmitání díky silné vazbě se specifickou vlnovou délkou dopadajícího světla. Vpravo – mikroskopický snímek v temnostním poli ukazující nanočástice stříbra o velikosti 60 nm. (Převzato z [2])

Povrchové plazmonové rezonanci pro kulovité kovové nanočástice o velikosti mnohem menší, než je vlnová délka světla, dominuje dipolární režim s polarizovatelností α :

$$\alpha = 3\varepsilon_0 V \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right), \quad (9)$$

kde V je objem částice, ε_0 je permitivita vakua, $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_r(\omega) + i\varepsilon_i(\omega)$ je komplexní frekvenčně závislá dielektrická funkce kovu a ε_m je dielektrická konstanta okolního média. K silné rezonanci dochází zhruba na elektromagnetické frekvenci ω kde $\varepsilon_r = -2\varepsilon_m$, tedy na frekvenci, kde se stanovuje povrchová plazmonová rezonance (SPR) (Kreibig a kol. 1995).

U zlatých a stříbrných nanočástic je podmínka rezonance splněna na viditelných frekvencích, což z nich činí plazmonické kovy vhodné pro optické aplikace (Kreibig a kol. 1995). Velká optická polarizace spojená s SPR vede k obrovskému lokálnímu zesílení elektrického pole na povrchu nanočástic, stejně jako silně se zvyšující absorpce a rozptyl světla nanočásticemi na frekvenci SPR (Kreibig a kol. 1995).

U malých (10–30 nm) kulovitých nanočástic zlata způsobuje povrchový plazmonový rezonanční účinek absorpci světla v modrozelené části spektra (~ 500 nm), zatímco červené světlo (~ 700 nm) se odráží, což vede k bohaté červené barvě disperzí nanočástic zlata. Pro malé kulovité nanočástice stříbra (do 50 nm), které se nacházejí ve vodném prostředí, je maximum rezonance povrchového plazmonu v oblasti okolo 400 nm (Mustansar a kol. 2016). Když se velikost částic zvyšuje, vlnová délka absorpce související s povrchovou plazmonovou rezonancí (SPR) se posune na delší, červenější vlnové délky. Červené světlo se pak absorbuje a modré světlo se odráží, čímž se získají roztoky s bledě modrou nebo fialovou barvou (obrázek 6 pro případ Au nanočástic).

Vzhledem k tomu, že velikost částic lze dále zvyšovat přes mikročástice směrem k objemovému limitu, povrchové plazmonové rezonanční vlnové délky se pohybují až do infračervené části spektra, kde se odráží většina viditelných vlnových délek. Dochází k disperzi nanočástic, které potom mají šedou nebo průsvitnou barvu a v koloidu lze pozorovat jejich kousky neboli mikročástice.

Povrchová plazmonová rezonance může být naladěna buď změnou velikosti nebo tvarem nanočástic, což vede k částicím, které mají přizpůsobené optické vlastnosti vhodné pro zvolené aplikace (Mustansar a kol. 2016).



Obrázek 6: Barvy různě velkých monodispergovaných nanočástic zlata. (Převzato z [3])

Když se do roztoku nanočástic přidává iontová sloučenina (např. sůl, NaCl), nebo adsorbát (sloučenina adsorbující se na povrch nanočástic) o určité koncentraci, je vidět posun rezonanční vlnové délky povrchového plazmonu vlivem agregace nanočástic zlata nebo stříbra. Povrchový náboj nanočástic ušlechtilých kovů putující s nanočásticemi roztokem, zvaný zeta potenciál, se při přidavku adsorbujícího se iontu či sloučeniny mění a stává se neutrálním, což vede k agregaci nanočástic. V důsledku toho jevu se barva roztoku změní např. z červené na modrou. Aby se minimalizovala agregace, lze nanočástice ušlechtilých kovů pokrýt polymery, malými molekulami anebo molekulami biologického rozpoznávání, a tím modifikovat jejich povrch ve smyslu vyšší sterické či elektro–sterické stabilizace. Tato povrchová modifikace umožňuje použití nanočástic ušlechtilých kovů v chemických, biologických, technických a lékařských aplikacích (Mustansar a kol. 2016).

2.5.3. Využití optických vlastností nanočástic ušlechtilých kovů

Nanočástice ušlechtilých kovů, zejména pak stříbra, jsou mimořádně účinné při absorpci a rozptylu světla. Na rozdíl od mnoha barviv a pigmentů mají barvu, která závisí pouze (pokud eliminujeme agregaci vlivem nedostatečně chráněného povrchu nanočástic) na jejich velikosti a tvaru v daném prostředí. Jak už bylo řečeno, silná interakce nanočástic ušlechtilých kovů se světlem nastává, jestliže vodivé elektrony na povrchu kovů kolektivně oscilují, když jsou

excitovány světlem při specifických vlnových délkách (obrázek 5, vlevo). Tato SPR oscilace má pro nanočástice ušlechtilých kovů za následek neobvykle silné rozptylové a absorpční vlastnosti. Ve skutečnosti mohou mít tyto nanočástice efektivní extinkční (tzn. rozptylové a absorpční) průřezy až desetkrát větší než je jejich fyzický průřez. Podle Mieho teorie pro kovovou nanosféru s velikostí částic $2R$, které jsou mnohem menší, než je vlnová délka světla λ (kvazistatická a dipólová mez), je průřez extinkce nanočástic dán vztahem (Liz-Marzan 2004):

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\varepsilon_i}{(\varepsilon_r + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_i^2}. \quad (10)$$

Ze vztahu vyplývá, že optická extinkce má maximální pásmo při rezonanční podmínce přibližně dané $\varepsilon_r = -2\varepsilon_m$, za předpokladu, že imaginární část dielektrické konstanty je malá nebo slabě závislá na frekvenci (Link a kol. 2003).

Zásluhou této vlastnosti jsou mimo jiné nanočástice ušlechtilých kovů s rozměry pod 100 nanometrů snadno vizualizovatelné konvenčním mikroskopem (Jain a kol. 2007). Například když jsou stříbrné nanočástice s velikostí 60 nm zkoumány pod mikroskopem při zobrazení v temném poli (obrázek 5, vpravo) a jsou osvětlovány bílým světlem, objevují se jako jasné modré bodové zdroje rozptylu. Jasné modrá barva je způsobena signálem SPR, který dosahuje vrcholu vlnové délky okolo 450 nm. Jedinečnou vlastností sférických nanočástic stříbra je, že tento pík vlnové délky SPR může být naladěn od 400 nm (fialové světlo) do 530 nm (zelené světlo), a to změnou velikosti částic a místního indexu lomu v blízkosti povrchu částic. Větší posuny píku do infračervené oblasti elektromagnetického spektra o vlnové délce SPR, lze dosáhnout vytvořením nanočástic stříbra, které mají tvary tyčinek nebo destiček (Karthikeyan a kol. 2017).

2.5.4. Interakce mezi nanočásticemi ušlechtilých kovů s fluorofory

Povrchy a kovové nanočástice vykazují rozmanité a komplexní optické vlastnosti. Příkladem jsou intenzivní barvy koloidních roztoků nanočástic ušlechtilých kovů, dále absorpce povrchové plazmonové rezonance tenkými kovovými filmy a také zhášení excitovaných fluoroforů v blízkosti kovových povrchů. V poslední době se interakce fluoroforů s kovovými částicemi a povrchy používají ke zvýšení intenzity fluorescence, k vyvinutí testů založených na fluorescenčním zhášení zlatými koloidy anebo na získání směrového záření z fluoroforů v blízkosti tenkých kovových filmů. Pro fluorescenci ovlivněnou kovem je obtížné předvídat, zda konkrétní kovová struktura jako je koloidní, fraktální nebo kontinuální povrch, zhasne nebo zvýší fluorescenci (Lakowicz 2005).

Z optických vlastností kovových struktur a podle modelu RP lze předpovídat emise nebo zhášení fluoroforu, který je v blízkosti kovu, jak je vypočítáno pomocí elektrodynamiky, Mieho teorie nebo Maxwellových rovnic. Například Mieho teorie říká, že podle velikosti a tvaru částic může být extinkce kovových koloidů způsobena buď absorpcí nebo rozptylem. Energie dopadu se rozptýlí absorpcí. Radiační záření je vytvořeno rozptylem. Na základě našeho modelu se očekává, že malé koloidy zhášejí fluorescenci, protože absorpce je dominantní nad rozptylem. Očekává se, že větší koloidy zvýší fluorescenci, protože rozptylová složka je dominantní nad absorpcí. Schopnost povrchu kovu absorbovat nebo odrážet světlo je určena požadavkem na shodnosti vlnového čísla, které je na rozhraní kov-vzorek. Úvahy o shodě vlnového čísla mohou být také použity k předpovědi, zda budou fluorofory v dané vzdálenosti od souvislého rovinného povrchu emitovat nebo budou zhášeny. Tyto úvahy naznačují, že tzv. „ztrátové povrchové vlny“, které zhášejí fluorescenci, jsou způsobeny indukovanými elektronovými oscilacemi, které nemohou vyzařovat do vzdáleného pole, protože není možné použít vlnové vektorové přizpůsobení (Lakowicz 2005).

Účinky kovových povrchů na fluorescenci mají dlouhou vědeckou historii, pravděpodobně počínající klasickými zprávami od Drexhageho (Drexhage 1970). Doba života excitovaného stavu fluoroforu oscilovala v závislosti na jeho vzdálenosti, která byla srovnatelná s vlnovou délkou emise od odrazného kovového povrchu, v tomto případě tlustého stříbrného filmu (≥ 100 nm) nebo zrcadla (Drexhage 1970). Tento efekt by mohl být vysvětlen odrazem záření vzdáleného pole od fluoroforu zpět na sebe, což závisí na vzdálenosti od povrchu kovu. Když byla amplituda odraženého pole u fluoroforu zvýšena, životnost se snížila. Když se odražené pole postavilo proti poli fluoroforu, životnost se zvýšila (Lakowicz 2005).

Souhlas dat s tímto reflexním modelem byl na většině vzdáleností dostačující, s výjimkou případů, kdy byl fluorofor blízko kovu. Při vzdálenosti pod 20 nm se životnost dramaticky snížila a emise byla silně zhášena. Tento zhášecí efekt byl připsán ztrátovým povrchovým vlnám (LSW), ztrátovému rozptylu, ohmickým ztrátám a podobným pojmem, z nichž všechny znamenaly radiační rozptýlení energie, která probíhá uvnitř kovu (Lakowicz 2005).

Účinky nanočástic kovů na fluorofory a jejich vzájemná interakce se používá pro zvýšení detekovatelnosti fluoroforů. Jsou studovány interakce fluoroforů s kovovými částicemi a povrchy. Bylo zjištěno, že blízkost fluoroforů ve vzdálenosti přibližně 10 nm od filmů obsahujících stříbrné ostrůvky (SIF) má za následek zvýšení emisní intenzity a snížení životnosti. SIF jsou povrchy potažené částicemi stříbra o velikosti menší, než je použitá vlnová délka světla. Tyto povrchy mají heterogenní distribuci velikostí. Podobné účinky zesílení byly

také pozorovány u koloidů stříbra a fraktálních stříbrných povrchů (Parfenov a kol. 2003). Bylo také zjištěno, že emise z komplexu kov-ligand a lanthanoidový luminofofor byly zvýšeny (Lakowicz a kol. 2002). Výsledky byly jednotně konzistentní se zvýšením rychlosti radiačního rozpadu fluoroforů. To je neobvyklý efekt, protože rychlost rozpadu fluoroforu je dána jeho extinkčním koeficientem a lokálním indexem lomu. Rychlost radiačního rozpadu se ve většině experimentů s fluorescencí nezmění (Lakowicz 2001).

Lze tudíž sumarizovat, že na krátkých vzdálenostech kovové nanočástice zvyšují fluorescenci, když je fluorofor vzdálen od nanočástice v rozmezí 5–20 nm. Tudíž fluorofor není nutně zhášen, ačkoli je ve vzdálenosti 5–20 nm od rovinného povrchu kovové nanočástice (Lakowicz 2005).

Fluorofory byly v novějších studiích zkoumány v blízkosti souvislých tenkých stříbrných (~50 nm) filmů (Lakowicz 2004). Pro povrchovou plasmonovou rezonanci (SPR) se používají zlaté fólie podobné tloušťky. Zlaté a stříbrné filmy vykazují absorpci plazmonové rezonance. Excitované fluorofory v blízkosti stříbrných filmů vyzařují do podložního skleněného substrátu v ostrém úhlovém rozložení. Směrovost emise v hranolu a jeho jedinečné polarizační vlastnosti ukázaly, že záření bylo z povrchových plazmonů indukováno excitovanými fluorofory, které byly v blízkosti kovu. Emisní distribuce vlnových délek však přesně odpovídala obvyklým emisním spektrům fluoroforů. Tento jev se nazývá emise povrchových plazmonů (SPCE). SPCE bylo pozorováno za použití zlatého filmu s elektrochemiluminiscencí, což vylučuje možnost, že vyzařující plazmony byly vytvořeny dopadajícím světlem (Zhang a kol. 2004a). Je překvapivé, že bylo pozorováno SPCE na zlatě a hliníku, o nichž je známo, že silně zhášejí fluorescenci. U některých stříbrných částic bylo také pozorováno zhášení (Pal a kol. 1997).

Bylo pozorováno SPCE zejména s kovy, o nichž je známo, že zhášejí fluorescenci. Z tloušťky vzorků plyne, že fluorofory jsou na krátkých vzdálenostech od kovu (10–80 nm) a ne ve vzdálenějších podmínkách odrazného pole Drexhage (100–500 nm). Výsledky z SPCE naznačují, že excitované fluorofory na těchto krátkých vzdálenostech vyvolaly elektronové oscilace v kovovém filmu, který vyzařoval do skleněného hranolu. Což je překvapující, protože v literatuře je uvedeno, že emise je na těchto krátkých vzdálenostech zhášena ztrátovými povrchovými vlnami (Chance a kol. 1973, Ford a kol. 1984), a proto by se nedaly pozorovat. Pokud fluorofor vyvolá v kovu oscilace a při větších odrazných vzdálenostech bude pokračovat v jejich indukci, potom fluorofor vstoupí do zóny zhášení krátkého dosahu (Lakowicz 2005). Kromě toho bylo zjištěno, že kovové částice zvyšují fluorescenci na krátkých vzdálenostech fluoroforu od kovu, 5–10 nm (Malicka a kol. 2003), takže fluorofor není nutně zhášen při 5–10

nm od rovinného kovového povrchu. Lakowicz ve své publikaci z roku 2005 se pozastavil nad těmito rozdílnými výsledky, které ho vedly k otázce, proč mají kovové povrchy a částice na fluorescenci různé účinky. Dále ho zaujalo zhášení na kratších vzdálenostech od rovinného povrchu, ale ne v blízkosti povrchu kovové částice nebo tenkého (50 nm) spojitého kovového filmu. Také byl zpochybněn fyzický význam LSW (Lakowicz 2005).

Některé fluoroforem indukované oscilace vedou k radiačnímu záření ve vzdáleném poli a dalším indukovaným oscilacím. Prohlášení, že kovy zháší na krátkých vzdálenostech je zavádějící, skrývá skutečný původ zhášení a brání účinnému využití interakcí fluorofor-kov. Lakowicz se ve své publikaci z roku 2005 domnívá, že kovové povrchy nemusí nevyhnutelně zhášet fluorescenci s výjimkou případů, kdy nedochází k žádné základní absorpci, která by způsobovala elektronové pohyby. Tyto absorpce jsou někdy označovány jako absorpce interbandu (Liebsch 1997). Oscilace vytvořené v kovech, kdy je fluorofor a kov na krátkých vzdálenostech, nemůže dojít k vyzařování z důvodu optických omezení na rozhraní kov-vzorek. Pozorované zhášení na krátkých vzdálenostech od kovu nemusí být způsobeno typickým chromoforickým absorpčním procesem a interakce s krátkým rozsahem nemusí nutně vést ke zhášení. Plazmony vytvořené na krátkých vzdálenostech fluorofor–kov mohou být zachyceny na rozhraní, to vše se děje kvůli jejich jedinečným optickým vlastnostem, a v důsledku toho se přemění na teplo. Plazmony vyzařují energii z fluoroforu, kdykoliv to dovolí optické podmínky. Pro spojitě povrchy plazmony vyzařují za předpokladu, že se vyskytne vlnová vektorová shoda na rozhraní mezi kovem a dielektrikem. U koloidů vyzařují indukované plazmony vždy, když je dominantní rozptylový průřez ve srovnání s absorpčním průřezem koloidu (Lakowicz 2005).

Pozorování ztrátových povrchových vln, které jsou zachyceny plazmony, není triviální. Termín LSW znamená, že energii nelze obnovit jako užitečný signál. Koncept zachycených plazmonů naznačuje, že změny v optických podmínkách mohou dovolit energii vyzařovat do vzdáleného pole. Mnoho různých efektů silných zrcadel, tenkých kovových filmů a kovových částic má za následek schopnost, nebo neschopnost plazmonů vyzařovat. Tento koncept je označován jako vyzařující plazmon (RP) (Lakowicz 2005).

Pro praktické aplikace interakcí fluorofor–kov má vyzařující plazmový model zásadní důsledky. Kovové struktury lze vybírat s přihlédnutím k tomu, zdali může dojít k plazmovému záření na vzdáleném poli, které je z fluoroforem indukovaných plazmatů. Silné interakce fluoroforů s povrchem kovových nanočástic, které mají nízký kvantový výtěžek, mohou rychle přenášet svoji energii na kov, který pak může vyzařovat s vyšší účinností než fluorofor ve volném prostoru. Vzdálené pole radiačního schématu lze vypočítat z elektrodynamické teorie,

což nám umožňuje racionální návrh nanostruktur fluorofor–kov, které by měly požadované optické vlastnosti (Lakowicz 2005).

3. Cíle práce

Jedním z cílů mé bakalářské práce je přehledně popsat aromatické aminokyseliny a zjistit jejich chování coby fluoroforů v blízkosti nanočástic. Experimentální cíl práce, založený na proměření extinkčních, absorpčních a fluorescenčních spekter zkoumaných látek, tkví ve zjištění, zdali probíhá interakce mezi nanočásticemi stříbra a zlata s aromatickými aminokyselinami. Dále je mým cílem diskutovat výsledky, u kterých vysvětlím, jakým způsobem spolu nanočástice a aminokyseliny interagují a proč dochází ke zhášení či naopak zesílení intenzit fluorescence příslušných aminokyselin vlivem blízkosti nanočástic.

4. Materiál a metody

Mezi zkoumané nanočástice ušlechtilých kovů patří nanočástice stříbra a zlata ve formě koloidů, které byly syntetizovány za snížené teploty redukcí stříbrné soli (ve tvaru dusičnanu AgNO_3) anebo zlatité soli (ve tvaru tetrahydrátu tetrachlorozlatité kyseliny $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) borohydridem sodným (NaBH_4).

Zkoumanými aminokyselinami byly patří L-tryptofan, L-tyrosin, L-fenylalanin a L-histidin. L-tryptofan ($M_m = 204,38 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), L-tyrosin ($M_m = 181,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a L-histidin ($M_m = 155,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), byly zakoupeny od výrobce Carl Roth s čistotou vyšší než 98 %. a L-fenylalanin ($M_m = 165,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) byl zakoupen od výrobce Fluka Analytical s čistotou vyšší než 98 %. Všechny aminokyseliny byly v pevném skupenství, proto, aby bylo možné provádět interakce s nanočásticemi, byly rozpuštěny v deionizované vodě. Zásobní roztoky pro všechny aminokyseliny s vyšší koncentrací byly: 1mM. Zásobní roztoky pro nižší koncentrace $c_F = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_W = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ a $c_Y = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Každá z aminokyselin byla namíchána s poněkud odlišnou koncentrací, a to z důvodu eliminace efektu vnitřního filtru při pozdějších fluorescenčních měřeních. Na základě měření absorpčních spekter (při dosažení absorbancí pod hodnotou 0,1), byly finální koncentrace aminokyselin takovéto: $c_{F1} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ a následně $c_{F2} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$; $c_{W1} = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ a následně $c_{W2} = 6,25 \times 10^{-9} \text{ M}$; $c_{Y1} = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ a následně $c_{Y2} = 2,25 \times 10^{-7} \text{ M}$; $c_H = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Koloidy obsahující nanočástice stříbra a zlata byly také ředěny deionizovanou vodou, opět z důvodu eliminace efektu vnitřního filtru. Koloid s nanočásticemi stříbra byl zředěn $18\times$ (1 mL koloidu a 17 mL deionizované vody) a koloid s nanočásticemi zlata byl zředěn $10\times$ (1 mL koloidu a 9 mL deionizované vody).

Při interakci nanočástic stříbra a zlata s aminokyselinami bylo dosaženo stejných koncentrací jaké jsou uvedeny výše, s tím rozdílem, že byly použity naředěné koloidy, které se používaly místo deionizované vody.

4.1. Měření absorpčních spekter

Extinkční spektra nanočástic stříbra a zlata a absorpční spektra aromatických aminokyselin byly měřeny na absorpčním spektrometru SPECORD 250 PLUS (Analytik Jena, Jena, Německo). Pro všechny vzorky byla použita křemenná kyveta s optickou dráhou 1 cm. Jako reference sloužila deionizovaná voda ve stejném typu kyvety. Všechna spektra byla

měřena v rozsahu 190–800 nm, rychlostí 5 nm/s s rozlišením 1 nm. Šířka štěrby monochromátoru byla nastavena na 1 nm.

4.2. Měření emisních spekter

Pro každou aminokyselinu musela být zjištěna excitační vlnová délka, což bylo určeno pomocí měření excitačně emisních 3D map. Měření excitačně emisních 3D map probíhalo na spektrofluorometru F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japonsko). Byly zvoleny následující vlnové délky pro L-tryptofan 280 nm, pro L-tyrosin 275 nm a pro L-fenylalanin 255 nm. Excitačně emisní mapy byly měřeny v rozsahu pro excitaci 200–400 nm a pro emisi 200–600 nm rychlostí 2400 nm/min, šířka štěrby monochromátoru pro emisní a excitační pás byla 5 nm a krok byl nastaven na 5 nm.

K měření emisních spekter pro všechny aminokyseliny a roztoky nanočástic s aminokyselinami byl použit spektrofluorometr FP-8500 (Jasco, Pfungstadt, Německo). Emisní spektra pro vyšší koncentrace byla měřena rychlostí 50 nm/min, šířka štěrby monochromátoru pro emisní a excitační pás byla 2,5 nm a krok byl nastaven na 0,5 nm. Emisní spektra pro nižší koncentrace byla měřena s počtem akumulací 3, rychlostí 50 nm/min, šířka štěrby monochromátoru pro emisní a excitační pás byla 2,5 nm a krok byl nastaven na 0,5 nm.

V průběhu měření excitačně emisních 3D map a emisních spekter byly používány křemenné květy s optickou dráhou 1 cm.

5. Výsledky

Před vlastním měřením spekter byl vypočítán povrch, a také počet stříbrných a zlatých nanočástic ve zředěných koloidech. Následně byla určena koncentrace monovrstevného pokrytí aminokyselin na nanočásticích. Měření extinkčních, absorpčních a fluorescenčních spekter a také extinkčně emisních 3D map analyzovaných nanočástic a aminokyselin, byla provedena dle parametrů v metodice.

5.1. Výpočty

AgbhII: $2,20 \cdot 10^{-3} \text{ M AgNO}_3$ $V_f = 9 + 75 = 84 \text{ ml}$

$$C_f(\text{Ag}^+) = \frac{V_0}{V_f} \cdot C_0 = \frac{9}{84} \cdot 2,20 \cdot 10^{-3} = 2,36 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

Kolik atomů Ag je k dispozici v 1 ml koloidu?

$$V = 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$$

$$C_f(\text{Ag}^+) = 2,36 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$N = ?$$

$$n = c \cdot V = \frac{N}{N_A}$$

$$N(\text{Ag v 1ml}) = N_A \cdot C_f \cdot V = 6,022 \cdot 10^{23} \cdot 2,36 \cdot 10^{-4} \cdot 10^{-3} = 1,421 \cdot 10^{17}$$

Uvažujeme, že nanočástice je kulatá o poloměru $r = 5 \text{ nm}$ v průměru (tj. $5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$)

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3$$

Kolik atomů obsahuje 1 nanočástice?

$$\rho(\text{Ag}) = 10,490 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

$$m(1 \text{ atomu Ag}) = A_r(\text{Ag}) \cdot m_u = 1,660 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

$$m(1 \text{ atomu Ag}) = 107,87 \cdot 1,660 \cdot 10^{-24} = 179,064 \cdot 10^{-24}$$

$$m(1 \text{ nanočástice}) = \rho \cdot V = 10,490 \cdot \frac{4}{3} \pi (5 \cdot 10^{-7})^3 = 5492,551 \cdot 10^{-21} \text{ g}$$

$$\text{Tudíž: } N(\text{Ag atomů v 1 nanočástici}) = \frac{m(1 \text{ nanočástice})}{m(\text{Ag 1 atom})} = \frac{5492,551 \cdot 10^{-21}}{179,064 \cdot 10^{-24}} =$$

$$= 30,674 \cdot 10^3 \text{ částic}$$

Počet Ag nanočástic v 1 ml koloidu

$$N = \frac{N_{\text{Atomů v 1ml}}}{N_{\text{Atomů v NP}}} = \frac{1,421 \cdot 10^{17}}{30,764 \cdot 10^3} = \mathbf{4,633 \cdot 10^{12}}$$

AubhII: $2,20 \cdot 10^{-3}$ M H₂AuCl₄ $V_f = 9 + 75 = 84$ ml

$$C_f(\text{Au}^{3+}) = \frac{V_0}{V_f} \cdot C_0 = \frac{9}{84} \cdot 2,20 \cdot 10^{-3} = 2,36 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

Kolik atomů Au je k dispozici v 1 ml koloidu?

$$V = 10^{-3} \text{dm}^3$$

$$C_f(\text{Ag}^+) = 2,36 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$$

$$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$$

$$N = ?$$

$$n = c \cdot V = \frac{N}{N_A}$$

$$N(\text{Au v 1ml}) = N_A \cdot C_f \cdot V = 6,022 \cdot 10^{23} \cdot 2,36 \cdot 10^{-4} \cdot 10^{-3} = 1,421 \cdot 10^{17}$$

Uvažujeme, že nanočástice je kulatá o poloměru $r = 5$ nm v poměru (tj. $5 \cdot 10^{-7}$ cm)

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot r^3$$

Kolik atomů obsahuje 1 nanočástice?

$$\rho(\text{Au}) = 19,320 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

$$m_u = 1,660 \cdot 10^{-24}$$

$$m(1 \text{ atomu Au}) = A_r(\text{Au}) \cdot m_u = 196,967 \cdot 1,660 \cdot 10^{-24} = 327,162 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

$$m(1 \text{ nanočástice}) = \rho \cdot V = 19,320 \cdot \frac{4}{3} \pi (5 \cdot 10^{-7})^3 = 10115,928 \cdot 10^{-21} \text{ g}$$

$$\text{Tudíž: } N(\text{Au atomů v 1 nanočástici}) = \frac{m(1 \text{ nanočástice})}{m(\text{Au 1 atom})} = \frac{10115,928 \cdot 10^{-21}}{327,162 \cdot 10^{-24}}$$

$$= 30920 \text{ částic}$$

Počet Au nanočástic v 1 ml koloidu

$$N = \frac{N_{\text{Atomů v 1ml}}}{N_{\text{Atomů v NP}}} = \frac{1,421 \cdot 10^{17}}{30920} = \mathbf{4,596 \cdot 10^{12}}$$

Určení koncentrace monovrstevného pokrytí aminokyselin na nanočásticích.

Poloměry kovalentní vazby dle (Červinka a kol. 1982)

Uvažujeme

$$r(C) = 77 \text{ pm}$$

$$r(O) = 66 \text{ pm}$$

pro jednoduchou vazbu $l(C - O)$

$$R(C) + r(O) = 143 \text{ pm}$$

$$r(C =) = 67 \text{ pm}$$

$$r(O =) = 55 \text{ pm}$$

$$r(C =) + r(O =) = 122 \text{ pm}$$

1,5tá vazba v COO^- mezi 143 pm a 122 pm průměr $l(C - C)_{1,5} = 132,5 \text{ pm}$

$$r(H -) = 30 \text{ pm} \wedge r(O) = 66 \text{ pm} \Rightarrow l(O - H) = 96 \text{ pm}$$

Pro aromatický kruh (benzen) $l(C - C) = 139 \text{ pm}$

$$l(C - H) = 30 + 77 = 107 \text{ pm}$$

$$sp^2: l(C = C) = 134 \text{ pm}$$

$$\text{Úhel } \alpha = 120^\circ$$

$$l(C = C)\phi = 139 \text{ pm}$$

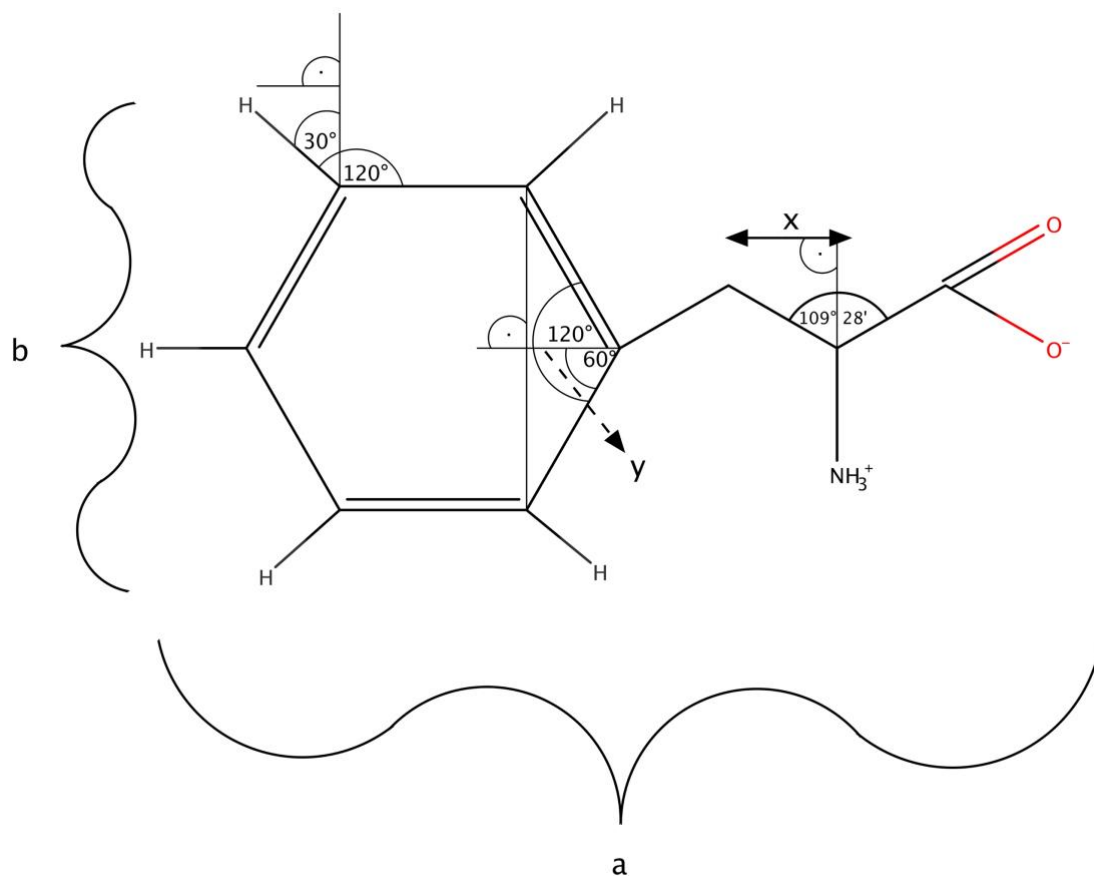
$$sp^3: l(C - C) = 154 \text{ pm}$$

$$\text{Úhel } \beta = 109^\circ 28'$$

Poté průmět molekuly fenylalaninu na povrchu NP, kdy zabere molekula maximální plochu na NP (tj. záporné náboje jsou co nejdále od povrchu):

$$S = (a \cdot b),$$

Kde a je délka od ϕ aromatického kruhu po $C - O^-$, b je šířka aromatického kruhu ϕ



Obrázek 7: Struktura fenylalaninu pomocná pro výpočty.

$$\forall x, y \quad x \doteq l(C - C) \cdot \sin 55^\circ$$

$$y \doteq l(C = C)_\phi \cdot \cos 60^\circ$$

$$a(F) = (b\phi) l(C = C)_\phi + 2y + l(C - H) + l(C - C) + 2x + l(C - O),$$

$$b(F) = l(C = C)_\phi + 2y + 2l(C - H) \cos 30^\circ,$$

$$a(F) = l(C = C)_\phi + 2y + l(C - H) + l(C - C) + 2x + l(C - O)$$

$$a(F) = l(C = C)_\phi + 2l(C = C)_\phi \cos 60^\circ + l(C - H) + l(C - C) + 2l(C - C) \sin 55^\circ + l(C - O)$$

$$a(F) = 139 + 2 \cdot 139 \cdot \cos 60^\circ + 107 + 154 + 2 \cdot 154 \cdot \sin 55^\circ + 132,5 \text{ [pm]}$$

$$a(F) = 139 + 2 \cdot 139 \cdot \frac{1}{2} + 261 + 308 \cdot 0,819 + 132,5 = 923,752 \text{ pm}$$

$$b(F) = 139 + 2 \cdot 139 \cdot \frac{1}{2} + 2l(C - H) \cos 30^\circ = 278 + 214 \cdot 0,866 = 463 \text{ pm}$$

$$S(F) = 924 \cdot 463 \text{ pm}^2 = 427812 \text{ pm}^2 = \mathbf{0,428 \text{ nm}^2}$$

$$S(Y) \equiv a \text{ je delší o } l(C - O) \text{ a } l(O - H) \wedge l(O - H) = 96 \text{ pm}$$

$S(Y)$ pro maximální plochu molekuly Y na povrchu NP:

$$a(Y) = a(F) + l(O - H) + l(C - O) - l(C - H)$$

$$a(Y) = 924 + 96 + 146 - 107$$

$$a(Y) = 1056 \text{ pm}$$

$$b(Y) = b(F)$$

$$S(Y) = a(Y) \cdot b(F) = 1056 \cdot 463 \text{ pm}^2 \doteq \mathbf{0,489 \text{ nm}^2}$$

Přibližně $S(W)$ pro maximální plochu molekuly W na povrchu NP

$$a(W) = a(F) = 924 \text{ pm}$$

$$b(W) \doteq 2 \cdot b(F) - 2 \cdot \cos 30^\circ \cdot l(C - H)$$

$$b(W) = 2 \cdot 463 - 2 \cdot \cos 30^\circ \cdot 107 \text{ pm}$$

$$b(W) = 926 - 185 \doteq 740,671 \text{ pm}$$

$$S(W) = a(W) \cdot b(W) = 924 \cdot 740,671 = \mathbf{0,684 \text{ nm}^2}$$

Nyní plocha povrchu NP:

$$r(NP) = 5 \text{ nm}$$

$$S_o = 4\pi r^2$$

$$S_o(NP) = 4\pi 5^2 = 314 \text{ nm}^2$$

Teoreticky na 1 NP se naváže $N(F)$ molekul F : $N(F) = \frac{314}{0,428} \doteq \mathbf{733 \frac{\text{molekul}}{1NP}}$

na 1 NP se naváže $N(W)$ molekul W : $N(W) = \frac{314}{0,684} \doteq \mathbf{459 \frac{\text{molekul}}{1NP}}$

na 1 NP se naváže $N(Y)$ molekul Y : $N(Y) = \frac{314}{0,489} \doteq \mathbf{642 \frac{\text{molekul}}{1NP}}$

Z důvodu snížení absorpce pod 0,1 (z důvodu vyhnutí se efektu vnitřního filtru při měření fluorescence) jsme nanočástice zředili.

$$\text{Ag NPs: } \frac{4,633 \cdot 10^{12}}{0,001} = 4,633 \cdot 10^{15} \frac{\text{NPs}}{\text{l}}$$

$$\text{Ag Nanočástice jsme zředili } 18 \times \Rightarrow \mathbf{2,574 \cdot 10^{14} \frac{\text{NPs}}{\text{l}}}$$

$$\text{Au NPs: } \frac{4,596 \cdot 10^{12}}{0,001} = 4,596 \cdot 10^{15} \frac{\text{NPs}}{\text{l}}$$

$$\text{Au Nanočástice jsme zředili } 10 \times \Rightarrow \mathbf{4,596 \cdot 10^{14} \frac{\text{NPs}}{\text{l}}}$$

Pro monovrstevné pokrytí při maximální zabrané ploše molekulami F, W, Y na Ag NPs

Počet molekul F na 1 NP × počet NPs

$$(AgNPs + F) \Leftrightarrow 733 \times 2,574 \cdot 10^{14} \frac{\text{molekul}}{l} \wedge V = 1l:$$

$$c = n \Rightarrow c_{mn}^{Ag}(F) = \frac{18,867 \cdot 10^{16}}{6,023 \cdot 10^{23}} M = \mathbf{3,133 \cdot 10^{-7} M}$$

$$(AgNPs + W) \Leftrightarrow 459 \times 2,574 \cdot 10^{14} \frac{\text{molekul}}{l} \wedge V = 1l:$$

$$c = n \Rightarrow c_{mn}^{Ag}(W) = \frac{11,815 \cdot 10^{16}}{6,023 \cdot 10^{23}} M = \mathbf{1,962 \cdot 10^{-7} M}$$

$$(AgNPs + Y) \Leftrightarrow 642 \times 2,574 \cdot 10^{14} \frac{\text{molekul}}{l} \wedge V = 1l:$$

$$c = n \Rightarrow c_{mn}^{Ag}(Y) = \frac{1,652 \cdot 10^{17}}{6,023 \cdot 10^{23}} M = \mathbf{2,740 \cdot 10^{-7} M}$$

Pro monovrstevné pokrytí při maximální zabrané ploše molekulami F, W, Y na Au NPs

$$(AuNPs + F) \Leftrightarrow 733 \times 4,596 \cdot 10^{14} \frac{\text{molekul}}{l} \wedge V = 1l:$$

$$c = n \Rightarrow c_{mn}^{Au}(F) = \frac{33,689 \cdot 10^{16}}{6,023 \cdot 10^{23}} M = \mathbf{5,593 \cdot 10^{-7} M}$$

$$(AuNPs + W) \Leftrightarrow 459 \times 4,596 \cdot 10^{14} \frac{\text{molekul}}{l} \wedge V = 1l:$$

$$c = n \Rightarrow c_{mn}^{Au}(W) = \frac{21,096 \cdot 10^{16}}{6,023 \cdot 10^{23}} M = \mathbf{3,503 \cdot 10^{-7} M}$$

$$(AuNPs + Y) \Leftrightarrow 642 \times 4,596 \cdot 10^{14} \frac{\text{molekul}}{l} \wedge V = 1l:$$

$$c = n \Rightarrow c_{mn}^{Au}(Y) = \frac{29,506 \cdot 10^{16}}{6,023 \cdot 10^{23}} M = \mathbf{4,899 \cdot 10^{-7} M}$$

\Leftrightarrow v experimentech fluorescence je:

$C_{f1}(F) = 1 \times 10^{-4} M \Rightarrow$ mnohonásobně nad monovrstevným pokrytím

$C_{f1}(W) = 2,5 \times 10^{-6} M \Rightarrow$ nad monovrstevným pokrytím

$C_{f1}(Y) = 1,5 \times 10^{-5} M \Rightarrow$ nad monovrstevným pokrytím

$C_{f2}(F) = 1 \times 10^{-5} M \Rightarrow$ mnohonásobně nad monovrstevným pokrytím

$C_{f2}(W) = 6,25 \times 10^{-9} M \Rightarrow$ pod monovrstevným pokrytím

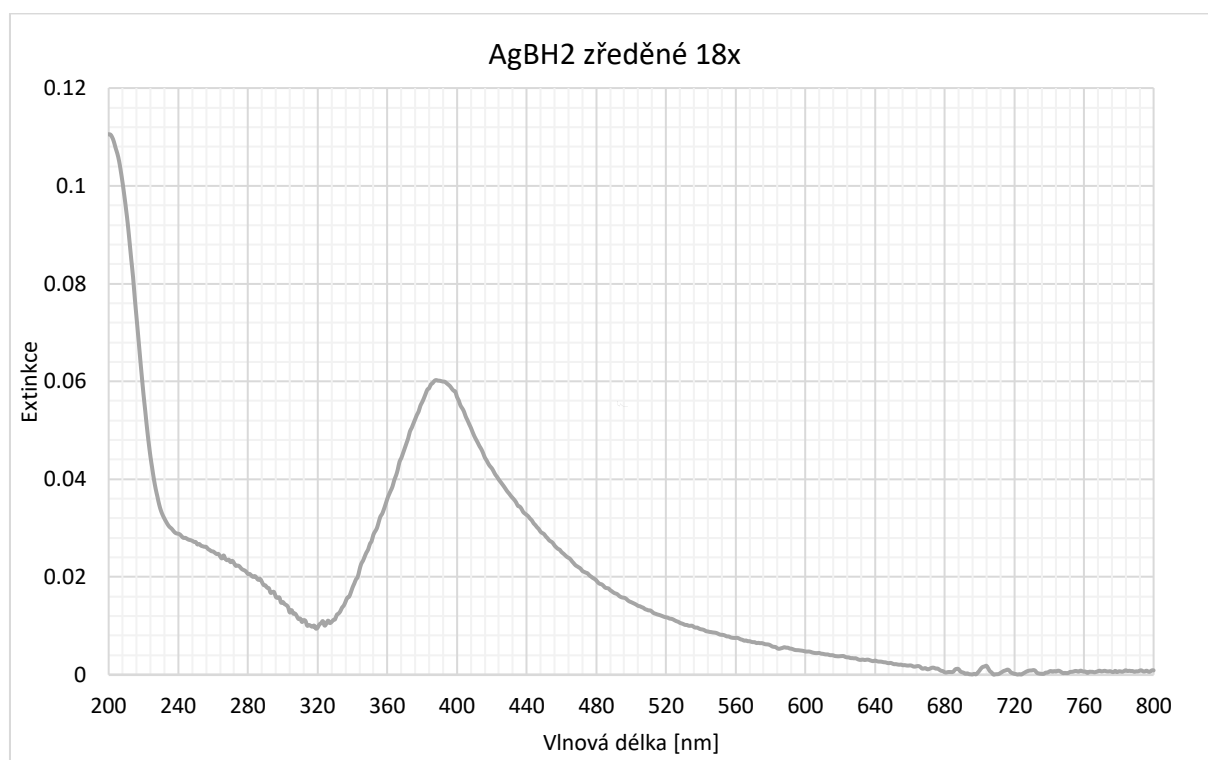
$C_{f2}(Y) = 2,25 \times 10^{-7} M \Rightarrow$ okolo hodnoty monovrstevného pokrytí

5.2. Extinkční spektra

U koloidních roztoků nanočástic stříbra a zlata byla měřena extinkční spektra (viz grafy 1 a 2).

5.2.1. Nanočástice stříbra

Extinkční spektrum pro 18× zředěný koloidní roztok s nanočásticemi stříbra vykazuje jedno maximum v měřeném rozsahu vlnových délek – graf 1, a to ve viditelné spektrální oblasti při 388 nm.



Graf 1: Extinkční průběh 18x zředěného AgBH2.

5.2.2. Nanočástice zlata

Extinkční spektrum pro 10× zředěný koloidní roztok s nanočásticemi zlata vykazuje jedno maximum v měřeném rozsahu vlnových délek – graf 2, a to ve viditelné spektrální oblasti při 520 nm.



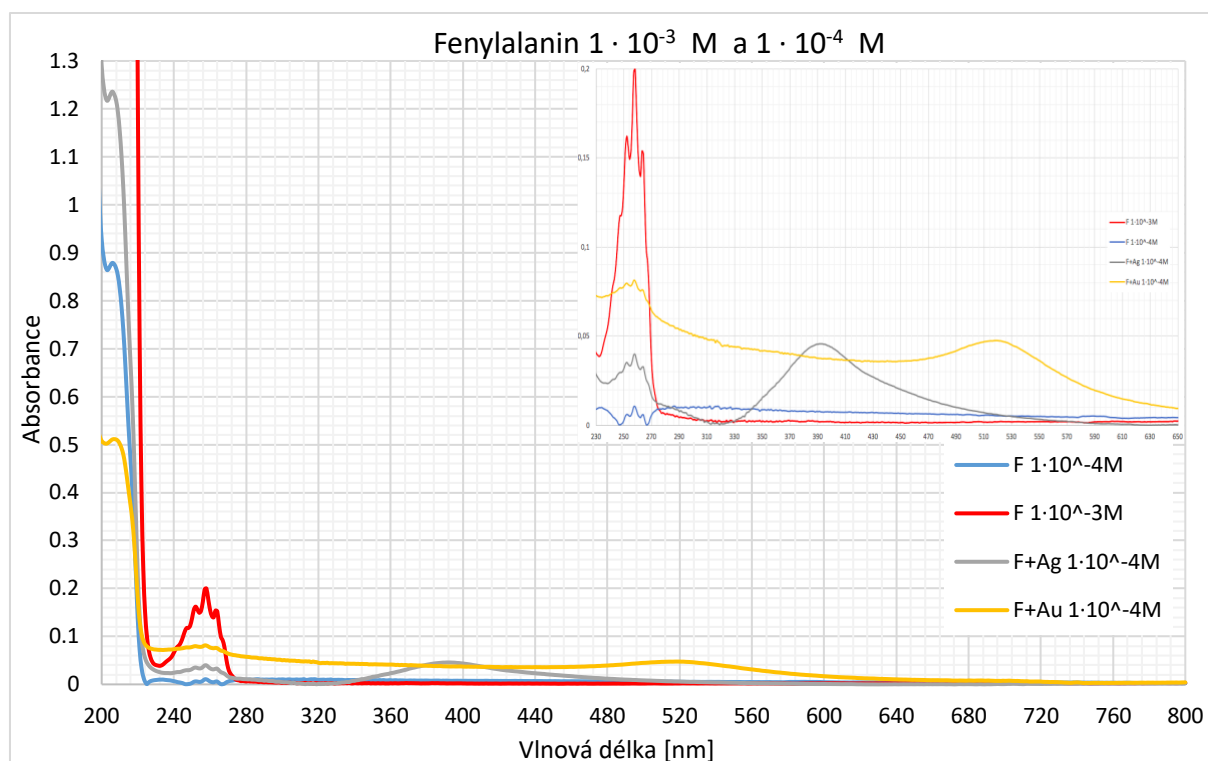
Graf 2: Extinkční průběh koncentrovaného AuBH2.

5.3. Absorpční spektra aminokyselin

Byla měřena pouze absorpční spektra pro vyšší koncentrace (viz grafy 3,4 a 5), u nižších koncentracích byly dosaženy hodnoty pod prahem detekce UV–Vis absorpčního spektrometru, tudíž nebylo nic detekováno.

5.3.1. Fenylalanin

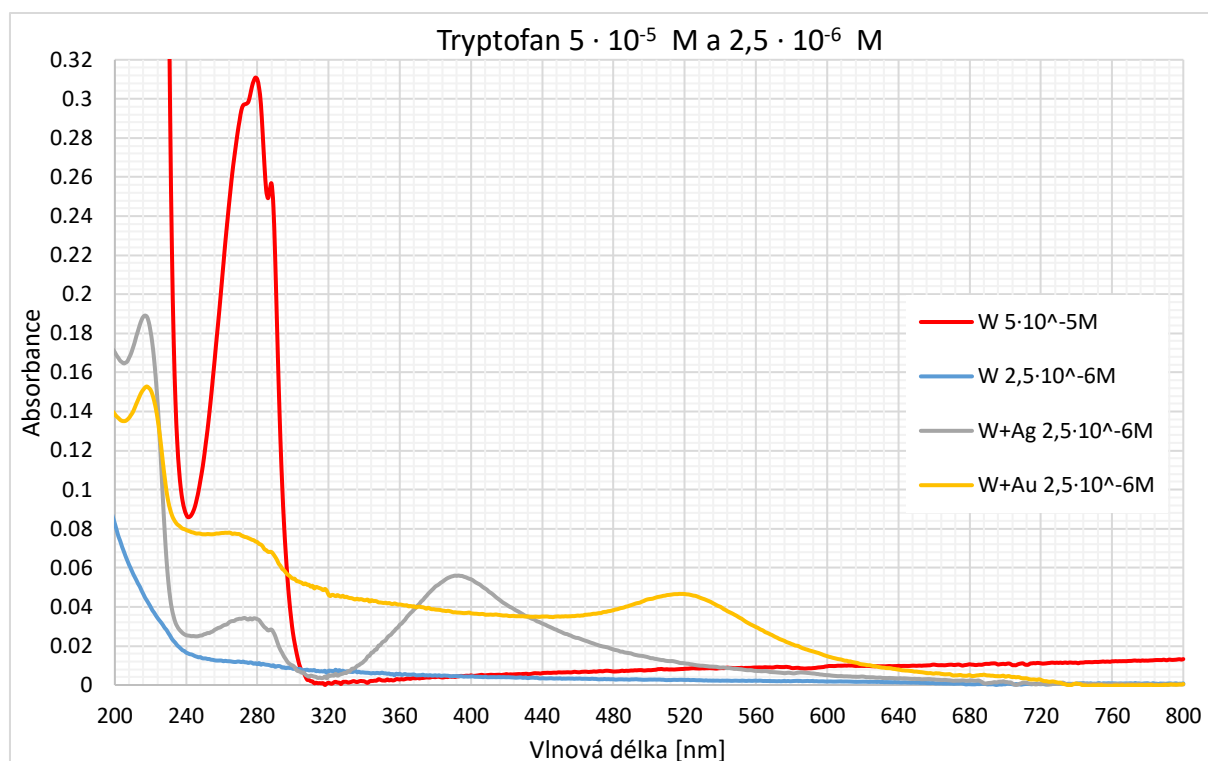
Absorpční spektrum pro samotný fenylalanin vykazuje dvě maxima v měřeném rozsahu vlnových délek, a to v ultrafialové spektrální oblasti při 206 nm a 258 nm – graf 3. Po přidání fenylalaninu do koloidního roztoku s nanočásticemi stříbra absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 206 nm, 258 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 391 nm třetí maximum patří nanočásticím stříbra (viz Graf 3). Po přidání fenylalaninu do koloidního roztoku s nanočásticemi zlata absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 207 nm, 257 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 519 nm. Třetí maximum patří nanočásticím zlata (viz Graf 3).



Graf 3: Průběh absorbance $1 \cdot 10^{-3}$ M a $1 \cdot 10^{-4}$ M čistého L-Fenylalaninu, L-Fenylalaninu+AgBH₂, L-Fenylalaninu+AuBH₂.

5.3.2. Tryptofan

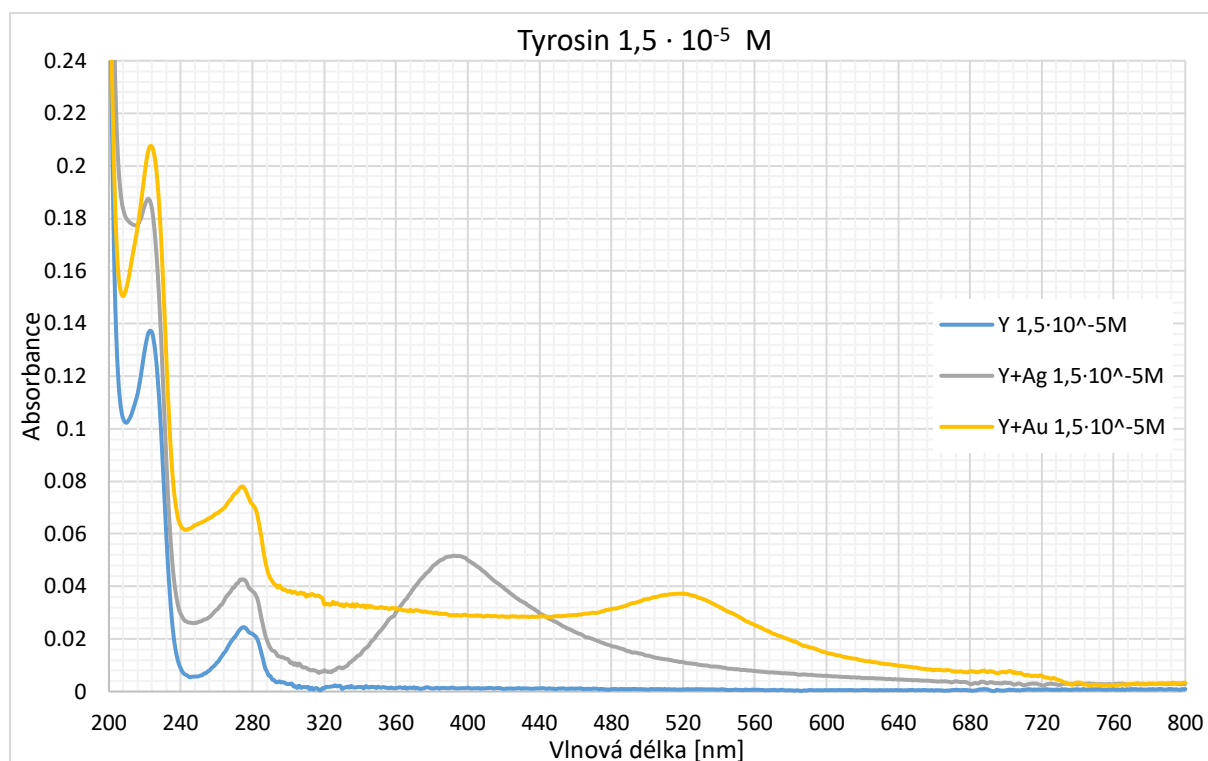
Absorpční spektrum pro samotný tryptofan vykazuje dvě maxima v měřeném rozsahu vlnových délek, a to v ultrafialové spektrální oblasti při 219 nm a 279 nm – graf 4. Po přidání tryptofanu do koloidního roztoku s nanočásticemi stříbra, absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 217 nm, 278 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 391 nm. Třetí maximum patří nanočásticím stříbra (viz Graf 4). Po přidání tryptofanu do koloidního roztoku s nanočásticemi zlata, absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 218 nm, 262 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 519 nm. Třetí maximum patří nanočásticím zlata (viz Graf 4).



Graf 4: Průběh absorbance $5 \cdot 10^{-5}$ M a $2,5 \cdot 10^{-6}$ M čistého L-Tryptofanu, L-Tryptofanu+AgBH₂, L-Tryptofanu+AuBH₂.

5.3.3. Tyrosin

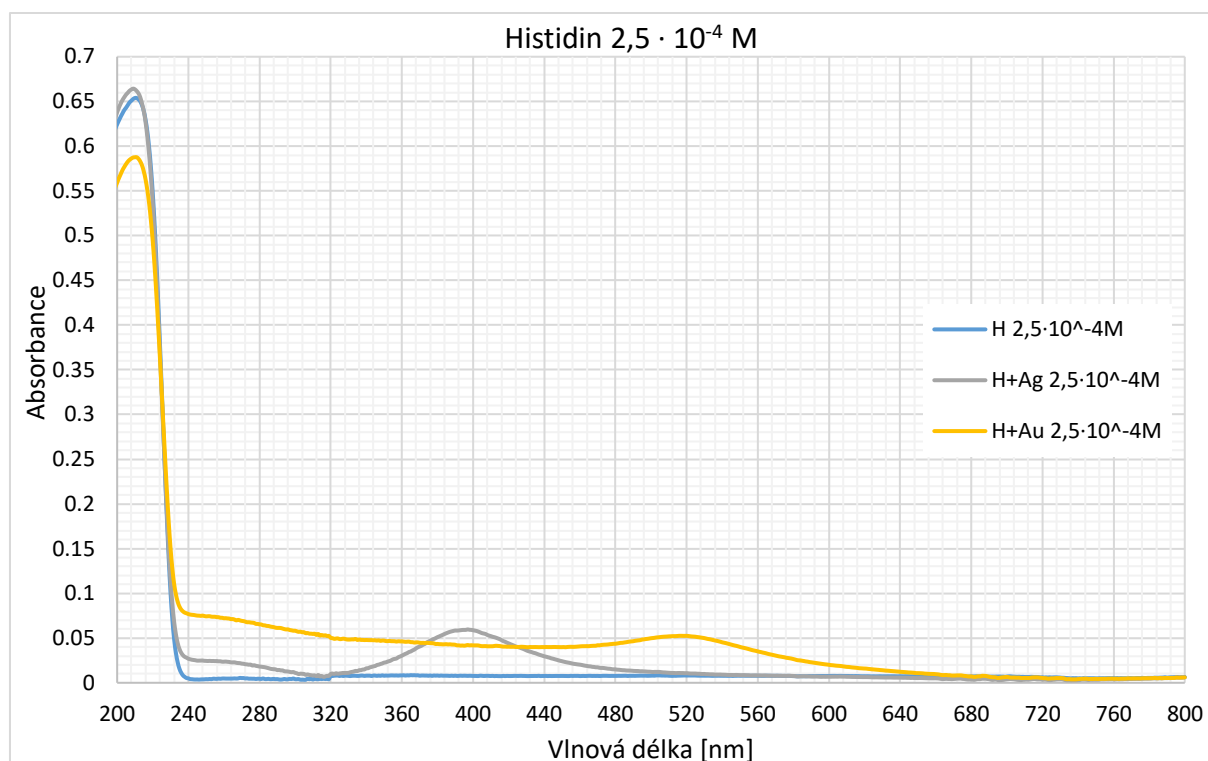
Absorpční spektrum pro samotný tyrosin vykazuje dvě maxima v měřeném rozsahu vlnových délek, a to v ultrafialové spektrální oblasti při 206 nm a 258 nm – graf 5. Po přidání tyrosinu do koloidního roztoku s nanočásticemi stříbra, absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 206 nm, 258 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 391 nm. Třetí maximum patří nanočásticím stříbra (viz Graf 5). Po přidání tyrosinu do koloidního roztoku s nanočásticemi zlata, absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 207 nm, 257 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 519 nm. Třetí maximum patří nanočásticím zlata (viz Graf 5).



Graf 5: Průběh absorbance $1,5 \cdot 10^{-5}$ L-Tyrosinu, L-Tyrosinu+AgBH₂, L-Tyrosinu+AuBH₂.

5.3.4. Histidin

Absorpční spektrum pro samotný histidin vykazuje jedno maximum v měřeném rozsahu vlnových délek, a to v ultrafialové spektrální oblasti při 210 nm – graf 6. Po přidání histidinu do koloidního roztoku s nanočásticemi stříbra, absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 209 nm, 248 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 397 nm. Třetí maximum patří nanočásticím stříbra (viz Graf 6). Po přidání histidinu do koloidního roztoku s nanočásticemi zlata, absorpční spektrum vykazuje dvě maxima v ultrafialové oblasti 211 nm, 248 nm a jedno maximum ve viditelné oblasti 520 nm. Třetí maximum patří nanočásticím zlata (viz Graf 6).



Graf 6: Průběh absorpce $2,5 \cdot 10^{-4}$ M čistého L-Histidinu, L-Histidinu+AgBH₃, L-Histidinu +AuBH₂.

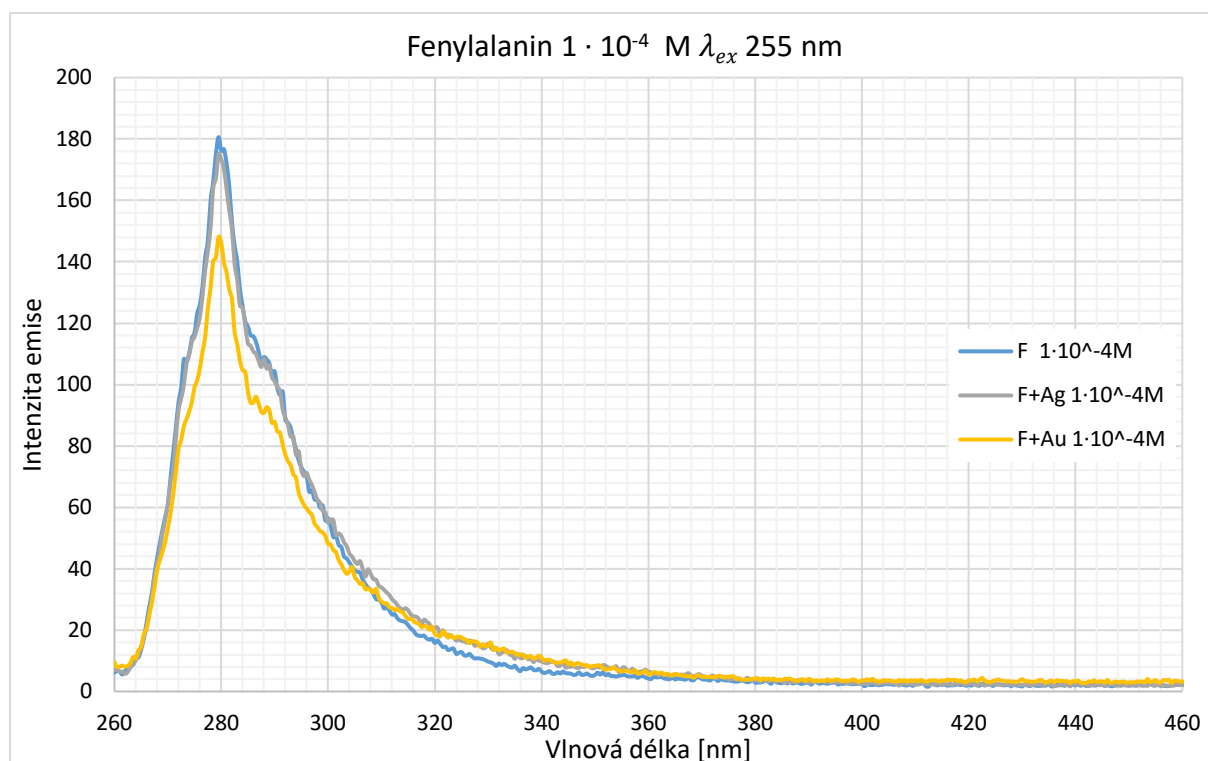
5.4. Emisní spektra

Emisní spektra byla měřena pro všechny zvolené koncentrace z výsledku je patrné, že fluorescenční metody jsou citlivější než absorpční metody, které nebyly nižší koncentrace schopny detekovat.

Histidin nebyl dále měřen, protože to není aminokyselina, která by vykazovala žádnou fluorescenci. Histidin byl zařazen do této bakalářské práce na základě článku (Iwunze 2007), kde byla měřena fluorescence histidinu v simulované tělní tekutině.

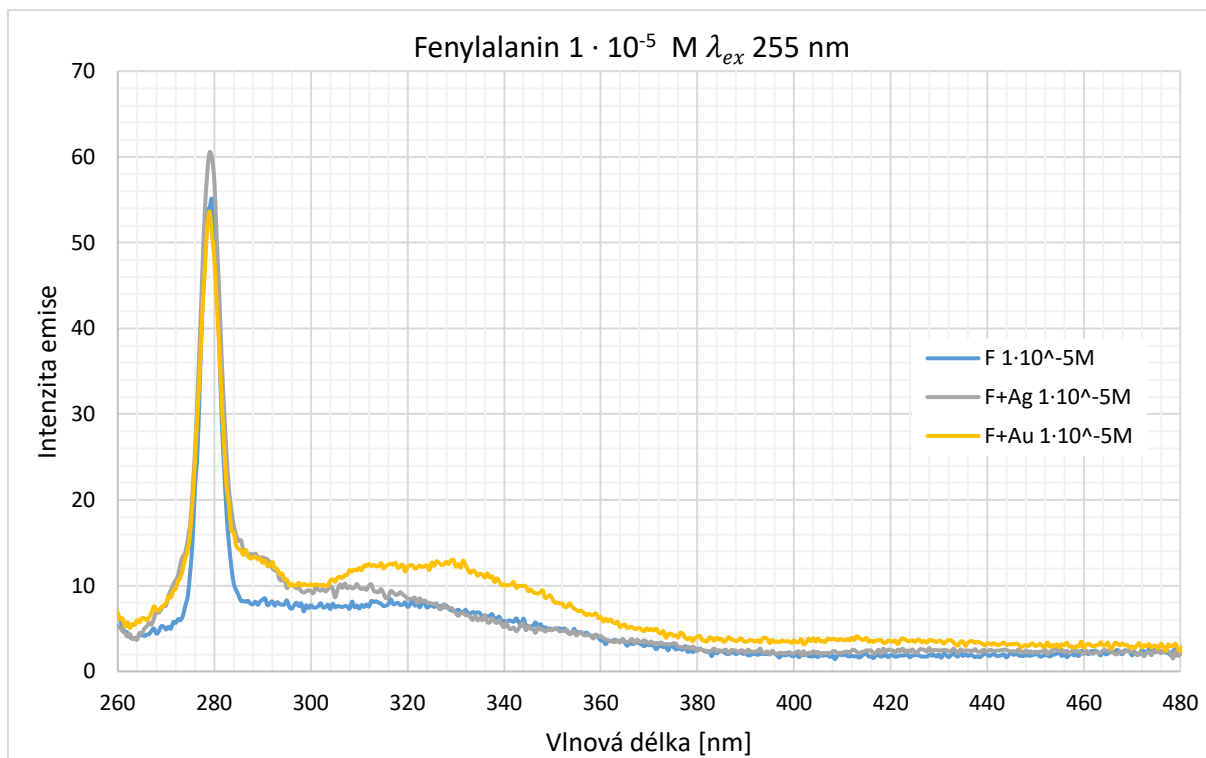
5.4.1. Fenylylanin

V emisním spektru fenylylaninu, fenylylaninu s nanočásticemi stříbra a fenylylaninu s nanočásticemi zlata o koncentracích $c_{F1} = 1,0 \times 10^{-4}$ M jsou vidět tři maxima (viz Graf 7). Z výsledků je patrné, že nejintenzivnější emise patří samotnému fenylylaninu (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 181). Následuje emise fenylylaninu s nanočásticemi stříbra (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 175) a fenylylanin s nanočásticemi zlata má nejnižší intenzitu emise (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 148). Všechny maxima jsou na vlnové délce 279,5 nm.



Graf 7: Emisní spektrum fenylalaninu, fenylalaninu+AgBH2 a fenylalaninu+AuBH2 při excitaci vlnovou délkou 255nm.

V emisním spektru fenylalaninu, fenylalaninu s nanočásticemi stříbra a fenylalaninu s nanočásticemi zlata o koncentracích $c_{F2} = 1 \times 10^{-5}$ M jsou vidět tři maxima (viz Graf 8). Z výsledků je patrné, že nejintenzivnější emise patří fenylalaninu s nanočásticemi stříbra (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 61). Následuje emise samotného fenylalaninu (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 55) a fenylalanin s nanočásticemi zlata má nejnižší intenzitu emise (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 54). Všechny maxima jsou na vlnové délce 279,5 nm.



Graf 8: Emisní spektrum fenylalaninu, fenylalaninu+AgBH2 a fenylalaninu+AuBH2 při excitaci vlnovou délkou 255nm.

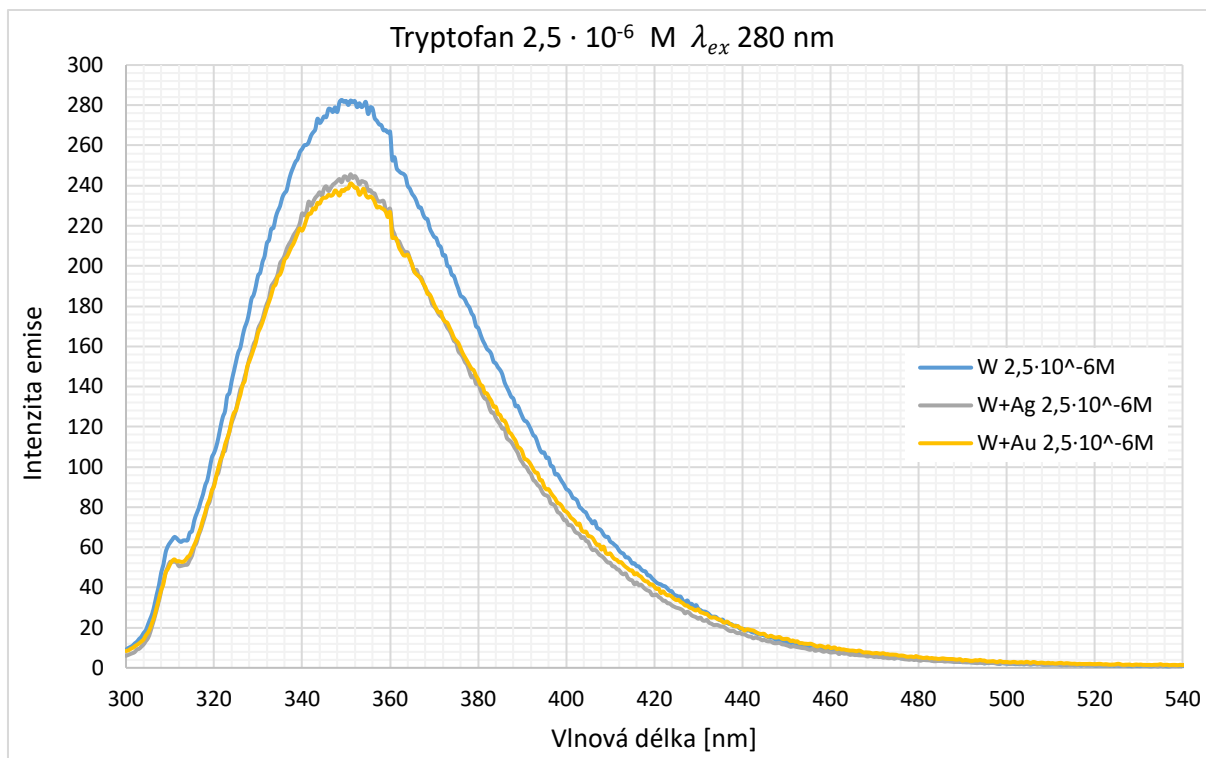
Pro všechny koncentrace fenylalaninu, fenylalaninu s nanočásticemi stříbra a fenylalaninu s nanočásticemi zlata byly vypočítány plochy pod emisními spektry (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Vyhodnocení integrálních intenzit fluorescence pro fenylalanin (v závorkách jsou uvedeny procenta jako bezrozměrné veličiny).

	F	AgNP+F	AuNP+F
$1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	4773 (1,00)	4937 (1,03)	4506 (0,94)
$1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	1183 (1,00)	1396 (1,18)	1716 (1,45)

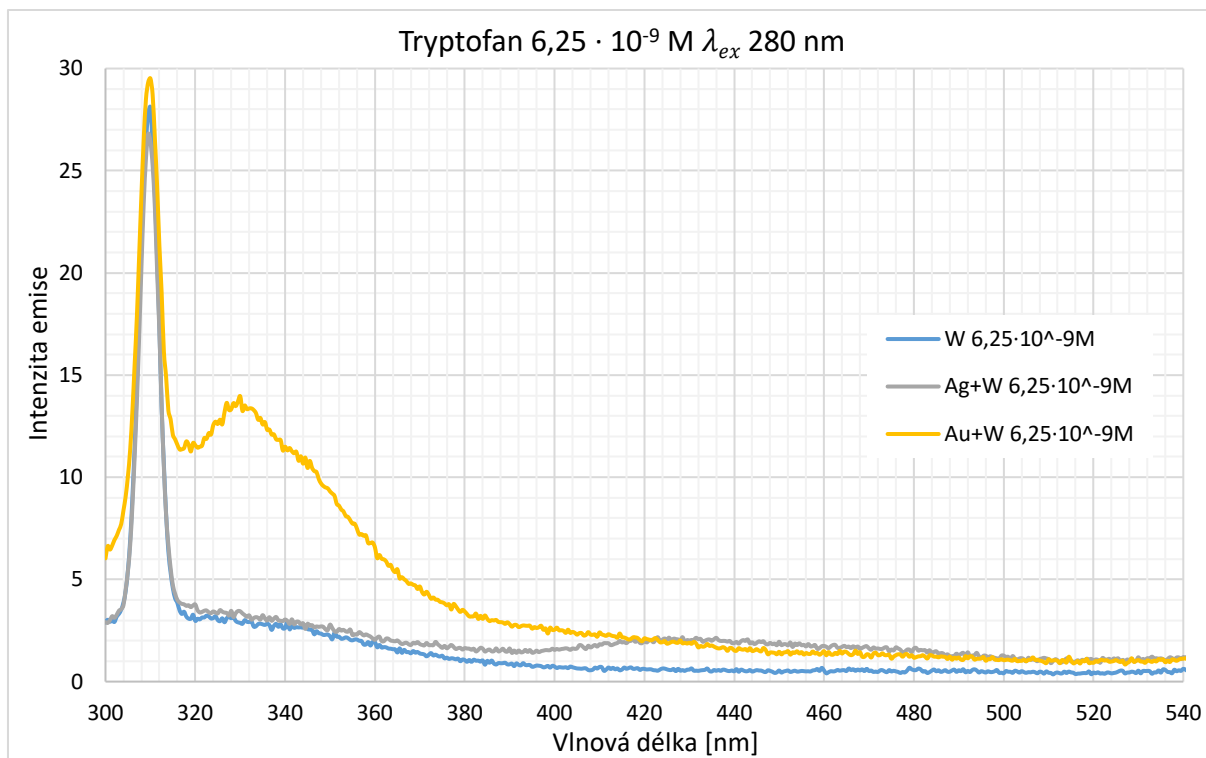
5.4.2. Tryptofan

V emisním spektru tryptofanu, tryptofanu s nanočásticemi stříbra a tryptofanu s nanočásticemi zlata o koncentracích $c_{W1} = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ jsou vidět tři maxima (viz Graf 9). Z výsledků je patrné, že nejintenzivnější emise patří samotnému tryptofanu (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 282), následuje emise tryptofanu s nanočásticemi stříbra (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 246) a tryptofan s nanočásticemi zlata má nejnižší intenzitu emise (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 241). Všechny maxima jsou na vlnové délce 351 nm. Raménko na vlnové délce 310 nm patří Ramanskému pásu vody.



Graf 9: Emisní spektrum tryptofanu, tryptofanu +AgBH2 a tryptofanu +AuBH2 při excitaci vlnovou délkou 280nm.

V emisním spektru tryptofanu, nanočástic stříbra s tryptofanem a nanočástic zlata s tryptofanem o koncentracích $c_{W_2} = 6,25 \times 10^{-9}$ M jsou vidět tři maxima (viz Graf 10). Z výsledků je patrné, že nejintenzivnější emise jsou na vlnové délce 310 nm. Tyto emise patří Ramanskému pásu vody. Samotný tryptofan, při tak nízké koncentraci nevykazoval fluorescenci (viz graf 10). U vzorku W + AuNP se vyskytuje široký pás mezi 320-360 nm s maximem intenzity fluorescence 14, které je na vlnové délce 330 nm.



Graf 10: Emisní spektrum tryptofanu, tryptofanu AgBH2 a tryptofanu +AuBH2 při excitaci vlnovou délkou 280nm.

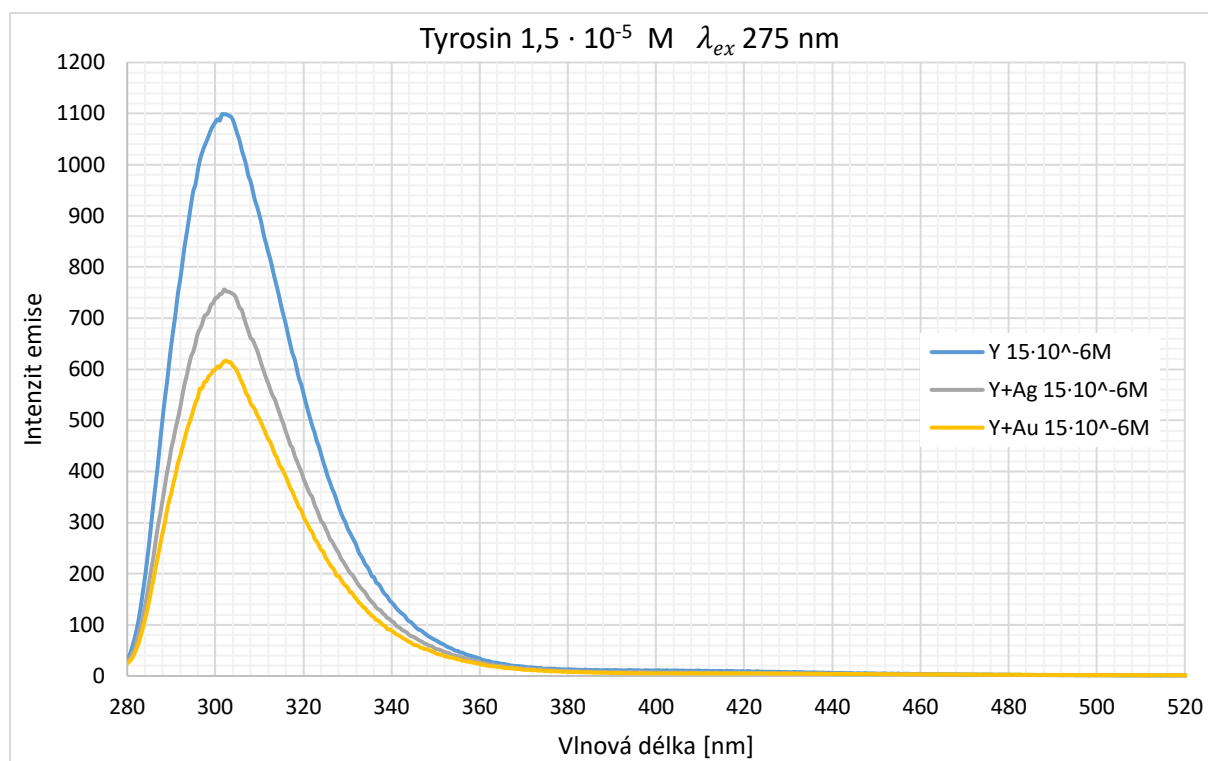
Pro všechny koncentrace tryptofanu, tryptofanu s nanočásticemi stříbra a tryptofanu s nanočásticemi zlata byly vypočítány plochy pod emisními spektry (viz tabulka 3).

Tabulka 3: Vyhodnocení integrálních intenzit fluorescence pro tryptofan (v závorkách jsou uvedeny procenta jako bezrozměrné veličiny).

	W	AgNP+W	AuNP+W
$2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	19549 (1,00)	16598 (0,85)	16899 (0,86)

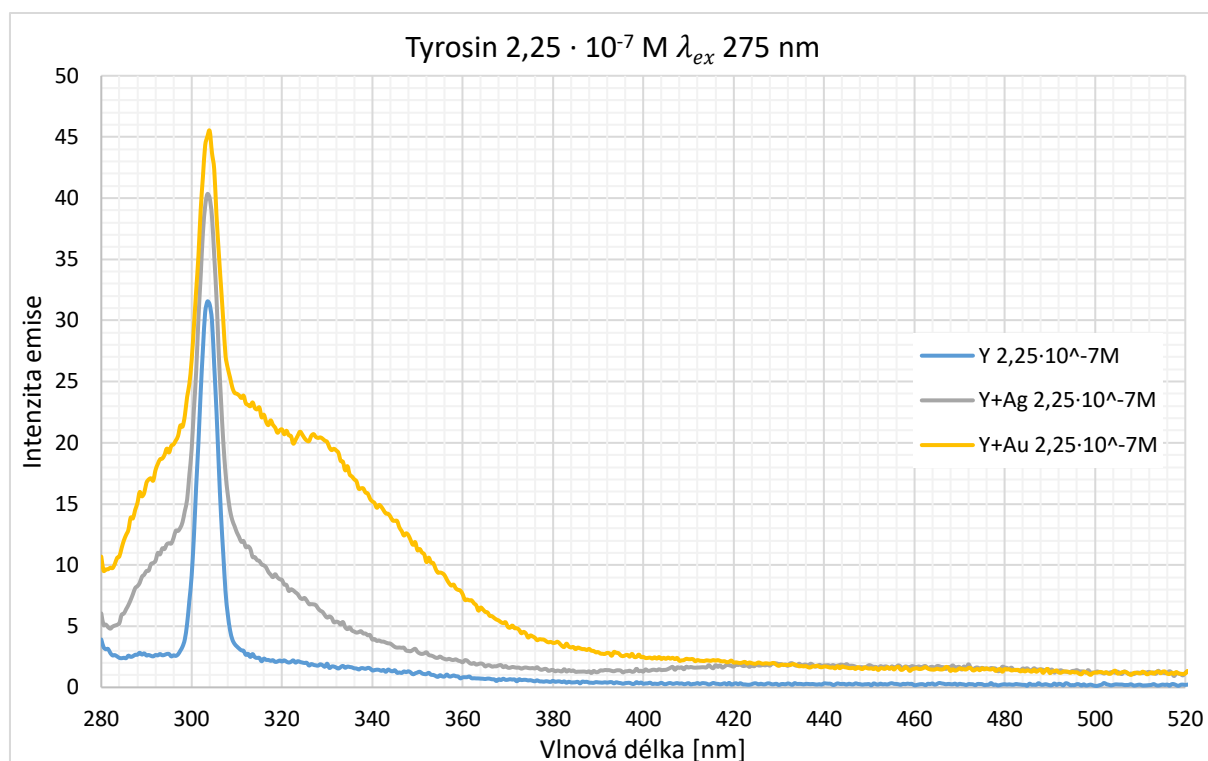
5.4.3. Tyrosin

V emisním spektru tyrosinu, tyrosinu s nanočásticemi stříbra a tyrosinu s nanočásticemi zlata o koncentracích $c_{Y1} = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, jsou vidět tři maxima (viz Graf 11). Z výsledků je patrné, že nejintenzivnější emise patří samotnému tyrosinu (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 1099), následuje emise tyrosinu s nanočásticemi stříbra (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 752) a tyrosin s nanočásticemi zlata má nejnižší intenzitu emise (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 616). Všechny maxima jsou na vlnové délce 302,50 nm.



Graf 11: Emisní spektrum tyrosinu, tyrosinu + AgBH2 a tyrosinu + AuBH2 při excitaci vlnovou délkou 275nm.

V emisním spektru tyrosinu, tyrosinu s nanočásticemi stříbra a tyrosinu s nanočásticemi zlata o koncentracích $c_{Y_2} = 2,25 \times 10^{-7}$ M, jsou vidět tři maxima (viz Graf 12). Z výsledků je patrné, že nejintenzivnější emise patří tyrosinu s nanočásticemi zlata (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 45), následuje emise tyrosinu s nanočásticemi stříbra (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 40) a samotný tyrosin má nejnižší intenzitu emise (maximum s hodnotou intenzity fluorescence 32). Všechny maxima jsou na vlnové délce 303,50 nm. U vzorku Y + AuNP se vyskytuje pás mezi 320-360 nm s maximem intenzity fluorescence 20, které je na vlnové délce 330 nm.



Graf 12: Emisní spektrum tyrosinu, tyrosinu + AgBH2 a tyrosinu + AuBH2 při excitaci vlnovou délkou 275nm.

Pro všechny koncentrace tyrosinu, tyrosinu s nanočásticemi stříbra a tyrosinu s nanočásticemi zlata byly vypočítány plochy pod emisními spektry (viz tabulka 4).

Tabulka 4: Vyhodnocení integrálních intenzit fluorescence pro tyrosin (v závorkách jsou uvedeny procenta jako bezrozměrné veličiny).

	Y	AgNP+Y	AuNP+Y
$1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	38540 (1,00)	26892 (0,70)	21908 (0,57)

6. Diskuze

V této práci jsme zkoumali vliv interakce nanočástic stříbra a zlata s aminokyselinami za pomoci křivek emisních spekter. Extinkčními spektry (měřením UV-Vis absorbance) jsme ověřovali, že nemůže docházet ke zkreslení emisních spekter vlivem efektu vnitřního filtru. Tento fakt byl v literatuře dost často opomíjen – např. (Iwunze 2007).

Taktéž jsme pomocí UV-Vis absorbance zkoumali, zda nedochází k agregaci nanočástic po přidavku aminokyselin (pracujeme totiž s 18x a 10x zředěnými nanočásticemi, které byly již tímto ředěním částečně destabilizovány), což by nám mohlo přispívat k rozdílům v příspěvku rozptylového (Q_s) vs. absorpčního (Q_A) členu nanočástic. S rostoucí velikostí NPs totiž začíná převažovat Q_s nad Q_A – (Lakowicz 2005). Při interakci s fluoroforem by pak vyšší Q_s vedl ke zvyšování jeho fluorescence, zatímco převažující Q_A by vedl ke zhášení fluoroforu při konstantní vzdálenosti fluoroforu od kovového povrchu (Lakowicz 2005).

Při interakci nanočástic s aminokyselinami docházelo ke změnám v emisních spektrech vybraných aminokyselin (viz výsledky). K těmto změnám mohlo docházet prostřednictvím sedmi faktorů, které mohly ovlivnit interakci nanočástic stříbra a zlata s aminokyselinami F, W a Y. Mezi těmito sedmi faktory je šest, které jsme schopni ovlivnit, patří mezi ně: výběr typu nanočástic a přítomnosti chemických látek na jejich povrchu, koncentrace nanočástic, vzájemný poměr nanočástic a aminokyselin, stáří koloidu a doba interakce nanočástic a aminokyselin. Sedmý faktor, který nebylo možné jednoznačně ovlivnit a sledovat, je vzdálenost aminokyselin od kovového povrchu nanočástic.

6.1. Fenylalanin

Z naměřených hodnot pro vyšší koncentrace (10^{-4} M ve finálním roztoku) F, F + AgNP a F + AuNP (viz graf 7) vyplývá, že mezi nanočásticemi stříbra i zlata dochází k interakci s fenylalaninem. U nanočástic stříbra dochází k nepatrnému poklesu emise a u nanočástic zlata dochází k markantnímu poklesu emise. Z toho lze usuzovat, že minimálně část molekul F se navázala na povrchy nanočástic. Míra interakce se liší u AgNP a AuNP. Tyto rozdíly přičítáme především sedmému faktoru, a tím je vzdálenost fenylalaninu od kovového povrchu nanočástice. Zároveň nesmí být opomenuto, že koncentrace F ($C_{f1}(F) = 1 \times 10^{-4}$ M) mnohonásobně převyšuje vypočítané monovrstevné pokrytí nanočástic stříbra ($c_{mn}^{Ag}(F) = 3,1 \cdot 10^{-7}$ M) i zlata ($c_{mn}^{Au}(F) = 5,6 \cdot 10^{-7}$ M). Je však nutné současně připomenout, že výpočet monovrstevného pokrytí byl proveden za předpokladu aminokyselin „ležících“ na nanočástici a zabírajících tak maximální plochu, což v realitě nemusí nastat, aminokyseliny mohou být

navázány prostřednictvím pouze jedné ze svých funkčních skupin k povrchu nanočástic a zabírat tak mnohem menší plochu než bylo předpokládáno pro výpočet monovrstevného pokrytí (koncentrace pro monovrstevné pokrytí by tak mohla nastat při vyšší koncentraci). Také je ve výpočtu uvažován kulovitý tvar nanočástic s poloměrem 5 nm, ačkoliv dle TEM víme, že některé nanočástice nejsou ideálně kulovité a současně víme, že některé nanočástice jsou menší, jiné o pár nanometrů větší než průměrná hodnota. A poslední důležitá aproximace při výpočtu byla, že všechny plochy na nanočástici jsou stejně reaktivní, což není tak zcela pravda, jak je známo z mnoha jiných studií o Ag a Au nanočásticích (Lakowicz 2004, Lakowicz 2005, Mustansar a kol. 2016) a další.

Při vzdálenosti fluoroforu od nanočástice nad 20 nm nedochází ke zhášení ani ke zvýšení emise, dle (Lakowicz 2005). Tento případ by mohl platit pro nanočástice stříbra s fenylalaninem, pro názornější představu bylo vytvořeno schéma 3. Samotné nanočástice stříbra v koloidním roztoku jsou polární, a protože fenylalanin má nepolární postranní řetězec, bude mít problém se jím přichytit na AgNP. Aromatický kruh bude mít tendenci se od AgNP spíše odpuzovat. Jak bylo výše zmíněno, druhým faktem je relativně vysoká koncentrace F, která mnohonásobně převyšuje teoretické monovrstevné pokrytí na nanočásticích stříbra. Volné aminokyseliny F se budou udržovat ve vzdálenosti vyšší jak 20 nm, a proto nedochází ke zhášení ani ke zvýšení emise.

Při vzdálenosti fluoroforu od nanočástice v rozmezí 1–2 nm dochází ke zhášení emise. Plazmony, které se vytvoří na krátkých vzdálenostech F–AuNP mohou být zachyceny na rozhraní, v důsledku toho se přemění na teplo a dojde ke zhášení, dle (Lakowicz 2005). Samotné AuNP v koloidním roztoku jsou o něco méně polární než AgNP a F může mít tendenci se na některé plochy zlatých nanočástic přichytit i svým aromatickým kruhem. I přes vyšší koncentraci F, která mnohonásobně převyšuje teoretické monovrstevné pokrytí touto aminokyselinou na AuNP, F pokryje AuNP s vyšší hustotou než bylo u AgNP (viz schéma 4). Proto dojde k většímu zhášení. Další volné aminokyseliny F, které se nevešly na povrch AuNP, se mohou též nacházet dále od povrchu nanočástic zlata (nad 20 nm), a z nich pak pochází naměřený signál emise.

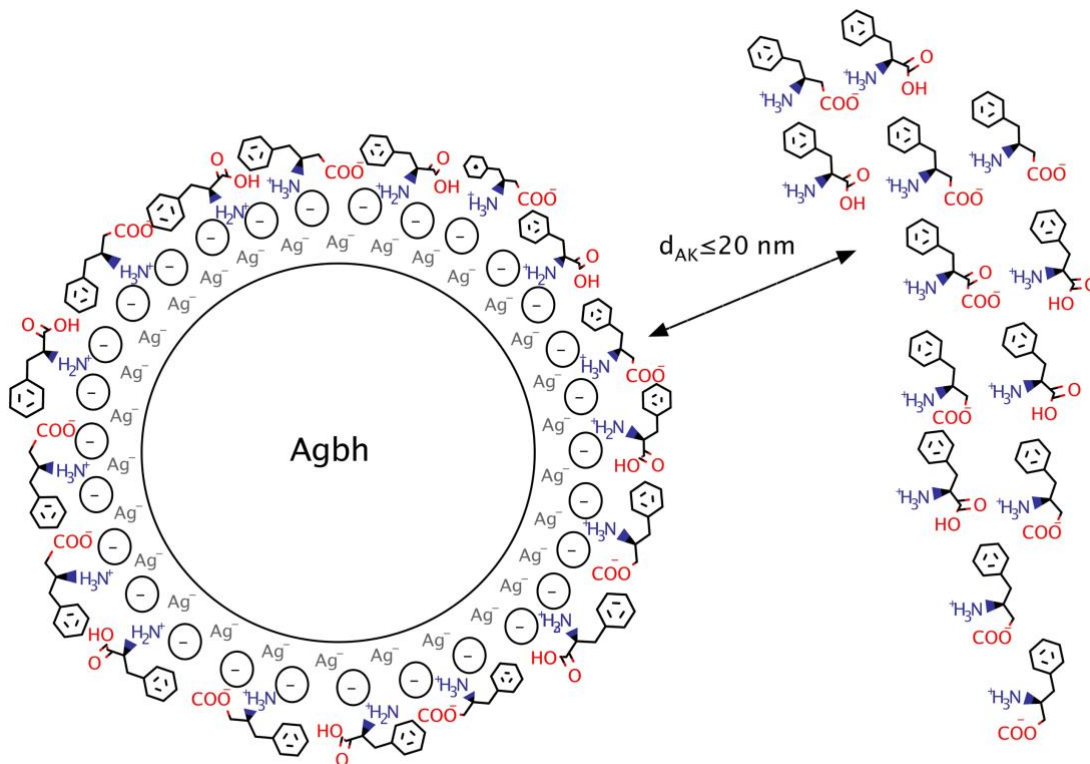


Schéma 3: Nanočástice stříbra s fenylalaninem ve vzdálenosti $\leq 20 \text{ nm}$ (vedoucí k téměř nezměněné fluorescence F).

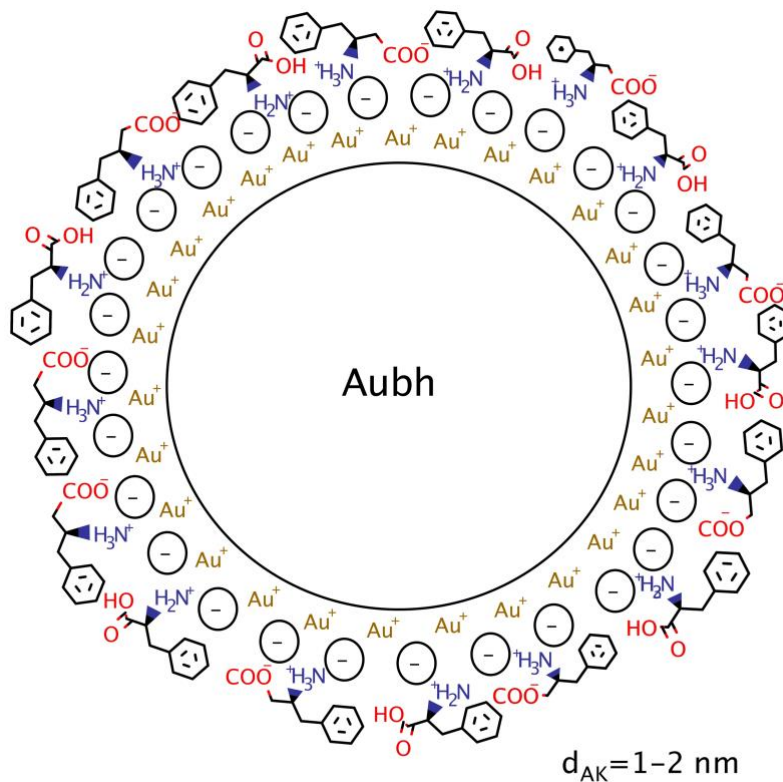


Schéma 4: Nanočástice zlata s fenylalaninem ve vzdálenosti 1–2 nm (vedoucí ke zhášení fluorescence F).

Z naměřených hodnot pro nižší koncentrace F, F + AgNP a F + AuNP (viz graf 8) vyplývá, že mezi nanočásticemi stříbra i zlata dochází k interakci s fenylalaninem. U nanočástic stříbra dochází k nárůstu emise a u nanočástic zlata dochází k nepatrnému poklesu emise. Tyto rozdíly mohou být opět vlivem vzdálenosti fenylalaninu od povrchu nanočástice, ačkoliv koncentrace F ($C_{f_2}(F) = 1 \times 10^{-5} \text{M}$) stále mnohonásobně převyšuje teoretické monovrstevné pokrytí nanočástic stříbra ($c_{mn}^{Ag}(F) = 3,1 \cdot 10^{-7} \text{M}$) i zlata ($c_{mn}^{Au}(F) = 5,6 \cdot 10^{-7} \text{M}$). Při vzdálenosti fluoroforu od nanočástice v rozmezí 5–20 nm dochází totiž ke zvýšení emise (Lakowicz 2005).

Jak již bylo uvedeno, nanočástice stříbra v koloidním roztoku jsou polární, po snížení koncentrace F se F bude přibližovat k AgNP postranním řetězcem a interagovat s molekulami F, které jsou již na AgNP navázané. Interakce bude pro molekuly F nejspíše výhodnější z toho důvodu, že se pohybujeme v o řád nižší koncentraci, tudíž není již tolik molekul F volných v roztoku ve vzdálenosti nad 20 nm. Aminokyseliny se proto uspořádají kolem AgNP ve vzdálenosti mezi 5–20 nm (viz schéma 5). Následně bude docházet ke zvýšení emise (viz graf 8).

Stran fluorescenčního chování systému F–AuNP pro nižší koncentraci F předpokládáme, že po snížení koncentrace F se aminokyseliny pohybují ve vzdálenostech 1–2 nm, jak tomu bylo u vyšší koncentrace F na AuNP. Avšak zbylé aminokyseliny, které nejsou v přímé interakci s AuNP, mohou být až ve vzdálenostech větších jak 20 nm od zlatých nanočástic (viz schéma 3). Následně nebude docházet ke zhášení ani ke zvýšení emise.

Je tedy velký rozdíl mezi chováním F na AgNP a AuNP, který může být způsoben rozdílnou orientací aminokyselin na stříbrném vs. na zlatém povrchu. V důsledku toho pak rozdílnými možnostmi navázání dalších volných aminokyselin z roztoku, jejich přiblížení se k nanočástici, která na svém povrchu již nese molekuly navázaných aminokyselin.

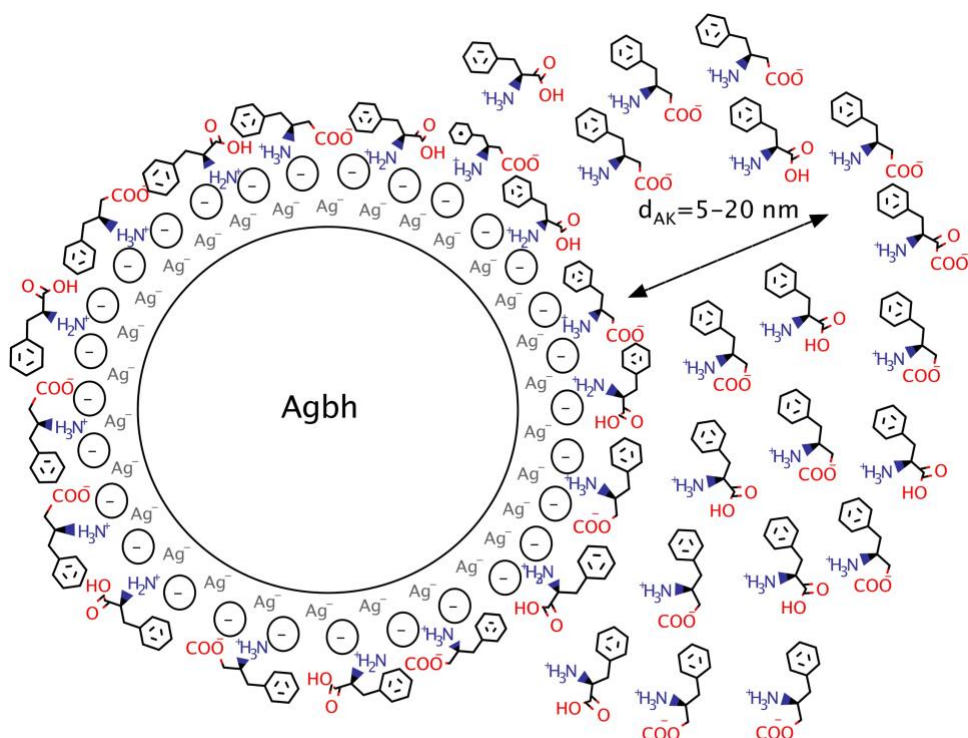


Schéma 5: Nanočástice stříbra s fenylalaninem ve vzdálenosti 5–20 nm (vedoucí ke zvýšení fluorescence F).

6.2. Tryptofan

Z naměřených hodnot pro vyšší koncentrace W ($2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ve finálním roztoku), W + AgNP a W + AuNP (viz graf 9) vyplývá, že mezi nanočásticemi stříbra i zlata dochází k interakci s tryptofanem. U nanočástic stříbra i zlata dochází k markantnímu poklesu emise. Použitá koncentrace W ($C_{f1}(W) = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$) sice stále ještě převyšuje teoretické monovrstevné pokrytí nanočástic stříbra ($c_{mn}^{Ag}(W) = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) i zlata ($c_{mn}^{Au}(W) = 3,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), ale již pouze o zhruba 1 řád, což s uvážením všech aproximací použitých při výpočtu teoretického monovrstevného pokrytí nanočástic aminokyselinami může být příčinou stejného chování W na AgNP a AuNP (v kontrastu k chování F na AgNP a AuNP).

Obdobně, jako tomu bylo u fenylalaninu, při vzdálenosti fluoroforu od nanočástice v rozmezí 1–2 nm dochází ke zhášení emise, dle (Lakowicz 2005). Tryptofan je nepolární aminokyselina, ale jelikož obsahuje ve svém aromátu imidovou skupinu (která může interagovat s kovovým povrchem NPs), stává se polárnější a postranní řetězec se bude chovat jinak než u F.

Samotné nanočástice stříbra v koloidním roztoku jsou polární, avšak W může mít tendenci se na stříbrné nanočástice přichytit postranním řetězcem prostřednictvím imidových dusíků. Taktéž na AuNP se W může přichytit svým postranním řetězcem daleko silnější vazbou

než tomu bylo v případě F (jenž nemá imidové dusíky v postranním řetězci) a W tak pokryje AuNP. Proto bude docházet ke zhášení emise jak v případě AgNP, tak v případě AuNP (viz schéma 4). K pozorované emisi přispívají molekuly W, které nejsou bezprostředně navázané na kovovém povrchu, ani nemají tendenci se do blízkosti NPs dostávat (tedy jsou ve vzdálenosti nad 20 nm).

Ze srovnání W + AgNP a W + AuNP systémů, nanočástice zlata o malinko lépe zhášejí fluorescenci W než AgNP. To může být vysvětleno faktem, že W nemá takový problém se dostat do blízkosti AuNP též svým heteroaromatickým kruhem (při úvaze, že AuNP na sebe lépe navazuje aromáty).

Z naměřených hodnot pro nižší koncentrace W ($6,25 \times 10^{-9}$ M ve finálním roztoku), W + AgNP a W + AuNP (viz graf 10) vyplývá, že už téměř nedetekujeme fluorescenci W. Pozoruhodná je přítomnost ostrého úzkého píku s maximem u 310 nm, který však rozhodně nepochází od fluorescence W. Byl pozorovatelný coby raménko již u vyšší koncentrace W (graf 9). Dále stojí za zmínku široký pás se dvěma maximy situovaný mezi 320-360 nm u systému W + AuNP (graf 10). Pro vysvětlení této emise bude zapotřebí dalších experimentů a experimentálních technik.

6.3. Tyrosin

Z naměřených hodnot pro vyšší koncentrace Y (15×10^{-6} M ve finálním roztoku), Y + AgNP a Y + AuNP (viz graf 11) vyplývá, že mezi nanočásticemi stříbra i zlata dochází k interakci s tyrosinem. U nanočástic stříbra i zlata dochází k markantnímu poklesu emise Y. Pokles je ještě výraznější než u systémů s W (srovnání tabulek 5 a 6), přičemž jsme zhruba o dva řády výše s koncentrací Y nad teoretickým monovrstevným pokrytím nanočástic touto aminokyselinou.

Jak již bylo uvedeno výše pro W, i zde předpokládáme, že se tyrosin pohybuje ve vzdálenosti 1–2 nm od nanočástic stříbra a zlata (viz schéma 4), a proto dojde ke zhášení fluorescence v obou případech. Zbylé nenavázané aminokyseliny putující roztokem ve vzdálenosti nad 20 nm pak přispívají k naměřenému signálu fluorescence.

K méně intenzivnímu zhášení dochází u nanočástic stříbra, domníváme se, že tato problematika souvisí s polaritou AgNP v koloidu. Tyrosin je polární aminokyselina. S přihlédnutím ke struktuře tyrosinu, u kterého nalezneme hydroxylovou skupinu na aromátu, jež činí Y polární, nemusí mít Y takovou tendenci se přichytit na nanočástice stříbra, a proto dochází k menšímu efektu zhášení emise.

Z naměřených hodnot pro nižší koncentrace Y ($2,25 \times 10^{-7} \text{ M}$ ve finálním roztoku), Y + AgNP a Y + AuNP (viz graf 12) vyplývá, že mezi nanočásticemi stříbra i zlata dochází k interakci s tyrosinem. U nanočástic stříbra i zlata dochází ke zvýšení emise. Na tomto místě připomeňme, že použitá koncentrace Y se blíží hodnotám teoretického monovrstevného pokrytí Y na AgNP ($c_{mn}^{Ag}(Y) = 2,7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) a AuNP ($c_{mn}^{Au}(Y) = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). S tím dozajista souvisí pozorované zesílení emise. Uvažujme, že v případě, kdy nepřekročíme monovrstevné pokrytí, působí aminokyselina jako nečistota a může způsobovat částečnou či lokální agregaci nanočástic. S tím by pak souvisel nárůst Q_s nad Q_A – Lakowicz 2005. Jak bylo výše řečeno, vyšší Q_s povede k zesílení fluorescence fluoroforu.

Ještě je pozoruhodná emise v systému Y+AuNP se dvěma maximy umístěnými v oblastech mezi 320-360 nm. Naprosto stejný typ emise byl pozorován u systému W+AuNP. Tudíž tato emise musí souviset s AuNP jako takovými. Plánujeme podrobnější zkoumání tohoto jevu dalšími experimenty a experimentálními technikami.

7. Závěr

V teoretické části byly popsány aminokyseliny, které dle dostupné literatury vykazují fluorescenci, následně byl čtenář seznámen s optickými vlastnostmi nanočástic stříbra a zlata a též s chováním fluoroforů nacházejících se v blízkosti těchto nanočástic, což bylo jedním z cílů této bakalářské práce.

Byla vypočítána plocha a počet nanočástic stříbra a zlata ve zředěných koloidech, které byly použity v experimentální části. Zároveň byla vypočítána teoretická plocha, kterou mohou zaujímat použité tři aminokyseliny na povrchu nanočástic, a následně byl výpočtem stanoven počet aminokyselin, které pokryjí jednu nanočástici. Z těchto výpočtů byla určena teoretická hodnota pro monovrstevné pokrytí nanočástic stříbra a zlata použitými aminokyselinami.

Dalším cílem bylo proměřit extinkční, absorpční a fluorescenční spektra zředěných stříbrných a zlatých nanočástic, fenylalaninu, tryptofanu, tyrosinu a následně smíchaných nanočástic stříbra a zlata s těmito třemi aminokyselinami. Z extinkčních a absorpčních spekter byly zjištěny polohy jednotlivých maxim a u fluorescenčních spekter byly zjištěny intenzity emisí. Z emisních spekter bylo objeveno, že dochází ke zhášení, nebo k zesílení intenzit, a to v závislosti na interakcích nanočástic s aminokyselinami. Byl vysvětlen způsob, jakým dochází ke zhášení a k zesílení emise a jak se aminokyseliny navazují na nanočástice, což byl jeden z cílů této bakalářské práce.

Emisní spektrum histidinu nebylo v práci uvedeno, jelikož tato látka nevykazovala v našich experimentech žádnou fluorescenci, ačkoliv existuje článek, který o fluorescenci histidinu pojednává.

V budoucnu by pro upřesnění výsledků, zejména pak bližší detaily o interakci příslušných tří aminokyselin s nanočásticemi stříbra a zlata, bylo dobré použít další měřicí metody jako je např. infračervená a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie.

8. Seznam použité literatury

- Botta R., Rajanikanth A., Bansal C. (2014) Surface enhanced raman scattering studies of L-amino acids adsorbed on silver nanoclusters. *Chemical physics letters* **618**, 14–19.
- Broadley K.J. (2010) The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology & Therapeutics* **125**, 363–375.
- Červinka O., Dědek V., Ferles M. (1982) *Organická chemie*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha, Česká republika **127**, 791 stran.
- Deijen J.B., Orlebek J.F. (1994) Effect of tyrosine on cognitive function and blood pressure under stress. *Brain Research Bulletin* **33**, 319–323.
- Drexhage K.H. (1970) Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. *Journal of Luminesc* **1**, 693–701.
- El-Nour K.M.A., Salam E.T.A., Soliman H.M., Orabi A.S. (2017) Gold nanoparticles as a direct and rapid sensor for sensitive analytical detection of biogenic amines. *Nanoscale Research Letters* **12**: 231.
- Fernstrom J.D. (1983) Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiological Reviews* **63**, 484–546.
- Ford G.W., Weber W.H. (1984) Electromagnetic interactions of molecules with metal surfaces, *Physics Reports* **113**, 195–287.
- Cademartiri L., Ozin G.A. (2009) *Concepts of Nanochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Německo 282 stran
- Chance R.R., Prock A., Silbey R. (1973) Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces. *Advances in Chemical Physics* **37**, 1–65.
- Chen R.F. (1967) Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine. *Analytical Letters* **1**, 35–42.
- Iwunze M.O. (2007) The characterization of the Fluorescence of L-Histidine in Simulated Body Fluid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **186**, 283–289.
- Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. (2007) Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems. *Plasmonics* **2**, 107–118.
- Karthikeyan R.B., Rani R.S. (2017) Optical properties of green synthesized silver nanoparticles. *European journal of pharmaceutical and medical research* **4**, 380–383.
- Kerker M. (1985) The optics of colloidal silver: something old and something new. *Journal of Colloid and Interface Science* **105**, 297–314.
- Kierdaszuk B., Gryczynski I., Modrak-Wojcik A., Bzowska A., Shugar D., Lakowicz J.R. (1995) Fluorescence of tyrosine and tryptophan in proteins using one- and two- photon excitation. *Photochemistry and photobiology* **61**, 319–324.
- Kopple J.D., Swendseid M.E. (1975) Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *Journal of Clinical Investigation* **55**, 881–891.
- Kreibig U., Vollmer M. (1995) *Optical properties of metal clusters*, Vol. 25, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 535 stran.
- Lakowicz J.R. (1992) Tyrosine fluorescence and phosphorescence from proteins and polypeptides. In: *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Volume 3, *Biochemical Applications*, (Lakowicz J.R., ed.), Plenum Press, New York, U.S.A., 1–53.
- Lakowicz J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd edition, Springer-Verlag, New York, U.S.A., 980 stran.
- Lakowicz J.R. (2001) Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications, *Analytical Biochemistry*. **298**, 1–24.
- Lakowicz J.R., Maliwal B.P., Malicka J., Gryczynski Z., Gryczynski I. (2002) Effects of silver island films on the luminescent intensity and decay times of lanthanide chelates, *Journal of Fluorescence* **12**, 431–437.
- Lakowicz J.R. (2004) Radiative decay engineering 3. Surface plasmon-coupled directional emission. *Analytical Biochemistry* **324**, 153–169.
- Lakowicz J.R. (2005) Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. *Analytical Biochemistry* **337**, 171–194

- Leathwood P.D., Pollet P. (1982) Diet-induced mood changes in normal populations. *Journal of Psychiatric Research* **17**, 147–154.
- Ledochowski M., Sperner-Unterweger B., Widner B., Fuchs D. (1998) Fructose malabsorption is associated with early signs of mental depression. *European Journal of Medical Research* **3**, 295–298.
- Liebsch A. (1997) *Electronic Excitations at Metal Surfaces*, Plenum Press, New York, U.S.A., 336 stran.
- Link S., El-Sayed M.A. (2000) Shape and size dependence of radiative, nonradiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *International Reviews in Physical Chemistry* **19**, 409–453.
- Link S., El-Sayed M.A. (2003) Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry* **54**, 331–366.
- Liz-Marzan L.M. (2004) Nanometals formation and color. *Materials Today* **7**, 26–31.
- Malicka J., Gryczynski I., Gryczynski Z., Lakowicz J.R. (2003) Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine-dyelabeled oligonucleotides. *Analytical Biochemistry* **315**, 57–66.
- Mustansar H.Ch., Kharisov B. (2016) *Advanced Environmental Analysis: Applications of Nanomaterials*. Volume 1, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, U.K., 534 stran.
- Nan C.G., Ping W.X., Ping D.J., Qing C.H. (1999) A study on electrochemistry of histidine and its metabolites based on the diazo coupling reaction. *Talanta* **49**, 319–330.
- Pal T., Jana N.R., Sau T. (1997) Nanoparticle induced fluorescence quenching. *Radiation Physics Chemistry* **49**, 127–130
- Paproski R.E., Roy K.I., Lucy C.A. (2002) Selective fluorometric detection of polyamines using micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **946**, 265–273.
- Parfenov A., Gryczynski I., Malicka J., Geddes C.D., Lakowicz J.R. (2003) Enhanced fluorescence from fluorophores on fractal silver surfaces. *The journal of Physical Chemistry B* **107**, 8829–8833.
- Prosser V. (1989) Metody emisní spektroskopie. In: *Experimentální metody biofyziky*. První vydání, (O. Jelínek), Academia Praha, Praha, 384–435.
- Rasmussen D.D., Ishizuka B., Quigley M.E., Yen S.S. (1983) Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**, 760–763.
- Roduner E. (2006) *Nanosopic Materials: Size-Dependent Phenomena*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 298 stran.
- Roy S., Das T.K. (2015) Study of interaction between tryptophan, tyrosine, and phenylalanine separately with silver nanoparticles by fluorescence quenching method. *Journal of Applied Spectroscopy* **82**, 598–606.
- Roy S. (2017) An insight of binding interaction between tryptophan, tyrosine and phenylalanine separately with green gold nanoparticles by fluorescence quenching method. *Optic* **138**, 280–288.
- Schaechter J.D., Wurtman R.J. (1990) Serotonin release varies with brain tryptophan levels. *Brain Research*. **532**, 203–210.
- Slominski A., Semak I., Pisarchik A., Sweatman T., Szczesniewski A., Wortsman J. (2002) Conversion of L-tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. *FEBS Letters* **511**, 102–106.
- Su S.C., Chou S.S., Chang P.C., Hwang D.F. (2000) Determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **749**, 163–169.
- Šišková M.K. (2013) Funkční modifikace povrchu nanočástic. Habilitační práce, Univerzita Palackého Olomouc.
- Teale F.W.J., Weber G. (1957) Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal* **65**, 476–482.
- Thomas J.R., Lockwood P.A., Singh A., Deuster P.A. (1999) Tyrosine improves working memory in a multitasking environment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **64**, 495–500.
- Vossen J.L., Chaudhari P., Raether H. (1977) Surface plasma oscillations and their applications. In: *Physics of Thin Films*, Volume 9, Academic Press, New York, U.S.A., 145–261.
- Wang J., Liu H., Tong Z., Ha C. (2015) Fluorescent/luminescent detection of natural amino acid by organometallic systems. *Coordination Chemistry Reviews* **303**, 139–184.

- Watanabe M., Suliman M. E., Qureshi A. R., Garcia-Lopez E., Barany P., Heimburger O., Stenvinkel P., Lindholm B. (2008) Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality. *The American Journal of Clinical Nutrition* **87**, 1860–1866.
- Zeng Q., Jim C.K.W., Lam J.W.Y., Dong Y.Q., Li Z., Qin J.U., Tang B.Z. (2009) A new disubstituted polyacetylene for the detection of α -amino acids. *Macromolecular Rapid Communication* **30**, 170–175.
- Zhang J., Gryczynski Z., Lakowicz J.R. (2004a) First observation of surface plasmon-coupled electrochemiluminescence. *Chemical Physics Letters* **393**, 483–487.
- Zhang L.Y., Sun M.X. (2004b) Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **1040**, 133–140.

9. Internetové zdroje

- [1] Understanding the Ruminant Animal's Digestive System – The cattle site. *Cattle, Cattle Health, Welfare, Diseases, Cattle News, Articles, Photos of Cattle, Cattle Photo - The Cattle Site* [online]. Copyright © 2000[09.02.2018]. Dostupné z: <http://www.thecattlesite.com/articles/2095/understanding-the-ruminant-animals-digestive-system/>
- [2] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services [online]. [15. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>
- [3] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services [online]. [15. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>
- [4] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services [online]. [23. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html>