

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**VLIV POLYMERNÍCH LÁTEK NA PŘÍPRAVU
A VLASTNOSTI NANOČÁSTIC STŘÍBRA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Martin Sivera

Studijní obor:

Materiálová chemie

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Olomouc 2011

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Martin Sivera
Název práce:	Vliv polymerních látek na přípravu a vlastnosti nanočástic stříbra
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Rok obhajoby práce:	2011
Abstrakt:	Cílem této diplomové práce je příprava a studium vlastností nanočástic stříbra připravených v přítomnosti přírodního polymeru – želatiny. Je zkoumán vliv koncentrace želatiny a použití různých redukčních látek na vlastnosti připravených nanočástic stříbra a také antibakteriální aktivitu takto připravených nanočástic stříbra.
Klíčová slova:	nanočástice stříbra, želatina, maltóza, askorbová kyselina, tetrahydridoboritan sodný, dlouhodobá stabilita, antibakteriální aktivita
Počet stran:	71
Počet příloh:	1 × CD
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Martin Sivera
Title:	The influence of Polymers on the Preparation and Properties of Silver nanoparticles
Department:	Department of Physical Chemistry
Type of thesis:	Master
Supervisor:	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
The year of presentation:	2011
Abstract	The aim of my diploma thesis is the preparation and study of silver nanoparticles properties prepared in the presence of natural polymer gelatin. In my work is described influence of gelatin concentration, usage different reductants on properties prepared silver nanoparticles and their antibacterial activity.
Keywords:	silver nanoparticles, gelatin, maltose, ascorbic acid, sodium borohydride, long-term stability, antibacterial activity
Number of pages:	71
Number of appendices:	1 × CD
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením pana doc. RNDr. Libora Kvítka, CSc. Veškerá literatura, která byla použita, je uvedena v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Martin Sivera

Poděkování:

Mé poděkování patří především vedoucímu této diplomové práce, panu doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky, které mi poskytl při jejím vypracování. Děkuji i panu RNDr. Aleši Panáčkoví, Ph.D. za snímky z transmisního elektronového mikroskopu, pracovníkům Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UP za provedení testů antibakteriální aktivity nanočástic stříbra a Mgr. Petru Jakubcovi za pomoc s interpretací dat.

Také děkuji svým rodičům za podporu a toleranci, kterou mi poskytli během mého vysokoškolského studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Nanotechnologie a nanomateriály	9
2.2	Nanočástice stříbra	10
2.2.1	Popis nanočástic	10
2.2.2	Optické vlastnosti nanočástic	11
2.2.3	Biologické vlastnosti	14
2.3	Příprava disperzí nanočástic	15
2.3.1	Dispergační metody	15
2.3.2	Kondenzační metody	16
2.4	Stabilizace nanočástic	21
2.5	Aplikace nanočástic stříbra	23
2.5.1	Aplikace v medicíně	23
2.5.2	Analytické aplikace	24
2.5.3	Katalýza	25
2.5.4	Použití v komerčních produktech	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Chemikálie	27
3.2	Přístrojové vybavení	27
3.2.1	Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (90Plus)	27
3.2.2	UV-VIS spektrofotometr Specord S600	28
3.2.3	Transmisní elektronový mikroskop	28
3.3	Příprava nanočástic stříbra	28
3.4	Modifikace nanočástic želatinou	29
3.5	Antibakteriální aktivita	30

4	VÝSLEDKY	31
4.1	Určení viskozity disperzí nanočástic	31
4.2	Použité redukční látky	32
4.3	Redukce maltózou	33
4.3.1	Dlouhodobá stabilita	37
4.3.2	Antibakteriální aktivita	40
4.4	Redukce askorbovou kyselinou	43
4.4.1	Dlouhodobá stabilita	47
4.4.2	Antibakteriální aktivita	50
4.5	Redukce tetrahydridoboritanem sodným	53
4.5.1	Dlouhodobá stabilita	57
4.5.2	Antibakteriální aktivita	60
5	DISKUZE	63
6	ZÁVĚR	67
7	SUMMARY	68
8	LITERATURA	69

1 ÚVOD

Příprava a studium nanomateriálů se v současnosti stává jednou z hlavních oblastí zájmu materiálového výzkumu a vývoje s enormním dopadem na rozvoj vědy a technologie, a to především ve fyzice, chemii a medicíně. Důkazem toho je i fakt, že poslední Nobelova cena za fyziku byla udělena za výzkum v oblasti nanotechnologií – objev grafenu [1]. Studium nanočástic stříbra patří k jedné z nejprogresivněji se rozvíjející oblasti v nanomateriálovém výzkumu, což mimo jiné potvrzuje i řada komerčně prodávaných produktů [2].

Už starověké civilizace používaly materiály na bázi stříbra pro jejich antibakteriální účinky. Objev penicilinu vedl ke snížení zájmu o stříbro jako baktericidního materiálu. Dramatický vývoj rezistence bakterií na některá běžná antibiotika ovšem podpořil obnovení výzkumu v této oblasti. Dnes se nanočástice stříbra používají k antibakteriální úpravě zdravotnického materiálu např. umělých srdečních chlopní, cévních katetrů, endoprotéz, různých chirurgických nástrojů i k léčbě těžkých popálenin [3, 4]. Dále jsou přidávány do filtračních náplní, ve kterých přispívají k lepší dezinfekci vody [5].

Nanočástice stříbra (ale i jiných ušlechtilých kovů) lze využít i pro jejich optické vlastnosti v řadě instrumentálních analytických technik. Používají se například u fluorescenční spektroskopie a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) [6, 7]. Další možnou oblastí využití je katalýza, kdy je možné pomocí nanočástic katalyzovat odbourávání řady organických polutantů. Lze je také použít ke konstrukci chemických senzorů nebo biosenzorů [8].

Cílem této diplomové práce je příprava a studium vlastností nanočástic stříbra připravených v přítomnosti přírodního polymeru – želatiny. Bude zkoumán vliv koncentrace želatiny a použití různých redukčních látek na vlastnosti připravených nanočástic stříbra a také antibakteriální aktivitu takto připravených nanočástic stříbra.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanotechnologie a nanomateriály

V oblasti nanotechnologií dochází v současnosti k bouřlivému pokroku za vzniku nových typů materiálů s nevšedními fyzikálně chemickými vlastnostmi. Ale již starověké civilizace užívaly nanotechnologie v řadě aplikací. Například Mezopotámská civilizace používala barvené sklo, které obsahovalo nanočástice kovů k dekorativním účelům.

Za vizionáře v oblasti nanotechnologie je považován nositel Nobelovy ceny RICHARD FEYNMAN, který svou přednášku na Kalifornském technologickém institutu v roce 1959 zahájil větou „There’s Plenty of Room at the Bottom“. Tato přednáška obsahovala řadu pokrokových teorií, které si vědecká komunita nedokázala v té době představit. Poukázal například na to, že bude možné navrhnout a sestavit požadovaný materiál atom po atomu.

Ačkoliv existuje řada definic termínu nanotechnologie, tu nejpoužívanější navrhnula NASA:

„Nanotechnologie zahrnuje výrobu funkčních materiálů, zařízení a systému s kontrolovanou velikostí v řádu nanometrů (1–100 nm) a využití nových jevů a vlastností (fyzikálních, chemických a biologických) objevujících se u těchto materiálů“ [9].

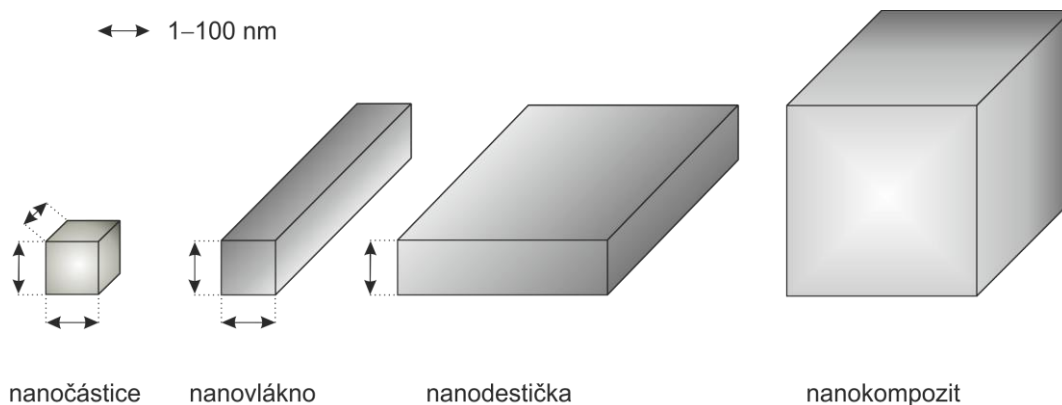
Nanomateriály můžeme rozdělit do skupin podle několika různých kritérií. Zde se omezíme na jejich rozdělení podle dimenzionality (Obrázek 1):

0-dimenzionální útvary (0D) – nanočástice, nanoklastry, nanokrystaly. Mezi významné zástupce patří fulleren, za který byla udělena Nobelova cena, **nanočástice kovů** a kvantové tečky [9].

1-dimenzionální útvary (1D) – nanotrubičky, nanovlákna, nanodráty. V této kategorii jsou asi nejvýznamnějším zástupcem uhlíkové nanotrubičky [9].

2-dimenzionální útvary (2D) – nanodestičky. Grafen objevili roku 2004 ANDRE GEIM a KONSTANTIN NOVOSELOV, kteří za tento objev získali Nobelovu cenu [9].

3-dimenzionální útvary (3D) – nanokompozitní materiály. Tyto materiály vznikají kombinací předchozích typů materiálů [9].



Obrázek 1: Rozdělení nanomateriálů podle dimenzionality

2.2 Nanočástice stříbra

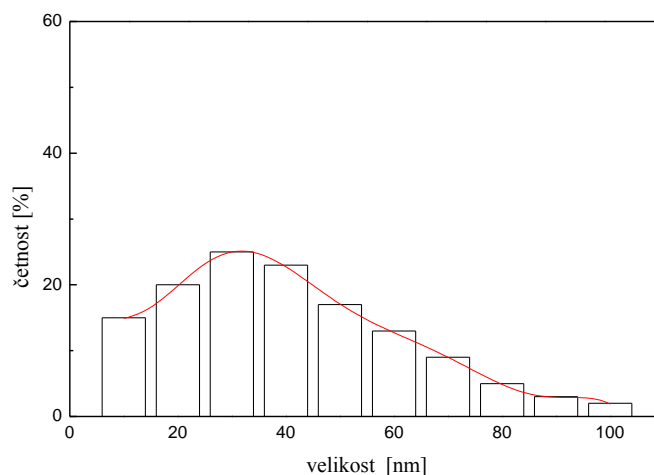
Jak už bylo zmíněno výše, z hlediska nanotechnologií jsou nanočástice stříbra definovány jako 0-dimenzionální útvary, kde se jejich velikost pohybuje v rozmezí 1–100 nm [9]. Tato definice je však jistou nástavbou vycházející z oblasti koloidní chemie. Ta zařazuje nanočástice do disperzních soustav (tj. soustav složených ze dvou základních složek – disperzního prostředí a disperzní fáze). Dle definice do disperzních soustav patří soustavy, ve kterých všechny nebo aspoň jeden rozměr, dosahují velikosti od 1 nm do 1 μm [10]. Na nanočásticích (ale i dalších nanomateriálech) jsou důležité jejich vlastnosti. Ty jsou totiž zásadně odlišné od vlastností makroskopického materiálu [9].

2.2.1 Popis nanočástic

Monodisperzní systémy nanočástic, tj. systémy, které obsahují nanočástice o stejné velikosti, se vyskytují jen velmi málo. Disperze nanočástic jsou zpravidla polydisperzní, tzn., že nanočástice v systému mají různou velikost. Polydisperzita systému se vyjadřuje obvykle za pomoci koeficientu variance rozdělení velikosti částic, stanoveného vhodnou experimentální metodou. Velikost nanočástic nejčastěji aproximujeme jako lineární rozměr kulovité částice, která má podobné vlastnosti jako skutečná nanočástice. Velikostní zastoupení nanočástic popisuje distribuční funkce, jejímž grafickým vyjádřením je distribuční křivka (obrázek 2). Díky této funkci jsou všechny přítomné nanočástice rozděleny do skupin podle velikosti. K popisu můžeme použít normální (Gaussovu) distribuční funkci, asymetrickou longnormální distribuční funkci nebo multimodální distribuční funkci. Nejvhodnější k popisu je asymetrická longnormální distribuční funkce f :

$$f_i \ln d_i = \frac{1}{\ln \sigma_g \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln d - \ln \bar{d}_g}{\ln \sigma_g} \right)^2 \right], \quad (1)$$

kde d_i je velikost částic, \bar{d}_g je průměr této velikosti a σ_g je odchylka [11–13].



Obrázek 2: Ilustrační graf velikostního rozložení částic vyjádřeného distribuční křivkou

2.2.2 Optické vlastnosti nanočástic

Elektromagnetické záření může s nanočásticemi interagovat několika způsoby, část může být absorbována, část rozptýlena a zbývající část záření může procházet v nezměněné podobě.

Rozptyl záření

Na rozdíl od absorpce při rozptylu nedochází při interakci s elektromagnetickým zářením ke změně energetických stavů, ale pohlcené kvantum energie je náhodně vyzářeno bez toho, aby se změnila jeho vlnová délka. Rozptyl záření je velmi složitý jev, který zahrnuje odraz, lom, ohyb a interferenci světla [12, 13].

Intenzitu rozptylu světla nanočásticemi ovlivňuje řada faktorů – velikost a tvar nanočástic, jejich vzájemné interakce a rozdíl mezi indexy lomu nanočástic a disperzního prostředí. Měření rozptylu světla lze proto využít při studiu nanočástic, protože tato metoda je absolutní (nevyžaduje kalibraci), rychlá a zahrnuje velké množství částic [10, 13].

Základy teorie rozptylu položil lord RAYLEIGH (1871) tak, že aplikoval elektromagnetickou teorii světla na malou, sférickou, neabsorbující částici v plynném

prostředí. Po dopadu elektromagnetického záření o intenzitě I_0 a vlnové délce λ na nanočástici ($\leq \lambda/20$) s polarizabilitou α dochází v částici k vytvoření oscilujících dipólů. Z částice se následně stává sekundární zdroj rozptýleného záření, jehož vlnová délka je stejná jako vlnová délka dopadajícího záření. Pro kterýkoliv nepolarizovaný paprsek jsou intenzita I_θ , vzdálenost r od detektoru a úhel θ popsány vztahem:

$$\frac{I_\theta r^2}{I_0} = \frac{8\pi^4 \alpha^2}{\lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) = R_\theta (1 + \cos^2 \theta), \quad (2)$$

kde $R_\theta (1 + \cos^2 \theta)$ je Rayleighův poměr. Jednička v tomto výrazu vyjadřuje vertikálně polarizovanou složku rozptýleného světla a člen $\cos^2 \theta$ vyjadřuje horizontálně polarizovanou složku [10, 13].

Při použití zdroje světla s přesně definovanou frekvencí (např. laseru) dochází k ovlivnění rozptylu světla interferencí rozptýlených paprsků. Toho využívá metoda dynamického rozptylu světla (DLS), alternativně nazvaná foton korelační spektroskopie (PCS) nebo metoda kvazielastického rozptylu světla (QELS), pomocí které můžeme stanovit velikost nanočástic [10]. Principem této metody je měření fluktuací intenzity rozptýleného světla kolem její průměrné hodnoty. Tyto fluktuace jsou způsobeny tím, že dochází k interferenčnímu zeslabování a zesilování světla rozptýleného na částicích disperzní fáze, které podléhají Brownovu pohybu [14]. Okamžitou hodnotu fluktuace popisuje autokorelační funkce g_τ , jejíž průběh je možné aproximovat exponenciálou:

$$g_\tau = \exp -\tau / \tau_c, \quad (3)$$

kde τ_c je relaxační čas, tj. doba návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Hodnota relaxačního času je nepřímo úměrně závislá na difuzním koeficientu D částic, vzhledem k faktu, že pohyb menších částic je rychlejší, tudíž i vyvolané fluktuace zanikají rychleji.

$$\tau_c = 1 / DQ^2, \quad (4)$$

kde Q označuje vlnový vektor určený vlnovou délkou světelného paprsku a úhlem pod nímž je intenzita rozptylu měřena. Na základě Stokes-Einsteinovy rovnice můžeme pomocí získané hodnoty difuzního koeficientu D spočítat hydrodynamický poloměr r rozptylujících částic:

$$r = kT / 6\pi\eta D, \quad (5)$$

kde k je Boltzmanova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita [13, 14].

Absorpce záření

Při absorpci dochází následkem průchodu elektromagnetického záření nanočástic k pohlcení fotonů. To způsobí nárůst energie u valenčních elektronů a jejich následný přechod na vyšší energetickou hladinu (excitaci). K charakterizaci experimentální závislosti absorpce na vlnové délce používáme veličinu zvanou absorbance, kterou můžeme vypočítat z Lambert-Beerova zákona:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd, \quad (6)$$

kde I je intenzita prošlého záření, I_0 je intenzita dopadajícího záření, ε je molární absorpční koeficient ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c je koncentrace látky (mol l^{-1}) a d (cm) je síla vrstvy kterou záření prochází [11, 13].

Povrchová plazmonová rezonance

Unikátní optické vlastnosti nanočástic stříbra (a dalších kovů) jsou výsledkem kolektivní oscilace vodivostních elektronů způsobené interakcí s elektromagnetickým zářením. Tento jev je označován jako povrchová plazmonová rezonance (SPR). Existence této kolektivní oscilace elektronů ve vodivostním pásu kovové nanočástice je podmíněna několika faktory – excitací vodivostních elektronů elektrickým polem dopadajícího záření, přítomností vratných sil (restoring forces) vyvolaných indukovanou polarizací okolního prostředí nanočástice a omezení pohybu elektronů oblastmi menšími než je vlnová délka dopadajícího záření (nanorozměry částice). Elektrické pole dopadajícího záření „vyrazí“ elektrony z rovnovážných poloh a důsledkem je oscilační pohyb elektronů o charakteristické frekvenci – SPR frekvenci. Pro nanočástice stříbra (velikost kolem 30 nm) je SPR patrná s maximem v absorpčních spektrech v oblasti okolo 400 nm. S rostoucí velikostí nanočástic se toto maximum posouvá k vyšším vlnovým délkám. Pozorovaný spektrální posun je způsoben šířením povrchového náboje přes větší plochu povrchu, z toho důvodu okolní médium lépe kompenzuje vratné síly a zpomaluje elektronovou oscilaci [15, 16].

2.2.3 Biologické vlastnosti

Antibakteriální aktivita sloučenin stříbra je známým fenoménem už dlouhou dobu. Používali je již starověcí Řekové a Římané. Nádoby vyrobené ze stříbra byly používány ke konzervaci pitné vody a jiných tekutin. Hippokrates používal stříbro k léčbě vředů [4]. Ve středověku se zase stříbrný prášek používal jako doplněk stravy, nicméně v této podobě nebyl dobře vstřebatelný a po delší době užívání se začaly objevovat symptomy otravy – tzv. argyrie [17].

Antibakteriální aktivita nanočástic stříbra (v té době koloidního stříbra) byla objevena na počátku 20. století, ale objev antibiotik znamenal zastavení výzkumu v této oblasti. Nicméně vzrůstající rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům vedla k obnovení zájmu o antibakteriální vlastnosti nanočástic stříbra. Ty totiž vykazují proti některým bakteriálním kmenům (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) srovnatelnou účinnost jako antibiotika [8].

Mechanismus antibakteriálního působení nanočástic stříbra je velmi intenzivně zkoumán, ale i přesto není dosud přesně znám. Existuje ale několik teorií o tom, jak by tento mechanismus mohl vypadat:

1. Kontakt nanočástice s mikroorganizmem – nanometrová nanočástice stříbra má extrémně velký povrch pro kontakt s bakterií a proto by mohla atakovat buněčnou membránu (ucpat ji, roztrhnout) nebo pronikat do bakterie [17].
2. Bakteriální membrány obsahují proteiny s obsaženou sírou a nanočástice by stejně jako Ag^+ mohly s těmito proteiny interagovat a inhibovat tak jejich funkci [17].
3. Nanočástice stříbra by mohly atakovat dýchací řetězec v bakteriální mitochondrii a způsobit tak buněčnou smrt [17].
4. Nanočástice stříbra by mohly mít schopnost uvolňovat ionty stříbra do bakteriálních buněk, což by vedlo ke vzniku volných radikálů. Volné radikály se podílejí na vzniku oxidativního stresu a způsobují poškození a dokonce i smrt buňky [17].

2.3 Příprava disperzí nanočástic

Disperze nanočástic lze připravovat pomocí dvou zásadně odlišných postupů. Při prvním jsou nanočástice připravovány tak, že makroskopický materiál je rozměňován na objekty, které dosahují nanometrových rozměrů – tyto postupy označujeme jako dispergační metody. Druhou skupinou postupů jsou metody kondenzační. Ty spočívají ve využití průběhu chemické reakce, kdy se atomy nebo molekuly spojují do nukleačních jader a tato jádra v disperzním médiu agregují na objekty nanometrových rozměrů [8].

2.3.1 Dispergační metody

Jsou označovány také jako Top-Down metody. Většina těchto metod se k přípravě nanočástic stříbra nepoužívá. V praxi se používají jen některé – např. laserová ablace a elektrochemická metoda [8].

Laserová ablace

Je fyzikální metoda vhodná pro přípravu nanočástic stříbra. Při této metodě dochází k rozrušování makroskopického materiálu (stříbrné folie) pomocí laserového paprsku. Je univerzální, snadno realizovatelná a vzniklé nanočástice nejsou kontaminované žádnými zbytkovými chemickými rezidui. Laserovou ablací se dají připravit nejen nanočástice stříbra ale i dalších kovů. Jejich velikost se pohybuje řádově v desítkách nanometrů a vzhledem k vysoké čistotě jsou takto připravené nanočástice vhodné pro použití v povrchu zesílené Ramanově spektroskopii (SERS). Velikost nanočástic se dá ovlivnit vlnovou délkou a intenzitou laseru, délkou ozařování a přítomností povrchově aktivních látek [8, 18].

Elektrochemická metoda

Pro výrobu nanočástic stříbra je možné použít zařízení s dvouelektrodovým zapojením. Jako katoda a anoda slouží stříbrné dráty vertikálně umístěné asi 10 mm od sebe v elektrochemické cele naplněné destilovanou vodou. Elektrolýza se provádí při teplotě 20–95 °C při konstantní voltáži 20 V. Důležitým krokem elektrochemické syntézy nanočástic stříbra je střídání polarity elektrod v intervalu 30–300 s spolu s intenzivním mícháním v průběhu elektrolýzy. Velikost připravených částic je 5–13 nm [19].

2.3.2 Kondenzační metody

Jinak označované jako Bottom-Up. Tyto metody vycházejí z analytických disperzí a jejich základem je průběh chemické reakce (nejčastěji chemická redukce iontu kovu v roztoku). Nanočástice kovů jsou připravovány převážně těmito metodami, protože bývá dosaženo lepších výsledků (menší velikost nanočástic) než u dispergačních metod. Můžeme také upravovat např. polydisperzitu. V následujícím textu budou popsány hlavní, ale i méně známé metody přípravy nanočástic stříbra i dalších kovů [18].

Borohydridová metoda

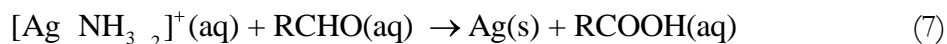
Intenzivní vývoj tzv. mokrých syntéz je spojen se jmény ALBRECHT, BLATCHFORD a CREIGHTON, kteří první publikovali dnes již klasickou metodu syntézy nanočástic stříbra, která spočívá v redukcí dusičnanu stříbrného silným redukčním činidlem – tetrahydridoboritanem sodným (NaBH_4). Reakcí jednoho ml roztoku $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$ a tří ml $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vychlazeného roztoku NaBH_4 za stálého a intenzivního míchání vzniknou nanočástice stabilní několik měsíců. Velikost těchto částic se pohybuje v rozmezí od 5 nm do 20 nm a dá se kontrolovat úpravou poměru $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$. Tato metoda má však zásadní nevýhodu v tom, že kvůli adsorpci borátu na povrch nanočástice není vhodná pro některé aplikace (např. SERS měření řady významných molekul – DNA) [8].

Citrátová metoda

Dalším příkladem klasické metody redukční přípravy nanočástic stříbra je citrátová metoda. Tuto metodu vyvinuli MEISEL a LEE, kteří k redukcí použili slabší redukční činidlo – citrátový aniont. Ten má schopnost nanočástice během vzniku zároveň stabilizovat. Příprava spočívá ve smíchání 10 ml 1 % citrátu sodného s 500 ml $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$ a následném přibližně hodinovém vaření reakční směsi. Připravené nanočástice mají velikost přibližně 30–120 nm a nejsou příliš stabilní. Na rozdíl od borohydridové metody adsorpce citrátového aniontu na nanočástici nepředstavuje aplikační problém a proto jsou nanočástice připravené citrátovou metodou velmi využívané pro SERS aplikace [8].

Modifikovaná Tollensova metoda

Tato metoda představuje jednostupňovou syntézu nanočástic stříbra s kontrolovanou velikostí. Základní Tollensova metoda spočívá v redukci $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ pomocí jednoduchých organických sloučenin – aldehydů.



V modifikované Tollensově metodě jsou Ag^+ ionty redukovány sacharidem v přítomnosti amoniaku. Touto metodou vznikají částice, jejichž velikost se pohybuje od 25 do 450 nm a závisí na koncentraci amoniaku (s rostoucí koncentrací amoniaku velikost nanočástic roste). Kromě koncentrace amoniaku se dá velikost nanočástic ovlivňovat změnou koncentrace stříbrných iontů a volbou redukujícího sacharidu. Mohou být použity glukóza a galaktóza jako zástupci monosacharidů a maltóza nebo laktóza jako disacharidy [20]. Významný je také přídavek hydroxidu sodného, který zahajuje redukční proces a délku reakce udržuje v řádu minut [20, 21].

Redukce pomocí polyalkoholů

Kromě výše zmíněných organických látek – aldehydů, sacharidů a citrátového aniontu mohou být použity k přípravě nanočástic stříbra také polyalkoholy. Polyalkohol přítomný v reakčním systému slouží jako solvent, stabilizátor a zároveň redukční látka. Jedním z příkladů je použití ethylenglykolu v přítomnosti polyvinylpyrrolidonu (PVP). V prvním kroku je v 10 ml ethylenglykolu rozpuštěno vhodné množství PVP (0,17–1,7 g) a tento roztok je temperován v olejové lázni na 160 °C. Následně je 0,170 g AgNO_3 přidáno do dalších 10 ml ethylenglykolu a tento roztok je po kapkách přidáván k prvnímu (obsahujícímu PVP). Reakce je ukončena přibližně po 4 h a připravené nanočástice mají velikost od 10 do 80 nm. Jejich velikost je možné upravovat změnou koncentrace PVP a přídavkem amoniaku [22].

Redukce dalšími anorganickými sloučeninami

Kromě tetrahydridoboritanu sodného mohou být pro redukční přípravu nanočástic stříbra použity i další sloučeniny. Jako reduktant může být použit např. vodík, peroxid vodíku, hydrazin, hydroxylamin a některé komplexní sloučeniny železa [8, 18].

Syntéza s použitím mikrovln

Použití mikrovlnného ohřevu je další možností jak připravit stříbrné, zlaté a bimetalické (Ag-Au) nanočástice. Velikost připravených nanočástic se pohybuje v rozmezí 5–50 nm. Výhodou mikrovln je pronikavost a rychlé zahřátí reakční směsi. Mikrovlny mají vysokou frekvenci a interagují s dipolovým momentem molekul což způsobuje zahřívání. Pro přípravu stříbrných nanočástic se používá dusičnan stříbrný jako prekurzor, polyakrylamid jako stabilizátor a jako redukční látka je použit hydrazin hydrát. Stabilita takto připravených nanočástic se pohybuje okolo měsíce při běžné pokojové teplotě [23].

Redukce za pomoci ultrazvuku

Ultrazvuk může být použit v rámci výše zmíněných dispergačních metod k rozrušování makroskopických materiálů na objekty nanometrových rozměrů, ale také může být použit jako redukční činidlo v metodách kondenzačních. Ultrazvukem o frekvenci 200 kHz můžeme rozložit vodu na vodíkové a hydroxylové radikály. V následujícím kroku vznikají po přidavku vhodného aditiva organické radikály, které mají redukční funkci. Sonifikací vodného roztoku stříbrné soli pak v přítomnosti povrchově aktivních látek vznikají nanočástice stříbra o velikosti 10–16 nm [8, 18].

Polyoxomethalátová syntéza

Polyoxomethaláty (POM) mají potenciál pro syntézu stříbrných nanočástic. Jedná se obvykle o aniont obsahující tři a více iontů kovů (např. vanadu, niobu, tantalu, molybdenu) propojených kyslíkovými atomy do třídímenzionální struktury, ve které je uzavřen jeden nebo více heteroatomů (fosforu nebo křemíku). Ozařováním odvdzušněné směsi POM/2,4-dichlorfenol/Ag⁺ UV zářením dojde ke vzniku nanočástic. POM v systému vystupuje jako katalyzátor, reduktant a zároveň jako stabilizátor. Velikost nanočástic se pohybuje kolem 38 nm [21].

Redukce za použití γ -záření

Pro přípravu nanočástic stříbra, zlata a platiny může být použito ozařování roztoků jejich solí pomocí γ -záření [24]. Výhodou této metody je fakt, že do reakční směsi je zaváděno minimum sloučenin, což znemožňuje adsorpci na povrchu nanočástice a negativní ovlivnění jejich výsledných vlastností. V průběhu ozařování solí ve vodíkové atmosféře

dochází ke vzniku vodíkových atomů, které redukují ionty soli na požadované nanočástice. Jejich velikost se pohybuje kolem 7 nm, jsou téměř monodisperzní a bez strukturních defektů. Parametry připravovaných nanočástic lze upravit přidáním organických rozpouštědel, například 2-propanolu nebo acetonu [18].

Redukce za použití UV záření

Fotochemická syntéza za užití UV záření vede ke vzniku nanočástic stříbra s podobnými vlastnostmi jako u předchozí metody. Její značnou výhodou je levnější experimentální vybavení. Reakční směs obsahuje stříbrnou sůl, stabilizátor (např. polyvinylpyrrolidon, polyakrylát) a organickou látku (např. fenylmethylketon, askorbová kyselina), která se rozpadá na radikály a ty redukují stříbrné ionty. Velikost nanočástic je kolem 10 nm [8].

Biologické metody

K syntéze nanočástic stříbra je používáno velké množství fyzikálních a chemických metod. Nicméně jejich použití je spojeno s řadou problémů: použití toxických rozpouštědel a někdy i velké energetické a ekonomické náklady. Jako slibné řešení tohoto problému se zdá hledání v čistě přírodních zdrojích. Pro levnou, energeticky nenáročnou syntézu nanočástic stříbra mohou být použity bakterie, rostliny, řasy a dokonce i viry [25].

Jedna z nejstarších studií popisuje bakterie *Pseudomonas stutzeri* AG259, objevené ve stříbrných dolech, které hromadí stříbrné nanočástice v protoplazmě. Jejich velikost se pohybuje v rozsahu 35–46 nm. Bohužel přesný mechanismus vzniku nanočástic je stále neznámý [25]. Dalším zajímavým druhem je *Morganella* sp. RP-42. Po vystavení této bakterie dusičnanu stříbrnému dochází k produkci nanočástic o velikosti 20 ± 5 nm [25]. Podobné je to také u bakterií *Lactobacillus*, které po vystavení vysoké koncentraci stříbrných iontů produkují mikroskopické krystaly stříbra [25].

Existuje také několik prací, ve kterých se k syntéze nanočástic stříbra používají kvasinky. Například druh kvasinky označený KMY3 je schopen při kontaktu s roztokem stříbrných iontů přeměnit toto stříbro na nanočástice [25].

Pro schopnost akumulovat kovy jsou také intenzivně zkoumány houby jako potenciální zdroj nanočástic stříbra. Výhodou hub je jejich rychlý růst, snadná manipulace a ekonomická nenáročnost. U hub rodu *Verticillium* byla pozorována intracelulární syntéza stříbrných nanočástic při vystavení roztokům stříbrných solí. Tyto nanočástice vznikají za buněčnou stěnou pravděpodobně tak, že některý enzym přítomný v buněčné stěně

redukuje ionty stříbra. Velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí 13–37 nm [25]. Příkladem extracelulární syntézy, která je zároveň jednodušší, je použití houby *Aspergillus fumigatus*. Tato syntéza je mimořádně rychlá, nanočástice stříbra se tvoří už během několika minut po kontaktu iontů stříbra s houbou a jejich velikost se pohybuje od 5 do 25 nm. Nanočástice jsou stabilní přibližně 4 měsíce při teplotě 25 °C [25]. Dalším zajímavým příkladem je zemědělsky významná houba *Trichoderma asperellum*. Zajímavým aspektem syntézy s použitím této houby jsou dva kroky: prvním je bioredukce dusičnanu stříbrného a druhým následné obalení nanočástice stabilizační vrstvou [25].

Kromě použití mikroorganismů se výzkum v oblasti biosyntéz nanočástic zaměřuje i na použití celých rostlin (případně jejich částí). Příkladem extracelulární syntézy je redukce roztoku stříbrných iontů za použití extraktu z muškátových listů (*Pelargonium graveolens*). Výhodou této syntézy je, že ve srovnání s použitím bakterií nebo hub, u nichž syntéza trvá až na výjimky 24–124 hodin, je mnohem kratší – cca 9 hodin. Zahřátím reakční směsi pod bod varu můžeme reakční čas zkrátit přibližně na 2 hodiny [21, 25].

Stejně jako u kvasinek také v případě řas existuje jen málo prací, zabývajících se syntézou nanočástic stříbra pomocí řas. Například extrakt získaný ze zelené řasy druhu *Chlorella vulgaris* může být použit pro syntézu nanočástic stříbra. Ty mají tvar destiček a velmi nízkou polydisperzitu [21, 25].

K syntéze nanočástic mohou být dokonce použity i nebuněčné organizmy – viry. Virální kostra může být použita jako templát pro tvorbu nanočástic. Konkrétními příklady jsou viry fazolové skvrnitosti CCMV, fazolové mozaiky CPMV a virus tabákové mozaiky TMV, které se dají použít jako nukleační „komůrky“ pro anorganické materiály [25].

2.4 Stabilizace nanočástic

Disperze nanočástic mají velký povrch a tudíž i velkou povrchovou energii. Za těchto podmínek je přechod do stavu s nižší energií samovolný. Nanočástice mohou zmenšit svoji energii změnou struktury, velikosti částic a stupně disperzity. Stabilitou nanočástic pak rozumíme jejich schopnost odolávat agregaci. Nanočástice v disperzi podléhají neustálému tepelnému pohybu a když dojde k jejich dostatečnému přiblížení, přitažlivé síly způsobí jejich spojování (agregaci) ve větší celky, které při dosažení určité hmotnosti začnou sedimentovat. Agregací proces je hlavním aplikačním problémem nanočástic – vznikem velkých agregátů dochází ke ztrátě zajímavých vlastností, typických pro nanočástice. Zlepšení stability disperzí nanočástic je realizováno dvěma mechanismy, jedná se o sterickou stabilizaci a stabilizaci elektrickou dvojvrstvou [3, 13].

První případ – sterická stabilizace – je založen na repulzních silách, které vznikají v systému v přítomnosti polymerů či neionických surfaktantů. Tyto látky se adsorbují na fázovém rozhraní, kde je rovnováha mezi atrakčními a repulzními silami závislá na tloušťce adsorbované vrstvy. Ta je v případě polymerů dána nejen délkou polymerního řetězce, ale také způsobem adsorpce [3, 11]. Pro účely sterické stabilizace patří k běžně používaným polymerům např. želatina, polyethylenglykol (PEG), poly(vinylalkohol) (PVA), polyvinylpyrrolidon (PVP), polyakrylamid a polyuretan (PU). Ze skupiny neionických surfaktantů patří mezi nejpoužívanější Tweeny (např. Tween 80), Triton X-100 a látky ze skupiny Brij [3].

Druhý mechanismus stabilizace je založen na přítomnosti elektrické dvojvrstvy. Ta se skládá z vnitřní (Sternovy) vrstvy protiiontů, vázaných na povrch nanočástice převážně pomocí adsorpčních sil, a difuzní vrstvy s elektrostaticky přitahovanými protiionty. Potenciál na rozhraní těchto vrstev se nazývá elektrokinecký potenciál (ζ potenciál). Všechny nanočástice v disperzi mají stejný povrchový náboj, díky němuž při vzájemném přiblížení nanočástic nedojde k agregaci, ale k odpuzování. Tento povrchový náboj lze zvětšit pomocí ionických surfaktantů či jiných iontových látek. Tím dochází ke zvýšení absolutní hodnoty ζ potenciálu, což vede k posílení stability nanočástic [3, 11]. K významným látkám používaným k tomuto typu stabilizace patří dodecylsulfát sodný (SDS) jako zástupce anionických surfaktantů a cetylmonium chlorid nebo bromid (CTAC, CTAB) jako kationické surfaktanty [3].

Pro studium agregátní stability nanočástic stříbra modifikovaných výše zmíněnými polymery či surfaktanty se používá stanovení hodnot kritické koagulační koncentrace (CCC). Tato koncentrace představuje koncentraci elektrolytu (destabilizačního činidla) v disperzi nanočástic, při které dochází k rychlé agregaci nanočástic – nárůstu velikosti sledovatelném například použitím metody DLS. Jednou z možností získání hodnot CCC je metoda založená na titraci disperze nanočástic stříbra kationickým polyelektrolytem – poly(dialyl-dimethylamonium) chloridem (PDDA). Ta spočívá v přidávání malého množství roztoku PDDA k záporně nabitým nanočásticím stříbra v určitých časových intervalech a následným proměřováním vhodnou experimentální technikou (např. DLS, UV-VIS). Výhodou použití PDDA je fakt, že vzhledem k jeho velkému náboji není k destabilizaci nanočástic třeba jeho velké množství a tudíž nedochází k výraznějšímu naředění disperze nanočástic, které by mohlo vést k nepřesné interpretaci získaných dat. Tabulka 1 demonstruje získané hodnoty CCC pro nemodifikované nanočástice stříbra a pro nanočástice modifikované vybranými polymery či surfaktanty [3, 13].

Tabulka 1: Získané hodnoty kritické koagulační koncentrace (CCC) pro vybrané polymery a surfaktanty (koncentrace želatiny v disperzi nanočástic je 0,01 % w/w a koncentrace ostatních látek je 1 % w/w)

modifikátor	hodnota CCC [% w/w]
–	$2,5 \cdot 10^{-5}$ [3]
želatina	$3,5 \cdot 10^{-4}$ [13]
SDS	$6,0 \cdot 10^{-3}$ [3]
Tween 80	$2,0 \cdot 10^{-4}$ [3]
Brij 58	$3,0 \cdot 10^{-5}$ [3]
PEG 1500	$3,0 \cdot 10^{-5}$ [3]
PVP	$8,0 \cdot 10^{-5}$ [3]

U všech uvedených modifikátorů je patrný nárůst hodnot CCC proti nemodifikované disperzi nanočástic stříbra. Daleko větší bude stabilizační schopnost želatiny, protože její koncentrace v disperzi je nižší (0,01 % w/w) než u ostatních modifikátorů (1 % w/w).

2.5 Aplikace nanočástic stříbra

Jak už bylo zmíněno v úvodu této práce, nanočástice stříbra mají řadu zajímavých vlastností, díky kterým mohou být využívány v různých odvětvích.

2.5.1 Aplikace v medicíně

Vzhledem k faktu, že nanočástice stříbra vykazují antibakteriální a antifungální vlastnosti, je logické jejich možné využití v oblasti medicíny. Používají se například k ošetření chirurgických a zubařských nástrojů [20].

Obvazový materiál

Medicínální aplikace nanočástic stříbra jsou pravděpodobně nejdůkladněji prostudovány v oblasti ošetřování povrchových zranění. První komerčně používaný materiál na bázi stříbra je na trhu více než deset let. Jedná se o Acticoat® – materiál tvořený dvěma vrstvami polyamidu pokrytými nanokrystaly stříbra. Nová generace materiálu je vyvíjena s ještě větším důrazem na antibakteriální vlastnosti. Tyto nové materiály (např. na bázi chitosan/stříbro) jsou použitelné nejen na ošetření popálenin, ale také vředů, puchýřů a tzv. diabetických nohou [4, 17].

Stříbrem impregnované implantáty

K nejvýznamnějším chirurgickým implantátům patří centrální žilní katetry. Ty jsou široce rozšířeny v chirurgické praxi, což přináší potenciální komplikace v podobě infekce. Předchozí studie ukázaly, že katetry impregnované antibiotiky jsou sice účinné k potlačení infekce, ale vrůstající rezistence bakterií na antibiotika je vážnou hrozbou. Nová generace stříbrem impregnovaných katetrů je založená na vazbě stříbra v inertním zeolitu [4].

V oblasti žilní chirurgie je výzkum zaměřen na vývoj infekci odolných cévních graftů (protéz). Použití graftu InterGard Silver®, na bázi rozvětveného polyesteru potaženého kolagenem a stříbrem, ukázalo výbornou odolnost proti infekci [17].

Intenzivní výzkum běží také v oblasti srdeční chirurgie a neurochirurgie. Konkrétním příkladem je testování srdečních chlopní potažených stříbrem a speciálních katetrů odvádějících cerebrospinální tekutinu, která může způsobit vysoký nitrolebeční tlak a poškodit tak mozek [4].

Kostní cement

Nanočástice stříbra mohou být použity jako antibakteriální aditivum do poly(metylmethakrylátu) (PMMA) – kostního cementu. Ten se používá například k zabezpečení spoje mezi kostí a protézou u operací kolenního nebo kyčelního kloubu. Infekčnost u těchto operací je poměrně vysoká – 1 až 4 % a použití cementu dopovaného nanočásticemi ukazuje vysokou antibakteriální aktivitu např. proti methicillin rezistentnímu *Staphylococcus aureus* [4, 17].

2.5.2 Analytické aplikace

Vývoj nových analytických technik schopných dosahovat nižšího detekčního limitu a taktéž konstrukce nových senzorů citlivých na biologicky aktivní látky patří k důležité oblasti výzkumu.

SERS a SERRS

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) a povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS) jsou velmi citlivé spektroskopické techniky, jejichž detekční limity se pohybují až v řádech femtomolů [8]. Zesílení Ramanova signálu molekul analytu, které jsou adsorbované na povrchu nanočástice je dáno dvěma mechanismy – elektromagnetickým a chemickým. Elektromagnetický mechanismus, zodpovědný za hlavní podíl zesílení, je spojen s existencí plazmonové rezonance nanočástic. Chemický mechanismus má základ v přenosu náboje mezi adsorbovanou molekulou a povrchem nanočástice [7, 8].

Techniky SERS a SERRS se dají použít pro studium malých organických molekul (např. 1,10-fenantrolin, dithiopyridin, thymin a jeho deriváty) nebo biomakromolekul (např. Cytochrom c, polypeptidy a proteiny). [8].

Pro tyto techniky se hodí nejen nanočástice stříbra, ale také nanočástice dalších kovů – zlata, mědi, hliníku a lithia [18]. Optimální velikost použitých nanočástic je spojena s vlnovou délkou použitého laseru. Pro vlnovou délku v rozsahu od 488 do 647 nm se hodí nanočástice stříbra o velikosti 70–200 nm. Důležitou roli hraje také tvar nanočástic a jejich případná agregace [8, 18].

Senzory a nanosenzory

Dalším možným využitím nanočástic stříbra je konstrukce citlivých chemických senzorů, biosenzorů a nanosenzorů. V této oblasti se využívá jejich výjimečných optických vlastností. Konkrétním příkladem jsou biosenzory na detekci streptavidinu a na stanovení markerů Alzheimerovy choroby [8, 16].

2.5.3 Katalýza

V oblasti katalyzátorů se používají látky s velkou plochou povrchu a vysokou povrchovou energií. Nanočástice tyto parametry splňují. Katalytický efekt nanočástic je závislý na velikosti (menší částice jsou katalyticky účinnější než větší). Nanočástice stříbra se využívají k oxidaci organických sloučenin – např. etylenu na etylenoxid, nebo k redukci nitrosloučenin. V katalyzátorech diesellových motorů aditiva na bázi Ag/alumina zlepšují efektivitu odstraňování NO_x a CO z výfukových plynů. U nanočástic stříbra je také testována jejich katalytická účinnost při degradaci sloučenin na bázi fenolu a chlorderivátů [8].

2.5.4 Použití v komerčních produktech

Na trhu se vyskytuje už více než stovka výrobků obsahujících nanočástice stříbra [5]. Významnou část zaujímá textilní průmysl, řada výrobců modifikuje svoje tkaniny nanočásticemi stříbra, aby zabránili vzniku pachů a plísní. Dále se nanočástice stříbra využívají při filtraci vody a slibně vypadá konstrukce elektronických zařízení pomocí komponent na bázi nanočástic stříbra.

Filtrace vody

Nanočástice stříbra mají pro svoje antibakteriální vlastnosti potenciál k využití jako filtrační médium při úpravě pitné vody. Komerčně dostupné domácí filtrační systémy firem Aquapure®, Kinetico® a QSI-Nano® používají ve svých filtračních náplních stříbrem impregnované nebo stříbrem potažené materiály [5]. Jako výborný nosič stříbra byl testován polyuretan. Polyuretanová pěna napuštěná stříbrem může být opakovaně namáčena, vysoušena a skladována po dlouhou dobu bez ztráty obsažených nanočástic. Tento materiál je běžně dostupný, levný a netoxický. Je ho možné aplikovat nejen při čištění vody, ale také jako filtrační vložku pro domácí či průmyslovou vzduchotechniku a jako obalový materiál [26].

Textil

Produkty textilního průmyslu jsou běžnou součástí každodenního života. Látky na bázi bavlny nebo syntetických vláken však představují vhodné prostředí pro škodlivé mikroorganismy – bakterie, houby a plísně. K ošetření textilu se dříve používala řada látek např. halogenidové ionty, řada detergentů a látky na bázi solí kovů (CuSO_4 a ZnSO_4). S rozvojem nanotechnologií se výrobci textilu zaměřili na nanočástice stříbra, které vykazují silnou antibakteriální aktivitu [27]. Proto je dnes většina výzkumu soustředěna na oblast syntézy textilních vláken s inkorporovanými nanočásticemi stříbra (Nanosilver® – spodní prádlo, termo prádlo, ponožky a trička).

Jedna z možností přípravy bavlněných vláken zahrnuje tři dílčí kroky. V prvním kroku jsou připraveny nanočástice stříbra (pomocí redukčních metod) a následně jsou stabilizovány pomocí vhodného polysacharidu. V druhém kroku jsou bavlněná vlákna ponořena do disperze stabilizovaných nanočástic a v ní jsou za stálého míchání ponechána 24 hodin. V této fázi dochází k depozici nanočástic stříbra na vlákna. Bavlna jako přírodní látka obsahuje celulózu, která má velký povrch a velké množství hydroxylových skupin. Tyto skupiny usnadňují adsorpci nanočástic na povrch vlákna. V třetím kroku dochází k odstranění vláken z disperze nanočástic a jejich proplachování destilovanou vodou. Tento krok vede k odstranění nenadeponovaných nebo slabě vázaných nanočástic stříbra z vláken [28].

Elektronika a informační technologie

Rozměry nanočástic stříbra, jejich optické a elektrické vlastnosti je předurčují k využití v oblasti moderní elektroniky. Chemickými metodami můžeme připravit nanofilmy nebo nanovlákna potažená izolační vrstvou oxidu křemičitého. Nanočástice stříbra mohou být také použity ke konstrukci 3D mikroeletromechanických systémů (MEMS) a tvorbě elektrických obvodů pomocí inkoustového tisku [8]. Pro optické vlastnosti mohou být nanočástice stříbra použity ke konstrukci datových úložišť nebo v oblasti barevné holografie [8, 29].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Seznam chemikálií použitých během experimentální činnosti je uveden v tabulce 2. Pro přípravu všech roztoků byla použita demineralizovaná voda z přístroje AQUAL 29 firmy MERCI o čistotě $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií

Název	M. h.	Výrobce	Čistota
dusičnan stříbrný	169,88	Tamda	p. a.
amoniak (25 % vodný roztok)	17,03	Lach-Ner	p. a.
hydroxid sodný	40,00	Lach-Ner	p. a.
želatina	—	Loba Feinchemie	p. a.
D(+) maltóza	360,31	Riedel-de-Haën	p. a.
askorbová kyselina	176,13	Penta	p. a.
tetrahydribořitan sodný	37,83	Sigma-Aldrich	p. a.
formaldehyd	30,03	Lachema	p. a.
sorbitol	182,17	Penta	p. a.
hydrazin hydrát	50,06	Sigma-Aldrich	p. a.
Dimezon S (4-hydroxymethyl-4-methyl-1-fenyl-3-pyrazolidion)	206,25	Fluka	Fotopur

3.2 Přístrojové vybavení

3.2.1 Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (90Plus)

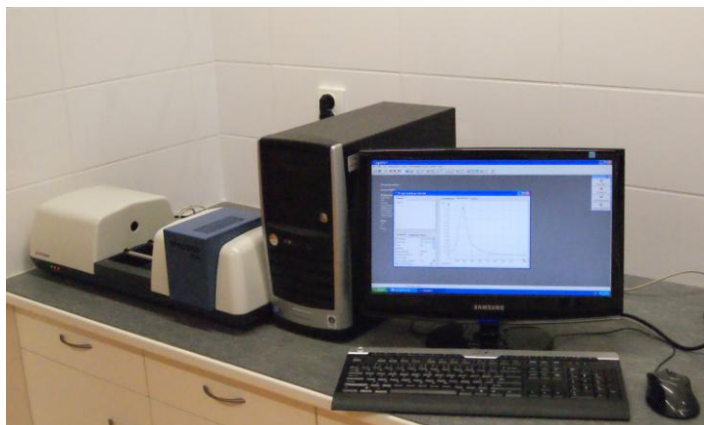
Měření velikosti částic byla prováděna na přístroji americké firmy BROOKHAVEN INSTRUMENTS CORPORATION, Zeta Plus, který pracuje na principu dynamického rozptylu světla (DLS). Mimo měření velikosti částic v rozsahu 2 nm až 2 μm umožňuje přístroj i měření zeta potenciálu. Výstupním údajem je velikost částic, polydisperzita, případně distribuční křivka zobrazující četnost částic v jednotlivých velikostních třídách [14].



Obrázek 2: Přístroj Zeta Potential Analyzer Zeta Plus

3.2.2 UV-VIS spektrofotometr Specord S600

Potřebná UV-VIS spektra byla měřena na přístroji německé firmy ANALYTIK JENA SPECORD S600. Jedná se o jednopaprskový spektrofotometr s diodovým polem ovládaný přes externí počítač s programem WINASPECT (verze 2.3.1.0).



Obrázek 3: UV-VIS spektrofotometr Specord S600

3.2.3 Transmisní elektronový mikroskop

Pro získání TEM snímků byl použit mikroskop firmy JEOL, model JEM-2010. Urychlovací napětí přístroje bylo 160 kV. Vzorek byl nanášen na měděnou síťku pokrytou vrstvou amorfního uhlíku.

3.3 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou, která spočívá v redukci $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ vhodnou redukční látkou [20, 21].

Do plastové kádinky o objemu 50 ml bylo pomocí automatické pipety přidáno 5 ml dusičnanu stříbrného ($c = 0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a 1,25 ml amoniaku ($c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Poté bylo do systému připipetováno 11,75 (případně 7,75) ml destilované vody. Množství vody je spočítáno na celkový objem reakčního systému 25 ml. Dále byl přidán 1 ml hydroxidu sodného ($c = 0,24 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a 1 (případně 5) ml zásobního roztoku želatiny. Na závěr bylo k systému přidáno 5 ml redukční látky ($c = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Výsledné koncentrace složek v reakčním systému ilustruje tabulka 3.

Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých složek v reakčním systému

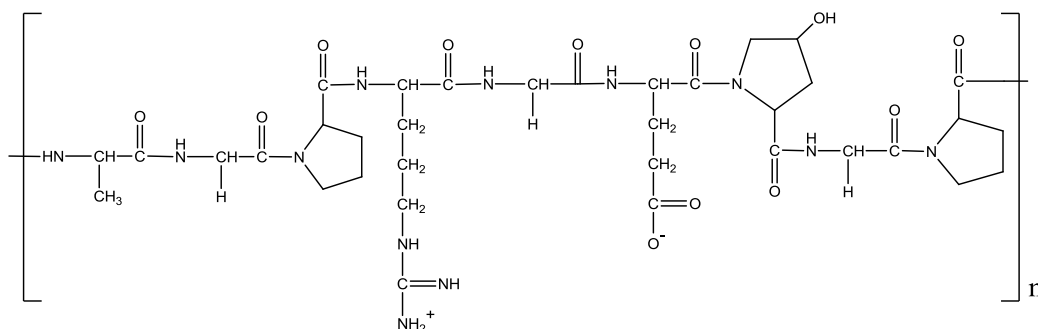
AgNO ₃	0,001 mol·dm ⁻³
NH ₃	0,005 mol·dm ⁻³
NaOH	0,010 mol·dm ⁻³
roztok želatiny	viz kapitola 3.4
redukční látka	0,010 mol·dm ⁻³

Příprava reakčního systému byla prováděna za laboratorní teploty. Míchání roztoku bylo zajištěno magnetickým míchadlem.

Výsledná disperze nanočástic stříbra byla charakterizována měřením velikosti částic pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS), UV-VIS spektroskopii a v některých případech snímky z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Snímky z TEM pořizoval RNDr. Aleš Panáček, Ph.D., z katedry Fyzikální chemie PřF UP Olomouc.

3.4 Modifikace nanočástic želatinou

Nanočástice stříbra byly modifikovány roztokem želatiny. Jedná se o přírodní nestejnorodý polymer, vzniklý spojováním aminokyselin do řetězců. Za základní jednotku jsou považovány aminokyseliny v pořadí -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-. Želatina se používá hlavně v potravinářství jako přísada při výrobě cukrovinek a dortů, ve farmacii jako pojivo a při výrobě tobolek, ale také v mnoha dalších odvětvích [30].



Obrázek 4: Strukturální uspořádání želatiny: -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro-

Zásobní roztoky želatiny byly připraveny tak, že se želatina rozpouštěla v destilované vodě. Při rozpouštění byl roztok míchán a zahříván na cca 50 °C, dokud nebyl dokonale homogenní. Roztoky želatiny byly do reakčního systému přidávány po ochlazení a za stálého míchání před redukční látkou. Jejich koncentrace byla volena tak, aby byla po naředění koncentrace želatiny v reakčním systému 5,0; 2,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,10; 0,05; 0,025; 0,010; 0,005; 0,001; 0,0001 hmotnostních % (% w/w). Pro prvních 5 koncentrací želatiny bylo do reakčního systému přidáváno 5 ml roztoku želatiny a pro dalších 7 pouze 1 ml.

Vzhledem ke zpomalení vzniku nanočástic stříbra vlivem želatiny byla velikost částic a UV-VIS spektra měřena po dvou hodinách od přípravy jejich disperze (v některých případech po 24 hodinách).

3.5 Antibakteriální aktivita

Testování antibakteriální aktivity připravených nanočástic stříbra bylo provedeno pomocí mikrodiluční metody, která umožňuje určit hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Při této koncentraci dochází k zastavení růstu testovaných kmenů bakterií a kvasinek. Disperze nanočástic stříbra se ředí na mikrotitrační destičce v geometrické řadě (2–2048×) kultivačním médiem (Mueller Hinton) a následně je očkováno standardní množství testovaného mikroorganismu. Získané hodnoty minimální inhibiční koncentrace jsou v rozmezí 54–0,05 mg·dm⁻³. Jako testovací organizmy byly použity bakterie rodu *Enterococcus* (2×), *Staphylococcus* (4×), *Escherichia* (1×), *Pseudomonas* (2×), *Klebsiella* (1×) a kvasinky rodu *Candida* (4×) [31]. Měření byla provedena na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UP pod vedením Prof. MUDr. Milana Koláře, Ph.D.

4 VÝSLEDKY

4.1 Určení viskozity disperzí nanočástic

Koncentrační rozmezí modifikátoru želatiny v disperzích nanočástic stříbra je poměrně veliké (0,0001 – 5 % w/w). U jednotlivých koncentrací želatiny v disperzi byla určena viskozita, protože se očekávalo, že minimálně u nejvyšších koncentrací by se mohla výrazněji zvyšovat. Tato odlišnost by způsobila při měření velikosti pomocí metody DLS chybu, protože tento přístroj pracuje při výpočtu velikosti nanočástic s hodnotou viskozity disperzního prostředí.

Měření viskozity bylo prováděno pomocí kapilárního viskozimetru. Pro každou koncentraci želatiny použitou v disperzi nanočástic bylo provedeno 3× a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Výsledky měření viskozity disperzí nanočástic stříbra jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Hodnoty viskozity pro různou koncentraci želatiny používané pro modifikaci disperze nanočástic stříbra určené pomocí kapilárního viskozimetru

koncentrace želatiny [% w/w]	viskozita [Pa·s]
0	0,890
0,0001	0,899
0,001	0,901
0,005	0,907
0,010	0,912
0,025	0,919
0,050	0,945
0,10	0,968
0,25	0,950
0,50	0,992
1,00	1,132
2,50	1,414
5,00	2,705

Naměřené hodnoty ukazují, že se hodnoty viskozit pro roztoky želatiny významně liší od hodnoty pro čistou vodu od koncentrace cca 0,05% w/w (odchylka je vyšší než 5%). Ovlivnění velikosti nanočástic získané metodou DLS se pohybuje v řádu jednotek až desítek nanometrů. Od koncentrace 0,50 % w/w již dochází k tak významnému nárůstu hodnot viskozity (více než 10%), že bez jejich korekce dochází k ovlivnění velikosti částic stříbra získané z DLS dokonce o stovky nanometrů.

4.2 Použité redukční látky

V modifikovaném Tollensově postupu se jako redukční látky používají sacharidy, přičemž nejreprodukovatelnější výsledky byly dosaženy s disacharidem maltózou. Kromě maltózy byly jako redukční látky vyzkoušeny i další organické a anorganické sloučeniny – askorbová kyselina, tetrahydridoboritan sodný, formaldehyd, sorbitol, hydrazin hydrát a Dimezon S (4-hydroxymethyl-4-methyl-1-fenyl-3-pyrazolidion). Stabilní disperze nanočástic stříbra byly připraveny za pomoci jen některých z těchto látek a budou jim věnovány další kapitoly této práce.

V případě použití sorbitolu a hydrazin hydrátu se nanočástice stříbra nepodařilo vůbec připravit. Po přidání těchto redukčních látek do reakčního systému nedošlo k charakteristickému zbarvení do žlutohněda. Tento fakt naznačuje, že nanočástice stříbra nevznikly, což bylo potvrzeno i měřením UV-VIS spekter, na kterých se nenacházelo charakteristické maximum v oblasti 400 nm.

Při použití látky Dimezon S také nedošlo ke vzniku nanočástic stříbra. Po jeho přidání se sice reakční systém zbarvil do tmavěmodra, ale spektroskopické měření opět neprokázalo existenci absorpčního maxima, charakteristického pro nanočástice stříbra.

Použití formaldehydu bez modifikace želatinou nevedlo ke vzniku stabilních nanočástic stříbra, ale ke vzniku agregátů, které okamžitě sedimentovaly. Při použití želatiny (koncentrace 0,0001–0,1 % w/w) byly připraveny disperze nanočástic stříbra, které vykazovaly charakteristické absorpční maximum, ale s klesající koncentrací želatiny docházelo k jeho posunu k vyšší vlnové délce a poklesu intenzity, což naznačuje agregaci nanočástic. Další experimenty vzhledem ke špatné reprodukovatelnosti výsledků nebyly realizovány.

Stabilní disperze nanočástic byly získány, když byly jako redukční látky použity maltóza (Kapitola 4.3), askorbová kyselina (Kapitola 4.4) a tetrahydridoboritan sodný (Kapitola 4.5).

4.3 Redukce maltózou

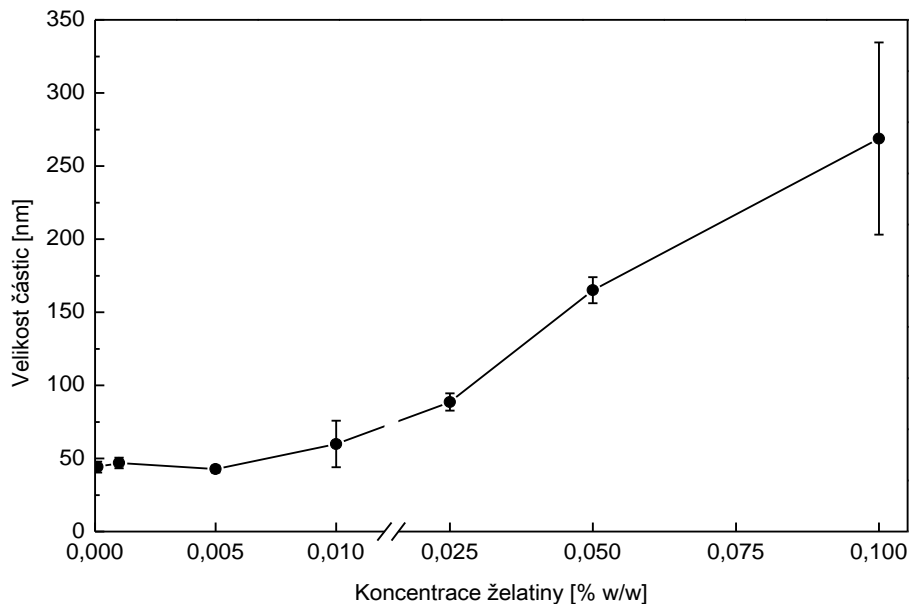
Jako první redukční látka byla použita maltóza, která v modifikovaném Tollensově postupu poskytuje nejstabilnější výsledky připravovaných disperzí nanočástic stříbra [20]. Bez použití želatiny dosahují nanočástice stříbra velikosti 26 až 30 nm. Koncentrace želatiny, použitá v reakčním systému, se pohybovala v rozmezí 0,0001–0,1 % w/w. Experimenty s vyšší koncentrací želatiny nebyly realizovány, protože slabá redukční schopnost maltózy vedla ke zpomalení redukce natolik, že některé roztoky byly měřitelné až druhý den. V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty velikosti částic měřené v disperzích pro jednotlivé koncentrace želatiny pomocí DLS.

Tabulka 5: Velikost nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro různé koncentrace želatiny v závislosti na čase (době uložení od okamžiku přípravy)

	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							čistý koloid
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001	
den	velikost částic [nm]							
1	x	x	x	52	39	49	49	30,8
	x	x	x	66	43	46	42	
	x	x	x	36	40	44	44	
	x	x	x	75	44	44	40	
2	363	169	87	49	44	52	50	29,5
	264	163	87	62	39	43	41	
	177	150	98	43	42	44	41	
	271	176	82	85	45	49	44	
7	300	156	74	56	45	50	54	30,0
	175	125	91	157	39	41	42	
	169	147	96	46	42	45	43	
	209	139	75	77	44	49	43	
14	117	102	73	59	38	56	57	34,4
	230	131	94	148	39	41	42	
	165	142	93	45	40	43	42	
	201	138	72	74	41	44	43	
21	191	90	73	62	39	53	58	32,9
	152	98	88	125	38	41	39	
28	180	102	75	64	40	58	60	34,2
	184	95	90	131	38	40	40	

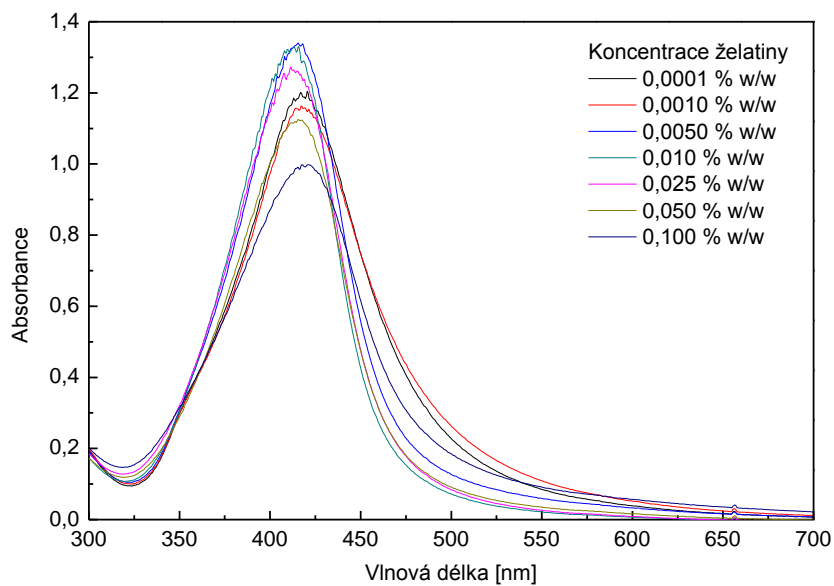
x ... nevzniká disperze nanočástic stříbra

Obrázek 5 ilustruje závislost velikosti nanočástic stříbra na koncentraci želatiny sestavenou vzhledem ke zpomalení redukce až z dat naměřených druhý den od zahájení vlastního syntetického experimentu.



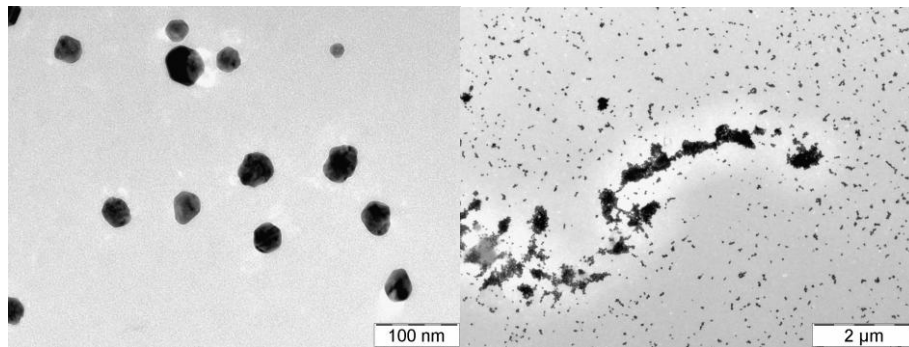
Obrázek 5: Závislost velikosti nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou na koncentraci želatiny (počet měření = 4)

Od každého vzorku byla také změřena UV-VIS spektra. Měření bylo prováděno po desetinasobném zředění a v křemenných kyvetách. Vývoj spekter demonstruje obrázek 6.

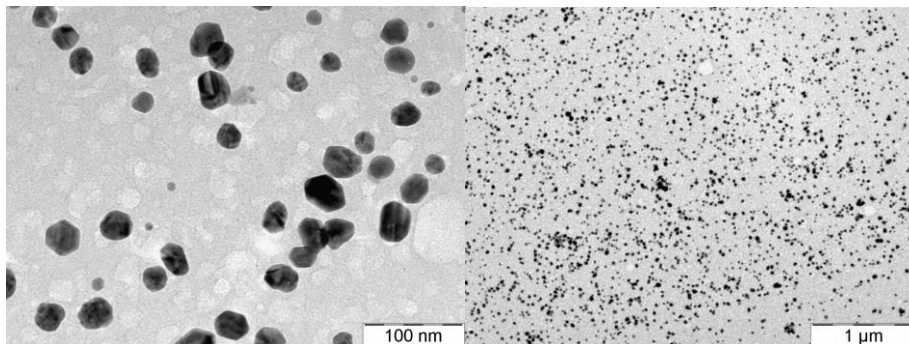


Obrázek 6: UV-VIS spektra nanočástic připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro jednotlivé koncentrace želatiny (měřeno druhý den)

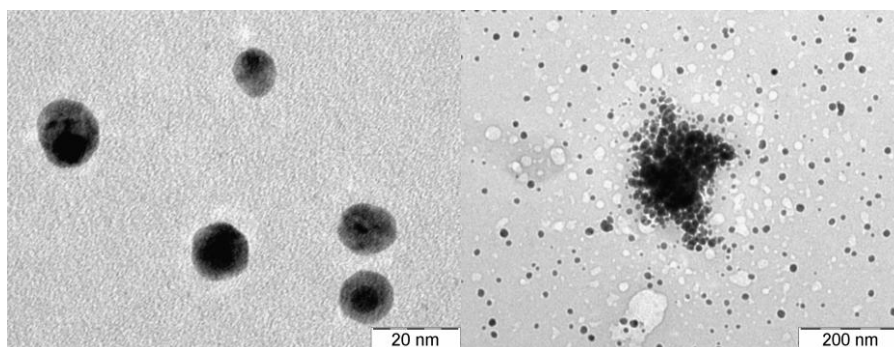
Z grafu na obrázku 5 je patrné, že s rostoucí koncentrací želatiny roste i velikost nanočástic stříbra získaná z měření DLS. U vyšších koncentrací želatiny se velikost pohybuje ve stovkách nanometrů. Tato velikost však neodpovídá získaným UV-VIS spektrům (Obrázek 6), na kterých je patrný charakteristický pík povrchového plazmonu v oblasti 400 nm, který vypovídá o přítomnosti nanočástic stříbra o velikosti přibližně 30 nm. Proto byly připravené nanočástice sledovány i transmisním elektronovým mikroskopem. Vzhledem ke kapacitním důvodům byly pak vybrány vzorky s koncentrací želatiny 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 % w/w.



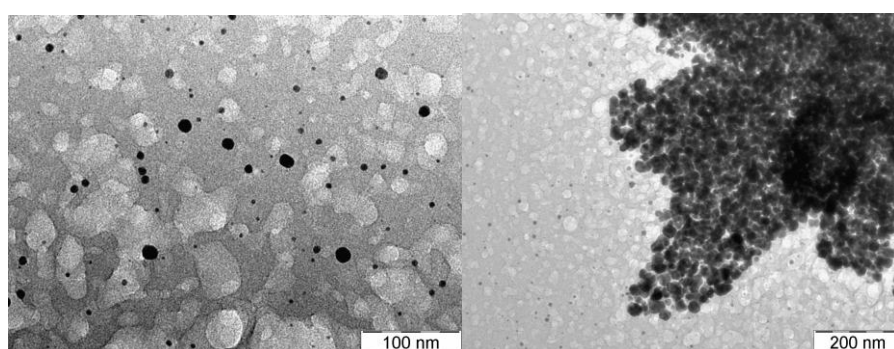
Obrázek 7: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,0001 % w/w



Obrázek 8: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,001 % w/w



Obrázek 9: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,01 % w/w



Obrázek 10: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,01 % w/w

Z pořízených snímků je patrné, že u nižších koncentrací želatiny v systému (Obrázek 7 a 8) jsou velikosti nanočástic stříbra v dobré shodě s výsledky měření velikosti pomocí DLS. U vyšších koncentrací želatiny (Obrázek 9 a 10) je vidět, že želatina způsobuje flokulaci nanočástic do větších celků. Přístroj využívající metody DLS tudíž měří spíše tyto větší útvary (flokuláty), než jednotlivé nanočástice, které dosahují velikosti i pod 20 nm.

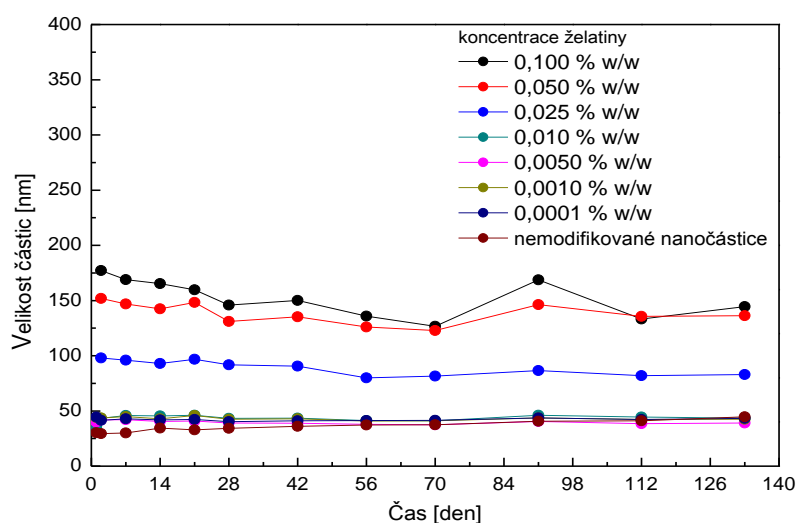
4.3.1 Dlouhodobá stabilita

Pro zjištění chování připravených nanočástic stříbra po delší časový úsek byl jeden z připravených vzorků průběžně sledován v období min. 4 měsíců od přípravy. Jednotlivé vzorky nanočástic byly uschovány v plastových zkumavkách a sledovány v týdenních, čtrnáctidenních a třítýdenních intervalech. Byla sledována velikost částic (pomocí DLS) a UV-VIS spektra. Naměřenou velikost nanočástic demonstruje tabulka 6 a graf 11.

Tabulka 6: Velikost nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro různé koncentrace želatiny v závislosti na čase (době uložení od okamžiku přípravy)

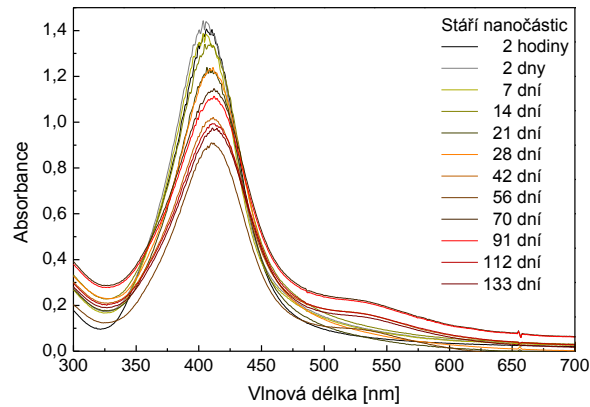
	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001	čistý koloid
den	velikost částic [nm]							
1	x	x	x	36	40	44	44	30,2
2	177	152	98	43	42	43	41	29,5
7	169	147	96	46	42	45	43	30,0
14	165	142	93	45	40	43	42	34,4
21	160	148	96	46	41	46	42	32,9
28	146	131	92	43	39	42	40	34,2
42	150	135	91	43	39	43	41	36,1
56	136	126	80	41	38	41	41	37,2
70	126	123	81	41	37	41	41	37,5
91	169	146	87	46	40	44	44	40,7
112	133	136	81	4	38	42	42	41,0
133	145	136	83	43	39	42	43	44,6

x ... nevzniká disperze nanočástic stříbra

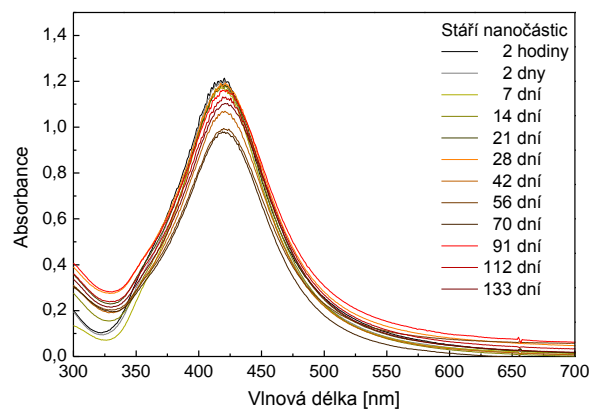


Obrázek 11: Dlouhodobá stabilita velikosti nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro různé koncentrace želatiny

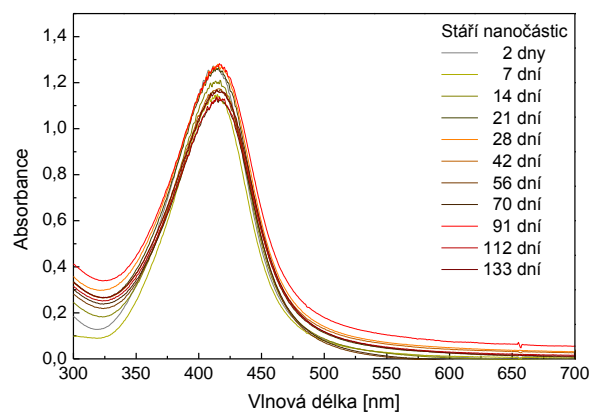
Pro každou koncentraci želatiny byla kromě velikosti částic měřena i UV-VIS spektra. Vzhledem k velké podobnosti spekter pro jednotlivé koncentrace želatiny obrázky 12–15 demonstrují pouze některá vybraná spektra.



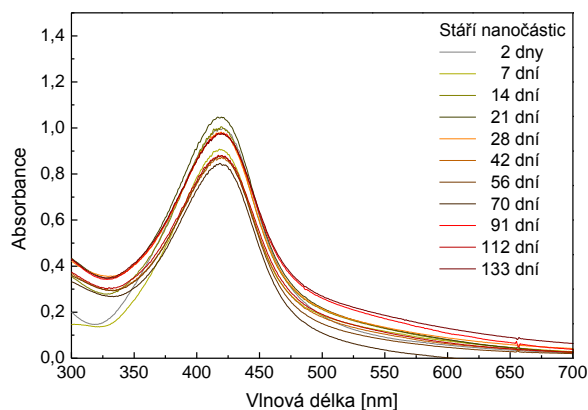
Obrázek 12: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou bez přítomnosti želatiny měřená v závislosti na čase



Obrázek 13: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,0001 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 14: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,025 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 15: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentraci želatiny 0,1 % w/w měřená v závislosti na čase

Z naměřených výsledků vyplývá, že v disperzi nanočástic stříbra nestabilizovaných želatinou dochází k jejich částečné agregaci. Z měření provedených pomocí DLS plyne, že dochází k mírnému nárůstu velikosti nanočástic. V UV-VIS spektru je rovněž patrný pokles absorbance v oblasti primárního maxima (400 nm) a vznik sekundárního maxima v oblasti 540 nm, které lze vysvětlit vznikem malých agregátů (Obrázek 12). U nanočástic stříbra modifikovaných želatinou vykazuje měření DLS poměrně konstantní hodnoty velikosti nanočástic stříbra. Tento fakt potvrzují i příslušná UV-VIS spektra, ve kterých je přítomen pouze primární pík a sekundární nevzniká, což znamená že nanočástice stříbra redukované maltózou a modifikované želatinou jsou stabilní.

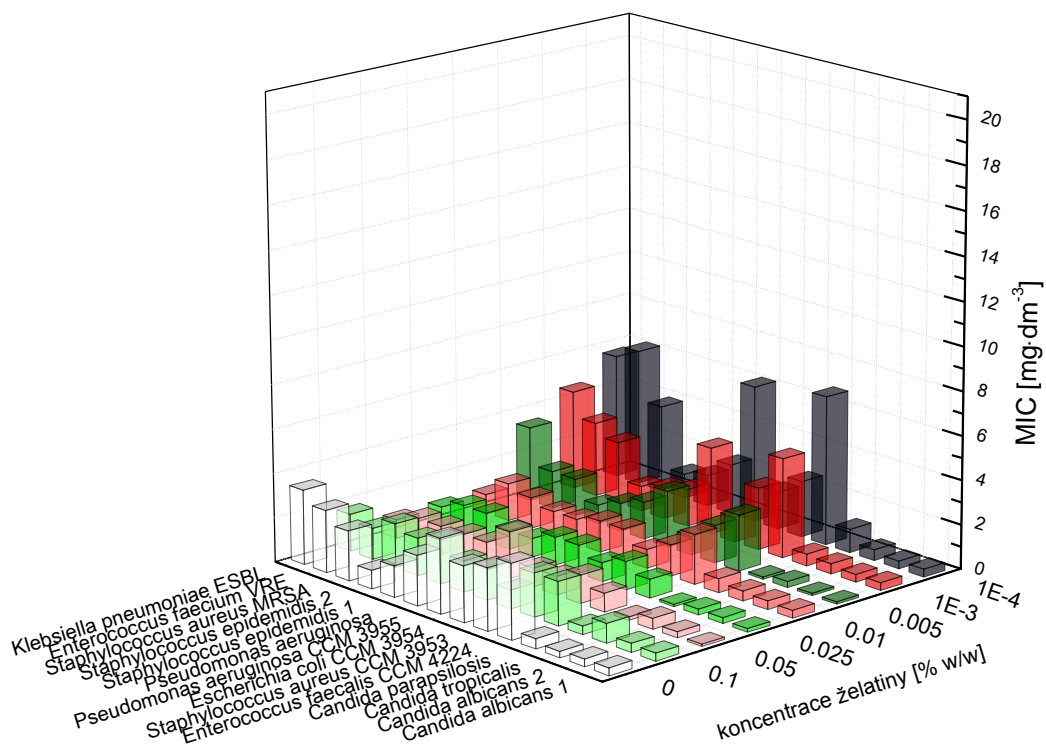
4.3.2 Antibakteriální aktivita

U nanočástic stříbra připravených Tollensovou metodou a modifikovaných želatinou byla sledována jejich antibakteriální aktivita. Pro její kvantifikaci se používá veličina minimální inhibiční koncentrace (MIC) stanovená mikrodiluční metodou. MIC byla stanovena pro nanočástice stříbra staré 6 dní (Tabulka 7) a 70 dní (Tabulka 8). Její hodnoty v tabulce jsou aritmetickým průměrem tří měření.

Tabulka 7: Hodnoty MIC nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro různé koncentrace želatiny měřené 6 dní po přípravě

	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							
	0	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001
kmen	MIC [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]							
Enterococcus faecalis CCM 4224	3,375	1,969	0,844	0,844	2,250	2,532	4,500	6,750
Staphylococcus aureus CCM 3953	2,813	1,969	1,266	1,266	1,407	1,688	2,813	2,531
Escherichia coli CCM 3954	2,531	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	1,125	1,688
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	3,375	1,407	0,844	1,266	1,407	2,532	3,938	6,188
Pseudomonas aeruginosa	2,250	1,407	2,110	1,266	1,407	1,688	1,688	2,250
Staphylococcus epidemidis 1	1,407	1,969	1,266	0,844	1,125	1,266	1,407	1,407
Staphylococcus epidemidis 2	0,844	1,688	1,266	0,844	1,125	0,844	1,125	1,125
Staphylococcus aureus MRSA	2,250	1,969	1,266	1,266	1,407	1,688	2,813	3,938
Enterococcus faecium VRE	2,813	1,407	1,266	1,266	1,688	1,688	3,375	6,188
Klebsiella pneumoniae ESBL	3,375	1,688	0,844	0,844	0,844	3,375	4,500	5,625
Candida albicans 1	0,351	0,351	0,105	0,158	0,351	0,105	0,351	0,351
Candida albicans 2	0,351	0,387	0,264	0,264	0,387	0,105	0,351	0,351
Candida tropicalis	0,281	0,879	0,475	0,264	0,457	0,264	0,457	0,492
Candida parapsilosis	0,457	0,387	0,158	0,105	0,633	0,105	0,528	1,055

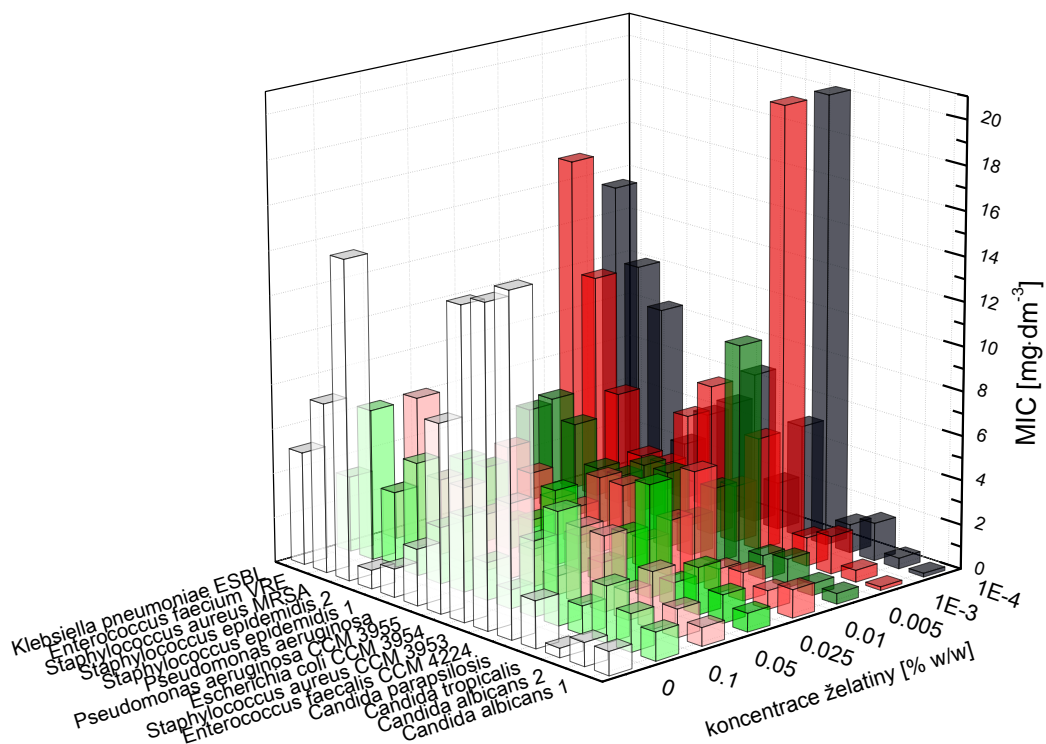
Pro lepší přehlednost získaných výsledků byly z hodnot minimálních inhibičních koncentrací sestaveny 3D histogramy (Obrázek 16 a 17), které demonstrují závislost antibakteriální aktivity nanočástic stříbra na koncentraci želatiny pro jednotlivé testované bakterie a kvasinky.



Obrázek 16: 3D histogram závislosti MIC nanočástic stříbra (6 dní starých) připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou na koncentraci želatiny pro testovací kmeny bakterií a kvasinek

Tabulka 8: Hodnoty MIC nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro různé koncentrace želatiny měřené 70 dní po přípravě

	koncence želatiny v roztoku [% w/w]							
	0	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0001
kmen	MIC [mg·dm⁻³]							
Enterococcus faecalis CCM 4224	15,18	5,063	3,375	5,063	5,063	10,12	20,25	20,25
Staphylococcus aureus CCM 3953	14,34	3,375	3,375	2,532	2,532	3,375	5,063	5,063
Escherichia coli CCM 3954	13,92	0,844	0,844	0,844	1,266	1,688	2,532	2,110
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	8,438	1,688	1,688	1,688	3,375	3,375	6,750	6,750
Pseudomonas aeruginosa	2,532	3,375	3,375	3,375	3,375	3,375	5,063	5,063
Staphylococcus epidemidis 1	1,266	2,532	2,532	1,688	1,688	2,532	2,532	4,219
Staphylococcus epidemidis 2	0,844	5,063	3,375	1,266	1,688	2,532	2,532	2,532
Staphylococcus aureus MRSA	14,34	3,375	3,375	3,375	2,532	4,219	5,063	8,438
Enterococcus faecium VRE	7,594	6,750	6,750	3,375	3,375	5,063	10,12	10,12
Klebsiella pneumoniae ESBL	5,063	3,375	2,110	2,110	2,110	4,219	15,18	13,50
Candida albicans 1	1,055	1,266	0,844	0,844	1,266	0,475	0,158	0,158
Candida albicans 2	1,055	1,688	1,266	1,266	0,844	0,528	0,528	0,475
Candida tropicalis	0,422	2,532	2,532	2,110	1,266	1,266	1,688	1,688
Candida parapsilosis	2,110	1,266	1,266	1,055	1,055	1,055	1,266	1,266



Obrázek 17: 3D histogram závislosti MIC nanočástic stříbra (70 dní starých) připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou na koncentraci želatiny pro testovací kmeny bakterií a kvasinek

Z naměřených hodnot MIC plyne, že antibakteriální aktivita nanočástic stříbra připravených redukcí maltózou s rostoucí koncentrací želatiny roste (nižší MIC). U vyšších koncentrací želatiny je také vidět, že vykazují ve většině případů vyšší aktivitu než nemoifikované nanočástice stříbra (bílá barva v grafech). Na antibakteriální aktivitě se projevuje také stáří nanočástic. U 70 dní starých nanočástic jsou hodnoty MIC přibližně 2–4× větší než hodnoty MIC čerstvých nanočástic stříbra.

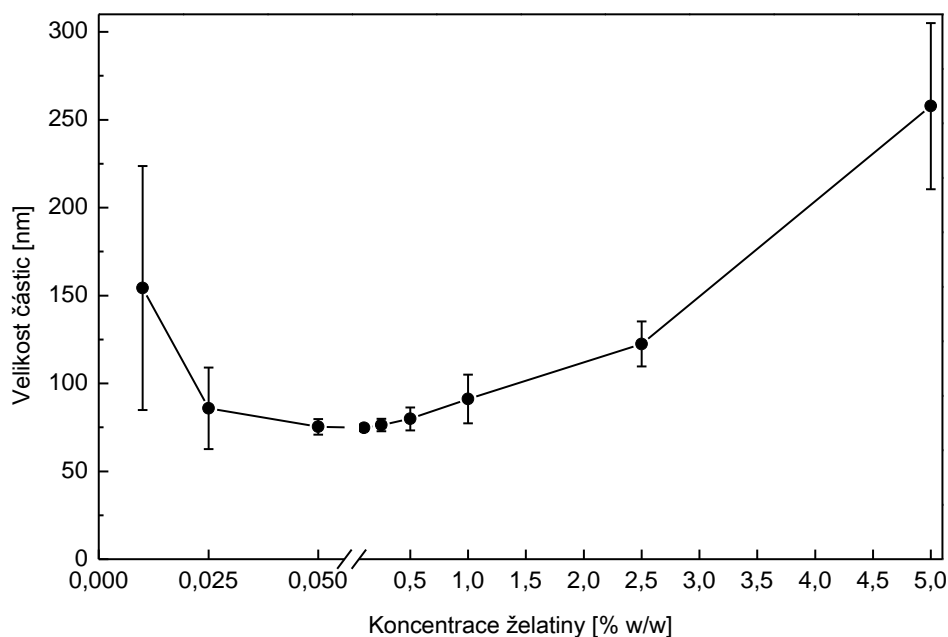
4.4 Redukce askorbovou kyselinou

Další redukční látkou použitou v modifikované Tollensově redukční syntéze byla askorbová kyselina. Její použití bez přítomnosti želatiny v reakčním systému nevedlo ke vzniku stabilních nanočástic stříbra, ale ke vzniku agregátů, které okamžitě sedimentovaly. Stabilní nanočástice byly získány při použití želatiny, jejíž koncentrace v systému byla minimálně 0,01 % w/w (měřeno až do 5 % w/w). Naměřené velikosti nanočástic stříbra pomocí metody DLS ilustruje tabulka 9.

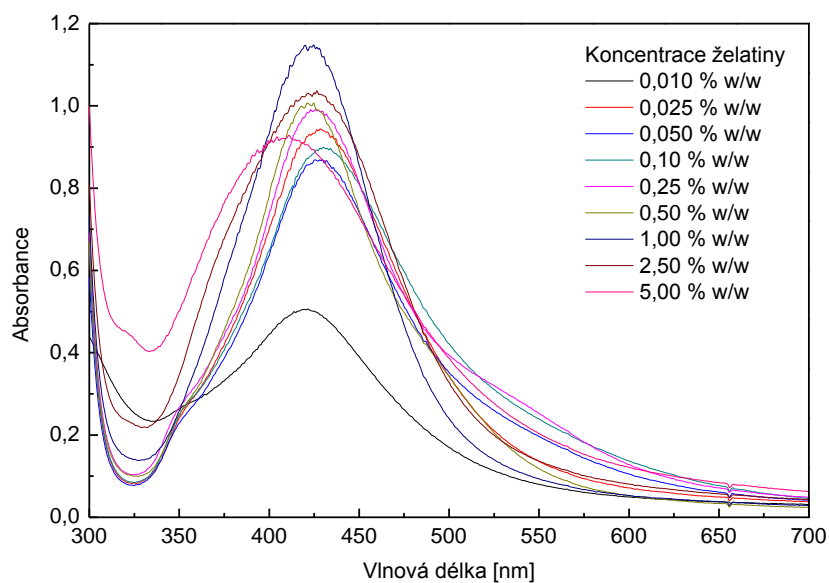
Tabulka 9: Velikost nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro různé koncentrace želatiny v závislosti na čase (době uložení od okamžiku přípravy)

	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]								
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
den	velikost částic [nm]								
1	205	111	72	73	72	74	74	125	266
	279	135	111	90	80	75	81	76	158
	223	109	93	81	80	77	69	74	86
	324	136	88	75	73	72	77	68	107
2	263	115	76	76	75	72	75	102	x
	280	127	110	88	79	76	81	75	79
	327	120	98	87	83	82	66	66	90
	578	156	98	79	76	79	80	71	105
7	222	100	71	71	72	75	77	93	x
	336	126	114	96	81	81	81	77	x
	479	116	107	87	81	81	67	62	84
	466	148	92	66	72	76	74	69	101
14	233	103	69	69	72	73	75	92	x
	339	129	101	89	77	78	78	75	x
	274	108	87	79	73	77	65	60	93
	460	145	88	59	67	71	70	65	81
21	243	110	96	85	74	76	77	73	x
	239	104	81	77	72	76	63	58	92
28	255	109	90	82	72	75	80	70	x
	248	106	78	73	66	66	56	48	78

Askorbová kyselina je dostatečně silnou redukční látkou a obrázek 18 ukazuje závislost velikosti nanočástic stříbra na koncentraci želatiny, měřenou už po dvou hodinách od dokončení syntézy a obrázek 19 příslušná UV-VIS spektra.



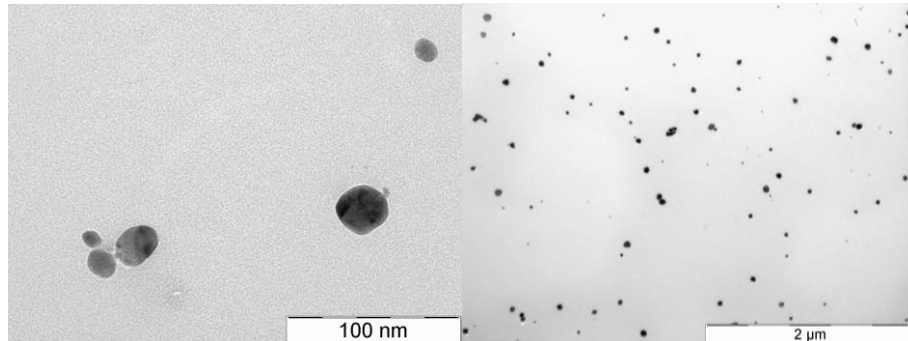
Obrázek 18: Závislost velikosti nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou na koncentraci želatiny (počet měření = 4)



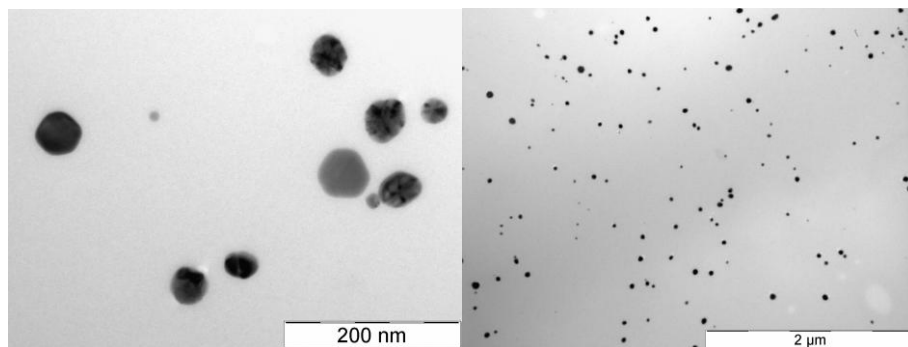
Obrázek 19: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro jednotlivé koncentrace želatiny (měřeno v den přípravy)

Z výsledků měření DLS je patrné, že závislost velikosti nanočástic stříbra má jiný trend než v případě nanočástic redukováných pomocí maltózy. Velikost nanočástic stříbra redukováných askorbovou kyselinou v závislosti na koncentraci želatiny nejprve klesá

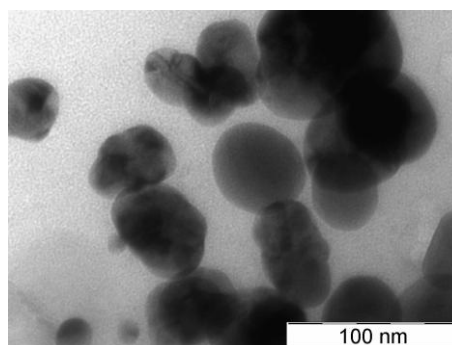
a od koncentrace 0,025 % w/w narůstá. Příslušná UV-VIS spektra však naznačují přítomnost částic menších než je naměřená velikost z DLS, a proto byly od koncentrací 0,01; 0,5; 2,5; 5 % w/w želatiny odebrány vzorky pro transmisní elektronový mikroskop.



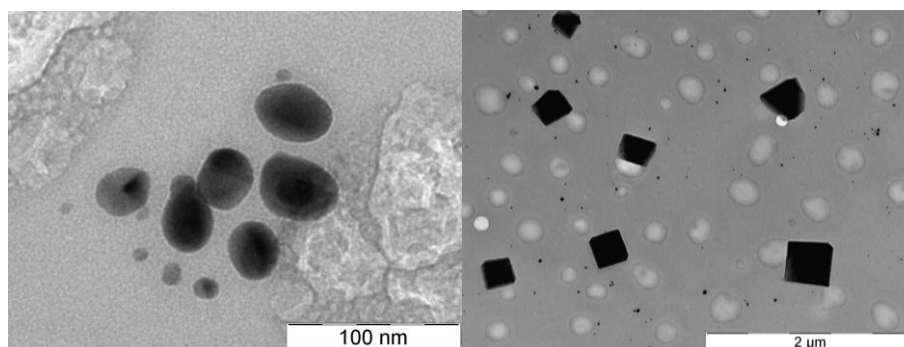
Obrázek 20: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 0,01 % w/w



Obrázek 21: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 0,5 % w/w



Obrázek 22: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 2,5 % w/w



Obrázek 23: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 5 % w/w

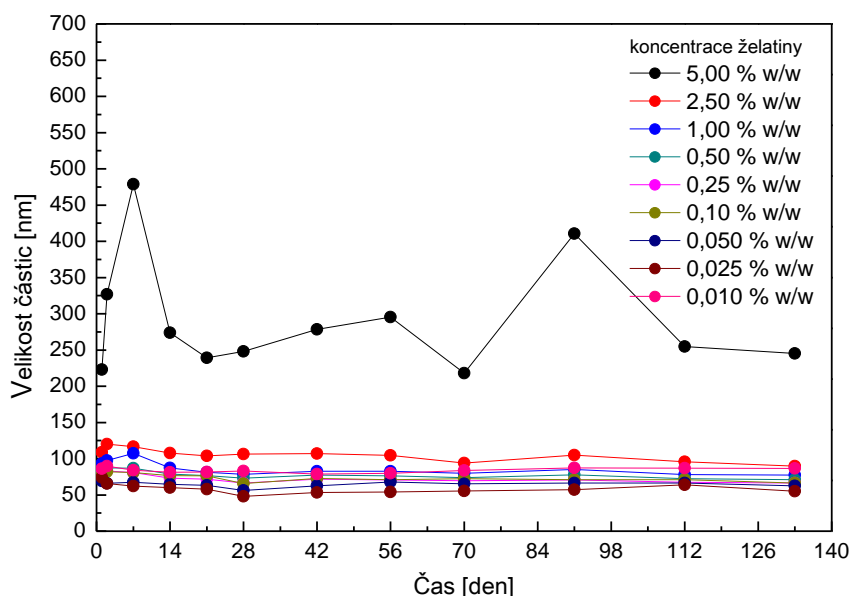
Ze získaných TEM snímků nanočástic stříbra připravených redukcí askorbovou kyselinou je patrné, že velikost naměřená pomocí přístroje DLS nekorresponduje s údaji z příslušných snímků. Na snímcích je vidět, že rostoucí koncentrace želatiny neovlivňuje velikost připravených nanočástic stříbra, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 10–40 nm. Od této velikosti se odchyluje obrázek 23, na kterém jsou patrné čtvercové objekty o velikosti přibližně 400 nm. Pravděpodobně se však nejedná o nanočástice stříbra, ale o krystaly zbytkových chemikálií, které vznikly v průběhu schnutí vzorku naneseného na síťce.

4.4.1 Dlouhodobá stabilita

Stejně jako v případě předchozí redukční látky i nanočástice stříbra připravené redukcí askorbovou kyselinou byly sledovány po delší dobu. Měření v týdenních, čtrnáctidenních a třítydenních intervalech demonstruje tabulka 10 a graf na obrázku 24.

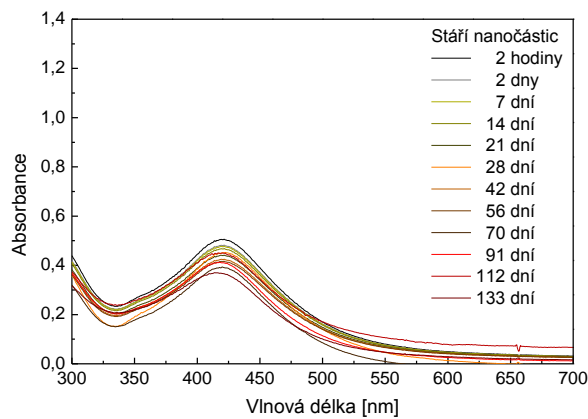
Tabulka 10: Velikost nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro různé koncentrace želatiny v závislosti na čase (době uložení od okamžiku přípravy)

den	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]								
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,001
	velikost částic [nm]								
1	223	108	93	81	80	77	69	74	86
2	326	120	98	87	83	82	66	66	90
7	479	116	107	87	81	81	67	62	84
14	274	108	87	79	73	77	65	60	81
21	239	104	81	77	72	76	63	58	82
28	248	107	78	73	66	66	56	48	83
42	278	107	83	77	72	73	63	53	79
56	295	105	83	76	71	71	68	54	80
70	217	93	80	74	69	73	65	55	84
91	411	105	85	78	71	71	66	57	87
112	255	96	78	72	67	71	66	64	87
133	245	90	77	71	66	67	62,6	55	86

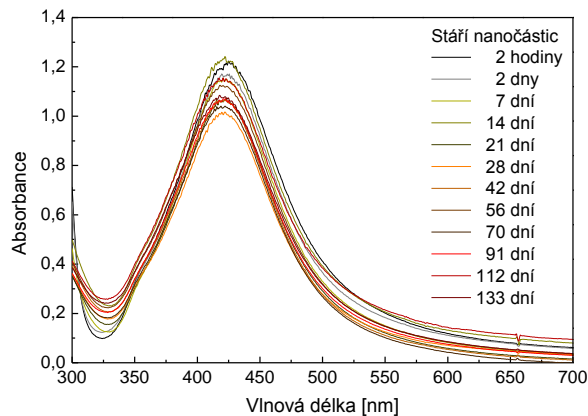


Obrázek 24: Dlouhodobá stabilita velikosti nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro různé koncentrace želatiny

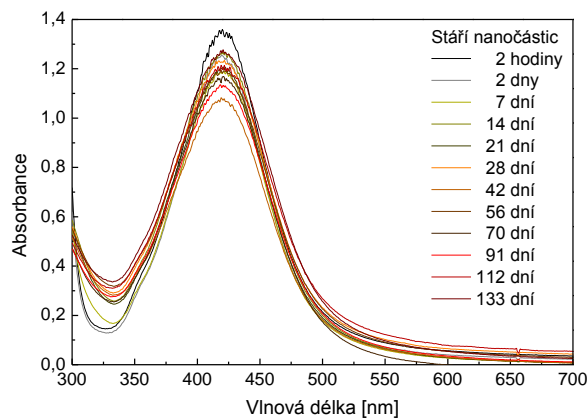
UV-VIS spektra pro vybrané koncentrace želatiny v disperzi nanočástic stříbra připravených redukcí askorbovou kyselinou zobrazují grafy na obrázcích 25–28.



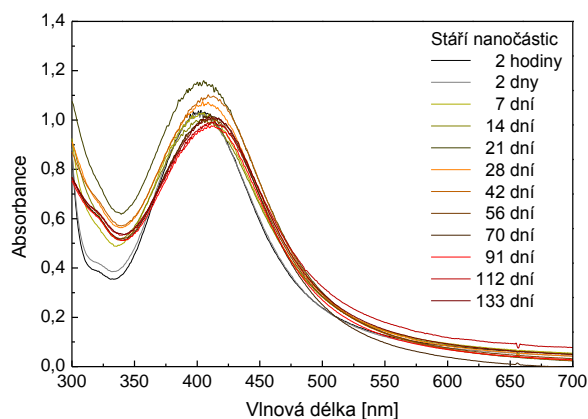
Obrázek 25: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 0,01 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 26: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 0,1 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 27: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 1 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 28: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentraci želatiny 5 % w/w měřená v závislosti na čase

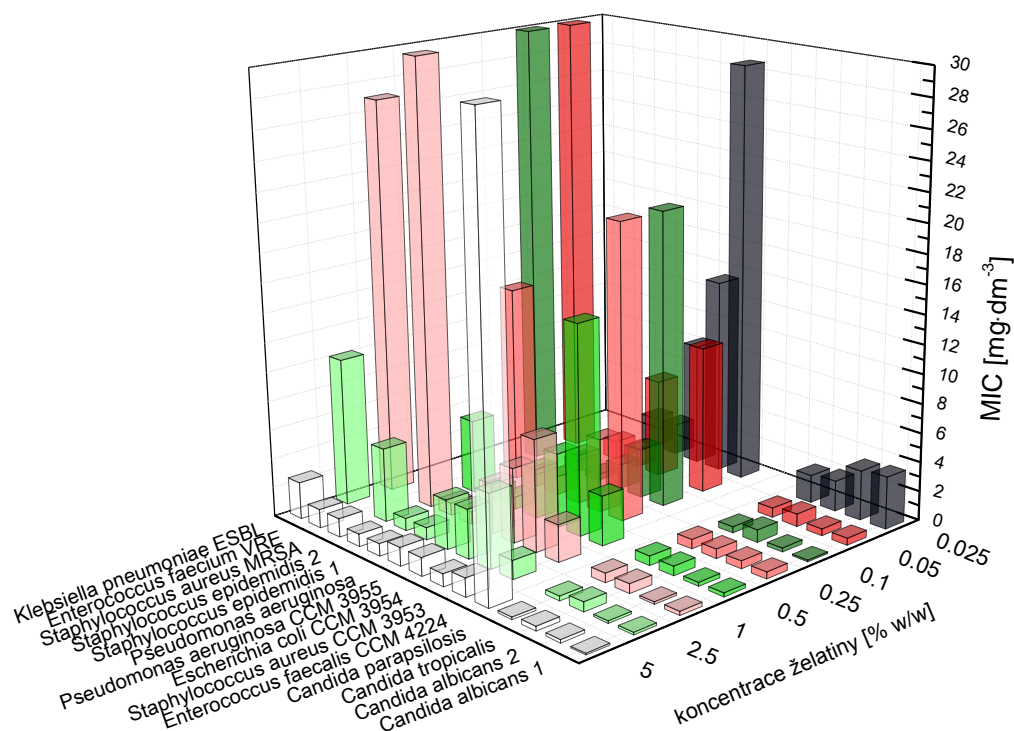
Ze získaných výsledků je vidět, že velikost nanočástic stříbra získaná z DLS má pro jednotlivé koncentrace želatiny v závislosti na čase poměrně konstantní hodnotu. Odlišné chování se vyskytuje u nejvyšší koncentrace želatiny v disperzi nanočástic, u které je patrný kolísavý nárůst a pokles velikosti. Ten je ale pravděpodobně způsoben stárnutím želatiny, při kterém může docházet k různým flokulačním procesům. Naměřená UV-VIS spektra však potvrzují, že disperze nanočástic stříbra je po sledovaný časový úsek 133 dní stabilní, protože ve spektrech není patrný žádný významný pokles absorbance ani vznik sekundárních maxim naznačujících vznik agregátů.

4.4.2 Antibakteriální aktivita

Pomocí mikrodiluční metody byly u připravených nanočástic stříbra zjištěny hodnoty MIC vůči vybraným bakteriálním kmenům. Hodnoty MIC pro čerstvě připravené nanočástice ukazuje tabulka 11 a pro 70 dní staré nanočástice tabulka 12. Jedná se vždy o aritmetický průměr ze 2–3 měření.

Tabulka 11: Hodnoty MIC nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro různé koncentrace želatiny měřené 6 dní po přípravě

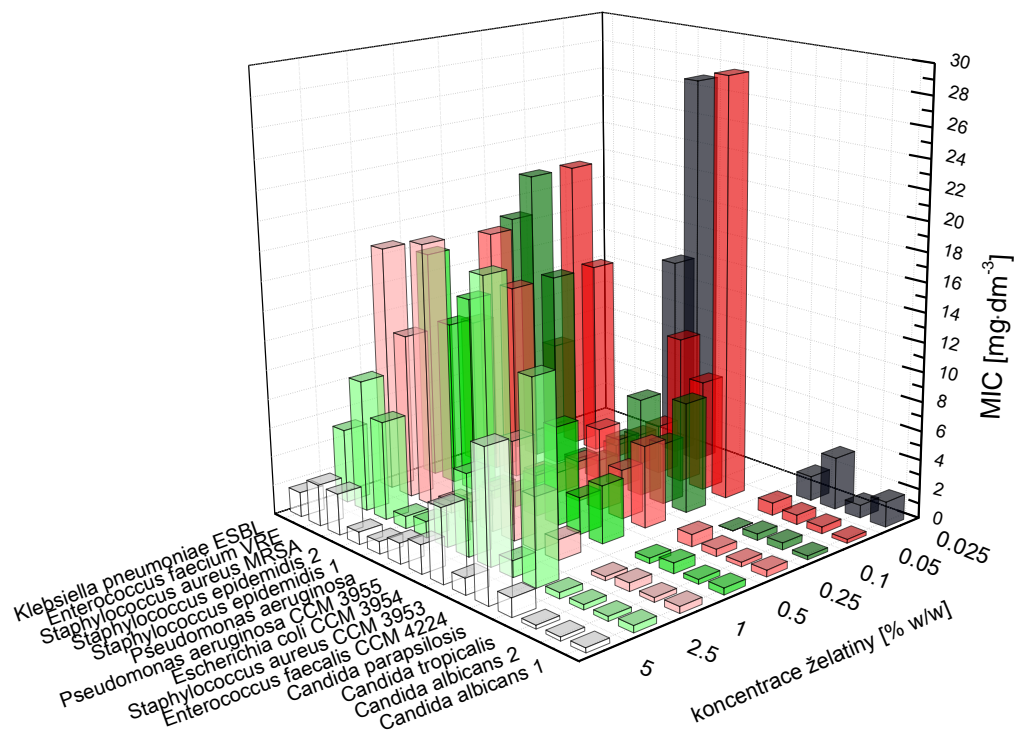
	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025
kmen	MIC [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]							
Enterococcus faecalis CCM 4224	30,38	x	x	x	x	x	x	x
Staphylococcus aureus CCM 3953	1,266	1,266	2,532	3,375	x	x	x	x
Escherichia coli CCM 3954	0,844	5,063	7,594	14,344	20,250	20,25	10,125	28,688
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	1,266	3,375	5,063	5,063	5,063	3,375	x	13,500
Pseudomonas aeruginosa	1,266	3,375	3,375	3,375	3,375	1,688	6,750	8,438
Staphylococcus epidemidis 1	0,844	0,844	0,844	0,844	1,266	0,422	1,266	2,110
Staphylococcus epidemidis 2	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	1,266	2,110
Staphylococcus aureus MRSA	1,266	5,063	30,375	5,063	13,50	x	x	x
Enterococcus faecium VRE	1,266	x	x	x	x	30,375	30,375	x
Klebsiella pneumoniae ESBL	2,532	10,125	27,000	x	x	x	x	x
Candida albicans 1	0,105	0,158	0,264	0,264	0,475	0,105	0,475	3,586
Candida albicans 2	0,211	0,158	0,158	0,264	0,528	0,264	0,475	3,428
Candida tropicalis	0,317	0,633	0,633	0,633	0,633	0,844	0,844	2,110
Candida parapsilosis	0,158	0,317	0,633	0,633	0,633	0,422	0,633	1,899



Obrázek 29: 3D histogram závislosti MIC nanočástic stříbra (6 dní starých) připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou na koncentraci želatiny pro testovací kmeny bakterií a kvasinek

Tabulka 12: Hodnoty MIC nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro různé koncentrace želatiny měřené 70 dní po přípravě

	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025
kmen	MIC [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]							
Enterococcus faecalis CCM 4224	10,12	13,50	x	x	x	x	x	x
Staphylococcus aureus CCM 3953	1,125	1,125	1,407	3,938	5,625	7,594	28,68	x
Escherichia coli CCM 3954	5,063	18,84	3,656	2,531	3,375	4,219	7,594	x
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	1,969	5,625	6,750	6,750	5,625	6,750	10,12	x
Pseudomonas aeruginosa	1,407	2,813	2,813	2,813	2,813	3,375	3,375	27,00
Staphylococcus epidemidis 1	0,844	1,125	1,407	1,125	1,407	1,266	2,110	13,92
Staphylococcus epidemidis 2	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	x
Staphylococcus aureus MRSA	2,813	6,750	18,00	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50
Enterococcus faecium VRE	2,813	9,000	11,25	11,25	16,88	20,25	20,25	x
Klebsiella pneumoniae ESBL	1,688	5,063	16,88	15,75	10,12	16,88	6,750	x
Candida albicans 1	0,316	0,457	0,457	0,457	0,457	0,264	0,264	1,740
Candida albicans 2	0,246	0,316	0,316	0,316	0,316	0,475	0,475	0,897
Candida tropicalis	0,246	0,352	0,563	0,703	0,492	0,422	0,633	3,586
Candida parapsilosis	1,301	0,495	0,352	0,422	0,985	0,633	1,055	1,899



Obrázek 30: 3D histogram závislosti MIC nanočástic stříbra (70 dní starých) připravených redukcí $[Ag(NH_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou na koncentraci želatiny pro testovací kmeny bakterií a kvasinek

Ze získaných hodnot MIC je patrné že antibakteriální aktivita nanočástic stříbra připravených redukcí askorbovou kyselinou je poměrně malá, ale s rostoucí koncentrací želatiny vzrůstá (nejnižší hodnoty MIC u 5 % w/w želatiny). U některých bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*) a kvasinek jsou hodnoty MIC dostačující v celém koncentračním rozmezí želatiny v disperzi, ale u většiny kmenů dochází s klesající koncentrací želatiny k růstu hodnot MIC, případně nanočástice stříbra neinhibují růst patogenů vůbec. Co se týče vlivu stáří nanočástic stříbra, tak v řadě případů dochází ke zlepšení antibakteriální aktivity (nižší hodnoty MIC) u 70 dní starých nanočástic oproti čerstvým, což je zcela opačný jev než byl pozorován u nanočástic připravených redukcí maltózou.

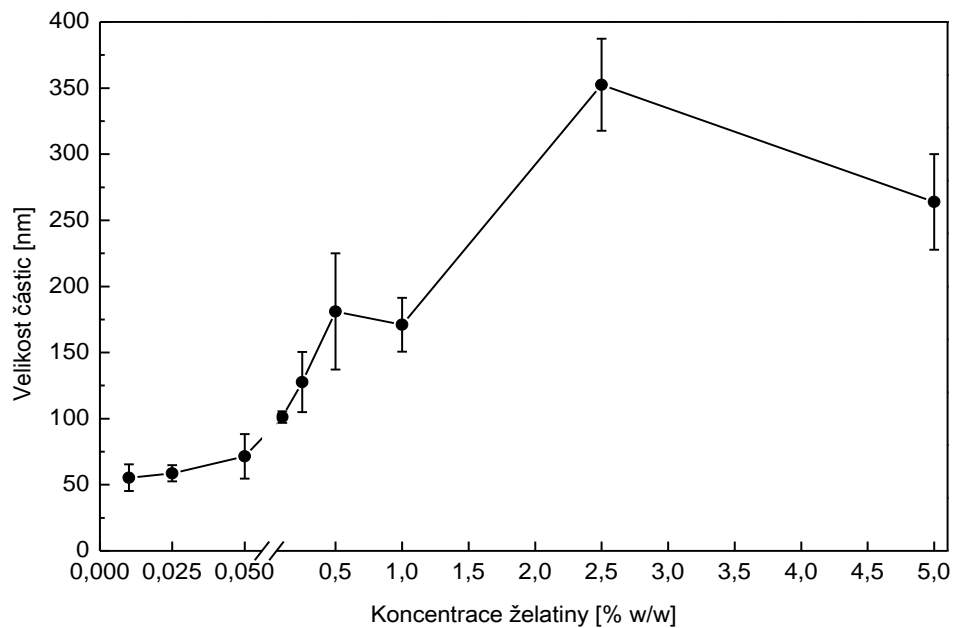
4.5 Redukce tetrahydridoboritanem sodným

Poslední redukční látkou použitou v Tollensově postupu je tetrahydridoboritan sodný. Nanočástice stříbra připravené pomocí této látky bez přítomnosti želatiny dosahovaly velikosti kolem 30 nm, tento systém ovšem nebyl stabilní a nanočástice do druhého dne zagregovaly. Při použití želatiny vznikly nanočástice v celém jejím použitém koncentračním rozmezí (0,0001–5 % w/w), ale 3 nejnižší koncentrace želatiny vykazovaly stejné chování jako nemodifikované nanočástice – zagregovaly do druhého dne. Z toho plyne, že nanočástice jsou stabilní při stabilizaci želatinou v koncentračním rozmezí od 0,01 do 5 % w/w. Ovšem u koncentrace 0,01 % w/w došlo druhý den zhruba k desetinásobnému zvětšení velikosti, takže stabilizace není ani v tomto případě dokonalá. Tabulka 13 ilustruje naměřené hodnoty velikosti částic pomocí DLS.

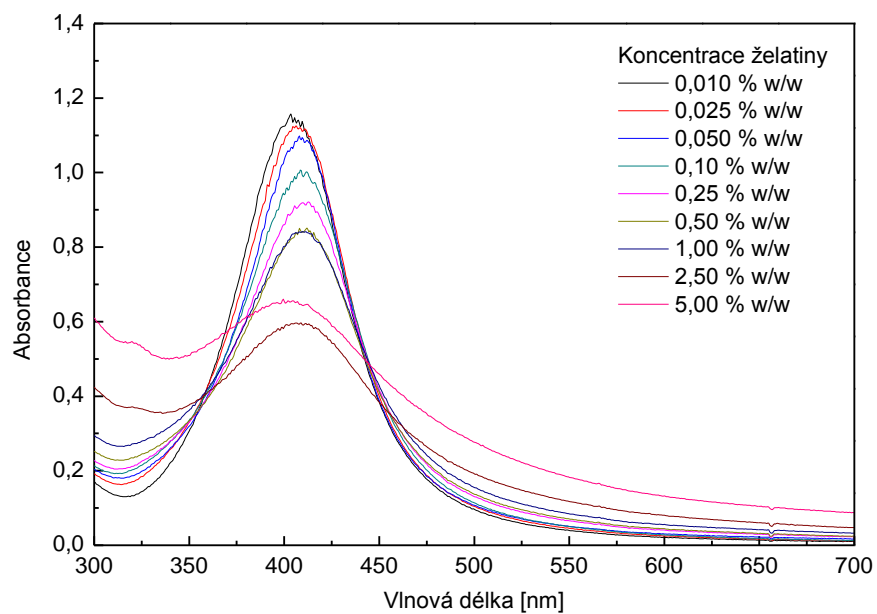
Tabulka 13: Velikost nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro různé koncentrace želatiny v závislosti na čase (době uložení od okamžiku přípravy)

	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]								
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
den	velikost částic [nm]								
1	235	380	192	217	133	107	93	68	49
	238	295	181	232	163	95	65	57	42
	258	379	138	134	105	99	80	58	67
	325	356	173	141	110	103	48	51	63
2	159	295	155	160	105	67	47	38	562
	244	250	144	161	130	73	47	38	653
	208	287	143	139	99	89	65	56	77
	303	375	195	148	75	71	45	47	455
7	114	215	105	107	89	59	48	38	461
	159	178	109	117	95	50	37	36	431
	147	202	96	100	74	73	63	63	842
	308	299	141	110	68	53	42	48	334
14	110	190	102	90	73	50	42	38	382
	174	160	85	110	94	50	40	37	331
	147	183	90	86	71	67	57	56	877
	299	282	136	100	66	52	39	40	309
21	96	173	88	86	74	50	43	37	312
	151	149	83	109	98	49	38	37	220
28	97	160	88	85	74	55	42	37	290
	150	142	85	103	108	48	34	36	278

Rostoucí závislost velikosti nanočástic na koncentraci želatiny demonstruje obrázek 31 a příslušná UV-VIS spektra obrázek 32.

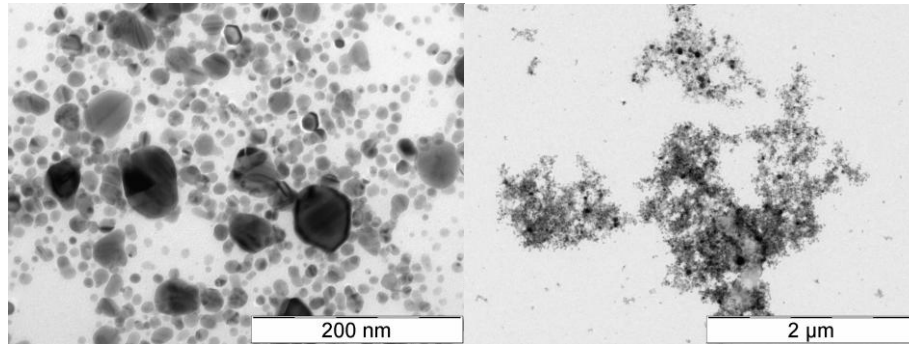


Obrázek 31: Závislost velikosti nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným na koncentraci želatiny (počet měření = 4)

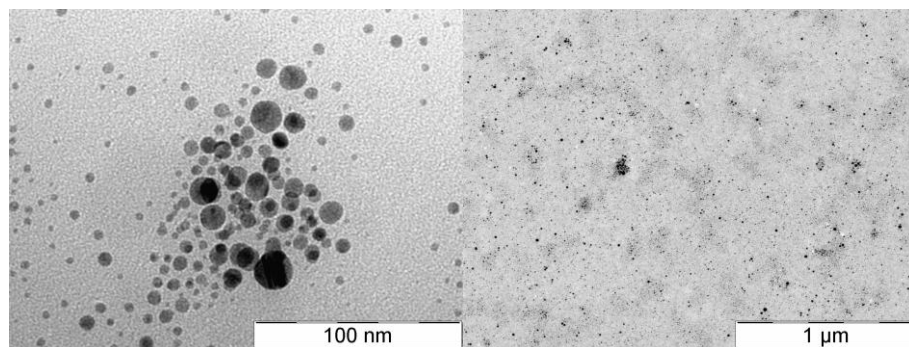


Obrázek 32: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro jednotlivé koncentrace želatiny (měřeno v den přípravy)

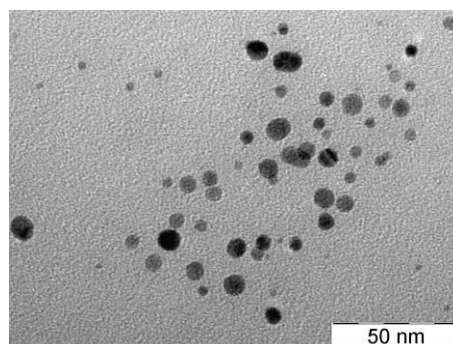
I v případě redukce pomocí tetrahydridoboritanu sodného je patrné, že velikost nanočástic stříbra získaná z DLS není ve shodě s reálnou velikostí. Příslušná UV-VIS spektra totiž vzhledem k přítomnosti píku v oblasti 400 nm naznačují přítomnost nanočástic stříbra s přibližnou velikostí 30 nm. Proto byly některé vzorky nanočástic stříbra (koncentrace želatiny 0,01; 0,05; 0,25; 1 ;5 % w/w) zkoumány transmisním elektronovým mikroskopem.



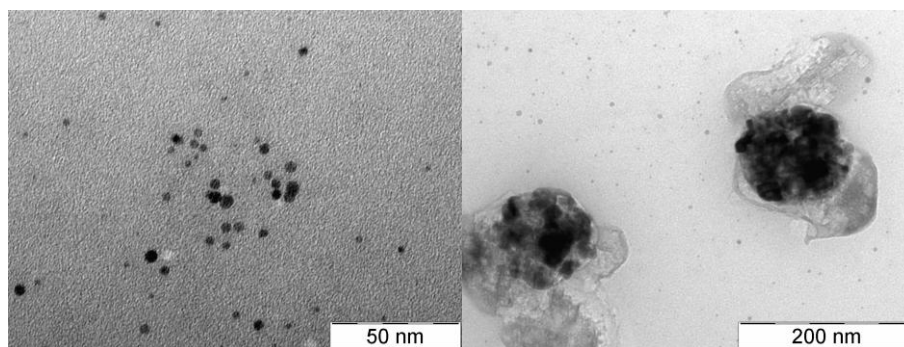
Obrázek 33: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 0,01 % w/w



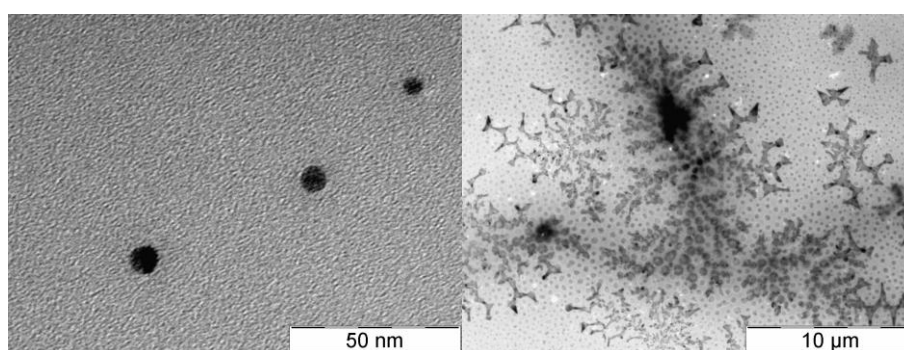
Obrázek 34: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 0,05 % w/w



Obrázek 35: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 0,25 % w/w



Obrázek 36: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 1 % w/w



Obrázek 37: TEM snímky nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 5 % w/w

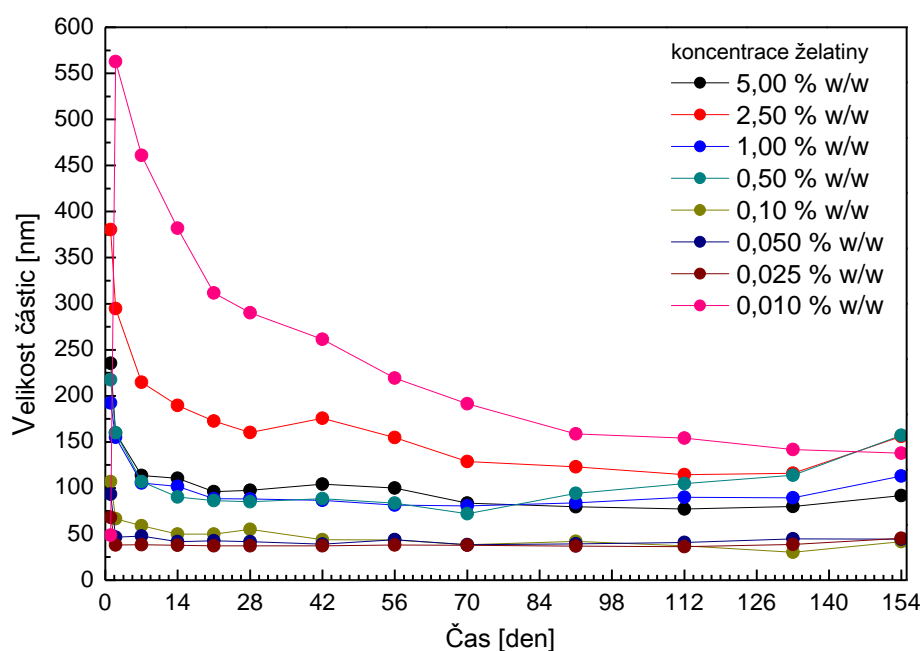
Je patrné, že měření velikosti částic pomocí DLS opět nekoresponduje se snímky z mikroskopu. U koncentrace želatiny 0,01 % w/w (Obrázek 33) se v systému nachází částice o velikosti přibližně 10–40 nm, které jsou spojené do mikrometrových celků (tyto celky vznikají na síťce pravděpodobně v důsledku schnutí disperze). Od koncentrace 0,05 % w/w jsou nanočástice v systému poměrně dobře rozptýlené a mají velikost přibližně 5–20 nm, což je přibližně pětkrát menší údaj, než u měření DLS. Od 1 % w/w se objevují rozměrné flokuláty nanočástic řádově v mikrometrových rozměrech. Kvůli těmto objektům DLS zanedbává frakci velmi malých částic a udává velikost přibližně 100–300 nm.

4.5.1 Dlouhodobá stabilita

Jako v předchozích případech byla z výchozích experimentů vybrána jedna sada vzorků. Příslušné vzorky stříbra byly uschovány a sledovány po delší časový úsek – pět měsíců. Naměřené velikosti částic ukazuje tabulka 14 a graf na obrázku 38.

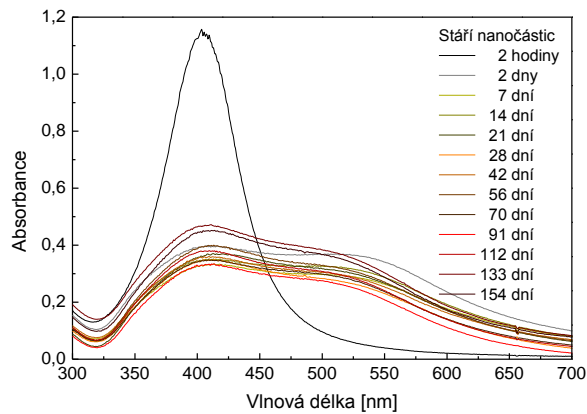
Tabulka 14: Velikost nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridboritanem sodným pro různé koncentrace želatiny v závislosti na čase (době uložení od okamžiku přípravy)

den	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]								
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
	velikost částic [nm]								
1	235	380	192	217	133	107	93	68	49
2	159	295	155	160	105	67	47	38	563
7	114	215	105	107	89	59	48	38	461
14	111	190	102	90	73	50	42	38	382
21	96	173	88	86	74	50	43	37	312
28	97	160	88	85	74	55	42	34	290
42	104	176	86	88	80	44	39	37	261
56	100	155	81	84	80	44	44	38	219
70	84	128	80	72	92	37	39	38	191
91	80	123	84	94	133	42	39	36	158
112	77	115	90	105	183	37	41	36	154
133	80	116	89	114	249	30	45	39	142
154	92	155	113	157	468	42	45	45	138

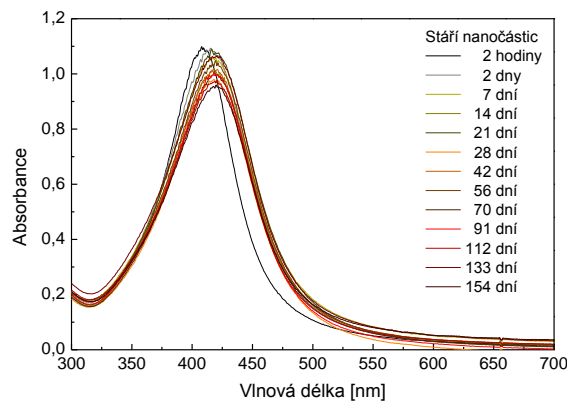


Obrázek 38: Dlouhodobá stabilita velikosti nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridboritanem sodným pro různé koncentrace želatiny

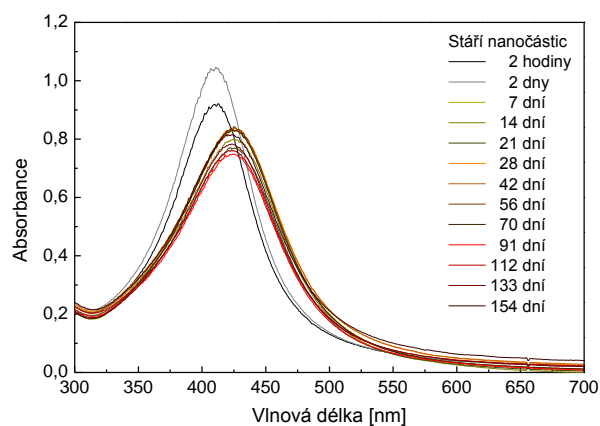
Příslušná UV-VIS spektra pro některé vybrané koncentrace želatiny v systému demonstrují obrázky 39–43.



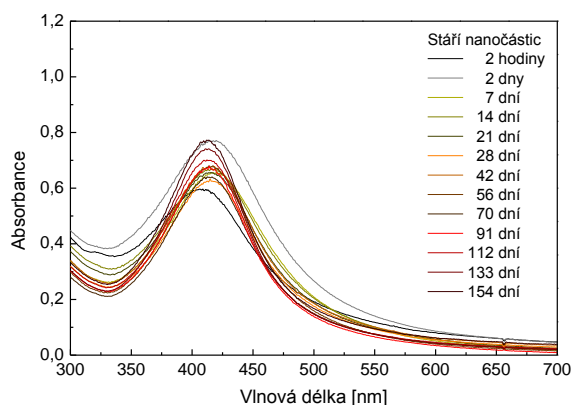
Obrázek 39: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 0,01 % w/w měřená v závislosti na čase



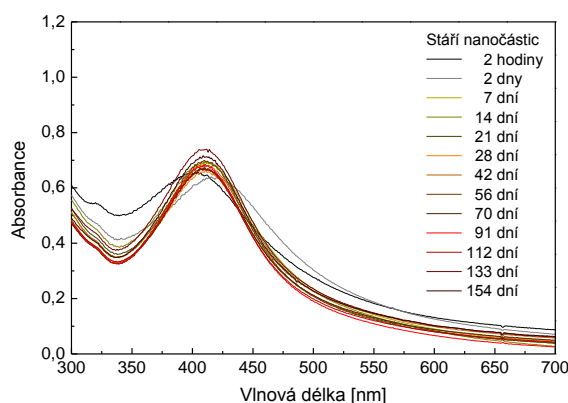
Obrázek 40: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 0,05 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 41: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 0,25 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 42: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 2,5 % w/w měřená v závislosti na čase



Obrázek 43: UV-VIS spektra nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentraci želatiny 5 % w/w měřená v závislosti na čase

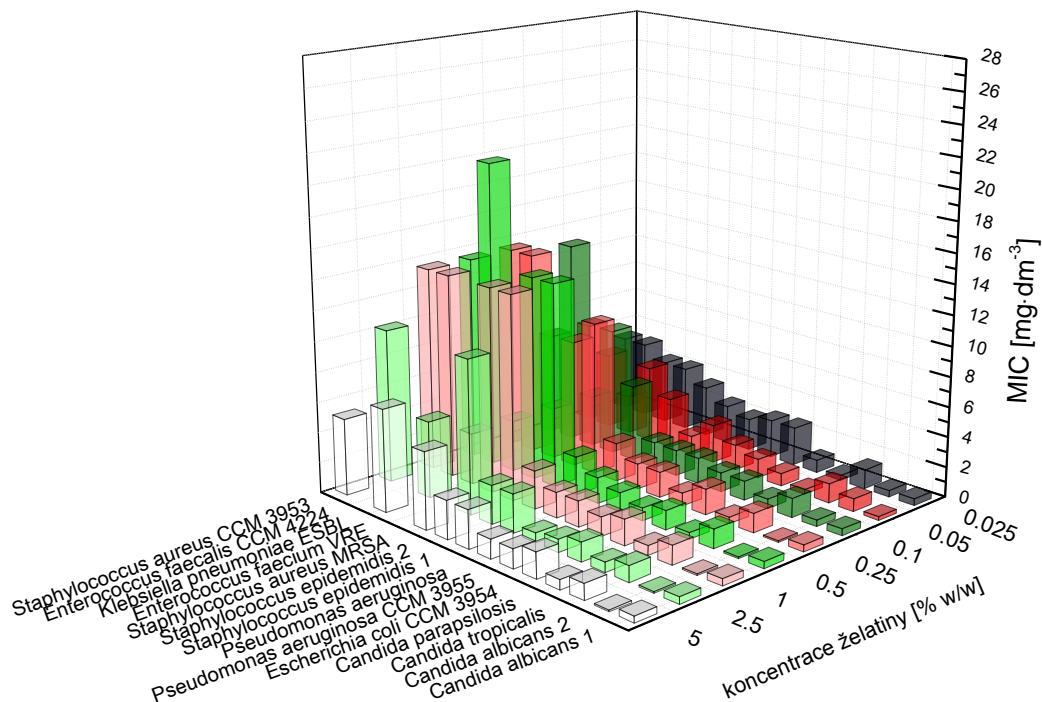
Z jednotlivých UV-VIS spekter je patrné, že sledované nanočástice jsou v časovém úseku 154 dní stabilní, i když u měření DLS je patrný nárůst velikosti částic např. u koncentrace 0,25 % w/w. Zásadní změny ve spektrech nastaly u koncentrace 0,01 % w/w (Obrázek 39), kde došlo druhý den přibližně k trojnásobnému poklesu absorbance u primárního maxima ve 400 nm a vzniku sekundárního v oblasti přibližně 530 nm. To je velmi pravděpodobně způsobeno vznikem malých agregátů obsahujících několik málo nanočástic stříbra, pro něž je maximum absorpce v této oblasti spektra typické. Je také vidět že přítomnost želatiny ovlivňuje redukční proces. U nanočástic stříbra s koncentrací želatiny 0,1–5,0 % w/w dohází k posunu absorpčních maxim a změně absorbance u UV-VIS spekter změřených po 2 hodinách a druhý den oproti ostatním spektrům, což naznačuje, že želatina zpomaluje redukcí nanočástic a redukční proces je dokončen až v průběhu prvního týdne od přípravy nanočástic.

4.5.2 Antibakteriální aktivita

Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) stanovené mikrodiluční metodou u nanočástic stříbra připravených Tollensovou metodou a modifikovaných želatinou pro 6 dní staré nanočástice stříbra zobrazuje tabulka 15 a pro 70 dní staré nanočástice tabulka 16. Hodnoty v tabulkách jsou získány jako aritmetický průměr z 2–3 měření.

Tabulka 15: Hodnoty MIC nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro různé koncentrace želatiny měřené 6 dní po přípravě

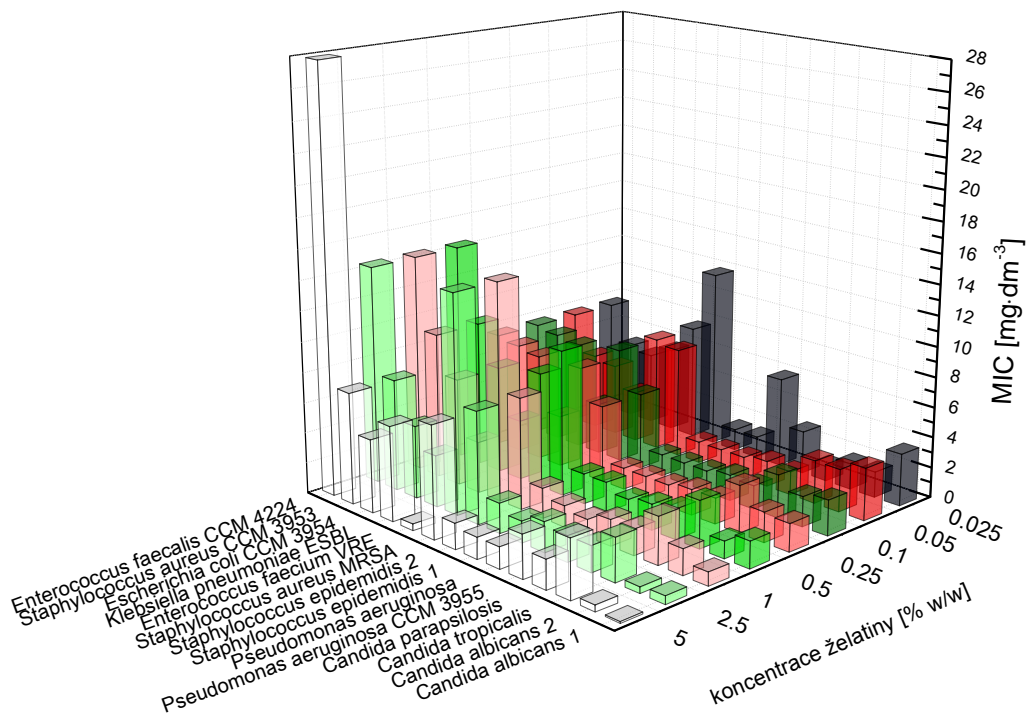
	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,25
kmen	MIC [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]							
Enterococcus faecalis CCM 4224	x	x	13,50	20,25	13,50	13,50	5,063	5,063
Staphylococcus aureus CCM 3953	5,063	10,12	13,50	13,50	13,50	6,750	6,750	5,063
Escherichia coli CCM 3954	1,688	1,266	1,688	1,266	1,688	1,266	0,844	0,844
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	1,266	0,844	1,266	0,844	0,844	1,266	1,266	2,532
Pseudomonas aeruginosa	1,266	0,633	1,688	1,266	1,688	1,688	1,688	2,532
Staphylococcus epidemidis 1	2,532	2,532	1,688	1,688	1,688	1,688	2,532	2,110
Staphylococcus epidemidis 2	2,532	2,532	2,532	2,532	2,532	1,688	1,266	2,532
Staphylococcus aureus MRSA	5,063	10,12	13,50	13,50	10,12	5,063	3,375	3,375
Enterococcus faecium VRE	x	x	13,50	13,50	8,438	8,438	5,063	4,219
Klebsiella pneumoniae ESBL	6,750	5,063	3,375	3,375	3,375	3,375	2,532	4,219
Candida albicans 1	0,422	0,449	0,449	0,449	0,449	0,449	0,238	0,449
Candida albicans 2	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,422	0,844	0,422
Candida tropicalis	1,055	1,055	1,266	1,266	1,266	1,266	1,266	1,266
Candida parapsilosis	0,633	0,633	0,633	0,422	0,422	0,633	0,317	0,317



Obrázek 44: 3D histogram závislosti MIC nanočástic stříbra (6 dní starých) připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným na koncentraci želatiny pro testovací kmeny bakterií a kvasinek

Tabulka 16: Hodnoty MIC nanočástic stříbra připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro různé koncentrace želatiny měřené 70 dní po přípravě

kmen	koncentrace želatiny v roztoku [% w/w]							
	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025
Enterococcus faecalis CCM 4224	27,84	14,34	14,34	14,34	7,594	7,594	7,594	7,594
Staphylococcus aureus CCM 3953	7,313	7,313	9,563	9,563	7,313	7,313	5,063	5,063
Escherichia coli CCM 3954	4,781	4,781	7,031	7,031	7,031	7,031	4,781	4,781
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955	2,813	1,688	1,688	1,688	1,688	1,688	1,688	2,813
Pseudomonas aeruginosa	1,407	1,969	1,125	1,407	1,407	1,407	1,407	5,906
Staphylococcus epidemidis 1	1,407	1,407	1,407	1,969	1,407	1,407	1,407	1,407
Staphylococcus epidemidis 2	1,688	1,969	1,969	1,969	1,407	1,407	1,407	1,407
Staphylococcus aureus MRSA	7,313	7,313	7,313	9,563	5,063	5,063	7,313	11,81
Enterococcus faecium VRE	0,422	14,34	14,34	7,594	7,172	7,594	7,594	7,594
Klebsiella pneumoniae ESBL	6,188	3,375	3,375	3,938	3,375	3,375	3,375	5,625
Candida albicans 1	0,105	0,528	0,879	1,758	1,828	2,320	3,445	3,445
Candida albicans 2	0,422	0,422	1,688	1,125	1,969	1,969	2,813	1,688
Candida tropicalis	3,797	2,813	3,094	3,094	3,094	2,813	2,813	1,688
Candida parapsilosis	1,899	1,688	1,688	1,969	1,688	1,547	1,547	0,985



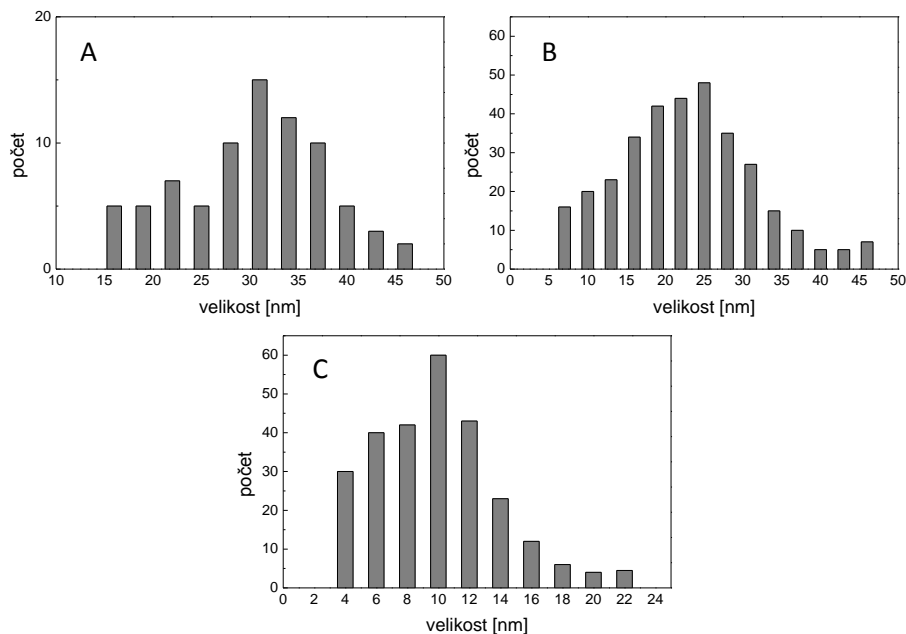
Obrázek 45: 3D histogram závislosti MIC nanočástic stříbra (70 dní starých) připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným na koncentraci želatiny pro testovací kmeny bakterií a kvasinek

Z grafů 44 a 45 je patrné, že hodnoty MIC pro nanočástice stříbra připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným a modifikované želatinou jsou pro většinu testovacích mikroorganismů nezávislé na koncentraci želatiny. U bakterií *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953 jsou výsledky kolísavé a ukazují, že lépe působí disperze s nižší koncentrací želatiny. Co se týče rozdílu mezi 6 a 70 dní starými nanočásticemi stříbra je vidět, že dochází k poměrně malému zvýšení MIC u starších nanočástic stříbra. Toto zvýšení MIC není tak výrazné jako v případě použití maltózy (Kapitola 4.3.2).

5 DISKUZE

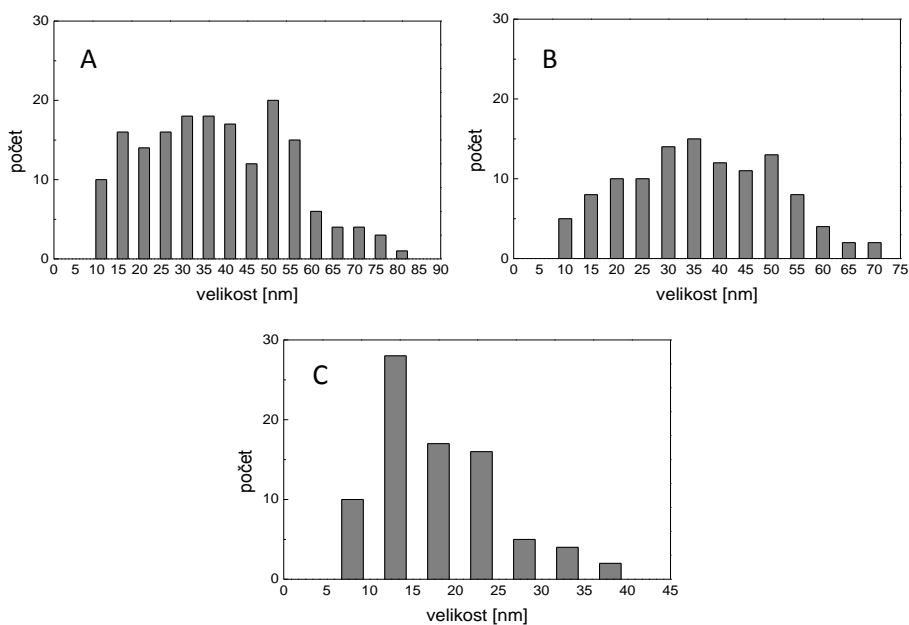
V rámci této diplomové práce byl zkoumán vliv želatiny na přípravu nanočástic stříbra pomocí modifikované Tollensovy metody a také vliv na vlastnosti nanočástic při použití různých redukčních látek použitých v této syntéze. Z redukujících látek byly použity následující – maltóza, askorbová kyselina, tetrahydridoboritan sodný, formaldehyd, sorbitol, hydrazin hydrát a Dimezon S. Stabilní nanočástice stříbra se podařilo připravit pouze při použití maltózy, tetrahydridoboritanu sodného a kyseliny askorbové. Koncentrační rozmezí želatiny pro stabilní nanočástice bylo 0,0001–0,1 % w/w pro redukci nanočástic pomocí maltózy a 0,01–5 % w/w pro redukci tetrahydridoboritanem sodným a askorbovou kyselinou. U připravených nanočástic stříbra byla sledovaná velikost částic (DLS, TEM), UV-VIS spektra a antibakteriální aktivita (MIC).

Při porovnání velikosti nanočástic stříbra získaných z DLS se snímky z transmisního elektronového mikroskopu se ukázalo, že si navzájem neodpovídají. Měření DLS bylo korigováno na viskozitu jednotlivých vzorků (Kapitola 4.1), takže z DLS pozorovaný nárůst velikosti nanočástic s rostoucí koncentrací želatiny nemůže být způsoben růstem viskozity. Vzhledem k těmto nesrovnalostem byla za pomoci programu GWYDDION (verze 2.23) provedena z TEM snímků obrazová analýza distribuce velikosti nanočástic stříbra. Tato analýza samozřejmě nevyhodnocuje distribuci se stoprocentní přesností vzhledem k přítomnosti šumu, neostroti a artefaktů na snímku, ale oproti měření velikosti pomocí DLS má vyšší vypovídající hodnotu. Distribuci velikosti nanočástic stříbra demonstrují obrázky 46, 47 a 48.



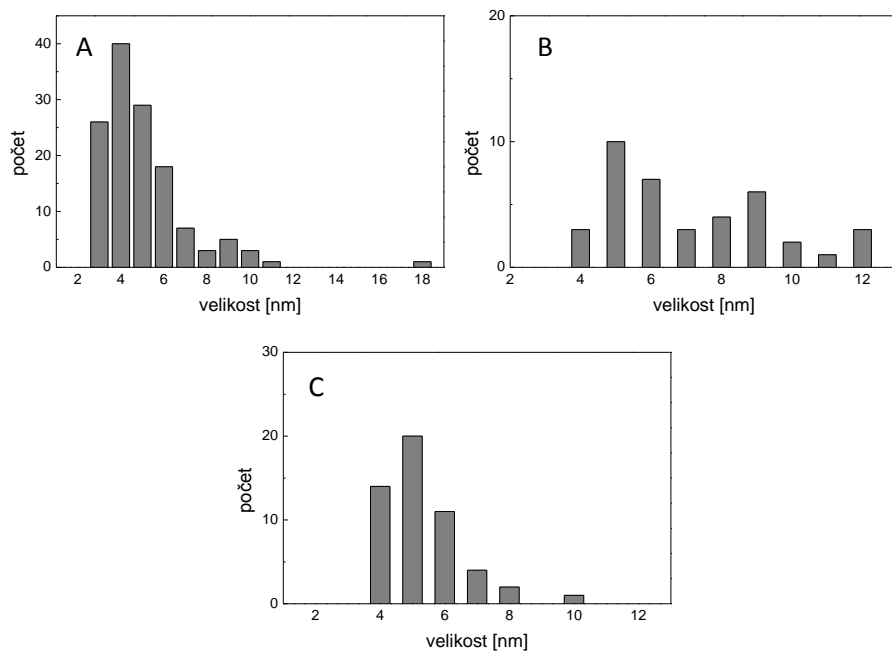
Obrázek 46: Distribuční diagramy velikosti nanočástic připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou pro koncentrace želatiny 0,0001 (A); 0,001 (B); 0,01 % w/w (C)

V případě redukce nanočástic stříbra maltózou velikost v závislosti na koncentraci želatiny v disperzi klesá. Z obrazové analýzy plyne, že pro koncentraci želatiny 0,0001 % w/w jsou v disperzi majoritně zastoupeny nanočástice o velikosti 27–34 nm (z DLS 44,1 nm). Pro koncentraci 0,001 % w/w jsou přítomny nanočástice stříbra o velikosti 16–27 nm (z DLS 46,9 nm) a pro koncentraci 0,01 % w/w o velikosti 5–14 nm (z DLS 59,9).



Obrázek 47: Distribuční diagramy velikosti nanočástic připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ askorbovou kyselinou pro koncentrace želatiny 0,025 (A); 0,5 (B); 5 % w/w (C)

V případě použití askorbové kyseliny jako redukující látky je situace podobná jako v případě maltózy. Velikost nanočástic stříbra v závislosti na rostoucí koncentraci želatiny klesá. Disperze nanočástic při koncentraci želatiny 0,025 % w/w obsahuje částice o velikosti 15–55 nm (z DLS 85,9 nm), při koncentraci 0,5 % w/w také 15–55 nm (z DLS 79,8 nm) a při koncentraci želatiny 5 % w/w obsahuje disperze nanočástice stříbra o velikosti 8–22 nm (z DLS 257,8 nm).



Obrázek 48: Distribuce velikosti nanočástic připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným pro koncentrace želatiny 0,05 (A); 0,25 (B); 2,5 % w/w (C)

Při použití tetrahydridoboritanu sodného opět s rostoucí koncentrací želatiny velikost nanočástic stříbra klesá. Pro koncentraci 0,05 % w/w jsou přítomny nanočástice o velikosti 3–10 nm (z DLS 71,5 nm), pro koncentraci 0,25 % w/w o velikosti 4–12 nm (z DLS 127,8 nm) a po 2,5 % w/w jsou přítomny nanočástice o velikosti 4–8 nm (z DLS 352,5 nm).

Z těchto měření je patrné, že při použití želatiny jako stabilizujícího činidla je použití přístroje DLS nevhodné. U nižších koncentrací želatiny v disperzi nanočástic stříbra se liší velikost poměrně málo, ale s její rostoucí koncentrací se odchylka zvětšuje a může dosahovat až stovek nanometrů.

Jev, při kterém s rostoucí koncentrací želatiny v disperzi stříbra klesá velikost částic, byl pozorován i v dalších studiích [32]. Vnik nové fáze (nanočástic stříbra) zahrnuje v první fázi vznik nukleačních zárodků nanočástic a následně dochází k přechodu na heterogenní mechanismus nukleace, který je energeticky výhodnější. Heterogenní mechanismus spočívá

v tom, že nevznikají další zárodky, ale ty již vzniklé narůstají případně se spojují ve větší celky. V této fázi by mohla rostoucí koncentrace želatiny v systému mít vliv na konečnou velikost částic dvěma možnými mechanismy. První souvisí s tím, že adsorpce želatiny na rostoucí zárodek částice stříbra snižuje jeho katalytickou aktivitu pro průběh další redukce a tím dochází i ke zpomalení růstu již existujících zárodků. Homogenní nukleace není přítomností želatiny až tak výrazně ovlivněna, což může vést k tvorbě nových zárodků tímto mechanismem. Tento děj může být navíc podpořen vysokou viskozitou disperzního prostředí, kdy zpomalení difuze opět snižuje rychlost redukce na již rostoucím zárodku a přispívá tak k podpoře homogenního mechanismu nukleace.

Významným parametrem, který byl u připravených nanočástic stříbra modifikovaných želatinou sledován, byla dlouhodobá stabilita. Od každé redukční látky byla vybrána jedna sada experimentů, která byla uschována v plastových zkumavkách a následně v pravidelných intervalech měřena. Nanočástice stříbra redukované maltózou a askorbovou kyselinou byly sledovány čtyři a půl měsíce. Při použití tetrahydridoboritanu sodného byly vzorky nanočástic sledovány 5 měsíců. Ze získaných UV-VIS spekter je patrné, že všechny vzorky nanočástic jsou stabilní, protože se u nich neobjevuje žádný výrazný pokles absorpance v oblasti primárního maxima (oblast 400 nm) ani vznik sekundárního maxima, které by naznačovalo vznik agregátů.

Dále byla sledována antibakteriální aktivita nanočástic stříbra pomocí mikrodiluční metody a byly vyhodnoceny hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro 6 a 70 dní staré nanočástice. V případě redukce maltózou a askorbovou kyselinou hodnoty MIC s rostoucí koncentrací želatiny v disperzi nanočástic klesaly (lepší antibakteriální aktivita), ale výrazně lepší byly výsledky u maltózy. V případě nanočástic připravených redukcí tetrahydridoboritanem sodným byly hodnoty MIC pro většinu testovaných mikroorganismů nezávislé na koncentraci želatiny, a pro některé kmeny bakterií hodnoty MIC kolísaly (aktivnější byly nižší koncentrace želatiny v disperzi nanočástic). Pokud se jedná o rozdíl mezi 6 a 70 dní starými nanočásticemi stříbra, tak v případě maltózy dochází u starších nanočástic ke zvýšení hodnot MIC 2–4×. U askorbové kyseliny dochází v některých případech ke zhoršení antibakteriální aktivity, v některých případech ke zlepšení. U přípravy nanočástic stříbra redukcí tetrahydridoboritanem sodným dochází s rostoucím stářím nanočástic k růstu hodnot MIC, který ale není tak výrazný jako v případě maltózy.

6 ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce byla příprava a studium nanočástic stříbra v přítomnosti přírodního polymeru – želatiny. Byl zkoumán vliv koncentrace želatiny a použitých různých redukujících látek na vlastnosti nanočástic. Nanočástice byly charakterizovány měřením jejich velikosti pomocí dynamického rozptylu světla (DLS), snímky z transmisního elektronového mikroskopu, UV-VIS spektrometrií a byla zjišťována jejich antibakteriální aktivita.

Nanočástice stříbra byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou, spočívající v redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ vhodnou redukční látkou. Jejich modifikace želatinou byla provedena tak, že její koncentrace v disperzi nanočástic byla v rozmezí 0,0001–5 % w/w a roztok želatiny byl přidáván před redukující látkou.

Z testovaných redukujících látek vedlo ke stabilním nanočásticím použití maltózy, askorbové kyseliny a tetrahydridoboritanu sodného. Pro maltózu bylo použito koncentrační rozmezí želatiny 0,0001–0,1 % w/w, pro askorbovou kyselinu a tetrahydridoboritan sodný 0,01–5 % w/w. Měření velikosti pomocí přístroje DLS (korigované na viskozitu) vykazovalo rostoucí velikost nanočástic stříbra v závislosti na zvyšující se koncentraci želatiny. Získané TEM snímky však ukazují opačný jev, kdy se u nejvyšších koncentrací želatiny vyskytují i nanočástice o velikosti kolem 5 nm. U připravených nanočástic byla také sledována dlouhodobá stabilita. Ze získaných dat je vidět, že nanočástice jsou po dobu sledování (4–5 měsíců) stabilní a naměřená UV-VIS spektra nenaznačují žádný agregační proces. Posledním sledovaným parametrem byly hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) stanovené mikrodiluční metodou. U maltózy a askorbové kyseliny dochází s rostoucí koncentrací želatiny k poklesu hodnot MIC (lepší antibakteriální aktivita) a u tetrahydridoboritanu sodného jsou MIC nezávislé na koncentraci želatiny, případně lépe účinkují nižší koncentrace želatiny v disperzi nanočástic. Co se týče rozdílu mezi 6 a 70 dní starými nanočásticemi, tak v případě maltózy se hodnoty MIC u starších nanočástic zvyšují 2–4×. U tetrahydridoboritanu dochází k nepatrnému růstu MIC a u askorbové kyseliny dochází v některých případech k nárůstu hodnot MIC, ale v některých případech paradoxně ke zlepšení antibakteriální aktivity u 70 dní starých nanočástic.

7 SUMMARY

The aim of my diploma thesis was the preparation and study of silver nanoparticles in the presence of a natural polymer – gelatin. In my work was studied the influence of gelatin concentration and the influence of the various reducing agents on the properties of silver nanoparticles. Silver nanoparticles were characterized by measuring their size by dynamic light scattering (DLS) method, transmission electron microscopy (TEM) and with UV-VIS spectrometry. Their antibacterial activity was observed too.

Silver nanoparticles were prepared via modified Tollens process. The modification by gelatin was made so that its concentration in the dispersion of nanoparticles ranged from 0,0001 to 5 % w/w and gelatin solution was added before the reducing agent.

Stable nanoparticles were synthesized only via reduction by maltose, ascorbic acid and sodium borohydride. For maltose was used concentration range of gelatin from 0,0001 to 0,1 % w/w, for ascorbic acid and sodium borohydride concentration range 0,01–5 % w/w. Measurement of size by DLS (corrected for viscosity) showed increasing size of silver nanoparticles with increasing concentration of gelatin. However, the TEM images showed the opposite phenomenon. Higher concentrations of gelatin in a nanoparticles dispersion contain a nanoparticles around 5 nm. Long-term stability variable was observed too. The measured data showed that nanoparticles are for follow up time (4–5 months) stable and measured UV-VIS spectra indicate no aggregation of silver nanoparticles. The last observed parameter was the minimum inhibitory concentration (MIC) obtained by microdilution method. Usage maltose and ascorbic acid resulted with increasing concentration of gelatin to decrease of the MIC values (better antibacterial activity). And in the case of sodium borohydride MIC values were independent on the concentration of gelatin in the dispersion of nanoparticles eventually were collected better results with lower concentration of gelatin.

8 LITERATURA

- [1] Dresselhaus, M. S.; Araujo, P. T. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6297–6302.
- [2] Hossam, H. *Journal of Physics D: Applied physics* **2007**, *40*, 7173–7186.
- [3] Kvítek, L.; Panáček, A.; Soukupová, J.; et al. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 5825–5834.
- [4] Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, M. A. *Trends in Biotechnology* **2010**, *28*, 580–588.
- [5] Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D. Y.; et al. *Water Research* **2008**, *42*, 4591–4602.
- [6] Kvítek, L.; Pucek, R.; Panáček, A.; et al. *Journal of Material Chemistry* **2005**, *15*, 1099–1105.
- [7] Anker, J. N.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; et al. *Nature Materials* **2008**, *7*, 442–453.
- [8] Kvítek, L.; Pucek, R. *Journal of Material Science* **2005**, Springer, 2005, on-line verze: <http://springerlink.com>. article no.: s10853-005-0789-2.
- [9] Fahlman, B. D. *Materials Chemistry*, Springer, Dordrecht, **2007**, ISBN 978-1-4020-6119-6.
- [10] Shaw, D. J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, Butterworth-Heinemann, Oxford, **2003**, ISBN 0-7506-1182-0.
- [11] Novák, J.; Bartovská, L.; Cibulka, I.; et al. *Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz*, VŠCHT, Praha, **2009**, ISBN 978-80-7080-675-3.
- [12] Kvítek, L.; Panáček, A. *Základy koloidní chemie*, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, **2005**, ISBN 978-80-244-1669-4.
- [13] Sivera, M. *Studium stabilizace nanočástic stříbra roztoky želatiny*, Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, **2009**.
- [14] Kvítek, L.; Novotný, R.; Píkal, P. *Chemické listy* **1998**, *92*, 431–433.
- [15] Evanoff, D. D.; Chumanov, G. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1221–1231.

- [16] Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; et al. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1578–1586.
- [17] Wong, K. K. Y.; Liu, X. *Medical Chemistry Communications* **2010**, *1*, 125–131.
- [18] Kvítek, L.; Pucek, R.; Hrbáč, J. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rectum Naturalium* **2004**, *Chemica* 43.
- [19] Khaydarov, R. A.; Khaydarov, R. R.; Garupova, O.; et al. *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, *11*, 1193–1200.
- [20] Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, J.; et al. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- [21] Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, *145*, 83–96.
- [22] Zhao, T.; Sun, R.; Yu, S.; et al. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **2010**, *366*, 194–202.
- [23] Pal, A.; Shah, S.; Devi, S. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **2007**, *302*, 51–57.
- [24] Choi, S.-H.; Zhang, Y.-P.; Gopalan, A.; et al. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **2005**, *256*, 165–170.
- [25] Thakkar, K. N.; Mhatre, S. S.; Parikh, R. Y. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2010**, *6*, 257–262.
- [26] Jain, P.; Pradeep, T. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, *90*, 59–63.
- [27] Lee, H. J.; Yeo, S. Y.; Jeong, S. H. *Journal of Material Science* **2003**, *38*, 2199–2204.
- [28] Ravindra, S.; Mohan, Y. M.; Reddy, N. N.; et al. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* **2010**, *367*, 31–40.
- [29] Shim, I.-K.; Lee, Y. I.; Lee, K. J.; et al. *Materials Chemistry and Physics* **2008**, *110*, 316–321.

- [30] Martinová, L. *Biomedicínální polymery*, staženo v září **2008** z:
<https://skripta.ft.tul.cz/akreditace/data/2008-07-18/12-34-14.pdf>.
- [31] Panáček, A.; Kolář, M.; Večeřová, R.; et al. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6333–6340.
- [32] Neupane, M. P.; Lee, S. J.; Park, I. S.; et al. *Journal of Nanoparticles Research* **2011**, *13*, 491–498.