

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální chemie



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Nanočástice vzácných kovů připravené v přítomnosti a/nebo vlivem  
vybraných aminokyselin

Jméno: Bc. Magdaléna Bryksová

Studijní obor: Materiálová chemie

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

Olomouc 2013

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora:	Bc. Magdaléna Bryksová
Název práce:	Nanočástice vzácných kovů připravené v přítomnosti a/nebo vlivem vybraných aminokyselin
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D
Rok obhajoby:	2013
Abstrakt:	Diplomová práce se zabývá jednak post-syntetickými povrchovými modifikacemi nanočástic vzácných kovů vybranými aminokyselinami, jednak syntézou těchto nanočástic v přítomnosti vybraných aminokyselin. Je zkoumáno, zda mohou být nanočástice vzácných kovů generovány metodami, které jsou šetrné k životnímu prostředí (tzv. „green“ syntézy). K charakterizaci vznikajících či post-synteticky modifikovaných nanočástic jsou použity následující techniky: UV/Vis spektroskopie, dynamický rozptyl světla, transmisní elektronová mikroskopie, povrchem zesílená Ramanova spektroskopie.
Klíčová slova:	nanočástice stříbra, nanočástice zlata, aminokyseliny, green syntézy
Počet stran:	87
Počet příloh:	1
Jazyk:	čeština

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Bc. Magdaléna Bryksová

Title: Noble metal nanoparticles prepared in the presence of chosen amino acids and/or their formation induced by chosen amino acids

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D

The year of presentation: 2013

Abstract: This Diploma thesis deals not only with post-synthetic surface modifications of noble metal nanoparticles by selected amino acids, but also with the synthesis of the nanoparticles in the presence of selected amino acids. It is investigated whether noble metal nanoparticles can be generated by syntheses which are environmentally friendly (so called green syntheses). The following techniques are used for the characterization of as-prepared and/or post-synthetically modified noble metal nanoparticles: UV/Vis spectroscopy, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, surface-enhanced Raman spectroscopy.

Key words: silver nanoparticles, gold nanoparticles, amino acids, green syntheses

Number of pages: 87

Number of appendices: 1

Language: Czech

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

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....  
Vlastnoruční podpis

### *Poděkování*

*Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce, RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph. D., za cenné rady a náměty, ale i za pomoc, čas a trpělivost, které mi věnovala při vypracování této práce. Mé poděkování patří i Mgr. Kláře Šafářové, Ph. D. za vyhotovení snímků z transmisního elektronového mikroskopu.*

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Teoretická část.....	10
2.1 Koloidní soustavy.....	10
2.1.1 Klasifikace koloidních soustav.....	11
2.1.2 Specifické vlastnosti koloidních soustav.....	11
2.2 Kinetické vlastnosti.....	11
2.3 Optické vlastnosti koloidních systémů.....	12
2.4 Elektrické vlastnosti koloidních systémů.....	14
2.4.1 Elektrokinetický potenciál.....	15
2.4.2 Elektrokinetické jevy.....	16
2.5 Koloidní částice vzácných kovů.....	16
2.5.1 Koloidní stříbro .....	17
2.5.2 Koloidní zlato.....	18
2.6 Metody přípravy koloidního stříbra .....	19
2.6.1 Dispergační metody.....	19
2.6.2 Kondenzační metody.....	20
2.7 Metody přípravy nanočástic zlata .....	24
2.8 Nanomateriály a aminokyseliny.....	24
2.8.1 Glutamin.....	25
2.8.2 Glutamová kyselina.....	25
2.8.3 Cystein.....	26
2.8.4 Arginin .....	26
2.9 Ramanova spektroskopie.....	27
2.9.1 Komponenty Ramanova spektrometru.....	28
2.9.2 Povrchový plasmon .....	30
2.9.3 Povrchový plasmon u kulatých kovových nanočástic.....	30
2.10 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	31
2.10.1 Základní konstrukce TEM.....	31
2.10.2 Příprava vzorků pro měření v TEM .....	33
3. Experimentální část.....	34
3.1. Chemikálie .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2 Experimentální vybavení.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.3 Pracovní postupy jednotlivých experimentů .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

3.3.1 Interakce nanočástic stříbra a zlata s aminokyselinami .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.3.2 Vznik stříbrných nanočástic redukcí tetrahydroboritanem sodným v přítomnosti zvolených aminokyselin .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.3.3 Vznik stříbrných nanočástic vlivem glutamové kyseliny .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.3.4 Syntéza částic stříbra v prostředí fosfátového pufru .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4. Výsledky a diskuze.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1 Interakce částic stříbra s aminokyselinami.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1.1 Interakce částic stříbra s kyselinou glutamovou	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1.2 Interakce částic stříbra s glutaminem .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1.3 Interakce částic stříbra s cysteinem .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1.4 Interakce částic stříbra s argininem .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2 Vznik stříbrných nanočástic redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti zvolených aminokyselin .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2.2 Koloidní roztok stříbra redukovaný tetrahydroboritanem sodným v přítomnosti glutamové kyseliny .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2.3 Koloidní roztok stříbra redukovaný tetrahydroboritanem sodným v přítomnosti glutaminu.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2.4 Koloidní roztok stříbra redukovaný tetrahydroboritanem sodným v přítomnosti cysteinu.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2.5 Koloidní roztok stříbra redukovaný tetrahydroboritanem sodným v přítomnosti argininu.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3 Vznik stříbrných částic vlivem vybraných aminokyselin .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3.1 Syntéza stříbrných částic vlivem glutamové kyseliny v bazickém prostředí ..	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3.2 Syntéza stříbrných částic v prostředí fosfátového pufru za použití různých aminokyselin a při různých hodnotách pH.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5. Závěr.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6. Summary .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
7. Seznam použité literatury a obrázků .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
8. Příloha .....	87

## 1. Úvod

Objev skenovacího tunelového mikroskopu a následně mikroskopu atomárních sil se staly klíčovými událostmi v dějinách nanověd a nanotechnologií. V roce 1986 byla Gerdu Binnigovi a Heinrichovi Rohrerovi udělena Nobelova cena za fyziku právě za konstrukci skenovacího tunelového mikroskopu. Před 20 lety se na scéně objevil i mikroskop atomárních sil, jenž prokázal svou využitelnost v celé řadě aplikací. Kromě schopnosti zobrazovat plochy, umožňuje mikroskopie atomárních sil manipulovat i s jednotlivými atomy a molekulami, což rozšiřuje její využitelnost i do oblasti kosmického výzkumu. V současné době je součástí systému, který by měl v roce 2014 přistát na kometě 67P a podrobně analyzovat materiál, ze kterého je kometa složena. (1)

V nanosvětě jsou popírány fyzikálně-chemické principy, vlastnosti a zákony, které jsou běžně pozorovatelné v makro a mikrosvětě. Mezi dva nejvýznamnější rozdíly, které byly pozorovány, patří výrazná změna poměru povrchu a objemu částic a mnohem větší reaktivita částic. Také vlastnosti, jako jsou magnetické, optické, elektrické, či tepelné jsou velmi odlišné od těch, které známe z makro-, či mikrosvěta. Všechny tyto vlastnosti předurčují nanotechnologie k využití v řadě vědeckých, technických, či průmyslových odvětvích.

Všechny výjimečné vlastnosti nanomateriálů jsou důsledkem jejich rozměrů v řádech nanometrů. Například kvantové tečky o velikosti 2-12 nm jsou toho typickým příkladem. Na druhé straně, uhlíkové trubičky mají nanometrické rozměry pouze v jednom směru – jejich průměr se pohybuje od 0,7 do 2 nm, ale jejich délka může dosáhnout až 10  $\mu\text{m}$ . I přesto jsou považovány za nanoobjekty a udržují si jejich unikátní vlastnosti. Jsou zde čtyři hlavní oblasti využití nanotechnologií – nanobiotechnologie (nanomedicína), nanomateriály, nanoelektronika a nanosenzory. Vliv nanověd a nanotechnologií na vědu a průmysl proto v posledních letech prudce vzrostl. (2)

V průběhu minulých let začal rozvoj nanotechnologií směřovat cestou tzv. „green“ synthesis, tj. metody, která je šetrná k životnímu prostředí. Dříve byly nanomateriály jako např. nanočástice vzácných kovů vyráběny převážně za použití silných chemických redukčních činidel, která však, či z nich vznikající vedlejší produkty mohou zatěžovat životní



prostředí. Proto je nezbytné rozvíjet ekologicky šetrné metody, zejména pro výroby ve velkém množství. (3)

Tato diplomová práce si klade za cíl prozkoumat, zda vůbec a za jakých podmínek může docházet ke vzniku nanočástic vzácných kovů (stříbra a zlata) vlivem aminokyselin. Aminokyseliny jsou, jak známo, součástí živých organismů, a proto by se vznik nanočástic vlivem jejich působení měl řadit mezi ekologicky šetrné syntézy. Pro tuto práci byly vybrány čtyři aminokyseliny (glutamová kyselina, glutamin, arginin, cystein), pro něž však je nutné nejprve určit, jakým způsobem interagují s nanočásticemi vzácných kovů a také jak ovlivňují klasickou borohydridovou syntézu těchto nanočástic. S ohledem na limitovaný rozsah diplomové práce jsou všechny doposud získané výsledky týkající se nanočástic zlata zařazeny do příloh a nebudou v práci diskutovány.

## **2. Teoretická část**

### ***2.1 Kolloidní soustavy***

Kolloidní soustavy jsou podtřídou tzv. disperzních soustav. Taková soustava obsahuje dvě základní části, kterými jsou disperzní fáze a disperzní prostředí.

Heterogenní soustava je termodynamický systém, ve kterém se vyskytují minimálně dvě základní fáze – první fáze je rozptýlena ve druhé v podobě částic, které mají daný tvar

a velikost. Základní vlastností každé heterogenní soustavy je existence tzv. fázového rozhraní. Opakem je soustava homogenní, kde nelze žádné fázové rozhraní pozorovat, protože taková soustava obsahuje pouze jednu fázi. (4)

### **2.1.1 Klasifikace koloidních soustav**

Klasifikovat disperzní soustavy lze podle mnoha kritérií. Za nejdůležitější faktor je považována velikost dispergujících částic a označujeme ho jako stupeň disperzity. Vyšší stupeň disperzity ukazuje na jemněji rozptýlenou fázi. Podle toho kritéria rozlišujeme 3 základní soustavy – analytické, koloidní a hrubé. Pro podrobnější dělení se používá dále označení makrodisperzní a mikrodisperzní.

Z pohledu velikosti částic rozlišujeme soustavy monodisperzní, kdy všechny částice v systému mají stejnou velikost a soustavy polydisperzní, ve kterých pozorujeme částice o různých velikostech.

Dalším dělením je dělení podle tvaru částic, kdy se můžeme setkat se soustavami homodisperzními (částice o stejném tvaru) nebo heterodisperzními (částice se tvarově liší). (4) Vzhledem k tvaru dispergovaných částic rozdělujeme soustavy na korpuskulární, fibrilární a laminární. Korpuskulární částice, nebo také izomerické či globulární, jsou ve svých rozměrech totožné. U fibrilárních částic pozorujeme vláknitý či tyčinkovitý tvar a u částic laminárních tvar lamel. Vzhledem k převládání jednoho rozměru nad ostatními jsou nazývány také jako anizomerické. (5,6)

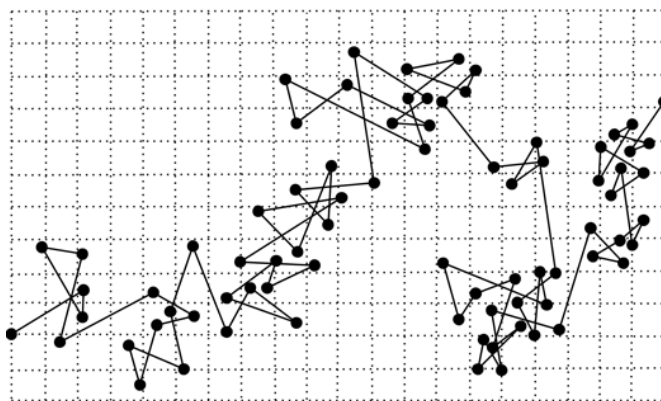
### **2.1.2 Specifické vlastnosti koloidních soustav**

Jedinečnost koloidních systémů spočívá v jejich unikátních vlastnostech jako je přítomnost Tyndallova efektu, pomalá difúze, nízký osmotický tlak, schopnost podléhat dialýze, nestálost a snadná koagulace nebo elektroforetická pohyblivost, díky níž často v koloidech neplatí Faradayovy zákony.

## **2.2 Kinetické vlastnosti**

Tepelný pohyb částic ovlivňuje kinetické vlastnosti koloidních systémů jako například sedimentaci, osmózu, či difúzi. Intenzita tepelného pohybu je závislá na teplotě a velikosti částic, a proto pomocí kinetických vlastností můžeme určit velikost částic v systému.

Brownův pohyb je chaotický a neuspořádaný pohyb částic v systému. Částice v systému se vzájemně srážejí, a tím mění svůj směr. Zvýšená pravděpodobnost srážky se objevuje u částic, jejichž hmotnost a velikost se zvětšují.



*Obr.1: Ukázka Brownova pohybu koloidní částice*

Pokud jsou v různých místech roztoku naměřeny různé koncentrace a roztok je rozdělen polopropustnou membránou, čímž se koncentrace vyrovnají, mluvíme o tzv. osmóze. Přes membránu pronikají pouze malé částice (rozpouštědlo), zatímco ostatní jsou na membráně zachyceny. (7)

Díky existenci Brownova pohybu můžeme pozorovat i další z jevů – difúzi. Díky tomuto jevu je systém schopen samovolně vyrovnávat koncentrace směrem z míst o koncentraci vyšší, do míst s nižší koncentrací. Difúze je děj nevratný a její směr je dán tzv. koncentračním gradientem. (4)

Poslední z vlastností, řadících se do této skupiny, je sedimentace. Sedimentovat mohou pouze ty částice, které mají dostatečnou hmotnost. Naopak tuto vlastnost nelze pozorovat u soustav s vysokým stupněm polysperzity. (8) Znalost doby, za kterou se všechny částice usadily a došlo k sedimentační rovnováze, můžeme praktikovat při zjišťování velikosti částic v daném systému. (9)

### **2.3 Optické vlastnosti koloidních systémů**

Optické metody se jeví jako nejvhodnější k charakterizaci a popisu koloidních soustav. I když je nelze pozorovat v mikroskopu, světlo absorbují (9). Na principu optických vlastností je založena i světelná mikroskopie, která je dnes nejpoužívanější metodou k charakterizaci nanočástic. (10)

Aby mohlo docházet k rozptylu světla na elektricky vodivých částicích, musí být splněna podmínka, že vlnová délka světla, dopadajícího na systém musí být větší než velikost částic rozptýlených v disperzní fázi. Viditelným projevem tohoto jevu je jemný zákal roztoku (opalescence). (11)

Na první pohled viditelnou vlastností koloidních soustav je jejich intenzivní zbarvení, což může mít celou řadu příčin – tvar, struktura a materiál částic, stupeň disperzity, ale i charakter disperze. (8)

Díky povrchovému plasmonu kovových částic můžeme pozorovat odlišné zbarvení jejich koloidních roztoků. (12)

### Tyndallův jev

Další typickou vlastností, vyskytující se v koloidních systémech, je přítomnost tzv. Tyndallova jevu – efektu rozšiřujícího se paprsku procházejícího disperzním prostředím. To, co pozorujeme, jsou však jen paprsky ohnuté na koloidních částicích, ne však skutečný obraz. (13)



Obr.2: Tyndallův jev – efekt procházejícího paprsku pravým roztokem a koloidní disperzí

Svazek paprsků, jenž prochází koloidní disperzí a v němž jsou přítomny koloidní částice, se při pozorování z boku stává viditelným, a to v důsledku rozptylu světla. Procházející paprsek ve tvaru kužele (Tyndallův kužel) a jeho vrchol je pozorovatelný v místě, kudy světlo do nehomogenního prostředí vchází. V případě, že mají přítomné částice dostatečnou velikost, jsou ve světelném kuželu viditelné jako jasné zářivé body – v případě částic menších, pozorujeme pouze difúzní pruh světla. V homogenním prostředí je Tyndallův jev nepozorovatelný. (6)

### Dynamický rozptyl světla

Při klasickém rozptylu světla je světlo rozptýleno od různých částic a nedochází tak k jeho interferenci. V případě použití laserové paprsku se světlo stává koherentním, interaguje s částicemi a k interferenci dochází. Vzhledem ke skutečnosti, že malé částice mají schopnost

se v roztoku pohybovat díky existenci Brownova pohybu, se mění dráha, kterou musí rozptýlené světlo překonat než dojde k detektoru.

Dynamický rozptyl světla je dnes široce využívanou metodou pro určení velikosti koloidních částic. Zjištěné hodnoty často odpovídají hodnotám zjištěným pomocí transmisní elektronové mikroskopie. K problému může docházet v případě polydisperzních systémů, kdy jsou nadhodnoceny částice větších rozměrů, které vykazují velkou intenzitu záření, a částice malých rozměrů tak nemusí být vůbec detekovány. (12)

## **2.4 Elektrické vlastnosti koloidních systémů**

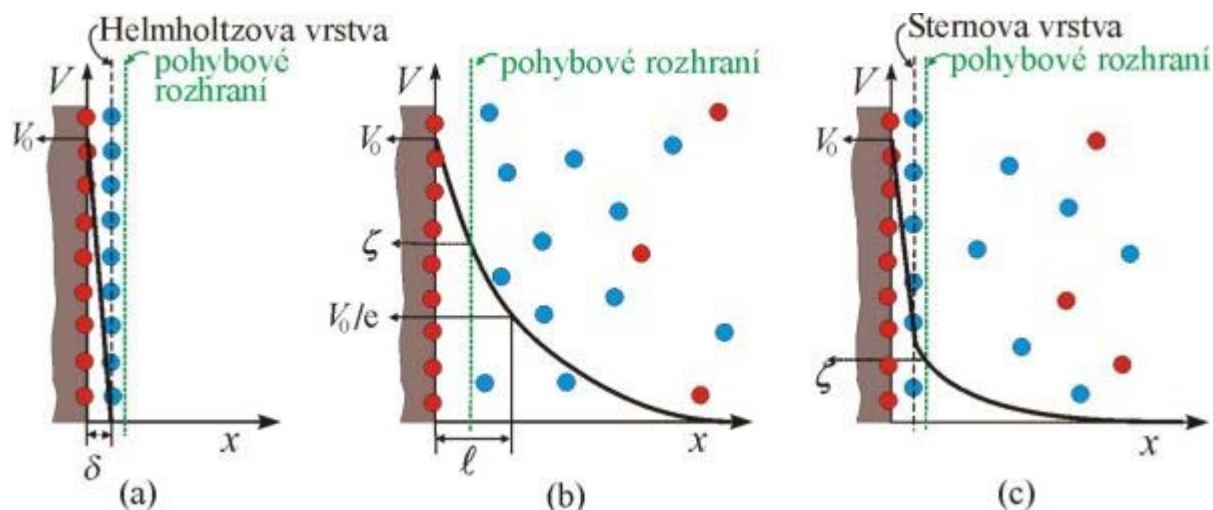
Vlastnosti každé látky výrazně ovlivňuje elektrický náboj, který vzniká na jejím povrchu. Tento náboj je zdrojem celé řady unikátních vlastností soustavy a může vznikat dvěma způsoby. Prvním způsobem je vzájemná interakce acidických, či bazických skupin na povrchu částic, které mají schopnost ionizovat s přítomnými protony, a druhý způsob je založen na selekci a následné sorpci iontů z roztoku na povrch částic. (14) Malé ionty nesoucí opačné náboje se tak shlukují kolem koloidní částice a vzniká tzv. elektrická dvojvrstva – dvě vzájemně opačně nabitě vrstvy na povrchu koloidní částice.

Pro popis elektrické dvojvrstvy existují tři modely založené na popisu tepelného pohybu elektronů uvnitř této vrstvy a jejich vzájemných elektrostatických interakcí. Podle popisu Helmholtzova modelu (obr.A) je plošná hustota vnitřní vrstvy stejné hodnoty jako plošná hustota náboje na nabitěm povrchu. Model byl formulován v roce 1879 a vystihuje chování reálných systému při vysoké iontové síle roztoku, kdy dochází ke stlačení difúzní vrstvy a náboje vnitřní a vnější vrstvy se vzájemně zneutralizují.

Gouy (1910) a Chapman (1913) vypracovali matematickou teorii popisující úbytek hustoty náboje a potenciálu, který závisí na vzdálenosti od povrchu. Teorie dala za vznik Gouyova-Chapmanova modelu (obr.B) vysvětlujícího koncentraci iontu ve vnější vrstvě jako plynuje klesající veličinu závislou na vzdálenosti od nabitěho povrchu. Rovnováha nacházející se mezi tepelným pohybem iontů a elektrostatickými silami udává stav této vrstvy. V reálných systémech je difúzní vrstva pouze částí vnější vrstvy, v silně zředěných elektrolytech však její význam narůstá.

Třetí model, Sternův, je využitelný zvláště pro elektrolyty středních koncentrací. Vnější vrstvu elektrické dvojvrstvy popisuje jako vrstvu skládající se ze dvou částí – přiléhající plošné vrstvy (Sternovy vrstvy) a z difúzní (Gouyovy-Chapmanovy vrstvy). Sternova vrstva obsahuje ionty, jež jsou k vnitřní vrstvě přichyceny adsorpčními silami, a jejich plošná hustota

náboje je menší než plošná hustota náboje vrstvy vnitřní. Gouyova-Chapmanova vrstva je tvořena ionty, které jsou k sobě vázány elektrostatickými silami a mají schopnost neutralizovat náboj vnitřní vrstvy. Výsledný potenciál tak nejdříve prudce klesá na potenciál Sternovy vrstvy a poté pozvolna klesá k nule.(6)



Obr.3: Modely elektrické dvojvrstvy – Helmholtzův (A), Gouyův-Chapmanův (B) a Sternův model (C)

### 2.4.1 Elektrokinetický potenciál

Elektrokinetický potenciál (zeta potenciál  $\xi$ ) je jednou z nejdůležitějších vlastností, které můžeme pozorovat u objektů v rozměrech nano- a mikrometrů a má značný vliv na jejich chování. Zeta potenciálem nazýváme rozdíl potenciálů mezi nejvzdálenější nepohyblivou vrstvou kapaliny obklopující částici a vzdáleným objemem této kapaliny. S jeho pomocí určujeme míru interakce mezi částicemi, a tím i jejich vlastnosti. Při vyšší hodnotě než  $|30 \text{ mV}|$  se systém považuje za stabilní – částice se neshlukují a vzájemně se odpuzují. Naopak při malých hodnotách zeta potenciálu je systém nestabilní a částice podléhají agregaci. Mimo stability částic lze s jeho pomocí určit i některé povrchové vlastnosti nano a mikroobjektů. Měření zeta potenciálu se provádí pomocí dopplerova posunu laserového paprsku na povrchu nabitých částic pohybujících se v elektrickém poli. Samotný zeta potenciál lze vypočítat pomocí Smoluchowského rovnice:

$$\xi = U \frac{\eta}{\varepsilon}$$

kde  $\zeta$  je zeta potenciál,  $U$  je pohyblivost částic,  $\eta$  je viskozita kapaliny a  $\varepsilon$  její permitivita (15)

#### **2.4.2 Elektrokinetické jevy**

V případě, že dochází k pohybu fáze, která obsahuje elektrickou dvojvrstvu, vůči roztoku a následkem toho se dvojvrstva rozdělí a vzniká elektrokinetický potenciál, došlo k tzv. elektrokinetickým jevům. Obecně jsou mezi ně řazeny následující čtyři jevy – elektroforéza a elektroosmóza (jejichž pohyb je způsobem přítomností elektrického pole) a sedimentační a proudový potenciál (tyto potenciály vznikají následkem mechanického pohybu). Při elektroforéze dochází k rozdělení elektrické dvojvrstvy nacházející se v okolí částice – částice tak přijímá náboj a pohybuje se směrem k příslušné elektrodě, zatímco zbytek difúzní vrstvy putuje na stranu opačnou. Elektroosmóza popisuje situaci, kdy se kapalina pohybuje v kapiláře, na jejíž stěně se nachází elektrická dvojvrstva. Pohyb je způsoben odlišnými hodnotami elektrických potenciálů na obou koncích kapiláry. Sedimentační potenciál (Dornův potenciál) je potenciál vznikající pohybem částic v jednom směru. Částice mají elektrickou dvojvrstvu, pohybují se v disperzním prostředí a jejich pohyb je vyvolán mechanickou silou. Proudový potenciál je dán rozdílem potenciálů mezi dvěma konci porézní přepážky v případě, že přepážkou proudí zředěný roztok elektrolytu za působení tlaku.(6)

#### **2.5 Koloidní částice vzácných kovů**

Nanovědy a nanotechnologie, relativně nové oblasti, které jsou v současnosti rozvíjeny, využívají pouze materiály a struktury o velikosti částic 1-100 nm. Materiály, obsahující částice pouze v řádech nanometrů, mohou poskytovat nová řešení v mnoha oblastech. Vzhledem k rostoucímu zájmu o tyto materiály je dnes velmi populární metoda tzv. green synthesis, kdy se používají pouze chemicky nezávadné a netoxické chemikálie(16). Tento postup je většinou jednoduchý, ekologicky šetrný a poměrně efektivní(17).

Nanočástice ušlechtilých kovů, především zlata, stříbra a mědi, mohou být využity v oblastech jako optoelektronika, katalýza, fotonika a analýza. Jedním z nejčastějších využití těchto částic je detekce pomocí povrchově zesíleného Ramanova rozptylu (SERS). Navíc v UV-Vis oblasti je u kovových částic prokázána existence povrchového plasmonu. Studie dále prokázaly, že velikost, stabilita, morfologie a chemické i fyzikální vlastnosti kovových částic jsou výrazně ovlivněny experimentálními podmínkami(16).



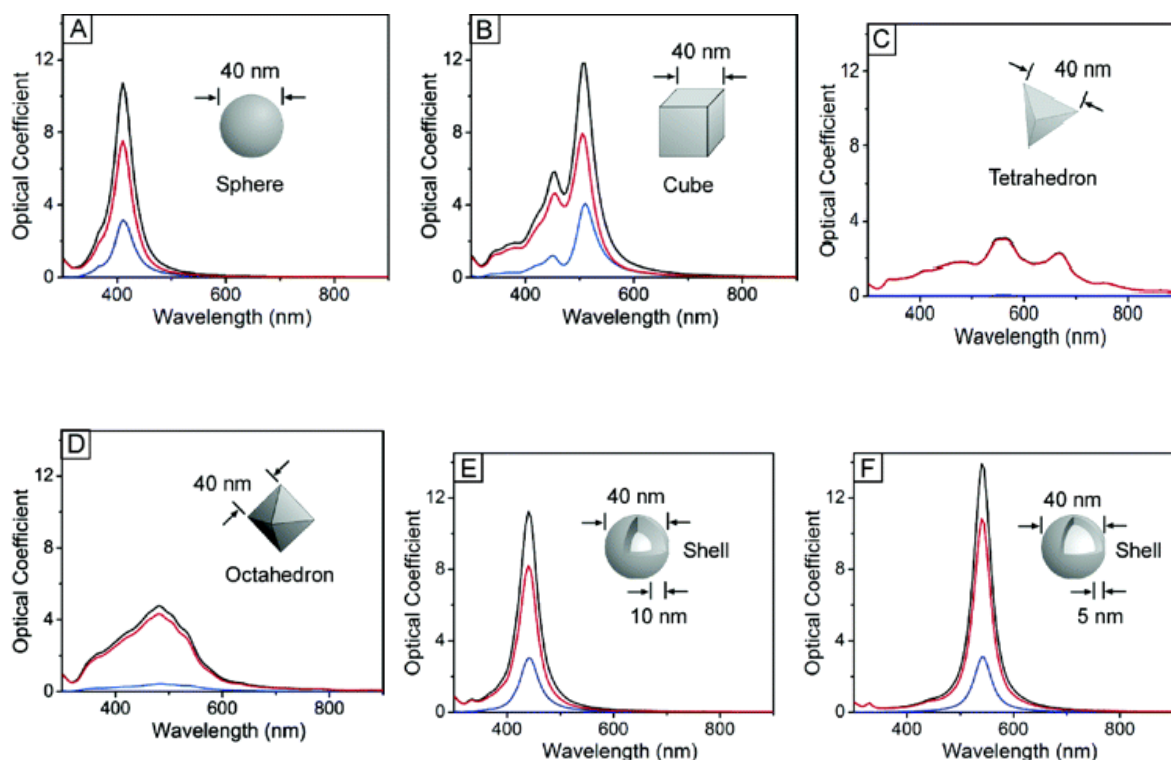
### 2.5.1 Koloidní stříbro

Samotné koloidní stříbro je zajímavé díky jeho specifickým vlastnostem jako je dobrá vodivost, chemická stabilita, katalytická a antibakteriální aktivita(16). Tyto vlastnosti jsou výrazně závislé na velikosti a tvaru samotných stříbrných nanočástic, ale i na prostředí, ve kterém se nacházejí(18).

První informace o využití stříbra pochází již z dob starého Egypta, kdy sloužilo především k úpravě pitné vody. V oblasti medicíny se datuje rozvoj jeho využívání do 70. let 20. století, kdy je hojně využíváno k léčbě popálenin. Dnes se však největšího ocenění stříbrným částicím dostává díky jejich antibakteriální aktivitě a uvažuje se o nich jako o náhradě antibiotik(19). Další studie prokázaly, že antibakteriální aktivita úzce souvisí s velikostí stříbrných částic – se vzrůstající velikostí částic, antibakteriální aktivita klesá. Neméně závislá je i na morfologii vzniklých částic, kdy částice ve tvaru trojbokého jehlanu vykazují nejvyšší aktivitu(20).

Své využití našly stříbrné částice i v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS), v současné době velice významné technice používané v mnoha oblastech. Metoda studuje ionty a molekuly, jež jsou naadsorbované na zdrsňeném povrchu částic vzácných kovů, z nichž jsou nejčastěji používány právě částice stříbrné(21).

Stejně jako nanočástice jiných kovů, i u nanočástic stříbra jsou pozorovatelné unikátní optické vlastnosti, jako je charakteristické zabarvení jejich roztoku. Tento jev souvisí s povrchovým plasmonem (tj. kolektivním kmitem volných elektronů (22)) a je nazýván jako povrchová plasmonová resonance (SPR). Interakci světla s hmotou se snažil vysvětlit i fyzik Michael Faraday, který prokázal, že i když jsou kovové částice menší v porovnání s vlnovou délkou světla, jejich absorpce a rozptyl světla jsou přesto velice silné. Skutečnost vlivu nanočástic stříbra na interakci se světlem je známá již téměř celé století. S rozvojem nových metod se však vyskytla možnost kontrolovat jejich tvar přímo v roztoku. Pomocí UV-Vis spektroskopie tak můžeme relativně snadno a rychle určit, zda jsou částice v roztoku přítomny. Navíc nám výsledná spektra mohou podat informace i o jejich tvaru a velikosti(23).



Obr.4: Přehled UV-Vis spekter naznačujících přítomnost různých tvarů nanočástic v roztoku. U tvaru izotropní koule A) se vyskytují spektra pouze s jedním rezonančním pikem, u anizotropní krychle B), tetraedru C) a oktaedru D) jsou typická spektra s více rezonančními píky posunutými do červené oblasti. Dutá koule E) a koule s tenkou stěnou F) vykazují také posun směrem k červené oblasti spektra(23)

## 2.5.2 Koloidní zlato

Ačkoli se použití zlata datuje již do starověku, větší pozornost je mu věnována až dnes, v době rozvoje nanotechnologií a nanověd. Zlaté nanočástice jsou nejstabilnější ze všech kovů a jejich unikátní elektrické a optické vlastnosti umožňují jejich aplikaci především v katalýze a biologii.

Těžba zlata byla zahájena již v 5 000 let před našim letopočtem. Ve starověkém Egyptě se využívalo především ke konstrukci soch, ale i pro estetické a léčebné účely. Je uváděno jeho používání k léčbě nemocí srdce a epilepsie, ale i nemocí pohlavních, či pro léčbu nádorů. Koloidní zlato bylo využíváno pro barvení keramiky a vitráží a tuto funkci plní dodnes. Nejslavnějším příkladem jedinečných vlastností zlata je pohár, který v procházejícím světle má rubínově červenou barvu a díky přítomnosti zlatých nanočástic se jeho barva ve světle odraženém mění na zelenou. Ovšem až ve 20. století byly všechny jeho vlastnosti znovu přezkoumány a publikovány metody pro jeho výrobu a i nyní jsou jeho vlastnosti intenzivně zkoumány.

Absorpčním maximum UV-Vis spekter zlatých nanočástic je pozorováno okolo 520 nm. Částice menších rozměrů (1-10 nm) mají schopnost chovat se jako nula-dimenzionální kvantové tečky. Fyzikální vlastnosti jsou silně závislé na jejich velikosti, mezičásticových vzdálenostech a výsledném tvaru částic(24). Efektivnost zlatých nanočástic pro biologické a zobrazovací aplikace nejvíce závisí na jejich optických vlastnostech(25).

## **2.6 Metody přípravy koloidního stříbra**

Vlastnosti koloidního stříbra, nejvíce však velikost částic, polydisperzita a povrchový náboj, předurčují aplikace takovéto stříbrné částice. Pro jejich vznik bylo publikováno již mnoho metod jako jsou metoda laserové ablace, chemická redukce a tepelné, či ozařovací metody(26).

### **2.6.1 Dispergační metody**

Základem dispergačních metod je přítomnost hrubé disperze, u nichž fyzikální cestou dochází ke zmenšení velikosti částic. U těchto metod jsou využívány převážně mechanické procesy, například míchání, elektrický výboj, nebo mletí. Ač jsou tyto metody vhodné pro výrobu větších množství koloidních roztoků a nachází tak své využití v průmyslové praxi, nejsou schopny formovat částice menší než 100 nm. Výsledný koloidní roztok bývá často nestálý, a proto jsou využívány stabilizátory jako povrchově aktivní látky nebo látky polymerní (želatina, polyethylenglykol) (12).

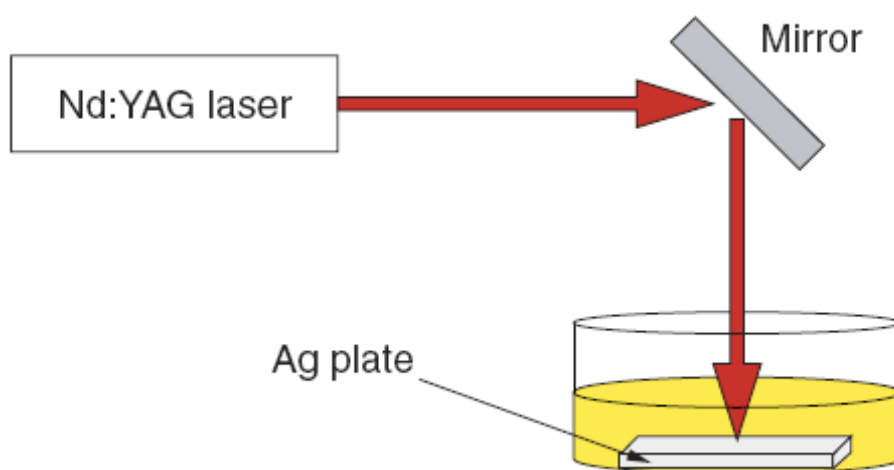
Při mechanickém rozmělnění se využívá strojů na tření, nebo kulovitých, či koloidních mlýnů, jež jsou v kontaktu s disperzním prostředím. Tyto mlýny jsou schopny rozmělnit hrubé částice na jemnější, které za přítomnosti stabilizační látky tvoří disperzní soustavu.

Rozmělnění pomocí ultrazvuku je metoda vhodná pouze pro dispergované látky, které mají malou pevnost.

Principem elektrických metod je výboj, při němž se na povrchu částic tvoří oxidový povlak, který plní stabilizační funkci. Hydrosoly kovů je možné připravit ve stejnosměrném oblouku, naopak k přípravě organosolů je potřeba vysokofrekvenční metoda, pracující při střídavém proudu. Hydrosoly některých kovových i nekovových materiálů, např. síry, uhlíku, či sulfidu těžkých kovů, je možno připravit katodickým rozprašováním, k němuž dochází při elektrolýze elektrolytu mezi anodou ve tvaru destičky a katodou tvaru drátku (4).

Oproti dříve uvedeným dispergačním metodám vede metoda laserové ablace k formování nanočástic stříbra a zlata. Metoda laserové ablace, využívající pulsní Nd:YAG laser, byla objasněna až nedávno. Jedná se o způsob, kdy na pevný povrch materiálů (plíšků příslušného

vzácného kovu) dopadá laserový paprsek, čímž dochází k přehřátí povrchu a působením tlaku se z něj uvolňují koloidní částice. Druhý mechanismus vzniku nanočástic laserovou ablací předpokládá vznik plazmatu v blízkosti plíšku a následnou generaci nanočástic v místech plazmatu vlivem stlačování vnější kapalinou (27). Ozáření laserem je používáno k úpravě velikosti a tvaru koloidního stříbra a zlata, připraveného chemickými či elektrochemickými metodami (4,28,29). Laserová ablace je jednoduchá, časově nenáročná metoda, využitelná nejen pro syntézu nanočástic, ale i jejich oxidů, organických látek a polovodičů (30). Metoda je ekologicky šetrná a akceptovatelná, protože nevyžaduje použití toxických látek (31). Takto vzniklé částice jsou vhodné pro využití v povrchově zesílené Ramanově spektroskopii, kde plní funkci nosičů pro detekci jiných molekul (32,33).

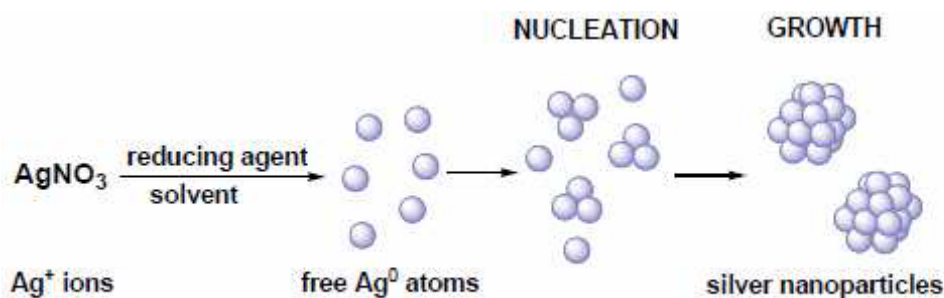


Obr.5: Princip přípravy nanočástic stříbra laserovou ablací(33)

## 2.6.2 Kondenzační metody

Princip kondenzačních metod je založen na postupném zvětšování částic nacházejících se v roztoku. Vycházejí z homogenních soustav a změnou podmínek (změna teploty, přítomnost jiného rozpouštědla) dochází ke snížení jejich rozpustnosti. Častěji používaným způsobem je výběr vhodné chemické reakce, jež mění původní rozpustnou látku na jinou méně rozpustnou. Příkladem může být redukce stříbrné soli a využití srážecích reakcí (12). Mechanismus formování stříbrných částic redukcí stříbrných iontů je rozdělen na dva kroky – nukleaci a růst. Zatímco proces nukleace vyžaduje vysokou aktivační energii, k růstu stačí aktivační energie nižší. Velikost a tvar nanočástic budou záviset na míře těchto procesů a mohou být ovlivňovány změnou koncentrace, teploty, pH, atd. Chemické metody jsou proto

poměrně snadnou cestou, jak syntetizovat stříbrné částice v roztoku. Úpravou parametrů, vyskytujících se v reakci, lze snadno kontrolovat jejich vlastnosti. Proto jsou vhodné pro vývoj nových nanomateriálů, například pro biomedicínké aplikace (34).



Obr.6: Mechanismus formování nanočástic, které jsou redukovány stříbrnou solí  $\text{AgNO}_3$ (34)

#### 2.6.2.1 Příprava koloidního stříbra za využití ultrazvuku, UV-záření, $\gamma$ -záření

Redukční činidla jako  $\text{NaBH}_4$ , dimethylformamid, formamid, hydrazin nebo triethanolamin jsou schopny provádět redukci stříbrných iontů  $\text{Ag}^+$  na koloidní stříbro  $\text{Ag}^0$ . Zbytky těchto redukčních činidel však mohou ohrožovat životní prostředí a jsou pro něj toxické. Z toho důvodu se dnes věnuje pozornost alternativním způsobům přípravy koloidních částic za pomoci UV záření,  $\gamma$ -záření, mikrovln nebo ultrazvuku(35).

Příprava částic stříbra ultrazvukem se řadí mezi kondenzační metody, při které dochází k rozdělení molekuly vody na hydroxylové radikály a vodíkové atomy. Stabilita roztoku je dále ovlivňována přidávkem aditiv – bez jejich přidavku je reakční rychlost malá, částice jsou nestabilní a rychle agregují. V jejich přítomnosti se rychlost reakce zvyšuje a částice jsou stabilní po dobu až několika měsíců(36).

Při redukcí  $\gamma$ -zářením dochází k agregaci částic, čemuž zamezuje přidavek stabilizační látky jako chitosan či poly(4-vinylpyridin). Ozáření roztoku stříbrné soli probíhá pod atmosférou vodíku, tvoří se hydratované elektrony a vodíkové atomy redukující ionty stříbra, zároveň se tvoří i OH radikály se schopností částice stříbra oxidovat. Na výslednou velikost vzniklých částic má vliv počáteční koncentrace stříbrné soli, koncentrace stabilizátoru a míra  $\gamma$ -záření(35,37).

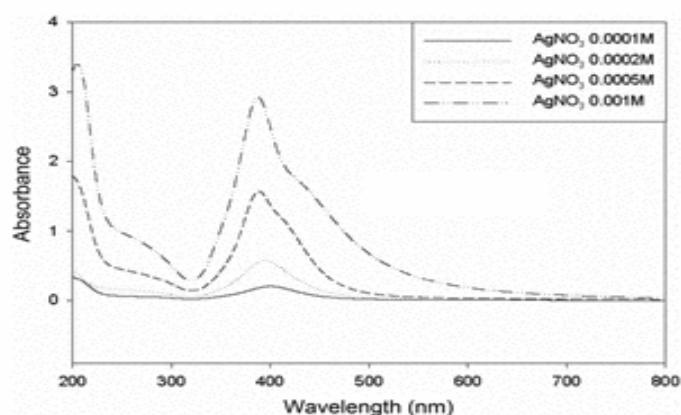
Redukce UV zářením je metoda jednoduchá a experimentálně nenáročná. K proběhnutí reakce je potřeba stříbrná sůl, sloučenina poskytující radikály a stabilizační látka(38).

A. Henglein publikoval studii o přípravě nanočástic stříbra pomocí UV záření, kde ozářením

roztoku, vzniklého z acetonu, 2-propanolu,  $\text{AgClO}_4$  a organických polymerních stabilizátorů, vznikají ketyl radikály, které při reakci se stříbrnými ionty, zredukují tyto ionty na  $\text{Ag}^0$ (39).

### 2.6.2.2 Příprava koloidního stříbra redukcí anorganickými činidly

Principem chemických redukčních metod je redukce stříbrné soli vhodným redukčním činidlem a v přítomnosti stabilizační látky. Hlavní funkcí stabilizátoru je zabránit prudkému nárůstu velikosti částic. Jak velikost samotných částic, tak i jejich agregační stabilita jsou ovlivňovány mnoha faktory jako je počáteční koncentrace stříbrné soli, molární poměr stříbrné soli a redukčního činidla, koncentrace stabilizační látky(40), ale i teplota, rychlost míchání, či koncentrace redukčního činidla(41).



Obr.7: Závislost intenzity UV-Vis absorpčního spektra stříbrných částic na koncentraci stříbrné soli(41)

Nejčastěji používaným redukčním anorganickým činidlem pro syntézu stříbrných částic je tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ). Toto redukční činidlo jako první využili Creighton, Blatchford a Albrecht, kteří ke 3 ml 0,002 M roztoku  $\text{NaBH}_4$  umístěného v ledové lázni přidali 1 ml roztoku  $\text{AgNO}_3$  o koncentraci 0,001 mol/l. Směs byla intenzivně míchána až došlo k tvorbě monodisperzních částic. Vzniklé částice vykazovaly absorpční maximum okolo 400 nm a jejich velikost byla 5-20 nm. Změnou poměru reakčních složek bylo vytvořeno mnoho modifikací této metody, za pomoci kterých je možnost syntetizovat částice jiných tvarů a velikostí (42).

K.CH.Song a kol. využili k přípravě částic stříbra také princip redukce stříbrné soli tetrahydridoboritanem sodným. Do reakce byl přidán i dodecyl sulfát sodný (SDS) plnící funkci stabilizačního činidla. Ve svých experimentech měnili poměr stříbrné soli ku redukčnímu činidlu, čímž dokázali, že s rostoucím množstvím redukčního činidla klesá schopnost agregace částic a zlepšuje se i disperzita (40). Na podobném principu pracovali

i J.Kim a kol., kteří jako stabilizátor zvolili kyselinu olejovou. Vzniklé částice měly dobrou disperzitu, kulovitý tvar a jednotnou velikost (43).

Velmi jednoduchou a rychlou přípravu stabilních částic, vhodných pro využití v SERS, představili Leopold a kol. Stříbrná sůl byla redukována hydroxylamin hydrochloridem v přítomnosti NaOH, v bazickém prostředí a za pokojové teploty. Touto cestou lze snadno kontrolovat velikost vznikajících částic – postačuje změna pořadí reakčních složek a jejich vzájemného koncentračního poměru (44).

### 2.6.2.3 Příprava koloidního stříbra redukcí organickými činidly

Přípravu koloidních roztoků, při nichž dochází k redukcí stříbrné soli organickým redukčním činidlem, zahrnujeme pochopitelně také mezi kondenzační metody. Syntéza vychází z analytických roztoků, což se jeví jako nejvýhodnější cestu kvůli širokým možnostem přípravy částic o rozdílných tvarech a velikostech. Na základě výběru stříbrné soli, redukčního činidla, či stabilizátoru, ale i změnou pH, či teploty lze ovlivňovat velikost, morfologii a tvar vznikajících částic (45).

Z této oblasti nejvyužívanější metodou je metoda podle Lee a Miesela, kde se k redukcí stříbrné soli využívá citrát sodný ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ). Oproti syntéze v přítomnosti  $\text{NaBH}_4$  vznikají částice větších rozměrů. Při nastavení vhodných parametrů mají částice stříbra vzniklé citrátovou syntézou velikost 30-120 nm a absorpční maximum okolo 420 nm. Princip této metody využili ke svým experimentům S.Miljanić a kol., kteří k vařicímu roztoku  $\text{AgNO}_3$  přidali 1%(w/v) roztok citrátu sodného. Takto vzniklé částice měly další využití v Ramanově spektroskopii (46). K.G. Stampelcoskie a kol. se věnovali přípravě stříbrných částic také citrátem sodným, a jako stabilizační činidlo využili L-arginin a poly(vinylpyrrolidon) (PVP) (47). Poté byly částice ozářeny LED diodami a se změnou vlnové délky bylo možné měnit jejich velikost a tvar (47). Khan Z. a Talib A. se ve své práci zaměřili na přípravu částic stříbra v přítomnosti stříbrné soli, cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) a aminokyselin, v tomto případě cysteinu. Ač měli částice vzniklé touto cestou absorpční maximum při 450 nm, absorpční pík byl viditelný v oblasti od 350 do 650 nm, což poukazuje na částice větších velikostí, s vyšší polydisperzitou a tendencí agregovat (48).

Jeden ze způsobů syntézy stříbrných částic, který nevyužívá toxické chemické látky a je tak šetrný k životnímu prostředí, je Tollensův způsob. Princip metody závisí na tvorbě amoniakálního komplexu  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ , který je v bazickém prostředí redukován pomocí cukrů. Mezi použitelné monosacharidy patří především glukosa a galaktosa, v případě disacharidů je to maltosa a laktosa. Metoda formuje částice o velikosti 25-400 nm v závislosti

na zvoleném cukru, koncentraci amoniaku a hodnotě pH. Zatímco koncentrace amoniaku a pH ovlivňují velikost částic, vliv redukujícího cukru může měnit i jejich tvar (49). Neméně důležitá se jeví i závislost na teplotě procesu, jenž může ovlivňovat nejenom velikost vznikajících částic, ale i jejich velikostní distribuci nebo stabilitu. Další změny vlastností může vyvolat i přítomnost povrchově aktivní látky – takto vzniklé částice mají rozměry od 20 do 70 nm (50).

## **2.7 Metody přípravy nanočástic zlata**

Pro přípravu nanočástic zlata mohou být využity nejrůznější metody, každá z nich však poskytuje částice jiného tvaru a jiných velikostí. Proto je třeba uvážit k jaké aplikaci budou nadále sloužit. Stejně jako v případě stříbra, i zde je celý proces syntézy založen na nukleaci a následném růstu tuhé fáze. Nabízí se široké spektrum redukčních činidel, které může být pro syntézu využito – např.  $\text{NaBH}_4$ , citrát sodný, hydrazin nebo hydroxylamin.

Syntéza nanočástic zlata může být provedena i bez přítomnosti redukčního činidla, a to pomocí mikrovln, kdy pro jejich vznik postačí voda a zlatá sůl. To poukazuje na skutečnost, že mohou být vyráběny i rychlou, bezpečnou a ekologicky šetrnou cestou(51).

Ovšem i aminokyseliny mají své uplatnění při syntéze nanočástic zlata – nejčastěji pak tryptofan. Studie potvrzují, že tryptofan může plnit funkci stabilizačního i redukčního činidla, a změnou teploty lze ovlivnit i tvar vzniklých částic zlata(52).

Z dispergačních metod lze využít laserovou ablací(53), přičemž její princip je obdobný jako v případě stříbra (kapitola 2.6.1).

## **2.8 Nanomateriály a aminokyseliny**

Chemická literatura obsahuje mnoho článků o pochopení role aminokyselin k syntéze a charakterizaci různých tvarů a velikostí stříbrných, či zlatých nanočástic. Již Khan a kol. naznačili, že rozdílné složení postranních řetězců u různých aminokyselin může mít na chování samotných částic vliv (48).

J.A.Jacob a kol. se ve svém studiu zabývali tím, jak lze biologicky významné molekuly využít pro přípravu a stabilizaci stříbrných nanočástic. Za redukční činidlo si zvolili aminokyselinu tryptofan, který zároveň plnil i funkci stabilizátoru. Ukázalo se, že syntéza stříbrných částic je touto cestou možná, ovšem jsou poměrně nestabilní a již po krátké době začínají podléhat agregaci(54).

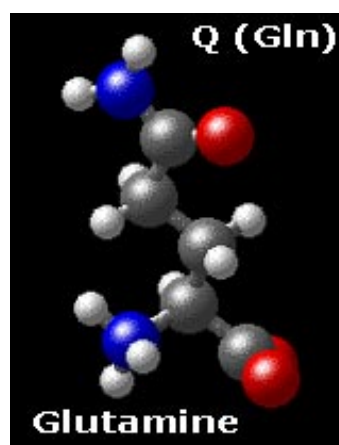
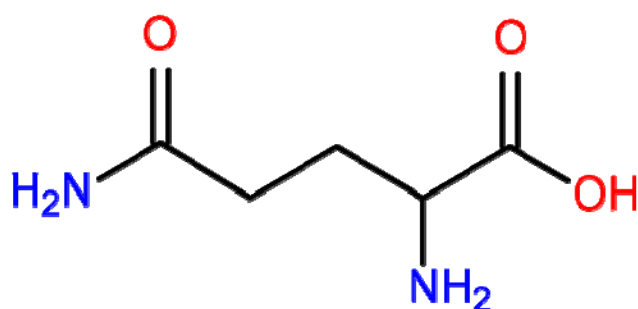
Aminokyseliny se také jeví jako vhodné látky pro funkci ochranné povrchové vrstvy zlatých nanočástic. Afinitní pro zlato jsou ty aminokyseliny, které obsahuje  $-\text{NH}_2$  i  $-\text{SH}$  skupinu, jako



je například L-cystein. Obecně mají aminokyseliny schopnost naadsorbovat se na povrch zlaté nanočástice již při jejím vzniku a plnit funkci redukčního činidla (55).

### 2.8.1 Glutamin

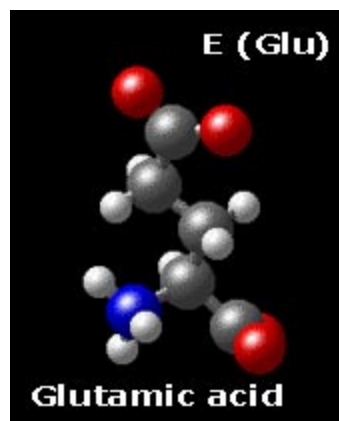
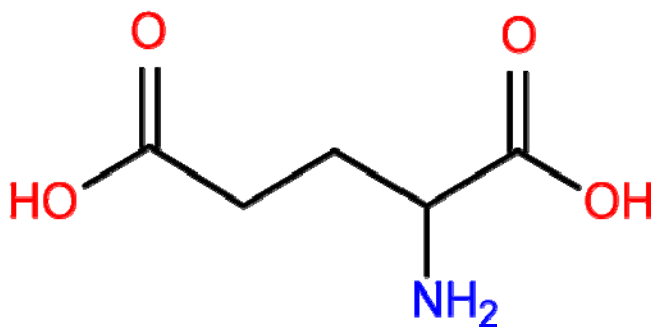
Glutamin (Gln, Q) je glukogenní neesenciální aminokyselina. Může být syntetizována všemi tkáněmi v těle. Narozdíl od mnoha jiných aminokyselin má dvě aminové poloviny –  $\alpha$ -aminoskupinu a amidovou skupinu. Její charakteristickou funkcí je důležitost jako přenašeče dusíku či při transportu amoniaku z povrchu do útrob orgánů. Glutamin dále zajišťuje funkci prekurzoru dusíku při syntézách purinu a pyrimidinu v buňkách. Převážně u rostlin slouží jako zásobárna aktivního dusíku. (56,57)



Obr.8 a 9: Vzorec a 3D model glutaminu

### 2.8.2 Glutamová kyselina

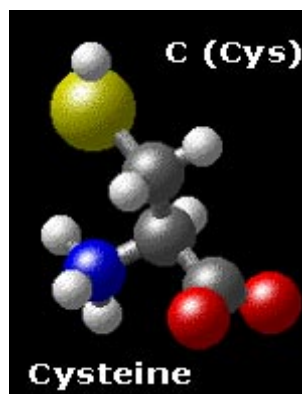
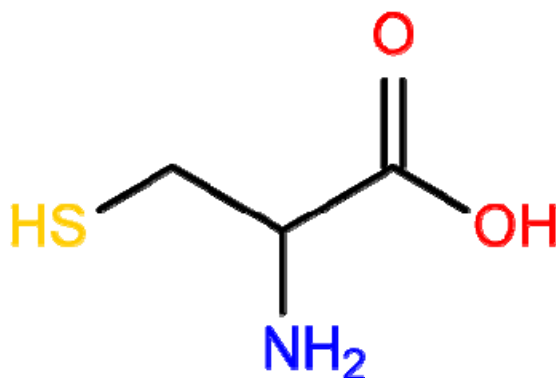
Glutamová kyselina (Glu, E) se řadí mezi glukogenní neesenciální aminokyseliny. Obsahuje ve svém vzorci dvě karboxylové skupiny. a proto vykazuje slabě kyselou reakci. Průmyslově se vyrábí hydrolýzou bílkovin a následně dělením směsí různých aminokyselin. Uplatňuje se zejména při přenosu  $-NH_2$  skupin mezi ostatními aminokyselinami. V potravinářství zaujímá funkci stabilizátoru barviv, nebo antioxidantů a je označena kódem E 620. Je nejdůležitějším budivým neurotransmiterem v sítnici a centrální nervové soustavě. (57,58)



Obr.10 a 11: Vzorec a 3D model glutamové kyseliny

### 2.8.3 Cystein

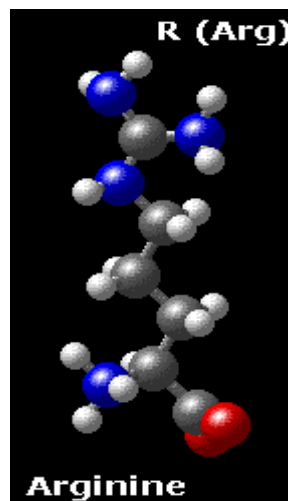
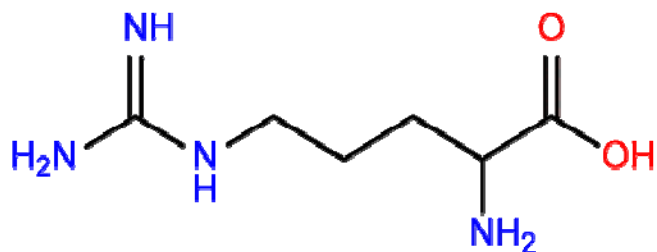
Cystein (Cys, C) náleží do skupiny glukogenních aminokyselin. Bývá syntetizován ze serinu, kde atom síry je poskytován methioninem. Ve struktuře cysteinu je obsažena thiolová skupina –SH, což je skupina velice reaktivní a má schopnost snadno se oxidovat a tvořit disulfidovou vazbu. Díky přítomnosti –SH skupiny má cystein polární charakter a již ve slabě kyselém prostředí disociuje. Thiolová skupina je přítomna i v aktivním místě některých proteolytických enzymů. (57)



Obr.12 a 13: Vzorec a 3D struktura cysteinu

### 2.8.4 Arginin

Arginin (Arg, R) je nejzásaditější aminokyselinou. Je glukogenní a řadíme ji mezi tzv. semiesenciální aminokyseliny - pro dospělého člověka je neesenciální, pro děti je však esenciální. Je meziproduktem močovinného cyklu, kde vzniká z ornithinu. V současnosti se arginin stává běžnou složkou potravinových doplňků, neboť urychluje tvorbu svalové hmoty a také napomáhá při její regeneraci. Z přirozených zdrojů je nejvíce obsažen v burských ořechách, zeleném hrášku, čokoládě či obilovinách. (57,59)



Obr.14 a 15: Vzorec a 3D model argininu

## 2.9 Ramanova spektroskopie

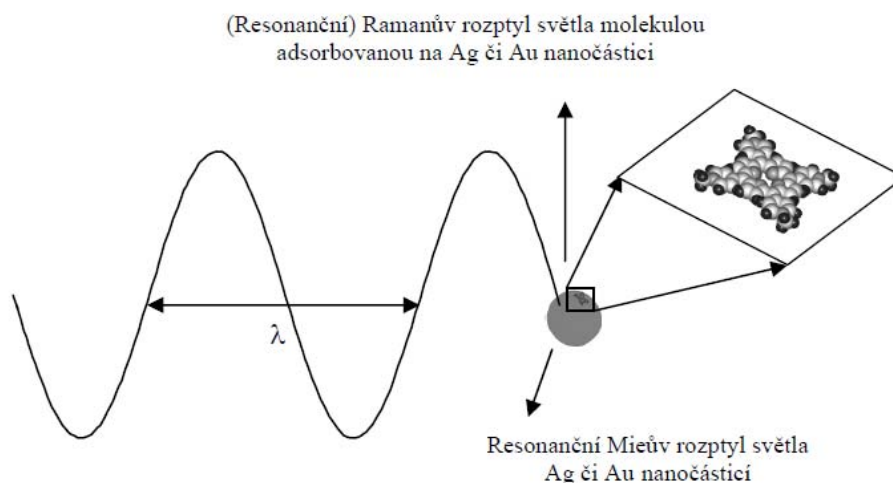
Ramanova spektroskopie je založena na nepružném rozptylu monochromatického světla. Ve spektru se společně se slabou Ramanovou linií vyskytuje i velice silná Rayleighova linie (elastický rozptyl). Elasticky rozptýlené světlo vytváří pozadí spektrometru, které může být intenzivnější než Ramanovy linie. V tzv. Ramanově efektu světlo neelasticky prochází vzorkem a dochází k posunu frekvence charakteristických molekulárních vibrací. Již od svého objevu v roce 1927 přitahuje pozornost od základního výzkumu až po specifické spektroskopické aplikace. Nástup laserového světla se zdrojem monochromatických fotonů se stal mezníkem v historii Ramanovy spektroskopie a vyústil ve výrazné zlepšení signálu Ramanova rozptylu. Dnes jsou známy laserové fotony v široké škále frekvencí, od ultrafialové až po blízkou infračervenou oblast, což umožňuje nastavení ideálních excitačních podmínek pro každý vzorek. Blízká infračervená oblast má zvláštní význam pro ultracitlivou Ramanovu spektroskopii, která pracuje na úrovni jedné molekuly, což nemusí být vždy pravidlem. Detekce na úrovni jedné molekuly může nastat i s excitační vlnovou délkou laseru 532 nm, či 633 nm. (60, 61)

Stejně jako u optické spektroskopie, i Ramanova spektroskopie může být použita téměř v každém prostředí a ani samotný vzorek nevyžaduje speciální přípravu. Pomocí konfokálního mikroskopu, jenž může být součástí spektrometru, lze pozorovat i vzorky o objemu asi  $1 \mu\text{m}^3$ , což umožňuje detekci chromozomů a buněk. (60, 61)

Jednou z hlavních výhod Ramanova spektroskopu je schopnost poskytovat velké množství informací o molekulární struktuře vzorku. Ze spektra tak lze vyčíst chemickou strukturu vzorku, ale i složení velmi složitých systémů, jakými jsou biologické materiály. (60, 61)

Některé substráty jsou schopny zesilovat Ramanův signál a nazývají se SERS aktivními substráty. Tyto substráty jsou většinou kovové částice o rozměrech v řádech nanometrů, nejběžnější jsou zlaté a stříbrné nanočástice o rozměrech 10-150 nm. (61)

Principem povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) je interakce viditelného záření s nanočásticemi kovů, jež mají na svém povrchu plasmon (nejčastěji zlaté a stříbrné částice), a s molekulami naadsorbovanými na jejich povrchu. Dopadající záření je zesilováno přítomnou nanočásticí pomocí Mieho rozptylu dopadajícího záření. V případě dopadu záření, které splňuje pravidla Mieho rozptylu, na přítomnou částici, se vodivostní elektrony v částici rozkmitají a frekvence toho kmitání je shodná s frekvencí dopadajícího záření. Na povrchu částice vzniká oscilující dipól, jehož intenzita má maximální hodnotu při splnění podmínek Mieho rozptylu. Pro stříbrné nanočástice se toto maximum rovná 390 nm, pro zlato je maximální hodnota 520 nm. Nanočástice zde plní funkci optických zesilovačů. (62)



Obr.16: Schéma mechanismu povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS)(62)

### 2.9.1 Komponenty Ramanova spektrometru

Ramanova spektroskopie v roce 1928 používala rtuťových lamp jako zdroje záření. Od roku 1960 se jako ideální monochromatické záření začaly využívat lasery – rubínový laser (694 nm), He-Ne laser (632,8 nm), Ar<sup>+</sup> laser (488 a 514,4 nm), GaAs diodový laser (780 nm) a Nd:YAG laser (1064 nm). Světelný tok nezbytný pro záznam Ramanových spekter je od 10 do 1000 mV. Všechny lasery ve viditelné části spektra, ale i laser o vlnové délce 780 nm, mohou excitovat i fluorescenční spektra a způsobovat překryv spekter. S laserem o vlnové délce 1064 nm je však pravděpodobnost fluorescence minimální. (60)

Klasické Ramanovo uspořádání, využívá Ramanova záření vystupujícího v úhlu  $90^\circ$  ke směru excitovaného záření. Toto uspořádání se používá při osvětlení vstupní štěrbinou mřížkového spektrometru, avšak pokud má interferometr vstupní kruhovou štěrbinu, je lepší analyzovat intenzitu Ramanova záření pod úhlem  $180^\circ$  vzhledem k záření excitovanému. Aby bylo možné zaznamenat Ramanova spektra dostatečně kvalitně, spektrální záření vzorku musí být maximální. Ramanova spektra jsou velmi slabá a nadměrná síla excitujícího záření může zničit vzorek. Proto zejména poměr použité intenzity Ramanova záření na vstupní clonu oproti intenzitě excitovaného záření musí být vhodně zvolen. Při průchodu záření vzorkem dochází ke ztrátě 99% intenzity tohoto záření, a proto jsou v okolí vzorku umístěna zrcadla, která odráží záření zpět na vzorek. Díky soustavě mikroskopů jsou Ramanovým spektrometrem pozorovatelné i mikrovzorky. Mikroskopy jsou schopny přizpůsobit se vzorku, pozorovat jej pod viditelným světlem a jsou upraveny i pro excitaci a pozorování Ramanových spekter. Tyto mikroskopy dokonce umožňují konfokální pozorování s 3D prostorovým rozlišením. Jejich optická vodivost je však poměrně malá, a proto je třeba obzvláště mikrovzorky pozorovat delší dobu. Tuto nevýhodu nelze kompenzovat větším množstvím laserového záření, protože by došlo k přehřátí a znehodnocení vzorku. (60)

Rayleighovy linie jsou  $10^6$  až  $10^{12}$  silnější než linie Ramanovy, a proto u běžných spektrometrů je Ramanův rozptyl zcela pohlčen rozptylem Rayleighovým a je nedetekovatelný. Proto musí být Rayleighův rozptyl zcela odstraněn, aby bylo možno dosáhnout maximální intenzity Ramanova signálu na pozadí. Absorpční filtry složené z roztoku s příslušnými skupinami, nebo skleněné filtry s absorpčními hranami jsou schopny absorbovat Rayleighovo záření. Filtry interferenční také odrážejí celé spektrum, s výjimkou té spektrální čáry, která má nejvyšší propustnost. Intenzita Rayleighovy linie tak může být snížena odrazem na filtru. Kombinace těchto dvou filtrů pak tvoří velmi efektivní Rayleighův filtr. Stejně filtry se používají i pro potlačení nežádoucích plasmatických linií laserového záření, které vznikají po excitaci Ramanových spekter. Holografické laserové filtry odrážejí laserové záření o více jak 90%. Podobnou konstrukci mají i tzv. Holopexové přenosové mřížky, které umožňují záznam Ramanových spekter na CCD kameru. (60)

Intenzita Ramanových linií se prudce snižuje při průchodu monochromátorem. Každý monochromátor má prostupnost pouze 30%, dvojitý tedy pouze 9% a trojitý dokonce jen 2,7%. I přesto jsou používány pro záznam Ramanových spekter spolu s detektory. Pořadí monochromátorů je dáno tím, zda má být zaznamenáno celé spektrum, nebo pouze jeho část. Další části Ramanova spektrometru jsou interferometry, jež zaznamenávají interferogram spektra a pracují na principu Fourierovy transformace. Jejich hlavní funkcí je korekce šumu.

Jako detektory se nejdříve uplatňovaly fotodestičky. Nyní jsou nahrazeny CCD kamerami a polovodiči z oxidů kovů, kde náboj produkuje světelná kvanta uložená na malém prostoru – pixely. Takové pole tvořené z jednotlivých pixelů pak podá celkový obraz s nižším, či vyšším rozlišením. Tepelný šum detektorů se dá odstranit ochlazením například kapalným dusíkem.(60)

### **2.9.2 Povrchový plasmon**

Povrchové plasmony jsou středem zájmů mnoha vědních oborů – od fyziky a chemie, až po výzkum materiálů, či biologii. Obnovený zájem o problematiku povrchových plasmonů začal v době rozvoje nanomateriálů, což přispělo k odhalení jejich nových vlastností, a tím se uzpůsobovaly pro konkrétní aplikace. Dnes jsou pro svůj potenciál zkoumány hlavně v optice, mikroskopii, při vývoji solárních článků, či pro detekci biologicky významných molekul.

Povrchové plasmony jsou vlny, které se šíří po povrchu vodiče (kovové částice). Přesněji se dají popsat jako světelné vlny, jež jsou chyceny na povrchu kovových částic z důvodu jejich interakce s volnými elektrony těchto částic. U této interakce pak volné elektrony odpovídají celkové oscilaci v rezonanci se světelnými vlnami. Resonanční interakce mezi povrchovým nábojem oscilace a elektromagnetického pole světla odpovídá povrchovému plasmonu a vede k jeho jedinečným vlastnostem (63). V důsledku přítomnosti povrchového plasmonu u nanočástic ušlechtilých kovů, mají tyto částice charakteristické zbarvení roztoku. Nejsilněji se projevuje u částic v rozmezí 10-100 nm, a proto vlastnosti jako velikost, tvar, či složení částic přítomných v koloidním roztoku mají vliv na šířku jeho pásu v absorpčním spektru (64).

### **2.9.3 Povrchový plasmon u kulatých kovových nanočástic**

Silná optická extinkce kovových nanočástic vzniká díky elektrodynamickému jevu, známému jako povrchové plasmony. Ty jsou generovány kolektivní excitací volných elektronů v důsledku charakteristické elektromagnetické frekvence.

Povrchové plasmony mohou být rozděleny do dvou typů – lokální plasmonové resonance, kde je dopadající světlo absorbováno, nebo rozptýleno kmitajícími elektrickými dipóly v kovové nanočástici. Druhým typem je povrchová plasmonová polarizace, která se šíří podél kovových povrchů ve vlnách v určité vzdálenosti od místa původu. Jsou důležité pro tvorbu lokálních faktorů, které zvyšují počet lineárních a nelineárních optických efektů v blízkosti povrchu kovu. Kovové nanostruktury někdy podporují oba typy současně – ve skutečnosti tak může být obtížně oddělit jednu od druhé. Plasmonová interakce kovových nanočástic se světlem

rozšiřuje škálu optických jevů, které mohou být užitečné pro další výzkum. Jsou jimi rezonanční rozptyl světla (RLS), povrchová plasmonová resonance (SPR) a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). (65)

## **2.10 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)**

Mezi experimentální metody, bez kterých se moderní věda, zejména nanotechnologie, neobejde, patří transmisní elektronová mikroskopie. Unikátnost metody spočívá v možnosti sledovat objekty v rozmezí od několika mikrometrů až po velikost atomu. I když je TEM obdobou světelného mikroskopu, světelný zdroj zde nahrazují elektrony, umístěné v elektronové děle. Místo klasických skleněných čoček, TEM využívá čočky elektromagnetické a funkci okuláru plní fluorescenční stínítko. Je nezbytné, aby celá dráha, kudy prochází elektrony, byla ve vakuu, a to z několika důvodů. Prvním důvodem je absorpce elektronu ve vzduchu, dalším pak přítomnost jiných molekul ve vzduchu, které by mohly způsobit kontaminaci vzorku. (66)

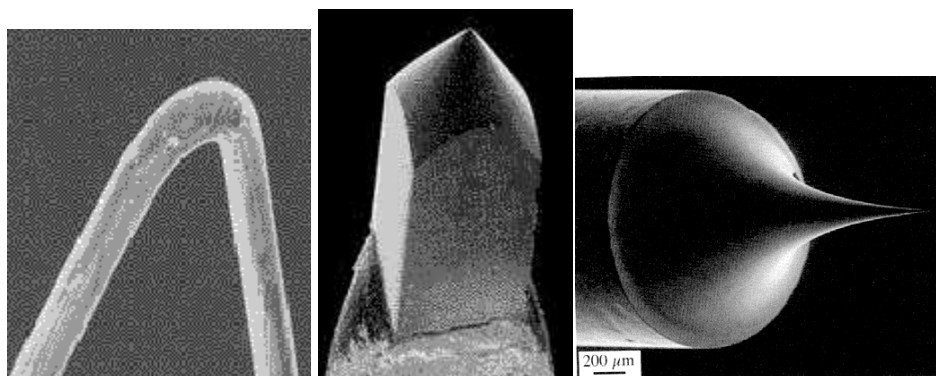
### **2.10.1 Základní konstrukce TEM**

Součástí každého transmisního elektronového mikroskopu jsou čtyři hlavní části – tubus, obsahující elektronovou optiku, systém pro udržení vakua, elektronika a software(66).



*Obr.17: Transmisní elektronový mikroskop JEM 2010 (Jeol, Japonsko)*

Zdroje elektronů používané v TEM dělíme na termoemisní a autoemisní. Termoemisní zdroje pracují na principu průchodu elektrického proudu, kdy dochází k zahřátí vlákna, a tím se uvolňují elektrony. Řadíme mezi ně například wolframové vlákno, či krystal  $\text{LaB}_6$ . Pokud elektrony emituje studené wolframové vlákno, které je vyleptané do hrotu, nazýváme tento zdroj jako autoemisní. Do této skupiny patří autoemisní katoda (FEG).(67)



*Obr.18: Zdroje elektronů – wolframové vlákno,  $\text{LaB}_6$  krystal a autoemisní zdroj(68)*

Elektromagnetické čočky pro využití v transmisní elektronové mikroskopii mají tvar prstenců a vyrábějí se z velmi čistého železa. Jsou zasazeny v cívkách a napájeny stejnosměrným proudem. Jako celý tubus, tak i elektromagnetické čočky jsou umístěny ve vakuu. Jejich zvětšení lze ovlivňovat změnou proudu protékajícího čočkami. Nevýhodou čoček může být přítomnost velkého množství optických vad (67):

- vady sférické – zvětšení na krajích obrazu je jiné než uprostřed a to proto, že čočka není schopna zaostřovat všechny vystupující paprsky opět do jediného bodu
- vady chromatické – elektrony ve svazku mají rozdílné energie, proto jsou elektrony s menší rychlostí vychylovány jinak než elektrony rychlejší
- osový astigmatismus – důsledek nesymetrie magnetického pole, především kvůli přítomnosti nečistot (68)

Zobrazovací soustava je tvořena držákem na preparát, objektivem, mezičočkami, projektivou a nakonec fluorescenčním stínítkem, na němž pozorujeme výsledný obraz. Do držáku se umísťuje síťka se vzorkem, kterou lze libovolně posouvat a naklánět. Objektiv je čočkou s nejvyšším výkonem, může dosahovat nejvyššího zvětšení a jeho ohnisková vzdálenost je nejkratší. Prochází jím proud a může docházet k jeho přehřátí, proto bývá chlazen vodou. V okolí objektivu bývá umístěno i antikontaminační zařízení, které má schopnost zmrazit okolí vzorku a zabránit tak jeho kontaminaci. Projektivy a mezičočky slouží ke zvětšení obrazu na požadovanou velikost. K převedení elektronů prošlých vzorkem a dále celým



zobrazovacím systémem do viditelného světla slouží fluorescenční stínítko. Bývá potaženo vrstvou ZnS a má schopnost emitovat světlo o vlnové délce 450-550 nm. (68)

Výstupní obraz z transmisního elektronového mikroskopu je trvalý. Lze jej zaznamenat na speciální fotografický materiál, nebo na v současné době používanější a oblíbenější CCD kameru. Při záznamu na fotografický materiál se využívá fotografické komory obsahující fotografické filmy. Komora je umístěna pod stínítkem TEMu. Výsledný obraz má vyšší rozlišení než obraz pořízený pomocí CCD kamery.

### **2.10.2 Příprava vzorků pro měření v TEM**

Aby mohly vzorkem projít elektrony, musí být dostatečně tenký a malý. Základem je volba vhodného materiálu podložní sítě. Využívají se sítě měděné, hliníkové nebo křemíkové, přičemž každá z nich musí být potažena folií. Nanopráškové materiály se nejdříve dispergují ve vhodném roztoku, potom se nakápnou na síťku a vysuší. (67)

### **3. Experimentální část**













































































































## 7. Seznam použité literatury a obrázků

1.	Gerber, Ch.; Lang, H. P.: <i>Nature Nanotechnology</i> 1, (2006), 3 – 5.
2.	Valcárcel, M.; Simonet, B. M.; Cárdenas, S.: <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> , (2008), 391, 1881 – 1887.
3.	Bo Hu et al: <i>J. Phys. Chem. C</i> , (2008), 112, 11169–11174.
4.	Kvítek, L.; Panáček, A.: <i>Základy koloidní chemie</i> , Olomouc 2007
5.	Komers, K.: <i>Základy koloidní chemie</i> . 1. vyd., Univerzita Pardubice, Pardubice, 1996.
6.	Bartovská, L.; Šišková, M.: <i>Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav</i> . 5. vyd., VŠCHT Praha, 2005.
7.	Novák J. a kol: <i>Fyzikální chemie II</i> , VŠCHT Praha, 2001.
8.	Novák J.; Bartovská L.; Cibulka I., et al. <i>Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz</i> , VŠCHT Praha, 2009.
9.	Pouchý J.: <i>Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav</i> , VŠCHT Praha, 1999.
10.	Vojuckij, S. S.: <i>Kurs koloidní chemie</i> , SNTL Praha, 1984.
11.	Ščukin, E. D.; Percov, A. V.; Amelinová, E. A.: <i>Koloidní chemie</i> . 1. vyd. Academia Praha, 1990.
12.	Kvítek L.: <i>Metody studia koloidních soustav</i> , PřF UP Olomouc, 2006, prozatímní text.
13.	Vacík, J.: <i>Fyzikální chemie</i> . 1. vyd. Nakladatelství technické literatury, Praha 1971.
14.	Vodražka Z.: <i>Fyzikalni chemie pro biologické vědy</i> , Academia, Praha 1982.
15.	Polčík, M., <i>Chemagazín</i> , (2010), 4, 28-29.
16.	Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y.: <i>Advances in Colloid and Interface Science</i> , (2009), 145, 83-96.
17.	Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L.: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , (2003,) 125 (46), 13940–13941.
18.	Link, S.; El-Sayed, M. A.: <i>Journal Phys. Chem. B</i> , (1999), 103, 8410–8426.
19.	Lara, H. H.; Ayala-Nunez, N. V.; Turrent, L. D. I.; Padilla R.C.: <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , (2010), 26, 615-621.
20.	Martínez-Castanón, G. A.; Nino-Martínez, N.; Martínez-Gutierrez, F.; Martínez-Mendoza, J. R.; Facundo, R.: <i>J. Nanopart. Res.</i> , (2008), 10, 1343-1348.
21.	Kvítek L.; Pucek R.: <i>Journal of materials chemistry</i> , (2005), 0022–2461.

22.	P.V. Kamat, <i>J. Phys. Chem. C</i> , (2007), 111, 2834–2860.
23.	Willey, B. J., et al.: <i>J. Phys. Chem. B</i> , (2006), 110, 15666 – 15675.
24.	Daniel, M. C.; Astru, D.: <i>Chem. Rev.</i> (2004), 104, 293-346.
25.	Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A.: <i>Phys. Chem. B</i> , (2006), 110, 7238–7248.
26.	Soukupova, J., et al.: <i>Material Chemistry and Physics</i> , (2008), 111, 77-81.
27.	Šišková, K.: <i>Disertační práce</i> , Praha, 2006.
28.	Dolgaev, S. I.; Simakin, A. V.; Voronov, V. V.; Shafeev, G. A.; Bozon-Verduraz, F.: <i>Applied Surface Science</i> , (2002), 186, 546–551.
29.	Šmejkal, P., et al: <i>Spectrochimica Acta Part A</i> , (2003), 59, 2321-2329.
30.	Tsuji, T.; Thang, D. H.; Okazaki, Y.; Nakanishi, M.; Tsuboi, Y.; Tsuji, M.: <i>Applied Surface Science</i> , (2008), 254, 5224-5230.
31.	Zamiri, R.; Azmi, B. Z.; Sadrolhosseini, A. R.; Ahangar, H. A.; Zaidan, A. W.; Mahdi, M. A.: <i>In J Nanomedicine</i> , (2011), 6, 71-75.
32.	Prucek, R.; Kvítek, L.; Hrbáč, J.: <i>Acta Univ. Palacki Olomouc</i> , (2004), Chemica 43.
33.	Hajiesmaeilbaigi, F., et al.: <i>Laser Physics Letters</i> , (2006), 5, 252-256.
34.	García-Barrasa, J.; Lopéz-de-Luzuriaga, J. M.; Monge, M.: <i>Cent. Eur. J. Chem.</i> , (2011), 9, 7-19.
35.	Yoksan, R.; Chirachanchai, S.: <i>Material Chemistry and Physics</i> , (2009), 115, 296-302.
36.	Nagata, Y., et al.: <i>Radiation Research</i> , (1996), 146, 333-338.
37.	Chen, P., et al.: <i>Radiation Physics and Chemistry</i> , (2007), 76, 1165-1168.
38.	Panáček, A.: <i>Disertační práce</i> , Olomouc, 2006.
39.	Heinglein, A.: <i>Chem. Mater.</i> , (1998), 10, 444 – 450.
40.	Song, K.C., et al.: <i>Korean J. Chem. Eng.</i> (2009), 26, 153-155.
41.	Gulrajani, M. L., et al.: <i>Journal of Applied Polymer Science</i> , (2008), 108, 614-623.
42.	Creighton, J. A.; Blatchford, Ch. G.; Albrecht, M. G.: <i>J. Chem. Soc. Farad. Trans. II</i> , (1979), 75, 790-798.
43.	Kim, J., et al: <i>Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects</i> , (2008), 313-314, 158-161.
44.	Leopold, N.; Lendl, B.: <i>J. Phys. Chem. B</i> , (2003), 107, 5723-5727.
45.	Goia, D. V.; Matijevic, E.: <i>New J. Chem.</i> , (1998), 1203 – 1215.
46.	Miljanic, S.; Dijanosic, A.; Meic, Z.: <i>Spectrochimica Acta Part A</i> , (2010), 75,

	1008-1012.
47.	Stamplecoskie, K. G.; Scaiano, J. C.: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , (2010), 132, 1825 – 1827.
48.	Khan, Z.; Talib, A.: <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , (2010), 76, 164–169.
49.	Panáček A.; Kvítek L.; Prucek R.; Kolář M.; Večeřová R.; Pizúrová N.; Sharma K.; Nevěčná T.; Zbořil R.: <i>J. Phys. Chem. B</i> , (2006), 110, 16248.
50.	Le, Anh-Tuan , et al.: <i>Current Applied Physics</i> , (2010), 10, 910-916.
51.	Vargas-Hernandez, C.; Mariscal, M. M.; Esparza, R.; Yacaman, M. J.: <i>Applied Physics Letters</i> , (2010), 96, 213115 - 213115-3.
52.	Iosin, M., Baldeck, P., Astilean, S.; <i>Journal of Nanoparticle Research</i> , (2010), 12, 2843-2849.
53.	Šišková, K., Pfleger, J., Procházka, M.; <i>Applied Surface Science</i> , (2010), 2979-2987.
54.	Jakob, J. A.; Naumov, S.; Mukherjee, T.; Kapoor, S.: <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , (2011), 87, 498– 504.
55.	Mocanu, A.; Cernicab, I.; Tomoaiac, G.; Bobova, L. D.; Horovitz, O.; Tomoiaia-Cotisel, M.: <i>Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects</i> , (2009), 338, 93 -101.
56.	Souba, W.W., et al.: <i>JPEN J Parenter Enteral Nutr September</i> , (1985), 9, 608-617.
57.	<a href="http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/motor/main.obsah.html">http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/motor/main.obsah.html</a> dne 23.2.2012
58.	Ehlers, D. B.: <i>Encyclopedia of Biological Chemistry</i> , Four-Volume Set, 1-4.
59.	<a href="http://www.celostnimediceina.cz/arginin.htm">http://www.celostnimediceina.cz/arginin.htm</a> dne 23.2.2013
60.	Lindon, J. C.: <i>Encyclopedia of Spectroscopy and Spektrometry</i> , Academia Press, 3. vyd., Londýn, 2000.
61.	Kneipp, K., et al.: <i>Chemical Reviews</i> , (1999), 99, 2957-2976.
62.	Strauch, B.; Vlčková, B.; Němec, I.: <i>Chem. Listy</i> , (2010), 104, 1210-1219.
63.	Barnes, W. L.; Dereux, A.; Ebbesen, T. W.: <i>Nature</i> , (2003), 424.6950, 824-830.
64.	Link, S.; El-Sayed, M. A.: <i>The Journal of Physical Chemistry B</i> , (1999), 103.40, 8410-8426.
65.	Rotello, V.: <i>Nanoparticles – Building Blocks for Nanotechnology</i> , Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.
66.	<a href="http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf">http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf</a> dne 28.11.2012
67.	<a href="http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_tem.pdf">http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_tem.pdf</a> dne 28.11.2012
68.	<a href="http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf">http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf</a> dne 28.11.2012

69.	Kubičková, H.: <i>Diplomová práce</i> , Olomouc, 2012.
70.	Munro, C. H., et al.: <i>Langmuir</i> , (1995), 11, 3712-3720.
71.	Carron, K.T., Gayle Hurley, L.; <i>J. Phys. Chem.</i> , (1991), 95, 9979 - 9984.

### Seznam obrázků

1.	<a href="http://www.techmania.cz/edutorium/data/fil_1014.gif">http://www.techmania.cz/edutorium/data/fil_1014.gif</a> dne 20.1.2013
2.	<a href="http://beta.topperlearning.com/tpadmin/app/webroot/js/tinymce/jscripts/tiny_mce/plugins/imagemanager/files/tyndall-effect.jpg">http://beta.topperlearning.com/tpadmin/app/webroot/js/tinymce/jscripts/tiny_mce/plugins/imagemanager/files/tyndall-effect.jpg</a> dne 20.1.2013
3.	<a href="http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/figures/modely_elektricke_dvojrvtvy.jpg">http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/figures/modely_elektricke_dvojrvtvy.jpg</a> dne 20.1.2013
4.	Willey, B. J., et al.: <i>J.Phys.Chem. B</i> , (2006), 110, 15666-15675.
5.	Hajiesmaeilbaigi, F., et al.: <i>Laser Physics Letters</i> , (2006), 5, 252-256.
6.	García-Barrasa, J.; Lopéz-de-Luzuriaga, J. M.; Monge, M.: <i>Cent. Eur. J. Chem.</i> , (2011), 9, 7-19.
7.	Song, K.C., et al.: <i>Korean J. Chem. Eng.</i> (2009), 26, 153-155.
8.	<a href="http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/G/V/1/glutamine.png">http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/G/V/1/glutamine.png</a> dne 5.3.2013
9.	<a href="http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-glutamine.jpg">http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-glutamine.jpg</a> dne 5.3.2013
10.	<a href="http://0.tqn.com/d/chemistry/1/7/H/V/1/gluamic_acid.png">http://0.tqn.com/d/chemistry/1/7/H/V/1/gluamic_acid.png</a> dne 5.3.2013
11.	<a href="http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-glutamate.jpg">http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-glutamate.jpg</a> dne 5.3.2013
12.	<a href="http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/B/V/1/cysteine.png">http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/B/V/1/cysteine.png</a> dne 5.3.2013
13.	<a href="http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-cysteine.jpg">http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-cysteine.jpg</a> dne 5.3.2013
14.	<a href="http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/5/V/1/L-arginine.png">http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/5/V/1/L-arginine.png</a> dne 5.3.2013
15.	<a href="http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-arginine.gif">http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Graphics/MolStruct/L-arginine.gif</a> dne 5.3.2013
16.	Strauch, B.; Vlčková, B.; Němec, I.: <i>Chem. Listy</i> , (2010), 104, 1210-1219
17.	<a href="http://www.rcptm.com/wp-content/uploads/2010/11/JEM-2010-JEOL.jpg">http://www.rcptm.com/wp-content/uploads/2010/11/JEM-2010-JEOL.jpg</a> dne 28.11.2012
18.	<a href="http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_tem.pdf">http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_tem.pdf</a> dne 28.11.2012

## 8. Příloha























