

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

PŘÍPRAVA KATIONICKÝCH SLOUČENIN JAKO
POTENCIÁLNÍCH SURFAKTANTŮ ZLATÝCH NANOČÁSTIC

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Jana Částková
Školitel: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Školitel specialista: doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
Akademický rok: 2013/14

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV 260 062.

V Hradci Králové dne 28. 4. 2014

Jana Částková

Tímto bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. a prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za jejich rady a pomoc při zpracování této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře za jejich pomoc a dobrou pracovní atmosféru.

Obsah

1 Abstrakt.....	8
2 Úvod a cíl práce.....	10
3 Teoretická část	11
3.1 Povrchově aktivní látky.....	11
3.1.1 Charakteristika povrchově aktivních látek.....	11
3.1.2 Vlastnosti povrchově aktivních látek	11
3.1.3 Rozdělení povrchově aktivních látek	13
3.1.3.1 Aniontové povrchově aktivní látky.....	13
3.1.3.2. Kationtové povrchově aktivní látky	14
3.1.3.3. Amfoterní povrchově aktivní látky.....	15
3.1.3.4 Neionogenní povrchově aktivní látky	15
3.2 Zlaté nanočástice.....	15
3.2.1 Syntéza zlatých nanočástic.....	15
3.2.1.1 Redukce	16
3.2.1.2 Metoda růstu zárodků.....	17
3.2.2 Vlastnosti zlatých nanočástic	19
3.2.2.1 Povrchová plazmonová rezonance.....	19
3.2.2.2 Povrchově zesílené efekty	21
3.2.2.3 Fluorescence	21
3.2.2.4 Absorpce rentgenového záření.....	22
3.2.2.5 Optické vlastnosti.....	22
3.2.3 Využití zlatých nanočástic v biomedicíně	23
3.2.3.1 Cílené doručování látek.....	23
3.2.3.2 Protinádorová terapie	25
3.2.3.2.1 Specifické cílení zlatých nanočástic	25
3.2.3.2.2 Pasivní distribuce zlatých nanočástic do nádoru.....	26
3.2.3.2.3 Inhibice angiogeneze	26

3.2.3.2.4 Radioterapie s využitím zlatých nanočástic	26
3.2.3.2.5 Fototermální terapie	27
3.2.3.3 Snímání a zobrazování	27
3.2.4 Povrchová úprava zlatých nanočástic	29
3.2.4.1 Surfaktantové dvojvrstvy	30
3.2.4.2 Samoskladné monovrstvy	31
3.2.5 Cytotoxicita a biokompatibilita zlatých nanočástic	32
4 Experimentální část	34
4.1 Obecná experimentální část	34
4.2 Obecný postup syntézy	36
4.2.1 Příprava S-(12-bromdodecyl)thioethanoátu (1)	37
4.2.2 Příprava 12-bromdodekan-1-thiolu (2)	38
4.3 Příprava meziproductů	39
4.3.1 Příprava N,N,N-trimethyl-12-acetylsulfanyldodecyl-1-amonium-bromidu (3)	39
4.3.2 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)chinolinium-bromidu (4)	40
4.3.3 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)isochinolinium-bromidu (5)	41
4.3.4 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)pyridazinium-bromidu (6)	42
4.4 Příprava konečných produktů	43
4.4.1 Příprava N,N,N-trimethyl-12-sulfanyldodecyl-1-amonium-bromidu (7)	43
4.4.2. Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridinium-bromidu (8)	44
4.4.3 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)chinolinium-bromidu (9)	45
4.4.4 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)isochinolinium-bromidu (10)	46
4.4.5 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridazinium-bromidu (11)	47
5 Diskuse	48
6 Závěr	50
7 Použitá literatura	51

Seznam zkratek

AuNP	zlaté nanočástice (gold nanoparticles)
AuNR	zlaté nanotyčky (gold nanorods)
CMC	kritická micelární koncentrace (critical micellar concentration)
CPP	buňkami pronikající peptidy (cell penetrating peptides)
CT	počítačová tomografie (computer assisted tomography)
CTAB	cetyltrimethylamonium-bromid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
EPR	efekt zvýšené propustnosti a retence (enhanced permeability and retention effect)
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
i. v.	intravenózní
l. t.	laboratorní teplota
LSPR	podélná povrchová plazmonová rezonance (longitudinal surface plasmonic resonance)
NIR	blízká infračervená oblast spektra (near infrared)
NK	nukleová kyselina
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
Mr	relativní molekulová hmotnost
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)

MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MTAB	16-merkaptohexadecyltrimethylamonium-bromid
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
PAL	povrchově aktivní látky
PEG	polyethylenglykol
p.o.	perorální
RES	retikuloendoteliální systém
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RTG	rentgenové záření
SERS	povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (surface enhanced Raman spectroscopy)
siRNA	malá interferující RNA (small interfering RNA)
SPR	povrchová plazmonová rezonance (surface plasmonic resonance)
TEA	triethylamin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TOAB	tetraoktylamonium-bromid
TSPR	příčná povrchová plazmonová rezonance (transverse surface plasmonic resonance)
VEGF	vaskulární endoteliální růstových faktor (vascular endothelial growth factor)

1 Abstrakt

Název: Příprava kationických sloučenin jako potenciálních surfaktantů zlatých nanočástic.

Autor: Jana Částková

Zlaté nanočástice jsou široce zkoumány pro různé aplikace. Jejich povrch umožňuje velké množství chemických obměn. Ty jsou důležité pro modifikaci jejich vlastností v závislosti na účelu jejich využití. K modifikaci povrchu, ale i k syntéze zlatých nanočástic jsou využívány povrchově aktivní látky.

Cílem této práce byla syntéza nových typů surfaktantů v podobě kvarterních amoniových solí. Skládají se z dvanáctiuhlíkatého řetězce, thiolové funkční skupiny a kvartérního dusíku zabudovaného v různých funkčních skupinách. Struktura a čistota připravených látek byla potvrzena nukleární magnetickou rezonancí a hmotností spektrometrií.

Tyto látky by měly sloužit právě jako potenciální surfaktanty zlatých nanočástic. Thiolová funkční skupina v molekule by měla zajistit kovalentní vazbu surfaktantu na zlatou nanočástici, a tak nižší toxicitu, kdy by se surfaktanty z povrchu zlatých nanočástic neměly uvolňovat do jejich roztoku. Kvartérní amoniová skupina by měla zajistit dostatečnou rozpustnost ve vodě.

Title: Preparation of cationic compounds as potential surfactants of gold nanorods

Author: Jana Částková

Gold nanoparticles are widely studied for various applications. Their surface enables large amount of chemical variations. Those are important for modification of their characteristics depending on the intended purpose. For the surface modification as well as for the gold nanoparticle synthesis various surfactants are used.

Our aim was the synthesis of novel type of surfactants based in quaternary ammonium salts. They consist of 12 carbons linker, thiol functional group and quaternary nitrogen incorporated in various moieties. Structure and purity of the compounds were confirmed by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

Produced compounds should be used as potential surfactants of the gold nanoparticles. Thiol group in the molecule should ensure covalent bond of the surfactant to the nanoparticle and thus lower toxicity, when the surfactants shouldn't be released from the surface of the gold nanoparticles into their solution. Quaternary ammonium moiety should ensure sufficient solubility in water.

2 Úvod a cíl práce

Zlaté nanočástice (AuNP) jsou v současné době intenzivně zkoumány pro své zajímavé vlastnosti a velké možnosti potenciálního využití v biomedicínských aplikacích. Pro různé aplikace jsou však nutné různé obměny jejich povrchu. Pro využití v medicíně je pak zásadní jejich biokompatibilita a nízká toxicita.

Cílem této práce je syntéza nových povrchově aktivních látek (PAL) kationického typu. Jedná se o kvartérní amoniové soli s dvanáctiuhlíkatých řetězcem a thiolovou skupinou. Připravené látky by měly sloužit jako potenciální surfaktanty zlatých nanočástic. Díky koncové thiolové skupině by se mohly kovalentně vázat na povrch zlatých nanočástic, a tak minimalizovat uvolnění molekul PAL do roztoku. Pokud jsou totiž různé typy PAL vázané na jejich povrch nekovalentně, tvoří dynamické dvojvrstvy, kde se jednotlivé molekuly PAL mohou z povrchu desorbovat. Takto se mohou PAL uvolňovat do roztoku, což způsobuje jeho toxicitu zapříčiněnou interakcemi volných molekul PAL s různými biologickými systémy. Pokud bude počet volných PAL v roztoku u kovalentně vázaných látek minimální, může být minimální i jejich toxicita. Kvarterní amoniová skupina je pak důležitá pro rozpustnost ve vodě, a tak i pro distribuci obalených zlatých nanočástic v organismu.

3 Teoretická část

3.1 Povrchově aktivní látky

3.1.1 Charakteristika povrchově aktivních látek

Povrchově aktivní látky (PAL) se typicky skládají z polární a nepolární části. Polární skupina většinou obsahuje heteroatomy jako O, S, P nebo N obsažené ve funkčních skupinách jako thiol, alkohol, ester, sulfonát, amin apod. Nepolární skupinu obvykle tvoří uhlovodíkový řetězec alkylového nebo alkylbenzenového typu. Může obsahovat atomy halogenu nebo neionizované atomy kyslíku. Polární část vykazuje silnou afinitu k polárním rozpouštědlům, zejména k vodě [1], ve které je solvatována pomocí interakcí dipól-dipól nebo iont-dipól [2], a proto je nazývána hydrofilní [1]. Nepolární část pak vykazuje afinitu k nepolárním rozpouštědlům a nazývá se hydrofobní, nebo lipofilní. Látky obsahující v molekule polární i nepolární skupinu se označují jako amfifilní [1]. V důsledku této dvojí afinity amfifilním molekulám nevyhovuje ani polární, ani nepolární prostředí, a proto se hromadí na rozhraní fází (hranice v systému kapalina-kapalina, kapalina-pevná látka a kapalina-plyn) tak, aby polární skupina byla orientována do polárního prostředí, zatímco nepolární skupina se orientuje do nepolárního prostředí [1,3]. Aby se amfifilní molekuly chovaly jako povrchově aktivní látky, musí být tyto polární a nepolární vlastnosti ve víceméně rovnovážném stavu. Pokud by jedna z vlastností převažovala, tak by molekula zůstávala v jedné fázi a nehromadila by se na rozhraní [1]. PAL tak tvoří orientované monovrstvy na rozhraní a vykazují povrchovou aktivitu (tj. snižují povrchové a mezifázové napětí média, ve kterém jsou rozpuštěny). V některých použitích jsou definovány jako molekuly schopné asociovat za vzniku micel [2].

PAL mohou pocházet z přírodních nebo syntetických zdrojů. K přírodním PAL patří mýdla jako první poznané surfaktanty. Mýdla zůstaly jediné přírodní detergenty od 7. stol. n. l. až do počátku 20. stol. V roce 1916 se v důsledku 1. světové války objevil nedostatek tuků pro výrobu mýdla a díky tomu v Německu vyrobili první syntetický detergent [3].

3.1.2 Vlastnosti povrchově aktivních látek

PAL mají schopnost radikálně měnit povrchové napětí i mezifázové vlastnosti a uspořádávat se v micely. To má velké využití v oblasti nerostných surovin a ropy,

biologických systémů, prostředků pro zdraví a osobní hygienu, potravin a v ochraně plodin [2]. Svou adsorpcí na rozhraní výrazně mění jeho fyzikální vlastnosti. Tato adsorpce je spojena se silnými energetickými změnami, protože volná energie povrchově aktivní látky lokalizované na rozhraní je nižší než u jejích molekul rozpuštěných v obou fázích. Jejich akumulace na rozhraní je tedy spontánní proces, který vede ke snížení mezifázového (povrchového) napětí. Toto vykazuje řada látek, např. alkoholy s dlouhým nebo středně dlouhým řetězcem. Tyto látky však nejsou považovány za povrchově aktivní látky. Právě PAL se vyznačují schopností tvořit orientované monovrstvy na rozhraní (zde vzduch/voda nebo olej/voda) a samoskladné struktury (micely) uvnitř fází. Adsorpční i agregační jevy vyplývají z hydrofobního efektu, tj. vytlačení uhlovodíkových řetězců z vody, který vychází z toho, že intermolekulární interakce voda-voda jsou silnější než voda-uhlovodík [3].

Ve vodných roztocích se PAL ve zředěných koncentracích chovají jako běžné elektrolyty, ve vyšších koncentracích však vykazují velmi odlišné chování. Toto chování je vysvětleno zformováním velkého počtu molekul do organizovaných agregátů zvaných micely, ve kterých se lipofilní část PAL sdružuje dovnitř agregátu a hydrofilní část je vystavena do vodného prostředí. Tvorba micel ve vodném prostředí je obecně vnímána jako kompromis mezi tendencí alkylových řetězců vyhnout se energeticky nepříznivému kontaktu s vodou a touhou polárních částí udržovat kontakt s vodným prostředím [2].

Uhlovodíky a voda jsou vzájemně nemísitelné. Omezená rozpustnost hydrofobních molekul ve vodě může být přičtena hydrofobnímu efektu. Hydrofobní Gibbsova energie může být definována jako Gibbsova energie nutná pro převedení rozpuštěných uhlovodíků z uhlovodíkového rozpouštědla do vody. Tento přenos je doprovázen nárůstem Gibbsovy energie. Pokles entropie je považován za výsledek kolapsu normální vodíkově vázané struktury vody doprovázené tvorbou různě strukturované vody, často nazývané „ledovec“, kolem uhlovodíkových řetězců. Přítomnost hydrofobních molekul podporuje organizaci molekul vody do blízkosti uhlovodíkového řetězce. Pro minimalizaci velkého entropického efektu mají ledovce sklon tvořit klastry tak, aby se snížil počet zúčastněných molekul vody. Celý proces má tendenci přivádět uhlovodíkové řetězce k sobě, což je známo jako hydrofobní interakce. Molekulární interakce vznikají z tendence molekul vody získat jejich normální tetraedrickou strukturu. Spolu s přitažlivými disperzními silami mezi uhlovodíkovými

řetězci tak způsobí odstranění uhlovodíkových řetězců z ledovců vody vedoucí k asociaci (sdružení) hydrofobních řetězců [2].

Díky přítomnosti hydrofobního efektu se PAL adsorbují na rozhraní i při nízkých koncentracích. Při vyšší koncentraci PAL, známé jako kritická micelární koncentrace (CMC), se vytvoří molekulové agregáty nazývané micely. CMC je vlastností PAL a dalších faktorů jako teplota, tlak či přítomnost a povaha přísad, protože micelizace jde proti tepelným a elektrostatickým silám. Nízká CMC je podpořena stoupající molekulovou hmotností lipofilní části molekuly, snižováním teploty (obvykle) a přidavkem elektrolytů. Molekulová hmotnost PAL se obvykle pohybuje v rozmezí od několika stovek do několika tisíc. Při koncentraci PAL mírně nad hodnotu CMC mají PAL tendenci asociovat do sférických micel obsahujících 50-100 monomerů s poloměrem podobným délce uhlovodíkového řetězce. Vnitřní část micely je v podstatě složena z uhlovodíkových řetězců [2].

CMC hodnota je definována jako koncentrace, při níž je dosaženo maximální rozpustnosti monomerní molekuly v jednotlivých rozpouštědlech. Hodnoty CMC jsou důležité prakticky ve všech průmyslových odvětvích využívajících PAL od zpracování nerostných surovin po tvorbu produktů osobní hygieny a potravin, včetně systémů podávání léčiv. V těchto procesech musí být PAL přítomna v koncentraci, která je obvykle vyšší než CMC, protože největší efekt PAL ve snížení mezifázového napětí, emulgaci, stabilizaci suspenzí či podpoře stability pěny je dosažen, je-li přítomna velká koncentrace micel. Při koncentraci nad CMC se adsorpce PAL na rozhraní zvyšuje jen velmi málo. To znamená, že CMC často představuje hodnotu, při které je dosaženo maximální adsorpce na rozhraní [2].

3.1.3 Rozdělení povrchově aktivních látek

Nejčastější je klasifikace založená na disociaci PAL ve vodě. Ionogenní látky jsou schopné disociace ve vodě. Dělí se na aniontové, kationtové a amfoterní. Neionogenní látky nejsou schopné disociace ve vodě [1].

3.1.3.1 Aniontové povrchově aktivní látky

Aniontové PAL disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Jejich kationt je nejčastěji tvořen zásaditým kovem jako sodík nebo draslík [1]. Negativně nabitou skupinou bývá karboxyl, sulfát nebo sulfonát. Jejich hlavní použití je jako čisticí prostředky, produkty osobní péče, emulgátory a mýdla [3].

3.1.3.2. Kationtové povrchově aktivní látky

Kationtové PAL disociují za vzniku povrchově aktivních kationtů. Jejich aniont je pak nejčastěji tvořen halogenem [1].

Kationtové PAL jsou obecně dražší než aniontové z důvodu potřeby vysokých hydrogenačních tlaků při výrobě. K výrobě amoniových solí je pak potřeba sled reakcí, které jsou více či méně selektivní a ne vždy kompletní, proto jen část z výchozích surovin skončí jako požadovaný produkt [1].

Velká část těchto sloučenin odpovídá dusíkatým sloučeninám. Nejčastěji používané jsou mastné aminy nebo jejich soli a kvartérní deriváty. Mastné aminy však musí být použity v kyselém pH, aby jejich soli získaly kladný náboj. V amoniové struktuře poskytuje dusík 2 elektrony k vytvoření čtvrté vazby, a tak zůstává kladně nabitý [1]. U pravých kvartérních amoniových sloučenin jsou na kladně nabitý dusíkový atom vázány 4 uhlíkové atomy (řetězce) a v případě povrchově aktivních amoniových molekul je jeden nebo více z těchto substituentů lipofilní. Tato kationická molekula může existovat pouze v páru s aniontovou molekulou ve formě elektroneutrální soli [4].

Využití nachází v aplikacích využívajících jejich absorpce na povrchy, které jsou obvykle záporně nabitě (např. kovy, plasty, vlákna, minerály, vlasy a buněčné membrány) [3]. Jsou tak využívány jako antikoroziční a antistatická činidla, maziva, změkčovadla, aviváže a kondicionéry [3,5].

Jejich druhou vlastností je jejich baktericidnost [1]. Kvartérní amoniové soli s dlouhými alkylovými řetězci vykazují široké spektrum proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím při relativně nízkých koncentracích [6]. Proto našly využití také jako biocidy, dezinfekční prostředky pro domácí i nemocniční použití nebo jako konzervanty [1,6]. Jejich účinek proti bakteriálním buňkám spočívá v narušení lipidové dvojvrstvy, která tvoří bakteriální cytoplazmatickou membránu a vnější membrány Gram-negativních bakterií, což vede k úniku cytoplazmy do okolí. Antimikrobiální efekt souvisí s délkou alkylového řetězce. Pro Gram-pozitivní bakterie je tato aktivita maximální při délce řetězce 12-14 uhlíků, zatímco pro Gram-negativní bakterie je optimální délka řetězce 14-16 uhlíků. Sloučeniny s alkylovým řetězcem nad 18 uhlíků nebo pod 4 uhlíky jsou jako antimikrobní činidla neúčinná [6].

3.1.3.3. Amfoterní povrchově aktivní látky

Amfoterní PAL disociují v závislosti na pH buď na povrchově aktivní kationt, nebo povrchově aktivní aniont [1]. Z přírodních látek sem patří např. aminokyseliny a fosfolipidy, ze syntetických látek pak např. betainy a sulfobetainy. Mají výborné dermatologické vlastnosti a kompatibilitu s pokožkou, a proto nachází uplatnění zejména v kosmetice [3].

3.1.3.4 Neionogenní povrchově aktivní látky

Neionogenní PAL nejsou schopné disociace, protože jejich hydrofilní skupina je nedisociovatelná. Bývá tvořena alkoholem, fenolem, etherem, esterem nebo amidem. Velké části těchto neionogenních PAL dodává hydrofilitu polyethylenglykolový (PEG) řetězec získaný polykondenzací ethylenoxidu [1]. Využití nachází jako detergenty a emulgátory při nízkých teplotách [3].

3.2 Zlaté nanočástice

Nanočástice jsou částice o velikosti 1-100 nm. Zlato je jedním z mála kovů schopných přežít v atmosférických podmínkách jako nanočástice [7].

Jsou to hybridní materiály obsahující anorganické jádro obvykle obklopené organickou monovrstvou [8]. Vykazují jedinečné optické, elektronické, chemické a magnetické vlastnosti, a tak mají mnoho potenciálních aplikací [7]. Tato všestrannost vychází z jejich schopnosti přizpůsobovat svoji velikost, tvar a složení. Malé odchylky ve velikosti nebo tvaru nanočástic mají velký vliv na jejich vlastnosti a chování. Čím je povrch AuNP větší, tím více se projevují vlastnosti atomů zlata na jejich povrchu. Konečná organizace materiálu jádra určuje fyzikální vlastnosti nanočástic [8]. Jejich výhodou je možnost snadné přípravy a chemické modifikace povrchu [9].

3.2.1 Syntéza zlatých nanočástic

Využití nanočástic spoléhá na kontrolovanou výrobu nanočástic o dané velikosti, tvaru, krystalické struktuře a v přiměřeném množství [10].

Jednoduchou redukcí kovových solí pomocí redukčního činidla obecně získáme tzv. nanosféry, protože je to tvar s nejnižší energií [11], a tak termodynamicky a kineticky nejvýhodnější morfologií [12]. Z důvodu snadnosti syntézy si sférické nebo kvazi-sférické nanočástice získaly zpočátku největší pozornost [12].

V případě přístupu ke komplikovanějším strukturám bylo potřeba najít reakční podmínky, které zlomí sklon k izotropnímu růstu, a řídí tak růst do tvarů anizotropních [12]. První třídou anizotropních částic byly zlaté nanotyčky (AuNR), které byly poprvé syntetizovány v polovině 90. let 19. století. Ovšem k širšímu přijetí AuNR došlo až s objevem syntetických postupů tzv. mokré chemie, které publikovali Murphy et al. v roce 2001 [12,13].

3.2.1.1 Redukce

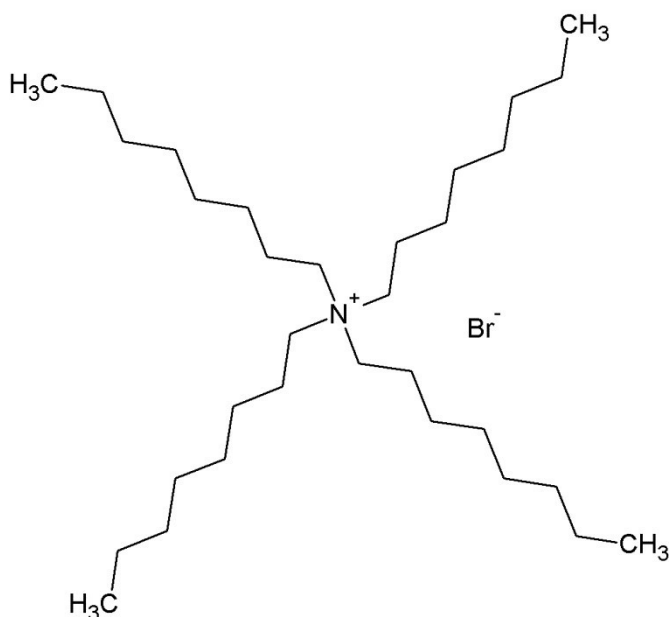
Nejjednodušší a nejvíce používaná metoda k syntéze AuNP je použití chemické redukce soli zlata na kovové zlato v přítomnosti obalujícího ligandu [14].

Redukce zlaté soli v přítomnosti redukčního činidla zahájí formování jádra zlatých iontů, a tak tvorbu nanočástic. Pro zabránění agregace se během syntetického procesu často přidává stabilizační činidlo [8,15], které se na povrch AuNP buď adsorbuje, nebo chemicky váže [15]. Toto činidlo je nabitě, a tak se stejně nabitě nanočástice vzájemně odpuzují a jsou koloidně stabilní [15]. Tato metoda byla poprvé popsána Turkevichem roku 1951 [16] a později vylepšena Frensem [17].

V Turkevichově metodě je kyselina tetrachlorozlatitá rozpuštěna ve vodě, a ta je zahřáta na teplotu varu. Přidá se citrát sodný, který redukuje zlatou sůl, a tak se začnou formovat zlaté zárodky. Výsledkem reakce jsou ve vodě rozpustné AuNP obalené citrátem [14]. Citrát sodný tak hraje dvojí roli – jako redukční činidlo a následně po naabsorbování na povrch jako stabilizátor [8]. Velikost těchto AuNP může být od 15 do 150 nm. Nejsou však stabilní v solných roztocích, a proto vyžadují dodatečné obalení pro biologické aplikace [14].

Pro syntézu stabilních AuNP, které jsou menší (2-6 nm) a více monodisperzní ve velikosti a tvaru, je vhodná Brust-Schiffrinova metoda [18], která produkuje velké množství kvalitních monovrstvou chráněných zlatých klastrů [8]. V této metodě je roztok zlatých iontů převeden do organické fáze s jeho následnou redukcí tetraboritanem sodným [11]. Činidlem fázového přenosu je tetraoktylamonium-bromid (TOAB) [8]. Poté je přidán nepolární organický thiol [8], např. dodekanthiol, aby působil jako obalující ligand [14]. Následně je rychle přidáno redukční činidlo, a to tetraboritan sodný [8,14]. Thiolem zprostředkované obalení zlatých klastrů nakonec zastaví shlukování redukováných zlatých atomů. Thiolové ligandy tvoří velmi stabilní organickou monovrstvu díky silné kovalentní vazbě síra-zlato [8]. Vyrobené AuNP jsou

tak stabilizovány vrstvou alkanthiolátu [19] a rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Pro biologické využití je potřebná dodatečná výměna ligandu nebo další obalení amfifilními molekulami nebo lipidy [14]. Inkorporací různého spektra funkcionalizovaných ligandů do monovrstvy dojde k postupnému vytlačení původních ligandů do roztoku. Tak mohou být nanočástice vybaveny specifickými vlastnostmi jako rozpustnost ve vodě, povrchový náboj nebo specifické rozpoznávání cílů [8].



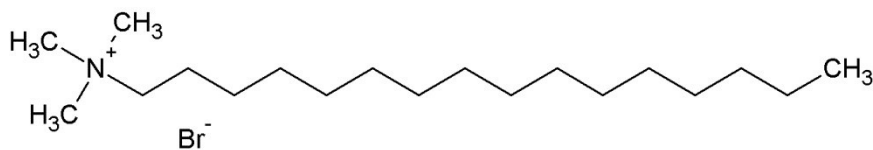
Obrázek 1 Struktura tetraoktylamonium-bromidu

3.2.1.2 Metoda růstu zárodků

Metoda růstu zárodků využívá předem nasyntetizovaných AuNP, které jsou použity jako zárodky pro další růst nanočástic do různých tvarů jako jsou tyčky, trojúhelníky, kostky nebo hvězdy. To se obvykle provádí v přítomnosti povrchově aktivních látek a mírných redukčních činidel [14]. Tato metoda zajistí kontrolovaný poměr stran tyček [10].

Kovové soli jsou redukovány silným redukčním činidlem (tetraboritanem sodným), čímž vzniknou 3,5-4 nm velké částice sférického tvaru – zárodky. V oddělené nádobě se připraví slabé redukční činidlo, obvykle kyselina askorbová. Kyselina askorbová není sama o sobě schopna při pokojové teplotě redukovat sůl kovu až na elementární kov, ale po přidání zárodků probíhá autokatalytická reakce na jejich povrchu. Dochází ke vzniku větších částic. Zásadní pro získání tyček namísto větších sfér je přítomnost strukturu-určující látky. Pro tento účel je mimořádně vhodný

cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB) [10]. AuNR syntetizované touto metodou jsou hydrofilní [20].



Obrázek 2 Struktura cetyltrimethylamonium-bromidu

AuNR mohou vyrůst až do šířky 20-30 nm a do délky až 600 nm. Poměr délky k šířce může být 2-25 a je řízen relativní koncentrací činidel. Menší zárodky produkují vyšší poměr stran nanotyček [10].

Předpokládá se, že CTAB se váže na delší strany AuNR s nějakou preferencí, která ale není moc silná, protože bylo získáno také mnoho sfér. Preferenční vazba je založena na prostorovém efektu. Zlatý atom umístěný na boční straně tyček je více srovnatelný s velikostí hlavní skupiny CTAB než těsně uspořádaná stěna zlata na koncích nanotyček. Taková vazba stabilizuje boční plochy, které pak mají relativně velkou povrchovou energii a napětí ve srovnání s ostatními stěnami. To umožňuje přidávání látky na stěny, které neobsahují CTAB. Hlavní skupina surfaktantu by tak mohla primárně určovat tvar nanočástic. Byly ovšem provedeny experimenty, ve kterých se lišila délka řetězce surfaktantu se zachovalou hlavní skupinou a bromidovým aniontem. Byla provedena syntéza s cílem získat co nejvyšší poměr stran, kterého je možné dosáhnout s touto sérií surfaktantů. Kdyby byla hlavní skupina primárně určující, tak by u všech reakcí byl získán stejný poměr stran. V experimentu byla použita 10, 12 a 14 uhlíkatá verze CTAB (který má 16 uhlíků) a bylo zjištěno, že délka řetězce je překvapivě důležitá. Hydrofobní řetězce tvořily vmezeřenou dvojvrstvu na nanotyčkách s kationickou hlavní skupinou první vrstvy orientovanou směrem k povrchu zlata a kationickou hlavní skupinou druhé vrstvy orientovanou k vodnému rozpouštědлу. To naznačuje, že tvorba předpokládané surfaktantové dvojvrstvy je během růstu značně důležitá. Všechny tyto surfaktanty tvoří tyčkovité micely s CMC, která se snižuje s rostoucí délkou řetězce. Dynamická tvorba dvojvrstvy surfaktantu na zlatém povrchu pomocí uhlovodíkových řetězců může poskytnout dostatečnou stabilizaci během růstu AuNR tzv. „zipovým“ způsobem, což vede k tvorbě delších nanotyček při použití delších uhlovodíkových řetězců [10].

Role doplňkových kovových iontů je pro růst nanotyček také důležitá. Bylo zjištěno, že přítomnost 5 % Ag^+ iontů zvyšuje výnosnost téměř na 100 % ve srovnání s 20-40% výtěžkem v nepřítomnosti Ag^+ iontů. Ovšem nejvyšší poměr stran získatelný s Ag^+ ionty byl 6 ve srovnání s poměrem 25 v nepřítomnosti těchto iontů. Koncentrace Ag^+ a Br^- iontů (z CTAB molekuly) jsou dostatečně vysoké, aby došlo k precipitaci AgBr , i když tato precipitace není vidět na makroskopické úrovni. AgBr tak může tvořit monovrstvy v epitaxiálním směru na rostoucích nanotyčkách, a proto inhibuje jejich růst v těchto místech [10].

Na aniontové straně CTAB je bromidový iont také důležitý pro získání tyčkovitého tvaru. CTA chlorid jako strukturu-určující látka dává vzniknout pouze sférám a jodid dává zřejmě vzniknout náhodné směsi tvarů [10].

Reprodukovatelnost metody (velikost, tvar, výtěžek) závisí na mnoha faktorech, např. na době zrání zárodků, metodě smíchání růstového roztoku a zárodků nebo na čistotě CTAB. I velmi zředěná nečistota v CTAB může radikálně ovlivnit tvorbu nanotyček, kdy nečistoty mohou způsobit místo tyček vznik sfér [21]. V dnešní době už je tato metoda syntézy AuNR reprodukovatelná [19].

3.2.2 Vlastnosti zlatých nanočástic

Vnitřní vlastnosti kovových nanočástic se řídí především jejich velikostí, tvarem, složením, krystalinitou a vnitřní strukturou [7]. Střední volná dráha elektronu v kovu při pokojové teplotě je 10-100 nm, a proto se dá předpokládat, že kovové částice o této velikosti budou vykazovat neobvyklé a výhodné vlastnosti. AuNP o rozměru 3 nm a méně už nejsou ušlechtilé a nereaktivní, nýbrž katalyzují chemické reakce [10].

3.2.2.1 Povrchová plazmonová rezonance

Zlaté nanočástice se jeví jako červené, fialové nebo jiné barvy. To je způsobeno tím, že při rozmezí 5-200 nm v průměru jsou AuNP dostatečně velké pro podporu vodivostního pásu – jsou srovnatelné se střední volnou dráhou elektronu kovu při pokojové teplotě (100 nm), ale jsou poměrně malé ve srovnání s vlnovou délkou viditelného světla (400-750 nm). Ozáření světlem o určitých frekvencích vede ke kolektivní oscilaci elektronů, známé jako plazmové oscilace nebo plazmony, které jsou obecně zobrazeny na povrchu – povrchové plazmony nebo povrchová plazmonová rezonance (SPR). Optické vlastnosti malých kovových nanočástic jsou řízeny těmito kolektivními oscilacemi, které jsou v rezonanci s dopadajícím elektromagnetickým

zářením. U zlata leží rezonanční frekvence tohoto kmitání ve viditelné oblasti [11]. Intenzita a vlnová délka SPR může být vysoce závislá na tvaru a velikosti částic [12].

Jelikož nanočástice mají velký poměr povrchu k objemu, jsou tak plazmonové frekvence citlivé k dielektrické povaze jejich rozhraní s místním médiem (index lomu). Jakékoli změny v okolí těchto částic, např. modifikace povrchu nebo agregace, vede ke kolorimetrickým změnám disperzí. Agregace částic vede k párování plazmonů se současným posunem plazmonových frekvencí [11].

V důsledku SPR jsou AuNP schopny absorbovat světlo o různé vlnové délce [12]. Plazmony však světlo nejen absorbují, ale i rozptylují. Čím jsou částice větší, tím větší procento světla je odraženo. Protože rozptýlené světlo je ve viditelné části elektromagnetického světla v souladu s jejich plazmonovými pásy, je možné opticky sledovat postavení jednotlivých částic, což vede k různým zobrazovacím aplikacím [11].

Nanotyčky a nanovlákná mají díky anizotropnímu tvaru dva oddělené SPR pásy odpovídající jejich šířce a délce, známé jako příčný SPR (TSPR) a podélný SPR (LSPR) [10-12]. TSPR se nachází těsně nad 500 nm, zatímco pozice LSPR se značně liší v závislosti na poměru stran a celkové velikosti nanotyčky. Pečlivou syntézou lze vytvářet AuNR s LSPR kdekoli od viditelné (600 nm) až k blízké infračervené (NIR) (≥ 1100 nm) části elektromagnetického spektra [12]. Pro daný průměr, když poměr stran tyčky stoupá, příčné pruhy zůstávají nezměněny, zatímco podélné pásy se posunují do NIR oblasti spektra [14]. Schopnost absorbovat v NIR oblasti je obzvláště výhodná pro biomedicínské aplikace, protože absorbance okolní tkáně je v této oblasti nízká [12].

Sledování SPR AuNR může umožnit jejich citlivou detekci. Změny v optické absorbanci jsou nejvíce nápadné v oblasti LSPR díky zvýšené citlivosti na změny prostředí i na orientaci nanotyček. Změny v okolním prostředí AuNR mohou mít vliv na místní index lomu, což může mít vliv na pozici píků plazmonových rezonancí. LSPR pík vykazuje velkou citlivost ke změnám indexu lomu. V praxi lze měřit posun absorpčních pásů menších než 1 nm, což znamená, že může být detekováno i navázání velmi malého množství látky. Ovšem nekontrolovatelná agregace nebo změny uspořádání AuNR mohou mít velký vliv na LSPR pík [12], např. při agregaci typu „konec-ke-konci“ bude docházet k posunu LSPR do NIR oblasti [11]. Z tohoto důvodu se v těchto systémech nanotyčky obvykle nachází v individuálním stavu [12].

Výše uvedené vlastnosti z AuNR dělají vynikající materiály pro biologické snímání a zobrazování, fototepelnou terapii, distribuci léčiv a další biologické aplikace [20].

3.2.2.2 Povrchově zesílené efekty

Ramanova spektroskopie je technika používaná pro studium molekulárních vibrací, rotací a dalších procesů. Ramanova spektra jsou vysoce komplexní a mohou sloužit jako otisky prstů molekul. Odhalují nám chemické složení vzorku. Ačkoli je vysoce specifická, tak je limitována nízkou citlivostí, protože pouze jeden foton z 10^8 je Ramanově rozptýlen. Absorpce molekul na AuNP nebo jiné kovové povrchy zvyšuje intenzitu vibračních spekter Ramanově aktivních molekul o několik řádů. Tento objev vedl ke vzniku nové techniky nazvané povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) [14].

AuNR tedy mají schopnost působit jako substráty pro SERS. Signál pochází z molekul blízko povrchu nanotyček, ne z tyček samotných [12]. Toto elektromagnetické pole blízko částicového povrchu je produkované SPR [14]. AuNR jsou zajímavé díky jejich anizotropnímu tvaru [12]. Elektromagnetické pole je posílené ostrými a špičatými okraji nanostruktur jako hvězdy nebo tyčky [14]. Proto jsou povrchově zesílené efekty větší u tyček než u sfér [10]. Nanotyčky mají největší zesílení na hrotech [10,12]. Mnohem vyšší signál se však očekává od aktivních bodů vytvořených oddělením 2 nanotyček na malou vzdálenost. Uspořádání AuNR, které vytváří aktivní body mezi konci tyček, vede k největšímu zesílení SERS signálu. Ovšem uspořádání strana-ke-straně může vést ke snížení SERS signálu, což zdůrazňuje význam kontrolování správného uspořádání AuNR pro použití v SERS detekci [12]. Naladěním SPR do NIR oblasti se zabrání absorpci excitovaného světla biologickými vzorky a omezí tak jejich rušení SERS signálu [14]. Proto jsou zlaté nanostrukтуры atraktivní jako značení pro průtokovou cytometrii nebo jako kontrastní látky pro biologické SERS zobrazování [14].

3.2.2.3 Fluorescence

U AuNP je pozorována silná fluorescence s kvantovým výtěžkem 10^{-3} . Může být snadno naladěna do NIR oblasti elektromagnetického spektra (650-900 nm). S rostoucí velikostí částic se mírně zvyšuje intenzita emisí, ale vlnová délka emisí zůstává téměř konstantní [22]. V NIR oblasti elektromagnetického spektra proniká světlo tkáněmi

relativně dobře, a tak může být tato fluorescence snadno aplikována v oblasti biomedicíny [14]. AuNP navíc nevyhasínají a za určitých experimentálních podmínek jsou netoxické, a tak mohou být atraktivní alternativou k tradičním organickým fluorescenčním barvivům [11]. Nevyhasínání AuNP lze využít pro zobrazování buněk jako fluorescenčních sond, protože buněčná autofluorescence snadno vyhasíná. Poté co jsou buňky označené AuNP osvětleny silným světlem, dojde k vyhasnutí buněčné autofluorescence, a tím se lze soustředit na fluorescenci AuNP, které jsou umístěny na buněčné membráně nebo uvnitř buněk [22].

Povrchově zesílená fluorescence za pomoci kovových nanočástic si získává pozornost jako způsob, jak detekovat různé molekuly. Povrchově zesílená fluorescence nese některé znaky analogické k SERS, ovšem oproti SERS nastane lepší fluorescenční signál ne v blízkosti nanočástic, ale při vzdálenosti molekul 10-100 nm od kovového povrchu nanočástic [10].

3.2.2.4 Absorpce rentgenového záření

Vysoké atomové číslo a elektronová hustota zlata vede k účinné absorpci rentgenového (RTG) záření, která je vyšší než u konvenčních látek obsahujících jód, které se v současné době používají v praxi. Navíc AuNP cirkulují v krvi po delší dobu než konvenční látky, což umožňuje delší zobrazování, cílení na specifické typy buněk a buněčné sledování. Tyto vlastnosti spolu s biokompatibilitou zlata, narozdíl od jiných prvků, které také silně tlumí RTG záření, mají za následek zkoumání AuNP jako kontrastních činidel pro zobrazovací techniky založené na RTG záření jako je počítačová tomografie (CT) [14].

Přidání dalších kontrastních látek do zlaté nanostruktury může vytvořit multimodální sondy, které poskytují kontrast jak pro CT, tak i pro další zobrazovací techniky jako magnetická rezonanci (MRI) nebo fluorescence [14].

3.2.2.5 Optické vlastnosti

AuNP mají mimořádnou schopnost rozptylu světla, která není pozorována u neplazmonických nanočástic [14]. Změny ve velikosti a tvaru nanočástic ovlivňují rozptylové vlastnosti a nabízí možnost posunout je do oblasti optimálního rozptylu světla [10,14]. Tento optický rozptyl může být využit k detekci různými metodami mikroskopie [14]. Ve viditelné oblasti vykazují silný absorpční pás [7], ten se však dá naladit v celém viditelném a NIR spektru [10].

Známa žlutá barva zlata je způsobena snížením odrazu světla na konci spektra. Ovšem pokud jsou částice zlata dostatečně malé, mají rubínově červenou barvu způsobenou absorpcí zeleného světla při cca 520 nm, což odpovídá frekvenci SRP [7]. V důsledku agregace se mění jejich absorpční spektrum a dochází ke zvýšení absorbance červené vlnové délky světla [7]. Proto se v závislosti na tvaru, velikosti, stupni agregaci a okolním prostředí mohou jevit jako červené, modré nebo v jiných barvách na základě SPR po ozáření světlem vhodné vlnové délky. SPR je tak základem pro sledování absorpce nebo rozptylu světla, což vytváří základ pro mnoho biologických snímacích a zobrazovacích metod [11].

3.2.3 Využití zlatých nanočástic v biomedicině

AuNP mají všestranné fyzikální vlastnosti, které z nich dělají vhodné kandidáty pro mnoho biomedicínských aplikací [14]. Pro jejich dobrou biokompatibilitu, velký povrch, nízkou toxicitu a unikátní fyzikálně-chemický charakter jsou AuNP využívány v biomedicínském výzkumu a diagnostice [23]. Ve srovnání s malými molekulami může být jejich detekovatelnost pro zobrazovací techniky o několik řádů vyšší, což výrazně snižuje detekční limity. Zobrazovací techniky jako CT mohou mít velký prospěch z nových kontrastních látek na bázi nanočástic, které nabízí delší dobu oběhu a lokalizované nahromadění v místě onemocnění [14]. Platformy založené na AuNP mohou být použity pro širokou škálu využití jako je doručování léčiv a genů, detekce patogenů, proteinu a toxických látek, v oblasti lékové analýzy, přípravě biosenzorů, fototermální ablace a radioterapii [14,23].

Jako multifunkční nanočástice získávají uplatnění v teranostice, neboli souběžné terapii a diagnostice. Jejich multifunkčnosti je dosaženo tím, že kombinují různé vlastnosti pro zobrazování a cílené doručování léčiva (targeting) do jedné platformy. Současně se může využít vlastností zlatého jádra jako kontrastu pro počítačovou tomografii při zobrazování a fototermálního efektu pro terapii. Alternativně může jedna z vlastností pocházet z látky ukotvené do stejné platformy jako zlaté jádro. Například lze použít nanočástice k cílení léčiva a pomocí zlatého jádra sledovat cestu jejich doručení [14].

3.2.3.1 Cílené doručování látek

AuNP mají řadu vlastností, které jsou vhodné pro cílené doručování léčiv. Jádro z ušlechtilého kovu je inertní, což přispívá k nízké toxicitě a dobré biokompatibilitě,

kteře jsou nutné pro biologické aplikace. Flexibilita tvarů a velikosti AuNP umožňuje zvolit ideální rozměry pro vkládání různých látek typu proteinů, peptidů, oligonukleotidů a nízkomolekulárních léčiv [14]. Monovrstva pokrývající AuNP umožňuje vyladění povrchových vlastností jako je náboj nebo hydrofobicita [24]. Velký povrch a možnost jeho chemické modifikace usnadňuje vkládání nejen léčiv, ale i dalších látek jako cílicích molekul nebo pomocných kontrastních látek [14]. Jejich interakce s thioley poskytuje efektivní a selektivní způsob řízeného intracelulárního uvolňování [24], protože vazby zlato-ligand jsou relativně stabilní vně buněk, ovšem uvnitř buněk se tato stabilita sníží, částečně díky vysoké koncentraci glutathionu (obsahující SH skupinu) v buňkách [8].

Cílené doručování AuNP může být dosaženo pasivním způsobem, kdy se dlouho cirkulující AuNP hromadí např. v nádorech tak, že prosakují perforovanou stěnou nádorové vaskulatury. Tento jev je známý jako efekt zvýšené propustnosti a retence (EPR) [14].

Aktivní cílení AuNP je zaměřeno na specifické typy buněk, receptory nebo proteiny prostřednictvím připojení cílicích ligandů jako jsou protilátky, proteiny, peptidy, aptamery a nízkomolekulární látky [14]. Toto cílení léčiv na specifické tkáně může minimalizovat toxicitu, zlepšit perorální (p.o.) dostupnost a nepříznivou farmakokinetiku, umožnit rozpuštění léčiv pro intravenózní (i.v.) aplikaci a zlepšit stabilitu použitých látek proti rozkladu [8].

Doručování genů je další oblastí, kde jsou AuNP zkoumány pro svůj terapeutický potenciál. Multifunkčnost AuNP umožnila několik různých přístupů k zapouzdření (enkapsulaci) a uvolnění nukleových kyselin (NK) [14]. Lee et al. použili AuNR obalené kationickými fosfolipidy. Kladně nabitý povrch fosfolipidů je využit k připojení negativně nabitě DNA, RNA nebo siRNA [25]. K uvolnění NK mohou být využity optické vlastnosti AuNP, kdy díky silné absorpci světla, a tím následnému zahřátí nanočástic, dojde k rozbití vazby nanočástice-NK [14]. Wijaya et al. demonstrovali toto selektivní uvolnění DNA absorbovaného na AuNR s různým poměrem stran po ozáření při vlnových délkách odpovídajících charakteristickým absorpčním pásům jednotlivých AuNR [26].

Ochranná fosfolipidová dvojvrstva savčích buněk slouží jako nepropustná bariéra pro většinu biomakromolekul. Hydrofobicita je proto důležitým faktorem při

zaměřování této lipofilní domény. Některé peptidy, tzv. buňkami pronikající peptidy (CPP), jsou schopny membránou proniknout dovnitř buňky. Tyto CPP jsou převážně kationické nebo amfifilní. Schopnost konjugátů CPP-nanočástice proniknout z extracelulárního prostoru přes buněčnou membránu do cytoplazmy ukazuje jejich schopnost působit jako funkční jednotka nosičů léčiv nebo genů. Tyto konjugáty mohou do buněk proniknout několika různými cestami, a to buď přímo skrze buněčnou membránu, nebo cestou endocytózy s následným endosomálním uvolněním [8].

3.2.3.2 Protinádorová terapie

Rakovina je na celém světě druhou nejčastější příčinou úmrtí [27]. Významný počet pacientů s rakovinou bývá asymptomatických až do pozdních stádií onemocnění. V současnosti je léčba omezena na chirurgii, chemoterapii a radioterapii. Je proto důležité najít nové technologie, které umožní včasnou detekci a léčbu těchto onemocnění [8]. Proto jsou AuNP široce studovány pro použití v protinádorové terapii [14].

3.2.3.2.1 Specifické cílení zlatých nanočástic

Lze vytvořit nanočástice s vysokou nádorovou specifičností. Konjugací s cílicími proteiny se mohou následně vázat na markery nadměrně exprimované na povrchu nádorových buněk [28]. Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je často nadměrně exprimován rakovinnými buňkami, a proto může sloužit jako zaměřovací cíl. Výzkumníci úspěšně konjugovaly anti-EGFR na povrch AuNP. Konjugované AuNP mají 6× vyšší absorpci rakovinnými buňkami než normálními lidskými buňkami. K zobrazení a detekci těchto maligních buněk byly využity optické vlastnosti AuNP [29]. Další receptor nadměrně exprimovaný na povrchu maligních buněk je receptor pro kyselinu listovou. Nanočástice kombinované s thiolovaným polyethylenglykolem, cisplatinou a kyselinou listovou měly toxický efekt na maligní buňky ve srovnání s normální buněčnou linií [30]. Kombinace AuNP s gemcitabinem, což je běžně užívané léčivo na léčbu různých nádorů, byla úspěšná v inhibici růstu pankreatických nádorových buněk *in vitro* i *in vivo* [31]. Tamoxifen konjugovaný s AuNP, zaměřený na α -estrogenové receptory, měl distribuci v nádorových buňkách 2,7× vyšší než volné léčivo [32].

3.2.3.2.2 *Pasivní distribuce zlatých nanočástic do nádoru*

Díky velké mezikapilární vzdálenosti a variabilnímu krevnímu průtoku typickému pro solidní nádory je často omezena penetrace a akumulace protinádorových léčiv v hypoxického středu nádoru. Ovšem proliferující vnější schránka solidních nádorů je častým místem angiogeneze. Tato vysoce prokrvená oblast má tendenci být perforovaná, což vede ke zvýšené prostupnosti a retenci. Jedna z běžných metod při navrhování nanočástic pro pasivní distribuci využívá této hyperpermeability solidních tumorů [8] a AuNP se tak mohou přednostně akumulovat v nádorech díky EPR [14]. Angiogenní krevní cévy v těchto tkáních mohou mít mezi sousedními epiteliálními buňkami mezery až do 600 nm, což umožňuje nosičům rozlít se do intersticiálního prostoru. Výsledkem je, že koncentrace AuNP nosiče v nádoru je více než desetinásobná v porovnání s relativní úrovní stejně podané dávky volného léčiva [8].

Akumulace částic v nádoru je závislá na velikosti jádra. Větší částice se shromažďují lépe, protože malé částice mají příliš velkou difúzní rychlost. Akumulace menších částic v nádoru závisí jednak na velikosti, jednak na jejich biologickém poločasu. Akumulace větších částic pak závisí výhradně na jejich biologickém poločasu [8].

3.2.3.2.3 *Inhibice angiogeneze*

Další možností může být inhibice angiogeneze. Ta hraje důležitou roli v růstu a šíření nádorových tkání. Tento složitý proces je přísně regulován rovnováhou mezi proangiogenními faktory jako vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a antiangiogenními faktory jako thrombospondin-1. Ovšem během tumorogeneze jsou proangiogenní růstové faktory secernovány k interakci s jejich povrchovými receptory tvořícími signální kaskádu podílející se na angiogenezi. Blokování interakce VEGF s jeho receptorem je jedním ze způsobů inhibice angiogeneze [8]. Např. nahé AuNP (neobalené) inhibují VEGF165 indukovanou proliferaci endoteliálních buněk v závislosti na dávce [33].

3.2.3.2.4 *Radioterapie s využitím zlatých nanočástic*

Radioterapie je široce využívána při léčbě rakoviny, protože záření (RTG, gama paprsky a rychle se pohybující nabitě částice jako ionty, elektrony a protony) indukuje poškození DNA, a tím zabíjí rakovinné buňky. Po absorpci RTG záření nádorem dojde k uvolnění rozptýlených fotonů a elektronů, což způsobí poškození DNA. Klinicky se

používá speciální zařízení, které ozařuje nádor z různých úhlů a maximalizuje tak dávky RTG záření do nádoru a minimalizuje je ve zdravé tkáni. K dalšímu snížení RTG dávky ve zdravé tkáni je používáno stínění. Zlato, jako vynikající absorbent RTG záření, může výrazně zvýšit dávku absorbovaného záření v místě nádoru, a zvýšit tak terapeutický účinek záření [14].

Hybridní zlaté 198/199 nanočástice vydávají beta záření. Jejich konjugací se specifickým bombesinovým peptidem přítomným v karcinomu prostaty mohou AuNP poskytnout účinnou terapeutickou odpověď při léčbě rakoviny prostaty. Jakmile totiž nádor dosáhne určité velikosti, je obtížné jeho chirurgické odstranění. Tyto radioaktivní nanočástice způsobily redukci velikosti nádoru u myši o 82 % ve srovnání s kontrolní skupinou. Radioaktivní úniky do necílových orgánů pak byly pouze 2 % [8].

3.2.3.2.5 Fototermální terapie

AuNP mají schopnost absorpce fotonu a jeho převedení do tepelné energie. Ozáření AuNP světlem o správné vlnové délce tak způsobí lokalizované zvýšení teploty, která způsobí denaturaci biomolekul a poškození buněk [14]. Úspěch fototermální terapie je velmi závislý na aktuální počtu AuNR přítomných uvnitř buněk [34]. Toto nachází uplatnění zejména při léčbě rakoviny díky vyšší akumulaci nanočástic v nádorové tkáni pomocí EPR a selektivnímu ozáření nádoru [14].

Chen et al. syntetizovali zlaté nanoklece s laditelnou NIR absorpcí mezi 600-1200 nm. Ukázali, že laserové ozáření 1 ppm roztoku zlatých nanokleccí zvýšilo teplotu vody o 5-10 °C, což by v tkáni mohlo odpovídat zvýšení teploty od 37 °C do 42 °C, nebo i více [35]. Park et al. zesílili fototermální terapii kombinací protinádorového léčiva doxorubicinu a zlata do stejné platformy. V experimentu s HeLa buňkami vedlo laserové ozáření k teplem indukovanému uvolnění léčiva a zesílenému protinádorovému efektu [36].

3.2.3.3 Snímání a zobrazování

Další využití našly AuNP v biologických snímacích a zobrazovacích aplikacích. Tyto vznikající technologie zčásti spoléhají na vynikající elastické rozptylové vlastnosti kovových nanočástic a také na posun maxima plazmonového pásu s lokální dielektrickou konstantou [10].

Chemické snímání může být založeno na agregaci částic, změnách v místním indexu lomu v důsledku chemické vazby nebo pomocí SERS. Sledování částic v biologickém materiálu je možné pomocí mikroskopie na temném poli nebo dvoufotonové luminiscenční mikroskopie [11].

Vývoj metod pro dřívější detekci je důležitý pro snížení dopadu onemocnění a zlepšení přežití. Vysoký poměr povrchu k objemu AuNP a jejich schopnost funkcionalizace pro detekci specifických cílů nabízí nižší detekční limity a vyšší selektivitu než běžné konvenční strategie. AuNP byly studovány pro detekci plynů, iontů, proteinových markerů nebo DNA [14].

Mirkin et al. popsali systém skládající se ze dvou populací AuNP. Každý typ je obalen různými thiolovanými oligonukleotidy. Posledních 15 oligonukleotidů je komplementární k jedné polovině cílové DNA sekvence. Po zavedení cílové DNA do systému se oba typy AuNP váží k DNA a agregují, což má za následek změnu barvy z červené na modrou [37]. Tato kolorimetrická metoda založená na AuNP byla vyvinuta v diagnostický produkt, který byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), a je mimo jiné používán k testování metabolismu warfarinu [14].

AuNP byly také zkoumány jako kontrastní látky pro fotoakustické zobrazování. Ve fotoakustickém zobrazování je subjekt ozářen světlem, což vede k lokalizovanému zahřátí, a tím k malé expanzi tkáně, což způsobí zvukové vlny. Použití krátkých laserových impulzů generuje zvukové vlny v ultrazvukovém frekvenčním rozsahu. Fotoakustické zobrazování je ve srovnání s některými dalšími zobrazovacími metodami výhodné. Použité záření je neionizující a použití ultrazvuku jako výstupu poskytuje širší prostorové rozlišení ve srovnání s optickými metodami díky nižšímu rozptylu ultrazvuku v tkáni. Jelikož různé druhy tkání mají různé koeficienty absorpce světla, může tato zobrazovací metoda rozlišovat tkáně a má hloubku penetrace v rozsahu centimetrů se submilimetrovým prostorovým rozlišením. Řada zlatých nanostruktur má absorpci nastavitelnou v rozsahu NIR části elektromagnetického světla, což je v tomto případě výhodné [14]. Wang et al. použili pegylované AuNP jako kontrastní látky pro detekci makrofágů v aterosklerotických plátech *ex vivo*. Endocytóza AuNP makrofágy způsobila agregaci AuNP uvnitř buněk a posunula tak absorpci k NIR světlu díky posunu plazmonové rezonance. To umožnilo rozlišení AuNP uvnitř a vně makrofágů použitím záření o různých vlnových délkách [38].

Plazmony kovových nanočástic umožňují zobrazit individuální umístění částic pomocí optické mikroskopie. Dvoufotonová transmisní mikroskopie a mikroskopie na temném poli závisí na NIR vlastnostech AuNR. Dvoufotonová transmisní mikroskopie byla použita k zobrazení individuální polohy nanočástic při proudění v krvi *in vivo* a ke zjištění, jak lze zaměřit rakovinné buňky na základě vhodného povrchu nanočástice. V mikroskopii na temném poli je přenášené bílé světlo blokováno, takže je detekován pouze ustálený rozptyl světla. Vzhledem k tomu, že se rozptyl šíří jako kužel, je velikost skvrny mnohem větší než samotné nanočástice. Dosažitelné je prostorové rozlišení 200 nm, a tak mohou být zobrazeny jednotlivé nanočástice [11].

3.2.4 Povrchová úprava zlatých nanočástic

Povrch nanočástic může být snadno upraven pro konkrétní aplikaci [14]. AuNP jsou syntetizovány s různými obalujícími ligandy, které zajišťují jejich rozpustnost ve vodných nebo organických rozpouštědlech, stabilitu, brání agregaci nebo slouží k udržení optických vlastností v různých prostředích [14,20]. Ačkoli AuNP obsahují poměrně inertní a nereaktivní jádro z ušlechtilého kovu, jejich biologické aplikace často vyžadují další povrchovou úpravu s cílem zajistit vysokou biokompatibilitu a nízkou cytotoxicitu [14]. Organická monovrstva funguje jako bariéra mezi jádrem a okolím a efektivně chrání a stabilizuje integritu jádra. Reaktivita a rozpustnost nanočástic jsou tedy určovány právě chemickou povahou periferie monovrstvy. Pro biologické aplikace je nutná rozpustnost ve vodném prostředí [8].

Některé surfaktanty jsou používány jako stabilizátory povrchů nebo jako šablony k syntéze nanočástic. Svou vazbou k povrchu nanočástic snižují jejich povrchovou energii a kontrolují jejich růst a tvar [39].

Neutrální surfaktanty jako alkanthioly, alkanfosfáty a aminy se používají jako stabilizátory při syntéze různých nanočástic [39]. Tyto ligandy vykazují afinitu k zlatému povrchu [19]. Nabité surfaktanty se také používají jako stabilizátory a jako templáty pro růst nanotyček. V poslední době jsou jako templáty pro syntézu AuNR používány směsi kationických surfaktantů skládající se z CTAB jako hlavní složky a TOAB jako minoritní složky [39].

Povrchová funkcionalizace nanotyček může být daleko náročnější než u nanosfér i přes dobře známou zlato-thiolovou chemii. Sférické nanočástice mohou být thiolovou vrstvou potaženy přímo během syntézy, nebo potaženy jeho slabě vázaným

aniontem. Ovšem zlaté nanotyčky jsou obvykle syntetizovány v přítomnosti CTAB, který se k povrchu váže silněji. Může tak dojít k úplné nebo částečné agregaci během funkcionalizace, pokud je CTAB struktura kolem tyček narušena [12]. Často se podaří vyměnit molekuly pouze na hrotech tyček, protože je tam vazba CTAB slabší než na jejich bocích [34].

V závislosti na geometrickém tvaru surfaktantu může kolem nanočástice tvořit 2 formy – micelární nebo dvojvrstevnou strukturu. V micelární struktuře je polární strana surfaktantu umístěna směrem k vodě. Ve dvojvrstevné struktuře jsou přítomny 2 vrstvy – vnější a vnitřní. Vnitřní vrstva je k povrchu ukotvena hlavní skupinou a spojena s vnější vrstvou pomocí hydrofóbních interakcí, zatímco hlavní skupina vnější vrstvy je orientována k vodnímu prostředí [39].

3.2.4.1 Surfaktantové dvojvrstvy

Jelikož nanočástice mají tendenci být v roztoku nestabilní a srážet se, musí se přijmout opatření, které tomu zabrání. Zřejmě nejjednodušší metodou je vytvoření dvojvrstvy na povrchu pomocí surfaktantů, nejčastěji CTAB [40].

Jak již bylo zmíněno, AuNR jsou obvykle vyráběny metodou růstu jader. Povrchově aktivní CTAB slouží jako strukturu-určující látka, což vede k produkci vysoce homogenních AuNR [20]. Ovšem CTAB není jen činidlo anizotropního růstu, ale také stabilizátor, který tvoří pevně vázanou kationtovou dvojvrstvu na povrchu AuNR [11,20].

V CTAB dvojvrstvě na AuNR je vnitřní vrstva vázána na povrch zlata pomocí povrchově aktivní hlavní skupiny. Tato vnitřní vrstva má hlavní úlohu pro stabilizaci tyčkovitého tvaru. Když se vnitřní vrstva uvolní z povrchu, dojde k tvarové deformaci z tyček na sféry. Vnější vrstva má kladný náboj [39]. CTAB dvojvrstva má dynamický charakter, proto se volné molekuly CTAB mohou z této vrstvy desorbovat, což má za následek toxicitu roztoku CTAB [41]. Vnitřní vrstva je vázaná silně, vnější vrstva slabě [12]. Se zvýšením teploty se vrchní vrstva desorbuje (hydrofobní interakce mezi nepolárními řetězci) a následně s dalším zvýšením teploty opouští povrch vnitřní vrstva (silnější vazba hlavní skupiny surfaktantu k povrchu nanočástice) [39]. Pokud koncentrace CTAB klesne pod kritickou micelární koncentraci, mají tyčky tendenci agregovat [12] a už nejsou rozpustné [34].

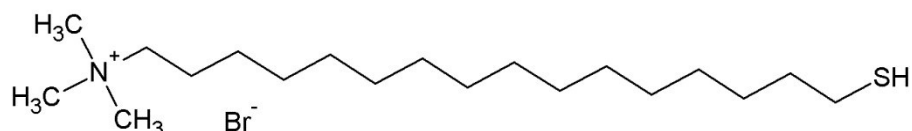
Cytotoxicita roztoku takto obalených nanočástic však není způsobena CTAB vrstvami, které jsou staticky vázané na AuNR, nýbrž CTAB uvolněným do roztoku. Ten interferuje s biologickými systémy, a tak vykazuje vysokou cytotoxicitu. Opakovaným odstředováním se snižuje přebytek CTAB se současným zachováním CTAB dvojvrstvy. Tyto dvojvrstvy mohou být desorbovány z povrchu, ale eliminace desorbovaného CTAB by vedla k agregaci AuNR [20].

Místo běžného CTAB lze také použít polymerizovaný CTAB. Nanosféry lze připravit v roztoku přímo s ním, ale u nanotyček musí k polymerizaci dojít až na jejich povrchu [41].

3.2.4.2 Samoskladné monovrstvy

Právě cytotoxicita CTAB obalených nanočástic vede k hledání jiných netoxických alternativ [34]. Byly zkoumány mnohé organické sloučeniny s různými reakčními skupinami typu thiol, disulfid, sulfid, thiosíran, fosfát, amin, karboxyl, nebo isokyanid. Nejoblíbenějšími se staly thioly díky své tvorbě ochranných monovrstev na AuNP [42]. Zlaté povrchy snadno reagují s thiolovými skupinami a tvoří stabilní Au-S vazby [14]. Takto chráněné nanočástice mají dobrou stabilitu. Ovšem právě kvůli jejich silné vazbě na povrch a vysoké hustotě monovrstvy by thioly také mohly negativně ovlivňovat biologické funkce AuNP [42].

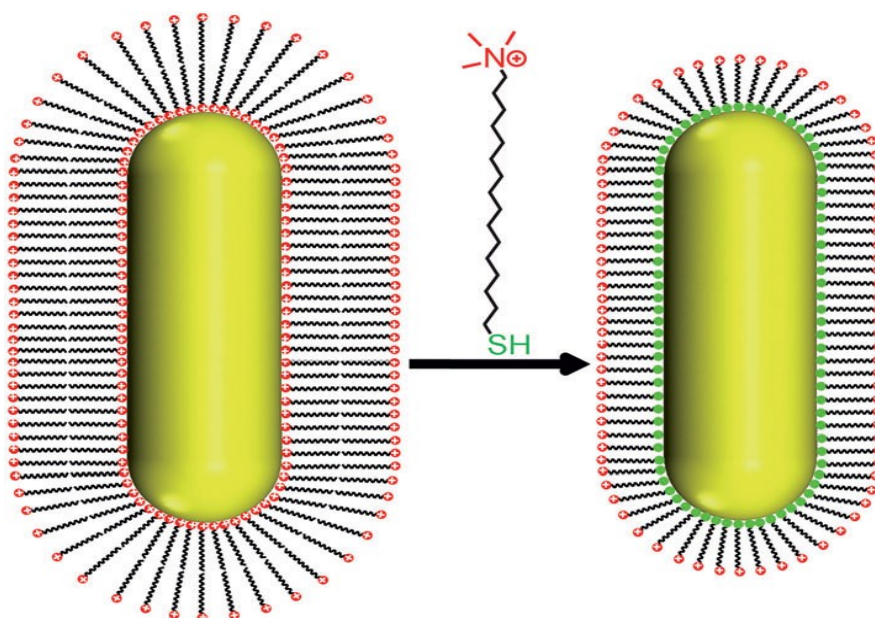
Nahrazení CTAB za jeho thiolový analog 16-(merkaptohexadecyl)trimethylamonium-bromid (MTAB; název sloučeniny takto popsán v literatuře, podle IUPAC by měl být správný systematický název 16-sulfanylhexadecyltrimethylamonium-bromid) je možné přímou výměnou ve vodě, kdy je nekovalentně vázaný CTAB kompletně nahrazen kompaktní thiolátovou monovrstvou, která je vázaná na povrch nanočástic kovaletní Au-S vazbou [34].



Obrázek 3 Struktura 16-(merkaptohexadecyl)trimethylamonium-bromidu

I po 5 cyklech centrifugace neztratily MTAB nanočástice svou stabilitu, což umožňuje jejich kompletní vyčištění, narozdíl od CTAB nanočástic, které po 4 cyklech centrifugace naprosto ztratily svou rozpustnost. MTAB nanočástice se mohou úplně

vysušit a udržovat v pevném stavu bez ztráty rozpustnosti ve vodě. MTAB monovrstva je schopna stabilizovat povrch nanočástic v čisté vodě po dobu několika měsíců. To dokazuje, že přítomnost volného surfaktantu v roztoku nanočástic není nutná, pokud je jejich povrch kovalentně funkcionalizován hustým organickým pláštěm [34].



Obrázek 4 Výměna CTAB dvojvrstvy za MTAB thiolovou monovrstvu [34].

Pro biologické aplikace byly připraveny zlaté nanokonjugáty s monovrstvou alkanthiolátu zakončeného aminovou skupinou. Aminové povrchové skupiny jsou při fyziologických hodnotách pH kladně nabitě, a tak elektrostaticky interagují s negativně nabitými NK [19].

3.2.5 Cytotoxicita a biokompatibilita zlatých nanočástic

AuNP musí být přezkoumány na biokompatibilitu a vliv na životní prostředí pokud mají být vyrobeny ve velkém množství a připraveny pro *in vivo* použití [11].

Zlatá jádra jsou inertní a jsou považována za biokompatibilní a netoxická [14]. Toxicita zlatých nanokonjugátů je tak závislá na chemickém složení povrchových ligandů. Ve skutečnosti je to často sama povrchová skupina, která vede k toxicitě [19]. Byla pozorována toxicita AuNP použitých ve vysokých koncentracích [43]. Ovšem při vysokých koncentracích může být toxické cokoliv. Proto je potřeba zjistit, jak jsou AuNP toxické v koncentraci, která by mohla být potenciálně používána [11]. V aplikacích jako CT jsou potřeba velké dávky (1,35 g Au/kg), oproti tomu v aplikacích jako fotoakustické zobrazování jsou dávky zlata řádově nižší (22,7 μg Au/kg). Zásadní

je také studium vylučování AuNP, protože dlouhá doba retence velkého množství injikovaného materiálu vede k obavám z dlouhodobých účinků. U nižších dávek, jako u fotoakustického zobrazování, by to nemuselo být tak klíčové, protože malá množství zlata jsou obvykle v těle přítomna a tolerována [14]. Cytotoxicitu ovlivňuje i povrch a typ buněk [11], stejně jako velikost konjugátu [19].

Kationické nanočástice jsou mírně toxické, zatímco anionické se jeví jako netoxické [11,43]. Pro studium byly použity lipidové vezikuly obsahující fluorescenční barvivo. Narušení vezikulu má za následek zvýšení fluorescence v důsledku uvolnění barviva. Všechny typy buněk mají celkový náboj záporný, a tak pomocí elektrostatických interakcí dochází k lýze buněk kationickými nanočásticemi. Rotello et al. zjistili, že amin-funkcionalizované nanočástice byly mírně toxické, zatímco nanočástice funkcionalizované s karboxylovou kyselinou byly za všech zkoušených podmínek netoxické [43].

Byly navrženy různé metody obalování nanočástic pro zvýšení biokompatibility jako ligandová substituce, amfifilní potah nebo vestavění do nosné matrice [14]. Potažení biokompatibilním obalem je důležité pro snížení vychytávání nanočástic retikuloendoteliálním systémem (RES) a brání nespecifickým vazbám na biologické látky [14]. Nejvíce používaný je obal z PEG, který má neutrální náboj a vysokou hydrofilitu, čímž brání nespecifické adsorpci proteinů na nanočásticový povrch a snižuje vychytávání RES, a tak prodlužuje cirkulaci v krevním oběhu [14]. Ovšem buněčné vychytávání pegylovaných nanočástic je přibližně jen 6% ve srovnání s nanočásticemi s CTAB vrstvou [11]. Další možností může být polyelektrolytové obalování vrstvou po vrstvě [14]. Mezi další možnosti patří obalení AuNP proteiny jako bovinní sérový albumin, nebo obalem z oxidu křemičitého [14] či fosfatidylcholinu [11]. Nanočástice obalené MTAB monovrstvou se také jeví jako netoxické až do koncentrace 0,1 g/l a v *in vitro* testech byly rakovinnými buňkami přijímány ve velkých množstvích [34]. AuNP mohou být také inkorporovány do větších částic z polymerů nebo lipidů jako liposomy, micely nebo dendrimery. Tím je umožněno integrování více komponent na povrch AuNP, kde mohou být použity diagnostické nebo terapeutické materiály [14].

4 Experimentální část

4.1 Obecná experimentální část

Rozpouštědla a chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Česká republika) a použity bez dalšího přečištění. Reakce byly monitorovány pomocí TLC (TLC silikagel 60 F254 nebo aluminium oxid neutrální 60 F254, Merck, Německo). Detekce byla provedena pod UV při 254 nm, postříkem vypalovacím činidlem ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 1 g, kys. fosfomolybdenová 2 g, konc. H_2SO_4 5 ml, H_2O 100 ml) a následně zahřátím vypalovací pistolí. Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel (Fluka, high-purity grade, pore size 60 Å, 70-230 mesh, 63-200 µm) nebo oxid hlinitý (Merck, 90 activ neutral, 70-230 mesh, 63-200 µm).

Zahřívání reakční směsi bylo realizováno pod zpětným chladičem v lázni silikonového oleje na magnetické míchače Heidolph MR Hei-Standard, teplota byla nastavována a kontrolována pomocí digitálního teplotního snímače. Filtrace a odpařování probíhaly za sníženého tlaku. K odpařování byla použita vakuová rotační odparka Heidolph Laborota 4000 s vakuovým systémem Vacubrand PC 510. Při rozpouštění byla používána ultrazvuková lázeň Polsonic. U některých reakcí byla výchozí sloučenina do reakční směsi přidávána injekční pumpou Harvard Apparatus 11 Plus. Odměřování malých objemů reaktantů bylo prováděno pomocí automatické pipety Biohit Proline. Reakční schémata a vzorce byla vytvářena v programu ChemSketch 12.0 (Advanced Chemistry Development Inc.).

NMR spektra byla měřena na přístrojích Varian Mercury-VxBB 300 (299.95 MHz pro ^1H a 75.43 MHz pro ^{13}C ; Varian Corp., Palo Alto, CA, USA) a na Varian Gemini 300 (300 MHz pro ^1H , 75 MHz pro ^{13}C , Palo Alto CA, USA) za pomoci doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. na Katedře anorganické a organické chemie (Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova).

HR-MS spektra byla stanovena kombinovanou metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie v Centru biomedicínského výzkumu (Fakultní nemocnice Hradec Králové) za pomoci Mgr. et Mgr. Rafaela Doležala, Ph.D. Analytický chromatografický systém Dionex UltiMate 3000 a hybridní kvadrupól-orbitrap spektrometr Q Exactive Plus byly dodány firmou ThermoFisher Scientific (Brémy, Německo). Hmotností spektra byla analyzována pomocí software Xcalibur 3.0.63 (ThermoFisher Scientific, Brémy, Německo). Studované látky byly rozpuštěny v

methanolu (Sigma Aldrich) a injikovány do LCMS systému vybaveného kolonou Waters Atlantis dC18 (2.1 x 100mm/5 μ m). Byl použit iontový zdroj HESI (heated electrospray ionization) v kladném módu s následujícím nastavením: průtok stínícího (sheath) plynu 40, průtok pomocného (aux) plynu 10, průtok odfukového (sweep) plynu 2, rozprašovací napětí 3.2 kV, teplota kapiláry 350 °C, teplota pomocného plynu 300 °C, úroveň S-lens RF 50.

4.2 Obecný postup syntézy

Syntéza byla prováděna pomocí dvou postupů přípravy se záměrem získání totožných produktů, jak je znázorněno na *Schématu 1*.

V prvním postupu byl výchozí látkou 1,12-dibromdodekan, ze kterého byl reakcí s thioacetátem draselným připraven *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoát (**1**). Z něj byl připraven 12-bromdodekan-1-thiol (**2**) a posléze reakcí se sloučeninami dusíku za vzniku konečného produktu. Jako rozpouštědlo pro poslední reakci byl zkoušen acetonitril a dimethylformamid.

Druhý postup byl totožný v přípravě *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoátu (**1**), který posléze reagoval s odpovídající dusíkatou sloučeninou. Výsledný produkt byl převeden na příslušný thiol pomocí deacetylace. Jako deacetylační činidlo byl zkoušen 48% roztok HBr a acetylchlorid.

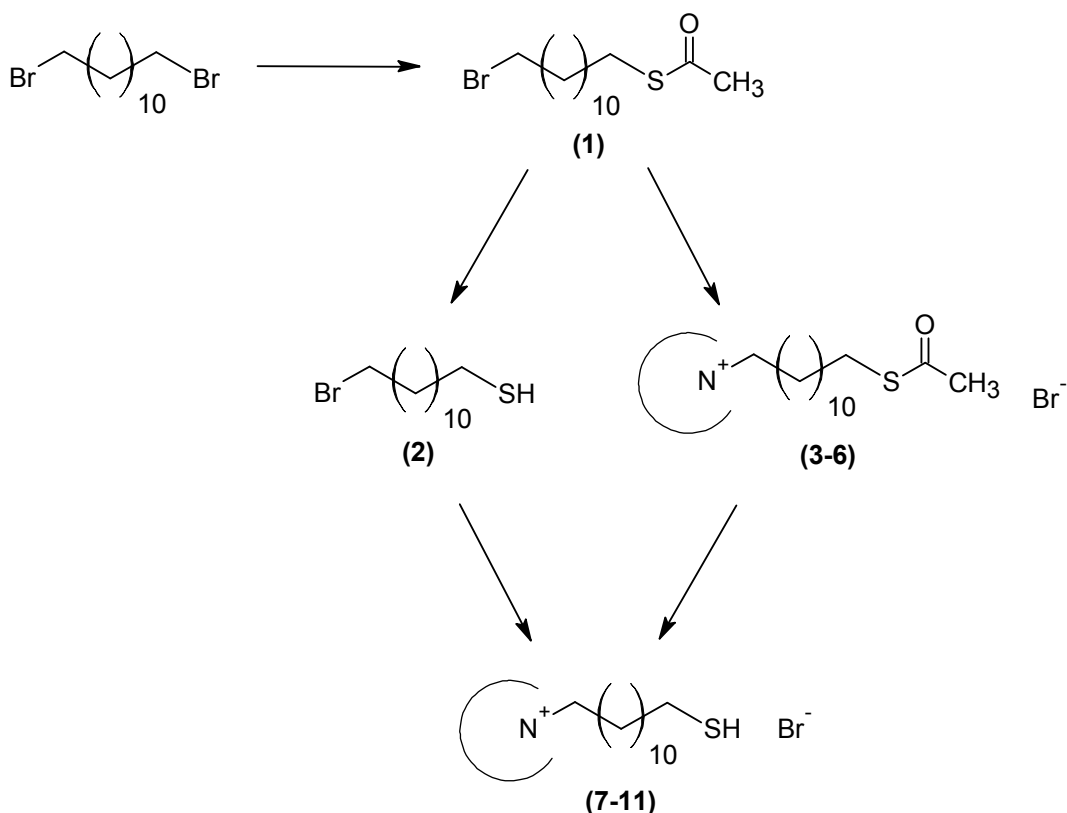


SCHÉMA 1 Příprava kationických povrchově aktivních látek

4.2.1 Příprava *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoátu (**1**)

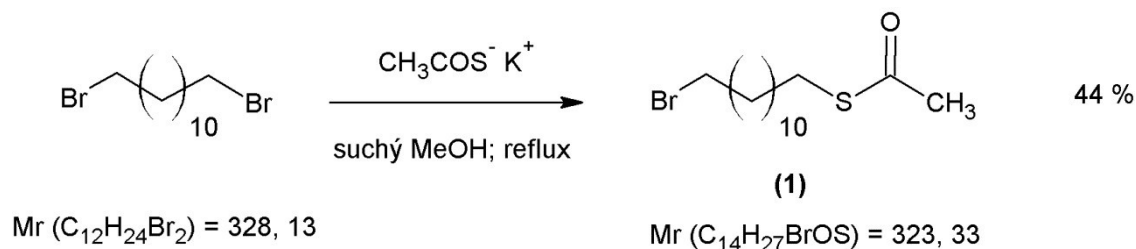


SCHÉMA 2 Příprava *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoátu (**1**)

1,12-dibromdodekan (4.00 g; 12.2 mmol) byl v atmosféře dusíku rozpuštěn v suchém methanolu (60 ml). Injekční jehlou k němu byl po dobu 4 hodin přidáván thioacetát draselný (1.67 g; 14.6 mmol) předem rozpuštěný v suchém methanolu (25 ml) pomocí ultrazvuku. Reakce probíhala za stálého míchání při refluxu methanolu.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku a produkt byl extrahován heptanem (2× 100 ml) a odfiltrován. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku.

Surový produkt byl následně čištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (80 g silikagelu; eluce heptan/EtOAc 25/1). Detekce pomocí TLC (silikagel; heptan/EtOAc 25/1).

Čistý *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoát (**1**) byl získán jako bezbarvá kapalina (44 %) a potvrzen pomocí NMR analýzy.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3.40 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 2.86 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.32 (s, 3H, CH_3), 1.88-1.81 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$), 1.59-1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 1.45-1.23 (m, 16H, $-(\text{CH}_2)_8-$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 196.04, 109.98, 34.03, 32.82, 30.63, 29.48, 29.46, 29.41, 29.39, 29.14, 29.08, 28.79, 28.74, 28.16.

4.2.2 Příprava 12-bromdodekan-1-thiolu (2)

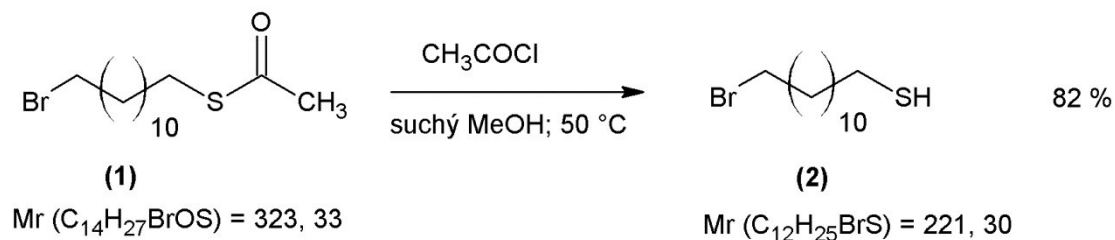


SCHÉMA 3 Příprava 12-bromdodekan-1-thiolu (2)

S-(12-bromododecyl)thioethanoát **(1)** (1.73 g; 5.35 mmol) byl v atmosféře dusíku rozpuštěn v suchém methanolu (90 ml) a následně byl přidán acetylchlorid (3,0 ml; 42.8 mmol). Reakce probíhala při 50 °C za stálého míchání 12 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. Produkt byl rozpuštěn v EtOAc (50 ml) a vytřepán solankou (3 × 50 ml). Následně byl sušen bezvodým síranem sodným, který byl poté filtrován a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku.

Surový produkt byl následně čištěn pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (100 g silikagelu; příprava heptan/TEA 100/2 %; eluce heptan 100%). Detekce pomocí TLC (silikagel; heptan/EtOAc/TEA 9/1/2 %).

Čistý 12-bromdodekan-1-thiol **(2)** byl získán jako bezbarvý olej (82 %) a potvrzen pomocí NMR analýzy.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 3.43 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂-Br), 2.49 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-SH), 1.87-1.80 (m, 2H, CH₂-CH₂-Br), 1.63-1.55 (m, 2H, CH₂-CH₂-SH), 1.48-1.26 (m, 16H, -(CH₂)₈-).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 35.29, 34.45, 34.07, 30.70, 30.68, 30.66, 30.63, 30.26, 29.90, 29.47, 29.24, 25.03.

4.3 Příprava meziproductů

4.3.1 Příprava *N,N,N*-trimethyl-12-acetylsulfanyldodecyl-1-amonium-bromidu (**3**)

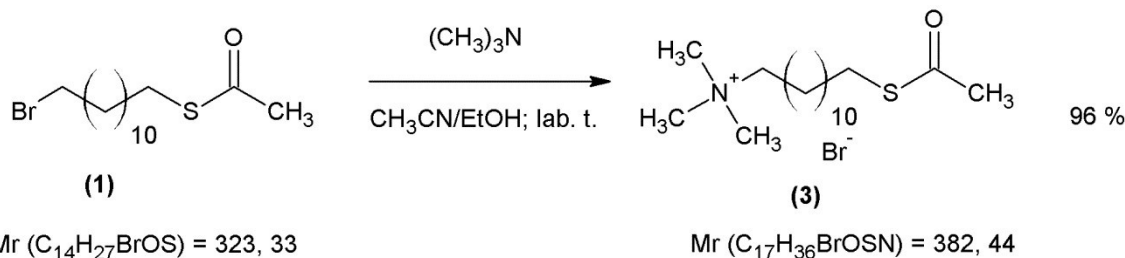


SCHÉMA 4 Příprava *N,N,N*-trimethyl-12-acetylsulfanyldodecyl-1-amonium-bromidu (**3**)

S-(12-bromododecyl)thioethanoát (**1**) (0.30 g; 0.92 mmol) byl rozpuštěn v atmosféře dusíku v suchém MeCN (5 ml) a následně byl přidán roztok trimethylaminu v ethanolu (5 ml). Reakce probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 143 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. K produktu byl přidán petrolether (30 ml) s následnou sonikací v ultrazvuku (5 min). Produkt se rozpustil. Směs byla ponechána 18 hodin při 4 °C. Produkt byl filtrován za sníženého tlaku a sušen v exsikátoru.

Čistý *N,N,N*-trimethyl-12-acetylsulfanyldodecyl-1-amonium-bromid (**3**) byl získán jako bezbarvá krystalická látka (96 %) a potvrzen pomocí NMR analýzy.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 3.32 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.12 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 2.85 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.30 (s, 3H, CH_3), 1.83-1.74 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 1.59-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 1.44-1.27 (m, 16H, $-(\text{CH}_2)_8-$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 197.67, 67.98, 67.95, 67.93, 53.55, 49.89, 30.80, 30.62, 30.58, 30.53, 30.24, 30.21, 29.87, 29.81, 27.40, 23.98.

4.3.3 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)isochinolinium-bromidu (5)

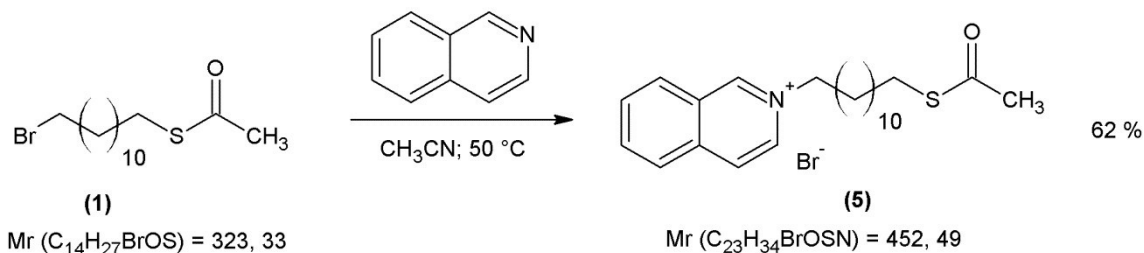


SCHÉMA 6 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)isochinolinium-bromidu (5)

S-(12-bromododecyl)thioethanoát (1) (0.30 g; 0.92 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (5 ml) a následně byl přidán isochinolin (0.18 g; 1.39 mmol). Reakce probíhala při 50 °C za stálého míchání po dobu 179 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. K surovému produktu byl přidán petrolether (20 ml). Směs byla přivedena k varu a za horka filtrována.

Čistý 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)isochinolinium-bromid (5) byl získán jako bezbarvá krystalická látka (62 %) a potvrzen pomocí NMR analýzy.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 9.97 (s, 1H, Ar), 8.70 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, Ar), 8.53-8.49 (m, 2H, Ar), 8.33 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 8.28-8.24 (m, 1H, Ar), 8.11-8.06 (m, 2H, Ar), 4.78 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH₂-N), 2.85 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂-S), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.17-2.09 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 1.58-1.50 (m, 2H, CH₂-CH₂-S), 1.48-1.25 (m, 16H, -(CH₂)₈-).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 197.63, 150.97, 139.08, 138.41, 135.79, 132.70, 131.56, 129.32, 128.61, 127.63, 62.98, 32.40, 30.78, 30.59, 30.55, 30.46, 30.18, 30.14, 29.87, 29.79, 27.30.

4.3.4 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)pyridazinium-bromidu (6)

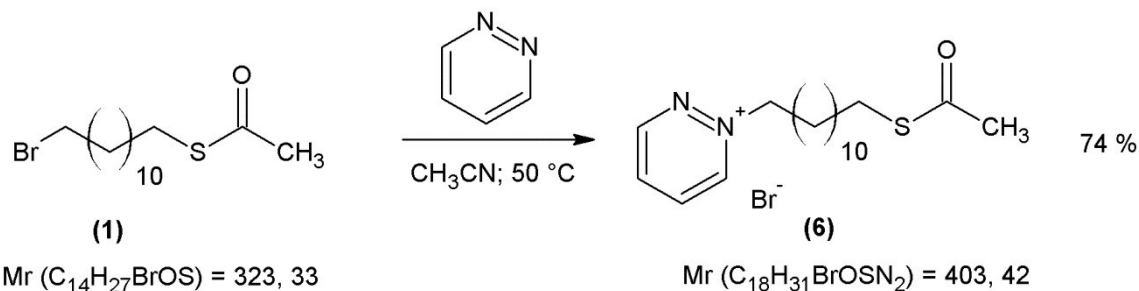


SCHÉMA 7 Příprava 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)pyridazinium-bromidu (6)

S-(12-bromododecyl)thioethanoát (**1**) (0.30 g; 0.92 mmol) byl rozpuštěn v MeCN (10 ml) a následně byl přidán pyridazin (0.10 ml; 1.39 mmol). Reakce probíhala při 50 °C za stálého míchání po dobu 101 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. K surovému produktu byl přidán petrolether (2 × 20 ml), směs byla přivedena k varu a za horka filtrována.

Čistý 1-(12-acetylsulfanyldodecyl)pyridazinium-bromid (**6**) byl získán jako bezbarvá krystalická látka (74 %) a potvrzen pomocí NMR analýzy.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 9.88 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz, Ar), 9.56 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz, Ar), 8.69-8.64 (m, 1H, Ar), 8.59-8.54 (m, 1H, Ar), 4.89 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂-N), 2.86 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-S), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.18-2.10 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 1.60-1.52 (m, 2H, CH₂-CH₂-S), 1.48-1.27 (m, 16H, -(CH₂)₈-).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 197.65, 155.92, 150.95, 137.82, 137.09, 67.00, 31.29, 30.78, 30.61, 30.57, 30.56, 30.45, 30.19, 30.10, 29.88, 29.80, 27.18.

4.4 Příprava konečných produktů

4.4.1 Příprava *N,N,N*-trimethyl-12-sulfanyldodecyl-1-amonium-bromidu (7)

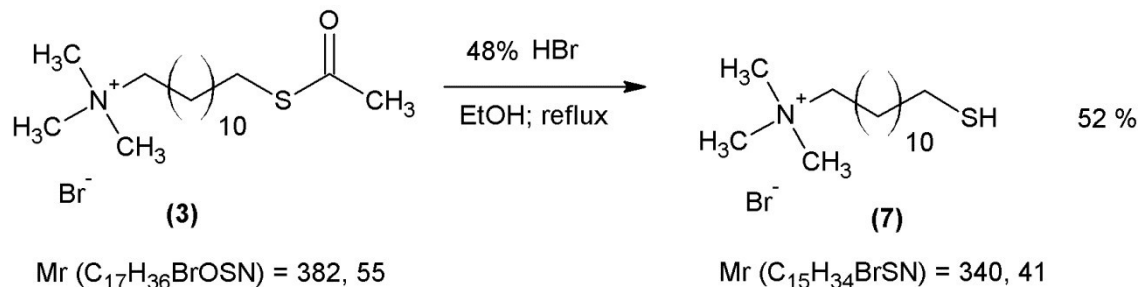


SCHÉMA 8 Příprava *N,N,N*-trimethyl-12-sulfanyldodecyl-1-amonium-bromidu (7)

N,N,N-trimethyl-12-acetylsulfanyldodecyl-1-amonium-bromid (**3**) (0.43 g; 1.13 mmol) byl rozpuštěn v 96% ethanolu a následně byl přidán 48% roztok HBr (0.61 ml; 11.31 mmol). Reakce probíhala při refluxu ethanolu za stálého míchání po dobu 24 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku a koevaporována s toluenem (2 × 20 ml). Surový produkt byl čištěn sloupcovou kapalinovou chromatografií (200 g silikagelu; eluce chloroform/MeOH/amoniak 6/3/1). Detekce pomocí TLC (silikagel; chloroform/MeOH/amoniak 6/3/1).

Čistý *N,N,N*-trimethyl-12-sulfanyldodecyl-1-amonium-bromid (**7**) byl získán jako bezbarvá krystalická látka (52 %) a potvrzen pomocí NMR a MS analýzy.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 3.35 (t, 2H, $J = 8.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.14 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 2.48 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-SH}$), 1.83-1.74 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.62-1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$), 1.44-1.25 (m, 16H, $-(\text{CH}_2)_8$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 67.94, 53.65, 35.23, 30.65, 30.61, 30.54, 30.24, 30.22, 29.42, 27.39, 25.01, 24.00.

HRMS 260.24045 (vypočteno pro $[\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{NS}^+]$ 260.240098).

4.4.2. Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridinium-bromidu (8)

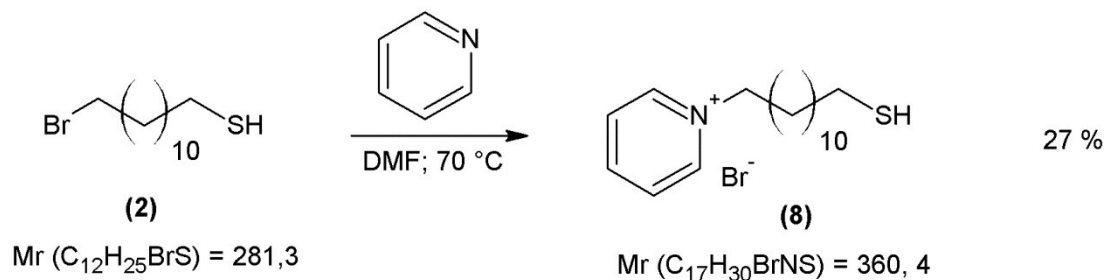


SCHÉMA 9 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridinium-bromidu (8)

12-bromdodekan-1-thiol (**2**) (0.30 g; 1.07 mmol) byl rozpuštěn v DMF (5 ml) a následně byl přidán pyridin (0.13 ml; 1.59 mmol). Reakce probíhala při 70 °C za stálého míchání po dobu 126 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. Surový produkt byl čištěn sloupcovou kapalinovou chromatografií (50 g aluminium-oxidu; eluce dichlormethan/MeOH/amoniak 9/1/2 %). Detekce pomocí TLC (aluminium-oxid; dichlormethan/MeOH/amoniak 9/1/2 %)

Čistý 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridinium-bromid (**8**) byl získán jako bezbarvá amorfni látka (27 %) a potvrzen pomocí NMR a MS analýzy.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 9.04 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, Ar), 8.65-8.59 (m, 1H, Ar), 8.18-8.10 (m, 2H, Ar), 4.66 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-N), 2.50 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂-SH), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.09-1.99 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 1.64-1.53 (m, 2H, CH₂-CH₂-SH), 1.48-1.24 (m, 16H, -(CH₂)₈-).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 146.89, 145.98, 129.55, 63.17, 35.23, 32.54, 30.68, 30.65, 30.60, 30.49, 30.22, 30.12, 29.42, 27.21, 25.00.

HRMS 280.20850 (vypočteno pro [C₁₇H₃₀NS⁺] 280.208798).

4.4.3 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)chinolinium-bromidu (9)

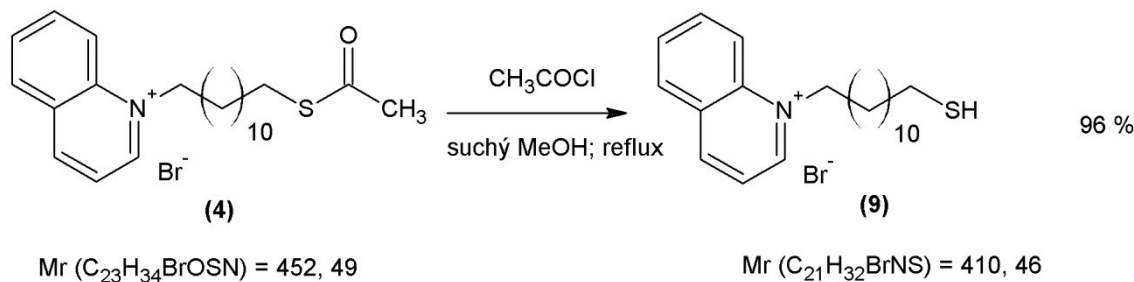


SCHÉMA 10 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)chinolinium-bromidu (9)

1-(12-acetylsulfanyldodecyl)chinolinium-bromid (4) (0.23 g; 0.50 mmol) byl rozpuštěn v suchém MeOH (30 ml) a následně byl přidán acetylchlorid (0.28 ml; 4.01 mmol). Reakce probíhala při refluxu methanolu za stálého míchání po dobu 48 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. K surovému produktu byl přidán petrolether (25 ml), směs byla sonikována v ultrazvuku (10 min) a filtrována.

Čistý 1-(12-sulfanyldodecyl)chinolinium-bromid (9) byl získán jako nahnědlá krystalická látka (96 %) a potvrzen pomocí NMR a MS analýzy.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 9.42 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, Ar), 9.20 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, Ar), 8.55 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar), 8.42 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, Ar), 8.30-8.25 (m, 1H, Ar), 8.10-8.01 (m, 2H, Ar), 5.08 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂-N), 2.45 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-SH), 2.12-2.04 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 1.58-1.43 (m, 2H, CH₂-CH₂-SH), 1.42-1.21 (m, 16H, -(CH₂)₈-).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 150.39, 149.06, 137.34, 132.21, 131.85, 131.42, 123.11, 119.79, 59.46, 35.22, 31.17, 30.64, 30.58, 30.51, 30.21, 29.41, 27.54, 24.99.

HRMS 330.22421 (vypočteno pro [C₂₁H₃₂NS⁺] 330.224448).

4.4.4 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)isochinolinium-bromidu (10)

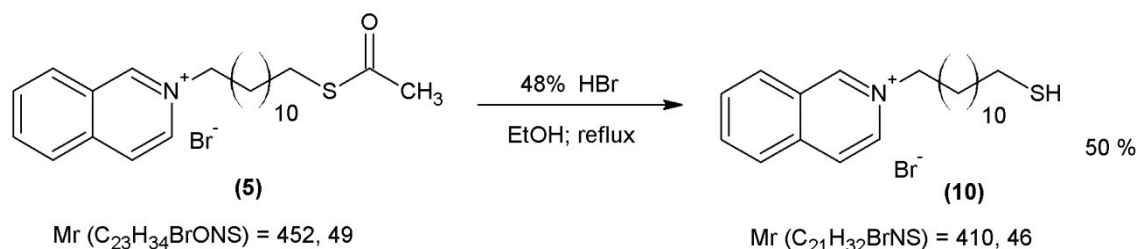


SCHÉMA 11 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)isochinolinium-bromidu (10)

1-(12-acetylsulfanyldodecyl)isochinolinium-bromid (**5**) (0.24 g; 0.53 mmol) byl rozpuštěn v 96% ethanolu (10 ml) a následně byl přidán 48% roztok HBr (0.45 ml; 8.45 mmol). Reakce probíhala při refluxu ethanolu za stálého míchání po dobu 22 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku a koevaporována s toluenem (2 × 20 ml).

Surový produkt byl následně čištěn sloupcovou kapalinovou chromatografií (140 g silikagelu; eluce chloroform/MeOH/amoniak 6/3/1). Detekce pomocí TLC (silikagel; chloroform/MeOH/amoniak 6/3/1).

Čistý 1-(12-sulfanyldodecyl)isochinolinium-bromid (**10**) byl získán jako bezbarvá amorfnní látka (50 %) a potvrzen pomocí NMR a MS analýzy.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 9.95 (s, 1H, Ar), 8.69 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, Ar), 8.52-8.47 (m, 2H, Ar), 8.32 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, Ar), 8.28-8.23 (m, 1H, Ar), 8.10-8.06 (m, 2H, Ar), 4.77 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.48 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-SH}$), 2.16-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.60-1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$), 1.48-1.25 (m, 16H, - $(\text{CH}_2)_8$ -).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 150.98, 139.09, 138.42, 135.78, 132.71, 131.56, 129.33, 128.61, 127.63, 62.99, 35.22, 32.40, 30.63, 30.59, 30.49, 30.21, 30.15, 29.41, 27.31, 24.99.

HRMS 330.22400 (vypočteno pro $[\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NS}^+]$ 330.224448).

4.4.5 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridazinium-bromidu (11)

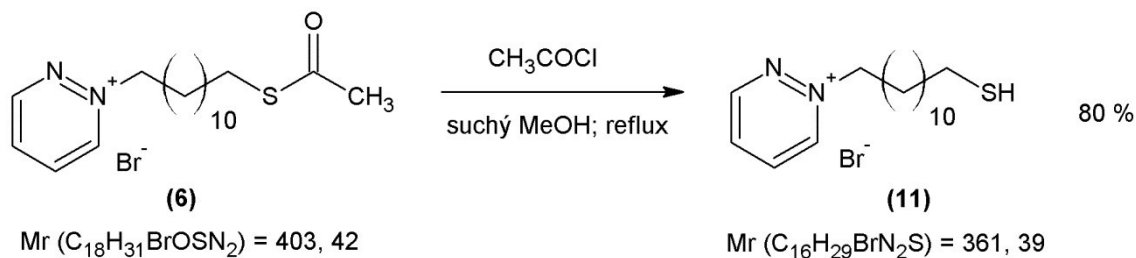


SCHÉMA 12 Příprava 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridazinium-bromidu (11)

1-(12-acetylsulfanyldodecyl)pyridazinium-bromid (**6**) (0.25 g; 0.63 mmol) byl rozpuštěn v suchém MeOH (40 ml) a následně byl přidán acetylchlorid (0.39 ml; 5.62 mmol). Reakce probíhala při refluxu MeOH za stálého míchání po dobu 26 hodin.

Směs byla odpařena za sníženého tlaku. K surovému produktu byl přidán petrolether (35 ml), směs byla přivedena k varu a za horka filtrována.

Čistý 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridazinium-bromid (**11**) byl získán jako nahnědlá krystalická látka (80 %) a potvrzen pomocí NMR a MS analýzy.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 9.87 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz, Ar), 9.56 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz, Ar), 8.68-8.63 (m, 1H, Ar), 8.58-8.53 (m, 1H, Ar), 4.88 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.49 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-SH}$), 2.17-2.09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.63-1.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$), 1.47-1.27 (m, 16H, $-(\text{CH}_2)_8-$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 155.91, 150.94, 137.82, 137.08, 66.98, 35.23, 31.30, 30.65, 30.61, 30.47, 30.23, 30.12, 29.42, 27.19, 25.00.

HRMS 281.20389 (vypočteno pro $[\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{S}^+]$ 281.204047).

5 Diskuse

***N,N,N*-trimethyl-12-sulfanyldodecyl-1-amonium-bromid (7)** byl připraven oběma postupy uvedenými v *kap. 4.2*. Nejprve se jej podařilo připravit reakcí trimethylaminu s 12-bromdodekan-1-thiolem (**2**) za použití acetonitrilu jako rozpouštědla. Produkt byl vyčištěn zahřátím ve směsi s heptanem. Výtěžek však byl 9 %, a proto byl připraven znovu, ovšem za použití dimethylformamidu. Produkt byl přečištěn sloupcovou kapalinovou chromatografií. Výtěžek byl 43 %, což je méně než při způsobu uvedeném v *kap. 4.4.1*, kde byl výtěžek 52 %.

1-(12-sulfanyldodecyl)pyridinium-bromid (8) byl připraven dvakrát. První postup odpovídá *kap. 4.4.2*, ovšem jako rozpouštědlo zde nebyl použit dimethylformamid, ale acetonitril při teplotě 70 °C. Produkt byl vyčištěn zahřátím ve směsi s diethyletherem. Výtěžek však byl 8 %, proto musel být připraven znova, a to postupem uvedeným v *kap. 4.4.2*, kde byl výtěžek 27 %.

1-(12-sulfanyldodecyl)chinolinium-bromid (9) byl připravován oběma postupy uvedenými v *kap. 4.2*. Nejprve se jej podařilo připravit reakcí chinolinu s 12-bromdodekan-1-thiolem (**2**). Ať však byl jako rozpouštědlo použit acetonitril nebo dimethylformamid, tak se produkt nepodařilo přečistit ani sloupcovou chromatografií. Posléze byl produkt připraven postupem uvedeným v *kap. 4.4.3*, ovšem jako deacetylační činidlo byl použit 48% roztok HBr. Produkt se ovšem také nepodařilo přečistit, a proto byl připraven počtvrté postupem uvedeným v *kap. 4.4.3* s výtěžkem 96 %.

1-(12-sulfanyldodecyl)isochinolinium-bromid (10) byl připraven oběma postupy uvedenými v *kap. 4.2*. Nejprve se jej podařilo připravit reakcí isochinolinu s 12-bromdodekan-1-thiolem (**2**). Jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Produkt byl vyčištěn zahřátím ve směsi s etherem. Výtěžek však byl 14 %, proto byl připraven znovu stejným způsobem, ovšem jako rozpouštědlo byl použit dimethylformamid. Produkt se však nepodařilo přečistit ani sloupcovou chromatografií, a proto byl připraven potřetí postupem uvedeným v *kap. 4.4.4*, kde byl výtěžek 50 %.

1-(12-sulfanyldodecyl)pyridazinium-bromid (11) byl připraven oběma postupy uvedenými v *kap. 4.2*. Nejprve se jej podařilo připravit reakcí pyridazinu s 12-bromdodekan-1-thiolem (**2**). Jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Produkt byl vyčištěn zahřátím ve směsi s diethyletherem. Výtěžek však byl 9 %, proto byl připraven

znovu stejným způsobem, ovšem jako rozpouštědlo byl použit dimethylformamid. Produkt se však nepodařilo přecistit ani sloupcovou kapalinovou chromatografií, a proto byl připraven potřetí postupem uvedeným v *kap. 4.4.5*, kde byl výtěžek 80 %.

Zdá se, že příprava produktů reakcí dusíkatých sloučenin s *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoátem (**1**) s následnou deacetylací na thiol přináší vyšší výtěžky, než reakce dusíkatých sloučenin přímo s 12-bromdodekan-1-thiolem (**2**). Při použití 48% roztoku HBr však musely být produkty čištěny sloupcovou kapalinovou chromatografií, což vede k nižším výtěžkům a produkty jsou pak často získány jako amorfní látky. Proto je zřejmě lepším deacetylačním činidlem acetylchlorid, kde k přečištění stačí zahřátí se směsí s petroletherem či sonikace s petroletherem. To značně usnadňuje přípravu produktů, vede k vyšším výtěžkům a produkty jsou pak získány jako krystalické látky.

Druhý způsob syntézy u většiny reakcí také poskytuje relativně snadný způsob čištění, je-li jako rozpouštědlo použit acetonitril. K vyčištění většinou postačí zahřátí ve směsi s etherem či heptanem, ovšem výtěžky okolo 10 % jsou neuspokojivé. Dimethylformamid se také nezdá jako vhodná volba, jelikož se ze směsi těžko odstraňuje, což komplikuje čištění, které je pak často neúspěšné, a produkty jsou získány jako amorfní látky.

6 Závěr

Výše uvedenými postupy bylo připraveno celkem 5 kvarterních amoniových solí s dvanáctiuhlíkatým alifatickým řetězcem a thiolovou skupinou v požadovaném množství a čistotě. Jedná se o molekuly v literatuře dosud nepopsané – *N,N,N*-trimethyl-12-sulfanyldodecyl-1-amonium-bromid (**7**), 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridinium-bromid (**8**), 1-(12-sulfanyldodecyl)chinolinium-bromid (**9**), 1-(12-sulfanyldodecyl)isochinolinium-bromid (**10**) a 1-(12-sulfanyldodecyl)pyridazinium-bromid (**11**).

Syntéza nových molekul byla provedena dvěma způsoby. První způsob zahrnoval přípravu *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoátu (**1**), ze kterého byl následně připraven 12-bromdodekan-1-thiol (**2**). Jeho reakcí s jednotlivými dusíkatými sloučeninami vznikly konečné produkty. Jejich čištění probíhalo různými způsoby v závislosti na jednotlivých látkách a použitém rozpouštědle. Druhý způsob také zahrnoval přípravu *S*-(12-bromdodecyl)thioethanoátu (**1**), který následně přímo reagoval s jednotlivými dusíkatými sloučeninami, z nichž byl připraven příslušný thiol. Čištění probíhalo různými způsoby v závislosti na jednotlivých sloučeninách a použitém deacetylačním činidle. Druhý způsob přípravy byl výhodnější vzhledem k výtěžkům reakcí a snazšímu čištění výsledných produktů.

Připravené sloučeniny budou využity jako obal pro zlaté nanočástice a budou zjišťovány specifické vlastnosti zlatých nanočástic s těmito připravenými surfaktanty.

7 Použitá literatura

- [1] SALAGER, J. L.; *Surfactants types and uses* [online]. 2002 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: <<http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>>.
- [2] SCHRAMM, L. L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G.; Surfactants and their applications. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.*, 2003, vol. 99, p. 3-48.
- [3] *Surfactant chemistry and general phase behaviour* [online]. [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/eastoe/Surf_Chem/1%20Surfactant%20chemistry%20and%20general%20phase%20behaviour.pdf>
- [4] RUBINGH, D.; *Cationic surfactants: Physical Chemistry*. 1st printing : CRC Press, 1990. p. 544. [ISBN 9780824783570].
- [5] MATA, J.; VARADE, D.; BAHADUR, P.; Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. *Thermochimica Acta*, 2005, vol. 428, no. 1-2, p. 147-155.
- [6] ZHAO, T.; SUN, G.; Hydrophobicity and antimicrobial activities of quaternary pyridinium salts. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, vol. 104, no. 3, p. 824-830.
- [7] GHOSH, S. K.; PAL, T.; Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.*, 2007, vol. 107, no. 11, p. 4797-4862.
- [8] ARVIZO, R.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P.; Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2010, vol. 7, no. 6, p. 753-763.
- [9] NIIDOME, T.; NAKASHIMA, K.; TAKAHASHI, H.; NIIDOME, Y.; Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells. *Chem. Commun.*, 2004, no. 17, p. 1978-1979.
- [10] MURPHY, C. J.; SAU, T. K.; GOLE, A. M.; ORENDORFF, CH. J ; GAO, J.; GOU, L.; HUNYADI, S. E.; LI, T.; Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, no. 29, p. 13857-13870.

- [11] MURPHY, C. J.; GOLE, A. M.; STONE, J. W.; SISCO, P. N.; ALKILANY, A. M.; GOLDSMITH, E. C.; BAXTER, S. C.; Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Acc. Chem. Res.*, 2008, vol. 41, no. 12, p. 1721-1730.
- [12] VIGDERMAN, L.; KHANAL, B. P.; ZUBAREV, E. R.; Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications. *Adv. Mater.*, 2012, vol. 24, no. 36, p. 4811-4841.
- [13] JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J.; Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.*, 2001, vol. 13, no. 18, p. 1389-1393.
- [14] MIESZAWSKA, A. J.; MULDER, W. J. M.; FAYAD, Z. A.; CORMODE, D. P.; Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Mol. Pharm.*, 2013, vol. 10, no. 3, p. 831-847.
- [15] SPERLING, R. A.; GIL, P. R.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W. J.; Biological applications of gold nanoparticle. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, vol. 37, no. 9, p. 1896-1908.
- [16] TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J.; A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*, 1951, vol. 11, p. 55-75.
- [17] FRENS, G.; Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, 1972, vol. 241, no. 105, p. 20-22.
- [18] BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; WHYMAN, R.; Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, no. 7, p. 801-802.
- [19] GILJOHANN, D. A.; SEFEROS, D. S.; DANIEL, W. L.; MASSICH, M. D.; PATEL, P. C.; MIRKIN, CH. A.; Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, vol. 49, no. 19, p. 3280-3294.
- [20] GUI, CH.; CUI, D. X.; Functionalized Gold Nanorods for Tumor Imaging and Targeted Therapy. *Cancer Biol. Med.*, 2012, vol. 9, no. 4, p. 221-233.

- [21] SMITH, D. K.; KORGEL, B. A.; The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods. *Langmuir*, 2008, vol. 24, no. 3, p. 644-649.
- [22] HE, H.; XIE, CH.; REN, J.; Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, no. 15, p. 5951-5957.
- [23] LIU, A.; YE, B.; Application of gold nanoparticles in biomedical researches and diagnosis. *Clin. Lab.*, 2013, vol. 59, no. 1-2, p. 23-36.
- [24] GHOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M.; Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, vol. 60, no. 11, p. 1307-1315.
- [25] LEE, S. E.; SASAKI, D. Y.; PERROUD, T. D.; YOO, D.; PATEL, K. D.; LEE, L. P.; Biologically Functional Cationic Phospholipid-Gold Nanoplasmonic Carriers of RNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, vol. 131, no. 39, p. 14066-14074.
- [26] WIJAYA, A.; SCHAFFER, S.; PALLARES, I. G.; HAMAD-SCHIFFERLI, K.; Selective Release of Multiple DNA Oligonucleotides from Gold Nanorods. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 1, p. 80-86.
- [27] SIEGEL, R.; MA, J.; JEMAL, A.; Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, 2014, vol. 64, no. 1, p. 9-29.
- [28] COUGHLIN, A. J.; WEST, J. L.; Targeting Gold Nanoparticles for Cancer Diagnostics and Therapeutics. (HEPEL, M.; ZHONG, C.) *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine, and Bioelectronic Devices*, 2012, vol. 2, p. 37-54.
- [29] EL-SAYED, I. H.; HUANG, X.; EL-SAYED M. A.; Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.*, 2006, vol. 239, no. 1, p. 129-135.
- [30] PATRA, CH. R.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P.; Fabrication and functional characterization of goldnanoconjugates for potential application in ovarian cancer. *J. Mater. Chem.*, 2010, vol. 20, no. 3, p. 547-554.

- [31] BAKER, C. H.; KEDAR, D.; MCCARTY, M. F.; TSAN, R.; WEBER, K. L.; BUCANA, C. D.; FIDLER, I. J.; Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling on Tumor Cells and Tumor-Associated Endothelial Cells for Therapy of Human Carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 2002, vol. 161, no. 3, p. 929-938.
- [32] DREADEN, E. C.; MWAKWARI, S. C.; SODJI, Q. H.; OYELERE, A. K.; EL-SAYED, M. A.; Tamoxifen-Poly(ethylene glycol)-Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment. *Bioconjug. Chem.*, 2009, vol. 20, no. 12, p. 2247-2253.
- [33] MUKHERJEE, P.; BHATTACHARYA, R.; WANG, P.; WANG, L.; BASU, S.; NAGY, J. A.; ATALA, A.; MUKHOPADHYAY, D.; SOKER, S.; Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin. Cancer Res.*, 2005, vol. 11, no. 9, p. 3530-3534.
- [34] VIGDERMAN, L.; MANNA, P.; ZUBAREV, E. R.; Quantitative Replacement of Cetyl Trimethylammonium Bromide by Cationic Thiol Ligands on the Surface of Gold Nanorods and Their Extremely Large Uptake by Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, vol. 51, no. 3, p. 636-641.
- [35] CHEN, J.; GLAUS, C.; LAFOREST, R.; ZHANG, Q.; YANG, M.; GIDDING, M.; WEICH, M. J.; XIA, Y.; Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. *Small*, 2010, vol. 6, no. 7, 811-817.
- [36] PARK, H.; YANG, J.; LEE, J.; HAAM, S.; CHOI, I. H.; YOO, K. H.; Multifunctional nanoparticles for combined doxorubicin and photothermal treatments. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 10, p. 2919-2926.
- [37] ELGHANIAN, R.; STORHOFF, J. J.; MUCIC, R. C.; LETSINGER, R. J.; MIRKIN, C. A.; Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 1997, vol. 277, no. 5329, p. 1078-1081.
- [38] WANG, B.; YANTSEN, E.; LARSON, T.; KARPIOUK, A. B.; SETHURAMAN, S.; SU, J. L.; SOKOLOV, K.; EMELIANOV, S. Y.; Plasmonic intravascular photoacoustic imaging for detection of macrophages in atherosclerotic plaques. *Nano Lett.*, 2009, vol. 9, no. 6, p. 2212-2217.
- [39] NIKOOLAKHT, B.; EL-SAYED, M. A.; Evidence for Bilayer Assembly of Cationic Surfactants on the Surface of Gold Nanorods. *Langmuir*, 2001, vol. 17, no. 20, p. 6368-6374.

- [40] ZHANG, L.; SUN, X.; SONG, Y.; JIANG, X.; DONG, S.; WANG, E.; Didodecyldimethylammonium Bromide Lipid Bilayer-Protected Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Self-Assembly. *Langmuir*, 2006, vol. 22, no. 6, p. 2838-2843.
- [41] ALKILANY, A. M.; NAGARIA, P. K.; WYATT, M. D.; MURPHY, C. J.; Cation Exchange on the Surface of Gold Nanorods with a Polymerizable Surfactant: Polymerization, Stability, and Toxicity Evaluation. *Langmuir*, 2010, vol. 26, no. 12, p. 9328-9333.
- [42] ISAACS, S. R.; CUTLER, E. C.; PARK, J. S., LEE, T. R.; SHON, Y. S.; Synthesis of tetraoctylammonium-protected gold nanoparticles with improved stability. *Langmuir*, 2005, vol. 21, no. 13, p. 5689-5692.
- [43] GOODMAN, C. M.; McCUSKER, C. D.; YILMAZ, T.; ROTELLO, V. M.; Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.*, 2004, vol. 15, no. 4, p. 897-900.