

VŠB – Technická univerzita Ostrava  
Univerzitní studijní program

**Hydrolýza bojových látek s využitím biosyntetizovaných  
zlatých nanočástic**  
**Warfare agents hydrolysis using bio-gold  
nanoparticles**

**Autor:**

Bc. Veronika Holišová

**Vedoucí diplomové práce:**

Ing. Gabriela Kratošová, Ph.D.

Ostrava 2014

## Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Veronika Holišová**

Studijní program: N3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T001 Nanotechnologie

Téma: **Hydrolyza bojových látek s využitím biosyntetizovaných zlatých nanočástic**  
**Warfare agents hydrolysis using bio-gold nanoparticles**

### Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je biosyntéza nanočástic zlata pomocí *Mallomonas kalinae*, jejich charakterizace a testování jejich katalytické účinnosti při hydrolyze bojových látek. Součástí diplomové práce bude:

1. Literární rešerše zaměřená na obecnou charakterizaci vybraných nervově paralytických látek, metody jejich detekce, dekontaminace a degradace. Pozornost bude věnována také nanomateriálům, které mohou být v procesech zneškodňování bojových látek v současné době využity.
2. Realizace experimentů biosyntézy zlatých nanočástic pomocí *Mallomonas kalinae*, charakterizace připravených nanočástic dostupnými analytickými metodami, studium jejich účinku při degradaci vybraných bojových látek a interpretace získaných dat.
3. Diskuze výsledků a posouzení vhodnosti daného materiálu při degradaci nervově paralytických jedů.

### Seznam doporučené odborné literatury:

1. Matoušek, J., Linhart, P.: CBRN – Chemické zbraně. 151. str., 2005, ISBN 80-86634-71-X.
2. Kratošová, G., Vávra, I., Horská K., Životný O., Němcová, Y., Bohunická M., Slabotinský, J., Rosenbergová, K., Schröfel, A.: Synthesis of Metallic Nanoparticles by Silica Based Algae – Outline, Prospect and Applications In: Sustainable Green Synthesis of Nanoparticles (Ed: Mahendra Rai and Clemens Posten), Springer Verlag (v tisku).
3. Schröfel A., Kratošová G.: Biosynthesis of metallic nanoparticles and their application, In: Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications (Ed: Aleš Prokop), Springer Verlag, 2011.
4. SALEM, Harry. Chemical Warfare Agents Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics [online]. 2008 [cit. 2013-10-29]. ISBN 978-1-4200-4661-8.
5. GUPTA, Ramesh C. Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Londýn: Academic press, 2009. ISBN 978-0-12-374484-5.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Gabriela Kratošová, Ph.D.**

Datum zadání: 11. 11. 2013

Datum odevzdání: 15. 05. 2014

---

prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.  
*vedoucí katedry*



---

prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.  
*prorektor pro studium*

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že se hlásím k autorství diplomové práce a souhlasím s jejím dalším využitím.

V Ostravě dne 15. 5. 2014

.....  
jméno a příjmení studenta

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji že,

- jsem byla seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že diplomová práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 15. 5. 2014

.....  
jméno a příjmení studenta

J. Kavky 3112, Frýdek-Místek  
.....

adresa trvalého pobytu studenta

## **Anotace:**

Diplomová práce je zaměřena na biosyntézu zlatých nanočástic prostřednictvím řasy *Mallomonas kalinae* a jejich praktické využití při dekontaminaci bojových látek. Teoretická část se zabývá obecnou charakterizací nervově paralytických látek, jejich detekcí, dekontaminací a degradací. V praktické části byly biosyntetizované nanočástice zlata charakterizovány převážně transmisí elektronovou mikroskopií a RTG difrakcí. Suspenze zlatých nanočástic byla poté testována jako katalyzátor při hydrolýze somanu (*O*-pinakolyl methylfosfonofluoridát) a VX (*O*-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methyl fosfonothiolát). Rozkladné procesy VX a somanu byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem a mikroextrakcí na tuhou fázi.

Klíčová slova: biosyntéza, zlaté nanočástice, hydrolýza, dekontaminace, soman, VX

Počet stran: 61

Vzor citace: HOLIŠOVÁ, V. *Hydrolýza bojových látek s využitím biosyntetizovaných zlatých nanočástic*. Ostrava, 2014. Diplomová práce. Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Gabriela Kratošová.

## **Annotation:**

The thesis focuses on the biosynthesis of gold nanoparticles using algae *Mallomonas kalinae* and their use in a decontamination of warfare agents. Theoretical part deals on general characterization of nerve agents, their detection, decontamination and degradation. In the practical part biosynthesized gold nanoparticles were characterized using mostly transmission electron microscopy and X-ray diffraction. Suspension of gold nanoparticles was used as catalyst for hydrolysis of soman (3,3-dimethyl 2-butyl methylphosphonofluoridate) and VX (*O*-ethyl S-2-(diisopropylamino)ethyl methylphosphonothionate). Reaction of chemical warfare agent VX and soman with gold nanoparticles have been studied using gas chromatography with mass spectroscopy detector and solid-phase microextraction.

Keywords: biosynthesis, gold nanoparticles, hydrolysis, decontamination, soman, VX

Number of pages: 61

Specimen citation: HOLIŠOVÁ, V. *Warfare agents hydrolysis using bio-gold nanoparticles*. Ostrava, 2014. Thesis. Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava. Supervisor Gabriela Kratošová.



## Poděkování

Tato práce byla vypracována s podporou projektu Nanotechnologie – báze pro mezinárodní spolupráci, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0074 podpořeného Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost, financovaného ze strukturálních fondů EU a státního rozpočtu ČR.

Děkuji především paní Ing. Gabriele Kratošové, Ph.D. za poskytnuté konzultace při přípravě mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Martinovi Urbanovi za poskytnutí spolupráce při testování degradace nervově paralytických látek a za jeho cenné rady, RNDr. Yvonne Němcové, Ph.D. za spolupráci při pěstování *Mallomonas kalinae*, Mgr., BcA. Adamovi Schröfloví, Ph.D. za poskytnutí snímků z transmisního elektronového mikroskopu, Mgr. Kateřině Mamulové Kutlákové, Ph.D. za RTG charakterizaci vzorku a Ing. Šárce Tomisové za analýzu vzorku metodou atomové emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem.

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Nervově paralytické látky</b> .....	<b>11</b>
1.1. Zařazení nervově paralytických látek .....	11
1.2. Obecná charakteristika nervově paralytických látek.....	12
1.3. Rozdělení nervově paralytických látek .....	13
1.3.1. Nervově paralytické látky řady G .....	13
1.3.2. Nervově paralytické látky řady V .....	14
1.3.3. Nervově paralytické látky GP .....	14
1.3.4. Binární chemické zbraně.....	15
1.4. Simulanty nervově paralytických látek .....	15
1.5. Toxický účinek nervově paralytických látek .....	16
1.6. Detekce nervově paralytických látek .....	17
<b>2. Degradace nervově paralytických látek</b> .....	<b>18</b>
2.1. Hydrolýza .....	18
2.2. Oxidace.....	20
2.3. Perhydrolýza.....	21
2.4. Nukleofilní reakce s kovy .....	22
2.5. Nukleofilní reakce s halogeny .....	23
2.6. Biologická degradace .....	23
2.7. Ostatní metody rozkladu nervově paralytických látek.....	24
<b>3. Dekontaminace vybraných NPL prostřednictvím nanomateriálů</b> .....	<b>25</b>
3.1. Nanodisperzní oxidy kovů připravené homogenní hydrolýzou .....	25
3.2. Nanotubulární materiály.....	27
3.3. Fotokatalytické nanomateriály .....	28
3.3.1. Fotokatalytické materiály na bázi TiO <sub>2</sub> .....	28



3.3.2. Fotokatalytické materiály na bázi Zn.....	29
3.4. Ostatní kovové nanomateriály.....	29
<b>4. Biosyntéza kovových nanočástic.....</b>	<b>30</b>
4.1. Vlastnosti nanozlata .....	32
4.2. Katalytické aplikace nanozlata.....	34
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Metody a materiály.....</b>	<b>36</b>
5.1. Příprava suspenze s obsahem zlatých nanočástic.....	36
5.1.1. Kultivace <i>Mallomonas kalinae</i> .....	36
5.1.2. Zpracování narostlé biomasy .....	38
5.1.3. Biosyntéza nanozlata.....	38
5.1.4. Použité metody charakterizace biosyntetizovaných nanočástic.....	39
5.2. Aplikace bionanozlata v hydrolyze somanu a VX.....	39
5.2.1. Detekce hydrolyzy somanu a VX v přítomnosti bionanočástic zlata .....	39
5.2.2. Postup testování hydrolytického rozkladu somanu.....	41
5.2.3. Postup testování hydrolytického rozkladu VX .....	42
<b>6. Výsledky.....</b>	<b>43</b>
6.1. Charakterizace suspenze nanočástic zlata .....	43
6.1.1. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	43
6.1.2. Výsledky RTG-difrakční analýzy a stanovení obsahu zlata v suspenzi .....	46
6.2. Výsledky hydrolyzy somanu.....	47
6.3. Výsledky hydrolyzy VX.....	49
<b>7. Diskuze.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Závěr .....</b>	<b>55</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>56</b>
<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>62</b>

## **Seznam zkratek a označení**

**BET** - Brunauer Emmett Tellerova metoda

**BJH** - Barrett Joyner Halendova metoda

**CEPS** - 2-chloroethylfenyl sulfid

**DESH** - diisopropylethyl merkptoamin

**DFP** - diisopropylfluorofosfonát

**DMMP** - dimethyl methylfosfonát

**EA-2192** - S-(2-diisoprylaminoethyl) methylfosfonothiolát

**EMPA** - kyselina ethyl methylfosfonová

**GA** - tabun

**GB** - sarin

**GC-FPD** - plynová chromatografie s fotometrickým detektorem

**GC-MSD** - plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

**GD** - soman

**GF** - cyklosarin

**HD** - yperit

**ICP-AES** - atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem

**IMPA** - kyselina isopropyl methylfosfonová

**IR** - infračervená spektroskopie

**MAS** - molekulová absorpční spektroskopie

**MK** - *Mallomonas kalinae*

**MPA** - kyselina methylfosfonová

**NMR** - nukleární magnetická rezonance

**NPL** - nervově paralytické látky

**OPH** - organofosforhydroláza

**OL** - otravné látky

**RTG difrakce** - rentgenová difrakce

**SEM** - skenovací elektronová mikroskopie

**SPME** - mikroextrakce na tuhou fázi

**SÚJCHBO** - Státní ústav jaderné, chemické a biologické obrany

**TEM** - transmisní elektronová mikroskopie

## ÚVOD

Nervově paralytické látky (NPL) jsou organické sloučeniny fosforu. Řadí se mezi velmi nebezpečné chemikálie, které mohou způsobovat závažná fyziologická poškození nebo smrt. Principem toxického účinku NPL je inhibice enzymu acetylcholinesteráza, který regeneruje prostředí pro průchod nového nervového impulzu přes synaptickou štěrbinu. Pokud nedojde k regeneraci, dojde k hromadění acetylcholinu (přenašeče nervového impulzu) a endogenní intoxikaci. Nervově paralytické látky mohou být detoxikovány několika způsoby, a to mechanickými, chemickými a fyzikálními [1, 2].

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na obecnou charakterizaci vybraných NPL a chemické metody jejich dekontaminace, kde řadíme hydrolýzu, oxidaci, perhydrolýzu, nukleofilní reakce s kovy, s halogeny a biologické degradace. Současný výzkum se také zaměřuje na využití nanomateriálů, právě pro jejich vysoký aplikační potenciál při degradaci bojových látek.

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci „Biosyntéza nanočástic ušlechtilých kovů“. Předmětem aplikace se staly nanočástice zlata syntetizované pomocí vodních řas *Mallomonas kalinae*. Byla tak vytvořena suspenze zlatých nanočástic. Ta byla dále použita při hydrolytické degradaci nervově paralytických jedů somanu a VX.

Praktická část se tedy zaměřuje na charakterizaci připravených nanočástic zlata a na jejich katalytický účinek při dekontaminaci somanu a VX. V závěru diplomové práce jsou diskutovány výsledky a porovnávány s ostatními nanomateriály. Dále je posouzena vhodnost připraveného bionanomateriálu pro degradaci NPL. V závislosti na dosažených výsledcích jsou navrženy optimalizační kroky pro zvýšení degradační účinnosti suspenze zlatých nanočástic.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Nervově paralytické látky

Počátky vývoje nervově paralytických látek (NPL) spadají do poloviny 30. let 19. století a jsou spojeny s vývojem nových syntetických pesticidů v Německu. Organická chemie fosforu se systematicky začala rozvíjet na přelomu 19. a 20. století za přispění Německa a Ruska [1].

NPL patří mezi smrtící látky, které mohou svým účinkem buď způsobovat dočasné paralyzování, nebo trvalé postižení lidí i zvířat. Jejimi rysy jsou rychlá účinnost, vysoká letalita a velmi nízká koncentrace, která může způsobit paralyzování či smrt, aniž by byl postižený varován svými smysly (jsou bez zápachu). Z těchto důvodů jsou při chemickém napadení nebezpečné [1].

Sloučeniny podobné struktury jako NPL se používají v průmyslu jako změkčovadla, pro nehořlavé úpravy, ve veterinární či humánní medicíně v podobě léčiva nebo jako sloučeniny k výzkumu nervových funkcí. Nejvíce byly využívány v zemědělství jako insekticidy [3].

### 1.1. Zařazení nervově paralytických látek

NPL se zařazují obecně mezi otravné látky (OL). Ty se rozdělují na dráždivé, zneschopňující, dusivé, všeobecně jedovaté a zpuchýřující látky. OL se řadí do skupin podle účelu přírodovědeckého (tzn. fyzikálního, chemického a toxikologického) a technického (z vojensky - zdravotnického pohledu) [1].

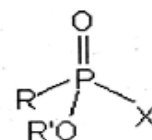
Z pohledu vojenské klasifikace mohou být OL řazeny podle účinku na živou sílu, rychlosti účinku a stálosti v terénu. NPL jsou řazeny do skupiny usmrcujících, jejichž použití způsobuje nevratné ztráty. Stálost v terénu je pro každou NPL rozdílná. Například VX setrvává v terénu i týdny, sarin patří mezi látky prchavé (zůstávají v terénu desítky minut až hodin) a nakonec látka polotrvalé, mezi něž se řadí tabun, soman nebo cyklosarin [1].

## 1.2. Obecná charakteristika nervově paralytických látek

NPL jsou organické sloučeniny odvozeny od kyseliny fosforečné a fosfonové (viz tab. 1) [4].

**Tab. 1** Vlevo se nachází tabulka vybraných NPL, vpravo je jejich obecný vzorec [1]

Látka	R	R'	X
Tabun (GA)	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CN
Sarin (GB)	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-F
Soman (GD)	-CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-F
Cyklosarin (GF)	-CH <sub>3</sub>	-cyklo-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	-F
VX	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N[CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
R-VX	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>



Z hlediska fyzikálních vlastností se jedná o výševroucí kapaliny, které vytvářejí při použití oblak aerodisperzní soustavy složené z par a kapek (viz tab. 2) [1]. Pro látky typu G (tabun, sarin, atd.) je typická vysoká těkavost, takže nejpravděpodobněji vstupují do organismu přes dýchací cesty. Nízkou těkavostí se vyznačují látky typu V (VX, R-VX, atd.), proto v aerodisperzní soustavě po explozi převažují kapky o velikosti 10-100 μm, které jsou k dosažení účinku na nechráněnou kůži dokonce žádoucí. GP látky jsou označovány jako středně těkavé a svými fyzikálně chemickými vlastnostmi se příliš od ostatních NPL neliší [1, 3].

**Tab. 2** Fyzikální vlastnosti vybraných NPL [2]

	Tabun (GA)	Sarin (GB)	Soman (GD)	VX
Relativní molekulová hmotnost	162,12	140,10	182,20	267,40
Hustota v 25 °C [g.cm <sup>-3</sup> ]	1,07	1,09	1,02	1,01
Bod tání [°C]	-50	-57	-42	-51
Bod varu [°C]	240	147	198	298
Hustota par [g.cm <sup>-3</sup> ]	5,63	4,86	6,33	9,2
Tlak par v 25 °C [mmHg]	0,07	2,9	0,4	0,007
Těkavost v 25 °C [mg.cm <sup>-3</sup> ]	61,0	22,0	3,90	10,5

### 1.3. Rozdělení nervově paralytických látek

NPL se mohou dělit do 4 skupin a to skupiny G, V, GP a Noviček [6]. Látky typu G byly vyvinuty během 2. světové války v Německu. Mají 2 atomy kyslíku vázány přímo na fosfor. Látky typu V byly vyvinuty na počátku roku 1950, obsahují síru a 2 atomy kyslíku opět vázány na fosfor [1]. Mezi nově vyvíjené látky patří Noviček a látky GP. Noviček je vyvíjen v Rusku od roku 1982 a podrobnější informace o něm zatím nebyly publikovány. Jedná se pravděpodobně o organofosfát obsahující dihaloformidovou skupinu. Látky GP jsou kombinací NPL G a V [5].

#### 1.3.1. Nervově paralytické látky řady G

Do skupiny NPL řady G patří tabun (GA), sarin (GB), soman (GD) a cyklosarin (GF). Vzhledem k tématu diplomové práce je tato kapitola zaměřena na nervově paralytický jed soman. Chemický vzorec somanu je *O* – pinakolyl methylfosfonofluoridát [1].

Je to bezbarvá až mírně nahnědlá kapalina se slabým zápachem. Je omezeně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v organických rozpouštědlech [6]. Hydrolyza je nejjednodušší dekontaminační metoda, nemusí však patřit mezi nejúčinnější [1].

Hydrolyzu somanu lze urychlit zvýšením pH. Rozkládá se při teplotě 140 °C a je jedovatější a perzistentnější než sarin, či tabun, ovšem méně než cyklosarin. Soman je označován jako zbraň hromadného ničení a jeho výroba je přísně regulována a hromadění je zakázáno. Tab. 3 udává toxicitu v závislosti na množství somanu a čase [1].

**Tab. 3** Toxicita somanu [1]

<sup>1</sup> LD <sub>50</sub>	2-10 mg	
<sup>2</sup> ECt <sub>50</sub>	25 mg.min/m <sup>3</sup> při inhalaci	4 g.min/m <sup>3</sup> při působení přes kůži
<sup>3</sup> LCt <sub>50</sub>	40-70 mg.min/m <sup>3</sup> při inhalaci	7,5-11 g.min/m <sup>3</sup> při působení přes kůži

<sup>1</sup> LD<sub>50</sub> – smrtící dávka - označuje dávku, jejíž podání způsobí úmrtnost na vzorku jedinců určeného druhu do 24 hodin

<sup>2</sup> ECt<sub>50</sub> – střední účinná koncentrace – dávka OL, která po čase *t* vyvolá u 50% zasažených osob dočasné zneschopnění

<sup>3</sup> LCt<sub>50</sub> – střední smrtící koncentrace - dávka OL, která po čase *t* usmrtí 50% exponovaných jedinců

### 1.3.2. Nervově paralytické látky řady V

Látky řady V patří k nověji vyvinutým nervově paralytickým jedům. Zařazují se zde VX, R-VX a VM [1, 4]. Mají vyšší inhalační toxicitu ve srovnání s NPL řady G. Jedná se o výševroucí kapaliny s velmi nízkou těkavostí. Chemický vzorec VX je *O*-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylfosfonothiolát. Jedná se o nažloutlou olejovitou kapalinu se slabým specifickým zápachem, která je minimálně těkává. K tepelnému rozkladu dochází při 150 °C, v organických rozpouštědlech je dobře rozpustný. Hydrolýza probíhá velmi pomalu, rozklad nelze pozorovat ani po dvou dnech [1].

Hydrolýza je urychlena změnou pH podobně jako u hydrolýzy somanu. K dekontaminaci lze využít nukleofilní činidla. Tab. 4 uvádí toxicitu látky VX [1].

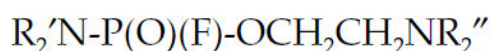
**Tab. 4** Toxicita VX [1]

<sup>1</sup> LD <sub>50</sub>	5 mg	
<sup>2</sup> ECt <sub>50</sub>	5 mg.min/m <sup>3</sup> při inhalaci	150-200 mg.min/m <sup>3</sup> při působení přes kůži
<sup>3</sup> LCt <sub>50</sub>	35-45 mg.min/m <sup>3</sup> při inhalaci	1 g.min/m <sup>3</sup> při působení přes kůži

### 1.3.3. Nervově paralytické látky GP

GP látky jsou sloučeniny strukturou podobné VX a sarinu (viz obr. 1) [4]. Tyto látky představují nižší nebezpečí při zasažení kůže než standardní látky řady V a větší nebezpečí při vdechnutí par než látky řady G. Příznaky kontaminace se mohou projevit od několika minut až do 18 hodin po expozici GP [5].

Hydrolyzují za vzniku fluorovodíku. Mezi další produkty hydrolýzy v závislosti na pH patří aminy a komplexní sloučeniny organofosfátů. Při spalování se uvolňují oxidy dusíku, fluorovodík a toxické organofosfáty [5].



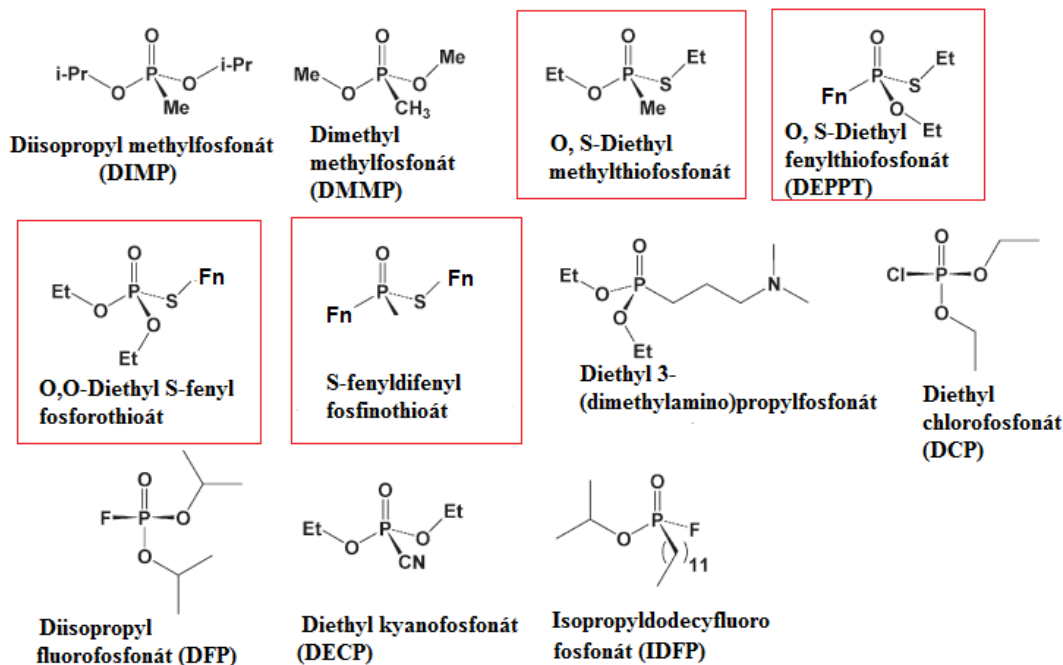
**Obr. 1** Obecný vzorec látky GP [5]

### 1.3.4. Binární chemické zbraně

Tyto chemické zbraně jsou založeny na principu syntézy dvou méně toxických prekurzorů. Pro tyto binární systémy se může využívat prekurzorů jak látek z řady G, tak látek z řady V. Během syntézy musí dojít k exotermní reakci, která proběhne s vysokým stupněm konverze. Využívá se při reakci kapalných prekurzorů, které jsou oddělené v těle náboje, při výstřelu dojde k smísení kapalin. Teplo při výstřelu dodává aktivační energii směsi. Může být využita také syntéza, do níž vstupuje jedna kapalná a jedna pevná látka [1].

### 1.4. Simulanty nervově paralytických látek

Vzhledem k vysoké toxicitě NPL se pro testy jejich odbourávání používají látky, které jsou blízké jejich struktuře. Tyto látky jsou přístupnější pro testovací laboratoře a především jsou méně toxické. Mají podobné reakční mechanismy jako pravé bojové látky. Struktury některých simulantů jsou uvedeny na obr. 2. Například pro simulaci sarinu se využívá pentylacetát, pro yperit methylsalicylát, pro soman 1,2,2-trimethylpropyl dimethylfosfát a pro VX 2-(butylamino)ethanthiol. Mezi další simulanty se řadí insekticidy jako např. parathion, paraoxon, malathion a diazinon [7].

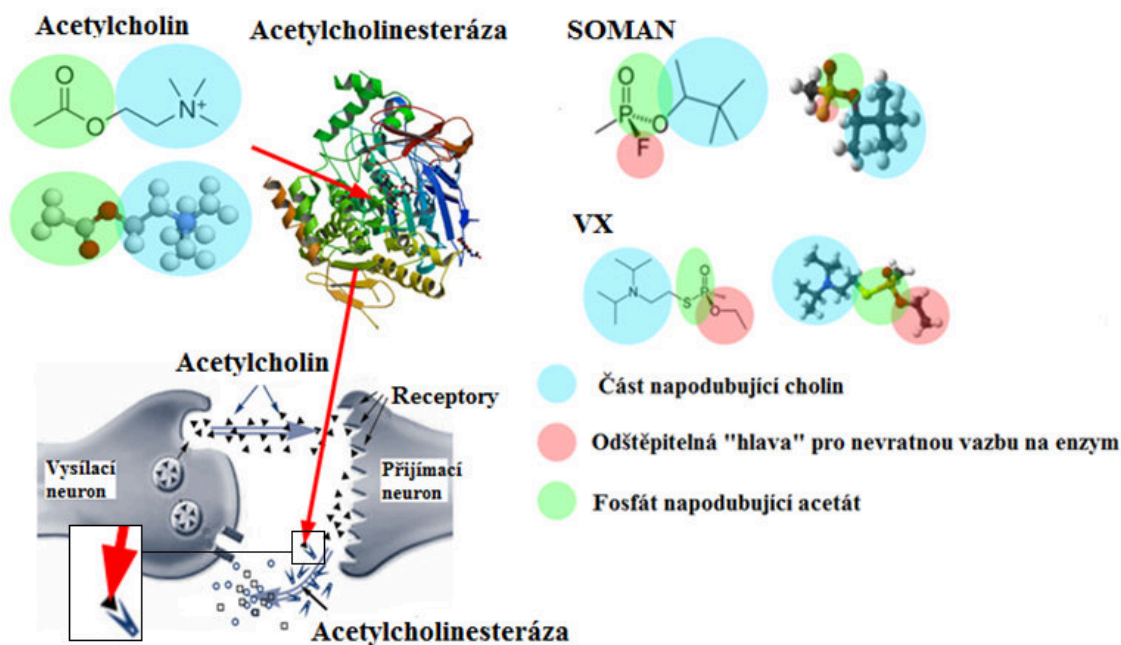


**Obr. 2** Výběr simulantů pro VX a sarin (i-Pr – isopropyl, Me –methyl, Et – ethyl, Fn – fenyl). Červeně jsou označeny simulanty VX [7]



## 1.5. Toxický účinek nervově paralytických látek

Podstatou toxického účinku NPL je rušivý zásah do mechanismu přenosu nervového vzruchu. Nervový impulz vychází z nervových zakončení ve směru k cílovému orgánu (efektoru) na parasymptických a některých sympatických synapsích. Impulz je přenášen mediátorem – acetylcholinem. Signál vychází z mozku, probíhá jako elektrický impulz na povrchu nervových drah, pak na nervová zakončení uvolní látku acetylcholin, který difunduje přes synaptickou štěrbinu k postsynaptické membráně. Na ní je u ústí receptorové místo pro acetylcholin, který změní permeabilitu postsynaptické membrány, to způsobí vytvoření elektrického potenciálu postsynaptické membrány (draslíko – sodíková výměna) a nervový impulz je poté veden jako elektrický signál k další synapsi. V závěru dojde k odezvě efektorového orgánu. Dále dochází k rychlému zbavení přenašeče acetylcholinu, aby mohlo dojít k dalšímu přijetí nového impulzu (obr. 3) [1]. Tuto roli plní enzym – acetylcholinesteráza, který regeneruje prostředí a odbourává acetylcholin na cholin a kyselinu octovou [4]. NPL způsobují inhibici acetylcholinu. Blokují tak jeho odbourávání a dochází k endogenní intoxikaci, která je hlavní příčinou toxického účinku NPL. Paradoxně nejúčinnějším inhibítorem acetylcholinu jsou látky, napodobující jeho strukturu [1].



**Obr. 3** Princip inhibice acetylcholinu nervově paralytickou látkou [8]

Klinické důsledky intoxikace jsou tyto - zúžení zornic, porucha akomodace, zvýšené slinění, slzení a pocení, bolesti svaloviny trávicího traktu, na srdci je pozorována bradykardie a pokles krevního tlaku. Mezi tzv. nikotinové příznaky patří svalová ochablost, křeče, které mohou vyústit až v ochrnutí kosterního svalstva. Tento stav je nebezpečný, protože hrozí ochrnutí dýchacího svalstva a výrazné omezení dýchání. Terapií proti intoxikaci NPL je okamžité podání příslušné antidotní látky jakou jsou atropin a benactylin [1].

### **1.6. Detekce nervově paralytických látek**

Mezi nejjednodušší metody detekce NPL patří průkazníkové papírky, které indikují během půl minuty změnou své barvy velmi nízké koncentrace látek typu G i typu V. Další možností je použití jednoduchých miniaturizovaných přístrojů, které umožňují kontinuální detekci ovzduší. Pro detekci NPL slouží také průkazníkové pásy DETEHIT a průkazníkové trubičky fungující na principu enzymatické inhibice. U průkazníkové pásy DETEHIT je mez detekce u látek G i V mezi 0,05-0,01 mg/m<sup>3</sup>. Průkazníkové trubičky mohou detekovat všechny typy NPL (GA, GB, GD, GF, VX a R-VX) s deklarovanou mezí 5.10<sup>-3</sup> mg/m<sup>3</sup> pro GB a GD. Rovněž automatické signalizátory pracují na principu enzymatické inhibice. Jsou to přístroje pro dlouhodobé monitorování NPL v ovzduší s mezí detekce 3.10<sup>-3</sup> mg/m<sup>3</sup> [1].

Laboratorně využívanou instrumentální technikou je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Samotné analýze zde předchází izolace látky z matrice. Obecně se OL izolují rozpuštěním, následně se extrahují nebo zachycují na sorbent, který se poté vymývá vhodným rozpouštědlem [1]. NPL lze také detekovat kolorimetricky, chemiluminiscencí (fluorescence a fosforescence) nebo nukleární magnetickou rezonancí [7].

Jako senzory pro přítomnost NPL mohou sloužit pórovité silikonové materiály pracující na principu absorpce NPL do pórů silikonu. Následně je nasorbovaný materiál analyzován infračervenou spektroskopií. Pro detekci NPL se také uplatňují elektrochemické vlastnosti uhlíkových nanotrubiček [7].

## 2. Degradace nervově paralytických látek

Metody degradace NPL jsou komplexní procesy, které mohou mít mnoho podob a klasifikací. Metodicky je můžeme rozdělit na mechanické, fyzikální a chemické. Mechanická dekontaminace představuje nejjednodušší způsob odstranění kontaminované plochy [2].

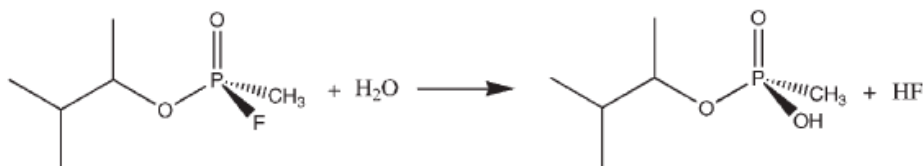
Fyzikální metoda je jednodušší a levnější než chemická detoxikace bojových látek, ale není tak účinná. Výhodou této metody je nezávislost na chemické povaze bojových látek, díky níž se stává metodou univerzální. Řadíme zde ultrafiltrace, promývání, ředění, obrácenou osmózu nebo adsorpci [2].

Třetí způsob je založen na chemických reakcích a je závislý na chemické povaze bojových látek. Jednou z velkých výhod této degradace je možnost přeměny toxických látek na netoxické nebo méně toxické, na rozdíl od fyzikálních metod, které nebezpečné látky dočasně odstraní, ale nerozloží. Mezi používané chemické mechanismy patří nukleofilní, eliminační, elektrofilní reakce, termální destrukce, fotochemické a radiochemické reakce [2]. Podkapitoly níže jsou podrobněji zaměřeny na vybrané chemické metody aplikované při odbourávání NPL.

### 2.1. Hydrolýza

NPL řady G je možno principiálně hydrolyticky rozkládat (rovnice 1). Tato problematika byla již studována a zjistilo se že, při hydrolytické reakci dochází k nukleofilnímu ataku fosforu. Rychlost hydrolýzy je závislá na pH a teplotě prostředí [7].

**Rovnice 1** Hydrolýza somanu [9]



Produkty hydrolytické rozkladné reakce NPL jsou méně toxické nebo netoxické látky. Při rozkladu sarinu vzniká kyselina isopropyl methylfosfonová (IMPA), při rozkladu somanu kyselina pinakolyl methylfosfonová a tabunu kyselina fosforečná [7].

Závislosti rychlosti rozkladu NPL na pH a teplotě prostředí jsou uvedeny v tab. 5.

**Tab. 5** Závislost rychlosti rozkladu vybraných NPL na pH a teplotě prostředí [7]

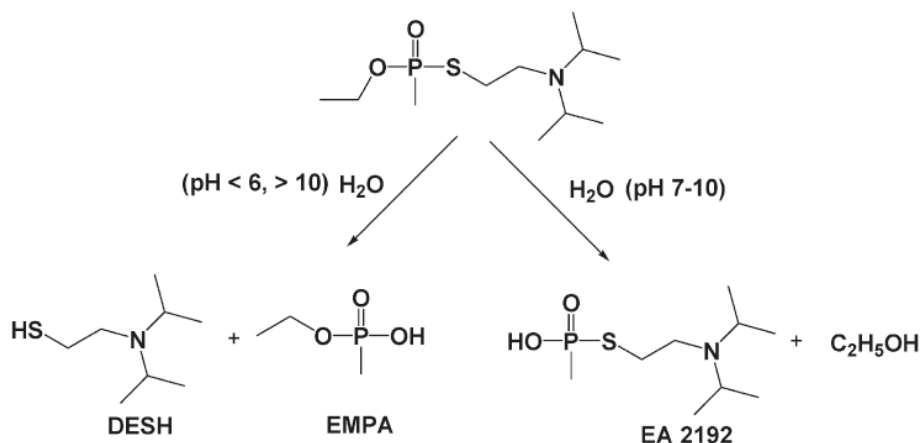
NPL	pH	Teplota [°C]	Poločas rozkladu [hod]
Tabun	7	25	14 -28
	7,4	20	8
Sarin	6,5	20	461
	7,5	20	46
	6,5	25	237
	7,5	25	24
	6,5	0	8300
Soman	6,5	25	60

Jestliže dojde k zvýšení pH nad 10 jsou sarin i soman hydrolyzovány během několika minut. Vzhledem k tomu, že při rozkladu dochází ke vzniku kyselin, snižuje se tak pH prostředí a v závislosti s tím se snižuje rychlost hydrolytické reakce [7].

Hydrolyza VX je při neutrálních a slabě bazických podmínkách pomalá s poločasem rozkladu 60 hodin. Rychlostní konstanta klesá se snižujícím se pH (od 10 k 7,5) [7].

Při hydrolyze VX ( $6 > \text{pH} > 10$ ) dochází k štěpení P-S vazby (viz rovnice 2). Produkty této rozkladné reakce jsou kyselina ethyl methylfosfonová (EMPA) a diisopropylethyl merkptoamin (DESH). Při pH 7 – 10 dochází k rozkladu VX za vzniku S-(2-diisopropylaminoethyl) methylfosfonothiolátu (EA-2192) a ethanolu. EA-2192 je stálý a bývá detekován v destilované vodě i po 40 dnech. Navíc je považován za přibližně stejně toxickou látku jako VX. Jestliže nakonec dojde k hydrolytickému rozkladu, je EA-2192 rozložen na DESH a kyselinu methylfosfonovou (MPA). Vzhledem k složitosti rozkladu VX může být VX detoxikován katalyzovanou hydrolyzou. EA-2192 v koncentrovaném hydroxidu sodném při teplotě 90 °C vytváří netoxické látky  $\text{NaPO}_3$  a thiolát [7].

## Rovnice 2 Hydrolýza VX [7]

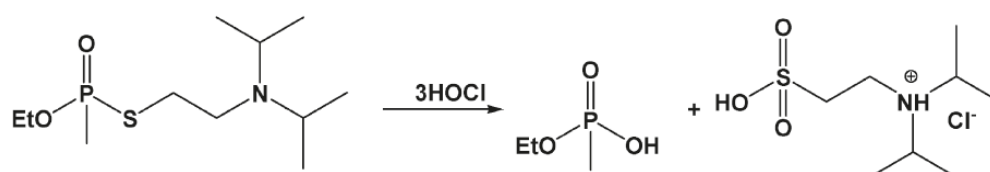


## 2.2. Oxidace

Další dekontaminační metodou NPL je jejich oxidace. Prvními prostředky studovanými pro dekontaminaci VX již v době 1. světové války byly bělidla a jejich roztoky [7].

Příkladem oxidace může být chlorace. Při reakci dochází v první fázi k oxidaci P-S vazby. Vlastností VX je rozpustnost v kyselém prostředí, dochází tak k protonaci dusíku terciálního aminu a k oxidaci síry za přítomnosti HOCl. V druhé fázi při pH 5-9 anion chlóru katalyzuje hydrolýzu (viz rovnice 3) [10].

## Rovnice 3 Oxidace VX [10]



Využití bělidel pro detoxikaci bojových látek má i své nevýhody. Aktivní chlor se degraduje dlouhodobým skladováním. K zamezení jeho degradace se roztoky bělidel pufřují. Mezi testované sloučeniny pro dekontaminaci NPL patří alkalické N-chlor sloučeniny nebo Fichlor (komerční název) [7].

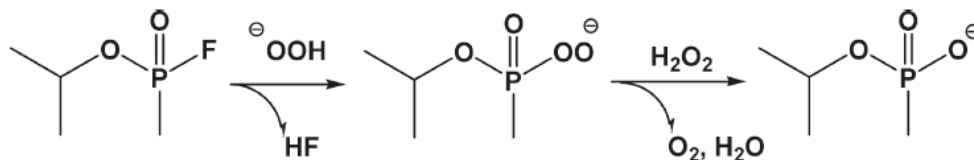
Komerčním přípravkem používaným pro rozklad VX je DaPont, ve kterém je obsažena účinná látka peroxymonosulfát draselný. Přípravek je poměrně stálý. Dalšími materiály k oxidaci NPL jsou např. peroxykyseliny, mezi něž můžeme zařadit monoperoxyftalát hořečnatý, kyselinu peroxyoctovou a m-chlorperoxybenzoovou kyselinu [11].

Existují také studie, které se zabývají oxidací G látek, nicméně s ne zcela pozitivními výsledky. V tomto případě se jako účinnější metoda degradace jeví jejich hydrolýza [7].

### 2.3. Perhydrolýza

Peroxidy jsou vhodné pro detoxikaci bojových látek, jelikož jsou netoxické a stálé. Mají nízký bod tuhnutí a mohou být využity na zamořená místa při nízkých teplotách okolí. Dekontaminace je založena na účinku nukleofilních peroxy- aniontů  $\text{HOO}^-$ . Reakce probíhá přes peroxyfosfonátové meziproducty (viz rovnice 4) [12].

**Rovnice 4** Perhydrolýza sarinu [12]

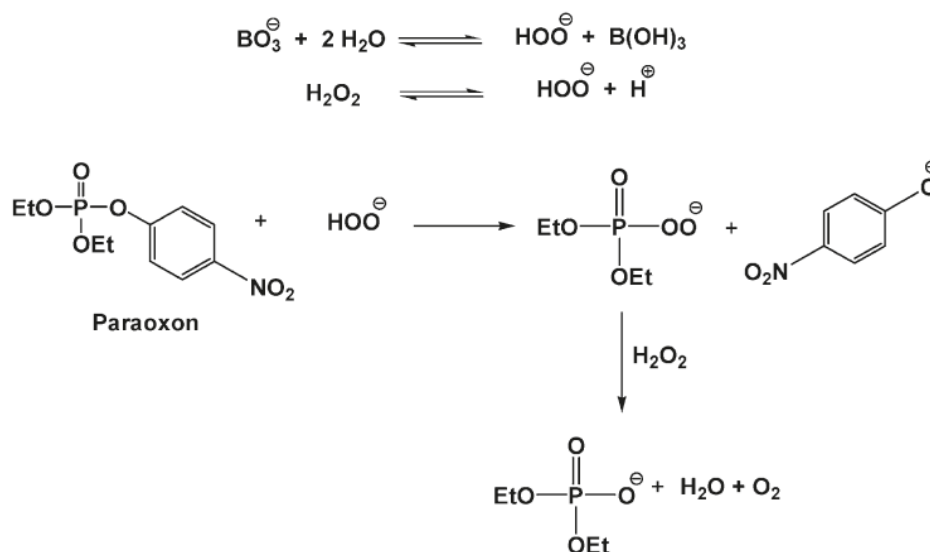


VX se také rozkládá perhydrolyticky. Výhodou oproti hydrolýze je zabránění vzniku toxické látky EA-2192 (při hydrolýze vzniklo EA-2192 o 22% hm. více). K tvorbě kyseliny fosfonové dochází přímo a nevzniká meziproduct peroxyfosfonát. Rychlost reakce je opět závislá na pH prostředí [7].

Perboritany, ve většině případů perboritan sodný ( $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), představují další chemikálie, které lze použít pro dekontaminaci organofosfátů. Při reakci vzniká perhydroxylový anion, ten je vůči organofosfátům více reaktivní než hydroxidový (viz rovnice 5) [13].

Bylo realizováno několik studií, které se zabývaly rozkladem malathionu, diazinonu a parathionu (organofosfátové insekticidy). Vysoká reaktivita, komerční dostupnost a poměrně dobrá skladovatelnost (stabilita) je činí vhodným prostředkem při degradaci insekticidů [7].

**Rovnice 5** Disociace perboritanu v zásaditém roztoku a reakce paraoxonu s perhydroxylovým aniontem [13]



#### 2.4. Nukleofilní reakce s kovy

Vzhledem k tomu, že klasická hydrolyza NPL probíhá relativně pomalu, byl testován vliv přítomnosti kovů na průběh degradace. Kovy mohou být buď katalyticky aktivní složkou, nebo mohou přímo vstupovat do reakce (např. v tzv. asistované hydrolyze) [7].

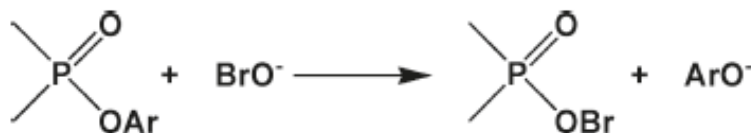
Byla studována hydrolyza sarinu, která byla katalyzována ionty mědi. Rozklad probíhal při teplotě 35°C a pH 8. Rychlostní konstanta degradace sarinu byla  $6,6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  [14]. Jiná vědecká publikace uvádí metalorganickou sloučeninu pod názvem CuBTC, která dokázala degradovat soman a VX, ovšem ne s příliš příznivým výsledkem. Poločas rozkladu obou NPL trval přes 1 den [15]. Pro katalyzovanou degradaci paraoxonu byly použity ionty lanthanu ( $\text{La}^{3+}$ -katechol-porézní organický polymer). Konverze organofosfátu činila 30% za 2 hodiny [16]. Další vědecký tým testoval opět sloučeninu s ionty  $\text{La}^{3+}$ . Rozklad probíhal při teplotě 70°C a pH 7,3 – 9. Rychlostní konstanta reakce činila  $3,6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  [17]. Pro degradaci NPL byly také použity kovové sloučeniny Mg, Mo a Zn [7].

Také byly popsány nekatalytické reakce s částicemi kovů, které degradují NPL. Jedním z hlavních typů reakce je štěpení vazby PO-R. Pro degradaci látek typu G byla použita směs ozónu s kobaltem, chromem nebo manganem. Pro degradaci NPL byly použity chemikálie také s obsahem boru a hliníku [7].

## 2.5. Nukleofilní reakce s halogeny

Ionty  $\text{BrO}^-$ , podobně jak tomu je u chlornanů, jsou při degradaci NPL dobrými R-nukleofilními činidly. Nukleofilní substituční reakce  $\text{BrO}^-$  je uvedena v rovnici 6 [7].

**Rovnice 6** Rozklad fosfinátu pomocí  $\text{BrO}^-$  iontů (Ar – aromát) [7]



Oxid hlinitý dopovaný fluoridy se využívá jako činidlo k hydrolyze VX, yperitu (bojová látka řazena mezi zpuchýřující) a sarinu.  $\text{KF-Al}_2\text{O}_3$  rychle reaguje a hydrolyzuje VX. Rozbívá P-S vazbu a vznikají netoxické látky EMPA (poločas rozpadu 0,1 - 6,3 hod) a toxický EA-2192 (poločas rozpadu 2,2 – 161 hod). Po odštěpení vazby mezi kyslíkem a fosforem může být dál rozkládán na netoxickou MPA. Při podobné hydrolyze s yperitem vzniká netoxický dioxan, při rozkladu GB byla produkována netoxická IMPA [7].

## 2.6. Biologická degradace

Degradace NPL biologickou cestou se jeví jako velice zajímavý jejich způsob zneškodňování. Důležitými biomolekulami, které hrají roli při degradaci NPL, mohou být enzymy z různých organismů. Bylo prokázáno, že některé enzymy dokážou urychlit hydrolyzu pesticidů, látek typu G a v některých případech i látek V [9].

Již v roce 1946 vyšel článek, který informoval o nespecifickém enzymu u lidí, králíků a opic, který dokázal štěpit P-F vazbu u NPL [18]. V roce 1950 jiná vědecká skupina napsala článek, v němž publikovala zprávu o enzymu tabunáza, který byl nalezen v krevní plazmě lidí a zvířat. Dle názvu enzymu se jedná o látku, která je schopna hydrolyzovat tabun [19]. O 24 let později byl vydán článek, který se zaměřoval na degradaci parathionu. Ten byl rozložen prostřednictvím mikrobiální kultury na p-nitrofenol. Optimální podmínky pro rozkladné reakce byly při pH 8,5 – 9,5 a teplotě 35 °C [20]. V roce 2003 byla vydána studie opět o dekontaminaci organofosfátu parathionu za pomoci bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida*. Byl rozložen 0,5 mM parathion na p-nitrofenol. Bakterie *E. coli* byla také použita při degradaci paraoxonu [21]. Článek z roku 2005 uvádí mikroorganismus, už výše zmiňovanou *P. putida*, který byl schopný hydrolyzovat látky jako parathion, paraoxon, methyl paraoxon a p-nitrofenol [22].



Dále byl získán enzymatický protein z mikroorganismu *Pseudomonas diminuta*, který katalyzoval hydrolytickou reakci parathionu, paraoxonu, ovšem hůř katalyzoval rozkladnou reakci VX [7]. Jiná publikace uvádí extrakci enzymu rovněž z *Pseudomonas diminuta* nazývaný fosfotriesteráza, který dekontaminoval insekticidy [2]. Skupina S. P. Harvey a kol. hydrolyzovala cyklosarin za pomoci enzymu izolovaného z mikroorganismu *Alteromonas haloplanktis* [7].

Jedním z omezení enzymatické hydrolýzy G – látek je vznik kyselých produktů reakce. Ty snižují enzymatickou aktivitu zvláště při  $\text{pH} < 6$ . Proto tyto reakce vyžadují pufování, které udržuje  $\text{pH}$  reakce neutrální až slabě alkalické. Pufováním mohou být vyvolány další enzymatické reakce [9].

Enzym organofosforhydroláza (OPH) byl testován při dekontaminaci VX. Obecně je účinnost enzymu nízká. Pro zlepšení jeho aktivních vlastností byly řízenou mutagenézí vyvinuty 4 typy enzymů, které již dokázaly efektivněji katalyzovat hydrolýzu VX [9].

## **2.7. Ostatní metody rozkladu nervově paralytických látek**

Skupina G. W. Wagnera studovala detoxikaci VX látky za pomoci použití zeolitů. I v tomto případě došlo k rozštěpení P – S vazby. Zjistilo se, že zeolit obsahující stříbro lépe štěpí P-X vazbu než zeolit s obsahem sodíku [2].

Jinou metodou je dekontaminace pomocí roztoku methoxidu sodíku a diethylenetriaminu impregnovaného na karbonové matrici. Takto připravený reaktivní sorbent byl využit pro dekontaminaci somanu [2].

Oxid křemičitý, oxid hlinitý nebo hlinitokřemičité jíly připravené ve formě koloidních gelů byly také testovány jakožto materiály degradující NPL. Mohou být naneseny na nakloněné nebo tvarované povrchy kontaminované chemickými bojovými látkami. Materiál se může aplikovat pomocí rozprašovače. Po dekontaminaci může být vysán nebo odplaven a následně likvidován. Odbourávání bojových látek funguje v tomto případě na principu hydrolýzy [2].

Dekontaminační materiály nemusí být použity jen ve formě gelu, ale také ve formě granulí. Příkladem je materiál, obsahující kationové povrchově aktivní látky jako jsou uhličitán, polyethylenglykol, amorfní oxid křemičitý a glycerol-diacetát. Jednotlivé látky se smíchaly s vodou a byly vytvořeny granule. Reakční mechanismy rozkladu jsou obdobné jako u oxidace [2].

### **3. Dekontaminace vybraných NPL prostřednictvím nanomateriálů**

Z důvodu odlišných chemických a fyzikálních vlastností nanočástic a nanomateriálů, jsou v poslední době pro degradaci NPL testovány různé nanomateriály jako jsou například submikronové částice kovových sloučenin, jejichž texturu tvoří mezo- a nanopóry. Vykazují vysoký specifický povrch, který je velmi reaktivní. Dokážou tak degradovat NPL za krátkou dobu na netoxické látky. V textu níže jsou uvedeny některé studie, které testovaly nanomateriály pro dekontaminaci látek řady V, látek řady G a v některých případech i yperitu (HD).

#### **3.1. Nanodisperzní oxidy kovů připravené homogenní hydrolýzou**

Homogenní hydrolýzou síranů, dusičnanů, či chloridů byly připraveny jejich nanodisperzní oxidy nebo oxo-hydroxidy. Následně byly vzorky po dobu 24 hodin při teplotě 100 °C sušeny (400 Pa). Výsledné materiály byly charakterizovány Brunauer Emmett Tellerovou metodou (BET), Barrett Joyner Halendovou metodou (BJH), rentgenovou difrakcí, infračervenou spektroskopií (IR) a skenovací elektronovou mikroskopií (SEM). Dále byly materiály testovány pro jejich schopnost rozkládat chemické bojové látky (soman a VX) na netoxické produkty. Toxická látka byla v lahvičce dávkována na vrstvu práškového činidla ve formě roztoku. Lahvička se uzavřela a vložila do termostatu. Všechny experimenty se prováděly při teplotě 25 °C. Proces byl ukončen přidáním isopropyl alkoholu. Suspenze se zamíchala a kapalná frakce se oddělila od pevné látky odstředěním. Následně byla frakce analyzována na obsah zbylých bojových látek [23]. Dále jsou v této kapitole uvedeny různé nanodisperzní oxidy kovů, které jsou připraveny výše uvedeným postupem.

Příkladem materiálů může být anatas a ferrihydrit připravených z příslušných síranů. Následně byly testovány při odbourávání VX a somanu Pro názornost jsou v tab. 6 uvedeny výsledky rozkladu NPL. Instrumentálními metodami se zjistilo, že polykrystalický anatas vytvořil sférické klastry o velikosti 1-2  $\mu\text{m}$ . Ferrihydrit tvořil sférické aglomeráty o submikronové velikosti. Zbytková koncentrace VX a somanu byla určena prostřednictvím kolorimetrického stanovení thiolů. Pomocí všech dekontaminačních činidel po 64 minutách bylo dosaženo téměř 100% degradace testovaných NPL [23].

**Tab. 6** Výsledky rozkladu VX a somanu [23]

	Anatas se somanem	Anatas s VX	Ferrihydrit se somanem	Ferrihydrit s VX
<b>Doba reakce [min]</b>	<b>Poměr konverze [%]</b>			
2	73,1	67,4	75,5	61,9
4	81,5	76,2	87,1	75,0
8	90,9	82,4	89,7	85,3
16	92,4	90,7	92,8	91,7
32	94,9	94,3	94,7	94,3
64	96,6	98,3	99,8	97,1

Dalšími materiály testovanými pro dekontaminaci NPL jsou nanodisperzní oxidy železa, hliníku a zinku dopované zirkoniem. Celkem bylo pro příslušnou sloučeninu kovu připraveno 5 sérií vzorků s různým poměrem dopantu zirkonia a oxidu kovu. Bylo tak možné posoudit vliv individuálního příspěvku zirkonia a oxidu kovu na degradaci testované NPL (viz tab. 7) [24].

**Tab. 7** Výsledky rozkladu VX a GD. V pravé části tabulky se nachází poměrové zastoupení jednotlivých chemikálií [24]

Vzorek	BET [m <sup>2</sup> /g]	Konverze VX po 64 minutách [%]	Konverze GD po 64 minutách [%]	Síran [g]	ZrOSO <sub>4</sub> [g]	Zr [hm. %]
FeZr1	300,1	99,63	99,32	99	1	1,33
FeZr2	272,7	99,97	99,91	95	5	8,35
FeZr3	267,5	99,83	99,07	90	10	14,63
FeZr4	322,4	99,95	98,41	85	15	17,37
FeZr5	422,4	91,78	93,62	80	20	21,24
AlZr1	108,3	53,26	44,6	99	1	3,33
AlZr2	119,6	44,9	40,55	95	5	5,75
AlZr3	138,6	50,22	43,87	90	10	9,37
AlZr4	275,5	78,57	75,64	85	15	17,17
AlZr5	125,9	52,49	49,05	80	20	19,16
ZnZr1	72,6	41,72	73,5	99	1	1,85
ZnZr2	71,8	73,55	72,92	95	5	3,82
ZnZr3	52,6	72,17	70,23	90	10	6,45
ZnZr4	46,7	71,37	70,76	85	15	10,24
ZnZr5	29,8	35,55	67,71	80	20	15,78

Přítomnost iontů zirkonia v oxidech zvyšuje měrný povrch materiálu, a tím může docházet ke zlepšení schopnosti degradace NPL. Ovšem není to vždy pravidlem, jak lze pozorovat z tab. 7. Koncentrace VX a somanu byla kvantifikována pomocí GC/FPD (plynová chromatografie s fotometrickým detektorem). Nejúčinnějším materiálem pro

dekontaminaci NPL byl oxo-hydroxid železa dopovaný zirkoniem. U této série vzorků docházelo k degradaci NPL nad 90 % [24].

Pomocí homogenní hydrolýzy 2 – chloracetamidem byly připraveny dále oxidy Ti-Mn. Zbytková koncentrace somanu byla detekována GC/FPD metodou. Nejlepší výsledky při degradaci somanu byly pozorovány pro vzorek Ti-Mn\_5, který obsahoval 2,1 % hm. Mn a Ti-Mn\_25 obsahující 6,76 % hm. Mn. Po 64 minutách působení Ti-Mn\_5 došlo k 89 % degradaci somanu. U činidla Ti-Mn\_25 za stejných podmínek došlo k 88 % degradaci somanu. S rostoucím obsahem manganu účinnost rozkladu pro soman klesala [25].

Homogenní hydrolýzou za pomoci srážecího činidla močoviny z roztoků chloridu germaničitého a síranu titaničitého byl připraven oxid titaničitý dopovaný germaniem. Dopované ionty  $\text{Ge}^{+4}$  zvyšují měrný povrch a obsah amorfni fáze vzorků. Bylo zjištěno, že oxid titaničitý dopovaný germaniem zlepšuje dekadační výsledky pro soman a VX. Za působení připraveného činidla došlo k 100% dekontaminaci somanu a 99 % degradaci VX [26].

Z výše uvedených experimentů plyne, že na degradaci NPL pomocí oxidických nanomateriálů s obsahem kovů má vliv několik faktorů např. specifický měrný povrch, porozita a poměr oxidu kovu a dopovaného prvku [27].

### **3.2. Nanotubulární materiály**

K dalším nanomateriálům, které přispěly k rozkladu somanu a VX, můžeme řadit titanové nanotrubičky. Degradace NPL byla sledována pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a molekulové absorpční spektroskopie (MAS). VX byla rozkládána rychle s poločasem rozpadu 30 minut. Tato rychlost se blížila rychlosti dosažitelné v kapalných dekontaminantech. Ukazuje se, že VX se adsorbuje do kanálek titanových nanotrubiček anebo jejich titaničitých vrstev. V mezivrstevném prostoru se nacházejí molekuly vody. Poskytují tak optimální podmínky pro hydrolýzu VX a GD. Poločas rozpadu GD při hydrolýze s obsahem 20% hm.  $\text{H}_2\text{O}$  byl 3,3 hodiny [28].

Jiná vědecká skupina testovala dekontaminaci simulantů CEPS (2-chloroethylfenyl sulfid) a DMMP (dimethyl methylfosfonát) pomocí titanových nanotrubiček dopovaných ionty stříbra. Nanotrubičky byly syntetizovány hydrotermální iontovou výměnou. Celkem byly připraveny 3 modifikace titanu a to - oxid titaničitý dopovaný stříbrem, titanové nanotrubičky a titanové nanotrubičky dopované stříbrem. Poločasy rozpadu CEPS a DMMP jsou uvedeny v tab. 8 [29].

**Tab. 8** Poločasy rozpadu CEPS a DMMP [29]

	CEPS [hod]	DMMP [hod]
TiO <sub>2</sub> - Ag <sup>+</sup>	2,31	13,8
TiO <sub>2</sub> - nanotrubičky	23,1	23,1
TiO <sub>2</sub> – nanotrubičky + Ag <sup>+</sup> (dopované)	10 x rychlejší než TiO <sub>2</sub> - Ag <sup>+</sup>	1,6 x rychlejší než TiO <sub>2</sub> - Ag <sup>+</sup>

Pro degradaci simulantů řady G (DFP - diisopropylfluorofosfonát) a V (paraoxon) byly dále testovány uhlíkové nanotrubičky modifikované přidavkem enzymu organofosforohydrolázy (OPH). Vytvořily tak aktivní a stabilní konjugát. Výsledné testy ukázaly katalytické účinky kompozitu, kdy během 45 minut došlo k 95% konverzi simulantu typu G a během 30 minut k 99% konverzi simulantu látky V [30].

### 3.3. Fotokatalytické nanomateriály

Principem fotokatalýzy je pohlcení světelného kvanta na povrchu fotokatalyzátoru. Vytvoří se dvojice nábojů h<sup>+</sup> (kladné díry) a e<sup>-</sup>. Kladné díry reagují s vodou za vzniku OH• radikálu a elektrony s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Vzniklé radikály se podílejí na štěpení organické molekuly [27].

#### 3.3.1. Fotokatalytické materiály na bázi TiO<sub>2</sub>

Homogenní hydrolyzou směsi oxosulfátu zirkonia a oxosulfátu titanu při teplotě 100 °C byl připraven anatas dopovaný zirkoniem, tímto krokem se zvýšil měrný povrch materiálu. Srážecím činidlem pro hydrolyzu byla použita močovina. Takto připravený materiál byl testován za účelem vyhodnocení jeho reaktivity se somanem a VX. Fotoaktivita byla studována pomocí fotokatalytického rozkladu barviva Orange II (C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S). Rozklad probíhal při ozáření o vlnové délce 254 nm a 365 nm. Zbytková koncentrace nervových látek somanu a VX byla kvantifikována kolorimetricky stanovením koncentrace thiolů. Konverze somanu činila 97,1% a VX 98,9% [31].

Dále byly připraveny fotokatalytické nanokompozity TiO<sub>2</sub> dopované ionty In<sup>3+</sup> a TiO<sub>2</sub>/In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>. TiO<sub>2</sub> dopovaný ionty In<sup>3+</sup> byl připraven homogenní hydrolyzou TiOSO<sub>4</sub> a In<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. TiO<sub>2</sub>/In<sub>2</sub>S<sub>3</sub> byl připraven homogenní hydrolyzou stejných solí, ovšem jako srážecí činidlo zde byl použit místo močoviny thioacetamid. Fotokatalytická aktivita byla testována opět na barvivo Orange II. Začlenění iontů In<sup>3+</sup> do oxidu titaničitého v oblasti viditelného světla způsobilo rozklad yperitu. Yperit je vybírán záměrně, díky jeho vysoké odolnosti. Konverze yperitu u obou materiálů činila téměř 100 % [32].

Fotokatalytické vlastnosti  $\text{TiO}_2$  mohou záviset na textuře, krystalinitě, velikosti částic a specifickém měrném povrchu. Dalšího vylepšení fotokatalytických vlastností u oxidu titaničitého může být dosaženo jeho dopováním prvky typu P ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ) nebo N ( $\text{Ta}^{+5}$ ,  $\text{Sb}^{+5}$ ,  $\text{Mo}^{+6}$ ) [27].

### 3.3.2. Fotokatalytické materiály na bázi Zn

Homogenní hydrolyzou síranu zinečnatého thioacetamidem při 80 °C byly připraveny nanočástice sulfidu zinečnatého. Po žíhání při teplotě 400°C v kyslíkové komoře byly získány nanočástice oxidu zinečnatého a sulfidu zinečnatého. Fotokatalytická aktivita vzorků byla stanovena pomocí rozkladu Orange II barviva ve vodném roztoku pod UV zářením o vlnové délce 365 nm. Vzorky byly poté vyhodnocovány pro schopnost degradace chemických bojových látek na netoxické produkty. Daný materiál byl testován na yperitu, kde konverze činila 42% během 32 minut [33].

### 3.4. Ostatní kovové nanomateriály

Za laboratorních podmínek byla provedena degradace VX a GD pomocí nanočástic oxidu hořečnatého. Rozkladné procesy byly studovány prostřednictvím nukleární magnetické rezonance (NMR). Testované látky hydrolyzovaly na povrchu reaktivních nanočástic MgO. VX se rozkládala na kyseliny ethyl methylfosfonovou a methylfosfonovou. Při rozkladu nebyly detekovány žádné toxické látky. GD se rozkládal na kyselinu methylfosfonovou. Při reakci dochází k adsorpci NPL na povrchu MgO. Proces adsorpce je řízen difúzí. Kapalina NPL se šíří prostřednictvím pórů do struktury MgO. Šíření roztoku je ukončeno v momentu, kdy dosahuje objemu pórů nanomateriálu. Poločas rozkladu GD činil 28 minut a VX 68 hodin [34].

Pro degradaci VX a GD byl dále testován oxid hlinitý. Produkty degradace NPL byly organofosfáty hliníku. Poločas rozkladu katalyzované hydrolyzy u somanu byl 1,8 hod a u VX 9,2 hod [35]. Jiná publikace uvádí hydrolyzu somanu a VX katalyzovanou hydroxidem zirkoničitým. Poločas rozpadu pro GD byl 8,4 minut a pro VX 1 minuta [36].

Také byla pozorována hydrolyza katalyzovaná nanočásticemi nulamocného železa a kompozitem tvořeným směsí  $\text{Fe}^{+4}/\text{Fe}^{+3}$ . Kompozit  $\text{Fe}^{+4}/\text{Fe}^{+3}$  na rozdíl od nanočástic železa prokázal vyšší degradační aktivitu. Při hydrolyze za přítomnosti kompozitu došlo téměř k 100% degradaci somanu a VX do 10 minut. V případě, kdy byl použity nanočástice nulamocného železa, hydrolyza probíhala pomalu a ani za 65 minut nedošlo k 60% konverzi NPL [37].

#### 4. Biosyntéza kovových nanočástic

Obecně mohou být metody přípravy nanočástic na bázi kovů děleny na chemické, fyzikální a biologické. Ve své podstatě se biologické metody řadí mezi metody chemické, ale navíc se v systému nacházejí mikroorganismy nebo jejich části. V porovnání s fyzikálními a chemickými metodami je biosyntéza nanočástic ekonomicky a energeticky výhodnější a ekologicky šetrnější. Není nutno pořizovat drahá experimentální zařízení a při syntéze se netvoří toxické meziprodukty [38]. Biologické syntézy mají již své pevné místo zejména v přípravě nanočástic stříbra, platiny, paladia a zlata [39].

Na bioredukci iontů kovů (biosyntéze) se podílejí různé biomolekuly, jako jsou např. enzymy, koenzymy, bílkoviny nebo zbytky biomolekul s různými funkčními skupinami (aminovými, karboxylovými, hydroxylovými atd.), které redukuje toxické ionty kovů dostávající se do kontaktu s biomasou [40]. Jedná se o redukující skupiny, které se nacházejí v buňce anebo na jejím povrchu. Kovy se následně vylučují jako nulamocné. Je nutno dodat, že při biosyntéze nanočástic dochází většinou k usmrcení původně živé biomasy [39].

Důvody proč (mikro)organismy vytvářejí anorganické nano- a mikrostruktury jsou v podstatě dva: 1) obrana a 2) záměr. V případě, že se dostanou kationty kovů k buňce, může dojít k obrannému detoxikačnímu mechanismu a právě k transformaci toxických iontů kovů na netoxické nebo méně toxické sloučeniny anebo nulamocné kovy. Záměrnou integrací funkčních složek do buněčných těl organismů rozumíme např. tvorbu nano- a mikrostruktur  $\text{SiO}_2$  a formování pevných schránek křemičitých řas nebo tvorbu magnetosomů u magnetotaktických bakterií. Zmíněné procesy lze využít pro přípravu různých nanočástic a nanomateriálů [38].

Pro biosyntézu nanočástic musí být vybrána vhodná biomasa (tab. 9). Může se jednat o mikroorganismy, vyšší rostliny, části rostlin nebo jejich extrakty. Biomasa se smíchá s prekurzorem kovu, který chceme připravit (např. u nanočástic zlata se nejčastěji jedná o kyselinu chlorozlatitou). Výsledkem biosyntetického (bioredukčního) procesu jsou nanočástice různých tvarů, velikostí a složení. Jednou z velkých výhod biosyntézy je tvorba nanočástic a jejich stabilizace v jednom kroku. Připravené nanočástice dále nemusí podstoupit stabilizační krok pro zamezení agregace. Biomolekuly organismu a jejich zbytky obalí nanočástice tak, že nedochází k následnému shlukování [38].

**Tab. 9** Vybrané organismy tvořící biosyntetizované nanočástice zlata [38]

<b>Organismus</b>	<b>Velikost nanočástic [nm]</b>	<b>Tvar</b>
<b>Bakterie</b>		
<i>Bacillus megaterium</i> D01	2	kulovitý
<i>Escherichia coli</i>	25 ± 8	kvazi - hexagonální
<i>Bacillus subtilis</i> 168	5 – 25	oktahedrální
<b>Aktinomicety</b>		
<i>Rhodococcus</i> sp.	5 – 15	kulovitý
<i>Thermomonospora</i> sp.	8	kulovitý
<b>Houby</b>		
<i>Colletotrichum</i> sp.	8 – 40	kulovitý, nepravidelný
<i>Fusarium oxysporum</i>	20 – 40	kulovitý, trojúhelníkovitý
<i>Trichothecium</i> sp.	-	-
<i>Volvariella volvacea</i>	20 – 150	kulovitý, trojúhelníkovitý, hexagonální
<i>Verticillium</i> sp.	2 – 20	-
<b>Kvasinky</b>		
<i>Pichia jadinii</i>	100	hexagonální, kulový, fcc
<i>Yarrowia lipolytica</i>	15	-
<b>Řasy</b>		
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-
<i>Sargassum wightii</i>	8 – 12	-
<i>Spirulina platensis</i>	6 – 10	kulovitý
<b>Rostliny a extrakty</b>		
<i>Aloera vera</i> (extrakt z listů)	-	kulovitý, trojúhelníkovitý
<i>Appin</i> (extrakt z listů)	39	kulovitý, trojúhelníkovitý
<i>Pelargonium graveolens</i>	20 – 40	dekahedrální, ikosahedrální
<i>Sesbania drummondii</i>	6 – 20	kulovitý
<i>Ocimum sanctum</i>	30	trojúhelníkovitý, hexagonální
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	200 – 500	kulovitý, trojúhelníkovitý
<i>Coriandrum sativum</i> (extrakt z listu)	7 – 58	kulovitý, trojúhelníkovitý



Změnou pH, teploty, koncentrace prekursoru nebo biomasy, ozáření, expozičním časem či mícháním, mohou být optimalizovány charakteristické vlastnosti nanočástic. Zjistilo se, že syntéza nanočástic je druhově specifická, tzn. že mikroorganismy různých druhů mohou vytvořit nanočástice stejného chemického složení, ale s rozdílnou velikostí a tvarem [39].

Správný výběr biomasy a zajištění optimálních podmínek pro růst buněk a reakčních podmínek jsou důležitými faktory pro přípravu nanočástic kovů. Při kontaktu prekursoru s biomasou dochází k její degradaci a k jejímu usmrcení, proto je vhodné vybírat mikroorganismy snadno kultivovatelné a také nepatogenní. Pro biosyntézu v průmyslovém měřítku je třeba také posoudit potenciální množství a rychlost redukce nanočástic. Během procesu biosyntézy se tedy kontrolují kultivační podmínky biomasy a v neposlední řadě rovněž její samotný průběh [38].

V praktické části diplomové práce je popsána biosyntéza nanočástic zlata. Proto budou následující podkapitoly tématicky zaměřeny právě na vlastnosti tohoto kovu v nanoformě a ve stručnosti bude uvedeno několik příkladů aplikací bionanozlata v katalýze.

#### **4.1. Vlastnosti nanozlata**

Jedním z nejčastěji používaných prvků v nanotechnologiích je zlato, které je tvořeno klastry zlata s řadou unikátních vlastností (elektrické, biokompatibilní, optické, termální, katalytické atd.). Nanozlatem se rozumí uskupení malých částic, tvořené několika atomy zlata až několika stovkami či tisíci atomy [41].

Svou popularitu nanozlato získalo hlavně díky:

- stabilitě v kovové formě (neoxiduje),
- selektivitě pro molekulární struktury (slouží jako platforma),
- širokému spektru možností přípravy (laserová ablace, biosyntéza, aj.),
- zajímavým optickým vlastnostem (zejména povrchové plazmonové rezonanci) [41].

Nanočástice zlata tvoří různé tvarové modifikace, např. sférické, tyčové či trojúhelníkovité (obr. 4) [41].



**Obr. 4** Koloidní roztoky zlata a snímky z transmisního elektronového mikroskopu (měřítko 30 nm), kde můžeme pozorovat změnu optických vlastností v závislosti na tvaru nanočástic. Roztoky obsahují 0,05 mg zlata/ml ( $\sim 10^{11}$  částic/ml) [42]

Nanosférické částice zlata jsou známy svými optickými vlastnostmi. Osvětlení roztoku nanozlata bílým světelným paprskem (400 – 700 nm) způsobí rozptyl barevného světla [41]. Část světla je tak absorbována a část odrazena. Odražená část dopadajícího světla propůjčí roztoku zlatých nanočástic barvu. Tento rozptyl je citlivý a závislý na velikosti a tvaru nanočástic. Nanočástice o průměru 60 nm rozptylují světlo fialové, zatímco nanočástice o velikosti 90 nm rozptylují světlo modré [43].

Nanotyčinky zlata rozptylují světlo červené a vykazují významně vyšší optické vlastnosti než nanosférické částice [41]. Absorbovaná vlnová délka záření je závislá na poměru jejich délky a šířky [43]. Opticky aktivními jsou i nanofilmy zlata nebo tzv. nanohouby, je to způsobeno vysokým specifickým povrchem obou struktur [41].

Další možnou morfologií nanozlata jsou tzv. „nanoshells“ skládající se ze dvou částí: jádra a tenké vrstvy na povrchu jádra. Kulovité dielektrické jádro bývá nejčastěji z oxidu křemičitého nebo polymeru. Povrch je tvořen zlatými sférickými nanočásticemi [41].

Výše zmíněné „nanoshells“ na bázi zlata byly využity jako elektrokatalyzátory při oxidaci oxidu uhelnatého, methanolu a redukci kyslíku. U tohoto materiálu byla prokázána elektrochemická a termální aktivita [41]. Nanosférické částice zlata se využívají ke zvýšení efektivního povrchu biosenzoru, k biologickému fluorescenčnímu značení a při katalytických a oxidačních reakcích. Zlaté nanotyčinky jsou využity pro zlepšení detekčních signálů založených na principu rezonance povrchových plasmonů [43].

## 4.2. Katalytické aplikace nanozlata

Obecně je zlato v „bulk“ formě inertní a chemické reakce nekatalyzuje. Použije-li se zlato v podobě nanočástic, stává se z něho aktivní nanokatalyzátor, jelikož obecně katalytické vlastnosti závisí na velikosti specifického povrchu materiálu [41].

Velké úsilí se vkládá do studie katalytických vlastností nanozlata. Nanočástice v rozmezí menším než 10 nm nachází uplatnění např. v heterogenních katalýzách. Vědci se zaměřují především na kontrolu rozměru a složení zlatých nanočástic a na prevenci jejich agregace [41].

Nanozlato je aktivní za laboratorních podmínek, a proto je hojně využíváno v chemickém průmyslu při oxidačních procesech například jako katalyzátor při oxidaci oxidu uhelnatého, oxidaci propenu na propylenoxid nebo oxidaci cukrů na organické kyseliny [41].

Bimetalické katalyzátory nanočástic zlata a paladia byly použity pro oxidaci ethenu na vinylacetát. Reakce mezi ethanem a chlorovodíkem je rovněž katalyzovaná nanozlatem za vzniku vinylchloridu. Dále mohou nanočástice zlata katalyzovat reakce vodíku s kyslíkem v palivových článcích nebo mohou být využity při syntéze peroxidu vodíku a oxidaci alkoholů [41, 44].

Bimetalické katalyzátory na bázi zlata a oxidu železitého byly využity rovněž pro degradaci oxidu uhelnatého a ozónu. Nanočástice zlata byly také testovány při dekontaminaci výfukových plynů, které mohou obsahovat dioxiny, uhlovodíky, oxidy dusíku a uhlíku [41].

V tab. 10 jsou uvedeny příklady některých reakcí, které byly katalyzovány zlatými nanočásticemi připravených bioredukci.

**Tab. 10** Katalytické aplikace biosyntetizovaných nanočástic zlata

<b>Biomasa</b>	<b>Reakce</b>	<b>Citace</b>
<i>Camellia sinensis</i>	redukce methylenové modři	[44]
<i>Cacumen platycladi</i>	oxidace propylenu	[44]
<i>Sesbania drummondii</i>	degradace 4 – nitrofenolu za vzniku 4 – aminofenolu	[44]
<i>Cylindrocladium floridanum</i>	degradace 4 – nitrofenolu za vzniku 4 – aminofenolu	[45]
<i>Ayurvedic arishtams</i>	degradace 4 – nitrofenolu za vzniku 4 – aminofenolu	[46]
<i>Ayurvedic kashayam</i>	redukce methylenové modři	[47]
<i>Trigonella foenum- graecum</i>	degradace 4 – nitrofenolu za vzniku 4 – aminofenolu	[48]
<i>Escherichia coli</i>	degradace 4 – nitrofenolu za vzniku 4 – aminofenolu	[49]
<i>Syzygium samarangense</i>	degradace 4 – nitrofenolu za vzniku 4 – aminofenolu	[50]
<i>Cacumen platycladi</i> (nanočástice Au-Pt)	oxidace benzyl alkoholu	[51]

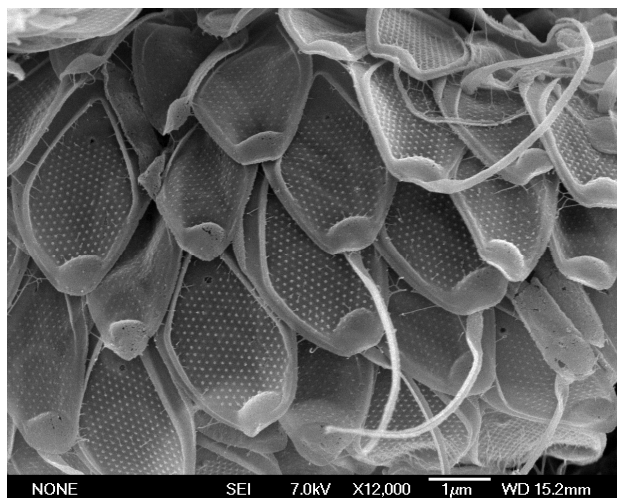
## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části je biosyntéza nanočástic zlata pomocí *Mallomonas kalinae*, jejich charakterizace a testování jejich katalytické účinnosti při hydrolýze somanu a VX. Následně jsou výsledky diskutovány a je vyhodnocena vhodnost použití bionanozlata pro degradaci testovaných NPL.

### 5. Metody a materiály

#### 5.1. Příprava suspenze s obsahem zlatých nanočástic

Biosyntéze nanočástic zlata předchází napěstování biomasy. Pro biosyntézu zlatých nanočástic byly použity vodní řasy *Mallomonas kalinae* (MK), které jsou tvořeny křemičitými šupinami na povrchu buněk. Jedná se o eukaryotní jednobuněčné organismy – bičíkovci – z třídy chrysomonád (obr. 5) [52]. Experimenty biosyntézy navazují na práci, ve které byla studována biosyntéza kovů pomocí řas *Diademsis gallica* [53]. Proto se výběr biomasy pro bioredukci zlatých nanočástic opět soustředil na mikroorganismy s křemičitými strukturami.



**Obr. 5** Detail povrchu buňky MK pokryté křemičitými šupinami (snímek je pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem JOEL na pracovišti v Českých Budějovicích, Akademie věd ČR, v.v.i.)

##### 5.1.1. Kultivace *Mallomonas kalinae*

Experimentální kultura byla pěstována v kultivačním médiu, které poskytuje základní výživy pro růst chrysomonád. Médium je složeno z chemikálií uvedených v tab. 11 [38].

**Tab. 11** Přehled potřebných chemikálií a jejich koncentrace [38]

Množství	Chemikálie	Zásobní roztok
1 ml	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml	KCl	0,3 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml	NH <sub>4</sub> Cl	0,268 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml *	NaNO <sub>3</sub>	2 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml *	β - glycerofosfát	0,216 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,08 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml *	Na <sub>2</sub> EDTA	0,7 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,4 g (0,6 g/100 ml dH <sub>2</sub> O)
1 ml *	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,166 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
1 ml	CaCl <sub>2</sub>	7,5 g/100 ml dH <sub>2</sub> O
243 mg	HEPES	Roth Hepes 0,5 Na
1 ml	Stopové prvky	Viz. recept (Tab. 12)
1 ml	Vitaminový roztok	Viz. recept

Pozn.: Upravit přidáním (\*) NaOH (3 g na 100 ml) na pH 6,6

Stopové prvky jsou připraveny z chemikálií uvedených v tab. 12. Každá chemikálie se rozpustí v 10 ml destilované vody, poté se těchto 6 roztoků smíchá a doplní destilovanou vodou do celkového objemu 100 ml.

**Tab. 12** Přehled potřebných chemikálií k přípravě roztoku stopových prvků

Množství [mg]	Chemikálie
31,4	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
4,5	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
1,46	COCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
2,35	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0,13	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>
0,27	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>

Vitaminový roztok je připraven rozpuštěním 10 mg thiaminu-HCl (B<sub>1</sub>) a přidáním 1 ml B<sub>12</sub> do 80 ml destilované vody. Po promíchání roztoku se objem doplní do 100 ml.

Postup přípravy média byl následující: do 950 ml destilované vody byl přidán vždy 1 ml zásobního roztoku MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, β – glycerofosfát, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, 243 mg HEPES a 1 ml roztoku stopových prvků. Roztoky NaNO<sub>3</sub>, β – glycerofosfátu a CaCl<sub>2</sub> byly upraveny přidáním NaOH na pH 6,6. Roztok byl nakonec doplněn destilovanou vodou na konečný objem 1l. Připravené médium bylo poté

rozlito do Erlenmayerových baněk a sterilizováno v autoklávu značky TUTTNAUER 2540 EL po dobu 20 minut při teplotě 121°C.

Aby nedocházelo k úhynu kultur, jejich pěstování zahrnuje pravidelné přeočkovávání. Příprava kultivačního média a přeočkování bylo prováděno za aseptických podmínek ve flowboxu (TESLAR, TECHNOLOGIES Min – H). Přeočkování bylo provedeno přidáním 1 ml roztoku kultury do Erlenmayerovy baňky s 500 ml čerstvého kultivačního média. Řasy MK byly inkubovány po dobu 30 dnů v kontinuálním osvětlení ( $15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 18 W zářivka Philips TDL 18W/33 ) v režimu světlo/tma při teplotě 24°C. Každé 4 dny bylo do média přidáno 1 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

### 5.1.2. *Zpracování narostlé biomasy*

Biomasa byla kultivována celkem ve čtyřiceti 500 ml Erlenmayerových baňkách. Po kultivaci byla biomasa slita a dále koncentrována centrifugací. Centrifugace byla provedena přístrojem Sigma-2-16 PK po dobu 5 minut při teplotě 4 °C (rychlost: 3612 rpm) ve 4 falkonách o objemu 50 ml. Na obr. 6 jsou fotografie biomasy ve falkonách před a po centrifugaci. Roztok nad biomasou byl vylit a usazené řasy na dně byly slity do jedné nádoby.

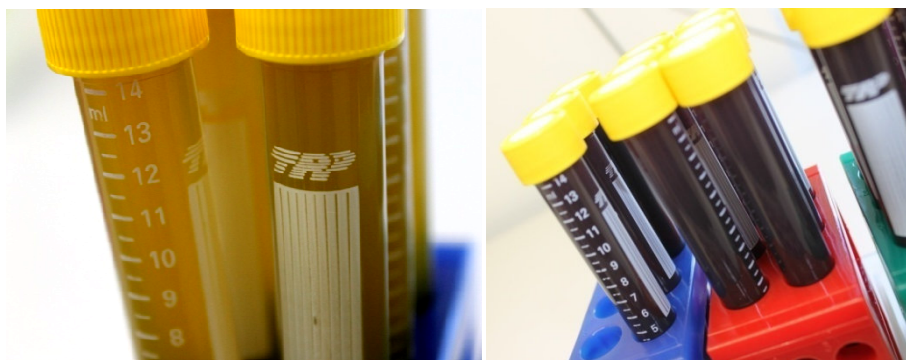


**Obr. 6** Vlevo - usazené buňky MK po centrifugaci, vpravo - suspenze před centrifugací

Tímto postupem se připravil 1 l roztoku zahuštěné biomasy, která byla následně rozdělena na objem 250 ml a 750 ml.

### 5.1.3. *Biosyntéza nanozlata*

Do 750 ml roztoku MK pH 6,5 bylo přidáno 7,5 ml roztoku 0,1 M zlata ( $\text{HAuCl}_4$ ). Už po několika minutách byla pozorována změna zabarvení biomasy z hnědé na tmavě fialovou. Zabarvení signalizovalo bioredukci zlatých nanočástic (viz obr. 7). Po přidavku kyseliny chlorozlatité do roztoku MK měla suspenze zlatých nanočástic pH 3,4.



**Obr. 7** Na fotografii vlevo se nachází čistá kultura MK, vpravo kultura po přidání zlatitého prekurzoru

#### **5.1.4. Použité metody charakterizace biosyntetizovaných nanočástic**

Připravená suspenze obsahující nanočástice zlata a zbytky buněk MK byla charakterizována transmisí elektronovou mikroskopií (FEI Tecnai Sphera 2, urychlovací napětí 200 kV) na pracovišti Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Krystalický charakter zlatých nanočástic byl potvrzen RTG difrakcí (Bruker D8 Advance, pozičně citlivým detektorem Vantec a generátorem Krystalloflex K780, jako zdroj rentgenového záření byla použita kobaltová lampa  $\text{CoK}\alpha$   $\lambda = 1,78897 \text{ \AA}$ ). Obsah zlatých nanočástic byl stanoven atomovou emisí spektroskopií s indukčně vázaným plazmatem (Ciros Vision fy Spectro). Měření na RTG-difraktometru a ICP-AES byla realizována na CNT, VŠB-TUO. Z vybraných snímků z TEM byla stanovena velikostní distribuce nanočástic zlata pomocí programu JmicroVision [54]. Na každém snímku, zvoleném pro stanovení velikostní distribuce, bylo označeno přes 200 nanočástic.

## **5.2. Aplikace bionanozlata v hydrolýze somanu a VX**

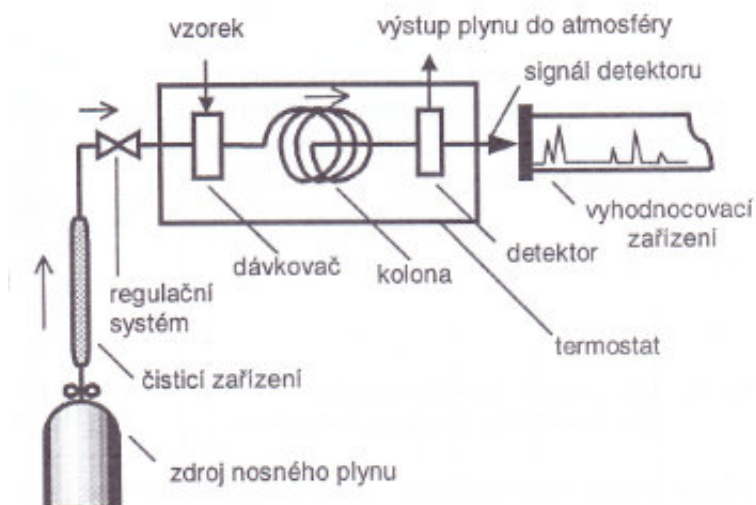
Pro sledování průběhu hydrolytického rozkladu somanu a VX za přítomnosti suspenze zlatých nanočástic byla použita plynová chromatografie s hmotnostním detektorem a technikou mikroextrakce na tuhou fázi.

### **5.2.1. Detekce hydrolýzy somanu a VX v přítomnosti bionanočástic zlata**

Základním principem plynové chromatografie, která byla využita při analýze koncentrace somanu a VX, je oddělování jednotlivých plynných složek. Vzorek je unášen v inertním prostředí mobilní fáze (nosný plyn) přes fázi stacionární. Vzorek je postupně stacionární fázi zachycován, a proto se při pohybu jednotlivé složky zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fázi poutány silněji. Tak se složky vzorku separují od sebe



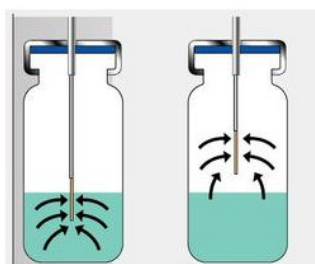
a k detektoru se nejdříve dostávají ty méně zadržované [55]. Na obr. 8 je schéma plynového chromatografu.



**Obr. 8** Schéma plynového chromatografu [55]

U plynové chromatografie se často využívá hmotnostní spektrometrie. Tato metoda převádí detekované molekuly na ionty. Principem je rozlišení iontů podle poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ) a záznam intenzit jednotlivých iontů [55].

Doplňkem plynové chromatografie je jedna z modifikací extrakce, a to mikroextrakce na tuhou fázi (Solid-Phase MicroExtraction – SPME). Křemenné vlákno pokryté zakotvenou fází je ponořeno do kapalného vzorku (přímá SPME) nebo umístěno nad ním (nepřímá SPME) do prostředí nasyceného těkavými analyty (viz obr. 9). Po určitou dobu se nechá matrice sorbovat na tuhou fázi, následuje analytický stupeň, výše zmiňovaná plynová chromatografie. Vlákno je obvykle zasunuto v duté ocelové jehle. Vzorky bývají připraveny ve viálkách (lahvičky s uzavřenou zátkou se septem). Vlákno se nechává v dávkovacím zařízení termicky desorbovat při teplotách 300 °C a analyt vstoupí do chromatografické kolony, kde je provedena separace jednotlivých složek [55].



**Obr. 9** Vlevo – přímá SPME, vpravo – nepřímá SPME [56]

Rozklad somanu a VX byl sledován plynovou chromatografií na pracovišti Ústavu státní jaderné, chemické a biologické obrany (SÚJCHBO v.v.i.) v Kamenné u Příbrami. Měření bylo provedeno na plynovém chromatografu (GC) Agilent 7890A, který měl ve svém příslušenství agitátor a automatický dávkovač vzorků CTC PAL Thermo Scientific/Agilent. Níže jsou uvedeny specifikace přístroje:

- GC kolona: HP-5MS (5% fenyl-95% dimethylpolysiloxan)
- Parametry GC kolony:
  - vnitřní průměr kolony: 0,25 mm
  - tloušťka naneseného filmu na povrchu kolony: 0,25  $\mu\text{m}$
  - délka kolony: 30 m
- Mobilní fáze: helium
- GC teplotní program: 45 °C (1 min.)  $\rightarrow$  15 °C/min.  $\rightarrow$  80 °C (1 min.)  $\rightarrow$  25 °C/min.  $\rightarrow$  280 °C (5 min.)
- Parametry agitátoru:
  - preinkubační doba: 300 s
  - preinkubační teplota: 30 °C
  - rychlost: 500 rpm
  - doba extrakce: 300s
  - doba desorpce: 300s

Pro mikroextrakci na tuhou fázi bylo použito vlákno 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (polydimethylsiloxan/divinylbenzen) Stableflex Supelco.

Rozkladné produkty byly detekovány hmotnostním detektorem Agilent 5975C inert XL.

### **5.2.2. Postup testování hydrolytického rozkladu somanu**

Do lahvičky s uzavíratelným víčkem se septem byly vždy namíchány matrice, které obsahovaly 15 ml vzorku a příslušné množství somanu o dané koncentraci. V experimentech hydrolyzy byly do matric dávkovány dva různé vstupní obsahy somanu: 5  $\mu\text{l}$  somanu o koncentraci 341  $\mu\text{g/ml}$  a 1  $\mu\text{l}$  somanu o koncentraci 68  $\mu\text{g/ml}$ . Vzorek, jakožto druhá složka matrice, obsahoval 1) nanozlato biosyntetizované řasami MK, 2) kontrolní roztok s obsahem čistých MK a 3) demineralizovanou vodu (kontrolní experiment). Celkem bylo tedy při degradaci somanu testováno 6 různých matric (viz tab. 12) Příprava matric probíhala v ochranných podmínkách v zabezpečené laboratoři na pracovišti Ústavu státní jaderné, chemické a biologické obrany (SÚJCHBO v.v.i.) v Kamenné u Příbrami. Celkem bylo při degradaci somanu testováno 6 matric (tab. 12).

Lahvička s matricí byla postavena na stojan chromatografu, odtud byla mechanicky přenesena do agitátoru, kde byla třepána. Při protřepávání matrice došlo k propíchnutí septa jehlou a k její sorpci na vlákno. Následně se celá jehla vložila do nástřikového prostoru chromatografu, kde došlo k desorpci matrice z vlákna. U všech vzorků probíhalo dávkování do kolony v hodinových intervalech po dobu 48 hodin.

**Tab. 12** Poměrové zastoupení látek v testované matrici pro hydrolyzu somanu

	<b>Vzorek</b>	<b>Soman</b>
<b>Matrice 1</b>	15 ml suspenze MK s nanoAu	1 $\mu$ l 68 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 2</b>	15 ml roztoku čisté MK (kontrola)	1 $\mu$ l 68 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 3</b>	15 ml H <sub>2</sub> O (neutrální pH) (kontrola)	1 $\mu$ l 68 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 4</b>	15 ml suspenze MK s nanoAu	5 $\mu$ l 341 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 5</b>	15 ml roztoku čisté MK	5 $\mu$ l 341 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 6</b>	15 ml H <sub>2</sub> O (neutrální pH)	5 $\mu$ l 341 $\mu$ g/ml

### 5.2.3. *Postup testování hydrolytického rozkladu VX*

Postup testování rozkladu VX probíhal analogicky, jak bylo popsáno v kapitole 5.2.2. u testování degradace somanu. Matrice byla vytvořena smícháním VX o koncentraci 336  $\mu$ g/ml a objemu 5  $\mu$ l s 15 ml vzorku. Celkem byly při degradaci VX testovány 3 matrice (viz tab. 13). U všech vzorků probíhalo dávkování do kolony v hodinových intervalech po dobu 20 hodin. Z časových důvodů bylo testování degradace VX realizováno jen pro jednu vstupní koncentraci.

**Tab. 13** Poměrové zastoupení látek v testované matrici pro hydrolyzu VX

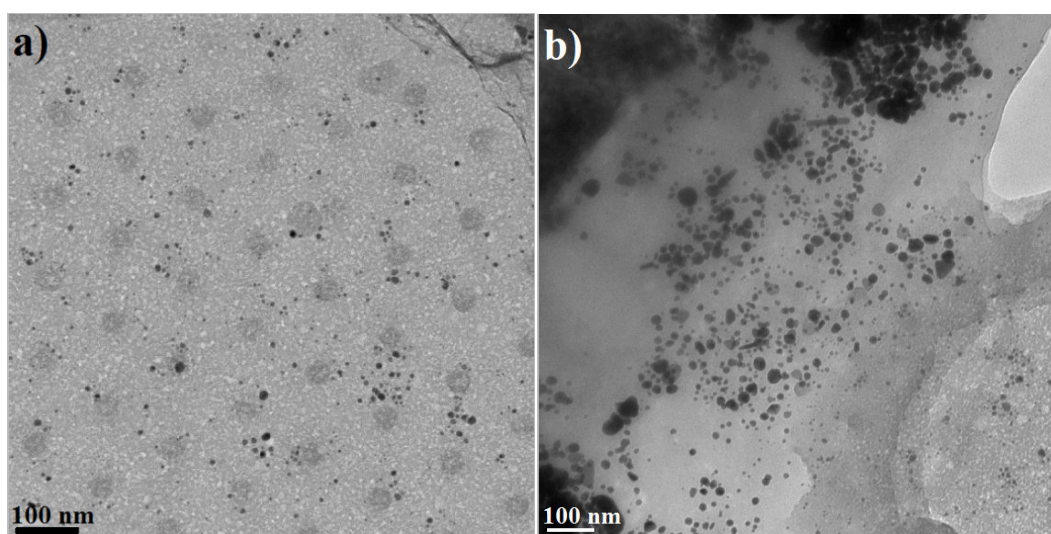
	<b>Vzorek</b>	<b>VX</b>
<b>Matrice 7</b>	15 ml suspenze MK s nanoAu	5 $\mu$ l 336 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 8</b>	15 ml roztoku čisté MK (kontrola)	5 $\mu$ l 336 $\mu$ g/ml
<b>Matrice 9</b>	15 ml H <sub>2</sub> O (neutrální pH) (kontrola)	5 $\mu$ l 336 $\mu$ g/ml

## 6. Výsledky

### 6.1. Charakterizace suspenze nanočástic zlata

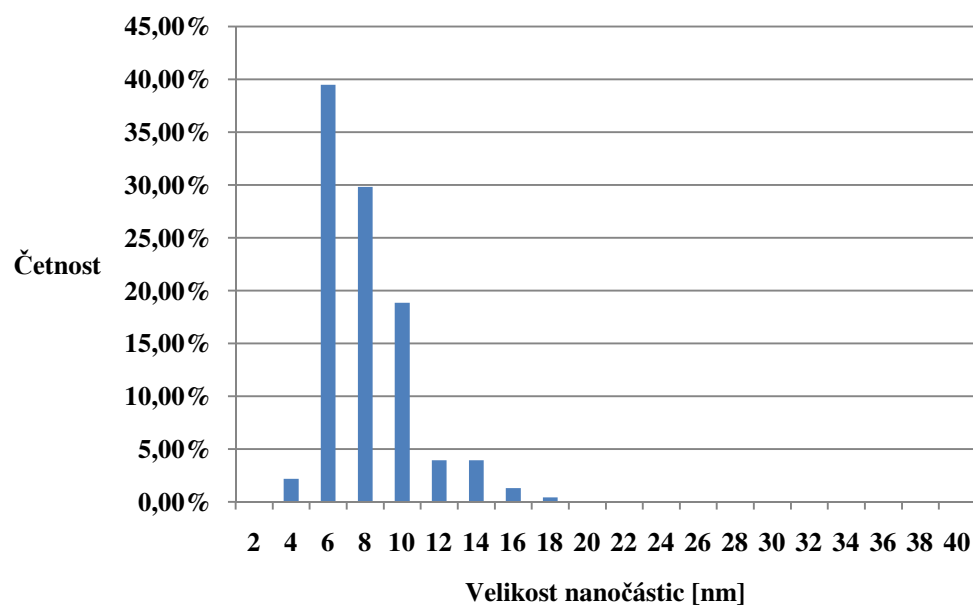
#### 6.1.1. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronová mikroskopie prokázala přítomnost zlatých nanočástic (obr. 10). Ty se nacházely v roztoku, na povrchu šupin a v buněčných zbytcích kolem křemičitých šupin MK. Ze snímku transmisního elektronového mikroskopu byla stanovena počtově vážená distribuce nanočástic zlata (viz obr. 11, 12, 13).

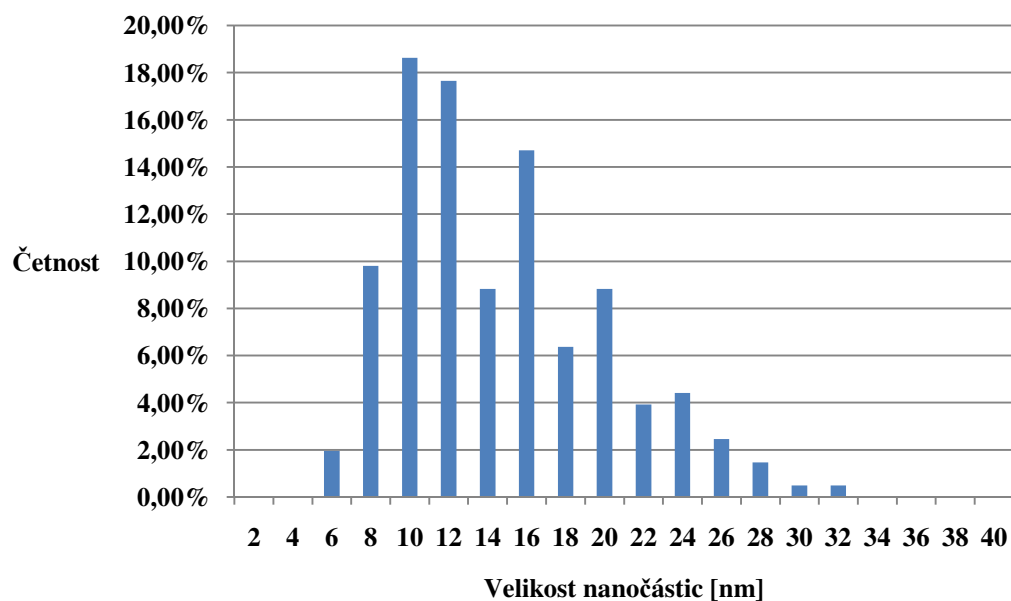


**Obr. 10** Snímky z TEM: a) Au nanočástice na povrchu buňky MK, b) Au nanočástice v buněčných zbytcích

Nanočástice na povrchu buněk měly průměrnou velikost 7 nm (viz histogram na obr. 11). Zjistilo se, že nanočástice nacházející se v buněčných zbytcích dosahují větší velikosti než nanočástice zlata na povrchu šupin řas. Průměrná velikost nanočástic v buněčných zbytcích činila 14 nm (viz obr. 12).

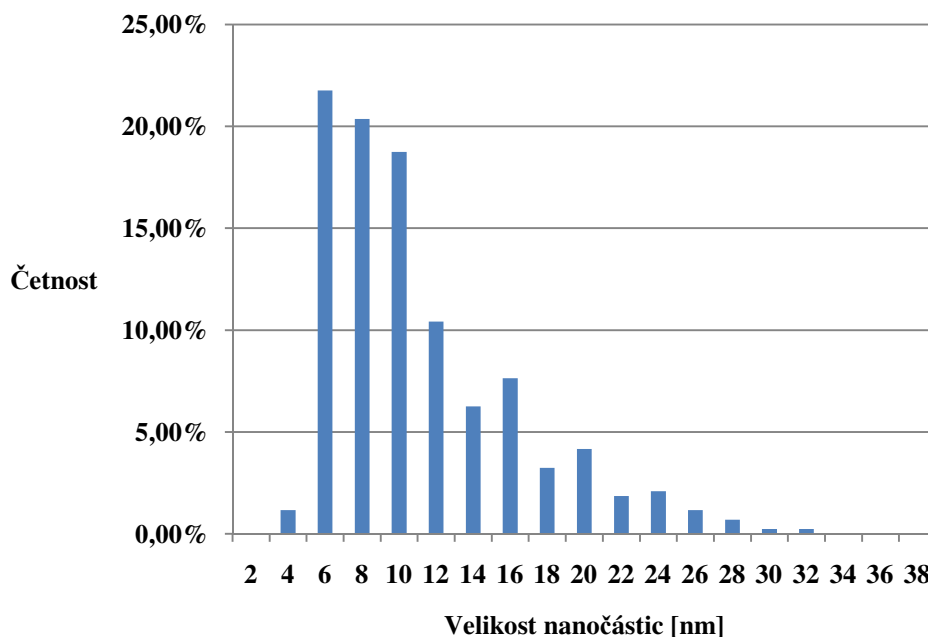


**Obr. 11** Počtově vážená distribuce nanočástic zlata na povrchu buňky



**Obr. 12** Počtově vážená distribuce nanočástic zlata v buněčných zbytcích

Dále byla vypočtena celková počtově vážená distribuce nanočástic zlata v suspenzi, která činila 10 nm (viz obr. 13).



**Obr. 13** Celková počtově vážená distribuce nanočástic zlata

Dále byly vypočteny statistické hodnoty jako modus, medián, výběrový rozptyl, standardní odchylka a aritmetický průměr (viz tab. 14). Modus udává nejvíce zastoupenou hodnotu velikosti nanočástic. V rozdělení odpovídá maximu na frekvenční křivce. Medián je hodnota, která dělí vzestupně seřazené velikosti nanočástic na 2 stejně početné poloviny. Výběrový rozptyl udává míru šířky distribuce. Jeho odmocněním je vypočítána standardní odchylka [57].

Modus byl odečten z histogramů počtově vážené distribuce nanočástic zlata. Medián byl vypočítán pomocí funkce MEDIAN v programu Microsoft Office Excel. Výběrový rozptyl byl vypočten pomocí vztahu (1), kde  $q_{0,i}$  je počtově rozdělení částic v  $i$ -té velikostní třídě,  $d_i$  je zvolená velikostní třída a  $\bar{x}_{Ar}$  je aritmetický průměr [57].

$$\sigma_0^2 = \frac{\sum q_{0,i} \cdot (d_i - \bar{x}_{Ar})^2}{\sum q_{0,i}} \quad (1)$$

Aritmetický průměr byl vypočten ze vztahu (2), kde  $n$  je počet nanočástic a  $x_i$  je velikost  $i$ -té nanočástice [57].

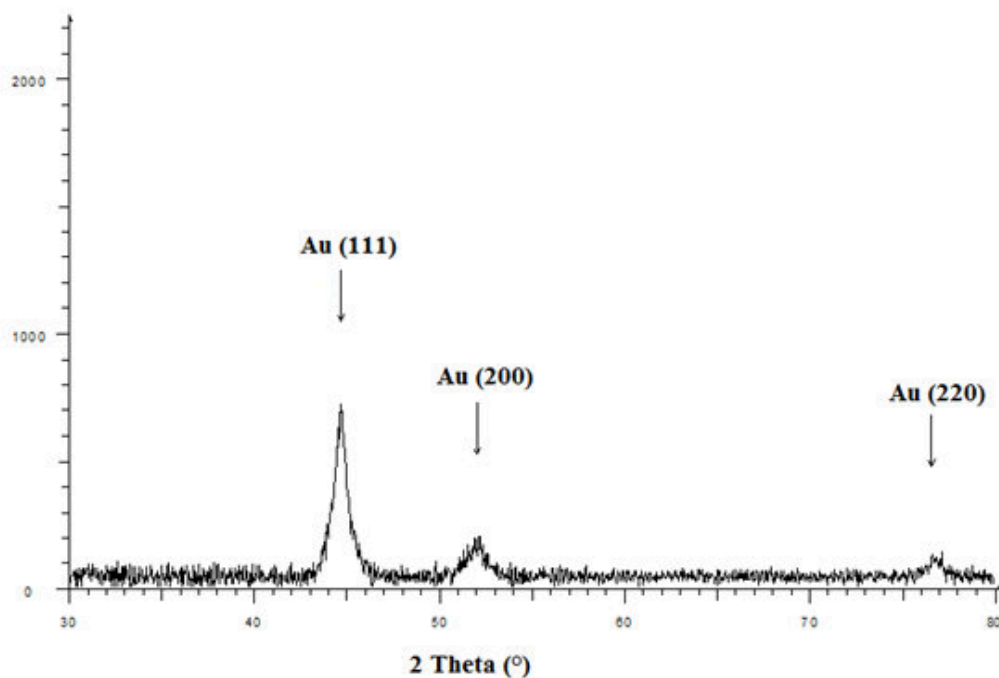
$$\bar{x}_{Ar} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$$

**Tab. 14** Vybrané statistické hodnoty distribuce velikosti Au nanočástic

	Bionanozlato na povrchu šupin	Bionanozlato v buněčných zbytcích	Bionanozlato v suspenzi
<b>Modus [nm]</b>	6,00	10,00	6,00
<b>Medián [nm]</b>	6,64	12,43	8,65
<b>Aritmetický průměr [nm]</b>	7,11	13,67	10,21
<b>Výběrový rozptyl [nm]</b>	6,89	29,97	28,69
<b>Standardní odchylka [nm]</b>	2,63	5,47	5,36

### 6.1.2. Výsledky RTG-difrakční analýzy a stanovení obsahu zlata v suspenzi

Rengenostrukturní analýzou byla potvrzena přítomnost zlata v kubické krystalové soustavě (viz obr. 14). Projevila se při úhlu  $45^\circ$  2 theta pro difraktující krystalografickou rovinu (111),  $52^\circ$  2 theta pro rovinu (200) a  $77^\circ$  2 theta pro rovinu (220). V difraktogramu se nenalézají píky  $\text{SiO}_2$ , který tvoří ochranný obal buněk MK. To je způsobeno jeho amorfní strukturou.



**Obr. 14** Difraktogram potvrzující krystalický charakter biosyntetizovaných nanočástic zlata

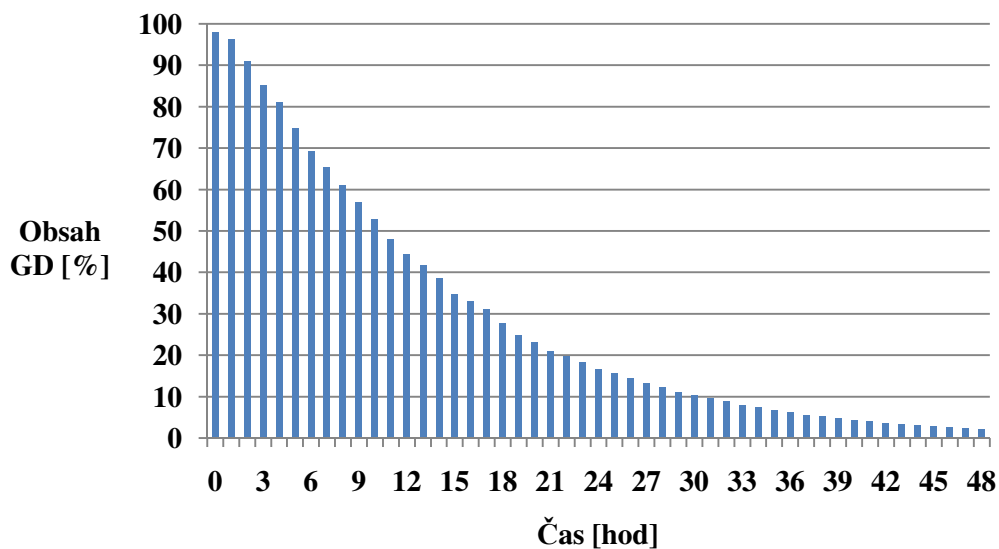
Pro stanovení obsahu zlata v suspenzi byla použita atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (tab. 15).

**Tab. 15** Výsledek stanovení obsahu zlata v suspenzi

Vzorek	Au [mg/l]
MK+Au	182 ± 19

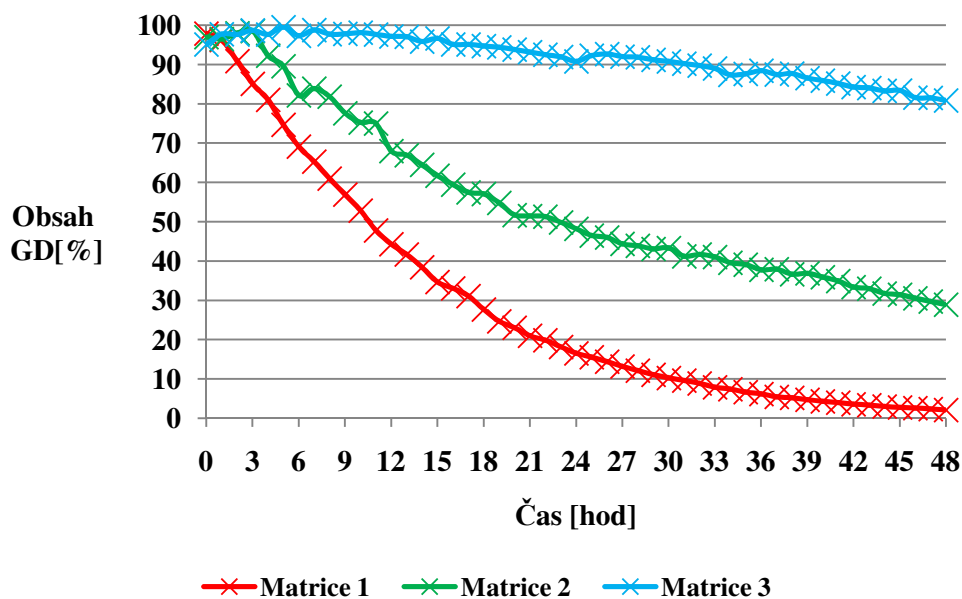
## 6.2. Výsledky hydrolýzy somanu

Výsledky z plynové chromatografie jednoznačně prokázaly katalytický účinek suspenze zlatých nanočástic. Na obr. 15 je znázorněn průběh degradace somanu o vstupní koncentraci 68 µg/ml (matrice 1). Po 48 hodinovém působení nanozlata došlo ke snížení obsahu somanu v matrici na 2,2 %. Na obr. 16 je pro porovnání uveden průběh degradace somanu v matrici s nanozlatem, čistou kulturou MK a ve vodě.



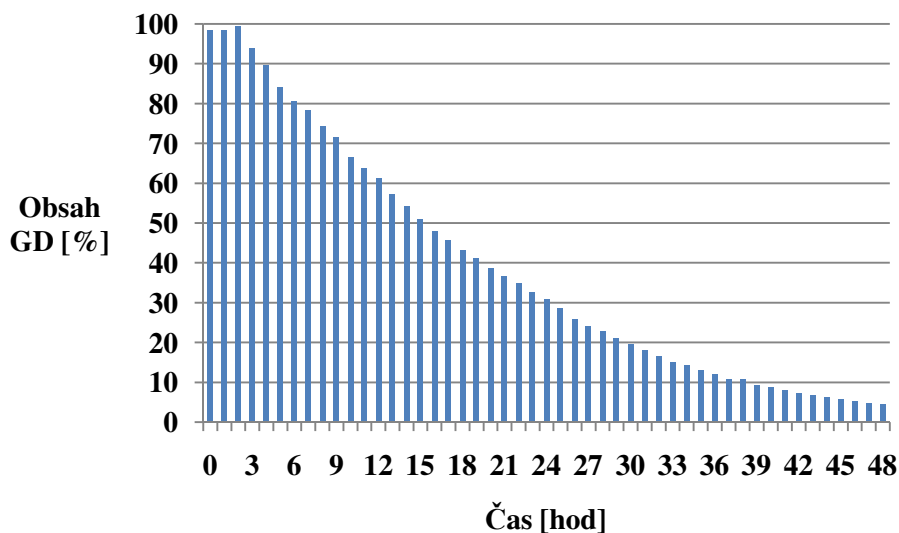
**Obr. 15** Hydrolýza somanu o koncentraci 68 µg/ml a objemu 1 µl za přítomnosti suspenze zlatých nanočástic (matrice 1)



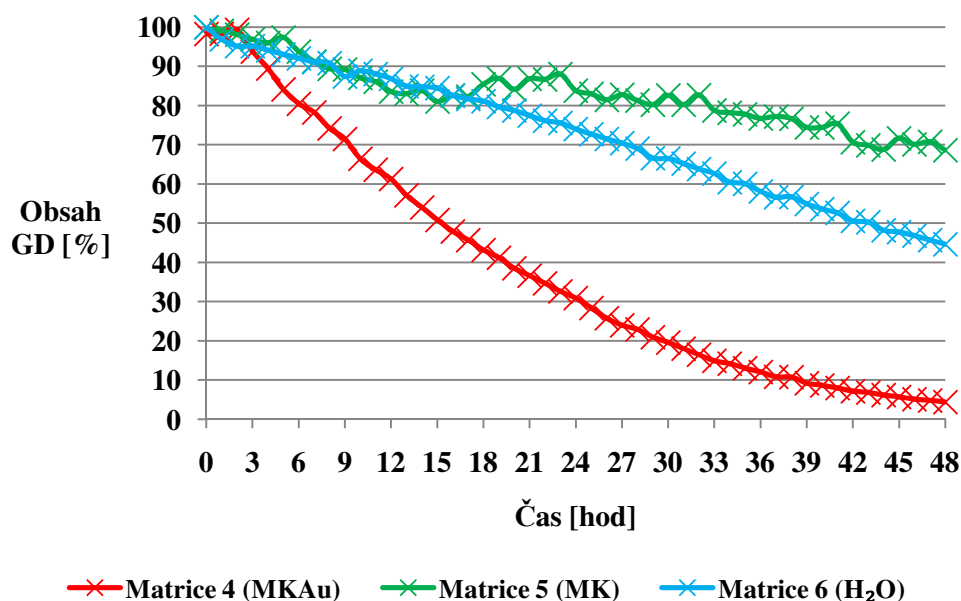


**Obr. 16** Porovnání hydrolyz somanu o koncentraci 68  $\mu\text{g/ml}$  a objemu 1  $\mu\text{l}$

Na obr. 17 je uveden průběh hydrolyzy somanu o koncentraci 341  $\mu\text{g/ml}$  a objemu 5  $\mu\text{l}$  katalyzované suspenzí zlatých nanočástic. Po 48 hodinovém působení suspenze Au nanočástic došlo ke snížení obsahu somanu z původní hodnoty na 4,5 %. Jako u předešlého testu i zde byla hydrolyza katalyzovaná Au nanočásticemi porovnávána se samotnou hydrolyzou a hydrolyzou za přítomnosti čisté biomasy MK (viz obr. 18).



**Obr. 17** Hydrolyza somanu o koncentraci 341  $\mu\text{g/ml}$  a objemu 5  $\mu\text{l}$  za přítomnosti suspenze zlatých nanočástic (matrice 4)



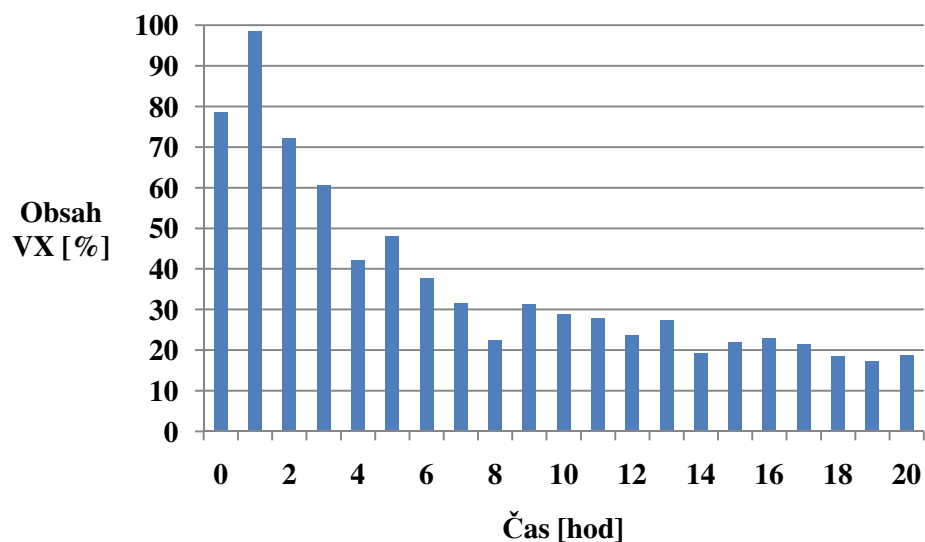
**Obr. 18** Porovnání hydrolyz somanu o koncentraci 341 µg/ml a objemu 5 µl

V seznamu příloh je uvedena tabulka (příloha A), která uvádí snižující se koncentraci somanu v procentuálním zastoupení hodnot za časový interval 48 hodin pro všechny typy matic. Hmotnostním detektorem byly zaznamenány frakce, které dokazují štěpení P-F vazby somanu (viz příloha B).

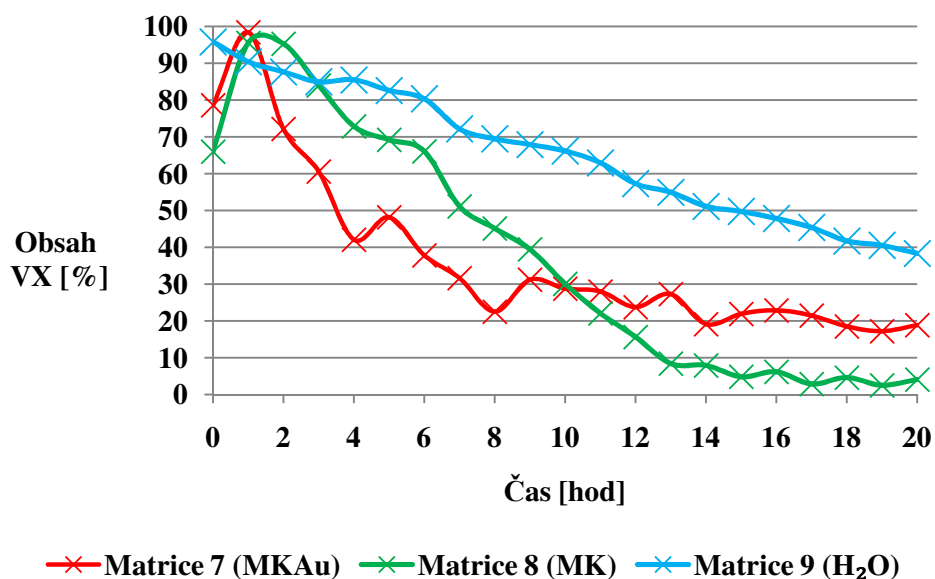
### 6.3. Výsledky hydrolyzy VX

Výsledky z plynové chromatografie prokázaly katalytický účinek čisté biomasy a suspenze zlatých nanočástic. Na obr. 19 je uveden průběh degradace VX o vstupní koncentraci 336 µg/ml a objemu 5 µl při katalyticky hydrolyzované suspenzi zlatých nanočástic (matrice 7). Po 20 hodinovém působení bionanozlata došlo ke snížení obsahu VX na 18,9 %. Na obr. 20 jsou uvedeny tři různé průběhy hydrolyzy VX za působení čisté biomasy MK, suspenze se zlatými nanočásticemi a vody. Zajímavostí je hydrolyza katalyzovaná čistou biomasou, která má lepší degradační průběh VX než hydrolyza katalyzovaná bionanozlatem. Z původní hodnoty obsah VX pro matrici 8 klesl na hodnotu 4 %. V tomto grafu lze cca od 10. hodiny měření pozorovat lepší výsledky degradace VX pro matrici s obsahem buněk MK, než pro matrici s obsahem MK a nanozlata.

Jako produkty hydrolyzy VX byly detekovány diisopropylethyl merkptoamin (DESH) a disulfidy. V seznamu příloh je uvedena tabulka (příloha C), která uvádí snižující se koncentraci VX v procentuálním zastoupení hodnot za časový interval 20 hodin pro všechny typy matic. Hmotnostním detektorem byly zaznamenány frakce, které dokazují štěpení P-S vazby (viz příloha D).

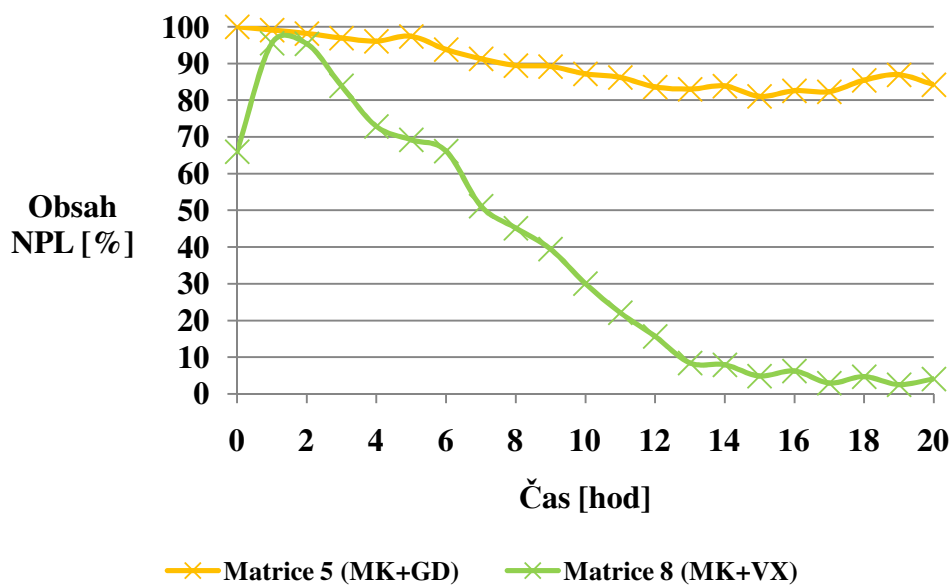


**Obr. 19** Hydrolýza VX o koncentraci 336 µg/ml a objemu 5 µl za přítomnosti suspenze zlatých nanočástic (matrice 7)



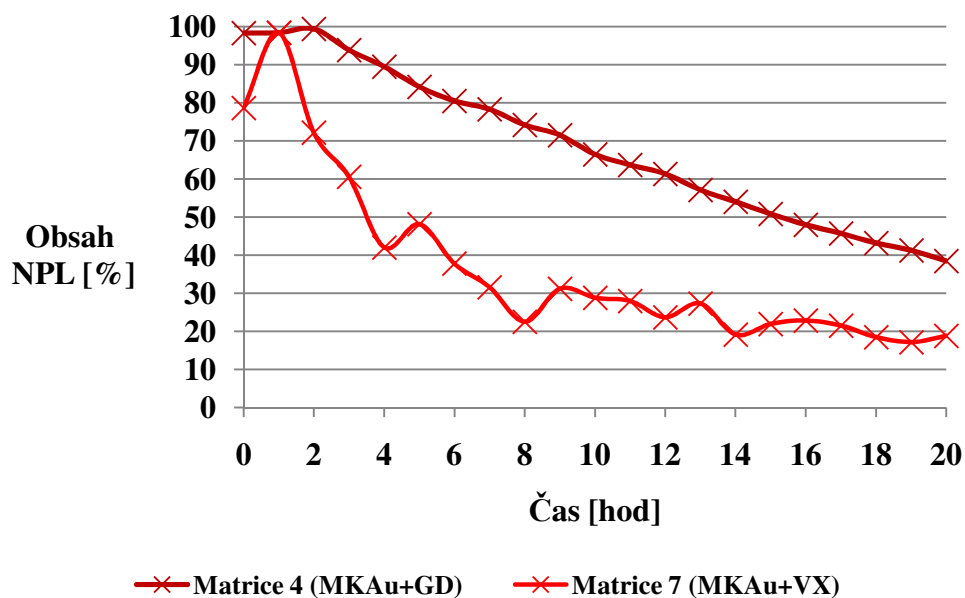
**Obr. 20** Porovnání hydrolýz VX o koncentraci 336 µg/ml a objemu 5 µl

Dále byla katalyzovaná hydrolýza VX porovnávána s katalyzovanou hydrolýzou somanu. Bylo zjištěno, že čisté buňky MK mají lepší degradační vlastnosti při hydrolýze VX než při hydrolýze somanu (obr. 21). Po 20 hodinách působení klesl obsah VX na 4%, na rozdíl od somanu, kde konečný obsah po 20 hodinách činil přes 80 %. Z obr. 21 je zřetelné, že konečné hodnoty se navzájem výrazně liší.



**Obr. 21** Hydrolýza somanu a VX o objemech 5  $\mu$ l katalyzovaná čistou biomasou

Podobně tomu bylo také u hydrolýzy VX a somanu katalyzované suspenzí zlatých nanočástic (obr. 22). Procentuální hodnoty zbytkové koncentrace obou NPL po 20 hodinách působení nanočástic zlata se opět liší. U VX je to 18,9 % a u somanu 39%.



**Obr. 22** Hydrolýza somanu a VX o objemech 5  $\mu$ l katalyzována suspenzí zlatých nanočástic

## 7. Diskuze

Biosyntézou prostřednictvím řas *Mallomonas kalinae* byla připravena suspenze obsahující zlaté nanočástice asociované v buněčných zbytcích a na křemičitých strukturách. Takto připravený bionanomateriál byl dále testován jako katalyzátor při hydrolytickém rozkladu somanu a VX. V úvodu je třeba zdůraznit, že nebyl doposud proveden žádný experiment, který by testoval katalytické vlastnosti bionanomateriálů (připravených pomocí biosyntézy) při hydrolýze nervově paralytických látek. Ostatní studie popisují degradační účinnost nanomateriálů při rozkladu somanu a VX připravených především chemickou cestou. Příkladem mohou být aplikace nanodisperzních oxidů, či oxo-hydroxidů kovů, nanotubulárních materiálů a fotokatalytických nanomateriálů titanu [23, 24, 27, 28], jak bylo zmíněno v teoretické části práce.

Hlavní předností biosyntetizovaného nanomateriálu je jeho jednoduchá příprava. Není nutno pořizovat experimentální zařízení pro zaopatrění náročných podmínek syntézy nanočástic, jako jsou vysoká teplota a tlak. I doba samotné bioredukce je rychlejší než v případě výše zmíněných nanodisperzních kovech. Za laboratorních podmínek jsou biosyntézou nanočástice tvořeny řádově v minutách, na rozdíl od sloučenin tvořených homogenní hydrolýzou, které jsou poté sušeny při vysokých teplotách (100 °C) po dobu 24 hodin [23, 38]. Další výhodou bionanomateriálů může být stabilizace nanočástic a ukotvení na substrát při bioredukci v jednom kroku, na rozdíl od uvedených nanodisperzních oxidů kovů, které se dále ukotvují například na slídu, kaolin nebo křemelinu [27, 38].

Vzhledem k tomu, že se jedná o první experiment, kde se za pomocí biosyntetizovaných nanočástic zlata podařilo katalyzovat hydrolýzu somanu a VX, je potřeba optimalizovat degradační účinnost suspenze zlatých nanočástic s ohledem na další konkrétní využití takto připraveného materiálu. Jestliže se jedná o rozsáhlé likvidování například zásob bojových látek, je potřeba optimalizovat kultivační podmínky biomasy pro snadné získání velkých objemů biomasy, a tím pro přípravu potřebného množství bionanomateriálu. To může být docíleno v nádržích či reaktorech, které zaopatrají růstové podmínky vodních řas [58]. Jedná-li se ovšem o spěšné odmoření zasažených předmětů, je potřeba zefektivnit katalytické vlastnosti zlatých nanočástic. Změnou např. bioredukčních podmínek zlatých nanočástic, jako je pH, teplota nebo poměr množství biomasy a prekurzoru kovu. Takto při biosyntéze může být docíleno úzké distribuce velikosti

nanočástic zlata. Katalytické vlastnosti suspenze nanočástic zlata mohou být dále zlepšeny přidáním kovů, jako je například železo nebo oxid titanu [27, 38]. Hodnota pH roztoku (matrice) může také hrát významnou roli při hydrolyze látek řady G i V.

Bylo zjištěno, že hydrolyza v alkalickém prostředí rozkládá soman a VX rychleji než v prostředí kyselém. Obecně je samotná hydrolyza pro VX méně vhodná než pro soman. Z tohoto důvodu se hydrolytický rozklad VX katalyzuje [7]. V případě experimentů představených v této diplomové práci se projevuje u degradace somanu a VX zejména katalytická aktivita nanočástic zlata a v některých případech i možnost katalyzovat hydrolyzu čistou biomasou. Suspenze zlatých nanočástic je kyselá a roztok čisté biomasy je prakticky neutrální. I přesto zde dochází (téměř u všech matric) k efektivnějším degradačním účinkům než u hydrolyzy s neutrálním pH. V případě zvýšení pH u roztoku čisté MK a suspenze zlatých nanočástic do alkalické oblasti by pravděpodobně došlo k urychlení hydrolytického rozkladu somanu a VX. Jednou z možností, jak lépe degradovat VX, je nemodifikovat buňky MK přidávkem zlata, ale použít při hydrolyze jako katalyzátor přímo čistou biomasu. Zde by se pravděpodobně musela sledovat závislost koncentrace buněk na účinnosti rozkladu VX.

Katalytická aktivita zlatých nanočástic pro rozklad somanu a VX může být podpořena reaktivním specifickým povrchem nanozlata i křemičitým povrchem řas. Křemičitá struktura na povrchu buněk může zachytávat, či sorbovat GD a VX do své struktury. Na povrchu buněk MK mohou NPL nalézat aktivní místa, například -OH skupiny [59]. Zde může docházet k jejich degradaci. Z rešerše v teoretické části vyplynulo, že se enzymy přítomné v buňkách také mohou podílet na degradaci nervově paralytických látek [18]. Výsledky degradace VX v přítomnosti čisté biomasy MK naznačují, že k této enzymaticky podpořené hydrolyze může docházet.

U matrice 2 (1  $\mu$ l GD o koncentraci 68  $\mu$ g/ml) došlo ke katalyzované hydrolyze somanu pomocí čisté biomasy, na rozdíl od matrice 4 (5  $\mu$ l GD o koncentraci 341  $\mu$ g/ml), kde došlo k jeho inhibici. To může být způsobeno vyšší koncentrací somanu, kdy ho buňky MK nedokážou dostatečně sorbovat a rozkládat pomocí - OH skupin. Další rozdíl také nacházíme u samotné hydrolyzy somanu. Snížením koncentrace somanu na 68  $\mu$ g/ml mohlo dojít u hydrolyzy k nadbytku vody. To znamená, že rovnováha reakce mohla být narušena a začala probíhat ve prospěch reaktantů. V tomto případě může platit Guldberg – Waagův zákon (zákon účinku hmotnosti). Porovnáme-li výsledky testu VX za přítomnosti pouze čisté kultury s výsledky testů hydrolyzy v přítomnosti zlatých nanočástic,

pozorujeme, že nanočástice zlata mají katalytický vliv na samotnou hydrolýzu, ovšem negativní vliv na rozklad VX za přítomnosti MK. Srovnáme-li testy VX a somanu o přibližně stejné koncentraci při 20 hodinovém působení, zjistíme, že pro katalyzovanou hydrolýzu VX je degradace účinnější.

Pomocí transmisního elektronového mikroskopu a programu JMicroVision byla sledována distribuce velikostí zlatých nanočástic. Byl potvrzen fakt, že nanočástice zlata jsou katalyticky aktivní, a jejich katalytická aktivita souvisí s velikostí nanočástic [41]. Pozorovány byly rozdíly ve velikosti nanočástic na povrchu řas a v buněčných zbytcích MK. Průměrná velikost nanočástic zlata na povrchu buněk MK byla 7 nm, jejich velikost v buněčných zbytcích byla přibližně 2x větší. Rozdíl ve velikosti zlatých nanočástic může být zdůvodněn přítomností křemičitými struktur řas a funkčních skupin, které se nacházejí v blízkosti samotných buněk, a které na svém povrchu vznikající nanočástice bezprostředně stabilizují. Předpokládá se, že v blízkosti buněk nebo intracelulárně dochází k produkci a uvolňování jiných redukčních činidel, které při biosyntéze formují menší nanočástice, než ty, které se uvolňují extracelulárně do objemu roztoku. Navíc v přítomnosti křemičitých struktur existuje větší prostorové omezení pro formaci nanočástic než v roztoku. Střední velikost nanočástic biozlata, při které bylo možné pozorovat katalytickou aktivitu v celém objemu testovaného vzorku, dosahovala cca 10 nm.

## 8. Závěr

V teoretické části práce je provedena literární rešerše z dostupné literatury zaměřená na obecnou charakterizaci, detekci a degradaci vybraných nervově paralytických látek. Pozornost byla také věnována nanomateriálům, které mohou být v současné době využity při degradaci nebezpečných bojových látek.

Praktická část je věnována realizaci experimentu biosyntézy zlatých nanočástic pomocí *Mallomonas kalinae*. Následně byly připravené nanočástice zlata charakterizovány transmisí elektronovou mikroskopií, RTG difrakcí a atomovou emisí spektroskopií. Prostřednictvím snímku z TEM byly vyhodnoceny počtově vážené distribuce nanočástic zlata. Průměrná velikost krystalických nanočástic zlata byla cca 10 nm. Následně byla suspenze zlatých nanočástic testována pro jejich degradační účinek na nervově paralytických látkách somanu a VX. Degradace somanu a VX byla pozorována plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem a technikou mikroextrakce na tuhou fázi.

Sledováním degradace nervově paralytických látek byly prokázány degradační účinky suspenze zlatých nanočástic na soman a VX o všech koncentracích. Katalyzovaná hydrolýza s čistou *Mallomonas kalinae* dokázala degradovat soman o počáteční koncentraci 68 µg/ml a VX o koncentraci 336 µg/ml. Naopak u degradace somanu o počáteční koncentraci 341 µg/ml čistá biomasa jeho rozklad nepodporovala. Suspenze nanočástic zlata byla efektivnější u hydrolýzy VX než u rozkladu somanu u téměř stejných koncentrací. Zajímavostí je lepší degradační aktivita čisté biomasy při hydrolýze VX, než za přítomnosti zlatých nanočástic.



## LITERATURA

- [1] MATOUŠEK, J. a P. LINHART. *CBRN-Chemické zbraně*. Ostrava: SPBI Ostrava, 2005. ISBN 80-86634-71-X.
- [2] SINGH, B., G.K. PRASAD, K.S. PANDEY, R.K. DANIKHEL a R. VIJAYARAGHAVAN. Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Defence Science Journal*. 2010, č. 4.
- [3] BAJGAR, J. *Mimoriadne události vo verejnom zdravotníctve*. Banská Bystrica: PRO, 2011. ISBN 978-80-89057-29-0.
- [4] GUPTA, C.R. *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*. Londýn: Academic press, 2009. ISBN 978-0-12-374484-5.
- [5] ELLISON, D. H. *Handbook of chemical and biological warfare agents*. United States of America: CRC Press LLC, 2000. ISBN 0-8493-2803-4.
- [6] SALEM, H. *Chemical warfare agents chemistry: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Therapeutics*. United States of America: CRC Press, 2008. ISBN 978-1-4200-4661-8.
- [7] KIM, K., O. G. TSAY, D. A. ATWOOD a D. G. CHURCHILL. Destruction and detection of chemical warfare agents. *Chemical reviews*. 2011, č. 9.
- [8] Chemické zbraně: *Chemické zbraně - Organofosfáty* [online]. 2010 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: <http://www.palba.cz/viewtopic.php?t=4162>
- [9] SMITH, B. M. Catalytic methods for the destruction of chemical warfare agents under ambient conditions. *Chemical society review*. 2008..
- [10] EPSTEIN, J, J BAUER, V.E. SAXE a M.M. DEMEK. The Chlorine-catalyzed Hydrolysis of Isopropyl Methylphosphonofluoridate (Sarin) in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*. 1956.
- [11] YANG, Y.C., J.A. BAKER a J.R. WARD. Decontamination of chemical warfare agents. *Chemical Review*. 1992, č. 8.
- [12] WAGNER, G.W. Rapid Nucleophilic/Oxidative Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2002.

- [13] RABER, E. a R.J. MCGUIRE. Oxidative Decontamination of Chemical and Biological Warfare Agents Using L-Gel. *Journal of Hazardous Materials*. 2002, č. 3.
- [14] HAY, R.W a N GOVAN. The [Cu(tmen)(OH)(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> promoted hydrolysis of 2,4-dinitrophenyl diethyl phosphate and O-isopropyl methylphosphonofluoridate (Sarin) (tmen = N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane). *Polyhedron*. 1998, č. 11.
- [15] PETERSON, G. W. a G.W. WAGNER. Detoxification of chemical warfare agents by CuBTC. *Journal of Porous Materials*. 2013, č. 21.
- [16] TOTTEN, R.K., M.H. WETSON, J.K. PARK, O.K. FARHA, J.T. HUPP a S.T. NGHUEN. Catalytic Solvolytic and Hydrolytic Degradation of Toxic Methyl Paraoxon with La(catecholate)-Functionalized Porous Organic Polymers. *ACS Catalysis*. 2013, č. 3.
- [17] WITHEY, R.J. Lanthanum ion catalysis of nucleophilic displacement reactions of monoesters of methyl phosphonic acid. *Canadian Journal of Chemistry*,. 1969.
- [18] MAZUR, A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *The Journal of Biological Chemistry*. 1946.
- [19] QUISTAD, G.B., D.K. NOMURA, S.E. SPARKS, Y. SEGALL a J.E. CASIDA. Cannabinoid CB1 receptor as a target for chlorpyrifos oxon and other organophosphorus pesticides. *Toxicology Letters*. 2002, 1-2.
- [20] MUNNECKE, D.M. a D.P.H. HSIEH. Pathways of microbial metabolism of parathion. *Journal of Applied Microbiology*. 1974, č. 28.
- [21] WANG, A. A. a W. CHEN. Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized dual functional biocatalysts in a cellulose hollow fiber bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005, č. 3.
- [22] KULKARNI, M. a A. CHAUDHARI. Biodegradation of p-nitrophenol by *P. putida*. *Bioresource Technology*. 2005, č. 8.
- [23] ŠTENGL, V., M. MAŘÍKOVÁ, S. BAKARDJIEVA, J. ŠUBRT, F. OPLUŠTIL a M. OLŠANSKÁ. Reaction of sulfur mustard gas, soman and agent VX with nanosized anatase TiO<sub>2</sub> and ferrihydrite. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2005.

- [24] ŠTENGL, V., V. HOUŠKOVÁ, S. BAKARDJIEVA, N. MURAFÁ, M. MAŘÍKOVÁ, F. OPLUŠTIL a T. NĚMEC. Zirconium doped nano-dispersed oxides of Fe, Al and Zn for destruction of warfare agents. *Elsevier*. 2010.
- [25] ŠTENGL, V., J. BLUDSKÁ, F. OPLUŠTIL a T. NĚMEC. Mesoporous titanium–manganese dioxide for sulphur mustard and soman decontamination. *Materials Research Bulletin*. 2011.
- [26] ŠTENGL, V., T.M. GRYGAR, F. OPLUŠTIL a T. NĚMEC. Ge<sup>4+</sup> doped TiO<sub>2</sub> for stoichiometric degradation of warfare agents. *Journal of Hazardous Materials*. 2012.
- [27] ŠTENGL, V. *Syntézy materiálů pro stechiometrickou a fotokatalytickou degradaci bojových chemických látek a azobarviv*. Husinec-Řež, 2013. Teze disertace k získání vědeckého titulu "doktor věd" ve skupině věd chemických. Akademie věd České republiky.
- [28] WAGNER, G.W., Q. CHEN a Y. WU. Reactions of VX, GD, and HD with Nanotubular Titania. *The Journal of Physical Chemistry*. 2008.
- [29] PRASAD, G.K. Silver ion exchanged titania nanotubes for decontamination of 2 chloro ethyl phenyl sulphide and dimethyl methyl phosphonate. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2009.
- [30] BORKAR, I.V., C.Z. DINU, G.Z. RAVI, R.S. KANE a J.S. DORDICK. Bionanoconjugate-Based Composites for Decontamination of Nerve Agents. *American Institute of Chemical Engineers*. 2010.
- [31] ŠTEGL, V., S. BAKARDJIEVA, N. MURAFÁ a F. OPLUŠTIL. Zirconium Doped Titania: Destruction of Warfare Agents and Photocatalytic Degradation of Orange 2 Dye. *The Open Process Chemistry*
- [32] ŠTENGL, V., F. OPLUŠTIL a T. NĚMEC. In<sup>3+</sup>-doped TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> / In<sub>2</sub>S<sub>3</sub> Nanocomposite for Photocatalytic and Stoichiometric Degradations. *Photochemistry and Photobiology*. 2012.
- [33] HOUŠKOVÁ, V., V. ŠTENGL, S. BAKARDJIEVA, N. MURAFÁ, A. KALEDOVÁ a F. OPLUŠTIL. Zinc Oxide Prepared by Homogeneous Hydrolysis with Thioacetamide, Its Destruction of Warfare Agents, and Photocatalytic Activity. *The Journal of Physical Chemistry*. 2007.

- [34] WAGNER, G. W., P.W. BARTRAM, O. KOPER a K.J. KLABUNDE. Reactions of VX, GD, and HD with Nanosize MgO. *The Journal of Physical Chemistry*. 1999.
- [35] WAGNER, G.W., L.R. PROCELL a S. MUNAVALI. <sup>27</sup>Al, <sup>47,49</sup>Ti, <sup>31</sup>P, and <sup>13</sup>C MAS NMR Study of VX, GD, and HD Reactions with Nanosize Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Conventional Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub>, and Aluminum and Titanium Metal. *The Journal of Physical Chemistry*. 2007.
- [36] BANDOSZ, T.R., M. LASKOSKI, J. MAHLE, G. MOGILOVSKY, G.W. PETERSON, J.A. ROSSIN a G.W. WAGNER. Reactions of VX, GD, and HD with Zr(OH)<sub>4</sub>: Near Instantaneous Decontamination of VX. *The Journal of Physical Chemistry*. 2012.
- [37] ZBORIL, R., M. ANDRLE, F. OPLUŠTIL, L. MACHALA, J. TUCEK, J. FILIP, Z. MARUSAK a V.K. SHARMA. Treatment of chemical warfare agents by zero-valent iron nanoparticles and ferrate(VI)/(III) composite. *Journal of Hazardous Materials*. 2012.
- [38] HOLIŠOVÁ, V. *Biosyntéza nanočástic ušlechtilých kovů*. Ostrava, 2012. Bakalářská práce. Vysoká škola Báňská-Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Gabriela Kratošová.
- [39] FILIPOVÁ, Z., G. KRATOŠOVÁ, A. SCHRÖFEL a MIROSLAV MAŠLÁŇ. *Biosyntéza nanomateriálů*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. ISBN 978-80-244-3202-1.
- [40] PROKOP, A. *Intracellular Delivery*. Česká republika: Springer Verlag, 2011, s. 373-409. ISBN 978-94-007-1247-8.
- [41] CORTI, C. a R. HOLLIDAY. *Gold: Science and applications*. United States of America: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4200-6523-7.
- [42] Tecnicall: Čtvrtletník českého vysokého učení technického v Praze. *Tecnicall* [online]. 2009-2014 [cit. 2014-05-06]. Dostupné z: <http://www.tecnicall.cz/clanek/2012-01-zlato/>
- [43] KYNCLOVÁ, H. *Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pro elektrochemické biosenzory*. Brno, 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.

- [44] NATŠINOVÁ, M. *Aplikace biosyntetizovaných nanočástic a nanokompozitů*. Ostrava, 2012. Bakalářská práce. Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava.
- [45] NARAYANAN, K. B. a N. SAKTHIVEL. Synthesis and characterization of nano-gold composite using *Cylindrocladium floridanum* and its heterogeneous catalysis in the degradation of 4-nitrophenol. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, č. 10.
- [46] AROMAL, S.A., K.V.D. BABU a D. PHILIP. Characterization and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized using ayurvedic arishtams. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012.
- [47] SUVITH, V.S. a D. PHILIP. Catalytic degradation of methylene blue using biosynthesized gold and silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013.
- [48] AROMAL, S.A. a D. PHILIP. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012.
- [49] SRIVASTA, S.K., YAMADA, OGINO a A. KONDO. Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by *Escherichia coli* K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol. *Nanoscale research Letters*. 2013, č. 8.
- [50] YANG, X., W.J. YANG, L.J. WENG, Y.Y. HAN a D. GENG. *Syzygium Samarangense* Leaf Mediated Biosynthesis of Gold Nanoparticles and its Application in Catalysis. *GetInfo*. 2012.
- [51] SUN, D., G. ZHANG, X. JIANG, J. HUANG, X. JING, Y. ZHENG, J. HE a Q. LI. Biogenic flower-shaped Au–Pd nanoparticles: synthesis, SERS detection and catalysis towards benzyl alcohol oxidation. *Journal of Materials Chemistry A*. 2014, č. 6.
- [52] ŘEZÁČOVÁ, M. *Mallomonas kalinae* (Synurophyceae), a new species of alga from northern Bohemia, Czech Republic. *Preslia*. 2006.

- [53] KRATOŠOVÁ, G., I. VÁVRA, K. HORSKÁ, O. ŽIVOTSKÝ, Y. NĚMCOVÁ, M. BOHUNICKÁ, J. SLABOTÍNSKÝ, K. ROSENBERGOVÁ a A. SCHROFEL. Synthesis of Metallic Nanoparticles by Silica Based Algae - Outline, Prospect and Applications In: Sustainable Green Synthesis of Nanoparticles. *Springer Verlag*. V tisku.
- [54] RODUIT, N. JMicroVision: Image analysis toolbox for measuring and quantifying components of high-definition images. Version 1.2.2. <http://www.jmicrovision.com>
- [55] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [56] CHARVÁTOVÁ, M. Využití metody SPME při analýze látek pocházejících z polymerů kontaminujících potravní řetězce (SOP). *Multimediální pomůcka pro předmět Chemie potravních řetězců*: [online]. [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://soubory.vfu.cz/fvhe/metoda-spme/>
- [57] PABST, W. A E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav*. Praha, 2007. Studijní materiál. Vysoká škola chemicko-technologická.
- [58] BUUREN, M. Vodní řasy pro energetiku – zkušenosti z Nizozemska. *Biom.cz* [online]. 2008 [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vodni-rasy-pro-energetiku-zkusenosti-z-nizozemska>
- [59] DICERSON, M.B. *The Protein and Peptide Mediated Syntheses of Non-biologically-produced*. Georgia, 2007. A Dissertation. Georgia Institute of Technology.

# PŘÍLOHY

## Seznam příloh

<b>Příloha A</b>	Tabulka uvádějící procentuální zastoupení klesající koncentrace jednotlivých katalyzátorů při hydrolýze somanu o objemu 1 $\mu$ l a 5 $\mu$ l.....	<b>63</b>
<b>Příloha B</b>	Fragmenty detekované hmotnostním detektorem, dokazující štěpení P-F vazby při degradaci somanu spolu s výstupem z hmotnostního detektoru.....	<b>64</b>
<b>Příloha C</b>	Tabulka uvádějící procentuální zastoupení klesající koncentrace jednotlivých katalyzátorů při hydrolýze VX o objemu 5 $\mu$ l.....	<b>67</b>
<b>Příloha D</b>	Fragmenty detekované hmotnostním detektorem, dokazující štěpení P-S vazby při degradaci VX spolu s výstupem z hmotnostního detektoru. ....	<b>68</b>

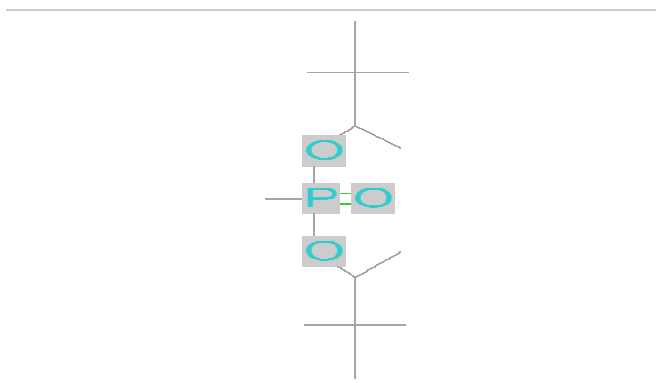
**Příloha A** Tabulka uvádějící procentuální zastoupení klesající koncentrace jednotlivých katalyzátorů při hydrolyze somanu o objemu 1  $\mu$ l a 5  $\mu$ l.

Čas [hod]	MKAu+1 $\mu$ l GD [%]	MK+1 $\mu$ l GD [%]	H2O+1 $\mu$ l GD [%]	MKAu+5 $\mu$ l GD [%]	MK+5 $\mu$ l GD [%]	H2O+5 $\mu$ lGD [%]
0	97,92	97,04	95,14	98,35	100,00	100,00
1	96,24	96,56	97,75	98,42	99,12	96,93
2	90,90	98,01	97,65	99,40	98,18	95,21
3	85,13	98,57	98,69	93,85	96,95	95,21
4	81,02	92,25	97,66	89,54	96,06	94,14
5	74,67	89,61	99,54	84,19	97,44	93,09
6	69,17	82,18	97,36	80,50	93,79	92,11
7	65,31	83,90	98,81	78,30	91,33	91,16
8	61,01	81,87	97,76	74,21	89,45	90,89
9	56,91	77,60	97,81	71,52	89,24	87,46
10	52,88	75,25	98,16	66,48	87,16	88,91
11	47,85	75,01	97,66	63,70	86,19	88,08
12	44,30	67,99	97,20	61,36	83,64	86,87
13	41,68	66,97	97,10	57,18	83,02	85,02
14	38,48	64,49	95,88	54,10	83,91	84,81
15	34,70	61,76	96,67	50,90	81,06	84,51
16	33,04	59,44	95,17	47,98	82,61	82,63
17	31,14	57,49	95,16	45,73	82,32	81,77
18	27,69	57,10	94,70	43,25	85,48	81,19
19	24,68	54,84	94,38	41,28	86,97	79,73
20	23,07	51,76	93,82	38,53	84,22	78,79
21	20,99	51,51	93,22	36,71	86,90	77,49
22	19,84	51,36	92,52	34,75	86,72	76,15
23	18,20	49,83	91,95	32,66	88,08	75,58
24	16,54	48,24	90,81	30,95	83,90	74,10
25	15,56	46,52	92,31	28,48	83,06	72,74
26	14,41	46,02	92,68	25,82	81,53	71,54
27	13,23	44,35	92,03	24,06	82,81	70,44
28	12,14	43,90	91,92	22,94	81,33	69,08
29	11,12	43,08	91,26	21,05	80,30	66,64
30	10,24	43,36	90,80	19,63	82,67	66,52
31	9,59	41,23	90,28	18,10	80,30	65,27
32	8,89	41,71	89,76	16,53	82,69	63,86
33	7,91	41,04	88,99	14,95	78,81	62,74
34	7,43	39,57	87,41	14,26	78,25	60,55
35	6,69	39,07	87,61	13,07	77,82	60,14
36	6,22	37,77	88,43	12,12	76,79	58,13
37	5,45	37,94	87,47	10,89	77,25	56,67
38	5,18	36,68	87,75	10,78	76,68	56,78
39	4,73	36,88	86,55	9,25	74,49	54,98
40	4,35	35,92	85,95	8,70	74,51	53,66
41	3,96	34,96	85,23	8,00	75,43	52,71

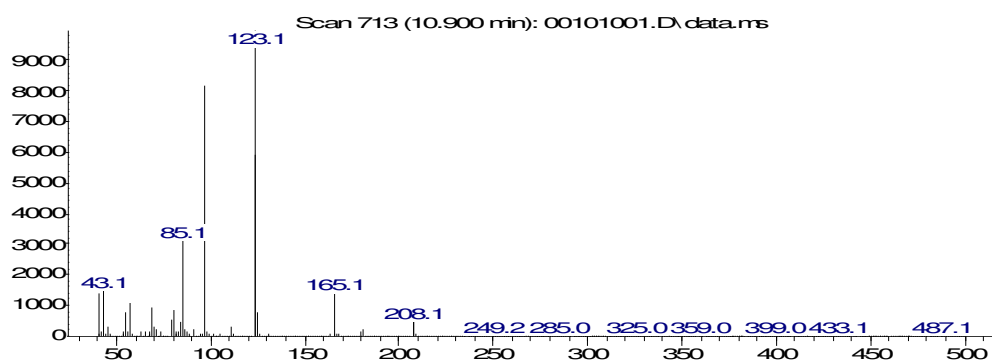


Pokračování přílohy A						
42	3,62	33,41	84,32	7,23	70,74	50,64
43	3,34	32,98	84,10	6,87	69,92	50,33
44	3,01	31,78	83,30	6,22	68,82	48,25
45	2,81	31,42	83,44	5,78	71,71	47,82
46	2,64	30,57	81,61	5,20	70,11	46,92
47	2,38	29,72	81,51	4,88	70,79	45,73
48	2,15	28,89	80,90	4,46	68,64	44,71

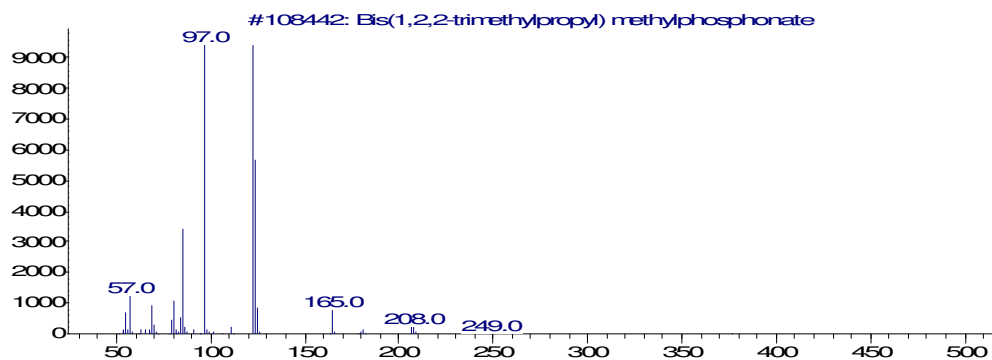
**Příloha B** Fragменты detekované hmotnostním detektorem, dokazující štěpení P-F vazby při degradaci somanu spolu s výstupem z hmotnostního detektoru.



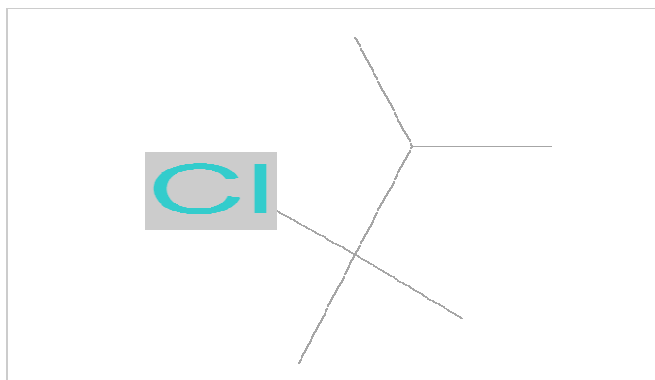
Abundance



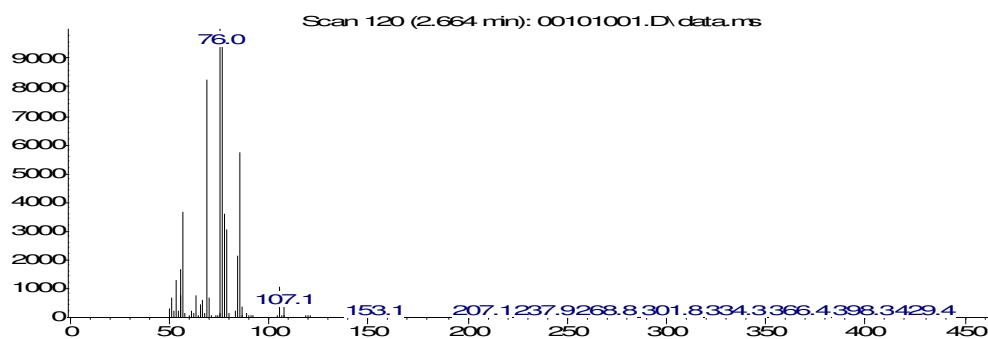
m/z->  
Abundance



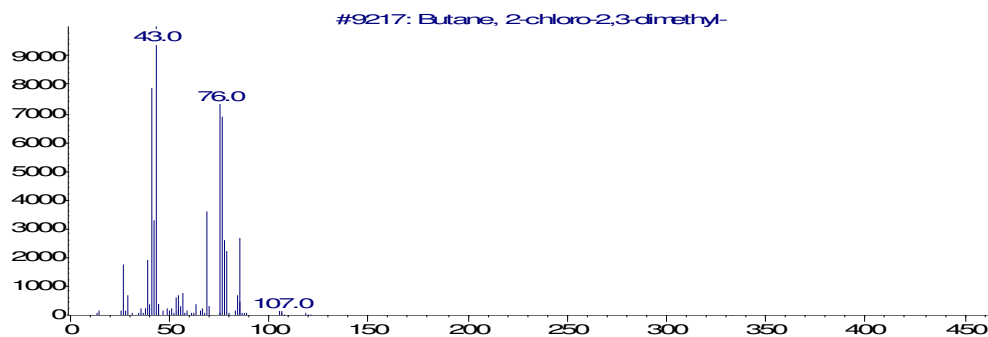
m/z->



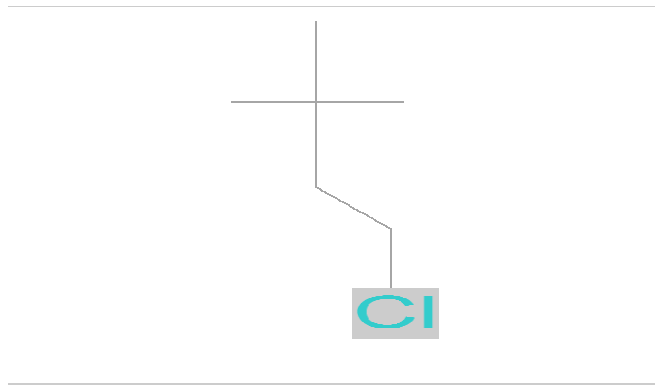
Abundance



m/z->  
Abundance



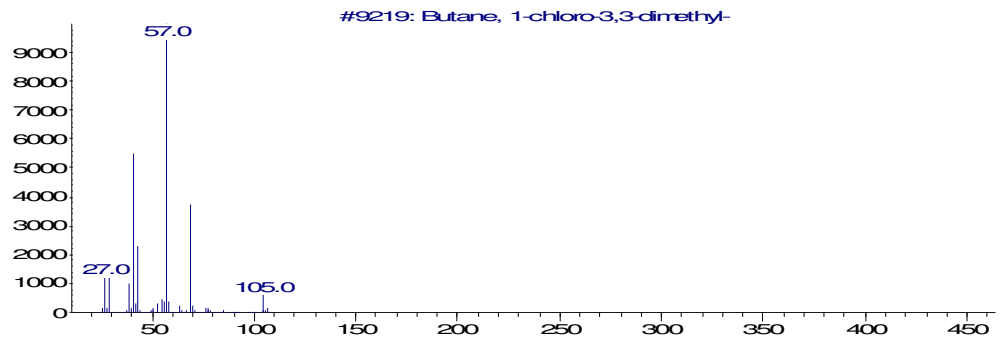
m/z->



Abundance



m/z ->  
Abundance

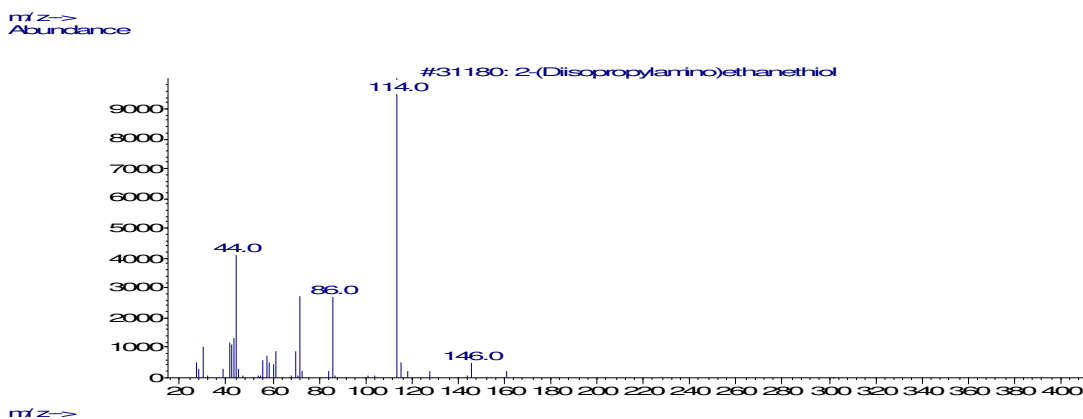
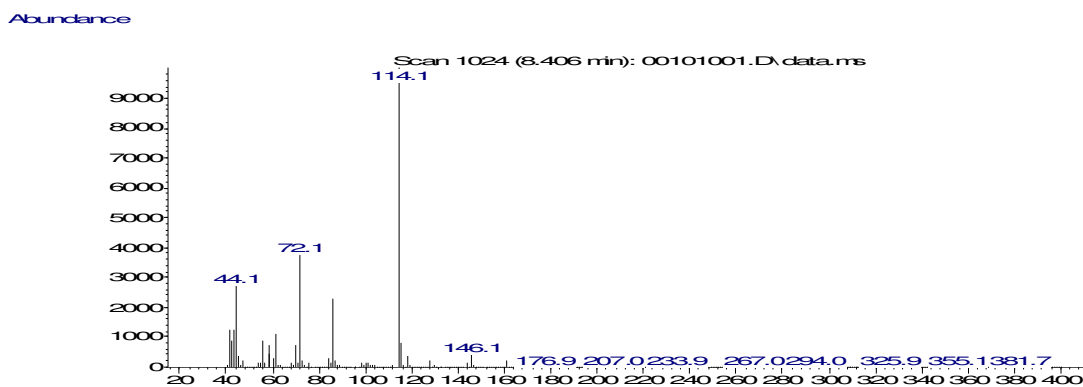
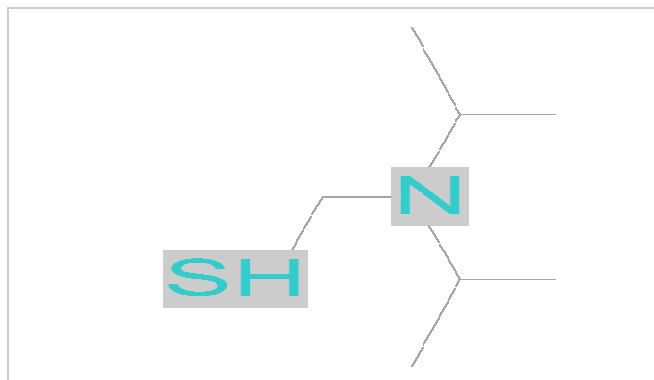


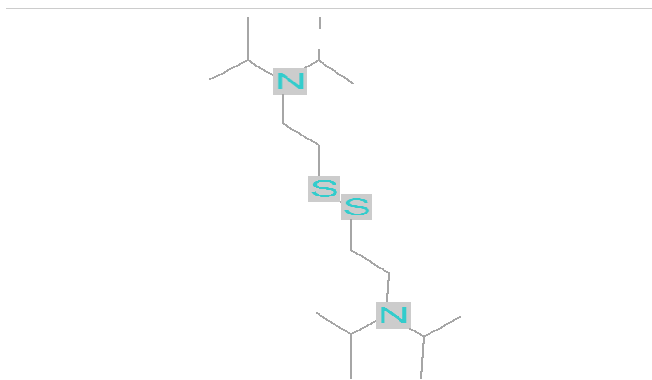
m/z ->

**Příloha C** Tabulka uvádějící procentuální zastoupení klesající koncentrace jednotlivých katalyzátorů při hydrolýze VX o objemu 5  $\mu$ l.

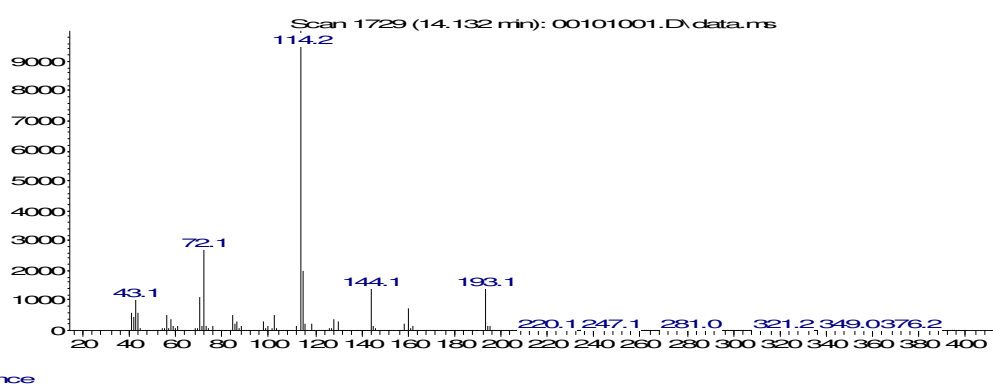
<b>Čas [hod]</b>	<b>MK Au+5<math>\mu</math>l VX [%]</b>	<b>MK+5<math>\mu</math>l VX [%]</b>	<b>Voda +5 <math>\mu</math>l VX [%]</b>
0	78,68	66,00	95,90
1	98,44	95,59	90,50
2	72,22	95,37	87,69
3	60,64	83,98	84,96
4	42,07	72,88	85,52
5	48,15	69,20	82,64
6	37,86	66,14	80,36
7	31,63	51,13	72,18
8	22,51	45,19	69,47
9	31,23	39,48	67,98
10	28,81	30,09	66,17
11	28,00	22,10	63,02
12	23,74	15,70	57,29
13	27,33	8,41	55,02
14	19,17	7,93	51,17
15	21,92	4,86	49,74
16	22,88	6,21	47,80
17	21,52	2,92	45,38
18	18,55	4,66	41,76
19	17,21	2,53	40,51
20	18,85	4,08	38,36

**Příloha D** Fragменты детекované hmotnostním detektorem, dokazující štěpení P-S vazby při degradaci VX spolu s výstupem z hmotnostního detektoru.

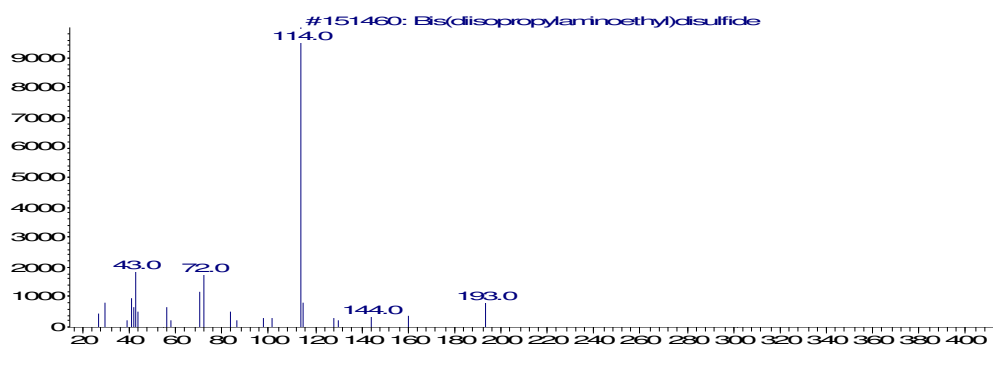


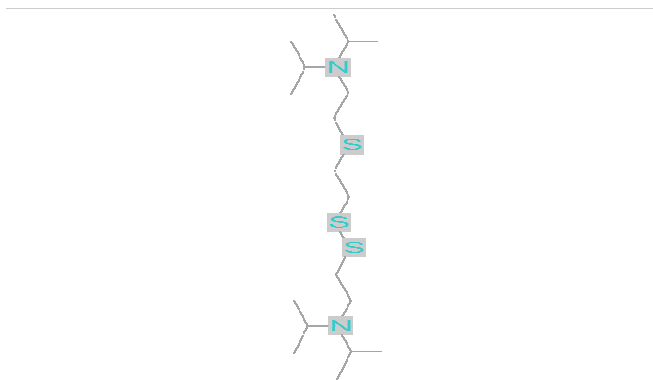


Abundance

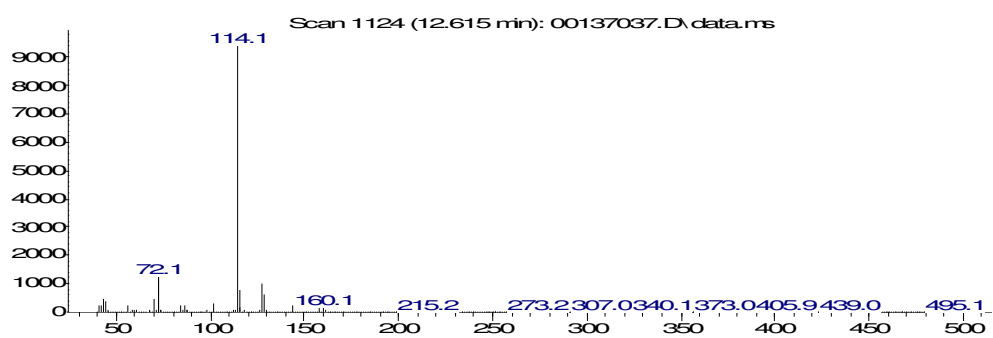


Abundance

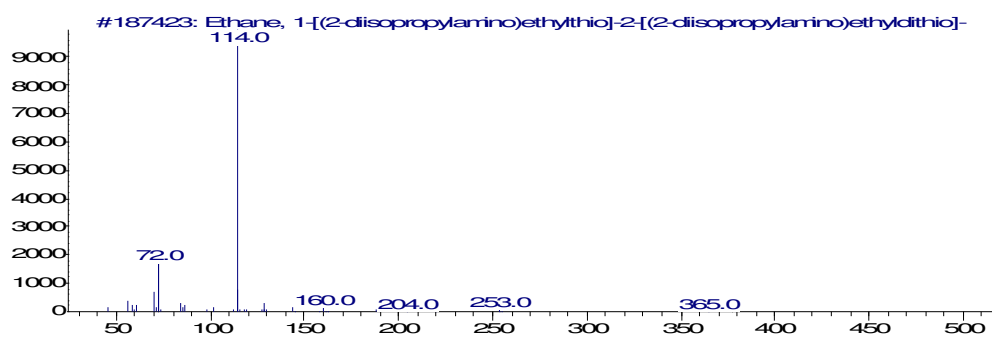




Abundance



m/z->  
Abundance



m/z->