

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**ANALÝZA UHLÍKOVÝCH KVANTOVÝCH TEČEK POMOCÍ KAPILÁRNÍ
ELEKTROFORÉZY S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Ondřej Stibor

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2011

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne 21. dubna 2011

.....

Vlastnoruční podpis

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Janu Petrovi Ph.D. za umožnění vypracování experimentální části v laboratoři elektromigračních metod na katedře analytické chemie a dále za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky.

Za finanční podporu této práce děkuji projektu Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů Operačního programu Věda a výzkum pro inovace – ESF (projekt MŠMT CZ.1.05/2.1.00/03.0058). Zároveň děkuji skupině Prof. Zbořila (RCPTM UP Olomouc) a Dr. Bourlinose (Institute of Materials Science, Athens) za poskytnutí uhlíkových kvantových teček.

Abstrakt

Tato diplomové práce se zabývá studiem chování uhlíkových kvantových teček v roztocích různých elektrolytů. V teoretické části jsou shrnuty poznatky týkající se laserem indukované fluorescence, derivatizačních metod a uhlíkových kvantových teček. Uhlíkové kvantové tečky nebo-li C-dots jsou sférické částice s rozměry od 2 do 10 nm. Uhlíkové kvantové tečky jsou tvořeny uhlíkovým jádrem a povrchem modifikovaným karbonylovými a karboxylovými skupinami nebo polymery. Tyto nanočástice mají unikátní optické vlastnosti, které mohou najít uplatnění například v zobrazovacích technikách, proto je vhodné podrobit uhlíkové kvantové tečky výzkumu jejich chování v roztocích elektrolytů. Výbornou technikou pro studium chování uhlíkových kvantových teček v roztocích elektrolytů je kapilární elektroforéza ve spojení s laserem indukovanou fluorescencí a to kvůli nabitému povrchu a fluorescenci těchto nanočástic. V experimentální části byly uhlíkové kvantové tečky analyzovány ve čtyřech různých prostředích a to v borátovém pufru (35 mmol/l, pH=9,5) s dodecylsulfátem sodným (SDS), acetátovém pufru (150 mmol/l, pH=4,0) s SDS, fosfátovém pufru (35 mmol/l, pH=2,5) s SDS a MOPS/NaOH pufru (35 mmol/l, pH=7,5) s kapilárou pokrytou didodecylmethylammonium bromidem. V těchto základních elektrolytech byly testovány různé hodnoty koncentrace analytu, koncentrace povrchově aktivní látky, iontové síly elektrolytu a teploty. Bylo zjištěno, že vlivem změn těchto atributů dochází u C-dots ke změnám v interakcích mezi nanočásticemi, destabilizaci a agregaci nanočástic.

Abstract

This thesis studies the behavior of carbon nanodots in different electrolyte solutions. Information about laser-induced fluorescence, derivatization methods and carbon nanodots are summarized in the theoretical section. Carbon nanodots or C-dots are spherical particles with diameters about 2 to 10 nm. C-dots are made from carbon core with surface modified by carboxylic and carbonylic groups and polymers. These nanoparticles have unique optical properties, which may find application in bioimaging, and therefore we need to know their behavior in different electrolytes. Excellent technique for studying their behavior in different electrolytes is capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence because of their charged surface and photoluminescence. Carbon nanodots were analyzed in four different electrolytes in the experimental section. C-dots were analyzed in borate buffer (35 mmol/L, pH 9.5) with sodium dodecylsulfate (SDS), acetate buffer (150 mmol/L, pH 4.0) with SDS, phosphate buffer (35 mmol/L, pH 2.5) with SDS and MOPS/NaOH buffer (35 mmol/L, pH 7.5) with a capillary surface covered by didodecyldimethylammonium bromide. In these background electrolytes, concentration of the analyte, surfactant concentration, ionic strength and temperature were studied. Different interactions between nanoparticles, destabilization and aggregation of nanoparticles were found due to changes in these attributes.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Laserem indukovaná fluorescence.....	10
2.1.1	Základní princip.....	10
2.1.2	Instrumentace.....	11
2.1.2.1	Zdroj elektromagnetického záření.....	11
	Plynové lasery.....	12
2.1.2.2	Optická dráha	13
	Kolmé uspořádání.....	13
	Excitační optika	13
	Detekční cela	14
	Zachycovací optika.....	14
	Přímé uspořádání	15
2.1.2.3	Detektory elektromagnetického záření.....	15
	Fotonásobiče	15
	Diodové pole.....	16
	Detektory CCD	16
2.2	Derivatizační metody.....	17
2.2.1	Klasifikace derivatizačních reakcí.....	17
2.2.1.1	Pre-capillary derivatizace	17
2.2.1.2	On-capillary derivatizace	18
2.2.1.3	Post-capillary derivatizace	18
2.2.2	Strukturní faktory ovlivňující luminiscenci.....	18
2.2.2.1	Prodloužení π -elektronového systému	18
2.2.2.2	Povaha elektronových přechodů	19
2.2.2.3	Tvorba komplexů	19
2.2.2.4	Efekt „těžkého atomu“	20
2.2.2.5	Efekt paramagnetických molekul.....	20
2.2.2.6	Efekt substituentu.....	20
2.2.3	Derivatizační reakce	21

2.2.3.1	Reakce vedoucí k prodloužení π -elektronového systému	21
2.2.3.2	Modifikace molekuly substituentem	22
2.2.3.3	Derivatizace založená na tvorbě komplexu.....	23
2.3	Nanočástice.....	24
2.4	Uhlíkové kvantové tečky	25
2.4.1	Syntetické metody	26
2.4.1.1	Metody obloukového výboje.....	26
2.4.1.2	Metody laserové ablace.....	26
2.4.1.3	Metody elektrochemické syntézy.....	27
2.4.1.4	Metody spalovací a termální	28
2.4.1.5	Metody využívající podpůrnou látku	29
2.4.2	Fyzikální a chemické vlastnosti.....	30
2.4.2.1	Krystalová struktura a hybridizace.....	30
2.4.2.2	Optické vlastnosti.....	30
2.4.2.3	Cytotoxicita	31
2.4.3	Aplikace uhlíkových kvantových teček.....	31
2.4.3.1	Zobrazovací techniky	31
2.4.3.2	Fotoredukce kovů	31
3	Cíle práce.....	33
4	Experimentální část	34
4.1	Experimentální podmínky	34
4.2	Výsledky.....	35
4.2.1	Volba vhodného elektrolytu	35
4.2.2	Analýza C-dots v borátovém pufru	39
4.2.2.1	Vliv ředění C-dots	40
4.2.2.2	Vliv iontové síly	43
4.2.2.3	Vliv koncentrace SDS	47
4.2.2.4	Vliv teploty.....	49
4.2.2.5	Vliv přídatku hovězího sérového albuminu	51
4.2.3	Analýza C-dots v MOPS/NaOH pufru	52
4.2.3.1	Vliv ředění C-dots	52
4.2.3.2	Vliv iontové síly	54

4.2.3.3	Vliv teploty.....	54
4.2.4	Analýza se simultánní detekcí.....	56
5	Závěr.....	58
6	Literatura.....	59
7	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	64

1 Úvod

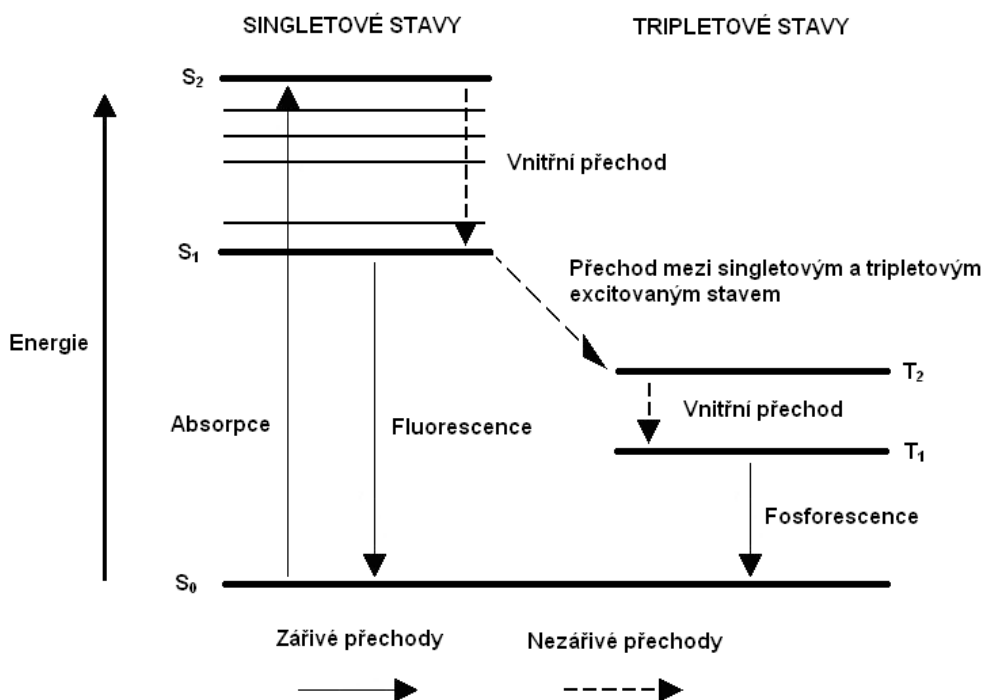
Nanočástice jsou v současnosti jednou z nejintenzivněji zkoumaných oblastí chemie a na výzkumu se svou činností podílí mnoho vědeckých skupin. Tento obrovský zájem o tyto částice, které mají alespoň jeden svůj rozměr řádově v nanometrech, je způsoben zejména kvůli jejich unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem. Jednou ze skupin nanočástic jsou kvantové tečky, které byly poprvé připraveny na počátku osmdesátých let dvacátého století. Kvantové tečky jsou kovové polovodičové částice o rozměrech v jednotkách až desítkách nanometrů, které mají výborné optické vlastnosti. Kvůli těmto vlastnostem mají kvantové tečky velký potenciál například v zobrazovacích technikách, ale určitou nevýhodou je jejich značná toxicita. Netoxickou variantou kvantových teček je nedávno objevená skupina nanočástic, která se označuje jako uhlíkové kvantové tečky nebo-li C-dots. Uhlíkové kvantové tečky jsou sférické částice s uhlíkovým jádrem a povrchem modifikovaným karbonylovými a karboxylovými skupinami nebo polymery. Tyto nanočástice mají rozměry v jednotkách nanometrů a mají opět unikátní optické vlastnosti, které jsou využitelné například v zobrazovacích technikách nebo při fotoredukci kovů a navíc se u nich neprokázala výrazná toxicita. Kvůli jejich potencionálnímu využití je nutné uhlíkové kvantové tečky podrobit studiu chování v roztocích elektrolytů. Tento výzkum zaměřený na chování uhlíkových kvantových teček v různých roztocích elektrolytů je důležitý zejména kvůli studiu interakcí nanočástic mezi sebou, destabilizace nanočástic a agregace nanočástic do větších celků. Pro tuto analýzu je vhodná kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí a to především kvůli nabitému povrchu a fluorescenci analytu. Navíc můžeme dostatečně ale jednoduše modifikovat zkoumané parametry základního elektrolytu, jako je například iontová síla. Kapilární elektroforéza společně s laserem indukovanou fluorescencí nám nabízí skutečně citlivou detekci a umožňuje nám výborně studovat chování uhlíkových kvantových teček v roztocích různých elektrolytů.

2 Teoretická část

2.1 Laserem indukovaná fluorescence

2.1.1 Základní princip

Absorpce elektromagnetického záření vede k excitaci molekuly z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Jde obvykle o první excitovaný singletový stav. Z tohoto excitovaného stavu se molekula dostane zpět do stavu základního dvěma rozdílnými deaktivacími přechody. Při nezářivém přechodu se elektron vrátí na základní hladinu a odevzdanou energii rozvibruje molekulu, která přechází na základní vibrační hladinu přes řadu vibračních stavů vibrační relaxací. Při zářivém přechodu dochází k emisi elektromagnetického záření obvykle nižší energie (delší vlnové délky), než energie záření určené k excitaci molekuly. Pokud emise následuje v krátkém časovém intervalu po excitaci ($\sim 10^{-9}$ s), hovoříme o fluorescenci (Obr.1).



Obr. 1: Jablonského diagram zřívých a nezřívých přechodů.

Při fluorescenčních experimentech existuje několik proměnných, které ovlivňují množství emitovaného záření dané molekuly. Na velikosti emise analytu se podílí molární absorpční koeficient při dané vlnové délce záření, kvantový výtěžek, teplota, povaha rozpouštědla a množství kyslíku rozpuštěného ve vzorku.

Velikost zářivého toku fluorescence (P_f) vyprodukované vzorkem je dána vztahem,

$$P_f = \Phi P_0 abc \varepsilon_x \varepsilon_c \varepsilon_m \varepsilon_{PMT} \quad (1)$$

kde P_0 je zářivý tok původního záření, Φ je kvantový výtěžek molekuly (fotony emitované/fotony absorbované), a , b , c jsou podmínky Lambert-Beerova zákona, ε jsou členy závislé na účinnosti excitační optiky (x), detekční cely (c), zachycovací optika (m), detektoru elektromagnetického záření (PMT) [1].

2.1.2 Instrumentace

2.1.2.1 Zdroj elektromagnetického záření

Lasery v metodách kapilární elektroforézy (CE) jsou používány k několika rozdílným účelům. Opticko-vtokovým zaváděním vzorku [2] počínaje a studiem vnitřního povrchu kapilár mikroskopii atomárních sil [3] konče. Nejčastější je ovšem využití laseru jako zdroje elektromagnetického záření při fluorescenčních [4,5] a nefluorescenčních [6] detekčních technikách.

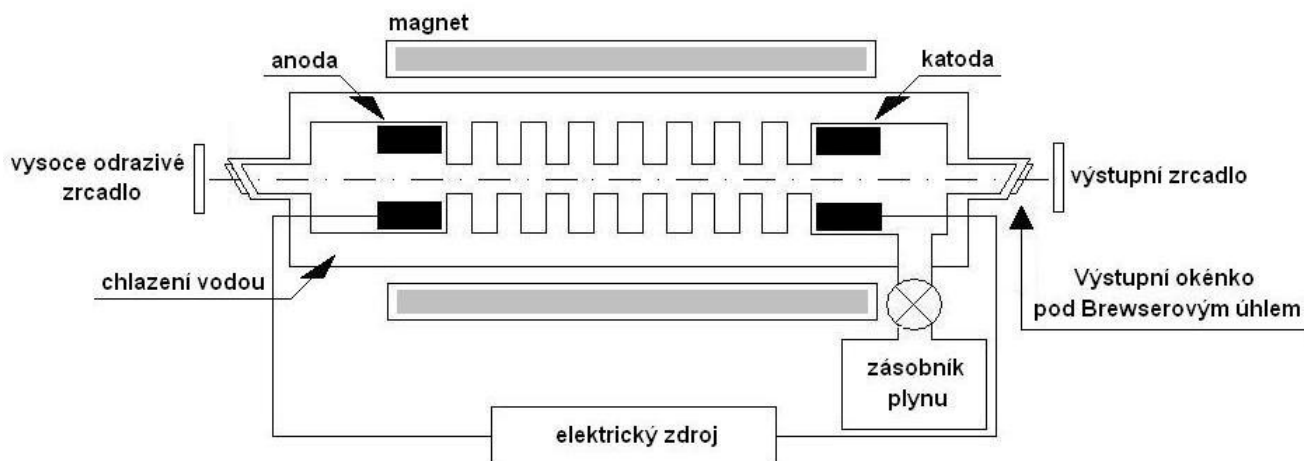
Laser je tvořen aktivním prostředím, rezonátorem a zdrojem energie. Zdrojem energie je do aktivního média dodávána energie, která excituje elektrony do vyšších energetických hladin. Tímto způsobem je vybudována většina elektronů a vzniká tzv. inverze populace. Při deexcitaci dochází k emisi fotonů, které reagují s dalšími elektrony inverzní populace a spouštějí tzv. stimulovanou emisi fotonů se stejnou frekvencí a fází. Aktivní část laseru je umístěna v rezonátoru tvořeném zrcadly, kde dochází k odrazu fotonů a opětovnému průchodu prostředím. Tímto způsobem dochází k exponenciálnímu zesilování toku fotonů. Výsledný paprsek poté opouští tělo laseru skrze polopropustné zrcadlo.

Lasery lze rozdělit podle několika kritérií. Podle povahy aktivního prostředí rozlišujeme pevnolátkové lasery, kapalinové lasery, plynové lasery a lasery využívající svazky nabitých částic [1].

Plynové lasery

Plynové lasery se ukázaly jako velmi perspektivní a mohutné zdroje infračerveného, viditelného a ultrafialového záření a našly významné uplatnění v technice a technologii. Důvodem je, že objem plynu můžeme podle potřeby zvětšovat, plynulým přítokem je možné dodávat stále nové aktivní prostředí a je možné je čerpat nejrůznějšími mechanismy (elektricky, chemicky). Plynové lasery mají vyšší účinnost, protože přeměna elektrické energie ve výboj je hospodárnější. Proto tyto lasery pracují v nepřetržitém režimu, ale jejich výkon není moc velký.

Argonový laser vydává modré nebo zelené světlo v šesti různých vlnových délkách od 457,9 do 545,5 nm s 80 % energie obsažené ve vrcholech 488 a 514,5 nm. Je pro něj typická vysoká hustota elektrického proudu protékajícího výbojem a vysoká teplota. Výbojová trubice se většinou zhotovuje z keramického materiálu a proud se izoluje od stěn magnetickým polem. Laser je schopen generovat výkon desítek wattů ve spojitém režimu a je vhodný i pro technologické účely. Podobné vlastnosti má i kryptonový a kadmiový laser a lasery s parami kovů (např. mědi)[7].



Obr. 2: Schéma plynového laseru.

2.1.2.2 Optická dráha

Při LIF detekci v metodách CE musí být záření laseru správně zaměřeno na detekční okénko kapiláry a fluorescence vyprodukovaná analytem musí směřovat do detektoru elektromagnetického záření. Vhodný výběr a umístění optických komponent je velmi důležitý. Při experimentu požadujeme maximální přenos a zachycení záření vyprodukovaného analytem a zároveň minimální zachycení rozptýleného a Ramanova záření [1].

Kolmé uspořádání

V tomto uspořádání je zachycování fluorescence analytu v kapiláře prováděno kolmo k rovině obsahující excitační paprsek. Typické kolmé uspořádání LIF obsahuje excitační optiku, detekční celou, zachycovací optiku.

Excitační optika

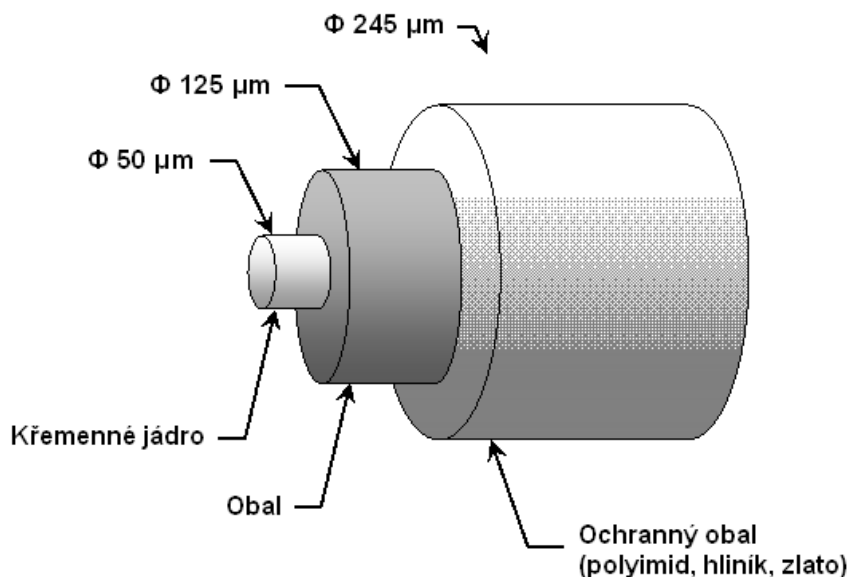
Použitím zrcadel může být paprsek laseru dopraven přímo k povrchu kapiláry. Mohou být použita zrcadla, která dobře odrážejí záření použitých vlnových délek. Odraz záření ovšem není většinou limitujícím faktorem, neboť lasery používané při LIF detekci produkují silnější záření než záření nutné k vybuzení fluorescence. Hlavní nevýhodou v používání zrcadel je, že dlouhá dráha paprsku způsobuje malé mechanické vibrace systému, které mohou mít vliv na rušení detektoru. Těmto vibracím můžeme zabránit použitím aktivní nebo pasivní izolace systému. Problémy mohou také nastat při zarovnání paprsku se zaostřovací optikou a kapilárou.

Problémům spojených s použitím zrcadel se můžeme vyhnout využitím optických vláken, které vedou paprsek od zdroje záření ke kapiláře nebo zaostřovací optice [8,9].

Laserový paprsek o průměru 1-2 mm musí být zaostřen použitím korekčních čoček nebo objektivem mikroskopu, abychom zvětšili optický výkon.

Optická vlákna mohou být skleněná nebo plastová vlákna, která přenáší signál pomocí elektromagnetického záření. Jde o dielektrický vlnodod, ve kterém se šíří zpravidla viditelné nebo infračervené elektromagnetické záření ve směru osy vlákna. Využívá se principu

absolutního odrazu na rozhraní dvou prostředí s odlišnými indexy lomu světla. Vláknem je složeno z jádra a tenké vrstvy obalu, který musí mít menší index lomu než jádro, aby docházelo k účinnému přenosu signálu (Obr. 3) [10].



Obr. 3: Struktura optického vlákna [11].

Detekční cela

Detekční cela je komponenta nezbytná pro dosažení vysoké citlivosti LIF detektoru. Jako detekční cely využíváme malou část kapiláry, abychom se vyhnuli nadměrnému rozšíření pásma analytu. Optická dráha tohoto způsobu detekce je omezena vnitřním průměrem kapiláry, proto je nezbytné maximalizovat vstupující záření a naopak redukovat rozptýlené a Ramanovo záření.

Zachycovací optika

Zachycováno a měřeno by mělo být pouze záření stanovovaného analytu. Nejčastější způsob využívá vysokou numerickou aperturu mikroskopu. Numerická apertura (NA) optických čoček je úměrné maximálnímu úhlu záření zachycovaného čočkami. Čím je NA vyšší, tím je zachyceno více záření vzorku. Se standardně používaným mikroskopem

s hodnotou NA 0,8 je zachyceno pouze 20% záření. V případě použitím parabolických zrcadel se můžeme dostat až na hodnotu 50% [12].

Přímé uspořádání

V přímém uspořádání jsou využívána dichroická zrcadla, která odrážejí záření o krátkých vlnových délkách a propouštějí záření o dlouhých vlnových délkách. Záření laseru odražené dichroickým zrcadlem je navedeno na stěnu kapiláry objektivem mikroskopu a následně je stejným objektivem zachyceno fluorescenční záření vzorku. V přímém uspořádání musí být použito různých filtrů kvůli snížení rozptýleného záření a vybrání vhodné vlnové délky.

2.1.2.3 Detektory elektromagnetického záření

Po zachycení fluorescenčního záření je nutné toto záření změřit. Převedeme proto elektromagnetické záření (fotony) na elektrický signál. Tento proces je založen na fotoelektrickém efektu [13].

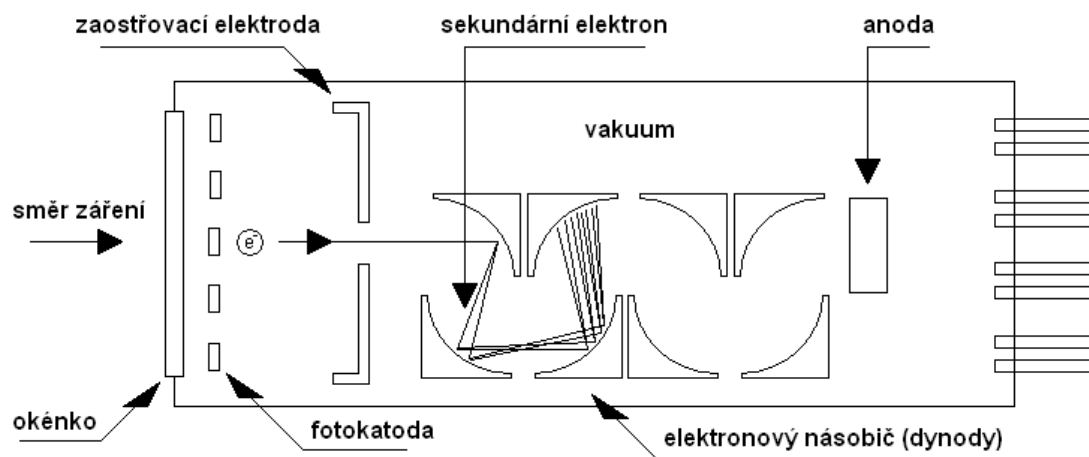
Při LIF detekci je měřeno jen velmi malé množství záření, obzvláště v případech s velmi zředěnými roztoky. K získání měřitelného elektrického signálu se používají emisní fotoelektrické články a polovodičové elektrické články [1].

Fotonásobiče

Fotonásobiče jsou díky vysoké citlivosti a rychlé odezvě stále nejčastěji užívanými detektory elektromagnetického záření, ačkoliv při některých aplikacích bývají nahrazovány polovodičovými fotoelektrickými články (diodové pole, detektor CCD). Typické součásti fotonásobiče jsou fotoemisí katoda (fotokatoda) následovaná zaostřovací elektrodou, elektronovým násobičem a kolektorem elektronů (anoda). Všechny součásti jsou umístěny v evakuované trubici (kolem 10^{-4} Pa) (Obr. 4).

Dopadající fotony vyřázejí z fotocitlivého povrchu fotokatody elektrony (vnější fotoelektrický jev). Tyto elektrony jsou usměrněny a urychleny zaostřovací elektrodou přímo

k dynodám elektronového násobiče, kde jsou generovány sekundární elektrony (zesiluje se elektrický proud). Nakonec elektrony dopadají na anodu a jsou měřeny jako proud mezi katodou a anodou [1].



Obr. 4: Schéma fotonásobiče.

Diodové pole

Diodové pole je seskupení velkého množství fotodiod, které zcela pokrývají vymezený interval vlnových délek. Foton po dopadu na fotodiodu vyvolá fotoelektrický proud, který vybije kondenzátor spojený s diodou. Měří se proud nutný k opětovnému nabití kondenzátoru [14].

Detektory CCD

Detektor CCD je křemíkový polovodičový čip (vodivost N), který obsahuje diskrétní čtvercové fotocitlivé jednotky (pixely) o šířce 10 – 30 μm , které pak tvoří jednotlivé body výsledného obrazu. Každý pixel má citlivost fotonásobiče. Činnost můžeme zjednodušeně popsat takto: dopad fotonu na vstupní část generuje elektron, který je uchován v „potenciálové jámě“ těsně pod povrchem, kde je obsažen SiO_2 . Počet nábojů v jámě kumulativně narůstá s množstvím fotonů dopadajících na povrch, tedy větší osvětlení

znamená větší náboj. Přenosovou částí je náboj postupně přenášen pomocí elektrického pole k výstupní části. Z výstupní části elektrony projdou na zesilovač čipu. Individuální náboj pixelu je konvertován na výstupní napětí [14].

2.2 Derivatizační metody

Derivatizace je modifikace analytu kvůli zvýšení jeho analytických významných vlastností. V CE/LIF využíváme derivatizaci k navázání skupin poskytujících fluorescenci na molekulu analytu a tím zvýšení citlivosti detekce.

Rozlišujeme dva typy derivatizace založené na interakci mezi analytem a derivatizačním činidlem. Jedná se o kovalentní a nekovalentní derivatizaci [15]. V prvním případě se skupina kovalentně naváže na analyzovanou molekulu a v případě druhém se skupina váže jiným typem vazby (např. elektrostatickými nebo hydrofobními interakcemi) [1].

2.2.1 Klasifikace derivatizačních reakcí

Derivatizační reakce můžeme také klasifikovat na základě času a místa reakce na (pre-capillary) před vstupem vzorku do kapiláry, (on-capillary) uvnitř kapiláry a (post-capillary) po uskutečnění separace, ale před vstupem do detektoru.

2.2.1.1 Pre-capillary derivatizace

Derivatizace před kapilárou je zřejmě nejrozšířenější metodou derivatizace. Výhodou tohoto způsobu derivatizace je její jednoduchost, k dispozici je velké množství reakčních činidel, možnost odpaření nebo extrakce nadbytku činidla, absence omezení souvisejících s dlouhými migračními časy a vysokou teplotou a uplatnění rozpouštědel nepoužitelných v CE.

Derivatizace nejčastěji probíhá skrze $-NH_2$ skupinu. Méně často derivatizujeme skupinami karbonylovými [16], karboxylovými [17] nebo thiolovými [18].

2.2.1.2 On-capillary derivatizace

V tomto provedení probíhá derivatizace i separace uvnitř kapiláry. Existuje několik možností jak toho dosáhnout.

Při derivatizaci pomocí míšení zón (zone-passing) aplikujeme napětí ihned po zavedení reakčního činidla a vzorku. První musí být zaveden roztok s nižší elektroforetickou pohyblivostí, aby mohlo dojít k promíchání zón. Tímto způsobem derivatizace můžeme postupovat pouze v případě rychlých reakcí, protože analyt a derivatizační činidlo jsou v kontaktu po omezenou dobu. Při sendvičovém způsobu je zóna vzorku aplikována mezi dvě zóny reakčního činidla.

Derivatizace před vstupem (at-inlet) do kapiláry probíhá v nádobce, která obsahuje vzorek i reakční činidlo. Až po potřebné reakční době aplikujeme napětí, začne probíhat separace [19].

Při celokapilární (throughout-capillary) derivatizaci je reakční činidlo přidáno do základního elektrolytu. Vzorek migrující kapilárou reaguje s činidlem po celou dobu separace [20].

2.2.1.3 Post-capillary derivatizace

Tento způsob derivatizace má několik výhod oproti výše zmíněným technikám. Derivatizace analytu totiž může způsobovat změny vlastností jako je náboj a hydrofobnost, které mohou být kritické pro separaci. Nevýhodami této metody jsou negativní efekt na účinnost separace, ředění vzorku, potřeba dalšího vybavení CE a zvýšený šum.

2.2.2 Strukturní faktory ovlivňující luminiscenci

2.2.2.1 Prodloužení π -elektronového systému

Dostatečně účinná fluorescence je dosažena pouze pro molekuly s prodlouženým π -elektronovým systémem. Jedná se hlavně o aromatické a vysoce nenasycené alifatické

sloučeniny. Při prodloužení π -systému dochází ke zvýšení účinnosti fluorescence a posunutí emise elektromagnetického záření k delším vlnovým délkám (tab. 1) [21].

Tab. 1: Účinnost fluorescence lineárních aromatických uhlovodíků (měřeno za chlazení tekutým dusíkem) [21].

Sloučenina	Počet kruhů	Φ_F	$\lambda_{em}(nm)$
Benzen	1	0,11	278
Naftalen	2	0,29	321
Anthracen	3	0,46	400
Tetracen	4	0,60	480

2.2.2.2 Povaha elektronových přechodů

Téměř všechny absorbované fotony vedou k prvnímu excitovanému singletovému stavu. Povaha těchto přechodů je rozhodující pro určení fluorescence molekuly. Excitace aromatických uhlovodíků vždy zahrnuje přechody z π vazebných do π^* protivazebných orbitalů. Tyto přechody jsou charakteristické vysokou hodnotou molární absorpce a velkou mírou fluorescence.

Pokud je v π -systému přítomen heteroatom musíme vzít v úvahu také přechody nevazebných elektronů heteroatomu ($n-\pi^*$). Díky malému překrytí nevazebných a π^* protivazebných orbitalů jsou tyto přechody charakterizovány nízkou hodnotou molární absorpce a malou mírou fluorescence. Tato skupina zahrnuje látky jako azosloučeniny, sloučeniny obsahující karbonylovou skupinu a spoustu dusíkatých heterocyklů [21].

2.2.2.3 Tvorba komplexů

V komplexních sloučeninách reagují nevazebné elektrony heteroatomu s ionty kovu. Tímto způsobem jsou stabilizovány nevazebné elektrony a proto je přechod do π^* protivazebných orbitalů energeticky náročnější. Výsledkem tvorby komplexu je upřednostňování přechodů $\pi-\pi^*$ místo $n-\pi^*$, proto se ligandy s malou nebo žádnou schopností fluorescence stávají silně fluorescentní. Tento způsob je užitečný jak pro analýzu kovů, tak pro analýzu organických látek neprojevující fluorescenci [21].

2.2.2.4 Efekt „těžkého atomu“

Přítomnost atomu s vysokou atomovou hmotností v molekule výrazně snižuje míru fluorescence (tab. 2). Důvodem je, že těžké atomy narušují elektronové spiny, proto singletové stavy získávají tripletový charakter [21].

Tab. 2: Efekt těžkého atomu pro halogenderiváty naftalenu (měřeno ve směsi ethanol-ethylether při 77 K) [21].

Sloučenina	Φ_F	$\lambda_{em}(nm)$
Naftalen	0,55	325
1-Fluornaftalen	0,84	316
1-Chlornaftalen	0,058	319
1-Bromnaftalen	0,0016	320
1-Jodnaftalen	<0,0005	

2.2.2.5 Efekt paramagnetických molekul

Elektrická pole nepárových elektronů molekul podporují intersystémové křížení. Jako příklad lze uvést, že kovové komplexy s paramagnetickými ionty neposkytují fluorescence. Zhášení fluorescence kyslíkem, které je často pozorováno v nepolárních rozpouštědlech, je tedy způsobeno jeho magnetickými vlastnostmi [21].

2.2.2.6 Efekt substituentu

Substituenty, které se chovají jako donory elektronů (např.: -NH₂, -NHR, -NR₂ a -OH) zvyšují účinnost fluorescence a posouvají emisi záření k vyšším vlnovým délkám. Naopak skupiny, které odčerpávají elektrony z molekuly (např.: -COOH, -COOR, -CHO, -CRO a -NO₂) účinnost fluorescence snižují (tab. 3) [21].

Tab. 3: Efekt substituentu na fluorescenci aromatických látek [21].

Substituent	Vliv na frekvenci	Vliv na intenzitu
Alkyl	Žádný	Lehce zvyšuje nebo zmenšuje
-OH, -OCH ₃ , -OC ₂ H ₅	Zmenšuje	Zvyšuje

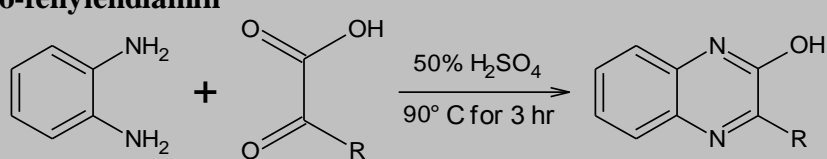
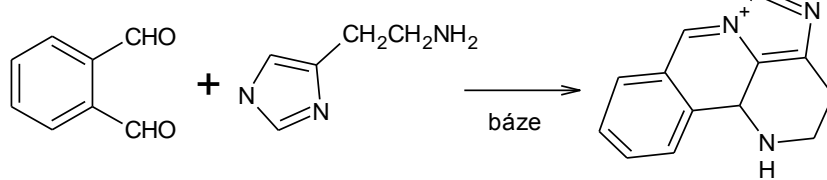
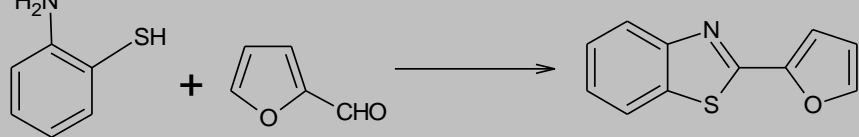
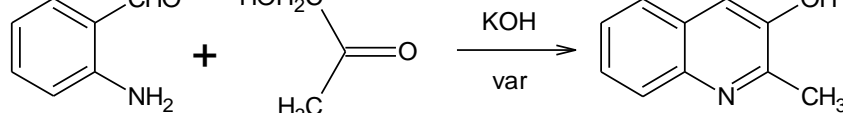
-COOH, -CHO, -CRO, -COOR	Zmenšuje	Silně zmenšuje
-NH₂, -NHR, -NR₂	Zmenšuje	Zvyšuje
-NO₂, -NO	Silně zmenšuje	Silně zmenšuje
-CN	Žádný	Zvyšuje
-SH	Zmenšuje	Zmenšuje
-Cl	Zmenšuje	Zmenšuje
-SO₃H	Žádný	Žádný

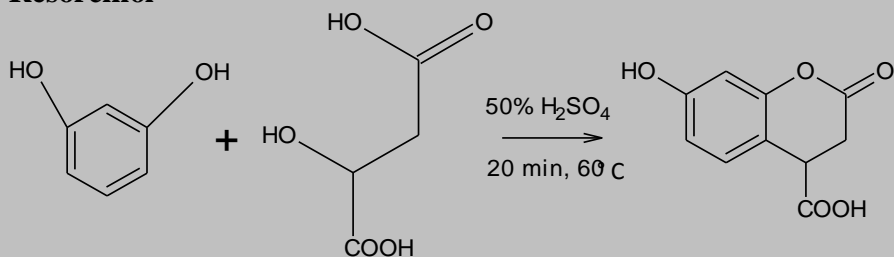
2.2.3 Derivatizační reakce

V této kapitole jsou uvedeny vybrané derivatizační reakce a jejich aplikace v praxi. Reakce jsou rozděleny podle efektu podporujícího luminiscenční vlastnosti vzorku.

2.2.3.1 Reakce vedoucí k prodloužení π -elektronového systému

Tab. 4: Derivatizační reakce vedoucí k prodloužení π -elektronového systému.

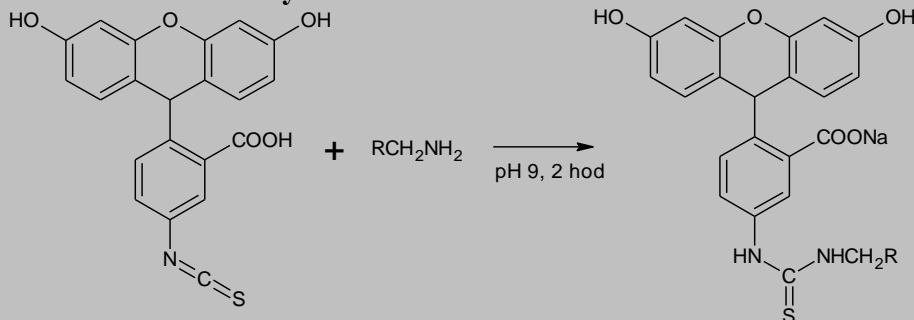
Typická reakce	Aplikace
<p>o-fenylendiamin</p> 	<p>α-ketokyseliny [22] Sacharidy [23] Imidazol [24] Alloxan [25] Tokoferol [26]</p>
<p>o-ftalaldehyd</p> 	<p>Histimin [27] Histidin [28] Polyaminy [29] Aminokyseliny [30] Indoly [31] Peptidy [32] Proteiny [33]</p>
<p>o-aminothiofenol</p> 	<p>Pentózy, hexózy [34] Aldehydy [35]</p>
<p>o-aminobenzaldehyd</p> 	<p>Sacharidy [36]</p>

Resorcinol

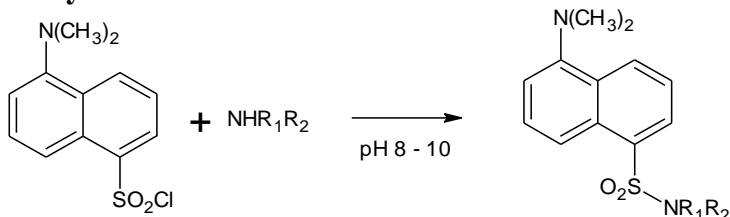
Ketohexózy [37]
 Sacharidy [38]
 β-ketokyseliny [39]
 Polykarboxylové kys. [40]
 Dikarboxylové kys. [41]

2.2.3.2 Modifikace molekuly substituentem

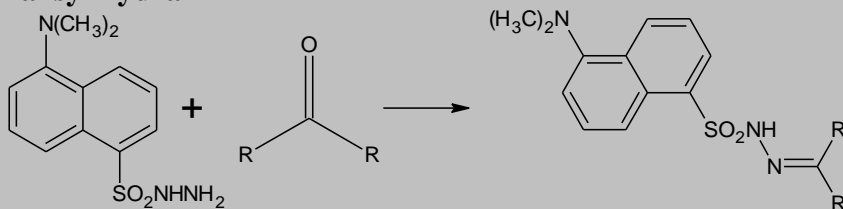
Tab. 5: Derivatizační reakce pomocí modifikace substituentem.

Typická reakce**Fluorescein isothiokyanát****Aplikace**

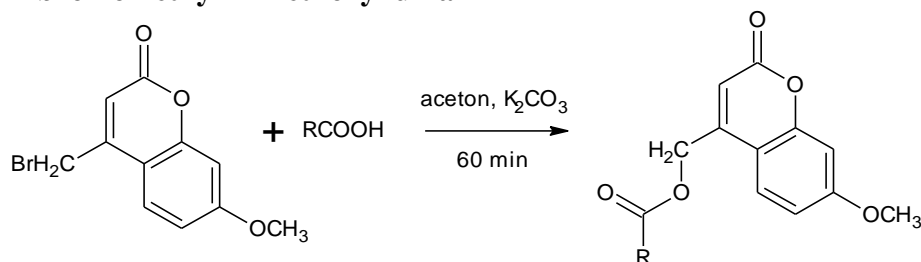
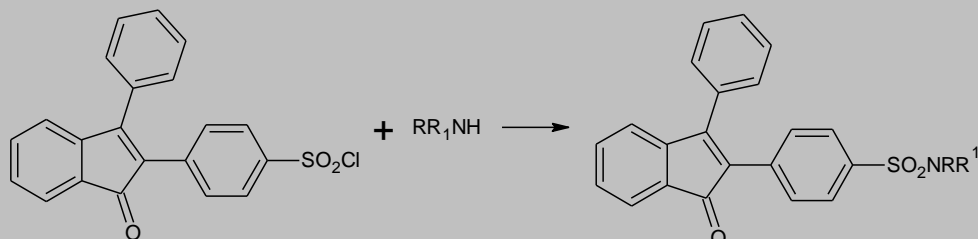
Aminokyseliny [42]

Dansyl chlorid**Aminokyseliny**

[43]
 Peptydy [44]
 proteiny [44]
 Aminy [45]
 Fenoly [44]
 Katecholy [44]
 Cukry [44]
 Hydroxybifenyl y [46]
 Pesticidy [47]
 Alkaloidy [48]

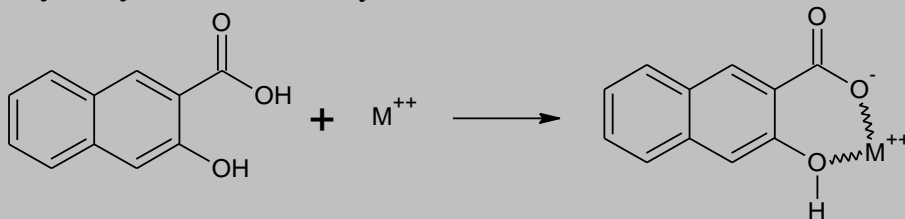
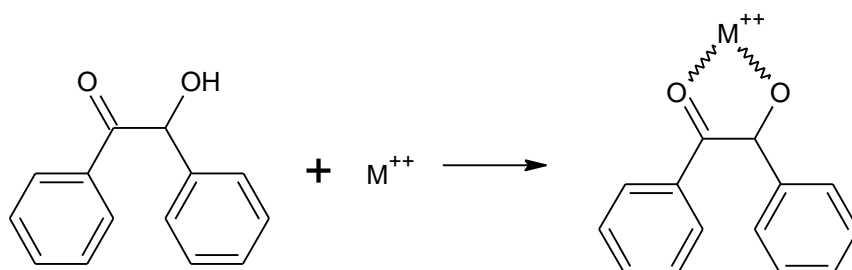
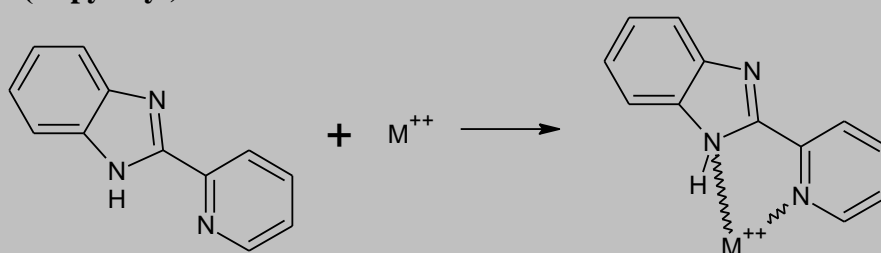
Dansyl hydrazin**Keto steroidy**

[49]
 Glykoproteiny [50]

4-bromomethyl-7-methoxykumarinMastné kyseliny
[51]**2-p-chlorosulfofenyl-3-fenyl indon**Aminy [52]
Aminokyseliny
[53]
Aminocukry
[54]
THC [55]**2.2.3.3 Derivatizace založená na tvorbě komplexu**

Tab.6: Derivatizační reakce pomocí tvorby komplexu.

Typická reakce	Aplikace
8-hydroxy chinolin 	Ag [56] Al [57] Mg, Ca [58] Cd, Zn, Sn, Sr, Ba [57] La [59] Zn [60] Cd, Mg, Al, Ga, In, Tl, Pb, Zn [61] Li, Na, Pb, Cs, Mg, Ca, Sr, Ba, Sc, Y [62] Zn, Cd, Al, Ga, In, Ge, Sn [62] Mg, Ca, Sr [63] Be [64]
2,2'-dihydroxy azobenzen 	Al, Ga, Se, Mg, In [65] Al, Ga, Sc, Y, La, Lu, Ln, Mg [66] Al, Ga, Se, In [67] Al, Ga, Th, In, Mg, Zn, Be [68]

3-hydroxy-2-naftalenová kyselinaAl, Be [69]
Al, Be, Sc, Ga, Zn
[70]**Benzoin**B [71]
Zn [72]**2-(2'-pyridyl) benzimidazol**

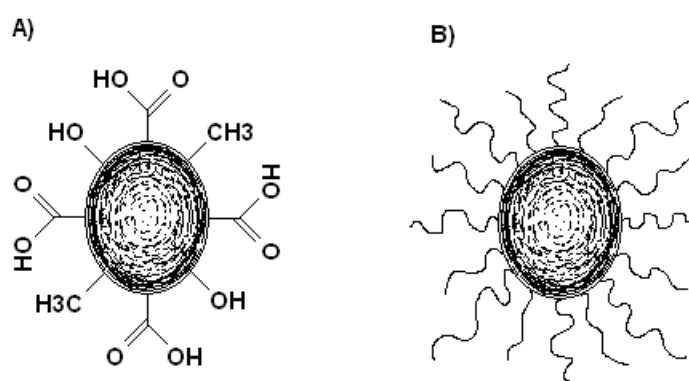
Ga, In, Zn [73]

2.3 Nanočástice

Nanočástice jsou mikroskopické částice s alespoň jedním rozměrem menším než 100 nm. V současnosti jsou oblastí intenzivního zkoumání vzhledem k široké škále možných aplikací v biochemických, optických a elektronických oborech. Nanočástice jsou středem vědeckého zájmu jelikož jejich vlastnosti jsou někde mezi syvkými materiály a atomovými či molekulovými strukturami. Syvké materiály by měly mít fyzikální vlastnosti nezávislé na jejich velikosti. V rozměrech nanometrů tomu bývá opačně. Vlastnosti materiálů se významně mění, jakmile se částice blíží k velikosti v nanometrech a procentuelní zastoupení atomů na povrchu částice se stává významným. Pro syvké materiály, o velikostech částic větších než jeden mikrometr, je procentuální zastoupení atomů na povrchu vzhledem k celkovému počtu atomů zanedbatelné [74].

2.4 Uhlíkové kvantové tečky

Uhlíkové nanotečky (C-dots) jsou fascinující novou třídou uhlíkových nanočástic s velikostí do 10 nm. Bývají označovány velikostí částic a excitační vlnovou délkou (λ_{ex}). C-dots přitahují pozornost jako nascentní kvantové tečky pro aplikace, kde je kritická velikost, cena a biokompatibilita nanočástic. Povrch těchto částic je často pokryt zbytky karboxylových kyselin, které jim dávají výbornou rozpustnost ve vodě a možnost funkcionalizace různými organickými, anorganickými a polymerními skupinami (Obr. 5). Jejich dobře definovaný povrch společně s ultramalými rozměry, možností funkcionalizace a množstvím jednoduchých, rychlých a levných syntéz, dělá z C-dots alternativu k jiným nanouhlíkovým částicím (fullereny, nanodiamanty, uhlíkové nanotrubičky). Největší potenciál ovšem mají jako náhrada za dnes používané, toxické, kovové kvantové tečky. Kvůli obavám o zdraví a známým environmentálním a biologickým rizikům kvantových teček jsou C-dots středem usilovného zkoumání, aby byla vyvinuta netoxická varianta a přitom měla požadované vlastnosti kvantových teček. Jako zajímavost lze uvést, že C-dots byly objeveny omylem při čištění jednovrstevných uhlíkových nanotrubiček připravených obloukovým výbojem. Při gelové elektroforéze se na chromatogramu objevila rychle se pohybující zóna vysoce luminiscenčního materiálu [75,76].



Obr. 5: Uhlíkové kvantové tečky A) po oxidaci povrchu B) po navázání pasivačních činidel.

2.4.1 Syntetické metody

Syntéza C-dots může být rozdělena do dvou hlavních skupin a to top-down a bottom-up. Top-down metody jsou obloukový výboj [76], laserová ablace [77,78] a elektrochemická oxidace [79]. Nanočástice jsou formovány narušováním většího celku. Bottom-up metody jsou například spalovací/termální [80], syntetické [81] nebo mikrovlnné [82]. Nanočástice jsou formovány z molekulových prekurzorů. Jejich povrch je oxidován kyselinou dusičnou a dále jsou přečišťovány centrifugací, dialýzou, elektroforézou nebo jinými separačními technikami [75].

2.4.1.1 Metody obloukového výboje

Při čištění jedностěnných uhlíkových nanotrubiček připravených obloukovým výbojem byl izolován neznámý fluorescenční uhlíkový nanomateriál [76]. Nanomateriál byl oxidován HNO_3 o koncentraci 3,3 mol/l, aby na povrch vnesly karboxylové funkční skupiny, které zlepšují hydrofilní charakter materiálu. Sediment byl poté extrahován roztokem NaOH (pH 8,4). Výsledkem byla stabilní černá suspenze. Tato suspenze byla separována pomocí gelové elektroforézy na jedностěnné uhlíkové nanotrubičky, krátké válcovité uhlíky a C-dots. Tyto C-dots byly separovány do tří elektroforetických zón, které po excitaci elektromagnetickým zářením (366 nm) emitovaly zelenomodré, žluté a oranžové záření v závislosti na jejich velikosti a molekulové hmotnosti. FTIR analýza zjistila přítomnost karboxylových funkčních skupin a hlavně zamítla přítomnost C-H vazeb polyaromatických uhlovodíků, takže fotoluminiscenční záření není způsobeno tímto zdrojem. Elementární analýza C-dots zjistila přítomnost 53,9% C, 2,6% H, 1,2% N a 40,3% O [75].

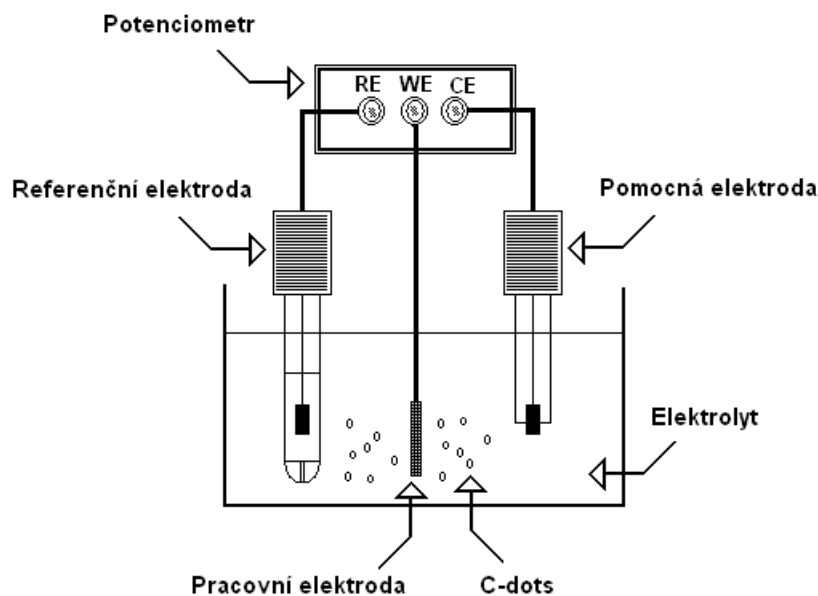
2.4.1.2 Metody laserové ablace

V současnosti jsou C-dots produkovány také laserovou ablací [77,78]. Z uhlíkového prášku a tmelu byly za vysoké teploty a tlaku připraveny větší uhlíkové částice. Tyto částice byly sušeny a žíhány pod proudem argonu [77]. K ablaci uhlíkových částic v proudu argonu nesoucím vodní páru (900°C, 75 kPa) byl použit Nd:YAG laser (1064 nm, 10Hz). Vzorek v HNO_3 o koncentraci 2,6 mol/l byl 12 hodin zahříván pod zpětným chladičem. Výsledkem

byly C-dots o velikosti 3-10 nm. Tyto nanočástice měly povrch pasivovaný polymery jako je diaminem zakončený polyethylenglykol (PEG_{1500N}) nebo poly(propionylethylenimin-co-ethylenimin) (PPEI-EI) [78] a následně byly přečištěny dialýzou a centrifugací [75].

2.4.1.3 Metody elektrochemické syntézy

Elektrochemická syntéza C-dots byla poprvé demonstrována při přípravě vícestěnných uhlíkových nanotrubiček tvořených ze srolovaných grafenových vrstev na uhlíkovém papíře pomocí chemické depozice v plynné fázi. Tyto nanotrubičky byly navrženy jako pracovní elektroda v elektrochemické cele s platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou a Ag/AgClO₄ jako referenční elektroda v odplyněném roztoku acetonitrilu obsahujícím tetrabutylammonium perchlorát o koncentraci 0,1 mol/l jako elektrolyt (Obr. 6). Potenciál se měnil od -2,0 V do +2,0 V a snímací rychlost byla 0,5 Vs⁻¹. Výsledkem byl roztok měnící svou barvu od bezbarvé ke žluté až k tmavě hnědé, což indikovalo odlupování C-dots z nanotrubiček a jejich hromadění v roztoku. Nanočástice byly získány z roztoku odpařením acetonitrilu a zbylá pevná fáze byla rozpuštěna ve vodě a přečištěna dialýzou. Produkované C-dots byly sférické s průměrem částic (2,8±0,5) nm a poskytovaly na excitačním záření závislou fotoluminiscenci [75,79].



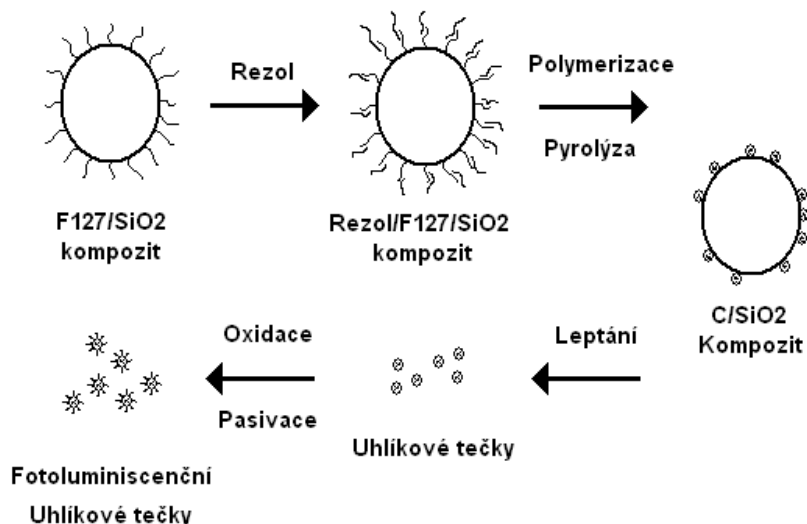
Obr. 6: Schéma zapojení elektrochemické cely.

2.4.1.4 Metody spalovací a termální

Dalším elegantním a snadným způsobem získávání C-dots je spalování svíček nebo zemního plynu [80]. Prvními, kdo zkusili tento zajímavý způsob přípravy, byli Mao a kol., kteří umístili hliníkovou folii nebo skleněnou desku nad hořící svíčku a shromažďovali na ní vznikající saze. Oxidace povrchu částic bylo docíleno smícháním sazí s kyselinou dusičnou o koncentraci 5 nmol/l a tato směs byla následně vařena pod zpětným chladičem po dobu 12 hodin. Po ochlazení byly vytvořené uhlíkové nanočástice (<2 nm) separovány pomocí centrifugy nebo dialýzy a frakcionovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (PAGE). Elektroforetické mobility C-dots byly korelovány s barvou emise. Rychleji se pohybující C-dots emitovali kratší vlnové délky. Použití mikroskopie atomárních sil ukázalo, že vytvořené nanočástice mají velikost zhruba 1 nm. ^{13}C NMR zjistila tři typy uhlíkových signálů: externí C=C, interní C=C, C=O vazby. Nebyla zjištěna sp^3 hybridizace uhlíku. Elementární analýza přečištěných C-dots (36,8% C, 5,9% H, 9,6% N, 44,7% O) byla velmi odlišná od elementární analýzy sazí svíčky (91,7% C, 1,8% H, 1,8% N, 4,4% O) [75,80].

2.4.1.5 Metody využívající podpůrnou látku

Další metoda bottom-up syntézy zahrnuje využití nějaké podpůrné látky ke vzniku uhlíkových kvantových teček. Při tomto postupu slouží podpůrná látka k blokování aglomerace nanočástic při syntéze za vysoké teploty. Jedním ze způsobů přípravy je využití povrchově modifikovaných křemenných částic [81]. Kompozit byl připraven modifikací křemenných částic F127 (amfifilní triblokový kopolymer) (Obr. 7). Uhlíkový prekurzor rezol (fenolformaldehydová pryskyřice) byl připojen k tomuto F127/SiO₂ kompozitu a následně polymerován. Použití F127 jako povrchové fáze bylo klíčové, kvůli adsorpce rezolu přes vodíkové vazby. Díky tomu probíhala polymerace na povrchu křemíkových částic více než v roztoku. Následným ohříváním kompozitu při 900 °C v argonu po dobu 2 hodin vznikl kompozit C-dots/SiO₂. Křemenné částice byly odstraněny leptáním roztokem NaOH o koncentraci 2 mol/l. Tímto způsobem přípravy vzniknou amorfní (sp² i sp³ hybridizace uhlíku) uhlíkové kvantové tečky o velikosti 1,5 - 2,5 nm a složení 90,3% C, 1,4% H a 8,3% O (wt %). Povrch nanočástic byl modifikován karboxylovými skupinami a následně pasivován PEG_{1500N}. C-dots emitovaly záření závislé na záření excitačním s maximy od 400 do 580 nm [75,81].



Obr. 7: Schéma vzniku uhlíkových kvantových teček za pomoci podpůrné látky.

2.4.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

2.4.2.1 Krystalová struktura a hybridizace

Experimenty na transmisním elektronovém mikroskopu odhalily u C-dots, připravených laserovou ablací, diamantu podobnou strukturu [83]. Tato struktura byla pozorována jak u nanočástic připravených pomocí PEG_{200N} jako pasivujícího ligandu, tak u syntézy ve vodě, kde jsou na povrchu částic methylové skupiny. Zjištěné mřížkové vzdálenosti se pohybovali od 0,2 do 0,23 nm. Podobné mřížkové vzdálenosti (0,208 nm) byly zjištěny u uhlíkových kvantových teček připravených ze sazí svíčky [84]. K rozhodnutí zda se jedná o sp³ (diamant) nebo sp² (grafit) hybridizaci uhlíku sloužila ¹³C NMR. NMR experiment zjistil přítomnost uhlíku s hybridizací sp² ($\delta = 90-180$ ppm) a absenci uhlíku s hybridizací sp³ ($\delta = 8-80$ ppm). Navíc měření FTIR také potvrdila přítomnost C=C vazeb aromatických kruhů. Na základě těchto údajů se usoudilo, že tyto C-dots mají nanokrystalové jádro složené z grafitického uhlíku s hybridizací sp² a na povrchu mají karboxylové a karbonylové skupiny [75].

2.4.2.2 Optické vlastnosti

Uhlíkové kvantové tečky typicky silně absorbují záření v UV oblasti a méně v oblasti viditelného záření. C-dots připravené pomocí jedнокrokové laserové ablace mají hranici excitace ve 280 nm (4,4 eV) [83]. V případě C-dots (2,8±0,5 nm) připravených elektrochemickou oxidací je maximum absorpčního pásu ve 270 nm s šířkou pásu v polovině maxima (FWHM) 50 nm [79]. Podobně je tomu u nanočástic připravených pomocí mikrovln s maximem absorpce ve 280nm a FWHM 50 nm [82]. Po povrchové pasivaci 4,7,10-trioxa-1,13-tridekandiaminem (TTDDA) se maxima absorpce posouvají do oblasti 350-550 nm [85]. Jedním ze zásadních rysů uhlíkových kvantových teček je jejich fotoluminiscence, která je v současné době předmětem výzkumu. Tato fotoluminiscence je u C-dots závislá na vlnové délce a intenzitě elektromagnetického záření. Jestli je to způsobeno různou velikostí částic (kvantový efekt), povrchem C-dots nebo jiným mechanismem je dosud nevyřešeno [75].

2.4.2.3 Cytotoxicita

Toxicita uhlíkových kvantových teček je samozřejmě intenzivně studována kvůli jejich potenciálu jako kontrastní látky v zobrazovacích technikách. V této době se toxicitou C-dots zabývá několik výzkumných skupin a výsledky zatím ukazují na nízkou toxicitu [84,86]. Ray a kolektiv testovali životaschopnost jaterních buněk (HepG2 cells). Tyto buňky byly vystaveny účinkům C-dots připravených ze sazí svíčky o velikosti 2-6 nm a koncentraci 0,1-1 mg/ml po dobu 24 hodin. Při koncentraci nanočástic do 0,5 mg/ml přežilo 90-100% buněk a při koncentraci nad 0,5 mg/ml byla míra přežití asi 75%. Nejvyšší testovaná hodnota koncentrace byla 100-1000 krát větší než koncentrace nutná pro zobrazovací techniky, proto se C-dots z hlediska toxicity jeví jako vhodná kontrastní látka [84,75].

2.4.3 Aplikace uhlíkových kvantových teček

2.4.3.1 Zobrazovací techniky

Kvantové tečky o složení CdSe a jiné byly použity v mnoha různých *in vitro* a *in vivo* optických zobrazovacích experimentech. Základní složkou kvantových teček jsou těžké kovy, proto mohou způsobovat vážné zdravotní problémy a jsou nežádoucí v životním prostředí [87]. Výborné optické vlastnosti a nízká toxicita dělají z C-dots vhodnou alternativu za kvantové tečky pro zobrazovací techniky. Jedna z prvních aplikací C-dots v zobrazovacích technikách byla testována na buňkách rakoviny prsu (MCF-7). Nanočástice byly s buňkami inkubovány po dobu 2 hodin při 37 °C a C-dots mimo buňky byly následně vymyty. Byl použit fluorescenční mikroskop a po excitaci laserovými pulsy (800 nm) nanočástice poskytovali fotoluminiscenci jak v oblasti buňčné membrány tak v cytoplazmě. Schopnost buněk pojmout C-dots byla závislá na teplotě [75,88].

2.4.3.2 Fotoredukce kovů

Fotoexcitované uhlíkové kvantové tečky mohou být donorem elektronů, proto mají potenciál při redukčních reakcích. Demonstrována byla fotoredukce stříbrných iontů na

elementární stříbro. Vodný roztok C-dots připravených laserovou ablací a AgNO_3 byl ozářen elektromagnetickým zářením o vlnové délce 450 nebo 600 nm (xenonová výbojka) [89].

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je charakterizovat uhlíkové kvantové tečky v roztocích různých elektrolytů a u těchto elektrolytů testovat vliv přídavku aditiv, a dále zjistit vliv teploty na chování uhlíkových kvantových teček a analyzovat tyto nanočástice pomocí metody kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie s detekcí pomocí UV detektoru a LIF detektoru.

4 Experimentální část

4.1 Experimentální podmínky

Všechny experimenty byly prováděny na přístroji kapilární elektroforézy Agilent HP 3D-CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s detektorem diodového pole a externím detektorem pro laserem indukovanou fluorescenci (Picometrics, Toulouse, Francie) s argonovým laserem produkujícím elektromagnetické záření o vlnové délce 488 nm a výkonu 25 mW. Pro analýzu byla použita křemenná kapilára potažená polyimidovou vrstvou o vnitřním průměru 50 μm s efektivní délkou 35 (60) cm a celkovou délkou 50 (75) cm. Před začátkem experimentu byla kapilára promývána 20 minut hydroxydem sodným (1 mol/l), 10 minut vodou a 10 minut základním elektrolytem. Pro nástřik vzorku bylo použito hydrodynamického dávkování (50 mbar/5 s).

Pro přípravu základních elektrolytů byly použity kyselina fosforečná, kyselina octová, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES), 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS), kyselina boritá, dodecylsulfát sodný (SDS), didodecyldimethylammonium bromid (DDAB), chlorid sodný, hydroxid sodný od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a methanol od společnosti Penta (Praha, ČR). Roztoky uhlíkových kvantových teček C_{WS} hydrofilní a C_{SALT} byly pro experimenty poskytnuty Prof. Zbořilem (Centrum nanomateriálového výzkumu PŘF UP Olomouc) a připraveny dle publikací Bourlinose a kol. [90,91]. Roztok kvantových teček CdSe/ZnS v toluenu Lumidot™ byl zakoupen u společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Roztoky kvantových teček byly uchovávány při 15 °C. Použité chemikálie byly analytické třídy (p.a.). Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda 18 M Ω (DirectQ-UV, Millipore, Billerica, USA).

Elektrolyty byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství příslušné kyseliny v deionizované vodě a roztok byl titrován zásadou (50 % roztokem NaOH) na dané pH. V případě použití aditiv (SDS) byla daná látka přidána k elektrolytu po adjustaci pH. Výsledný roztok byl ultrazvukován po dobu 10 minut. Elektrolyty složené z tzv. biologických složek pufrů (MES, MOPS) byly uchovávány při 4 °C, nejdéle však 7 dnů.

4.2 Výsledky

Pro studium chování uhlíkových kvantových teček v roztocích elektrolytů byla vybrána kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí. Pracovalo se metodou kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie, které jsou nejčastějšími metodami pro charakterizaci nanočástic. V experimentální části se zabývám volbou vhodného elektrolytu s případnými aditivy, analýzou nanočástic v borátovém pufru, analýzou nanočástic v MOPS/NaOH pufru s kapilárou pokrytou DDAB a analýzou se simultánní detekcí UV a LIF.

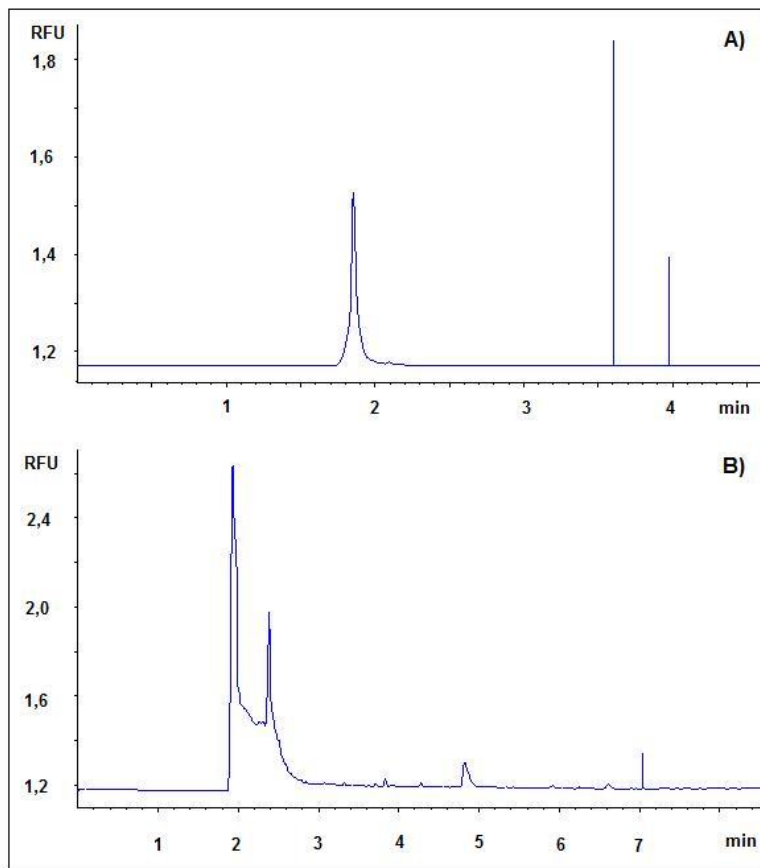
4.2.1 Volba vhodného elektrolytu

Pro studium C-dots a CdSe/ZnS kvantových teček byly pro pilotní testování vybrány základní pracovní elektrolyty, které se používají pro analýzu nanočástic pomocí kapilární elektroforézy [92,93]. Byly testovány následující elektrolyty: borátový pufr (35 mmol/l, pH 9,5), acetátový pufr (150 mmol/l, pH 4,0), fosfátový pufr (35 mmol/l, pH 2,5) a MOPS pufr (35 mmol/l, pH 7,5), všechny titrované NaOH na dané pH. Při analýze v těchto elektrolytech docházelo k interakci nanočástic se stěnou kapiláry a následnému ucpání kapiláry. Aby došlo k zamezení těchto nežádoucích efektů, bylo by nutné k základnímu roztoku elektrolytu přidat aditiva (např. SDS) nebo kovalentně nebo dynamicky pokrýt kapiláru (např. pomocí DDAB). V tomto případě bylo zvoleno dle literatury nejčastěji používané aditivum SDS a dynamické pokrytí pomocí DDAB v případě MOPS pufru. Jako základního elektrolytu k testování chování nanočástic bylo použito borátového pufru (35 mmol/l, pH 9,5) s SDS (50 mmol/l), acetátového pufru (150 mmol/l, pH 4,0) s SDS (50 mmol/l), fosfátového pufru (35 mmol/l, pH 2,5) s SDS (50 mmol/l) a MOPS/NaOH pufru (35 mmol/l, pH 7,5) s kapilárou pokrytou DDAB; všechny elektrolyty byly titrované NaOH na dané pH. Testování těchto elektrolytů probíhalo na uhlíkových kvantových tečkách (C-dots) C_{WS} , C_{SALT} a na kvantových tečkách CdSe/ZnS (LumidotTM). Ve všech případech bylo studium zaměřeno především na koncentrované roztoky kvantových teček, kde je sice možná vzájemná interakce částic (a tím znemožněna charakterizace povrchové hustoty náboje nanočástic), ale toto studium poskytuje více informací ohledně celkového obrazu chování nanočástic (např. pro účely popisu chování nanočástic v medicíně).

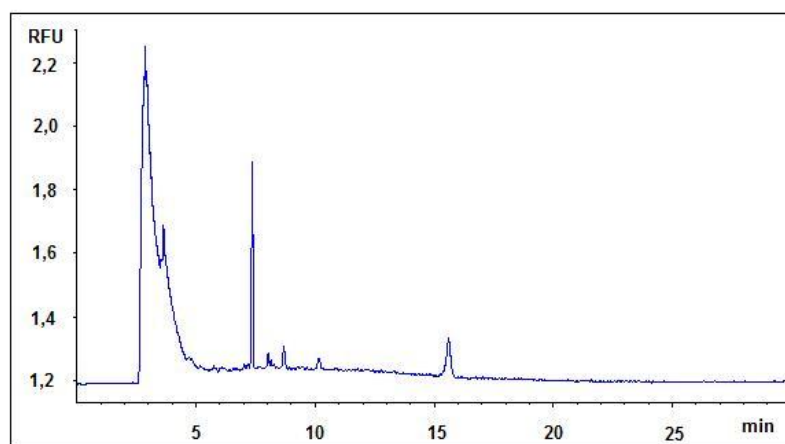
Na obr. 8 a 9 jsou elektroforegramy C-dots v acetátovém pufru s SDS a fosfátovém pufru s SDS. Migraci C-dots odpovídají píky v 1,7 – 2,0 minutě (Obr. 8A), 1,9 – 2,9 minutě (Obr. 8B) a 2,5 – 4,8 minutě (Obr. 9). Na obrázcích se ještě vyskytují „spajky“, které jsou neopakovatelné a mohou odpovídat klastrům nanočástic a další píky, které mohou odpovídat prostředí C-dots (C-dots jsou přečištěné, ale lze předpokládat zbytky látek ze syntézy). Rozdvojení píku na Obr. 8B lze přičítat dvěma a více populacím C_{WS} ve vzorku, které se mohou takto projevit, resp. vytvořením několika koloidních struktur těchto nanočástic v daném pufru. Podobné záznamy vytváří obecně všechny koloidní struktury, jako jsou např. mikroorganismy, nanočástice nebo huminové koloidní látky [94]. Šířka píku je v případě nanočástic poměrně velká, např. pro C_{WS} ve fosfátovém pufru odpovídá šířka přibližně 2,3 minutám, což představuje rozdíl v mobilitách asi $22 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Šířka píku (vyjádřená jako σ) ale vypovídá nejen o disperzi způsobené elektroforézou (σ_{elfo}), ale zároveň odráží disperzi vlastních částic v daném systému (σ_{nano}):

$$\sigma = \sigma_{\text{elfo}} + \sigma_{\text{nano}}$$

Disperzi nanočástic lze pak z elektroforegramu vypočítat v případě předpokladu ideálního chování nanočástic. V našem případě disperze počítána nebyla, protože jsme pracovali s koncentrovanými roztoky kvantových teček, kde je možné předpokládat, že dochází k vzájemnému ovlivňování částic.



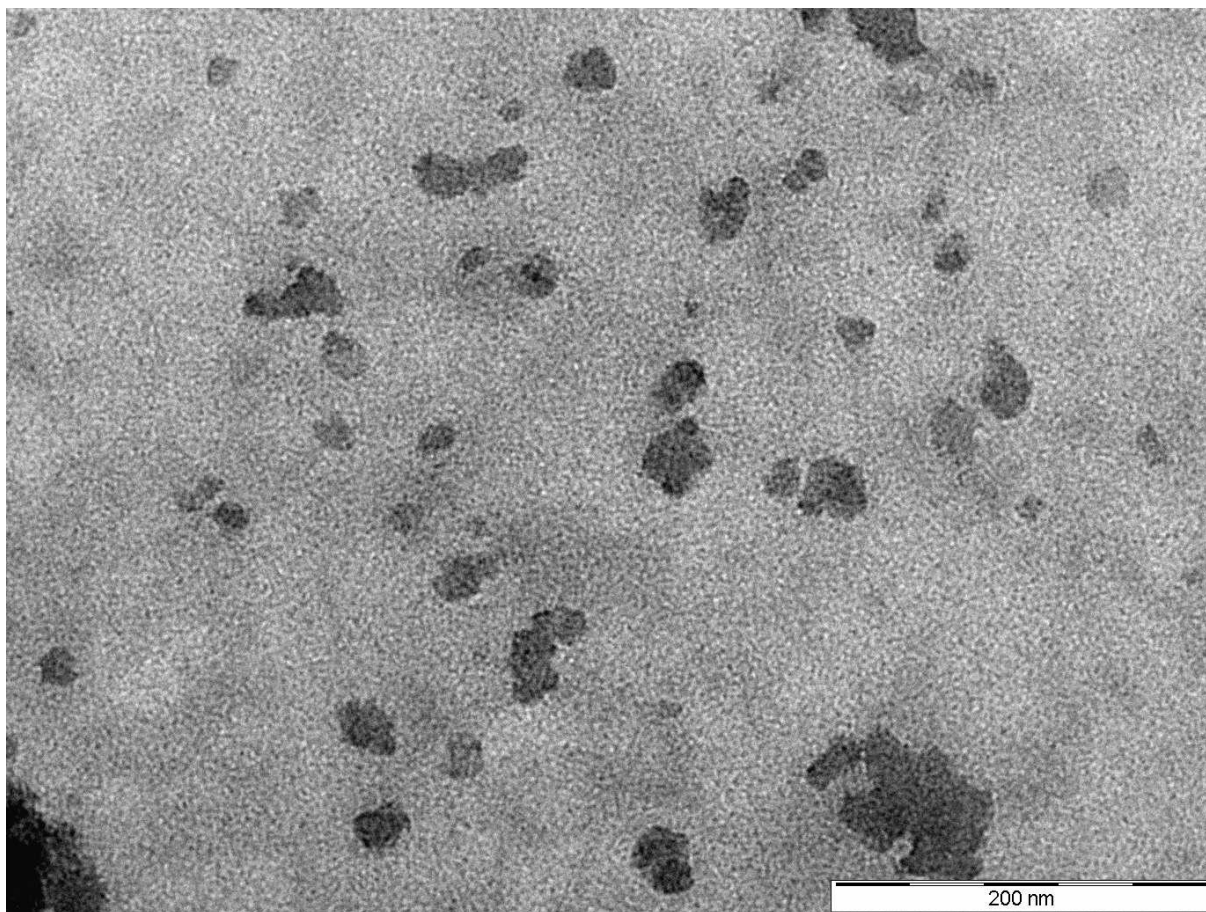
Obr. 8: Elektroforegramy uhlíkových kvantových teček v acetátovém pufru (150 mmol/l, pH=4,0) s SDS (50 mmol/l v BGE), -30 kV A) C_{SALT} B) C_{WS}



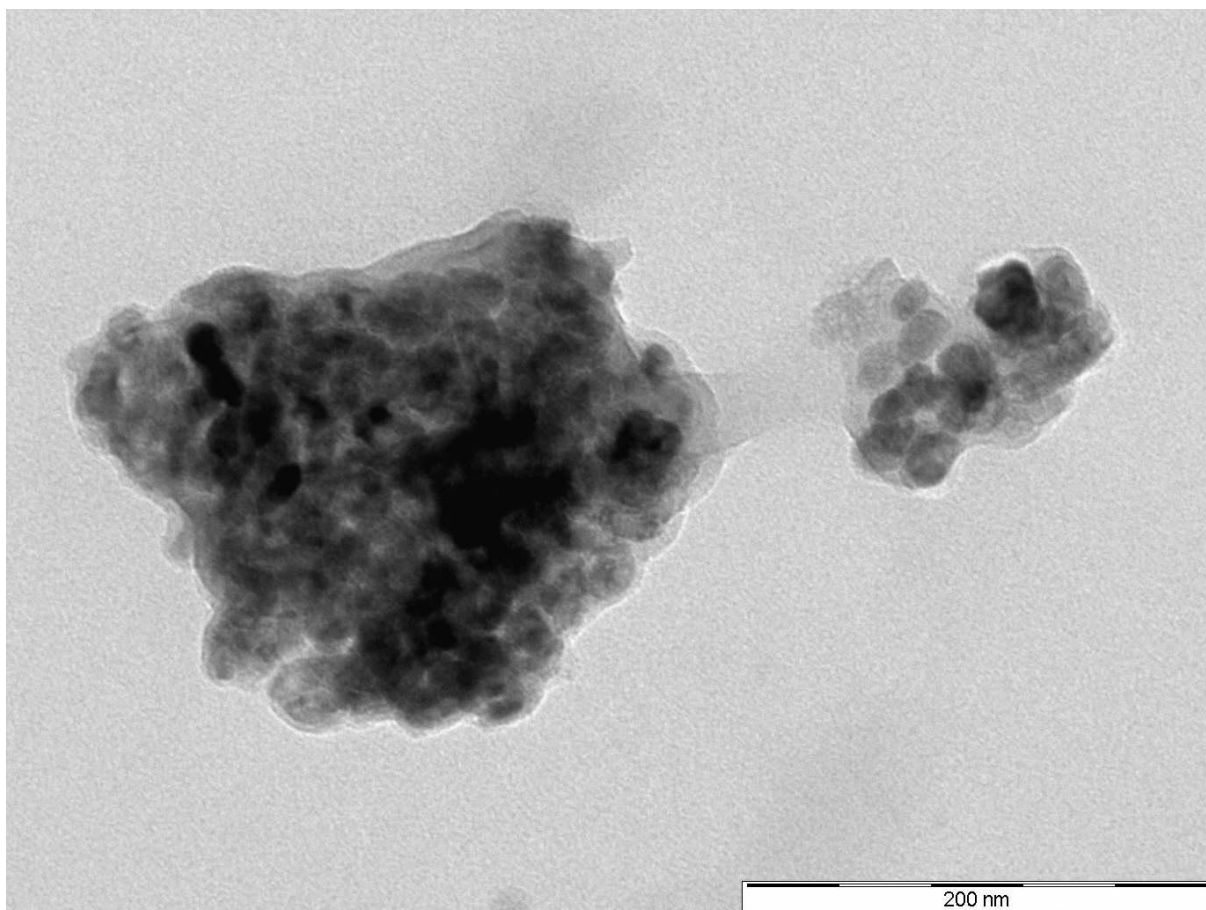
Obr. 9: Elektroforegram C_{WS} ve fosfátovém pufru (35 mmol, pH=2,5) s SDS (50mmol/l v BGE), -30 kV

V borátovém elektrolytu s SDS byla migrace kvantových teček nejopakovatelnější a zároveň analýzy CdSe/ZnS kvantových teček poskytovaly podobné výsledky jako již provedené studie [92,93]. Z tohoto důvodu byl borátový pufr použit pro další měření. Zároveň MOPS elektrolyt vykazoval nejvíce opakovatelné analýzy s použitím C_{WS} , zatímco C_{SALT} vytvářely v tomto prostředí agregáty. Pro další analýzy byly již testovány pouze C-dots, protože kvantové tečky LumidotTM byly dobře popsány v předchozích studiích [92,93].

Kvantové tečky C_{WS} a C_{SALT} byly pro lepší představu o jejich struktuře charakterizovány zároveň i pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) na pracovišti Centra nanomateriálového výzkumu. Z obrázků (obr. 10 a 11) je vidět, že C_{SALT} jsou částice o rozměru přibližně 10 nm a C_{WS} jsou částice o rozměrech přibližně 20 nm.



Obr. 10: Obrázek C_{SALT} z TEM (Centrum nanomateriálového výzkumu).



Obr. 11: Obrázek C_{WS} z TEM (Centrum nanomateriálového výzkumu).

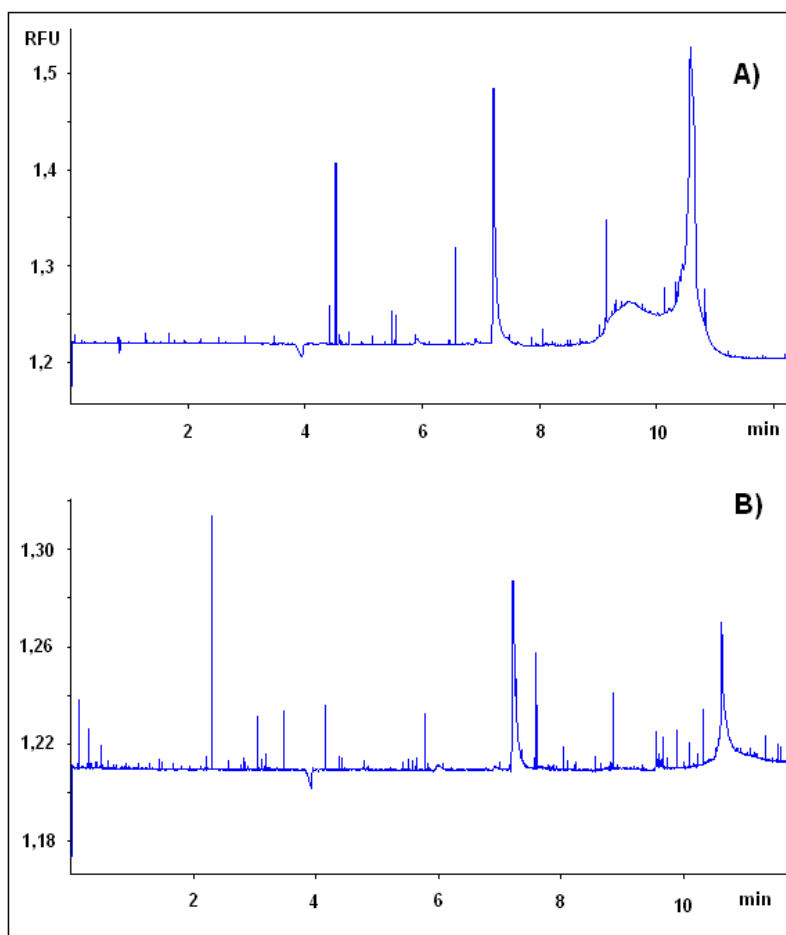
4.2.2 Analýza C-dots v borátovém pufru

Experimenty byly prováděny v borátovém pufru o koncentraci 35 mmol/l, vytitrovaném na pH 9,5. Do tohoto pufru byl přidán SDS o koncentraci 50 mmol/l. Roztok základního elektrolytu byl před analýzou ponechán v ultrazvukové lázni při 40 °C po dobu 10 minut. Napětí na elektrodách bylo nastaveno na +30 kV. Uhlíkové kvantové tečky C_{WS} a C_{SALT} byly dávkovány hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Kapilára o délce 60/75 (35/50) cm a vnitřním průměru 50 μm byla mezi analýzami promývána 3 minuty základním elektrolytem.

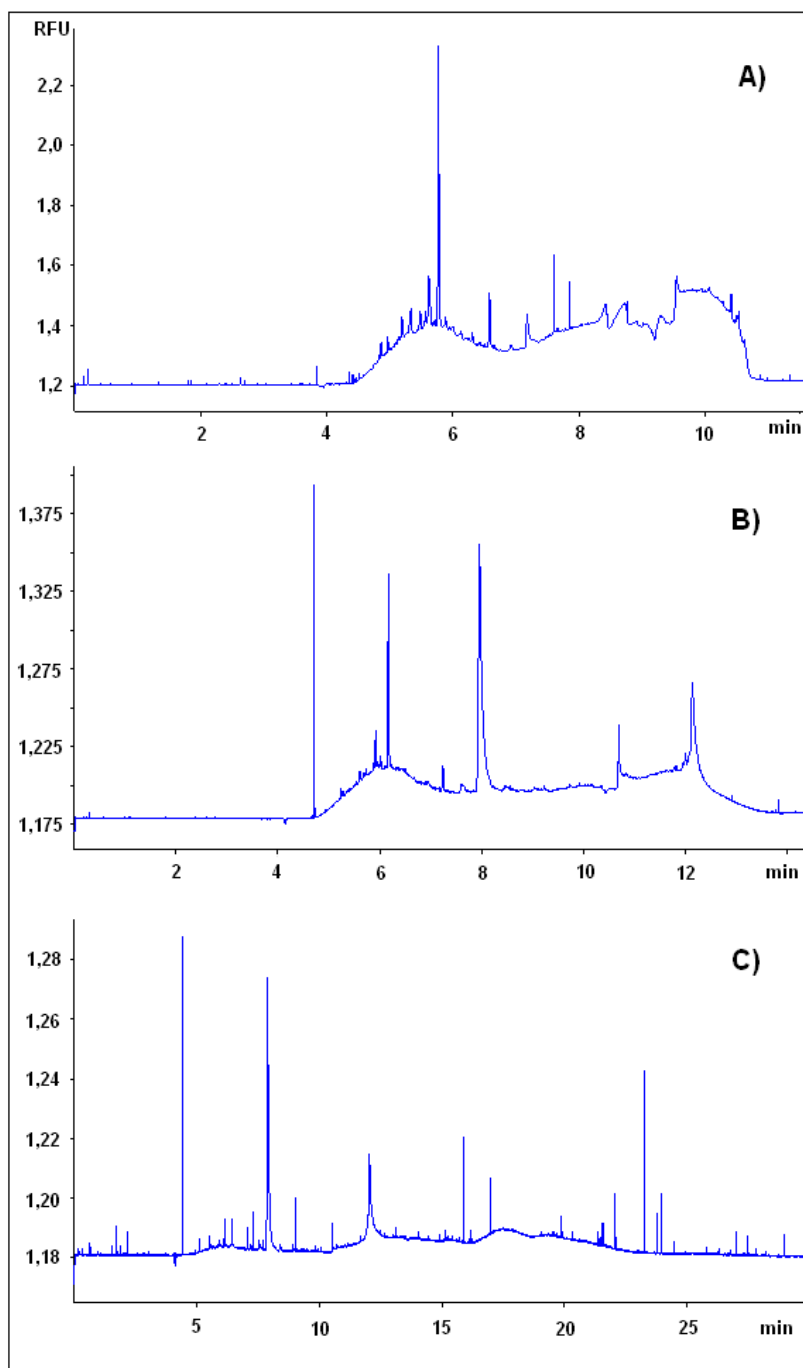
4.2.2.1 Vliv ředění C-dots

Zásobní roztoky uhlíkových kvantových teček C_{SALT} a C_{WS} byly ředěny základním elektrolytem a byly pozorovány změny v elektrochromatogramu. Ředěním roztoků C-dots dochází ke zmenšování interakcí mezi nanočásticemi a tím ke snižování energetické náročnosti, která vede k agregaci částic do větších celků. Tato agregace se projevuje snižující se intenzitou signálu nanočástic, změnou tvaru píku nanočástic a tvorbou „spiků“ agregátů.

Na obr. 12 a 13 je vidět vliv ředění C-dots. V případě C_{SALT} dochází k tvorbě více agregátů („spiky“ na Obr. 16B) a změně struktury píku mezi 8,5 – 11,0 min. Předpokládáme-li, že tento pík obsahuje dvě koloidní struktury (pík 8,5 – 10,5 min a pík 10,5 – 11 min), tak ředěním dochází k potlačení efektu první struktury na výsledný elektroforegram. V případě C_{WS} (Obr. 13) je rovněž patrná značná restrukturalizace píku nanočástic (4,5 – 11 min v případě Obr. 13A) se snižující se koncentrací nanočástic.



Obr. 12: Elektroforegramy C_{SALT} A) původní roztok C_{SALT} B) 100x zředěný roztok C_{SALT} , pík mezi 7 a 8 min nebyl identifikován, pravděpodobně jde o nečistotu ze vzorku.

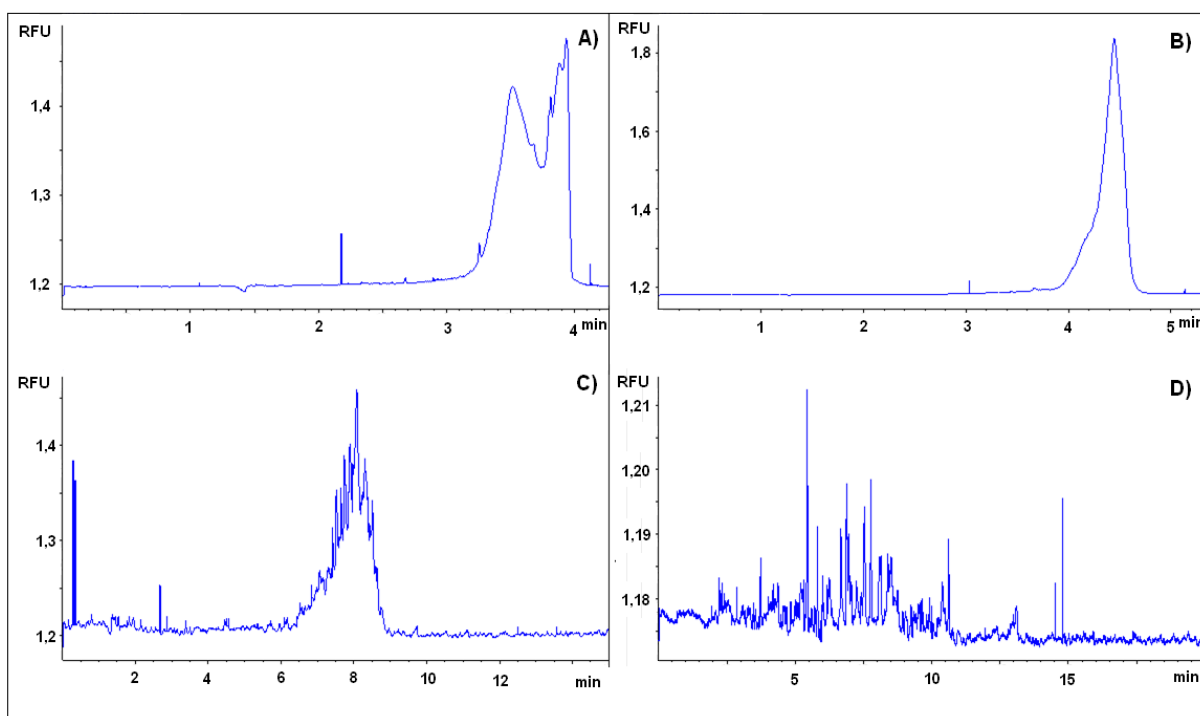


Obr. 13: Elektroforegramy C_{WS} A) původní roztok C_{WS} B) 10x zředěný roztok C_{WS} C) 100x zředěný roztok C_{WS} .

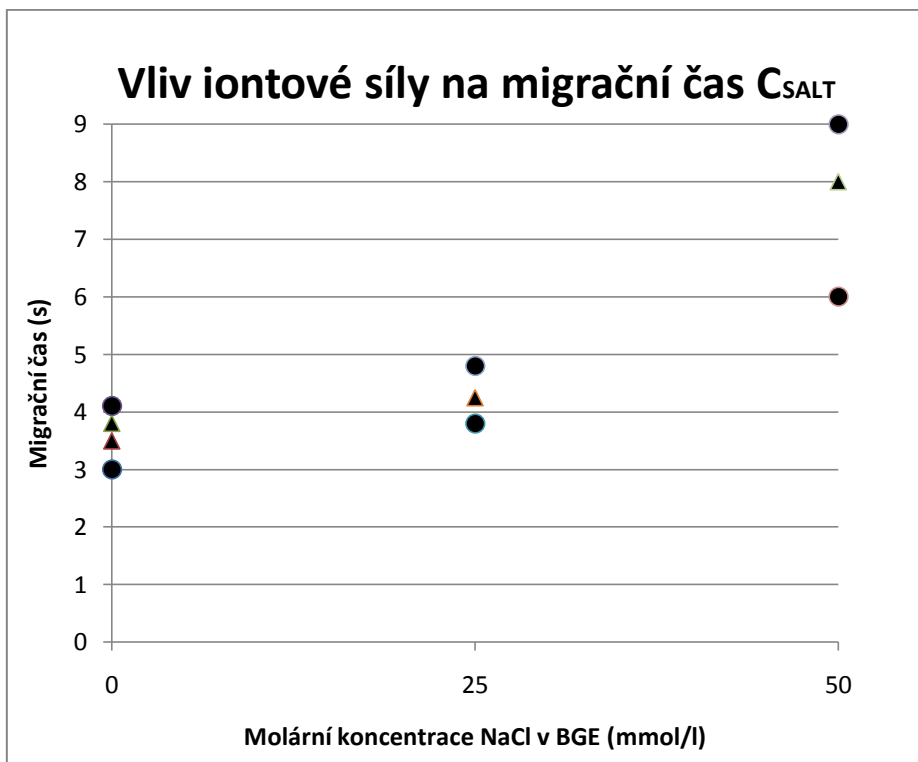
Obecně je možné konstatovat, že ředěním C-dots elektrolytem bez SDS dochází ke změně iontové atmosféry nanočástic, tím ke změně hustoty jejich povrchového náboje a tím ke změnám v koloidní struktuře částic (což vede ke změnám v tvaru píků a agregaci).

4.2.2.2 Vliv iontové síly

Změna iontové síly byla studována na různých přídavicích NaCl do roztoku základního elektrolytu obsahujícím borát (35 mmol/l) vytitrovaný na pH 9,5 a 50 mmol/l SDS. Tento elektrolyt má vlastní iontovou sílu 75 mmol/l. V případě C_{SALT} docházelo po zvýšení iontové síly, které odpovídalo koncentraci 25 mmol/l NaCl v základním elektrolytu, k tvorbě jedné populace částic. Při koncentraci 50 mmol/l NaCl v základním elektrolytu byla patrná destabilizace nanočástic a při koncentraci 75 mmol/l NaCl v základním elektrolytu vznikaly agregáty (Obr. 14). Grafické vyjádření migračního času v závislosti na zvyšující se iontové síle (koncentraci NaCl) je uvedeno na Obr. 15.

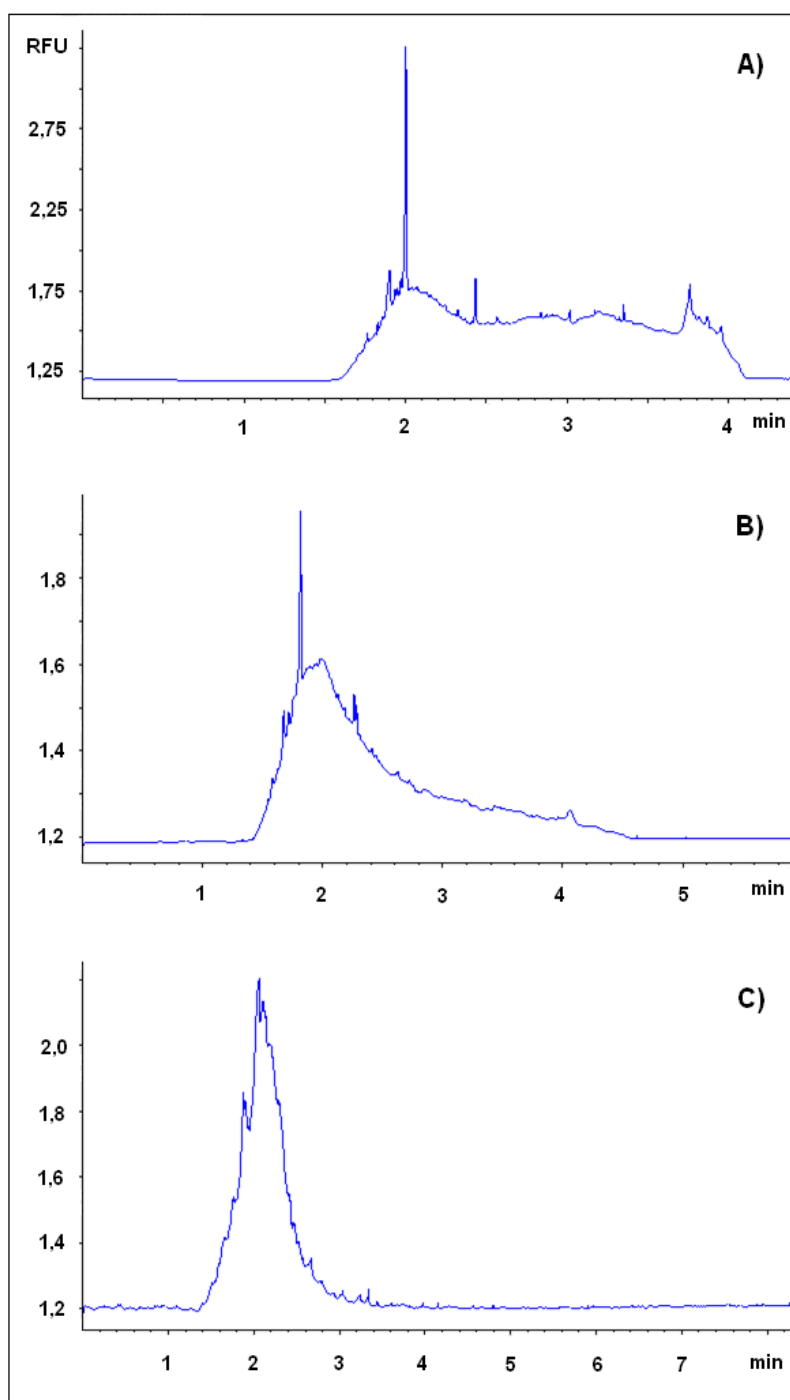


Obr. 14: Elektroforegramy C_{SALT} při změně koncentrace NaCl v základním elektrolytu A) 0 mmol/l NaCl B) 25 mmol/l NaCl C) 50 mmol/l NaCl D) 75 mmol/l NaCl.

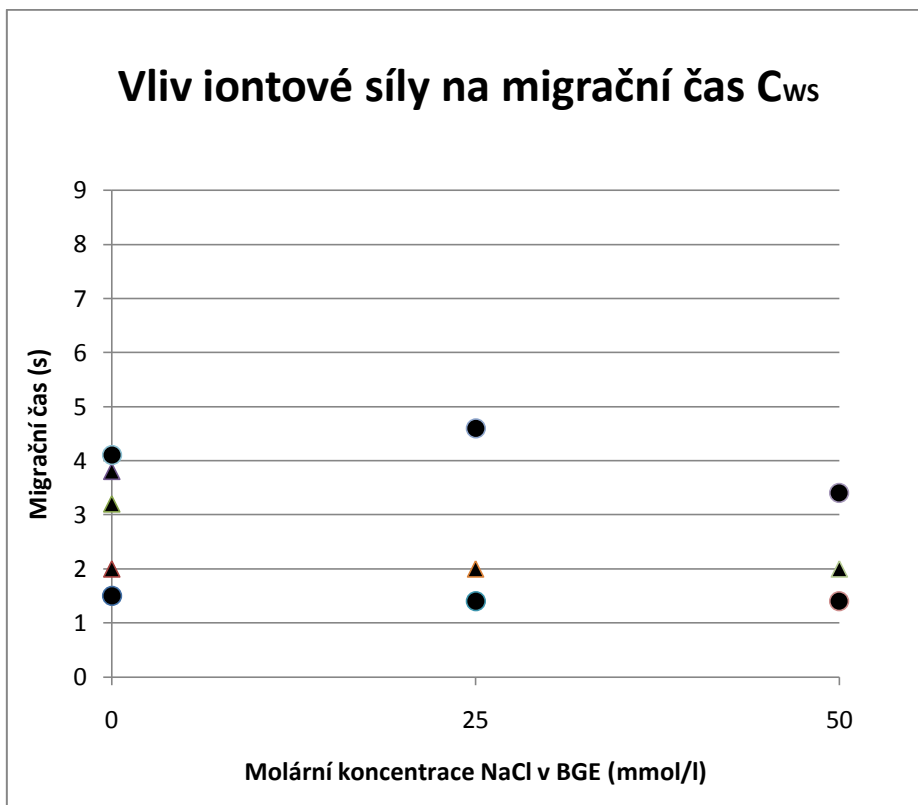


Obr. 15: Vliv iontové síly na migrační čas CSALT. Kolečka označují počátky a konce zóny CSALT a trojúhelníky vrcholy píků.

Obdobný průběh mělo zvyšování iontové síly u uhlíkových kvantových teček C_{WS} . Při koncentraci 25 mmol/l NaCl v základním elektrolytu byla patrná změna tvaru píku nanočástic a při koncentraci 50 mmol/l NaCl v základním elektrolytu docházelo k tvorbě jedné populace částic (Obr. 16). Vyšší iontové síly (větší přídavky NaCl) základního elektrolytu nebyly testovány z důvodu dosažení vysokých proudů uvnitř křemenné kapiláry.



Obr. 16: Elektroforegramy C_{ws} při změně koncentrace NaCl v základním elektrolytu A) 0 mmol/l NaCl B) 25 mmol/l NaCl C) 50 mmol/l NaCl.



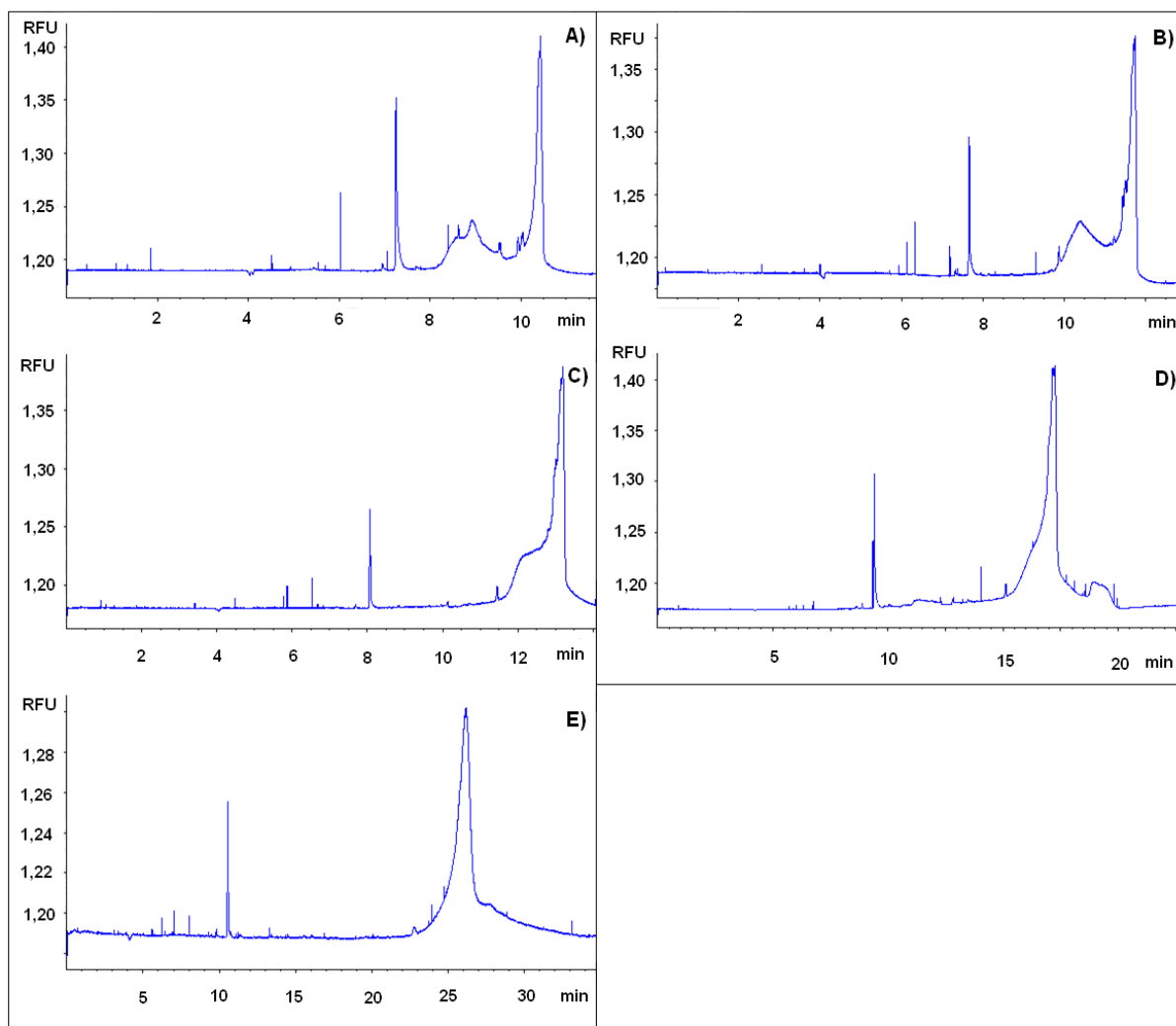
Obr. 17: Vliv iontové síly na migrační čas C_{WS} . Kolečka označují počátky a konce zóny C_{WS} a trojúhelníky vrcholy píků.

Průběh závislosti migračního času na iontové síle je v souladu s teoretickými předpoklady. Se zvyšující se iontovou silou dochází k potlačení šířky elektrické dvojvrstvy vytvořené na nanočásticích, čímž dojde k potlačení efektu povrchového náboje. Tím dochází k tvorbě úzkých zón obsahujících jednu koloidní strukturu nanočástic (podobný princip funguje i u nízkomolekulárních látek, kde lze dosáhnout zlepšení tvaru píku zvýšením iontové síly). Dalším zvyšováním iontové síly dochází k potlačování elektrické dvojvrstvy až po určitý limitní bod stability, kdy se nanočástice začnou shlukovat a vytvářet agregáty.

Při srovnání chování C_{SALT} a C_{WS} je vidět, že se zvyšující se iontovou silou dochází u C_{SALT} k prodlužování doby migrace, zatímco v případě C_{WS} je migrace prvního píku téměř totožná (1,4 – 2,8 min z Obr. 16 C). Iontová síla má obecně vliv i na prostředí, ve kterém separace probíhá, např. na velikost EOF nebo na tvorbu micel. V tomto případě lze předpokládat, že zvyšující iontová síla způsobí zdánlivé zpomalení migrace kvantových teček. Nicméně v rámci analýzy koloidních částic lze předpokládat, že se budou uplatňovat i jiné jevy spojené se strukturou koloidů a interakcemi mezi částicemi a ionty elektrolytu.

4.2.2.3 Vliv koncentrace SDS

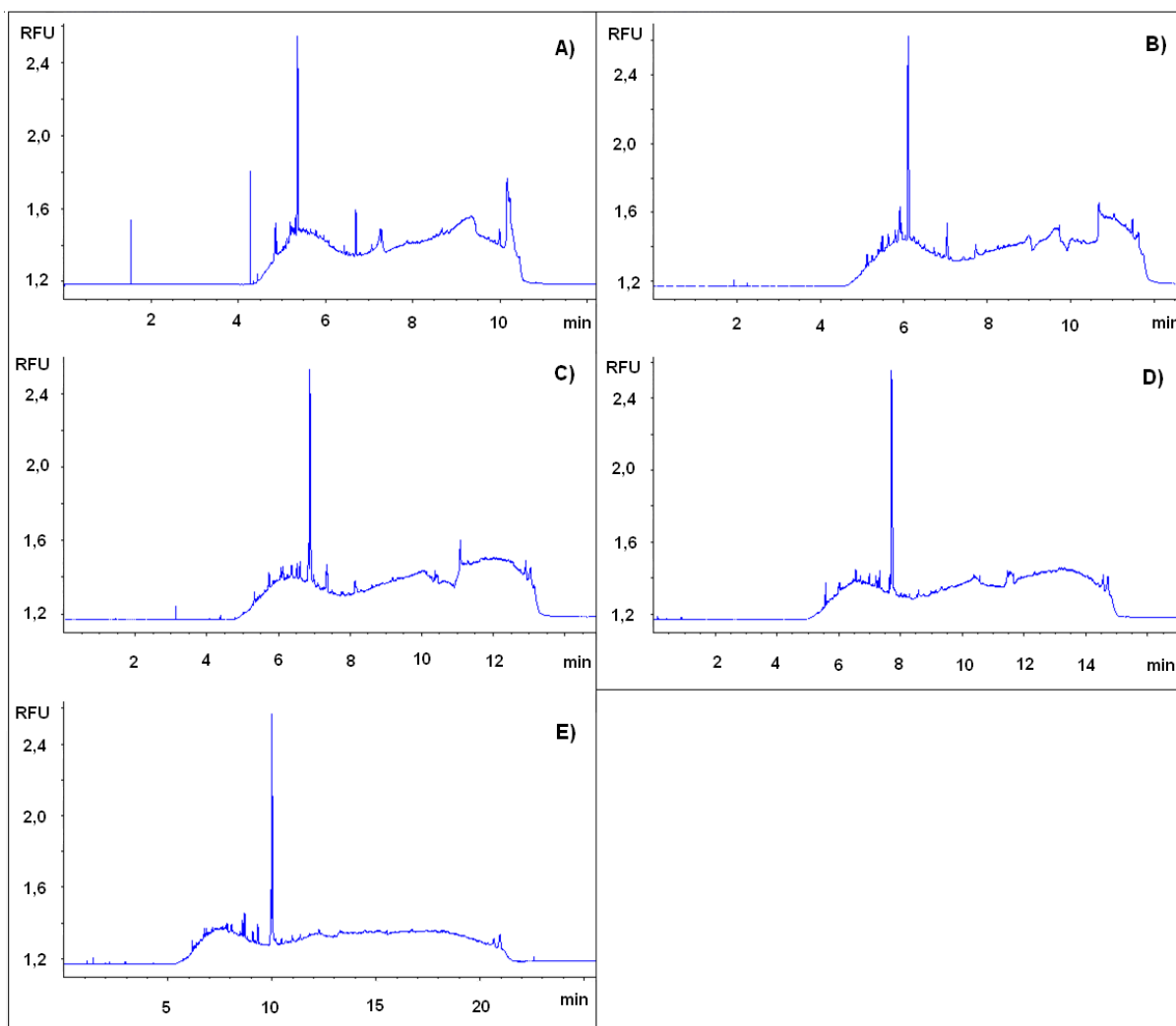
Dalším studovaným parametrem byla koncentrace SDS. Koncentrace SDS byla studována v rozpětí koncentrací od 25 mmol/l po 150 mmol/l. Na obr. 18 a 19 jsou zobrazeny příklady analýz C-dots v závislosti na zvyšující se koncentraci SDS v borátovém pufru.



Obr. 18: Elektroforegramy C_{SALT} při změně koncentrace SDS v základním elektrolytu A) 25 mmol/l SDS B) 50 mmol/l SDS C) 75 mmol/l SDS D) 100 mmol/l SDS E) 150 mmol/l SDS

Uhlíkové kvantové tečky C_{WS} se chovají obdobně jako C_{SALT} , ale nepozorujeme zde výraznou změnu ve tvaru píku a posun začátku zóny analytu také není veliký. Velice výrazné

je prodlužování zóny analytu, kdy při 25 mmol/l SDS v roztoku základního elektrolytu zóna trvá asi 6 minut a při koncentraci 150 mmol/l SDS zóna trvá asi 17 minut.



Obr. 19: Elektroforegramy C_{WS} při změně koncentrace SDS v základním elektrolytu A) 25 mmol/l SDS B) 50 mmol/l SDS C) 75 mmol/l SDS D) 100 mmol/l SDS E) 150 mmol/l SDS

Při zvyšování koncentrace SDS může obecně docházet k změnám v interakcích látek s SDS micelami a zároveň dochází ke změnám iontové síly roztoku. V případě C_{SALT} (Obr. 18) se tvoří jedna populace částic, ale nedochází k agregaci nanočástic jako v případě zvyšování iontové síly pomocí NaCl (a to i přesto, že iontová síla je v případě elektrolytu se 150 mmol/l SDS přibližně o 25 mmol/l větší než byla iontová síla elektrolytu s NaCl

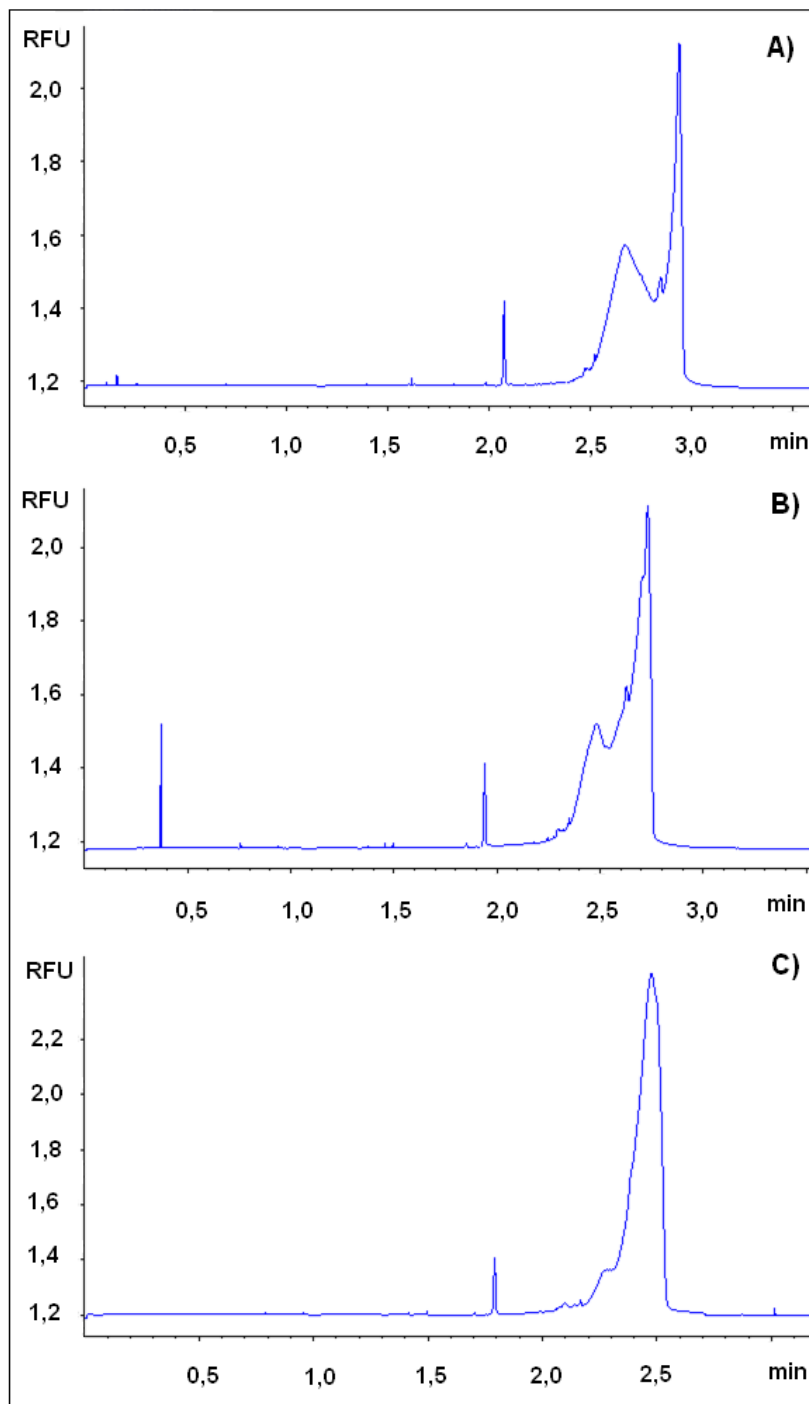
v případě pozorování agregace). Zároveň má koncentrace SDS také výrazný vliv na dobu migrace a prodlužování zóny nanočástic. Při koncentraci 25 mmol/l SDS v základním elektrolytu se pohyboval migrační čas kolem 8 – 10 min a zóna analytu trvala asi 3 minuty a při koncentraci 150 mmol/l SDS byl migrační čas asi 25 – 27 min a zóna nanočástic trvala asi 11 minut. Zde lze opět usuzovat, že se zvyšující se iontovou silou dochází k potlačení zdánlivé rychlosti migrace C-dots. Zároveň se ale zvyšující se koncentrací SDS zřejmě prohlubuje míra interakce C_{SALT} s SDS a tím dochází ke zvýšení jejich migračního času.

Uhlíkové kvantové tečky C_{WS} se chovají obdobně jako C_{SALT} , ale nepozorujeme zde výraznou změnu ve tvaru píku a posun začátku zóny analytu také není veliký. Naopak velice výrazné je prodlužování zóny analytu, kdy při 25 mmol/l SDS v roztoku základního elektrolytu zóna trvá asi 6 minut a při koncentraci 150 mmol/l SDS zóna trvá asi 17 minut. Tato skutečnost by mohla nasvědčovat tomu, že C_{WS} nejsou tvořeny jednou populací částic, ale nejméně dvěma s velmi odlišnou mírou hydrofobicity.

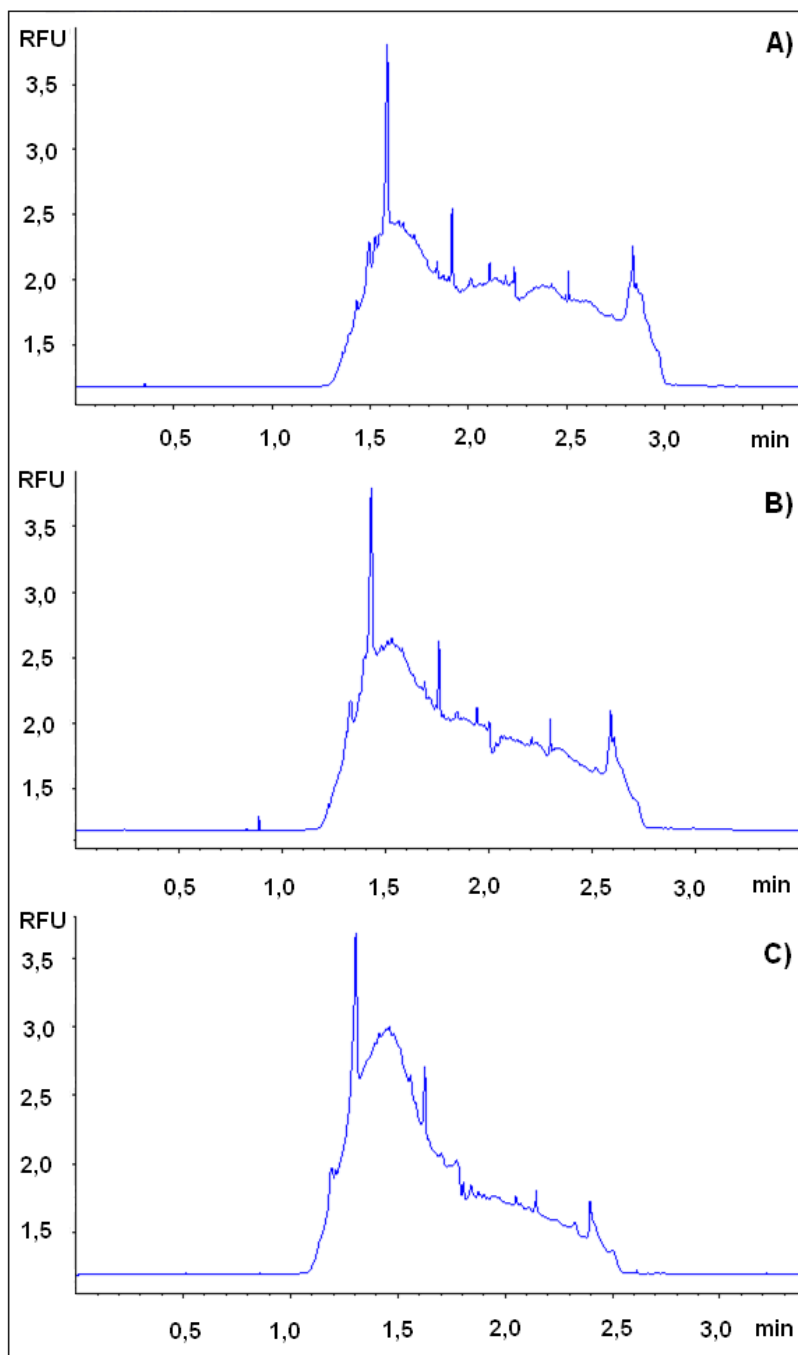
4.2.2.4 Vliv teploty

Vliv teploty na elektroforetické chování uhlíkových kvantových teček byl testován při 25 °C, 40 °C a 60 °C. Vliv teploty byl výrazný u obou analytů. Docházelo ke zkracování migračních časů a změně tvaru píků. U nanočástic C_{SALT} se zóna analytu posunula z původních 2,4 – 3,1 min při 25°C na 2,0 – 2,6 min při 60°C. Byla pozorována také změna tvaru píku z původních dvou populací C_{SALT} při 25°C na jednu populaci nanočástic při 60°C. U uhlíkových kvantových teček C_{WS} také docházelo ke změně migračního času a tvaru píku analytu. Zóna C_{WS} se posunula z původních 1,3 – 3,0 min při 25°C na 1,0 – 2,6 min při 60°C. Změna tvaru píku nebyla tak výrazná jako v případě C_{SALT} , ale snížení signálu v druhé polovině zóny analytu je viditelné (Obr. 20 a 21).

Je zřejmé, že se zvyšující se teplotou se také snižuje viskozita základního elektrolytu a toto snížení viskozity může mít vliv na migrační časy analytů (a dochází také k dalším efektům jako je ovlivnění rozdělovací rovnováhy mezi micely a volný elektrolyt apod.). Nicméně z hlediska změn ve tvaru píků lze spíše předpokládat, že teplotou zde došlo k ovlivnění rovnováhy mezi více koloidními strukturami připravených C-dots.



Obr. 20: Elektroforegramy C_{SALT} při změně teploty systému A) 25°C B) 40°C C) 60°C.



Obr. 21: Elektroforegramy C_{WS} při změně teploty systému A) 25°C B) 40°C C) 60°C.

4.2.2.5 Vliv přídavku hovězího sérového albuminu

Testována byla také interakce uhlíkových kvantových teček C_{SALT} a C_{WS} s hovězím sérovým albuminem (BSA). Zásobní roztok BSA o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ v borátovém pufru

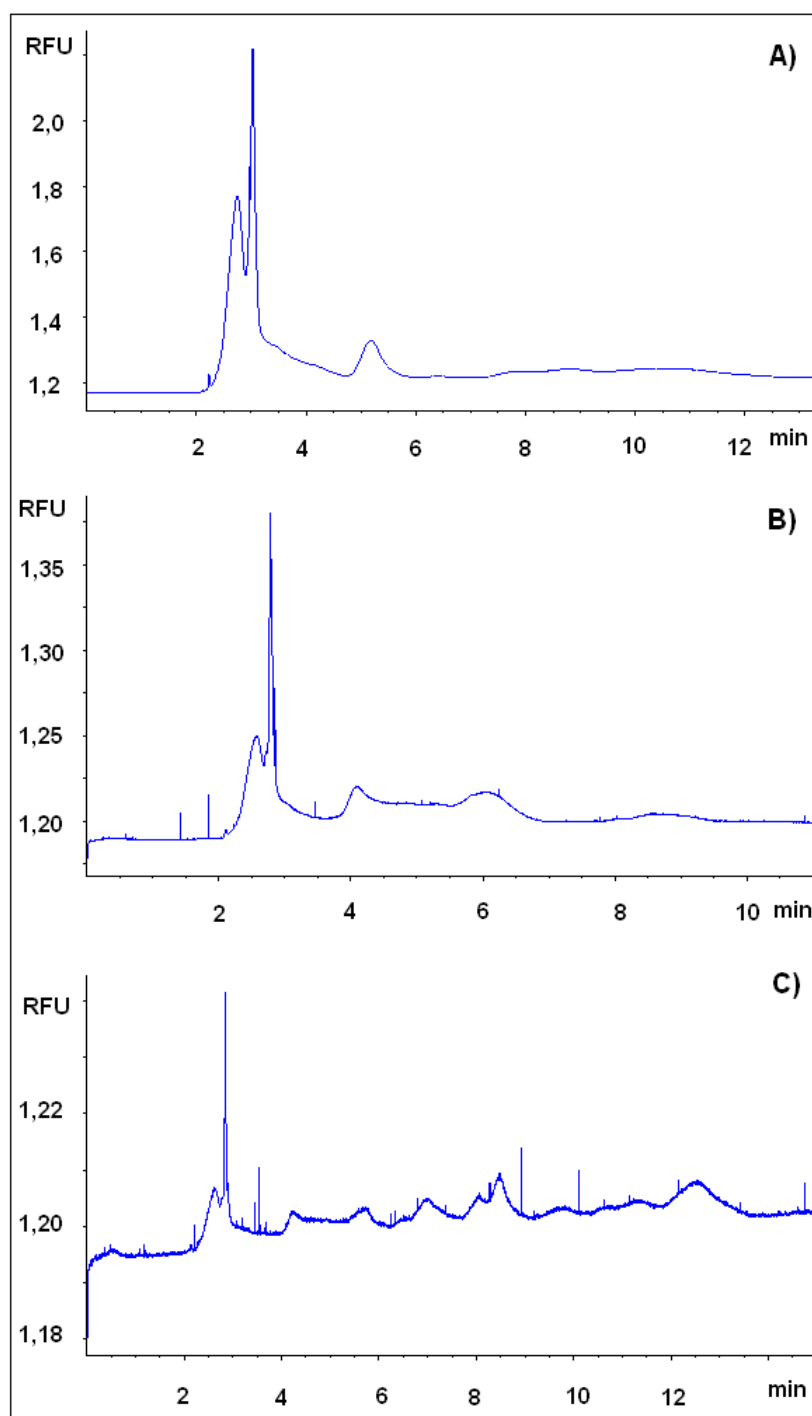
byl inkubován s roztokem nanočástic až do poměru objemů 1:1 po dobu 30 minut a laboratorní teploty. Na elektroforegramech C-dots nebyly pozorovány žádné změny v migračních časech ani v tvarech píků. Vliv BSA byl také testován na přidavku BSA do roztoku základního elektrolytu a to až do koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ BSA v základním elektrolytu. Na elektroforegramech opět nebyly pozorovány změny v migraci ani tvaru píku nanočástic. Na základě těchto údajů se můžeme domnívat, že uhlíkové kvantové tečky neinteragují s C-dots, což bude předmětem další detailní studie.

4.2.3 Analýza C-dots v MOPS/NaOH pufru

Experimenty s uhlíkovými kvantovými tečkami byly prováděny v MOPS/NaOH pufru o molární koncentraci 35 mmol/l a pH 7,5. Stěny kapiláry byly při analýzách dynamicky pokryty DDAB, a proto se kapilára mezi analýzami promývala 2 minuty vodou, 5 minut DDAB o koncentraci 2 mg/ml a 3 minuty základním elektrolytem. Napětí na elektrodách bylo nastaveno na -30 kV. C-dots byly dávkovány hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Kapilára měla délku 35/50 cm a vnitřním průměr 50 μm . Experimenty v tomto elektrolytu byly prováděny pouze s C_{WS} , protože C_{SALT} tvořily agregáty („spiky“ v elektroforegramu).

4.2.3.1 Vliv ředění C-dots

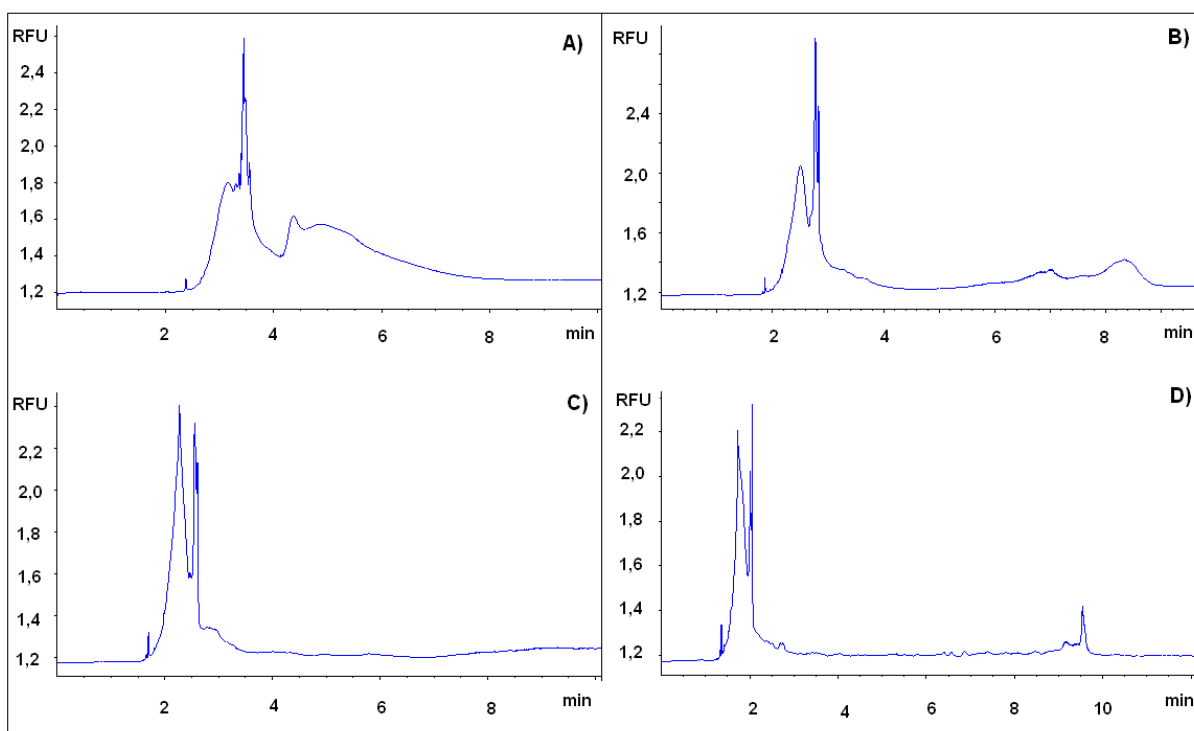
Zásobní roztok uhlíkových kvantových teček C_{WS} byl ředěn základním elektrolytem a byly pozorovány změny v elektrochromatogramu. Ředění zásobního roztoku C_{WS} vedlo ke snižování interakcí nanočástic a následné agregaci, která se projevovala snížením intenzity signálu a „spiky“ v elektroforegramu (viz Obr. 22).



Obr. 22: Elektroforegramy C_{WS} A) původní roztok C_{WS} B) 10x zředěný roztok C_{WS} C) 100x zředěný roztok C_{WS} .

4.2.3.2 Vliv iontové síly

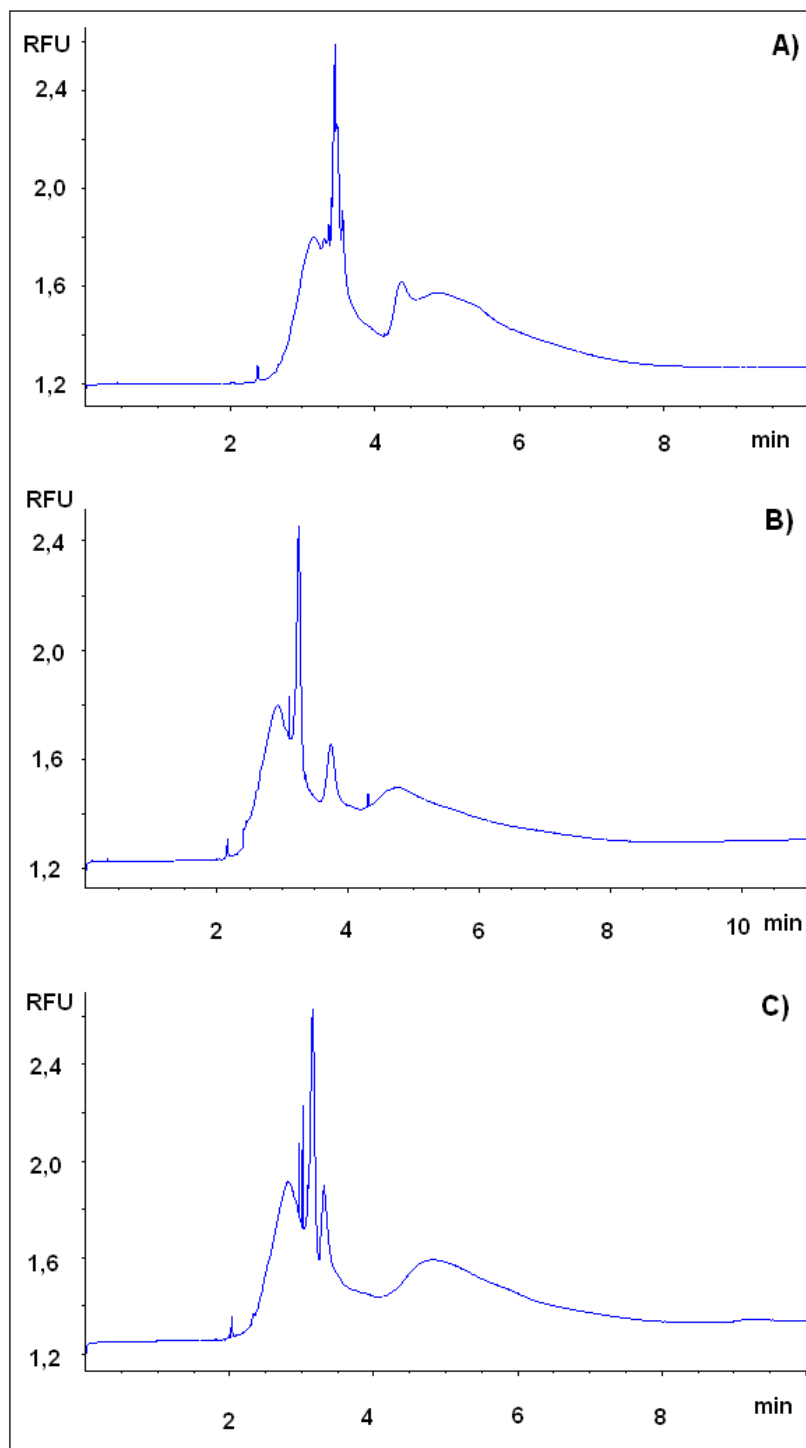
Změna iontové síly byla studována na různých přídavicích NaCl do roztoku základního elektrolytu (Obr. 23). Iontová síla měla podobně jako v případě borátového elektrolytu vliv na tvar píku nanočástic, který odpovídal restrukturalizaci kvantových teček C_{WS} (změně koloidního uspořádání nanočástic). Při iontové síle, která odpovídala koncentraci 50 mmol/l NaCl v roztoku základního elektrolytu byly zřetelné dvě populace C-dots. Změna iontové síly neměla vliv na migrační časy a u nanočástic nedocházelo k agregaci. Vyšší koncentrace NaCl nebyly testovány z důvodu dosažení vysokých hodnot elektrického proudu.



Obr. 23: Elektroforegramy CWS při změně koncentrace NaCl v základním elektrolytu A) 0 mmol/l NaCl B) 25 mmol/l NaCl C) 50 mmol/l NaCl D) 75 mmol/l NaCl.

4.2.3.3 Vliv teploty

Vliv teploty byl studován při 25°C, 40°C a 60°C (Obr.24). Zvyšováním teploty a sníženou viskozitou základního elektrolytu se trochu snižují migrační časy C_{WS} . Při změně teploty dochází také ke změnám tvarů píků (restrukturalizaci nanočástic).

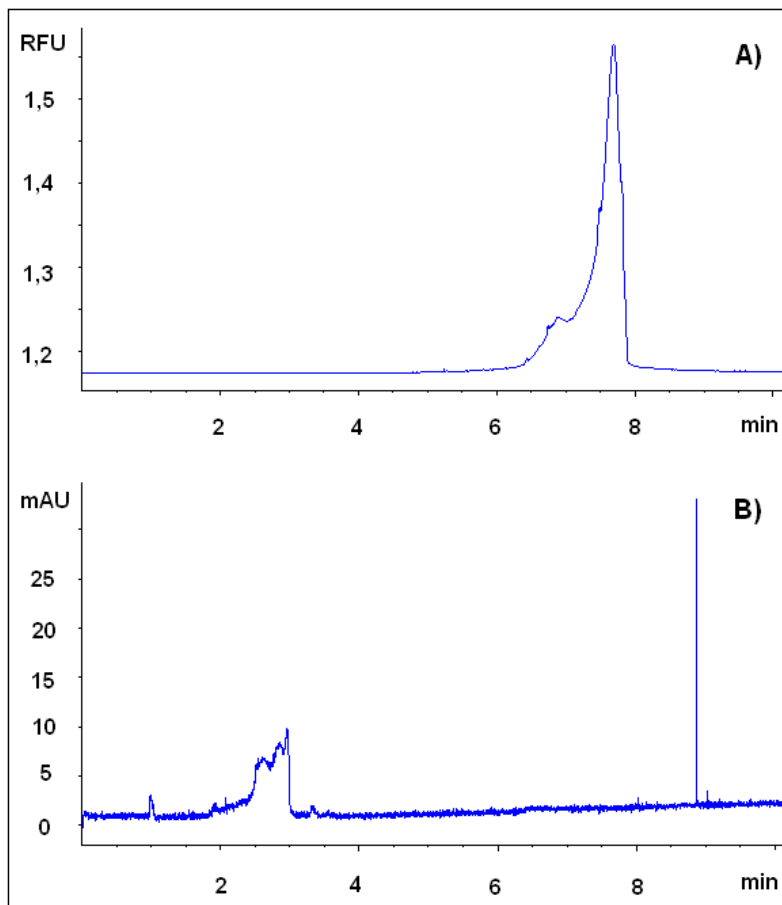


Obr. 24: Elektroforegramy C_{ws} při změně teploty systému A) 25°C B) 40°C C) 60°C

Obecně charakter analýz C-dots v tomto uspořádání (DDAB pokrytí) může vypovídat jak o změně koloidní struktury nanočástic, tak o hlubších změnách v interakci nanočástic v závislosti na jejich iontovém okolí, popř. na DDAB pokrytí (pomineme-li efekty teploty na viskozitu apod.). Petr a kol. [95] popsali, že DDAB hraje důležitou roli v interakcích mezi nanočásticemi, a proto lze předpokládat, že se tento vliv uplatní i v případě C-dots. Zároveň je oproti borátovému pufru možné pozorovat jiný vzhled píku nanočástic, pravděpodobně díky změně módu kapilární elektroforézy a díky změně mechanismu separace (z micelární elektrokinetické chromatografie na kapilární zónovou elektroforézu).

4.2.4 Analýza se simultánní detekcí

Analýza uhlíkových kvantových teček byla také realizována se dvěma detektory jdoucími po sobě (UV detektor, po němž následoval LIF detektor). Pro tento experiment byly vybrány nejlepší podmínky pro analýzu nanočástic z minulých měření. Analýza C-dots probíhala v prostředí borátového pufru o molární koncentraci 35 mmol/l a pH = 9,5 s přídavkem SDS o koncentraci 50 mmol/l v roztoku základního elektrolytu. Při experimentu byla také měřena mobilita elektroosmotického toku (EOF). Z měření se simultánní detekcí jsme zjistili, že uhlíkové kvantové tečky C_{WS} a C_{SALT} můžeme detekovat také pomocí UV detektoru (jsou opticky aktivní v UV oblasti elektromagnetického záření). Mobilita EOF byla zjištěna přídavkem markeru EOF (mesityl oxid) a bylo prokázáno, že nanočástice mají větší migrační čas než EOF marker (viz obrázek 25). V tomto případě (borátový pufr pH 9,5 s 50 mmol/l SDS) tedy C-dots migrují jako anionty, což odpovídá i jejich předpokládané struktuře dle publikací Bourlinose a kol. [90,91].



Obr. 25: Elektroforegramy C_{SALT} při analýze se simultánní detekcí při 60 °C
A) LIF detektor B) UV detektor (migrační čas mesityl oxidu je asi 1 min a migrační čas C_{SALT} asi 1,9 – 3 min)

5 Závěr

Kapilární elektroforéza společně s laserem indukovanou fluorescencí se ukázala jako výborná technika pro charakterizaci uhlíkových kvantových teček v roztocích elektrolytů. Analyzoval jsem chování C_{WS} a C_{SALT} v acetátovém pufru s SDS, fosfátovém pufru s SDS, borátovém pufru s SDS a MOPS/NaOH pufru s kapilárou pokrytou DDAB. V těchto základních elektrolytech jsem testoval vliv koncentrace nanočástic, koncentrace SDS, iontové síly a teploty. Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí se ukázala jako vhodná technika především kvůli nabitému povrchu a fluorescenci uhlíkových kvantových teček a navíc umožňuje dostatečně ale jednoduše modifikovat zkoumané parametry základního elektrolytu.

6 Literatura

- 1 Altria K.D.: *Capillary electrophoresis guidebook*. Humana Press Inc, Totowa 1996.
- 2 Moore A.W., Jorgenson J.W.: *Anal. Chem.* 65, 3550 (1993).
- 3 Cifuentes A., Diez-Masa J.C., Fritz J., Anselmetti D., Bruno A.E.: *Anal. Chem.* 70, 3458 (1998).
- 4 Lin Y.W., Chiu T.C., Chang H.T.: *J.Chromatogr. B* 793, 37 (2003).
- 5 Hu S., Dovichi N.J.: *Anal. Chem.* 74, 2833 (2002).
- 6 Beer T, Velthorst N.H., Brikman U.A.T., Gooijer C.: *J. Chromatogr. A* 971, 1 (2002).
- 7 <http://fyzika.jreichl.com/index.php?sekce=browse&page=788> (28.11.2010).
- 8 Bruno A.E., Gassmann E., Pericles N., Anton K.: *Anal. Chem.* 61, 876 (1989).
- 9 Safford E.L.: *The Fiber optics and Laser Handbook*. Tab Books Inc., Blue Ridge Summit 1984.
- 10 http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_fiber (30.11.2010).
- 11 <http://techfusion.in/2010/03/optical-fiber-communication/> (30.11.2010).
- 12 Pentoney S.L., Konrad K.D., Kaye W.: *Electrophoresis* 13, 467 (1992).
- 13 Einstein A. In: M.H.Shamosed (Ed.). *Great Experiments of Physics*, Dover, New York, 1987, p. 232.
- 14 Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- 15 Holmes K.L., Lantz L.M.: *Methods Cell Biol.* 63, 185 (2001).
- 16 Malek A., Khaledi M.G.: *Anal. Biochem.* 270, 50 (1999).
- 17 Gallaher D.L., Johnson M.E.: *Analyst* 124, 1541 (1999).

- 18 Chassaing C., Gonin J., Wilcox C.S., Wainer I.W.: *J. Chromatogr. B* 735, 219 (1999).
- 19 Taga A., Honda S.: *J. Chromatogr. A* 742, 243 (1996).
- 20 Taga A., Nishino A., Honda S.: *J. Chromatogr. A* 822, 271 (1998).
- 21 Seitz W.R., Frei R.W.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 8, 367 (1980).
- 22 Spikner J., Towne J.: *Anal. Chem.* 34, 1468 (1962).
- 23 Towne J., Spikner J.: *Anal. Chem.* 35, 211 (1963).
- 24 Alkon D., Goldberg A., Green J., Levi P., Liao K.: *Anal. Biochem.* 40, 192 (1971).
- 25 Archibald R.: *J. Biol. Chem.* 158, 347 (1945).
- 26 Kofler M.: *Helv. Chim. Acta* 28, 702 (1945).
- 27 Siraganian R.P.: *Anal. Biochem.* 57, 383 (1974).
- 28 Hakanson R., Ronnberg A.L., Sjolund K.: *Anal. Biochem.* 59, 98 (1974).
- 29 Marton L.J., Lee P.L.Y.: *Clin. Chem.* 21, 1721 (1975).
- 30 Roth M.: *Anal. Chem.* 43, 880 (1971).
- 31 Maickel R., Miller F.: *Anal. Chem.* 38, 1937 (1966).
- 32 Mendez E., Gavilanes J.G.: *Anal. Biochem.* 72, 473 (1976).
- 33 Butcher E.C., Lowry O.H.: *Anal. Biochem.* 76, 502 (1976).
- 34 Nakano S., Taniguchi H., Mikoshiba K.: *Yakugaku Zasshi* 93, 350 (1973).
- 35 Uno T., Taniguchi H.: *Bunseki Kagaku* 21, 76 (1972).
- 36 Bandich O., Deuel H.: *J. Am. Chem. Soc.* 44, 1585 (1922).
- 37 Morrison G.: *Anal. Biochem.* 12, 150 (1965).
- 38 Rogers C., Chambers C., Clarke N.: *Anal. Chem.* 38, 1851 (1966).

- 39 Strassman M., Ceci O., Tucci A.F.: *Anal. Biochem.* 23, 484 (1968).
- 40 Frohman C.E., Orten J.M.: *J. Biol. Chem.* 205, 717 (1953).
- 41 Gregorowicz Z., Gorka P.: *Z. Anal. Chem.* 230, 431 (1967).
- 42 Maeda H., Kawauchi H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 188 (1968).
- 43 Airhart J., Sibiga S., Saunders H., Khairallah E.A.: *Anal. Biochem.* 53, 132 (1973).
- 44 Seiler N.: *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 18. Wiley Interscience, New York (1970).
- 45 Seiler N., Knodgen B., Eisenbess F.: *J. Chromatogr.* 145, 29 (1978).
- 46 Frei-Haesler M., Frei R.W., Hutzinger O.: *J. Chromatogr.* 79, 206 (1973).
- 47 Lawrence J.F., Larer G.W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57, 1022 (1974).
- 48 Nachtmann F., Spitz H., Frei R.W.: *Anal. Chim. Acta.* 76, 57 (1975).
- 49 Chayen R., Drir R., Gould S., Harell A.: *Anal. Biochem.* 42, 283 (1971).
- 50 Eckhardt A.E., Hayes C.E., Goldstein I.J.: *Anal. Biochem.* 73, 192 (1976).
- 51 Duges V.: *Anal. Chem.* 49, 442 (1977).
- 52 Ivanov C.P.: *Monatsh. Chem.* 97, 1499 (1966).
- 53 Ivanov C.P., Vladovska-Iukhnovska Y.: *J. Chromatogr.* 71, 111 (1972).
- 54 Vladovska-Iukhnovska Y., Ivanov C.P., Malgrand M.: *J. Chromatogr.* 90, 181 (1974).
- 55 Winson J.A., Patel D.D., Patel A.H.: *Anal. Chem.* 49, 163 (1977).
- 56 Ryan D.K., Pal B.K.: *Anal. Chim. Acta.* 44, 385 (1969).
- 57 Elbein I.I.M., McOmie J.F.W., Pollard F.H.: *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 7, 186 (1949).
- 58 Miller C., Magee R.: *J. Chem. Soc.*, 3183 (1951).

- 59 Bishop J.A., Soler J.: *Talanta* 22, 619 (1975).
- 60 Van Slageren R., den Boev G., van der Linden W.E.: *Talanta* 20, 739 (1973).
- 61 Ohnesorge W.E., Rogers L.B.: *Spectrochim. Acta.* 15, 27 (1959).
- 62 Little F.E., Storey D.R., Juricich M.E.: *Spectrochim. Acta.* 29A, 1357 (1973).
- 63 Lieu V.T, Handy C.A.: *Anal. Lett.* 7, 267 (1974).
- 64 Bishop J.A.: *Anal. Chim. Acta.* 87, 255 (1976).
- 65 Hiraki K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 46, 2438 (1973).
- 66 Hiraki K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 45, 789 (1972).
- 67 Hiraki K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 45, 1395 (1972).
- 68 Freeman D.C., White C.E.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2678 (1956).
- 69 Kirkbright G.F., West T.S., Woodward C.: *Anal. Chem.* 37, 137 (1965).
- 70 Alykov N.M., Aliev R.Z.: *Chem. Abstr.* 78, 64646h (1973).
- 71 White C.E., Hoffman D.E.: *Anal. Chem.* 29, 1105 (1957).
- 72 White C.E., Neustadt M.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 15, 599 (1943).
- 73 Bark L.S., Rikson A.: *Anal. Chim. Acta.* 45, 425 (1969).
- 74 <http://www.sciencedaily.com/articles/n/nanoparticle.htm> (21.3.2011).
- 75 Baker S.N., Baker G.A.: *Angew. Chem. Int Ed.* 49, 6726-6744 (2010) .
- 76 Xu X.Y., Ray R., Gu Y.L., Ploehn H.J., Gearheart L., Raker K., Scrivens W.A.: *A. Am. Chem. Soc.* 126, 12736 (2004).
- 77 Sun Y.P., Zhou B., Lin Y., Wang W., Fernando K.A.S., Pathak P., Mezziani M.J., Harruff B.A., Wang X., Wang H.F., Luo P.J.G., Yang H., Kose M.E., Chen B.L., Veca L.M., Xie S.Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7756 (2006).
- 78 Sun Y.P., Wang X., Lu F.S., Cao L., Mezziani M.J., Luo P.J.G., Gu L.R., Veca L.M.: *J. Phys. Chem. C* 112, 18295 (2008).

- 79 Zhou J.G., Booker C., Li R.Y., Zhou X.T., Sham T.K., Sun X.L, Ding Z.F.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 744 (2007).
- 80 Liu H.P., Ye T., Mao C.D.: *Angew. Chem. Int. Ed.*46, 6473 (2007).
- 81 Liu R.L., Wu D.Q., Liu S.H., Koynov K., Knoll W., Li Q.,: *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 4598 (2009).
- 82 Zhu H., Wang X.L., Li Y.L., Wang Z.J., Yang F., Yang X.R.: *Chem. Commun.*,5118 (2009).
- 83 Hu S.L., Niu K.Y., Sun J.,Yang J., Zhao N.Q., Du X.W.: *J. Mater. Chem.* 19, 484 (2009).
- 84 Ray S.C., Saha A., Jana N.R., Sarkar R.: *J. Phys. Chem. C* 113, 18546 (2009).
- 85 Peng H., Travas-Sejdic J.: *Chem. Mater.* 21, 5563 (2009).
- 86 Yang S.T., Cao L., Luo P.G., Lu F.S., Wang X., Wang H.F., Meziani M.J., Liu Y.F., Qi G., Sun Y.P.: *J. Am. Chem. Soc.* 131, 11308 (2009).
- 87 Hardman R.: *Environ. Health Perspect.* 114, 165 (2006).
- 88 Cao L., Wang X.,Meziani M.J., Lu F.S., Wang H.F., Luo P.J.G., Lin Y., Harruff B.A., Veca L.M., Murray D., Xie S.Y., Sun Y.P.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 11318 (2007).
- 89 Wang X., Cao L., Lu F.S., Meziani M.J., Li H., Qi G., Zhou B., Harruff B.A., Kermarrec F., Sun Y.P.: *Chem. Commun.*,3774 (2009).
- 90 Bourlinos A.B., Stassinopoulos A., Anglos D., Zboril R., Karakassides M., Giannelis E.P.: *Small* 4, 455 (2008).
- 91 Bourlinos A.B., Stassinopoulos A., Anglos D., Zboril R., Georgakilas V., Giannelis E.P.: *Chem. Mater.* 20, 4539 (2008).
- 92 Oszwałdowski S., Zawistowska K., Grigsby L.K., Roberts K.P.: *Cent. Eur. J. Chem.* 8,806 (2010).
- 93 Li Y., Wang H., Wang J., Guan L., Liu B.,Zhao Y., Chen H.: *Anal. Chim. Acta* 647, 219 (2009).
- 94 Petr J., Ryparova O., Znaležiona J., Maier V., Ševčík J.: *Electrophoresis* 30, 3863 (2009).
- 95 Petr J.,Teste B., Descroix S., Siaugue J., Gareil P., Varenne A.: *Electrophoresis* 31, 2754 (2010).

7 Seznam použitých zkratk a symbolů

BSA	Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CCD	Zařízení s vázanými náboji (Charge-Coupled Device)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CHES	N-cyklohexyl-2-aminoethansulfonová kyselina
DDAB	Didodecyldimethylammonium bromid
EOF	Elektroosmotický tok (Electroosmotic flow)
FTIR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy)
FWHM	Šířka pásu v polovině maxima (Full width at half maximum)
LIF	Laserem indukovaná fluorescence
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
NA	Numerická apertura
NMR	Nukleární magnetická resonance
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PEG _{1500N}	Diaminem zakončený polyethylenglykol
PMT	Fotonásobič (Photomultiplier tube)
PPEI-E	Poly(propionylethylenimin-co-ethylenimin)
SDS	Dodecylsulfát sodný
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
TTDDA	4,7,10-trioxa-1,13-tridekandiaminem
UV	Ultrafialové záření (Ultraviolet)