

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Analýza a využití fluoreskujících nanočástic v kapilární elektroforéze

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Daniel Baron

Chemie

RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2012

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

.....

Daniel Baron

Poděkování

Poděkování patří samozřejmě svým rodičům, kteří mě podporovali a umožnili mi studovat. Také mé přítelkyni, která se mnou měla strpení, ale hlavně bych chtěl poděkovat mému vedoucímu, nejen za jeho odborné vedení a cenné rady, ale především za jeho optimismus a pozitivní přístup.

Dále bych chtěl poděkovat týmu prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. za poskytnuté nanočástice a Regionálnímu centru pokročilých technologií a materiálů (projekt OP VaVpI CZ.1.05/2.1.00/03.0058) za finanční podporu výzkumu.

Abstrakt

V této práci je popsána pilotní studie chování nanočástic, zejména uhlíkových kvantových teček (C-dots) v kapilární elektroforéze. Práce ukazuje využití kapilární elektroforézy pro separaci nanočástic a jejich charakteristiku v roztocích při změně teploty, iontové síly nebo také vliv nosného elektrolytu na analýzu. Byla rovněž pozorována adsorpce uhlíkových kvantových teček na stěnu kapiláry, a proto bylo testováno použití SDS jako aditiva vytvářejícího micely a zabraňujícího adsorpci. Pro analýzu použitých nanočástic byl použit UV detektor a fluorescenční detektor, jenž byl pro tyto fluoreskující částice vhodnější. Cílem práce bylo ukázat, jak může být kapilární elektroforéza využita pro charakterizaci nanočástic.

Abstract

A pilot study on the behavior of nanoparticles, especially carbon quantum dots (C-dots) in capillary electrophoresis is described in this work. The work shows that we can use capillary electrophoresis for the separation and characterization of nanoparticles in solution. We characterized the C-dots with changing temperature, ionic strength and studied the influence of a background electrolyte on analysis. Adsorption of the C-dots on the inner surface of the capillary was also observed. The problem was solved by adding of SDS to the background electrolyte since SDS forms micelles and they prevent adsorption of the C-dots. For the identification of nanoparticles, UV and LIF detector was used; the LIF detector was better for these fluorescent particles. The aim of this work was to show how capillary electrophoresis can be used for the characterization of nanoparticles.

OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 NANOČÁSTICE	9
2.1.1 Historie	9
2.1.2 Příprava nanočástic.....	9
2.1.2.1 Metody dispergační	10
2.1.2.2 Metody kondenzační.....	10
2.1.3 Využití nanočástic	10
2.1.3.1 Možnosti analytického využití nanočástic.....	11
2.1.4 Rozdělení nanočástic	11
2.1.5 Fluorescenční nanočástice	12
2.1.5.1 Luminiscence.....	12
2.1.5.1.1 Fosforescence	13
2.1.5.1.2 Fluorescence	13
2.1.5.2 Kvantové tečky	13
2.1.5.2.1 Struktura kvantových teček	13
2.1.5.2.2 Syntéza kvantových teček	14
2.1.5.3 Kompozitní nanočástice	15
2.1.5.3 Fluorescenční uhlíkové nanočástice (C-dots) a jejich struktura.....	16
2.1.5.3.1 Syntéza C-dots.....	17
2.1.5.3.2 Aplikace a využití C-dots	17
2.1.5.3.2.1 „Bioimaging“	17
2.1.5.3.2.2 Fotoredukce kovů	17
2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ TECHNIKY	18
2.2.1 Historie	18
2.2.2 Princip.....	18
2.2.3 Vznik elektrické dvojvrstvy a elektroosmotický tok (EOF).....	19
2.2.4 Rozdělení kapilárních elektromigračních metod.....	21
2.2.4.1 Kapilární zónová elektroforéza	22
2.2.4.2 Kapilární gelová elektroforéza	23

2.2.4.3 Bioafinitní kapilární elektroforéza	23
2.2.4.4 Micelární elektrokinetická chromatografie	23
2.2.4.5 Kapilární elektrochromatografie.....	24
2.2.4.6 Kapilární izoelektrická fokusace	24
2.2.4.7 Kapilární izotachoforéza.....	24
2.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA UHLÍKOVÝCH FLUORESCENČNÍCH NANOČÁSTIC	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Materiál.....	27
3.1.1 Chemikálie.....	27
3.1.2 Kvantové tečky	27
3.2 Příprava elektrolytu	27
3.3 Instrumentace a experimentální podmínky	28
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
4.1 Vliv elektrolytu na chování C-dots v kapilární elektroforéze	29
4.2 Srovnání elektroforegramů za použití DAD detektoru a LIF detektoru.....	29
4.3 Efekt přidavkem NaCl	30
4.4 Efekt teploty	32
5 ZÁVĚR.....	34
6 LITERATURA	35
7 SEZNAM ZKRATEK	37

1 ÚVOD

Nanočástice, jejich vytváření a manipulace s nimi, tedy nanotechnologie, v současné době představují jeden z nejbouřlivěji se rozvíjejících oborů lidské činnosti.¹ Pro své unikátní vlastnosti nacházejí široké uplatnění v různých odvětvích průmyslu, avšak setkáváme se s nimi také v běžném životě. Mezi velmi zajímavé nanočástice patří tzv. kvantové tečky, které jsou velmi užitečné v biologických aplikacích, zejména jejich nový typ, který byl objeven roku 2004. Jedná se o tzv. uhlíkové nanočástice, nejčastěji označované jako C-dots. Tyto částice jsou pro svou silnou fluorescenci a nízkou toxicitu zajímavé hlavně pro lékařské využití.

Analýza těchto částic pomocí kapilární elektroforézy nám pak může přinést zajímavé informace o jejich chování v roztoku.^{2,3} Vzhledem ke své silné fluorescenci lze pak pro selektivní detekci využít detektor pracující na principu laserem indukované fluorescence.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 NANOČÁSTICE

2.1.1 Historie

O unikátních vlastnostech nanočástic (objekty s rozměry od 1 do 100 nm) věděli lidé již v pátém nebo čtvrtém století př. n. l. v Číně a Egyptě. Z této doby pochází první zmínky o tzv. „rozpuštěném zlatě“, které bylo používáno jak pro estetické účely (barvení skla a keramiky), tak pro účely léčivé (srdeční a sexuální problémy, úplavice, epilepsie, syfilis atd.).

Roku 1857 oznámil Michael Faraday získání koloidního zlata redukcí vodného roztoku tetrachlorozlatitanu. V této době byly připraveny i další kovy v koloidní formě. V roce 1959 pak pronesl Richard Feynman slavnou větu „Tam dole je spousta místa“. Tehdy byl odstartován prudký rozvoj nanotechnologií.

Nanočástice poskytují díky své velikosti a morfologii takové optické, elektrické, magnetické, katalytické, biologické a mnohé další vlastnosti, které nejsou u molekul či makroskopických látek pozorovatelné.⁴ Proto v poslední době přitahují pozornost v různých oborech chemie, fyziky, materiálových vědách či medicíně.

2.1.2 Příprava nanočástic

Již při přípravě vlastních nanočástic je třeba uvážit jejich další aplikaci. Nanočástice mohou být připraveny různými metodami, a lze tak dosáhnout požadovaných velikostí a tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností.⁵ Nejvíce jsou studovány nanočástice z anorganických materiálů jako ušlechtilé kovy (např. zlato, stříbro), magnetické kovy a jejich sloučeniny (Fe_3O_4), slitiny kovů, oxidy (křemičitý, titaničitý), sulfidy a selenidy (kademnatý) a polovodiče. Tyto částice mají obrovský potenciál pro uplatnění v různých oblastech od technologie po biomedicínu. Poměrně hodně rozšířené jsou také polymerní nanočástice (dendrimery, kopolymery).

Metody přípravy nanočástic lze obecně rozdělit do dvou skupin - na metody dispergační a metody kondenzační.

2.1.2.1 Metody dispergační

Mezi tyto metody patří např. mechanické rozemílání, nejčastěji v kulových mlýnech, rozměňování pomocí ultrazvuku, elektrické rozprašování, odtrhávání částic z látky pomocí laseru a peptizace.⁶

2.1.2.2 Metody kondenzační

Kondenzační metody se dělí na fyzikální a chemické kondenzační postupy. Fyzikální postupy jsou založeny například na změně rozpustnosti látek. K roztoku látky se přidá jiné rozpouštědlo, v němž má látka nižší rozpustnost, čímž dojde k vyloučení dané látky v koloidní formě. Tímto způsobem lze připravit koloidní částice síry. K dalším fyzikálním postupům patří také ochlazování par kovů nebo jiných prvků.

Daleko více využívané jsou však chemické postupy založené na nukleaci a růstu tuhé fáze, protože jimi lze připravit větší počet koloidních soustav různého chemického složení. Mezi reakce vedoucí ke vzniku koloidních částic patří srážecí reakce (např. PbI_2), hydrolyza solí (hydroxidy těžkých kovů) a oxidačně-redukční reakce. Vzhledem k tomu, že jsou redoxní reakce velmi jednoduše proveditelné a lze díky nim připravit v gramových množstvích koloidní nanočástice požadované velikosti s malou odchylkou, patří tato metoda také mezi nejrozšířenější, zejména pro přípravu kovových nanočástic. Například nanočástice zlata lze připravit redukcí zlatitých solí různými redukčními činidly, jako je například kyselina citrónová, citrát sodný, askorbát sodný nebo aminy.^{6,7}

2.1.3 Využití nanočástic

Nanočástice nacházejí obrovské využití v různých oblastech běžného života jako je zdravotnictví (cílená doprava léčiv, náhrada tkání, roušky, umělé klouby, MRI), strojírenství (obráběcí nástroje), stavebnictví (izolační materiály), textilní průmysl (nemačkové tkaniny), optický průmysl (integrovaná optika, optické filtry), automobilový průmysl (filtry čelních skel), kosmický průmysl (konstrukční prvky raketoplánů), vojenský průmysl (nanosenzory), životní prostředí (biodegradace) a samozřejmě průmysl chemický, kde se nanočástic využívá

například jako selektivních katalyzátorů. Nanočástice mají také velké analytické využití. V poslední době se také rychle rozvíjí výzkum v oblasti nanoelektroniky.⁸

2.1.3.1 Možnosti analytického využití nanočástic

Analytické systémy s nanočásticemi vykazují mnohdy lepší vlastnosti než systémy původní. Mezi tyto vlastnosti patří například snížení meze detekce, zlepšení účinnosti separace nebo možnosti detekce nových analytů. Z tohoto důvodu existuje již mnoho prací využívající nanočástice pro analytické účely. Jedná se o elektrochemické metody, kde je využíváno modifikace povrchu elektrod nanočásticemi. Pro tyto účely jsou velmi vhodné hlavně zlaté elektrody, na které lze navázat přes jednu z –SH skupin libovolný dithiol (např. dithiothreitol) a na druhou –SH skupinu se naváže nanočástice (Au).⁹ Nanočástic se také velmi často využívá ve spektrometrických metodách, jelikož mají velký vliv na optické vlastnosti molekul, s nimiž interagují. Mezi nejvyužívanější spektrometrické metody patří absorpční spektrometrie, metody založené na rozptylu světla a zejména luminiscenční techniky. Mezi separační metody využívajících nanočástic patří plynová a kapalinová chromatografie (GC a HPLC), avšak nejčastěji je využíváno elektromigračních technik, zejména kapilární elektroforézy (CE).⁵

2.1.4 Rozdělení nanočástic

Podle chemického složení lze nanostruktury dělit na kovové (např. Au, Ag, Ni, Fe₂O₃...), polovodičové – kvantové tečky (např. CdTe, CdSe, InP, InAs...) a nekovové (např. uhlíkové nanotrúbky). Nanočástice lze také dělit podle struktury na částice, tyčinky, trubky, atd.¹⁰

2.1.5 Fluorescenční nanočástice

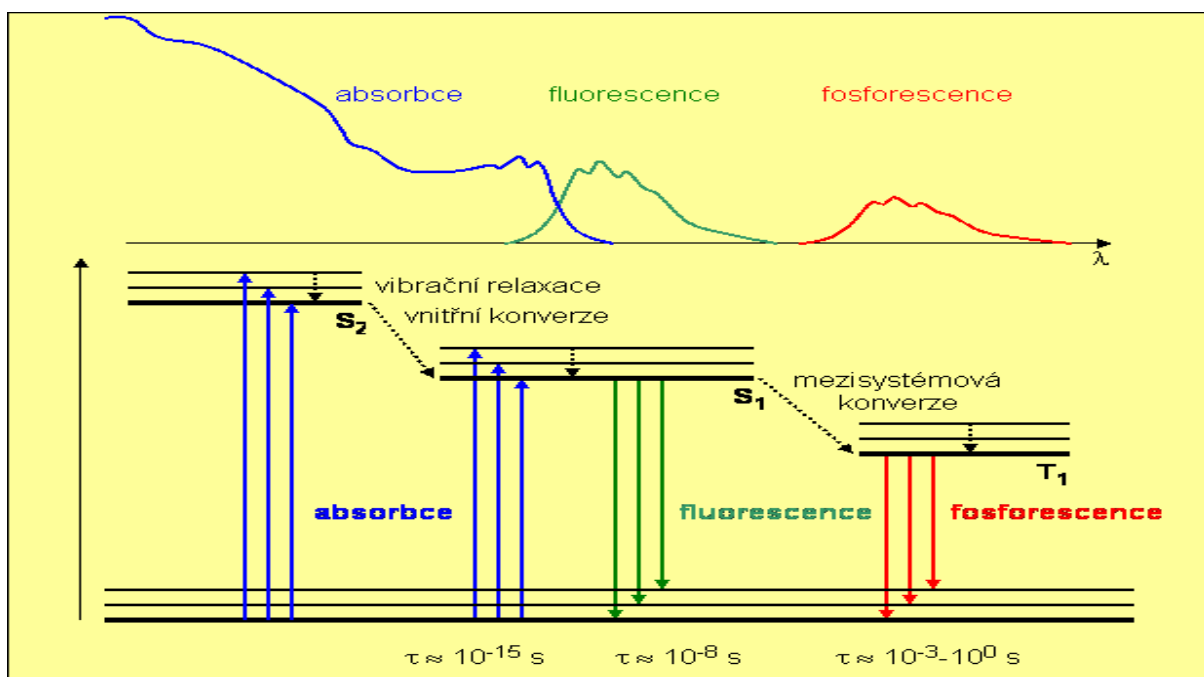
2.1.5.1 Luminiscence

Molekuly v excitovaném stavu se při chaotickém tepelném pohybu vracejí do základního stavu vzájemnými srážkami, čímž si předávají energii. Tato energie je přibližně stejně velká jako energie potřebná ke změně rotačních a někdy vibračních stavů molekuly. Pokud je změna rotačního nebo vibračního stavu uskutečněna tímto způsobem, jedná se o tzv. nezářivé přechody. Některé molekuly, ale celou nebo část přijaté energie opět vyzáří do okolí. Tomuto jevu říkáme luminiscence.

Lumiscence se dělí podle doby, která uplyne mezi pohlcením energie a luminiscenčním vyzářením na:

1. fosforescenci
2. fluorescenci

Obr.1: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy molekuly (Jablonského diagram).¹¹



2.1.5.1.1 Fosforescence

Uplatňuje-li se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu metastabilní hladina, jedná se o fosforescenci. Fosforescence má delší dobu dohasínání než fluorescence ($>10^{-8}$ s) a obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.

2.1.5.1.2 Fluorescence

Nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci. Fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s).^{11,12}

2.1.5.2 Kvantové tečky

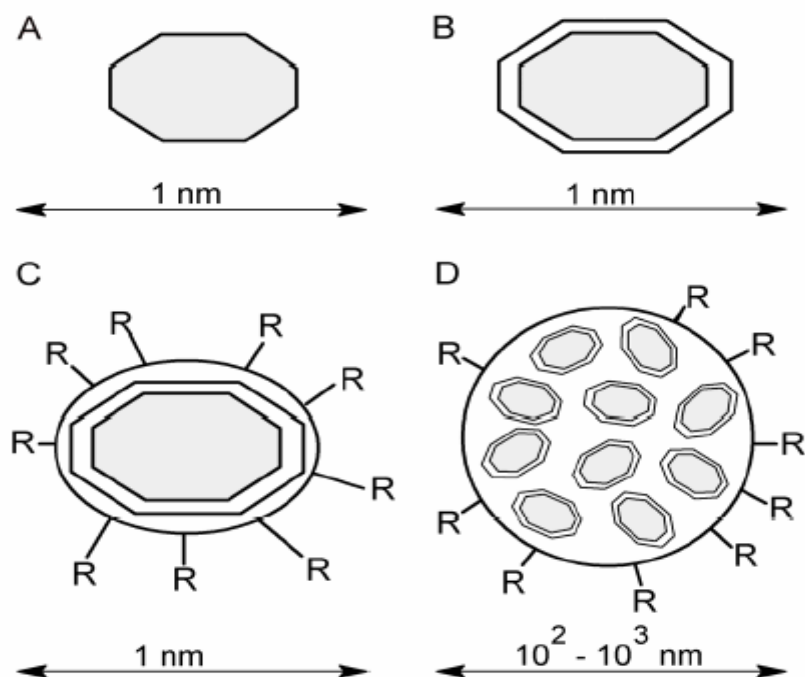
Fluoreskující polovodičové nanokrystaly, běžně známé jako kvantové tečky (QD, „quantum dots“) jsou shluky atomů o velikosti přibližně 2-15 nm. Vzhledem k velikosti těchto shluků, uplatňují se v nich kvantové jevy. Pohyb elektronů obsažených atomů není volný, ale je vázán pouze na kvantovou tečku. Proto se kvantové tečky chovají jinak, než velké struktury stejného složení a jejich fyzikální vlastnosti spíše odpovídají vlastnostem jednotlivých atomů. Tyto nanočástice mají v biologii a (bio)analytické chemii podobné uplatnění, jako již dlouho známé organické fluorofory jako jsou rhodaminy, fluorescein a jiné. Některé optické a chemické vlastnosti však mají kvantové tečky zcela výjimečné. To umožňuje navrhovat nové analytické metody pro detekci iontů, virů, bakterií a jiných analytů.^{1,13}

2.1.5.2.1 Struktura kvantových teček

Kvantové tečky anorganické povahy existují buď samostatně (jsou tvořeny jedním typem polovodiče) – **A**, nebo mohou být uspořádány do klastrů. Zřejmě nejčastější je uspořádání, kdy jeden typ polovodiče vytváří jádro kvantové tečky (core, např. CdSe) a několik vrstev atomů druhého typu polovodiče vytváří obal kolem tohoto jádra (shell, např. ZnS). Kvantové tečky tohoto typu se označují jako „core/shell“ struktury – **B**. Dalším typem

je kvantová tečka, obklopená vnější organickou vrstvou povrchových molekul (ligandy), umožňující solvataci ve vodném roztoku a nesoucí různé reaktivní skupiny – C. Posledním typem je polymerní částice, jež obsahuje několik kvantových teček s povrchovými reaktivními skupinami (základ pro fluorescenčně kódované mikročástice) – D.^{13,14}

Obr.2: Struktura kvantových teček.¹³



2.1.5.2.2 Syntéza kvantových teček

Nejznámějšími nanokrystaly pro biologické účely jsou CdSe a CdSe/ZnS nebo CdTe a CdTe/CdS, přičemž nejvíce prozkoumanou strukturou k dnešnímu dni je právě CdSe/ZnS. Stále intenzivněji jsou však připravovány kvantové tečky, tvořené méně toxickými materiály, jako jsou InP nebo ZnS. Nejvyšší kvality QD jsou připravovány v nevodných rozpouštědlech. Jde však o náročný způsob, takže se prosazuje příprava QD ve vodném prostředí.

Syntéza je založena na vytvoření nanokrystalů v prostředí stabilizujících ligandů, zajišťujících solvataci v reakčním prostředí. V nevodných rozpouštědlech se nejčastěji používá směs trioktylfosfin/trioktylfosfinoxid (TOP/TOPO), ve vodných různé thioley, např. kyselina sulfanylethanová.

QD vznikají smísením vhodných prekurzorů (např. smísení diethylzinku a bis(trimethylsilyl)sulfidu pro CdSe/ZnS) a následným zahříváním na vysokou teplotu. Na takto připravenou nanočástici lze nanést obalovou vrstvu, a tím vytvořit částici core/shell.^{13,14}

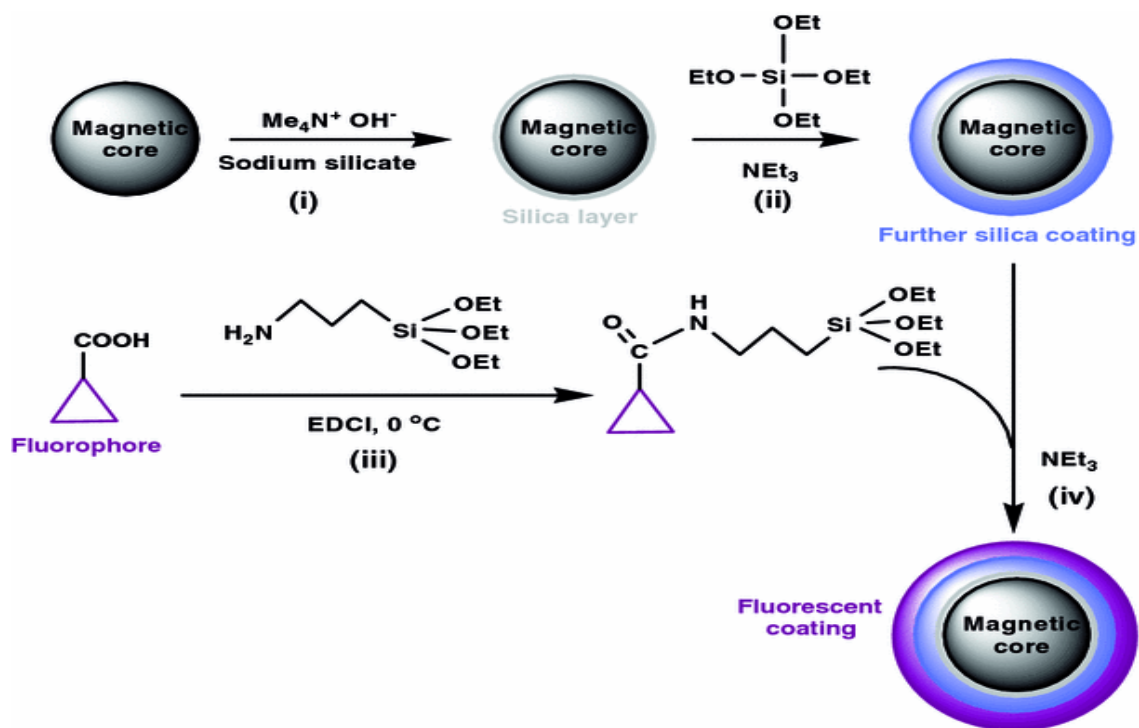
2.1.5.3 Kompozitní nanočástice

Jedná se o nanočástice, které mohou obalovat nanočástice jiných typů. Vytvářejí tak tzv. kompozitní nanočástice. Příkladem mohou být fluoreskující magnetické silikátové nanočástice.

Hydrolyzou tetraethyl orthosilikátu (TEOS) ve vhodném prostředí vznikají nanočástice tvořené polymerním oxidem křemičitým. Jsou vhodné pro např. fluoreskující silikátové nanočástice obsahující různé organické fluorofory. Protože jedna silikátová nanočástice může obsahovat desetitisíce molekul fluoroforu, jasnost částice pak převyšuje jasnost jednotlivých molekul.

Do těchto silikátových částic lze také uzavírat kvantové tečky nebo např. magnetické nanočástice. Tak vzniká magnetická fluorescenční nanočástice, která bývá využívána pro detekci biomolekul spojenou s jejich separací pomocí magnetického pole.¹⁵

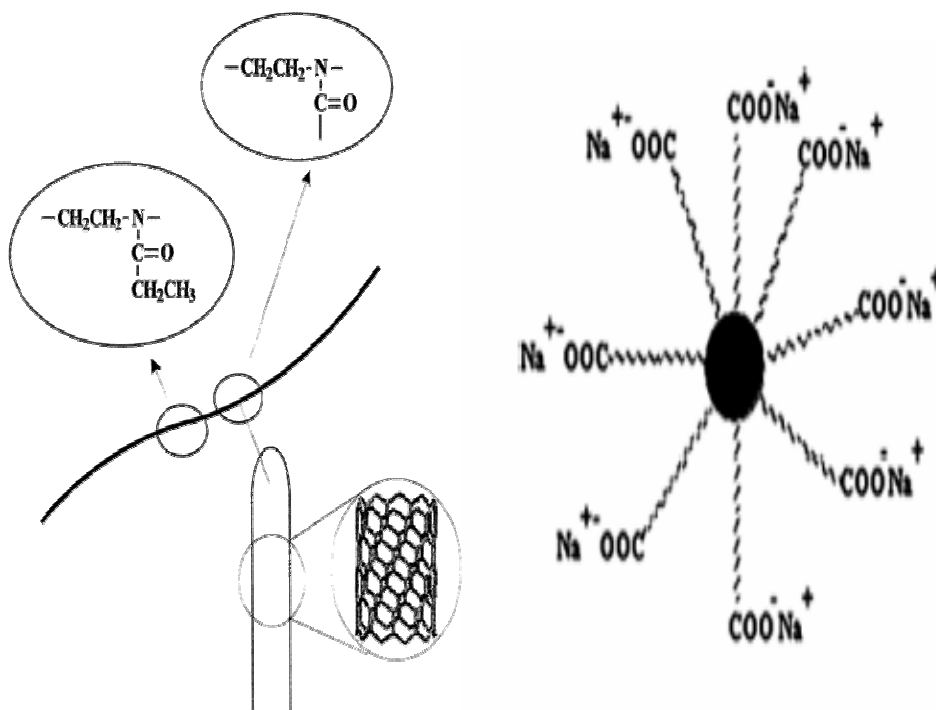
Obr.3: Schéma přípravy fluorescenční magnetické silikátové nanočástice.¹⁶



2.1.5.3 Fluorescenční uhlíkové nanočástice (C-dots) a jejich struktura

Objev uhlíkových nanotrubic v roce 1991 významně přilákal vědeckou pozornost. Mnoho potenciálních aplikací těchto uhlíkových nanotrubiček vyžaduje pochopení jejich vlastností v excitovaném stavu, ale nerozpustnost nanotrubic ve všech rozpouštědlech brání jejich výzkumu. K uhlíkovým nanotubicím je však možno kovalentně připojit vysoce rozpustné lineární polymery. Takovéto roztoky (vodné i organické) vykazují poměrně silnou fluorescenci.¹⁷

Obr.4: Ilustrace polymerně vázaných uhlíkových nanotrubic.^{17,18}



Fluorescenční uhlíkové nanočástice (C-dots) představují novou třídu uhlíkatých zářičů, což významně rozšiřuje použitelnost materiálů na bázi uhlíku. C-dots jsou nanočástice s velikostí menší než 10 nm, fluoreskující již po vybuzení viditelným světlem.¹⁸ Vzhledem k tomu, že C-dots mají velmi dobře definovatelné tvary, malé rozměry a existuje velké množství jednoduchých, levných a rychlých způsobů jejich přípravy využívají se C-dots jako náhrada jiných nanočástic uhlíku, jako je fulleren nebo nanodiamant. Jejich největší potenciál

je však v nahrazování kvantových teček, používaných v současné době, jež jsou na bázi toxických kovů.¹⁹

2.1.5.3.1 Syntéza C-dots

Přípravu C-dots lze obecně rozdělit do dvou hlavních skupin: „top-down“ a „bottom-up“ metody.

„Top-down“ metody spočívají v rozrušování větších uhlíkových struktur a skládají se z těchto kroků: obloukový výboj, laserová ablace a elektrochemická oxidace, zatímco „bottom-up“ metody spočívají v přípravě C-dots z molekulárních prekurzorů, a lze sem zařadit spalovací procesy, syntetické nebo mikrovlnné metody. Povrch C-dots pak bývá oxidován kyselinou dusičnou (HNO_3) a čištěn pomocí centrifugace, dialýzy, elektroforézy, atd.¹⁹

2.1.5.3.2 Aplikace a využití C-dots

2.1.5.3.2.1 „Bioimaging“

Kvantové tečky jako CdSe a s nimi související „core-shell“ QD jsou používány v různých in vivo a in vitro zobrazovacích pokusech.²⁰ Vzhledem k tomu, že jsou však tyto kvantové tečky tvořeny těžkými kovy, jsou C-dots v důsledku svých fluorescenčních vlastností a díky své nízké toxicitě zajímavou alternativou ke zmiňovaným kvantovým tečkám.¹⁹

2.1.5.3.2.2 Fotoredukce kovů

C-dots ve fotoexcitovaném stavu mohou vystupovat jako dárce elektronů, čímž se stávají uplatnitelnými při redukčních reakcích. Jako příklad lze uvést fotoredukci Ag^+ iontů na elementární Ag pomocí vodného roztoku C-dots a AgNO_3 s využitím monochromátoru (Xe oblouková lampa s buzením při 450 nebo 600 nm).²¹

2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ TECHNIKY

2.2.1 Historie

Elektroforéza jako analytická separační metoda byla poprvé představena roku 1937 A. Tisellem, jenž za svou práci obdržel Nobelovu cenu, avšak první experimenty s migrací iontů ve trubici ve tvaru U prováděli lidé již na počátku 19. století. Roku 1857 pak německý fyzik F. Kohlraush odvodil funkci kvantitativně popisující vztah mezi koncentrací a pohyblivostí iontů. První, kdo však použil kapiláru v elektroforéze, byl švédský chemik S. Hjertén. V té době však byly k dispozici pouze kapiláry o průměru 1 mm. Hjertén jimi otáčel kolem své podélné osy, aby minimalizoval účinky konvekce. Začátkem 80. let minulého století použili pro elektroforézu J. W. Jörgenson a K. D. Lukacs kapiláru o vnitřním průměru 75 μm , které se používají dodnes.²²

Dnes elektroforetické techniky dosahují citlivosti 10^{-15} až 10^{-21} mol analytu v nano- až pikolitrových objemech analyzovaných vzorků. Díky této citlivosti a perspektivě bývá kapilární elektroforéza označována jako nejúčinnější separační metoda.

2.2.2 Princip

Kapilární elektromigrační separační metody jsou založené na různé rychlosti migrace iontů ve stejnosměrném elektrickém poli, které je vytvořeno vložением konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody. Tyto techniky jsou v dnešní době souhrnně nazývány jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza – HPCE („high-performance capillary electrophoresis“).

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost, označovaná též jako mobilita, která byla definována jako rychlost pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě :

$$m = v/E \quad (1)$$

kde v je rychlost a E je intenzita elektrického pole.

Intenzita pole v kapiláře je dána jako podíl vloženého napětí a její délky, lze ji však vypočítat také jako podíl procházejícího elektrického proudu prostředím o specifické vodivosti:

$$E = U/l = I/\kappa \quad (2)$$

kde U je napětí, l délka kapiláry, I elektrický proud a κ je specifická vodivost.

Ion s nábojem q je uváděn do pohybu silou elektrického pole F_e :

$$F_e = q \cdot E \quad (3)$$

a proti této síle působí tzv. frikční síla F_f daná Stokesovým zákonem :

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (4)$$

kde r je hydrodynamický poloměr iontu a η je viskozita prostředí.

Pokud dáme tyto proti sobě jdoucí síly v ustáleném stavu do rovnosti, pak platí:

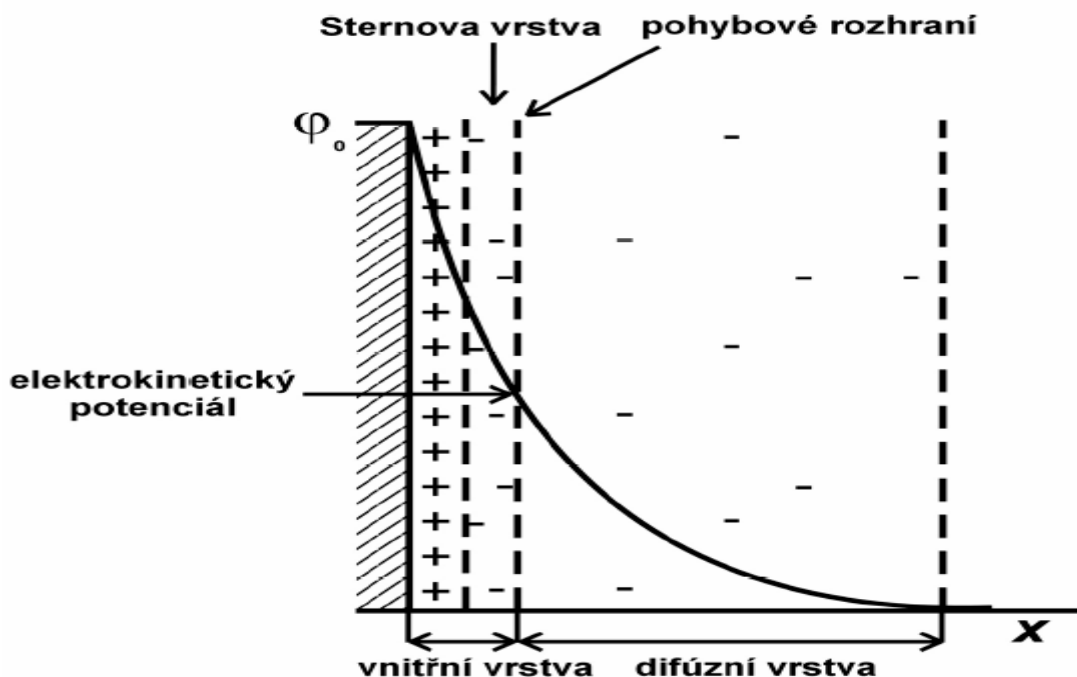
$$m = v/E = q / 6\pi\eta r \quad (5)$$

2.2.3 Vznik elektrické dvojvrstvy a elektroosmotický tok (EOF)

Častým transportním jevem u kapilárních elektromigračních metod je tzv. elektroosmotický tok, vznikající působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry.²⁴

Na tomto rozhraní není intenzita elektrického pole vždy nulová. Naplníme-li křemennou kapiláru roztokem vhodného elektrolytu, dochází na vnitřní stěně kapiláry nejprve k hydrolýze siloxanových skupin za vzniku skupin silanolových a k následné disociaci: $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv \rightarrow \equiv\text{Si-OH} \rightarrow \equiv\text{Si-O}^-$. Vlivem tohoto záporného náboje dochází v těsné blízkosti k uspořádání protiiontů. Tím vzniká elektrická dvojvrstva, která bývá popisována nejčastěji pomocí Gouyho-Chapmanova-Sternova modelu.

Obr.5: Schéma Gouyho-Chapmanova-Sternova modelu uspořádání elektrické dvojvrstvy.⁴



Podle Sterna jsou k vnitřní vrstvě iontů přitahovány adsorpčními a elektrostatickými silami ionty opačného znaménka. Těsně přiléhající vrstva protiiontů (Sternova vrstva) je vázána především adsorpčními silami, zatímco vzdálenější protiionty jsou přitahovány elektrostatickými silami a jsou součástí difúzní vrstvy. Potenciál existující ve vzdálenosti pohybového rozhraní (oddělující pohyblivou – vnitřní a nepohyblivou – difúzní část elektrické dvojvrstvy) je odpovědný za interakci s vnějším elektrickým polem a nazývá se elektrokinetický nebo-li zeta potenciál (ζ -potenciál).

Působením elektrického pole se pohybuje nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale díky vnitřnímu tření v kapalině i veškerý roztok přítomný v kapiláře – Elektroosmotický tok (EOF), který má na rozdíl od hydrodynamického toku téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry.

EOF významně ovlivňuje účinnost separace, migrační rychlost analytů a tím i dobu analýzy. Protože je disociace skupin přítomných na stěně kapiláry ovlivněna pH prostředí (nosného elektrolytu), je i EOF silně závislý na pH elektrolytu při separaci.

Pro rychlost EOF, v_{eo} a pro jeho velikost vztaženou na jednotkovou intenzitu elektrického pole, tzv. elektroosmotickou mobilitu, m_{eo} , platí:

$$v_{eo} = m_{eo} \cdot E \quad (6)$$

$$m_{eo} = \varepsilon \zeta / \eta \quad (7)$$

kde ζ , je elektrokinetický potenciál, η je viskozita roztoku a ε je dielektrická konstanta roztoku.^{4,22-25}

2.2.4 Rozdělení kapilárních elektromigračních metod

Mezi elektromigrační separační metody řadíme těchto sedm základních technik, které se od sebe liší hlavně mechanismem separace a použitým médiem, kterým je kapilára během separace naplněna:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
2. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
3. Bioafinitní kapilární elektroforéza (BACE)
4. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
5. Kapilární elektrochromatografie (CEC)
6. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
7. Kapilární izotachoforéza (CITP)

CZE, CGE, CIEF a CITP lze použít pouze pro separaci iontů, MEKC a CEC jsou vhodné pro ionty, ale i pro neutrální molekuly.^{22-24,26}

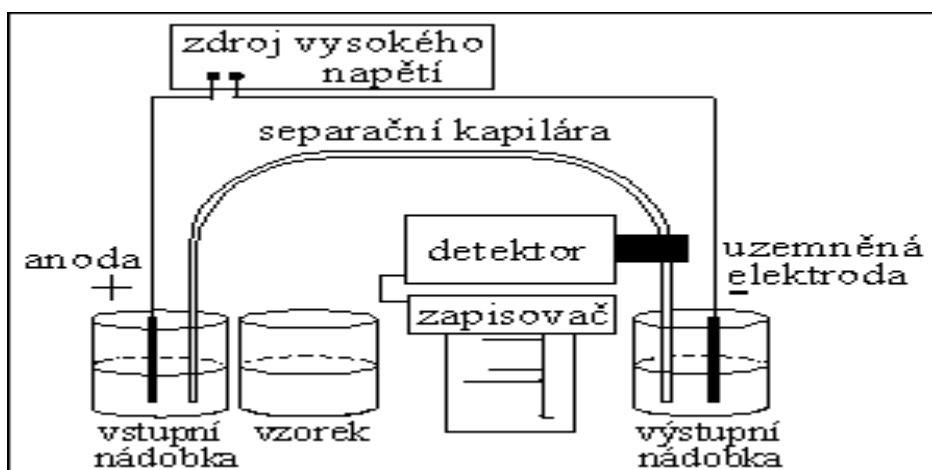
2.2.4.1 Kapilární zónová elektroforéza

Jedná se o nejjednodušší elektromigrační techniku, při které se jednotlivé ionogenní látky lišící se svou pohyblivostí oddělují v homogenním prostředí nosného elektrolytu (background electrolyte – BGE).

Tenká křemenná kapilára je naplněna nosným elektrolytem a její oba konce jsou ponořeny do elektrodových nádobek, které jsou také naplněny tímto elektrolytem. Kapilára má nejčastěji průměr 50 - 75 μm a bývá dlouhá 30 – 80 cm. Díky tomu dosahujeme poměrně dobrého odvodu Jouleova tepla, a proto lze použít vysoké intenzity elektrického pole (desítky kV/m), tudíž i rychlosti separace a účinnost bývají vysoké.

Nejprve se velmi krátký úsek kapiláry naplní roztokem vzorku tak, že vstupní konec kapiláry je umístěn do nádoby se vzorkem a po určité době je vytvořen rozdíl hladin mezi roztokem vzorku a roztokem nosného elektrolytu. Jakmile je zóna vzorku zavedena do kapiláry, je vstupní konec kapiláry opět zaveden do elektrodové nádoby a k systému je připojeno stejnosměrné elektrické pole. Složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými pohyblivostmi směrem k detektoru (nejčastěji UV/VIS absorpční detektor) a na tomto principu jsou od sebe oddělovány.²⁴

Obr.6: Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody.²⁷



2.2.4.2 Kapilární gelová elektroforéza

Tato technika je vhodná zejména pro látky s rozdílnou molekulovou hmotností a velmi podobným specifickým nábojem (náboj vztažený na jednotku relativní molekulové hmotnosti). Mezi takové látky patří např. komplexy bílkovin, polynukleotidy, nukleové kyseliny atd. Separaci těchto látek je potřeba provádět v prostředích vykazující tzv. síťový efekt způsobující zpomalení migrujících částic. Výsledná elektroforetická pohyblivost je tedy dána velikostí částic a látky jsou separovány v pořadí podle vzrůstajících molekulových hmotností.

Síťový efekt poskytují např. polyakrylamidové a agarosové gely, deriváty celulosy, dextran, aj.^{24,28}

2.2.4.3 Bioafinitní kapilární elektroforéza

Polyakrylamidové gely se také používají k imobilizaci ligandů, které selektivně zpomalují určité složky směsi analyzovaných látek. Bioafinitní elektroforéza je založená na kombinaci specifických interakcí typu enzym-inhibitor, antigen-protilátka, hormon-receptor, lektin-sacharid.²⁴

2.2.4.4 Micelární elektrokinetická chromatografie

Kombinovaná metoda využívající jevy elektrokinetické (elektroforézu a elektroosmózu) a chromatografii, vyvinutá především pro analýzu neutrálních molekul. Separace je založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi pseudofází tvořenou micelami ionogenního detergentu (SDS) a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu (v tomto případě mobilní fáze), ve které je pseudofáze homogenně rozptýlena.²⁴

Protože disociované síranové skupiny micel mají záporný náboj, jsou unášeny směrem k anodě spolu s neutrálními analyty, které jsou v micelách rozpuštěny podle své polarity. Micelární fázi velmi často označujeme jako pseudostacionární.

Čím více jsou molekuly analytu rozpuštěny v dutinách micel, tím rychleji jsou touto fází uvnitř nosného elektrolytu unášeny směrem k anodě. Nosný elektrolyt je ale s rozpuštěnými micelami a analyty unášen pomocí EOF ke katodě. Protože je rychlost EOF

větší než elektroforetická pohyblivost micel, je zaručeno, že všechny neutrální analyty budou transportovány směrem ke katodě.²²

2.2.4.5 Kapilární elektrochromatografie

Tato technika je obdobou HPLC s tím rozdílem, že u kapalinové chromatografie je mobilní fáze hnána mechanicky (tlakem) na vstupu do separační kapiláry, kdežto u kapilární elektrochromatografie je tok mobilní fáze realizován EOF.²²

Výhodou oproti HPLC je pravoúhlý profil EOF na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku, avšak díky absenci zpětného tlaku kolony lze využít menších částic sorbentu, a tím zvýšit účinnost separace.²⁴

2.2.4.6 Kapilární izoelektrická fokusace

CIEF umožňuje separaci látek amfoterní povahy podle jejich izoelektrických bodů, tj. podle rozdělení nábojů v molekulách. Migrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na komplexní směsi analytů, tvořících nosný elektrolyt.

Dělené látky migrují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. CIEF provádíme v kapilárách s potlačeným EOF (takové kapiláry jsou potažené na svém vnitřním povrchu vrstvou hydroxyethylcelulosy) a po dosažení ustáleného stavu jednotlivé zóny mobilizujeme např. přetlakem vyvolaným u jednoho z konců kapiláry, aby mohly být identifikovány pevně umístěným detektorem.^{22,24}

2.2.4.7 Kapilární izotachoforéza

Je to elektroforéza, realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů, které se nazývají vedoucí a koncový. Opět se využívají kapiláry nenesoucí žádné disociovatelné funkční skupiny, a tudíž negenerující EOF (potlačený EOF).

Vzorek se dává mezi vedoucí a koncový elektrolyt, a vytváří tak mezi nimi rozhraní. Vedoucí elektrolyt obsahuje ion nesoucí náboj se stejným znaménkem jako analyty a má větší elektroforetickou pohyblivost než všechny separované ionty ve vzorku. Koncový

elektrolyt také obsahuje ion se stejným znaménkem jako analyzované ionty, ale má naopak menší elektroforetickou pohyblivost než všechny analyty ve vzorku.

Po spuštění elektrického napětí migrují kapilárou všechny analyty a ionty z elektrolytů stejnou rychlostí k detektoru. Během migrace se ionty ze vzorku řadí za iontem z vedoucího elektrolytu podle klesajících elektroforetických pohyblivostí, a vytvářejí tak oddělené zóny obsahující vždy pouze jeden analyt. Posloupnost zón analytů pak prochází vodivostním detektorem.²²

2.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA UHLÍKOVÝCH FLUORESCENČNÍCH NANOČÁSTIC

Kapilární elektroforézou lze separovat malé organické nebo anorganické ionty, ale také velké makromolekuly. Zajímavou aplikací je však analýza větších částic, jako jsou buňky, mikroorganismy nebo nanočástice.²⁹

Abychom mohli nanočástice včetně C-dots charakterizovat, potřebujeme informace o jejich složení, struktuře, tvaru, velikosti, což lze zjistit metodami jako je např. elementární analýza, elektronová mikroskopie, IR a Ramanova spektra atd. Těmito technikami však nezjistíme nic o jejich chování ve vodných roztocích s ostatními sloučeninami, což souvisí s chováním nanočástic v buňkách. Tento problém lze řešit pomocí kapilární elektroforézy, která představuje velmi snadný a rychlý způsob charakterizace nanočástic.²

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Jako základní (nosný) elektrolyt byl použit pufr obsahující kyselinu boritou, hydroxid sodný a dodecylsulfát sodný (SDS) a pro testování vlivu iontové síly na chování C-dots byl přidáván roztok chloridu sodného. Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich (St. Louis, USA) v čistotě p.a. Voda se používala deionizovaná, čehož bylo dosaženo přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA).

3.1.2 Kvantové tečky

Pro analýzu byly použity iontové alkyl karboxylátově vázané uhlíkové fluorescenční nanočástice typu C_{SALT}-dots, které byly poskytnuty týmem prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. Použité nanočástice byly dispergovány ve vodě.

3.2 Příprava elektrolytu

Elektrolyt byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny borité v deionizované vodě. Do vzniklého 50 mM roztoku byl poté přidáván za stálého míchání 50 % a 10 % (w/w) roztok hydroxidu sodného až na požadovanou hodnotu pH = 9,5. Hodnota pH byla průběžně zjišťována pomocí pH metru. Výsledný pufr vznikl smísením 100 ml roztoku kyseliny borité vytitrované hydroxidem sodným a předem připraveného roztoku 50 ml 50 mM SDS, který byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství SDS v deionizované vodě.

3.3 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny analýzy byly provedeny na přístroji pro kapilární elektroforézu HP ^{3D}CE s detekcí s diodovým polem DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a s detekcí laserem indukované fluorescence LIF (Picometrics, Toulouse, Francie) pracující při excitační vlnové délce 488 nm. Vlnová délka pro UV detektor byla nastavena na 200 nm (obr. 7). Byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 µm. (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA), jejíž celková délka byla 70,2 cm. Efektivní délka kapiláry byla 20,5 cm (pro UV detektor) a 54,8 cm (pro LIF detektor). Kazeta s kapilárou byla temperována na 25 °C a při zkoumání vlivu teploty na průběh analýzy byla postupně temperována na 40 °C a 60 °C. Dávkování probíhalo po dobu 5 s tlakem 50 mbar. Aplikované separační napětí bylo 30 kV.

Před prvním pokusem byla kapilára propláchnuta 0,5 M roztokem NaOH po dobu 2 minut a následně deionizovanou vodou po dobu 3 minut. Před každou analýzou pak byla kapilára proplachována pufrem po dobu 5 minut. Veškeré proplachování kapiláry bylo prováděno tlakem 925 mbar.

Obr. 7: Fotografie přístroje HP ^{3D}CE Agilent Technologies.



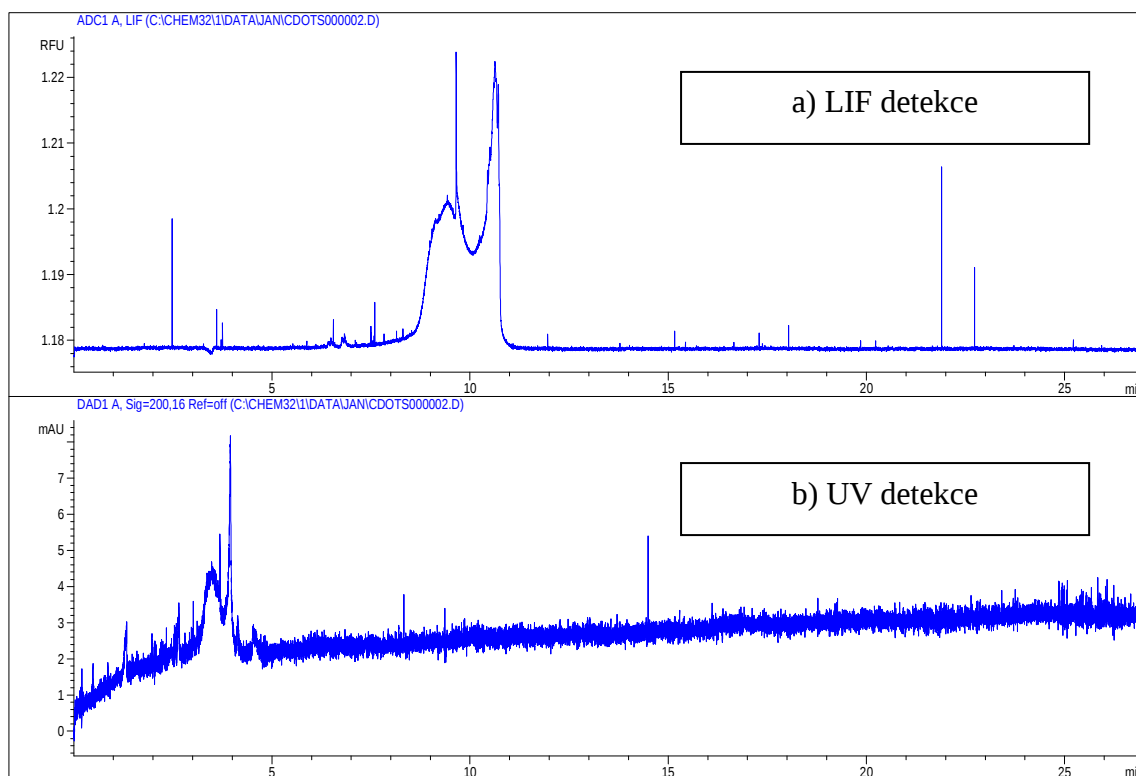
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv elektrolytu na chování C-dots v kapilární elektroforéze

Je zřejmé, že výběr elektrolytu je klíčovým parametrem pro popis chování nanočástic v kapilární elektroforéze. Jako první bylo testováno použití borátového pufru o pH 9,5. Při analýze nanočástic za použití borátu, však docházelo k adsorpci C-dots na povrchu kapiláry a výsledky byly nereprodukovatelné. Adsorpce nanočástic byla potlačena přidávkou 50 mM SDS.²

4.2 Srovnání elektroforegramů za použití DAD detektoru a LIF detektoru

Obr. 8: Elektroforegram s LIF detekcí (a) a UV detekcí (b).

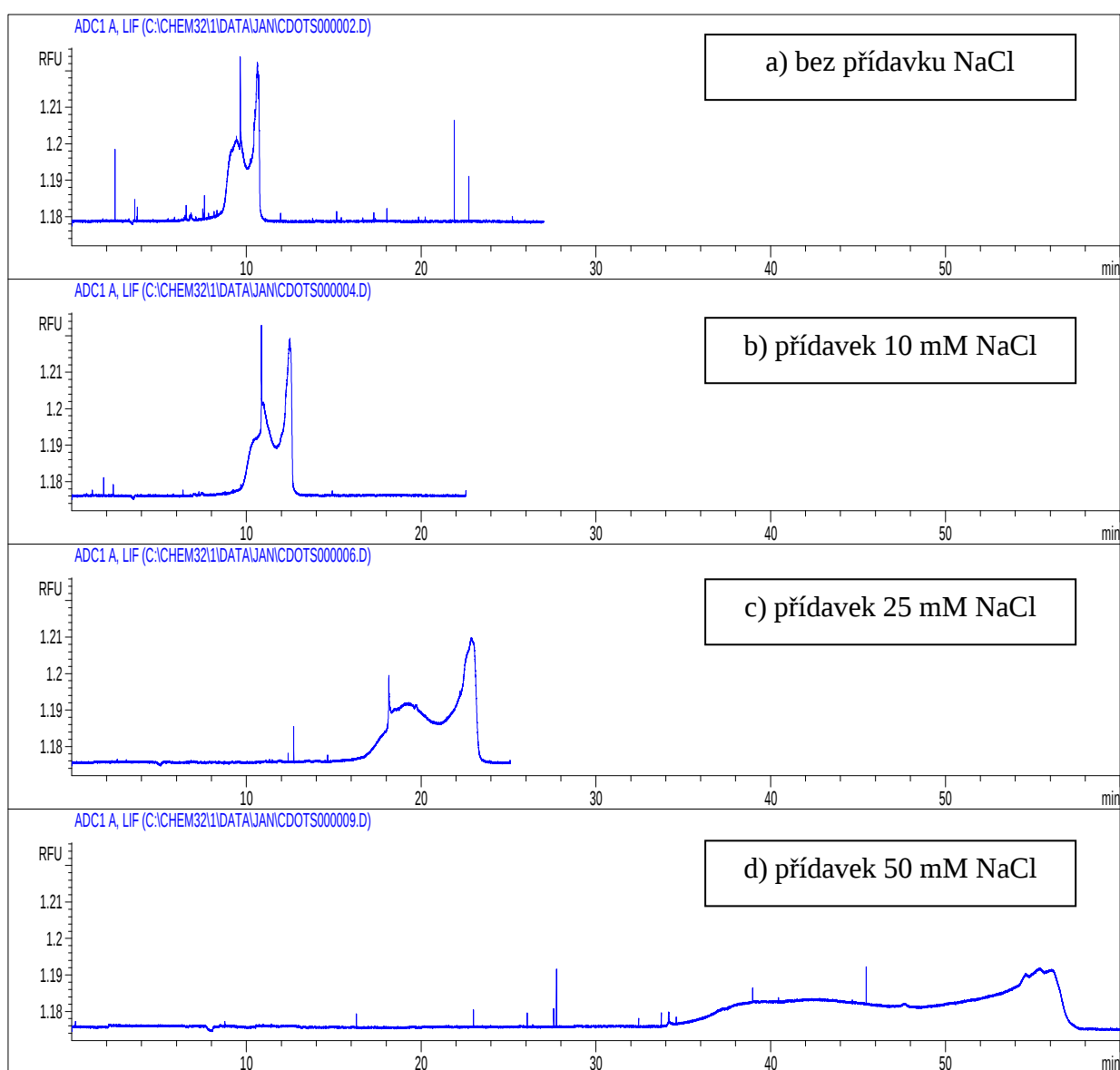


Z uvedených elektroforegramů je jasné vidět, že oba typy detekce jsou vhodné pro identifikaci nanočástic, avšak LIF detektor dosáhl lepší meze detekce. Navíc se jedná o selektivní detektor pro fluoreskující částice, čímž se také zlepšil poměr S/N (signál/šum).

4.3 Efekt přidavkem NaCl

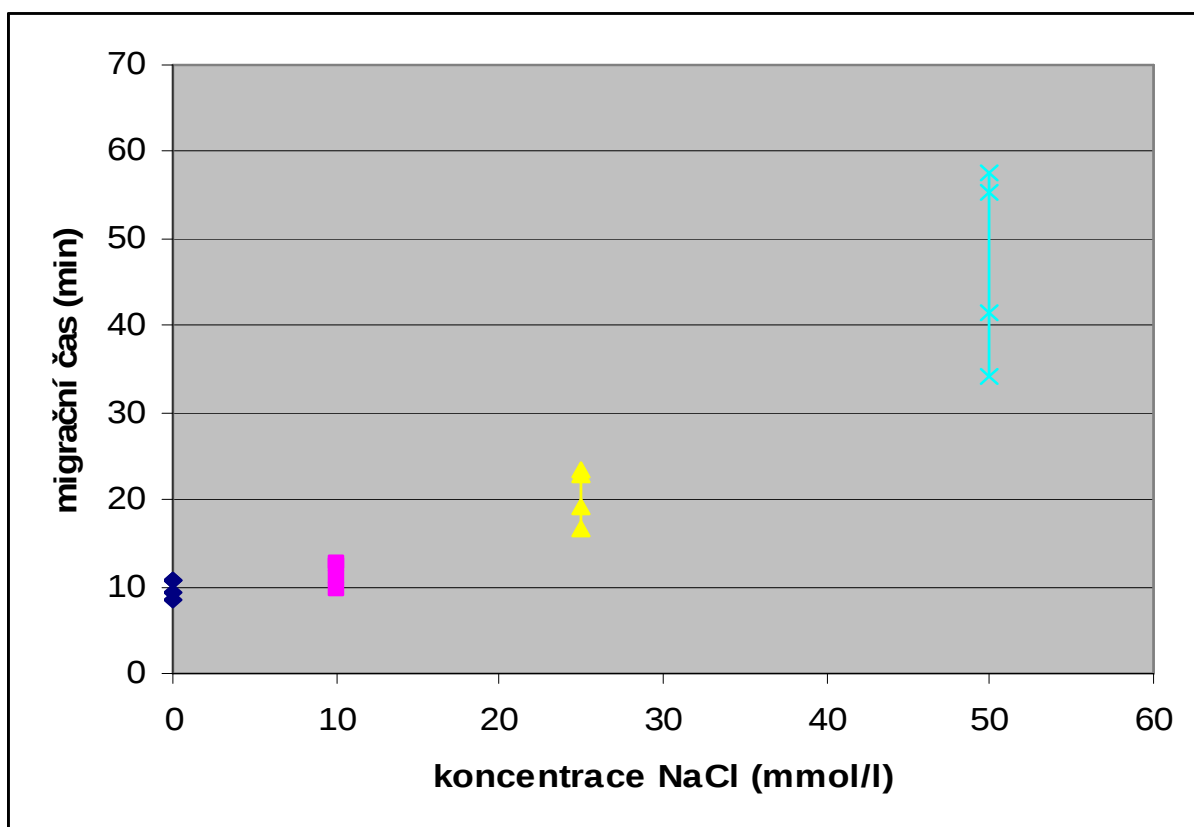
Jak již bylo zmíněno, pro úspěšnou analýzu C-dots je nezbytné použití SDS. Mezi další parametry ovlivňující chování C-dots v kapilární elektroforéze patří: koncentrace SDS, teplota, a také iontová síla elektrolytu. Iontová síla elektrolytu byla upravena přidavkem NaCl o koncentracích 10 mM, 25 mM a 50 mM. NaCl byl použit pro svůj běžný výskyt v biologických vzorcích.

Obr. 9: Vliv iontové síly na průběh analýzy C-dots.



Z uvedených záznamů je patrný vliv iontové síly na průběh analýzy. Snižující se rozptyl vrcholů s rostoucí iontovou silou je pravděpodobně způsoben snižováním tloušťky elektrické dvojvrstvy na C-dots, což má za následek spojování částic. Kromě toho je vidět, jak se s rostoucí iontovou silou dvě viditelné populace slučují do jedné zóny, která však migruje o poznání pomaleji, než dvě od sebe oddělené zóny, které jsou patrné v elektroforegramu a).

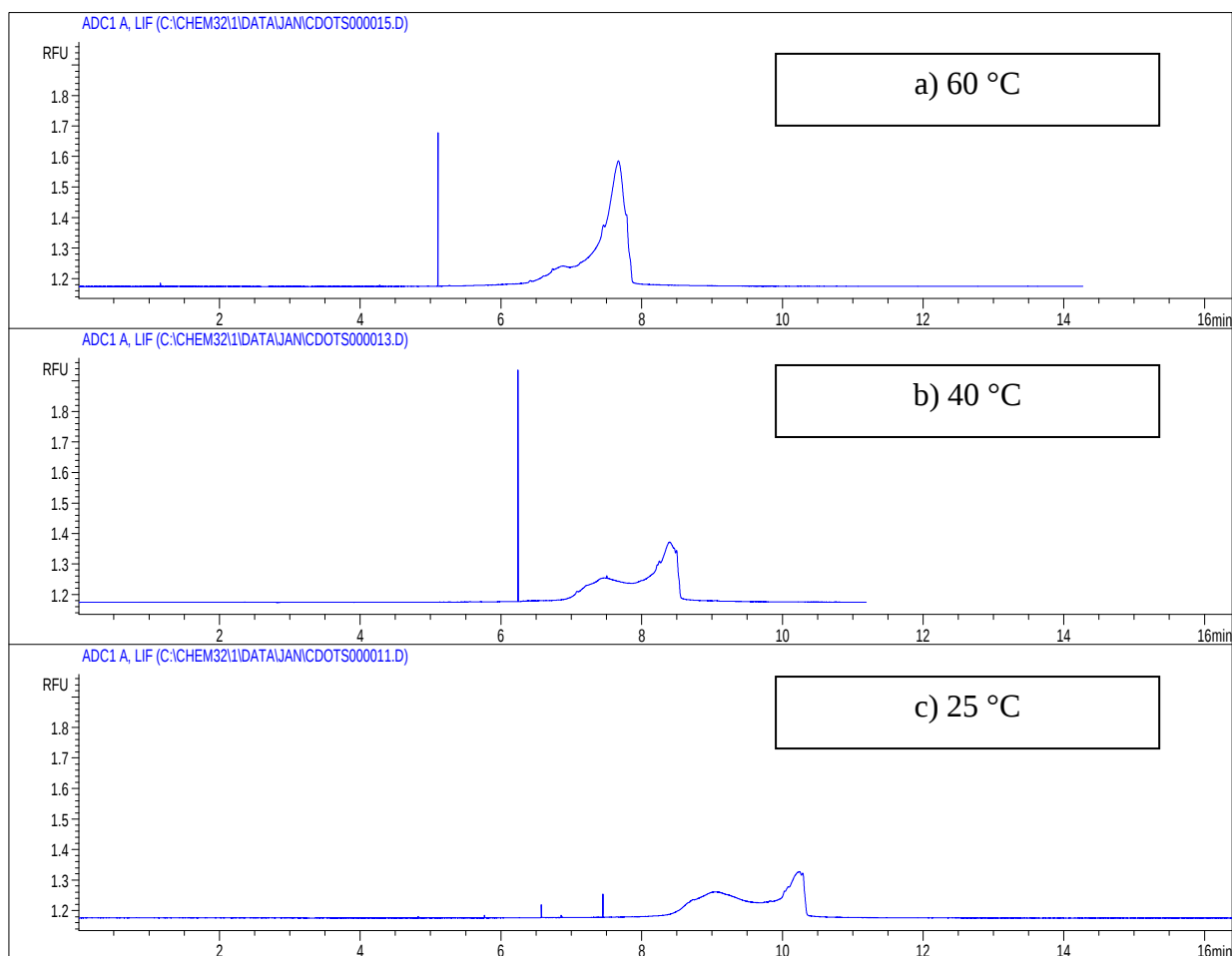
Obr. 10: Závislost změny migračního času na velikosti iontové síly.



4.4 Efekt teploty

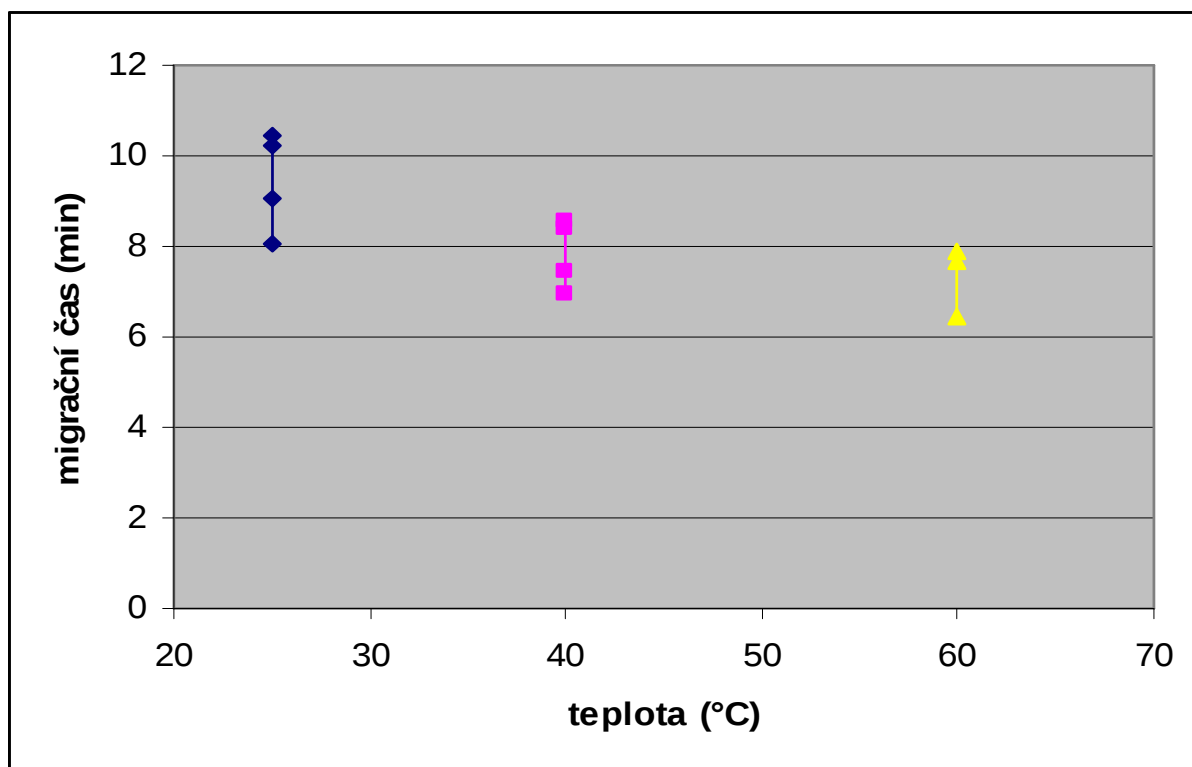
Nakonec byl testován vliv teploty na chování C-dots v kapilární elektroforéze. Testování probíhalo při teplotách 25, 40 a 60 °C, kvůli popisu termodynamické stability zkoumaných nanočástic.

Obr. 11: Vliv teploty na průběh analýzy C-dots.



Z uvedených záznamů je patrné, že s vyšší teplotou dochází k rychlejší migraci nanočástic, což je zřejmě způsobeno změnou viskozity BGE. Avšak se zvyšující se teplotou dochází k restrukturalizaci analyzovaných oblastí, což se projevuje tím, že píky splývají v jeden. Obecně tedy platí, že stabilita nanočástic je závislá na teplotě.

Obr. 12: Závislost změny migračního času na teplotě.



5 ZÁVĚR

V této práci je ukázáno, že kapilární elektroforéza představuje výkonnou techniku pro charakterizaci kvantových teček, zejména bylo zkoumáno chování C-dots, pro jejichž detekci bylo využito UV detektoru, ale také selektivního LIF detektoru.

Kapilární elektroforéza dokáže poskytnout informace o vlivu iontové síly, teplotě nebo typu elektrolytu. Je to tedy vynikající nástroj pro charakterizování koloidních suspenzí nanočástic a lze ji využít např. pro medicínální účely, základní výzkum materiálové chemie a jiné výzkumné aplikace.

6 LITERATURA

1. Klusoň P., Drobek M., Bartková H., Budil I.: Chem. Listy **101**, 271 (2007).
2. Petr J., Stibor O., Ginterová P., Bourlinos A. B., Znalezona J., Maier V., Zbořil R., Giannelis E. P., Ševčík J.: v přípravě.
3. Chi X., Huang D., Zhao Z., Zhou Z., Yin Z., Gao J.: Biomaterials **33**, 189 (2012).
4. Panáček A.: *Řízená příprava a antibakteriální aktivita koloidních částic stříbra*. Doktorská disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci 2006.
5. Řezanka P., Záruba K., Král V.: Chem. listy **101**, 881 (2007).
6. Kvítek L., Panáček A.: *Základy koloidní chemie*. UP Olomouc, Olomouc 2007.
7. Daniel M.C., Astruc D.: Chem. Rev. **104**, 293 (2004).
8. <http://nanotechnologie.vsb.cz>, staženo 26.11.2010.
9. Wang L., Bai J., Huang P., Wang H., Zhang L., Zhao Y.: Electrochem. Commun. **8**, 1035 (2006).
10. http://www.nanocon.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/030.pdf, staženo 24.4.2012.
11. <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>, staženo 17.4.2012.
12. Vacík J.: *Obecná chemie*, SPN Praha 1986.
13. Hlaváček A., Skládal P.: Chem. Listy **105**, 611 (2011).
14. Reiss P., Protière M., Li L.: Small **5**, 155 (2009).
15. http://www.nanobio.cz/articles.php?article_id=6, staženo 26.4.2012.
16. Corr S. A., Rakovich Y. P., Gun'ko Y. K.: Nanoscale Res. Lett. **3**, 91 (2008).
17. Riggs J. E., Guo Z. X., Carroll D. L., Sun Y. P.: J. Am. Chem. Soc. **122**, 5879 (2000).
18. Bourlinos A. B., Stassinopoulos A., Anglos D., Zbořil R., Georgakilas V., Giannelis E. P.: Chem. Mater. **20**, 4539 (2008).
19. Baker S. N., Baker G. A.: Angew. Chem. Int. Ed. **49**, 6727 (2010).
20. Gao X. H., Yang L. L., Petros J. A., Marshal F. F., Simons J.W., Nie S. M.: Curr. Opin. Biotechnol. **16**, 63 (2005).
21. Wang X., Cao L., Lu F. S., Mezziani M. J., Li H., Qi G., Zhou B., Harruff B. A., Kermarrec F., Sun Y. P.: Chem. Commun. **25**, 3775 (2009).
22. Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.

23. Lauer H. H., Rozing G. P.: *High Performance Capillary Electrophoresis, A Primer*. Agilent Technologies, Germany 2009.
24. Kašička V.: Chem. Listy **91**, 320 (1997).
25. Gaš B., Štědrý M., Kenndler E.: J. Chromatogr. **709**, 63 (1995).
26. Jörgenson J. W., Lukacs K. D.: Anal. Chem. **53**, 1298 (1981).
27. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>, staženo 2.5.2012.
28. Baba Y., Matsuura T., Wakamoto K., Morita Z., Nishitsu Z., Tshako M.: Anal. Chem. **64**, 1221 (1992).
29. Svobodová P., Vítková K., Procházka V., Petr J.: Chem. Listy **106**, 1 (2012).

7 SEZNAM ZKRATEK

BACE	bioafinitní kapilární elektroforéza
BGE	nosný (základní) elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
EOF	elektroosmotický tok
GC	plynová chromatografie
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	infračervený
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MRI	magnetická rezonance
QDs	kvantové tečky
SDS	dodecylsírán sodný
TEOS	tetraethyl orthosilikát
TOP	trioktylfosfin
TOPO	trioktylfosfinoxid
UV	ultrafialový
VIS	viditelný