Bakalářská práce

2016 **Iva Bartoňková**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Iva Bartoňková

Analýza a studium interakcí fluorescenčních nanočástic v analytické chemii

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

V Olomouci 26. 4. 2016

---

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce panu doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za výborné vedení a lidský přístup.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Iva Bartoňková
Název práce:	Analýza a studium interakcí fluorescenčních nanočástic v analytické chemii
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Cílem práce je vypracovat přehlednou rešerši na téma nanočástic jejich syntézou a modifikacemi a využitím v analytické chemii. Dále se teoretická část zabývá fluorescencí a zhášením fluorescence pomocí nanotechnologických prvků např. grafen oxidu. Dále je zmíněno studium chování fluorescenčních nanočástic, studium interakce nanočástic s biologicky aktivními molekulami a studium zhášení fluorescence pomocí grafen oxidu.
Klíčová slova:	Grafen oxid, zhášení fluorescence, tenzidy
Počet stran:	36
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author´s first name and surname: Iva Bartoňková

Title: Analysis and study the interactions of fluorescent nanoparticles in analytical chemistry.

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Analytical Chemistry

Advisor: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: The aim of the work is to make an overview of the research on the topic of nanoparticles synthesis, modifications and applications in the analytical chemistry. Furthermore, the theoretical part deals with fluorescence theory and fluorescence quenching using nanotechnological elements for example graphene oxide. Then the thesis mentions the behavior of fluorescent nanoparticles, the study of interaction of nanoparticles with a biologically active molecules and the study of fluorescence quenching using graphene oxide.

Keywords: Graphene oxide, quenching of fluorescence, surfactants

Number of pages: 36

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Obsah

Úvod……..9
1. Teoretická část……10
1.1 Fluorescence…….....10
1.1.1 Luminiscence……...10
1.1.2 Fosforescence……10
1.1.3 Fluorescence……10
1.1.4 Fluorescenční barviva……11
1.1.4.1 Fluorescein FITC – fluorescein isothiokyanát……..11
1.1.4.2 Rhodamin B……..12
1.1.5 Měření fluorescence……...13
1.1.5.1 Fluorescenční mikroskopie……13
1.1.6 Zhášení fluorescence……..13
1.1.6.1 Statické zhášení fluorescence…….....13
1.1.6.2 Dynamické zhášení fluorescence……..13
1.1.6.3 Samozhášení fluorescence…….....14
1.1.6.4 Zhášení fluorescence pomocí grafen oxidu……...14
1.2 Grafen oxid……..14
1.2.1 Syntéza grafen oxidu……...……..16
1.2.2 Použití grafen oxidu……...……16
1.2.2.1 Detekce glukosy v lidském séru...……16
1.2.2.2 Stanovení rtuti v potravinách a životním prostředí……...17
1.2.2.3 Detekce lidského trombinu……17
1.3 Tenzidy……18
1.3.1 Aniontové tenzidy……..18
1.3.2 Kationtové tenzidy……18
1.3.3 Amfoterní tenzidy……..19
1.3.4 Neiontové tenzidy……..……19
1.3.5 Ovlivňování fluorescence pomocí tenzidů……19
1.4 Zónová elektroforéza……...……20
1.4.1 Pohyb nabité částice v elektrickém poli……21
1.4.2 Kapilární zónová elektroforéza……..21
1.4.2.1 Separační kapiláry……...……..22
1.4.2.2Dávkování vzorku……..22
1.4.2.3 Detekce……..23
2. Experimentální část……..……...24
2.1 Cíle práce……...……24
2.2 Vybavení……24
2.2.1 Použité chemikálie……...……..24
2.2.2 Příprava roztoků……..……25
2.3 Výsledky a diskuze……26
2.3.1 Detekce fluoresceinu……..……26

2.3.2 Pozorování fluorescence s roztokem dodecylsíranu sodného (SDS)……..…26
2.3.3 Pozorování fluorescence s roztokem hexamethylammonium bromidu (CTAB)……..26
2.3.4 Pozorování fluorescence s roztokem polyethylenglykolu (PEG)……..27
2.3.5 Pozorování fluorescence s roztokem polyvinylalkoholu, fluorinertu a asolektinu (neiontové tenzidy)……..27
2.3.6 Pozorování fluorescence s roztokem Genapolu X-080, Brije a Tritonu X-114 (neiontové tenzidy)……27
2.3.7 Pozorování fluorescence s roztokem Brij v různých koncentracích……..28
2.3.8 Pozorování fluorescence s roztokem Triton X-114 v různých koncentracích...28
2.3.9 Zkoušení zhášení proteinů……...……..28
2.3.10 Zhášení fluorescein isothiokyanátu (FITC) a 8-anilino-1-naftalensulfonové kyseliny (ANS)……..29
2.3.11 Rozsvěcování 8-anilino-1-naftalensulfonové kyseliny (ANS)……29
2.3.12 Rozsvěcování pomocí cyklodextrinu, celulózy, dextrózy a PEG……29
2.3.13 Zhášení fluorescence jinými látkami než GO……..29
2.3.14 Rozsvěcování oxidů železa……..30
2.3.15 Stanovení nejnižší koncentrace glukózy……...……30
2.3.16 Rozsvěcování GO s tenzidem pomocí glukózy……...……31
Závěr……33
Přehled použitých zkratek……...……34
Použitá literatura…….35

Úvod

Nanočástice jsou jedny z nejvíce diskutovaných látek dnešní doby. Velký zájem vyvolávají pro své pozoruhodné elektrické, optické, vodivostní, mechanické a biologické vlastnosti. Tvarem rozlišujeme několik typů nanočástic, jsou to například nanotrubičky, nanovlákna, nanotečky atd. Jejich velikost je na úrovni součásti buněk např. DNA. Použití nanočástic se během posledních dob dostalo téměř do všech odvětví průmyslu: elektrochemický (výroba polovodičů), textilní, potravinářský, automobilový. Dále je možno nanočástice využít v lékařství, biomedicíně a farmacii například: v diagnostice nádorových onemocnění, detekce se značením krve a moči, specifická distribuce léčiv pomocí liposomů a mnoho dalších. Pro všechny své pozoruhodné vlastnosti jsou nanomateriály látky, které se směle nazývají materiály budoucnosti.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 FLUORESCENCE

1.1.1 Luminiscence

Luminiscence je vyzařování elektromagnetického záření, po předchozím dodání energie. Luminofor („světélkující“ látka) nejdříve přijme energii (světelnou, tepelnou…) a přejde do excitovaného stavu. Excitovaný stav je nestabilní, a proto snadno přechází zpět do základního stavu za současné emise světla. Druhy luminiscence dělíme podle typů budící energie příkladem je radioluminiscence, chemiluminiscence, termoluminiscence, elektroluminiscence apod.[1] Dále rozdělujeme Luminiscenci podle typu emitovaného záření na fosforescenci nebo fluorescenci.

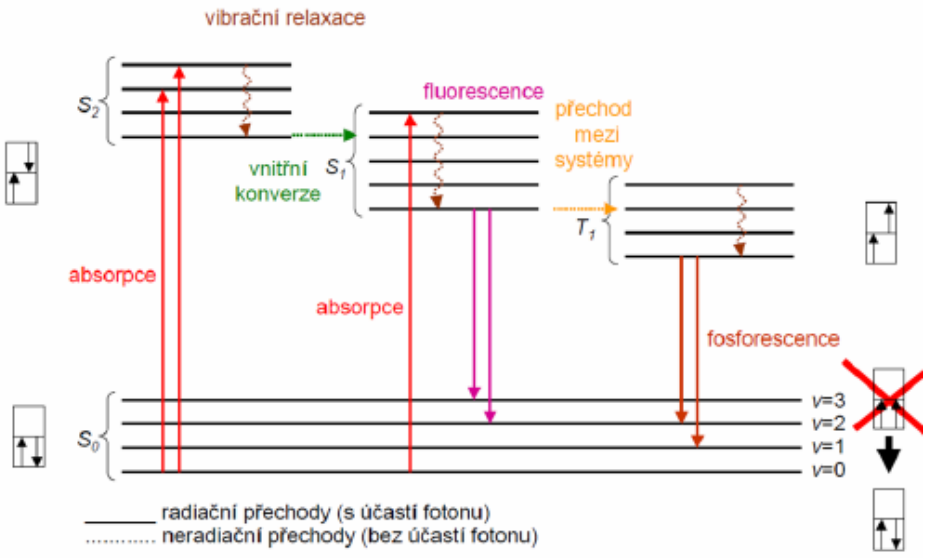
1.1.2 Fosforescence

Při fosforescenci dochází k emisi světla z tripletních excitačních stavů. Tyto přechody jsou velmi pomalé a jejich trvání je okolo milisekund. Rozdíl mezi fluorescencí je takový, že v průběhu fosforescence není veškerá energie okamžitě uvolňována, ale naopak je ukládána do tzv. “zásobníků“ a z nich je poté uvolňována po menších částech.[2]

1.1.3 Fluorescence

Fluorescence je spontánní emise záření trvající v řádech ns. Princip fluorescence spočívá v tom, že fotony, které jsou součástí světla, jsou schopny předávat energii elektronům obsažených v různých molekulách. Toto předání energie se v molekule projevuje tak, že elektron je přesunut do vyšší energetické hladiny takzvaně dojde k excitaci elektronu. Tento stav ale není stabilní, po nějaké době dojde k uvolnění energie. Z části se energie uvolní ve formě tepla a zbytek ve formě světelné. Tento jev, ale není pozorovatelný pouhým okem ani mikroskopem. Z toho důvodu se používají různá fluorescenční barviva. Jsou to molekuly obsahující velké množství elektronů, které lze snadno excitovat a následně pozorovat uvolňování energie ve formě světla. Jako fluorescenční barviva se nejčastěji používají aromatické sloučeniny a heterocykly např:[3] fluoresceiny, rhodaminy, kumariny, pyreny atd. K měření fluorescence se používá například fluorescenční spektrometr, přičemž fluorescenční spektra představují

závislost intenzity fluorescence na vlnové délce. Emisní spektra různých látek se značně liší a jsou závislé na chemické struktuře fluoroforu a rozpouštědla, ve kterém je daný fluorofor rozpuštěn. Procesy absorpce a emise jsou znázorňovány tzv. Jablonského diagramy (Obr. 1.1). Dochází k dvěma typům přechodů. Nezářivé přechody, v tomto typu se molekula zbavuje získané energie jinak než přechodem mezi elektronovými hladinami. K nezářivým přechodům řadíme: 1) Vnitřní konverzi, kde dochází k přechodům S→S a T→T, ale nedochází ke změnám spinu a 2) Mezifázový přechod, kde dochází k přechodům S→T nebo T→S, dochází ke změnám spinu. Druhý typ přechodů nazýváme zářivé přechody. K zářivým přechodům řadíme fluorescenci, kde dochází k emisi fotonu $S_1 \rightarrow S_0$ a fosforescenci, kde dochází k emisi fotonu $T_1 \rightarrow S_0$. [4]



Obrázek 1.1: Jablonského diagram

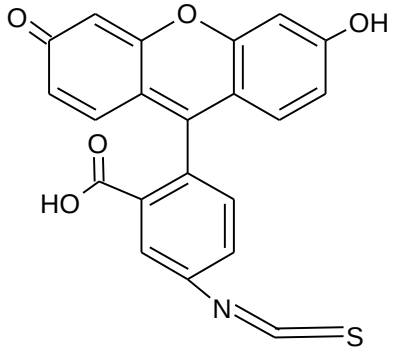
1.1.4 Fluorescenční barviva

1.1.4.1 Fluorescein isothiokyanát

Fluorescein isothiokyanát (FITC) (Obr. 1.2) je jeden z nejvíce používaných fluoroforů, byl syntetizován v roce 1871. FITC je červeno oranžový prášek rozpustný ve vodě, alkoholech a etherech, nezůstává zadržován v tělních buňkách. Ve vodném prostředí mění barvu v závislosti na absorpci záření ze žluté na zelenou. Ve velmi koncentrovaných roztocích je červený. Jeho absorpční maximum je okolo 494 nm a emisní maximum 521 nm.[5] FITC se používá ke značení proteinů, kyano skupina reaguje

s aminoskupinou na proteinu, a dojde navázání FITC. Takto značený protein je možné snímat například pomocí fluorescenční mikroskopie.

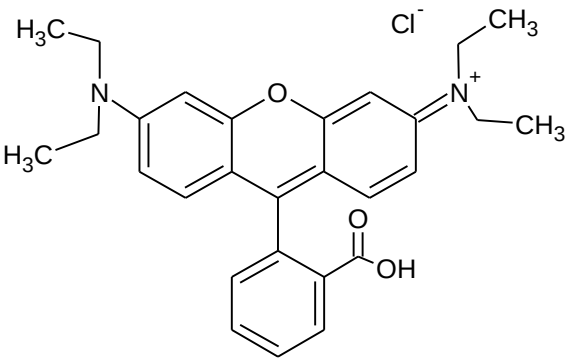
Systematický název je *3´6´-dihydroxy-6-isothiocyanatospiro[2-benzofuran-3´9´-xanthan]-1-on*



Obrázek 1.2: Strukturní vzorec fluoresceinisothiokyanátu

1.1.4.2 Rhodamin B

Rhodamin B (Obr.1.3) je červený lesklý prášek rozpustný v alkoholech. Jeho fluorescence závisí na teplotě, absorpční maximum je okolo 610 nm.[5] Systematický název je *[9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammonium chlorid*



Obrázek 1.3: strukturní vzorec rhodaminu B

1.1.5 Měření fluorescence

1.1.5.1 Fluorescenční mikroskopie

Ve fluorescenční mikroskopii se získávají obrazy buněk připojením velkého počtu fluorescenčních molekul na proteiny, nukleové kyseliny a membrány. Měří se intenzita fluorescenčního záření, kterou daná látka vyzařuje. Jako fluorofor se například používá tzv. zelený fluorescenční protein GFP, což je směs cca 238 aminokyselin. Před vlastním měřením je nutné zbavit vzorek veškerých nečistot, které by mohly fluorescenci ovlivňovat.[2]

1.1.6 Zhášení fluorescence

Zhasnutí fluorescence vede k snížení intenzity záření tzn. snížení kvantového výtěžku, což je počet světelných kvant emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu, ale nemění emisní spektrum. Rozlišujeme tři typy zhášení fluorescence: statické, dynamické a samozhášení.

1.1.6.1 Statické zhášení fluorescence

Při kontaktu fluoroforu a zhášedla dochází k tvorbě komplexu, který nevykazuje fluorescenci. Intenzita fluorescence je závislá na velikosti koncentrace zhášedla a nazývá se asociační konstanta (K_S).

$$K_S = \frac{[F - Q]}{[F][Q]}$$

Kde [F – Q] je koncentrace komplexu [F] je koncentrace fluoroforu mimo komplex a [Q] koncentrace zhášedla. Typickými statickými zhášedly jsou báze nukleových kyselin, nikotinamid, těžké kovy a guanin.[5]

1.1.6.2 Dynamické zhášení fluorescence

Intenzita fluorescence fluoroforu je deaktivována srážkou s molekulou srážedla. Molekuly nejsou v případě této srážky nijak chemicky měněny na rozdíl od statického zhášení. Dynamické zhášení fluorescence vyjadřuje Sternova – Volmerova rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

Kde F_0 je kvantový výtěžek fluorescence bez použití zhášedla, F je kvantový výtěžek fluorescence s použitím zhášedla, k_q je zhášecí konstanta, τ_0 je doba fluorescence bez použití zhášedla a Q je koncentrace zhášedla. Typickými dynamickými zhášedly jsou kyslík, halogenidy a akrylamid.[5]

1.1.6.3 Samozhášení fluorescence

Jedná se o zhášení fluoroforu jím samotným. K tomuto jevu může docházet při vysokých koncentracích fluoroforu nebo při vysoké hustotě značení.[5]

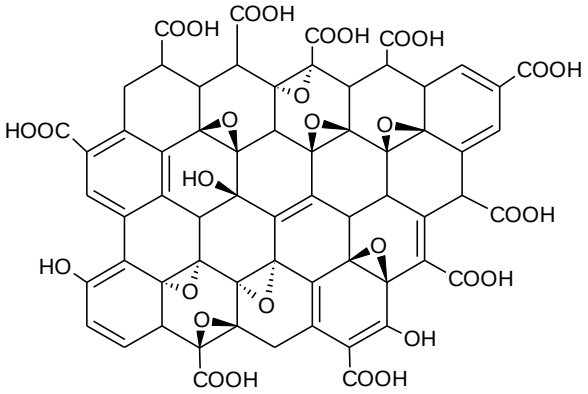
1.1.6.4 Zhášení fluorescence pomocí grafen oxidu

Molekula grafen oxidu (GO) je sama fluorescenční, přesto dokáže „zhasnout“ ostatní fluorescenční barviva. GO zhasne molekulu tak, že se adsorbuje na její povrch. Zhasnutou molekulou mohou být barviva nebo konjugované polymery. Efektivita zhášení je významně ovlivněna redukcí grafen oxidu na redukovaný grafen oxid (rGO). Zatímco GO vykazuje i po zhasnutí vzorku vlastní slabou fluorescenci, tak rGO již žádnou fluorescenci nevykazuje. Metoda zabývající se pozorováním zhášení fluorescence se nazývá fluorescenční zhášecí mikroskopie (FQM). GO byl použit jako substrát v Ramanově spektroskopii, což vedlo k výraznému zlepšení odezvy signálu. Díky přítomnosti iontových a aromatickým skupin, může GO reagovat s různými typy biomolekul. Což vede k vyvíjení různých testů pro značení a snímání molekul v živých organismech.[6]

1.2 GRAFEN OXID

Grafen oxid (Obr. 1.4) byl objeven Oxfordským chemikem Benjaminem Brodiem v roce 1859. Jedná se o dvourozměrnou vrstvičku grafitu o tloušťce jednoho atomu rozpustnou v bazické prostředí. Obsahuje uhlíky v hybridizaci sp^2 a sp^3. Vykazuje zajímavé elektrické vlastnosti. Zatímco molekula GO je nevodivá, tak po řízené oxidaci dochází ke vzniku elektricky vodivého $_r$GO. Zájem budí také pro své pozoruhodné mechanické a teplotní vlastnosti. Ty jsou dány přítomností funkčních skupin. Grafen oxid se vyrábí oxidací grafenu pomocí roztoku koncentrované kyseliny sírové a

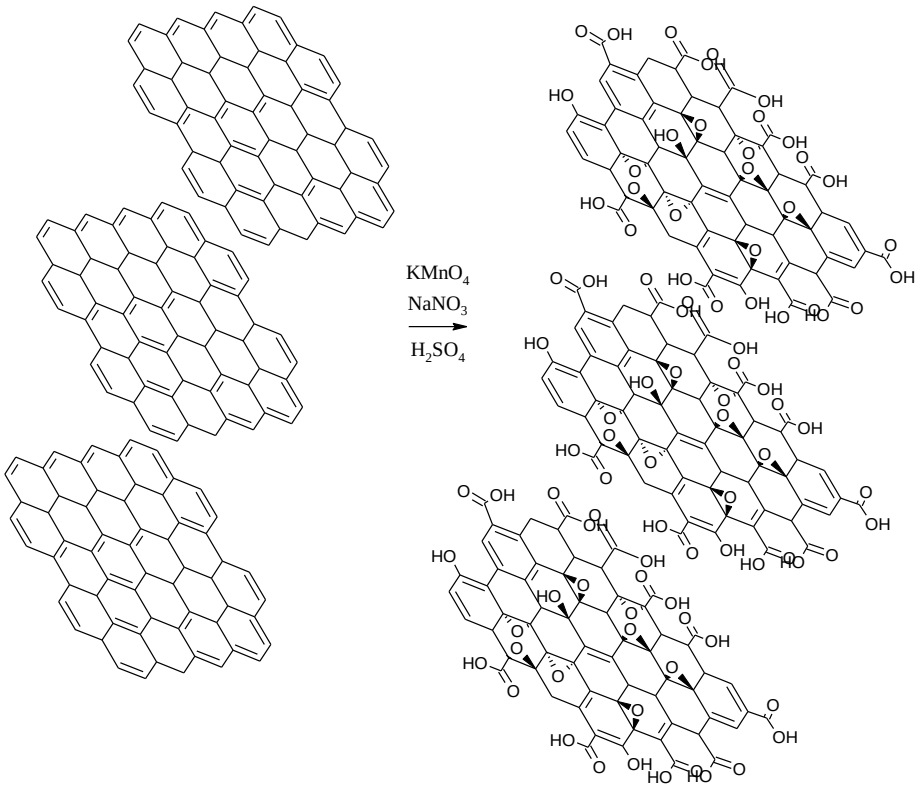
manganistanu draselného. Na rozdíl od čistého grafenu vykazuje grafen oxid fluorescenci v širokém rozsahu vlnových délek a to díky své heterogenní struktuře.[7]



Obrázek 1.4: Vzorec strukturní jednotky grafen oxidu

1.2.1 Syntéza Grafen oxidu

První syntéza grafen oxidu byla popsána v roce 1859 Benjaminem Brodiem, grafen oxid vznikal postupným přidáváním chlorečnanu draselného k suspenzi grafitu v dýmavé kyselině dusičné. V roce 1898 obměnil stávající postup Staudenmaier a to tak že reakci nechal probíhat ve směsi koncentrované kyseliny sírové a dýmavé kyseliny dusičné a k reakční směsi obsahující suspenzi grafitu postupně přidával chlorečnan draselný. Touto malou změnou vznikl vysoce oxidovaný grafen oxid. V roce 1958 byla publikována nová Hummerova syntéza (Obr. 1.5) připravující grafen oxid reakcí s použitím práškového grafitu, manganistanu draselného a dusičnanu sodného v koncentrované kyselině sírové.[8]



Obrázek 1.5 syntéza grafen oxidu dle Hummera

1.2.2 Použití grafen oxidu

1.2.2.1 Detekce glukosy v lidském séru

V lidském organismu dochází k tvorbě nekovalentní silné vazby mezi nukleobázemi DNA a GO. Tvorba této vazby může být využita k detekci enzymové aktivity, DNA, bílkovin, cukrů, kovových iontů a mnoho dalšího. Při detekci cukrů, konkrétně glukózy

dochází k tomu, že v lidském organismu katalyzuje enzym glukosa-oxidasa oxidaci glukosy a zároveň vytvoření hydroxyl radikálu. Tento radikál nevratně štěpí jedno vláknovou DNA, která je označená karboxy-fluoresceinem, k tomuto štěpení dochází však pouze v přítomnosti glukosy. Interakce mezi GO a krátkou (štěpenou) DNA je nižší než interakce mezi GO a dlouho (neštěpenou) DNA. Dojde k menšímu zhasnutí fluorescence. Změny fluorescence jsou závislé na přítomnosti glukosy, čím větší je koncentrace glukosy, tím větší zhasnutí pozorujeme.[9]

1.2.2.2 Stanovení rtuti v potravinách a životním prostředí

Rtuťnatý iont (Hg^{2+}) je velmi toxický kov. V lidském organismu působí především na nervový sytém a vnitřní orgány. Dokonce i při nízkých koncentracích ohrožuje životní prostředí a lidské zdraví. Při stanovení rtuti se postupuje tak, že GO byl naadsorbován na oligonukleotid (tymin) a tím došlo k zhasnutí fluorescence. V případě, že by byla přítomna rtuť, došlo by k vytvoření duplexu T-Hg^{2+}-T, který nedovolí absorpci GO na povrch a dojde k obnovení fluorescence. V případě nepřítomnosti rtuti by roztok zůstal zhasnutý.[10]

1.2.2.3 Detekce lidského thrombinu

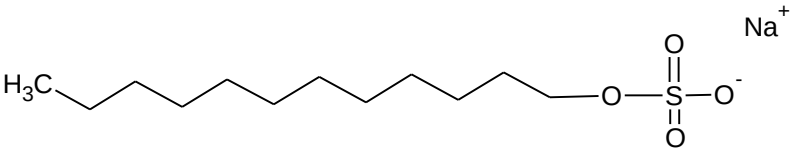
GO je schopný tvořit silné nekovalentní vazby s nukleobázemi a aromatickými sloučeninami. Předpokládá se, že ve vzorku, kde je obsažena jednovláknová DNA (obsahující thrombin) spolu s fluoroforem, dojde po přidání GO k jeho navázání na DNA a zhasnutí roztoku. Po přidávání nadbytku DNA (obsahující thrombin) však dojde k opětovnému rozsvícení vzorku. Intenzita fluorescence je úměrná koncentraci thrombinu v DNA. K pětinásobnému zvýšení fluorescence dojde po přidání cca 10nM thrombinu. Nejnižší koncentrace thrombinu, kdy bylo možné pozorovat fluorescenci je okolo 2,0nM thrombinu. Pomocí grafen oxidu byly detekovány i další bílkoviny jako například: lidský albumin, hovězí albumin, lidský imunoglubulin G a hovězí thrombin. Všechny byly testovány v koncentracích 100 nM. Žádný z nich ale nevykazoval tak vysokou intenzitu fluorescence jako lidský thrombin.[11]

1.3 TENZIDY

Tenzid je organická látka, která je schopna se hromadit na fázovém rozhraní, i při nízké koncentraci, a tím snižovat mezifázovou energii soustavy. Proto jsou tenzidy nazývány jako povrchově aktivní látky. Molekula tenzidů se skládá z hydrofilní (polární) a hydrofobní (nepolární) části, tato část je složena z dlouhého uhlíkatého řetězce, ten může být lineární nebo větvený a může obsahovat aromatické kruhy. V závislosti na povaze hydrofilní skupiny dělíme tenzidy na kationtové, aniontové, amfoterní a neiontové. Dále poté na detergenty, což jsou směsi tenzidů a dalších látek, které jsou schopny převádět nečistoty z povrchu do objemové fáze, saponáty neboli syntetické tenzidy, saponiny (gykosidické tenzidy), které jsou obsaženy v rostlinách. Pokud koncentrace překoná určitou hodnotu nazývanou kritická micelární koncentrace a určitou teplotu, začnou se molekuly shlukovat do vodných nebo částečně vodných roztoků a vytvoří koloidní micely.[12]

1.3.1 Aniontové tenzidy

Aniontové tenzidy jsou největší skupina tenzidů. Nejznámějším aniontovým tenzidem je natrium-sek-alkylbenzensulfonát. Nejčastěji se používá v práškových mycích a pracích prostředcích. Dalšími tenzidy jsou například α-olefinsulfonáty (OAS), které se nejčastěji používají v kapalných pracích prostředcích. Další skupinou jsou například natrium-alkylsulfáty, kam patří dodecyl síran sodný (SDS) (Obr. 1.6). SDS je součástí téměř všech mycích prostředků a je jedním z nejpoužívanějších tenzidů v chemii. Můžeme ho také zařadit do skupiny esterifikovaných tenzidů.[12]

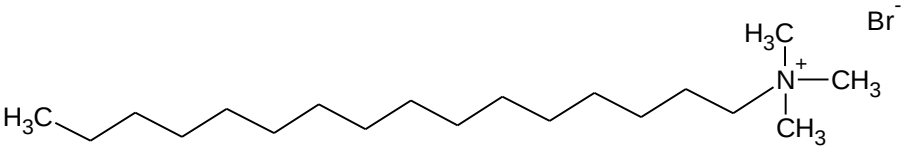


Obrázek 1.6: Strukturní vzorec SDS

1.3.2 Kationtové tenzidy

Kationtové tenzidy se vyskytují nejčastěji ve formách kvartérních amoniových solí. Například hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB) (Obr. 1.7). Tyto tenzidy jsou často používány v laboratořích hlavně pro svou vysokou povrchovou aktivitu.[12] Dále tento druh tenzidů vykazuje antiseptické a dezinfekční účinky, ničí mikrobiální

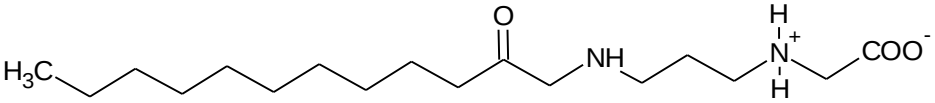
organismy. Oproti aniontovým tenzidům se vyznačují velkou variabilitou uspořádání molekul.[13]



Obrázek 1.7: Strukturní vzorec CTAB

1.3.3 Amfoterní tenzidy

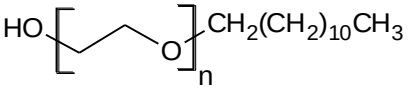
Ve své molekule obsahují jak aniont, tak kationt. Součástí šamponů je l-(3-lauroylaminopropyl)-l,l-dimethylacetobetain (Obr. 1.8).[12]



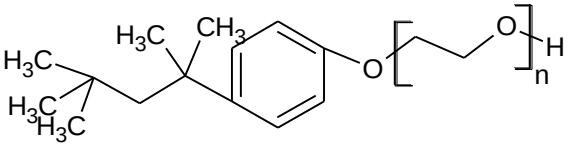
Obrázek 1.8: strukturní vzorec l-(3-lauroylaminopropyl)-l,l-dimethylacetobetainu

1.3.4 Neiontové tenzidy

Uplatňují se v nepěnivých mycích a pracích prostředcích z toho důvodu, že jejich koncové skupiny nejsou tolik hydrofobní. Do této skupiny látek patří například: Polyethylenglykolmonoisotridecyl ether (Genapol X080) (Obr. 1.9), polyoxyethylen monooctylfenyl ether (Triton X114) (Obr. 1.10).[12]



Obrázek 1.9: strukturní vzorec Genapolu X080



Obrázek 1.10: strukturní vzorec Tritonu X114

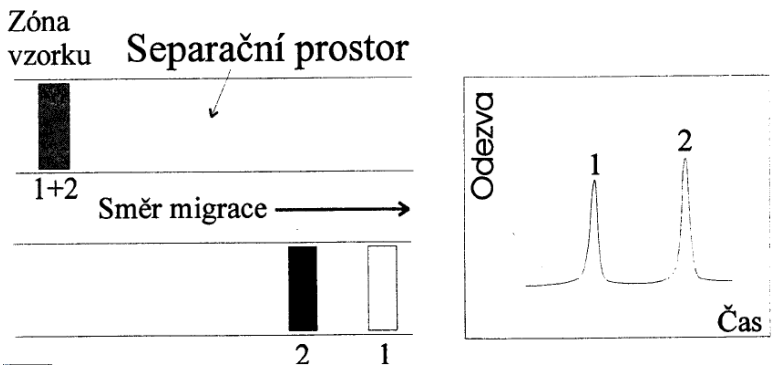
1.3.5 Ovlivňování fluorescence pomocí tenzidů

Přidáním neiontových nebo kationtových tenzidů k fluoreskujícím komplexům s kovy se výrazně zlepšuje detekce fluorescence. Po přidání tenzidů je výsledná mez detekce fluorescence až desetkrát nižší než u běžných detekčních metod. Nejvíce zkoumaným

kovem byl hliník. Po přidání CTAB k fluoreskujícímu roztoku komplexu hliníku se intenzita fluorescence nezvyšovala, nýbrž se výrazně snižovala. Naopak přidání neiontového tenzidu Genapolu způsobilo pozoruhodné desetinásobné zlepšení detekce fluorescence ve srovnání s jinými metodami. Vazba mezi komplexem a Genapolem však není příliš silná, protože se nedá spektrofotometricky zachytit. Intenzita a doba fluorescence je závislá na množství přidaného tenzidu. Pokud je koncentrace tenzidu vyšší než 0,5% je maximum intenzity fluorescence dosaženo po 1,5 hod a je konstantní po dobu 5 hod. Pokud je koncentrace nižší než 0,5% stává se intenzita fluorescence nestabilní po 1,5 hod. Nejoptimálnější koncentrace tenzidu je okolo 3%, pro tuto hodnotu byl maximální rozdíl intenzit fluorescencí pro kovový komplex a pro slepý vzorek. [14]

1.4 ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

Patří do skupiny tzv. elektromigračních metod v analytické chemii. Jelikož separace složek vzorku je dosaženo díky rozdílné rychlosti pohybu částic v elektrickém poli, lze metodou zónové elektroforézy analyzovat pouze látky nesoucí náboj, tedy takové, které v roztoku podléhají disociaci. Princip separace dvou komponentní směsi metodou zónové elektroforézy je zřejmé z obrázku 1.11. Vzorek je nadávkován do separačního prostředí, do tzv. nosného elektrolytu, ve formě úzké, ostře ohraničené zóny, která složení nosného plynu téměř neovlivňuje. Elektrolytem je zpravidla pufr, protože pH separačního prostředí je pro separaci řady látek velice důležitým faktorem. Nadávkovaná směsná zóna vzorku se v separačním prostoru pohybuje vlivem elektrického pole. V průběhu migrace dochází k oddělování komponent vzorku s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí, které se soustřeďují do samostatných zón. Pokud je součástí experimentálního uspořádání detektor registrující pohyb jednotlivých zón na konci separačního prostoru, je možno výsledek separace zaznamenat ve formě časového průběhu odezvy detektoru tzv. elektroferogramu. Vzhled tohoto záznamu a způsob je ekvivalentní chromatogramu.[15]



Obr. 1.11 Princip separace dvou komponentní směsi metodou zónové elektroforézy[15] .

1.4.1 Pohyb nabité částice v elektrickém poli

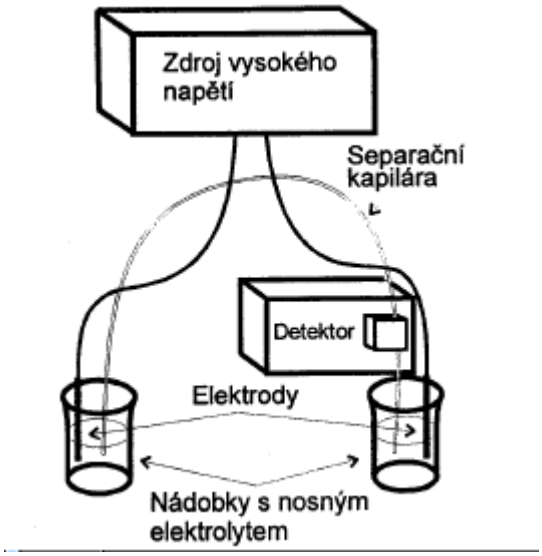
K pohybu vzorku separačním prostorem a separaci iontů dochází vlivem elektrického pole. Pohyb částic v elektrickém poli vychází z rovnice:

$$F_E = f\ (Q, E_n,)$$

Elektrické pole urychluje nabitou částici silou F_E, která je přímo úměrná náboji částice Q a intenzitě elektrického pole E_n. Směr působení elektrické síly závisí na znaménku náboje. Kladně nabité částice (kationty) se pohybují k záporně nabité elektrodě (katodě) a záporně nabité částice (anionty) se pohybují směrem ke kladně nabité elektrodě (anodě). Pohyb částic vlivem elektrického pole se nazývá migrace. Částice různé velikosti a různého elektrického náboje se v elektrickém poli pohybují (migrují) různou rychlostí.[15]

1.4.2 Kapilární zónová elektroforéza (Obr. 1.12)

Kapilární elektroforéza resp. Vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) se řadí mezi jedny z nejúčinnějších a nejperspektivnějších analytických separačních metod. A to díky účinnosti dosahující stovek tisíc až milión teoretických pater a citlivosti na úrovni femtomol – zeptomol (10^{-15} – 10^{-21} mol) analytu v nanolitrových objemech analyzovaných vzorků. HPCE probíhá v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 20 – 200 μm a je naplněna elektrolytem nebo gelem. Výhodou provádění elektroforézy v kapiláře je její relativně velký povrch vůči objemu. Množství vzorku musí být přizpůsobeno velikosti separační kapiláry a detektor musí být citlivé a schopné detekovat takto malá množství, nejčastěji se používá detektor optický (UV-VIS, fluorescenční) nebo vodivostní.[16]



Obrázek 1.12 uspořádání kapilární elektroforézy

1.4.2.1 Separační kapiláry

Jedná se nejčastěji o křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 – 100 μm. Pro zvýšení odolnosti bývají z vnější strany potaženy vrstvou polyimidu. K transportu vzorku kapilárou může přispívat i efekt elektroosmózy. Elektroosmóza se projevuje jako měřitelný tok roztoku nosného elektrolytu kapilárou vlivem elektrického pole, transportuje veškeré komponenty vzorku, nepřispívá však k jejich vzájemnému oddělení. Na rychlost elektroosmotického tlaku má vliv iontová síla roztoku nosného elektrolytu a přídavek modifikátorů typu organických rozpouštědel, neiontových a zejména kationtových tenzidů.[15]

1.4.2.2.Dávkování vzorku

Pro zachování separační účinnosti je nutno do kapiláry dávkovat definované, velmi nízké objemy vzorku okolo nl. Jsou známy tři hlavní způsoby dávkování. Gravitační způsob dávkování, který je nejjednodušší ale nejméně přesný. Nádobka se vzorkem je umístěna v definované výšce nad roztokem separačního pufru. Dávkování řízeným tlakem, nejčastější způsob dávkování. Do hermeticky uzavřené nádobky je zaveden přetlak vzduchu vhodného inertního plynu. Elektrokinetické (elektromigrační) dávkování, na dvojici elektroforetických elektrod je vkládáno vysoké napětí. Látkové množství je přímo úměrné tomuto napětí.[15]

1.4.2.3 Detekce

Měrná cela detektoru je nejčastěji tvořena separační kapilárou. Nejčastěji se používá fotometrický detektor, který umožňuje sledovat absorbanci zón jednotlivých látek. Dále se používají fluorescenční nebo vodivostní detektor.[15]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo, studium zhášení fluorescence fluoresceinu pomocí GO a její opětovné obnovení, v závislosti na přídavku modelových látek a studium vlivu přídavku tenzidu na tyto procesy.

2.2 VYBAVENÍ

Pro kvantitativní fluorescenční měření byl použit přístroj kapilární elektroforézy Agilent 3D CE (Německo) s LIF detektorem od firmy Picometrics (Francie), který pracuje při excitační vlnové délce 488 nm. Přístroj kapilární elektroforézy byl používán jako dávkovací systém pro měření fluorescence na LIF detektoru a pro vyhodnocování záznamů. Vzorky byly do LIF detektoru dopravovány křemennou kapilárou o vnitřním průměru 75 µm a vnějším průměru 360 µm (Polymicro Technologies, USA) tlakem 50 mbar. Vzorky byly dávkovány do pufru pomocí tlaku 50 mbar po dobu 30 s. Vyhodnocení probíhalo měřením intenzity fluorescence vzorku. Intenzita se vyhodnocovala jako průměrná výška detekované zóny z 10 měření.

2.2.1 Použité chemikálie

Pro experimenty byly použity následující chemikálie: kyselina boritá, hydroxid sodný, fluorescein isothyokyanát (FITC), grafen oxid (GO), dodecylsíran sodný (SDS), hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB), polyethylen glykol (PEG), polyvinylalkohol, fluorinert, asolektin, Genapol X-080, Brij, Triton X-114, lysozom, kuřecí albumin, peroxidáza, králičí aldoláza, 8-anilino-1-naftalensulfonová kyselina (ANS), dusičnan rtuťnatý, dusičnan olovnatý, chlorid kademnatý, β-cyklodextrin, celulóza, dextróza, nanočástice zlata, kvantových teček CdSe/ZnS, nanočástice oxidů železa (II,III), nanočástice stříbra, glukóza, fruktóza, laktóza, BSA a DNA

Grafen oxid byl zakoupen od firmy Graphene 3D lab z USA, ostatní použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma. Všechny chemikálie byly v čistotě p.a.

2.2.2 Příprava roztoků

Kyselina boritá byla připravena ve výchozí koncentraci 0,05 mol/dm^3. Tento roztok jsem titrovala pomocí hydroxidu sodného až na výsledné pH 9,5. Příprava Brije, roztoky byly připraveny metodou postupného ředění. Výchozí koncentrace Brije byla 100 µl/ml. Z tohoto roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích 50 µl/ml, 30 µl/ml, 10 µl/ml a 5 µl/ml. Stejným způsobem byly připraveny roztoky o stejných koncentracích Tritonu X-114.

2.3 VÝSLEDKY A DISKUZE

2.3.1 Detekce fluoresceinu

Fluorescein jsem smíchala s borátovým pufrem o koncentraci 0,05M. Odebrala jsem 500 µl této směsi a po 200 µl jsem přidávala borátový pufr a sledovala fluorescenci. Fluorescence při excitační vlnové délce 356 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 5,2 x 10^{-6} mol/l. Fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 4,6 x 10^{-6} mol/l

2.3.2 Pozorování fluorescence s roztokem dodecylsíranu sodného (SDS)

Připravila jsme roztok SDS o koncentraci 5mmol/l a 50 mmol/l. Oba dva roztoky obsahovaly borátový pufr o koncentraci 50 mmol/l. Fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 2,0 x 10^{-6} mol/l. Při koncentraci 5 mM SDS a při koncentraci fluoresceinu 1,3 x 10^{-6} mol/l pro 50 mM SDS.

Z tohoto pozorování plyne, že SDS pozitivně ovlivňuje intenzitu fluorescence fluoresceinu (zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence). Tento vliv je vyšší v případě, že se SDS vyskytuje v koncentraci nad kritickou micelární koncentrací (CMC)

2.3.3 Pozorování fluorescence s roztokem hexadecyltrimethylammonium bromidu (CTAB)

Připravila jsem roztok CTAB o koncentraci 10 mmol/l. roztok obsahoval borátový pufr. Fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 3,5 x 10^{-6}. CTAB byl připravován v koncentraci nad CMC.

Z tohoto pozorování plyne, že CTAB pozitivně ovlivňuje intenzitu fluorescence fluoresceinu (zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence).

2.3.4 Pozorování fluorescence s roztokem polyethylenglykolu (PEG)

Připravila jsem 1 % roztok PEG v borátovém pufru. Fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 3,1 x 10^{-6} mol/l

Z tohoto pozorování plyne, že PEG pozitivně ovlivňuje intenzitu fluorescence fluoresceinu (zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence).

2.3.5 Pozorování fluorescence s roztokem polyvinylalkoholu, fluorinertu a asolektinu (neiontové tenzidy)

Připravila jsem si 1 % roztoky tenzidů v borátovém pufru. Fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 2,6 x 10^{-6} mol/l pro polyvinylalkohol a asolektin a při koncentraci fluoresceinu 3,0 x 10^{-6} mol/l pro fluorinert.

Z tohoto pozorování plyne, že polyvinylalkohol, asolektin a fluorinert pozitivně ovlivňují intenzitu fluorescence fluoresceinu (zvyšují kvantový výtěžek fluorescence).

2.3.6 Pozorování fluorescence s roztokem Genapolu X-080, Brije a Tritonu X-114 (neiontové tenzidy)

Připravila jsme si 1 % roztoky tenzidů v borátovém pufru. Fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm byla naposledy pozorována při koncentraci fluoresceinu 2,6 x 10^{-6} mol/l pro Triton X-114, při koncentraci fluoresceinu 2,7 x 10^{-6} mol/l pro Genapol X-080 a při koncentraci fluoresceinu 2,3 x 10^{-6} mol/l pro Brij.

Z tohoto pozorování plyne, že Genapol X-080, Brij a Triton X-114 pozitivně ovlivňují intenzitu fluorescence fluoresceinu (zvyšují kvantový výtěžek fluorescence).

2.3.7 Pozorování fluorescence s roztokem Brij v různých koncentracích

Připravila jsme si 0,5; 1; 3; 5; 10 % roztoky Brij. Posledně pozorované fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm jsou uvedeny v tabulce:

Koncentrace Brij (%)	*Koncentrace fluoresceinu*
0,5	4,5 x 10^{-6} mol/l
1	2,3 x 10^{-6} mol/l
3	3,4 x 10^{-6} mol/l
5	3,4 x 10^{-6} mol/l
10	3,4 x 10^{-6} mol/l

2.3.8 Pozorování fluorescence Tritonu X-114 v různých koncentracích

Připravila jsme si 0,5; 1; 3; 5; 10 % roztoky Tritonu X-114. Posledně pozorované fluorescence při excitační vlnové délce 254 nm jsou uvedeny v tabulce:

Koncentrace Tritonu X-114 (%)	*Koncentrace fluoresceinu*
0,5	2,6 x 10^{-6} mol/l
1	2,6 x 10^{-6} mol/l
3	1,6 x 10^{-6} mol/l
5	9,4 x 10^{-7} mol/l
10	8,3 x 10^{-7} mol/l

2.3.9 Zkoušení zhášení proteinů

Připravila jsme koncentrace proteinů (lysozom, kuřecí albumin, BSA, peroxidáza, králičí aldoláza) 0,1 mg/ml v borátovém pufru. K roztoku fluoresceinu (10^{-4} mol/l) s Genapolem (10^{-6} mol/l) jsme přidala protein tak, aby výsledná koncentrace byla 0,01 mg/ml. Poté jsem přidávala opakovaně grafen oxid (100 µl).

V žádném studovaném případě nedošlo ke „zhasnutí” roztoku.

2.3.10 Zhášení fluorescein isothyokyanátu (FITC) a 8-anilino-1-naftalensulfonové kyseliny (ANS)

Připravila jsem si roztoky FITC o koncentraci 10^{-5} mol/l a ANS 3 x 10^{-3} mol/l, oba dva roztoky obsahovaly borátový pufr. Odebrala jsem 500 µl. K tomuto roztoku jsem po 100µl přidávala grafen oxid. Roztoky zhasnuly po přídavku 400 µl grafen oxidu v případě FITC a 100 µl grafen oxidu v případě ANS.

2.3.11 Rozsvěcování 8-anilino-1-naftalensulfonové kyseliny (ANS)

K rozsvícení jsem použila zhasnutý roztok z bodu 2.2.10. Roztok jsem rozsvěcovala pomocí albuminu, DNA o koncentraci 0,1 mg v 1 ml borátového pufru. A dále pomocí $Hg(NO_3)_2$, $Pb(NO_3)_2$, $Hg_2(NO_3)_2$ a $CdCl_2$ o koncentracích 0,5 mol/l. K zhasnutému roztoku jsme po 100 µl přidávala danou látku. Zhasnutý vzorek se mi podařilo rozsvítit pomocí albuminu po přidání 0,4 ml (koncentrace 0,05 mg/ml) a DNA po přidání 1 ml (0,02 mg/ml). Pomocí těžkých kovů se mi ANS rozsvítit nepodařilo.

2.3.12 Rozsvěcování pomocí cyklodextrinu, celulózy, dextrózy a PEG

Připravila jsme si roztok fluoresceinu o koncentraci 10^{-4} mol/l. Tento roztok jsem zhasnula pomocí GO. K zhasnutému roztoku jsem po 100 µl přidávala cyklodextrin, celulózu, dextrózu a polyethylen glykol, všechny o koncentraci 1 mg v 1 ml borátového pufru a sledovala množství, které povede k rozsvěcení fluorescence.

Použitá látka	*Koncentrace*
Cyklodextrin	0,5 mg/ml
Celulóza	0,5 mg/ml
Dextróza	0,4 mg/ml
Polyethylen glykol	0,4 mg/ml

2.3.13 Zhášení fluorescence jinými látkami než GO

Připravila jsem si roztok fluoresceinu o koncentraci 10^{-4} mol/l v borátovém pufru. Tento roztok jsem se pokusila zhasnout pomocí nanočástic zlata, kvantových teček CdSe/ZnS, nanočástic oxidů železa (II, III) a nanočástic stříbra. Pouze v případě nanočástic oxidů železa došlo k zhasnutí fluorescence po přídavku 100 µl částic do 500 µl vzorku.

2.3.14 Rozsvěcování oxidů železa

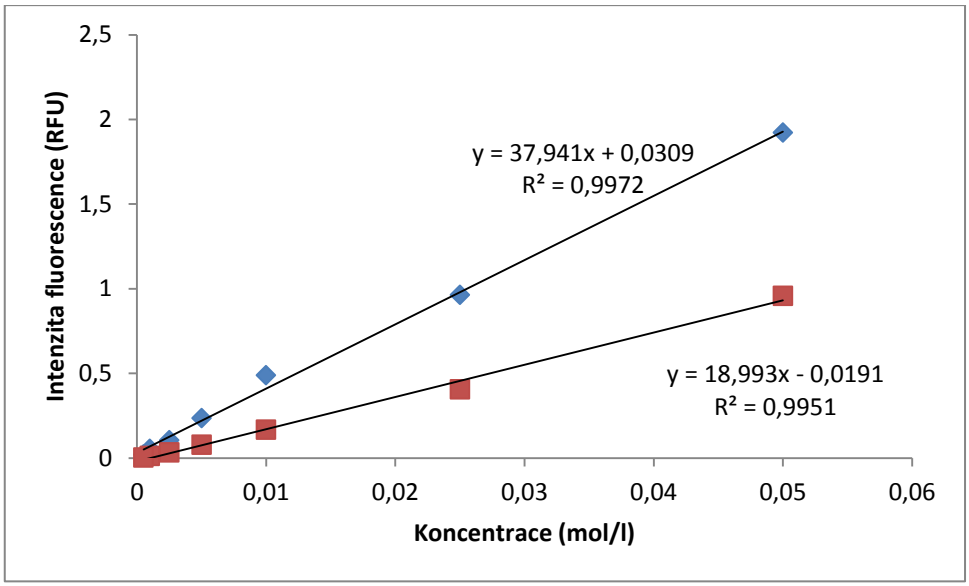
Ke zhasnutému roztoku z bodu 2.2.13 jsem přidávala roztoky glukózy, fruktózy, laktózy, BSA a DNA o koncentraci 1 mg/ml v borátovém pufru. Všechny látky mi zhasnutý roztok rozsvítily. Největší fluorescenci po rozsvícení vykazovala glukosa a nejmenší DNA. Koncentrace jsou uvedeny v tabulce:

Použitá látka	*Koncentrace*
Glukóza	0,55 mg/ml
Fruktóza	0,55 mg/ml
Laktóza	0,55 mg/ml
BSA	0,63 mg/ml
DNA	0,63 mg/ml

2.3.15 Stanovení nejnižší koncentrace glukózy

K fluoresceinu o koncentraci 10^{-4} mol/l v borátovém pufru jsem přidala nanočástice na bázi oxidů železa (roztok zhasnul). Dále jsme přidávala roztoky glukózy a měřila intenzitu fluorescence pomocí LIF detektoru (excitace při 488 nm). Stejný experiment jsme opakovala s fluoresceinem o koncentraci 10^{-5} mol/l. výsledky jsou uvedeny v grafu níže (modrá = koncentrace 10^{-4} mol/l, červená = koncentrace 10^{-5} mol/l).

Intenzita fluorescence (RFU)	*Koncentrace (mol/l)*
1,921	0,956
0,963	0,405
0,488	0,167
0,234	0,078
0,105	0,033
0,053	0,012
0,019	0,001

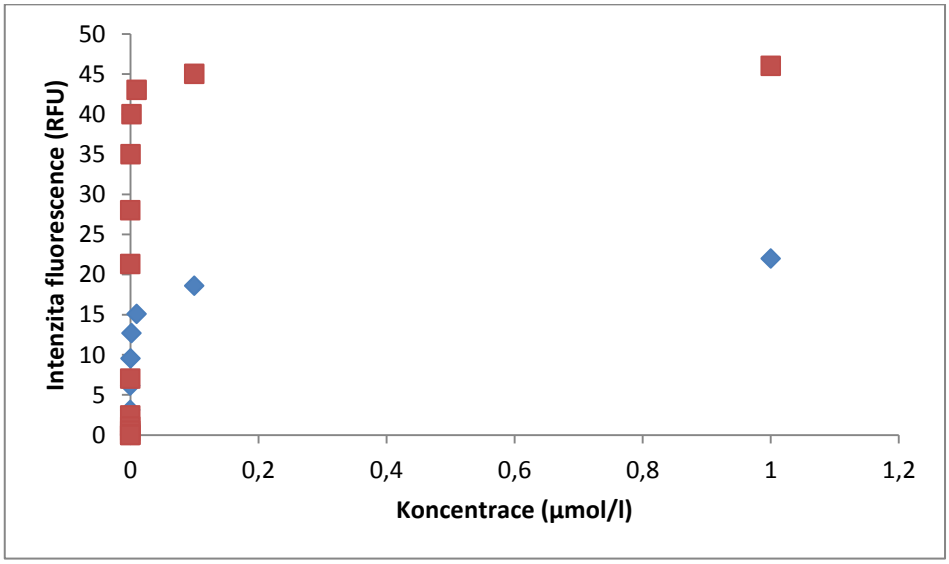


Z těchto závislostí lze odhadnout mez detekce pomocí programu QC.Expert na 0,001 mol/l pro koncentraci fluoresceinu 10^{-5} mol/l a na 0,0003 mol/l pro koncentraci fluoresceinu 10^{-4} mol/l. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci je lineární v celém rozsahu studovaných koncentrací.

2.3.16 Rozsvěcování GO s tenzidem pomocí glukózy

K roztoku fluoresceinu o koncentraci 10^{-4} mol/l v borátovém pufru s přídavkem Tritonu X-114 o koncentraci 1 % a 10 % jsme přidala suspenzi GO (roztok zhasnul). Dále jsem přidávala roztoky glukózy a měřila intenzitu fluorescence pomocí LIF detektoru (excitace při 488 nm). Výsledky jsou uvedeny v grafu níže (modrá = 1 %, červená = 10 % .)

mol/l	1%	10%
1×10^{-6}	22,000	46,000
1×10^{-7}	18,600	45,000
1×10^{-8}	15,100	43,000
2×10^{-9}	12,700	40,000
4×10^{-10}	9,560	35,000
8×10^{-11}	6,170	28,000
$1,60 \times 10^{-11}$	3,110	21,300
$3,20 \times 10^{-12}$	1,387	7,020
$6,40 \times 10^{-13}$	0,432	2,450
$1,30 \times 10^{-13}$	0,186	1,050
$2,50 \times 10^{-14}$	0,108	0,530
$5,00 \times 10^{-15}$	0,063	0,040
$1,00 \times 10^{-15}$	0,026	0,016
$2,00 \times 10^{-16}$	0,019	0,012



Daná závislost není lineární v celém rozsahu studovaných koncentrací. Oblast linearity je 3,2 x 10^{-12} – 1,0 x 10^{-15} mol/l pro 1 % Triton X-114 a 1,6 x 10^{-11} – 1,0 x 10^{-15} mol/l pro 10 % Triton X-114. Lineární regrese pak má následující tvar 4,14 x 1011 (2,07 x 1010) x + 0,0804 (0,0256), R2 = 0,9877 pro 1 % Triton X-114 a 1,31 x 1012 (7,29 x 1010) x + 0,7758 (0,4207), R2 = 0,9818 pro 10 % Triton X-114. V závorkách jsou uvedeny chyby odhadů parametrů rovnice lineární regrese. Meze detekce byly odhadnuty pomocí programu QC.Expert na 3,5 x 10^{-16} mol/l pro 1 % Triton X-114 a 2,4 x 10^{-16} mol/l pro 10 % Triton X-114.

ZÁVĚR:

Bylo provedeno studium zhášení fluorescence fluoresceinem pomocí GO a její opětovné obnovení v závislosti na přídavku modelových látek a studium vlivu přídavku tenzidů na tyto procesy.

Bylo zjištěno, že přídavek tenzidů výrazně ovlivňuje meze detekce glukózy (jako modelové látky) v tomto typu reakce.

Získané poznatky mohou sloužit k vývoji detekčního systému pro kapilární zónovou elektroforézu. Tento detekční systém může sloužit například pro detekci cukrů, které jsou klasickým UV detektorem (nebo LIF detektorem) velmi obtížně detekovatelné.

Přehled použitých zkratek:

FITC	Fluorescein isothiokyanát
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. Green fluorescein protein)
GO	grafen oxid
rGO	redukovaný grafen oxid
FQM	fluorescenční zhášecí mikroskopie (z angl. Fluorescence quenching microscopy)
OAS	α-olefin sulfonát
SDS	dodecyl síran sodný
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromid
HPCE	vysokoúčinná kapalinová elektroforéza (z angl. High Performance Capillary Electrophoresis
UV	ultrafialový
VIS	viditelný (z angl. Visible)
PEG	polyethylen glykol
ANS	8-anilino1-1naftalensulfonová kyselina
LIF	fluorescenční detektor (z angl. Laser induced fluorescence)

Použitá literatura:

[1] ŠIMSA, Daniel a Jan SKOPAL. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2008, č. 102

[2] ATKINS, P a Julio DE PAULA. *Atkins' Physical chemistry*. 8th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006, xxx, 1064 s. ISBN 01-987-0072-5

[3] YANG, Sheng, Changyao WANG, Changhui LIU, Yijun WANG, Yue XIAO, Jishan LI, Yinhui LI a Ronghua YANG. Fluorescence Modulation by Absorbent on Solid Surface: An Improved Approach for Designing Fluorescent Sensor. *Analytical Chemistry*. 2014-08-05, vol. 86, issue 15, s. 7931-7938. DOI: 10.1021/ac5019292. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac5019292

[4] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.

[5] HOFR, Ctirad. *Ustálená fluorescence* [online]. 2014 [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C7230/um/6053971/6056654/04_Steady_state.pdf

[6] KOHEN, Elli a Joseph G HIRSCHBERG. *Cell structure and function by microspectrofluorometry*. San Diego: Academic Press, c1989. ISBN 0124177603.

[7] CHHOWALLA. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry*. 2010, vol. 2, issue 12, s. 1015-1024. DOI: 10.1038/nchem.907

[8] SHAHRIARY, LEILA a ANJALI ATHAWALE. *Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach* [online]. International Journal of Renewable Energy and Environmental Engineering, 2014 [cit. 28.4.2015].

[9] ZHANG, Hao, Hui HUANG, Zihan LIN a Xingguang SU. A turn-on fluorescence-sensing technique for glucose determination based on graphene oxide–DNA interaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, vol. 406, issue 27, s. 6925-6932. DOI: 10.1007/s00216-014-7758-z.

[10] CUI, Xin, Lei ZHU, Jing WU, Yu HOU, Peiyao WANG, Zhenni WANG a Mei YANG. A fluorescent biosensor based on carbon dots-labeled oligodeoxyribonucleotide and graphene oxide for mercury (II) detection.

Biosensors and Bioelectronics. 2015, vol. 63, s. 506-512. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.085

[11] LU, Chun-Hua, Huang-Hao YANG, Chun-Ling ZHU, Xi CHEN a Guo-Nan CHEN. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009-06-15, vol. 48, issue 26, s. 4785-4787. DOI: 10.1002/anie.200901479. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200901479

[12] ŠMIDRKAL, Jan. Tezidy a detergenty dnes. *Chemické listy*, 1999, 421-427.

[13] HAVELKA, Michal. *Stanovení nízkých koncentrací kationaktivních povrchově aktivních látek ve vodách technikou průtokové injekční analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí*. Praha, 2012. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

[14] ESCRICHE, Julio Medina, Miguel De La Guardia CIRUGEDA, Felix Hernandez HERNANDEZ, K.R. CZERWINSKI a K. CZERWINSKI. Increase in the sensitivity of the fluorescent reaction of the complexing of aluminium with morin using surfactant agents. *The Analyst*. 1983, vol. 108, issue 1292. DOI: 10.2172/10158040.

[15] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.

[16] PAZOUREK, Jiří. *Elektroforetické analytické metody: Moderní elektroforetické analytické metody*. 2013