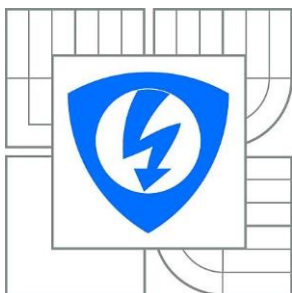


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNologií

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## STUDIUM VLIVU KVANTOVÝCH TEČEK NA BIOLOGICKÉ SYSTÉMY A JEJICH KOMPONENTY

STUDY OF INFLUENCE OF QUANTUM DOTS TO BIOLOGICAL SYSTEMS AND THEIR  
COMPONENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

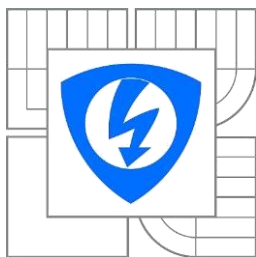
Bc. ZUZANA KOUDELKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor  
**Biomedicínské a ekologické inženýrství**

**Studentka:** Bc. Zuzana Koudelková

**ID:** 136475

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2014/2015

## NÁZEV TÉMATU:

**Studium vlivu kvantových teček na biologické systémy a jejich komponenty**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proved'te rešerši v oboru kvantových teček s ohledem na jejich strukturu, metody detekce a použití. 2) Dále proved'te rešerši v oblasti proteinů jako hlavní interakční složky v biologických systémech. 3) Seznamte se základními technikami studia interakce kvantových teček s proteiny a studia stability kvantových teček. 4) Navrh'něte model stárnutí/degradace kvantových teček. 5) Proved'te experimentální sledování stárnutí/degradace kvantových teček vlivem různých typů prostředí a využití elektrochemických metod. 6) Zpracujte a vyhodno'te výsledky, proved'te diskusi.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] J. DRBOHLAVOVÁ, V. ADAM., R. KIZEK, J. HUBÁLEK. Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. International Journal of Molecular Sciences 2009;10:656-673.
- [2] N. CHEN, Y. HE, Y. Y. SU, X. M. LI, Q. HUANG, H. F. WANG, X. Z. ZHANG, R. Z. TAI, C. H. FAN. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. Biomaterials 2012;33:1238-1244.

**Termín zadání:** 9.2.2015

**Termín odevzdání:** 22.5.2015

**Vedoucí práce:** prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

**Konzultanti diplomové práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

## UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Cílem diplomové práce je sumarizovat dostupné poznatky o kvantových tečkách a jejich vlivu na živé systémy. V textu jsou popsány metody přípravy kvantových teček s ohledem na jejich vlastnosti (velikost, vlnovou délku fluorescence) a metody biofunkcionalizace kvantových teček biomolekulami. V živých organismech se nachází velké množství proteinů, proto jsou tyto látky považovány za jednu z hlavních interakčních složek v organismech. Proto je v práci také uvedena základní informace o proteinech. V neposlední řadě jsou popsány různé metody, kterými se kvantové tečky mohou charakterizovat, především diferenční pulsní voltametrie, měření zeta potenciálu a fluorescence.

Hlavním úkolem této práce je navrhnout modely různých prostředí, ve kterých bude probíhat degradace kvantových teček s ohledem na vyhodnocení získaných kinetických parametrů pro predikci stability jednotlivých kvantových teček.

## **Klíčová slova**

Kvantové tečky, zetasizer, zeta potenciál, fluorescenční spektroskopie, diferenční pulsní voltametrie, stabilita, degradace.

## **Abstract**

The aim of this thesis is to summarize the available evidence about quantum dots and their effects on living systems. The text describes methods for the preparation of quantum dots with respect to their characteristics (size, fluorescence wavelength) and methods of quantum dots bio-functionalization of biomolecules. In living organisms is a large number of proteins, because these are considered as one of the main components of the interaction of organisms. Therefore, the work also provides basic information about proteins. Finally, there are described various methods by which the quantum dots may be characterized mainly by differential pulse voltammetry measurement zeta potencial and fluorescence measurement.

The main objective of this work is to propose models of different environments in which will be degradation of quantum dots with regard to the evaluation of acquired kinetic parameters for predicting the stability of individual quantum dots.

## **Keywords**

Quantum dots, zetasizer, zeta potencial, fluorescence spectroscopy, differential pulse voltammetry, stability, degradation

KOUDELKOVÁ, Z. *Studium vlivu kvantových teček na biologické systémy a jejich komponenty*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 87 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Studium vlivu kvantových teček na biologické systémy a jejich komponenty jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího projektu a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedeného semestrálního projektu dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

podpis autorky



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Prof. Ing. Ivu Provazníkovi, Ph.D. za podporu a cenné rady.

Ráda bych poděkovala celému týmu laboratoře nanobioelektrochemie za podporu, pomoc při mé práci a pochopení, díky čemuž jsem se vždy do této laboratoře těšila.

Největší poděkování patří mému konzultantovi Ing. et Ing. Davidu Hynkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, čas věnovaný konzultacím a za nedocenitelnou pomoc při vypracování mé diplomové práce a hlavně za slova povzbuzení.

Dále bych chtěla také poděkovat Ing. Kateřině Tmejové, Ph.D. za její čas, rady a odbornou pomoc. Za pomoc a ochotu při měření a přípravě kvantových teček patří můj velký dík Ing. Vedranu Milosavljevici a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat Amitavu Moulickovi MSc., Ph.D. za jeho „recept“ a pomoc při přípravě kvantových teček.

# Obsah

|       |                                                                               |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | ÚVOD .....                                                                    | 14 |
| 2     | KVANTOVÉ TEČKY.....                                                           | 16 |
| 2.1   | Vlastnosti kvantových teček.....                                              | 16 |
| 2.2   | Výroba QDs.....                                                               | 17 |
| 2.2.1 | Syntéza ve vodě rozpustných QDs .....                                         | 18 |
| 2.2.2 | Syntéza hydrofobních QDs.....                                                 | 18 |
| 2.2.3 | Solubilizace hydrofobních QDs.....                                            | 19 |
| 2.2.4 | Biosyntéza QDs .....                                                          | 20 |
| 2.3   | Využití QDs.....                                                              | 20 |
| 2.4   | Fluorofory.....                                                               | 21 |
| 3     | PROTEINY .....                                                                | 23 |
| 4     | BIOFUNKCIONALIZACE .....                                                      | 26 |
| 5     | DEGRADACE .....                                                               | 28 |
| 6     | METODY CHARAKTERIZACE QDs.....                                                | 29 |
| 6.1   | Stanovení velikosti a zeta potenciálu pomocí dynamického rozptýlu světla..... | 29 |
| 6.2   | Voltametrie .....                                                             | 32 |
| 6.3   | Absorpční a fluorescenční spektroskopie .....                                 | 33 |
| 7     | KINETIKA CHEMICKÝCH REAKCÍ .....                                              | 36 |
| 8     | EXPERIMENTÁLNÍ PLÁN.....                                                      | 38 |
| 9     | MATERIÁLY A METODY.....                                                       | 39 |
| 9.1   | Chemikálie.....                                                               | 39 |
| 9.2   | Přístrojové vybavení .....                                                    | 39 |
| 9.3   | Příprava kvantových teček.....                                                | 40 |
| 9.4   | Příprava roztoků .....                                                        | 41 |
| 9.5   | Charakterizace kvantových teček pomocí transluminátoru .....                  | 41 |
| 9.6   | Absorpční a fluorescenční spektroskopie .....                                 | 42 |

|        |                                                        |    |
|--------|--------------------------------------------------------|----|
| 9.7    | Koloidní analyzátor - Zetasizer .....                  | 44 |
| 9.8    | Diferenční pulsní voltametrie .....                    | 44 |
| 10     | VÝSLEDKY .....                                         | 46 |
| 10.1   | Charakterizace použitých kvantových teček .....        | 46 |
| 10.2   | Studium stability QDs v kyselém prostředí .....        | 51 |
| 10.2.1 | Krátkodobá interakce.....                              | 52 |
| 10.2.2 | Dlouhodobá část .....                                  | 54 |
| 10.3   | Studium stability QDs v neutrálním prostředí .....     | 56 |
| 10.3.1 | Krátkodobá část .....                                  | 56 |
| 10.3.2 | Dlouhodobá část .....                                  | 58 |
| 11     | DISKUZE .....                                          | 61 |
| 11.1   | Vliv modifikace QDs na jejich degradaci.....           | 62 |
| 11.2   | Vliv typu QDs na jejich degradaci .....                | 69 |
| 11.3   | Degradační procesy QDs a jejich sledování .....        | 71 |
| 11.4   | Využití DPV pro predikci dlouhodobé stability QDs..... | 74 |
| 12     | ZÁVĚR.....                                             | 81 |
|        | LITERATURA .....                                       | 83 |
|        | SEZNAM ZKRATEK.....                                    | 87 |

## Seznam obrázků

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 1: Velikosti světů [3].....                                                                 | 14 |
| Obrázek 2: Uspořádání kvantových teček [6] .....                                                    | 16 |
| Obrázek 3: Velikost QDs [3].....                                                                    | 17 |
| Obrázek 4: Příprava QDs [10].....                                                                   | 18 |
| Obrázek 5: Hydrofobní QDs [11].....                                                                 | 19 |
| Obrázek 6: Využití QDs v biomedicínských a bioanalytických aplikacích, přejato a upraveno [4] ..... | 21 |
| Obrázek 7: Fluorofory [18] .....                                                                    | 22 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 8: Struktura bílkovin [22].....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 24 |
| Obrázek 9: Fluorescenční aminokyseliny [23] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 25 |
| Obrázek 10: Hovězí sérový albumin [23].....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 25 |
| Obrázek 11: Příklady biokonjugace QDs: Pod možností A) zobrazena metoda konjugace záporně nabitého povrchu QDs s pozitivně nabitým avidinem. B) sacharidové jednotky na povrchu QDs se aktivují oxidací $\text{NaIO}_4$ , následně vzniknou aldehydové skupiny, na něž se váží molekuly s aminoskupinami. C) aktivované karboxylové skupiny reagují s aminoskupinami biomolekul. Na možnosti D) jsou vidět thiolové skupiny QDs a biomolekul, jež se propojí disulfidickým můstkem. E) spojení aminoskupin pomocí glutaraldehydu [6] ..... | 27 |
| Obrázek 12: Uvolnění iontů kadmia z jádra QDs [27].....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 28 |
| Obrázek 13: Princip zetasizeru [33] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 30 |
| Obrázek 14: Zeta potenciál [35] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 31 |
| Obrázek 15: Křivka zeta potenciálu proti pH [34] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 32 |
| Obrázek 16: DPV voltamogram QDs [36] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 33 |
| Obrázek 17: Jablonského diagram [16] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| Obrázek 18: Fluorescenční spektroskopie [40] .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 35 |
| Obrázek 19: Připravené QDs pod transluminátorem (nahore zleva MPA-CdTe, MSA-CdTe, dole zleva GSH-CdTe, ZnSe/CdTe), vlastní zpracování .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 42 |
| Obrázek 20: Absorpční spektrum kvantových teček .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 43 |
| Obrázek 21: Fluorescenční spektrum připravených kvantových teček .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 43 |
| Obrázek 22: Koloidní analyzátor Zetasizer (Malvern Instruments, UK), vlastní zpracování .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 44 |
| Obrázek 23: Přístroj 797 VA Computrance (Metrohm), vlastní zpracování .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 45 |
| Obrázek 24: Velikostní distribuce jednotlivých QDs po precipitaci: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D – CdTe/ZnSe.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 47 |
| Obrázek 25: Distribuce zeta potenciálu kvantových teček GSH-CdTe a CdTe/ZnSe .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 48 |
| Obrázek 26: Distribuce zeta potenciálu kvantových teček MPA-CdTe a MSA-CdTe .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 48 |
| Obrázek 27: Charakterizace kvantových teček ve fosfátových pufrách o pH 4-9; A – závislost koncentrace kadmia u kvantových teček na pH prostředí, B - procentuální vyjádření koncentrace kadmia, vztaženo k maximálním hodnotám při pH 5, C – závislost fluorescence kvantových teček na pH prostředí, D – závislost velikosti zeta potenciálů na pH prostředí .....                                                                                                                                                                       | 49 |

|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 28: Kalibrační křivky množství kadmia stanovené pomocí DPV ve: A – fosfátový pufr pH 4, B – fosfátový pufr pH 5, C – fosfátový pufr pH 6, D – fosfátový pufr pH 7, E – fosfátový pufr pH 8, F – fosfátový pufr pH 9 ..... | 50 |
| Obrázek 29: Kalibrační křivky množství kadmia stanovené pomocí DPV: A - v acetátovém pufru, B - v citrátovém pufru, C - v kyselém roztoku, D - ve fosfátovém pufru, E - v neutrálním roztoku .....                                | 51 |
| Obrázek 30: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe .....                                                                                                | 52 |
| Obrázek 31: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - GSH-CdTe, B - CdTe/ZnSe .....                                                                                               | 53 |
| Obrázek 32: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe obě výsledky .....                                                                                   | 54 |
| Obrázek 33: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A - GSH-CdTe, B – CdTe/ZnSe.....                                                                                                | 55 |
| Obrázek 34: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe .....                                                                                             | 56 |
| Obrázek 35: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - GSH-CdTe, B – CdTe/ZnSe.....                                                                                             | 57 |
| Obrázek 36: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe.....                                                                                              | 58 |
| Obrázek 37: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A – GSH-CdTe, B – CdTe/ZnSe.....                                                                                             | 59 |
| Obrázek 38: Závislost relativní koncentrace kadmia (vztaženo k začátku experimentu) v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe .....                               | 63 |
| Obrázek 39: Závislost relativní koncentrace kadmia (vztaženo k začátku experimentu) v různých prostředích na době interakce (dvě hodiny); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe.....                            | 64 |
| Obrázek 40: Závislost relativní fluorescence QDs (vztaženo k původním tečkám bez pufru) v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe .....                           | 65 |
| Obrázek 41: Závislost fluorescence v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe .....                                                                                | 66 |
| Obrázek 42: Závislost relativní fluorescence (vztaženo k prvnímu měření v pufrch) v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe .....                                 | 67 |

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 43: Závislost relativní fluorescence (vztaženo k prvnímu měření v pufrch) v různých prostředích na době interakce (dvě hodiny); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe..... | 68 |
| Obrázek 44: Proložení časové závislosti MSA-CdTe (acetátový pufr, kyselý roztok): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce .....                                                               | 77 |
| Obrázek 45: Proložení časové závislosti MSA-CdTe (acetátový pufr): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce.....                                                                               | 78 |
| Obrázek 46: Proložení časové závislosti MPA-CdTe (kyselý roztok): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce.....                                                                                | 78 |
| Obrázek 47: Proložení časové závislosti CdTe/ZnSe (citrátový pufr): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce.....                                                                              | 79 |
| Obrázek 48: Proložení časové závislosti GSH-CdTe (fosfátový pufr): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce.....                                                                               | 79 |
| Obrázek 49: Proložení časové závislosti CdTe/ZnSe (neutrální roztok): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce.....                                                                            | 80 |

## Seznam tabulek

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabulka 1: Hodnoty pH, velikosti a zeta potenciálu jednotlivých kvantových teček po precipitaci. ....                           | 46 |
| Tabulka 2: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, kyselé prostředí, krátkodobé výsledky.....       | 72 |
| Tabulka 3: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, neutrální prostředí, krátkodobé výsledky.....    | 72 |
| Tabulka 4: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, kyselé prostředí, krátkodobé výsledky.....    | 73 |
| Tabulka 5: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, neutrální prostředí, krátkodobé výsledky..... | 73 |
| Tabulka 6: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, kyselé prostředí, všechny výsledky.....          | 74 |
| Tabulka 7: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, neutrální prostředí, všechny výsledky.....       | 74 |
| Tabulka 8: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, kyselé prostředí, všechny výsledky.....       | 75 |

Tabulka 9: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, neutrální prostředí, všechny výsledky..... 75

Tabulka 10: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro výsledky DPV z krátkodobého a dlouhodobého experimentu, kyselé prostředí..... 76

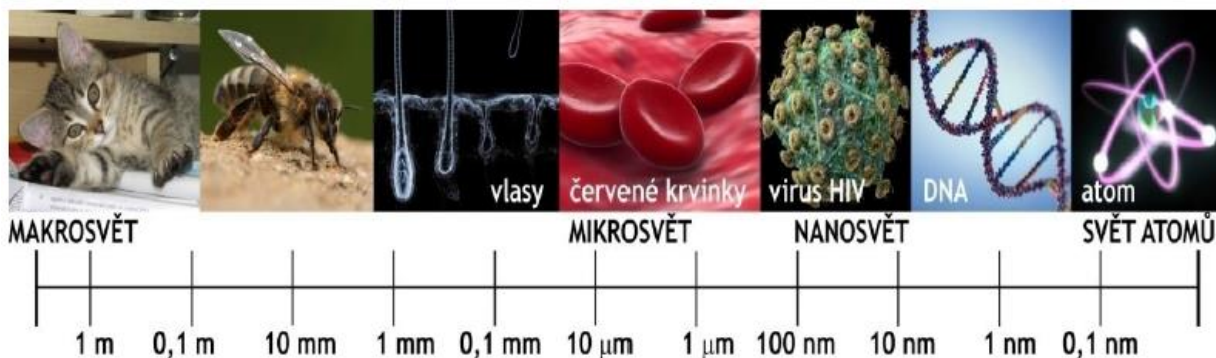
Tabulka 11: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro výsledky DPV z krátkodobého a dlouhodobého experimentu, neutrální prostředí..... 76

# 1 ÚVOD

Nanotechnologie jsou v dnešní době často skloňovaným pojmem v mnoha vědeckých oborech. Za nanočástice považujeme entity, jejichž velikost je od 1 do 100 nm. Tyto látky vykazují velký potenciál využití v mnoha oblastech lidské činnosti (biochemie, medicína, IT atd.). Abychom materiály, či systémy označili za nano, musí splňovat ještě následující podmínky:

- Alespoň jeden jejich rozměr, či vnitřní struktura musí mít velikost v rozmezí 1-100 nm.
- Tyto materiály nebo systémy využívají chemických i fyzikálních vlastností na úrovni atomů a molekul.
- Tyto struktury, či materiály lze kombinovat do větších struktur s důsledky do makrosvěta [1, 2].

Jako první se nanosvětlem zabýval americký fyzik Richard Feynman, který na toto téma v Kalifornském technologickém institutu v roce 1959 přednesl svoji přednášku *There's Always Room at the Bottom (Tam dole je stále místo)*. Jelikož v té době nebyla technologie na dostatečné úrovni, aby mohla nanosvět zkoumat, byly Feynmanovi úvahy považovány za utopii. Začaly se potvrzovat v 80. letech 20. století, kdy byl objeven skenovací tunelový mikroskop (STM) a mikroskop atomových sil (AFM) [1].



Obrázek 1: Velikosti světů [3]

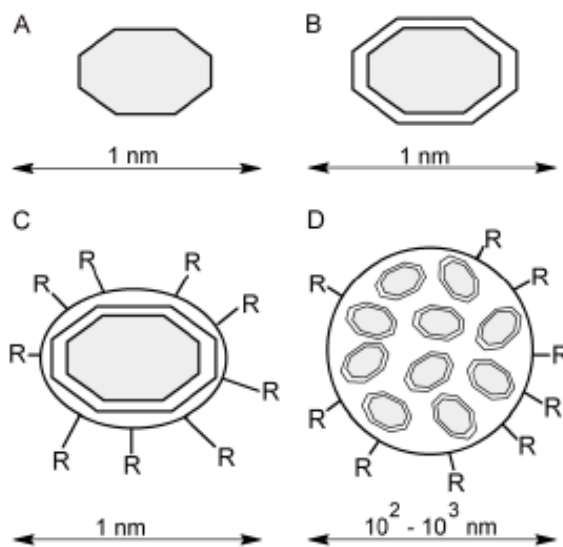
Do skupiny nanočástic se řadí i kvantové tečky (QDs). Jsou to polovodičové materiály, které mají výborné fluorescenční vlastnosti, díky nimž mohou do budoucna nahradit organické fluorofory. Hlavní výhodou kvantových teček je, že mají široké absorpční spektrum, ale úzké emisní spektrum. Můžeme tedy světelným zdrojem ozařovat několik druhů kvantových teček současně. Při tomto ozáření dojde k vybuzení elektronů na vyšší energetickou hladinu. Při návratu na hladinu původní dojde k emisi světelného záření. A právě tuto emisi světelného záření lze u QDs využít (např. jako charakteristické značky) [4].

## 2 KVANTOVÉ TEČKY

### 2.1 Vlastnosti kvantových teček

Kvantové tečky jsou polovodičové nanokrystaly, jejich velikost je řádově 1-20 nm [5, 6].

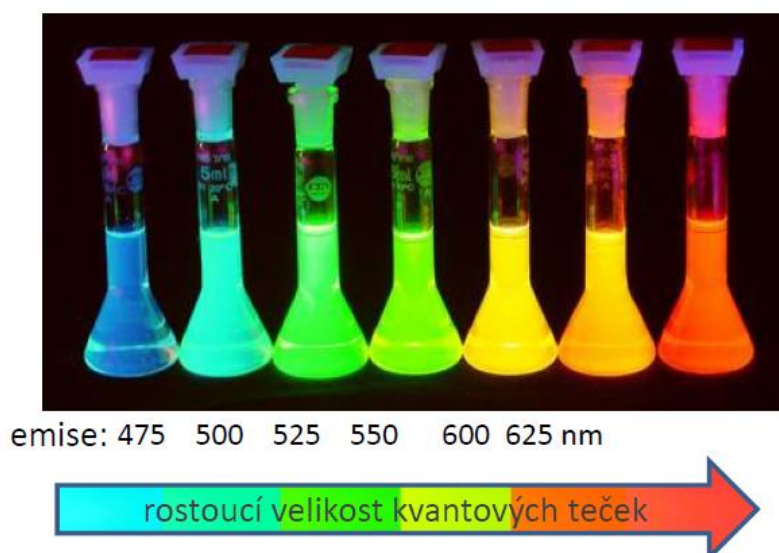
Kvantové tečky mohou existovat samostatně nebo jsou uspořádány do klastrů. Na následujícím obrázku jsou zobrazeny možné struktury kvantových teček.



Obrázek 2: Uspořádání kvantových teček [6]

Na obrázku 2A je zobrazena kvantová tečka, která je tvořena jen jádrem, tedy pouze jedním typem polovodiče. Na obrázku 2B kvantovou tečku tvoří dva typy polovodiče, což je uspořádání typu jádro/obal. Na obrázku 2C je kvantová tečka, která je navíc obalená vnějším obalem, ten umožní solvataci ve vodném roztoku a na svém povrchu má navázané reaktivní skupiny R, které umožňují biokonjugaci. A na posledním obrázku 2D pozorujeme několik kvantových teček, jež tvoří polymerní částici, která má na svém povrchu reaktivní skupiny R. Další dělení QDs může být podle jejich afinity k vodnímu, či nevodnímu prostředí, a to na hydrofilní a hydrofobní kvantové tečky [5, 6].

Kvantové tečky fungují na principu vybuzení elektronů vnějším světelným zářením na vyšší energetickou hladinu. Po nějakém čase dochází k návratu elektronu do základního stavu, a tím dojde k uvolnění energie. Díky němu dojde k emisi světelného záření. Toto emisní záření má větší vlnovou délku, než světelné záření nutné k excitaci elektronů. Podoba excitačních a emisních spekter je u kvantových teček záležitostí jejich velikosti a složení. Na obrázku číslo tři je znázorněn vliv velikosti QDs na jejich emisi. S rostoucí velikostí kvantových teček se posouvá jejich emisní spektrum směrem k vyšším vlnovým délkám [5, 6].



**Obrázek 3: Velikost QDs [3]**

Největší výhodou použití kvantových teček je, že absorbují v UV oblasti, tudíž lze různé QDs ozářit pouze jedním světelným zdrojem UV záření. Další velkou výhodou je výrazný rozdíl mezi excitačním a emisním spektrem, díky čemuž při měření fluorescence vzniká nízká úroveň šumu. Jako výhoda se považují i úzká emisní spektra jednotlivých kvantových teček. Kvantové výtěžky (tzv. jasnost) jsou vysoké ve viditelné i v blízké infračervené oblasti záření. Poslední výhodou je jejich fotostabilita, díky které lze QDs využívat ve fluorescenční mikroskopii. Pro výborné fluorescenční vlastnosti se začaly využívat v biologii a analytické chemii, ke značení proteinů a molekul (další možnosti využití kvantových teček jsou uvedeny v kapitole 2.3). Oproti organickým fluoroformům jsou kvantové tečky až dvacetkrát jasnější a stokrát stabilnější. Ovšem naopak velkým problémem je jejich toxicita (viz kapitola 5), což omezuje jejich využití v biologických systémech [4-6].

## 2.2 Výroba QDs

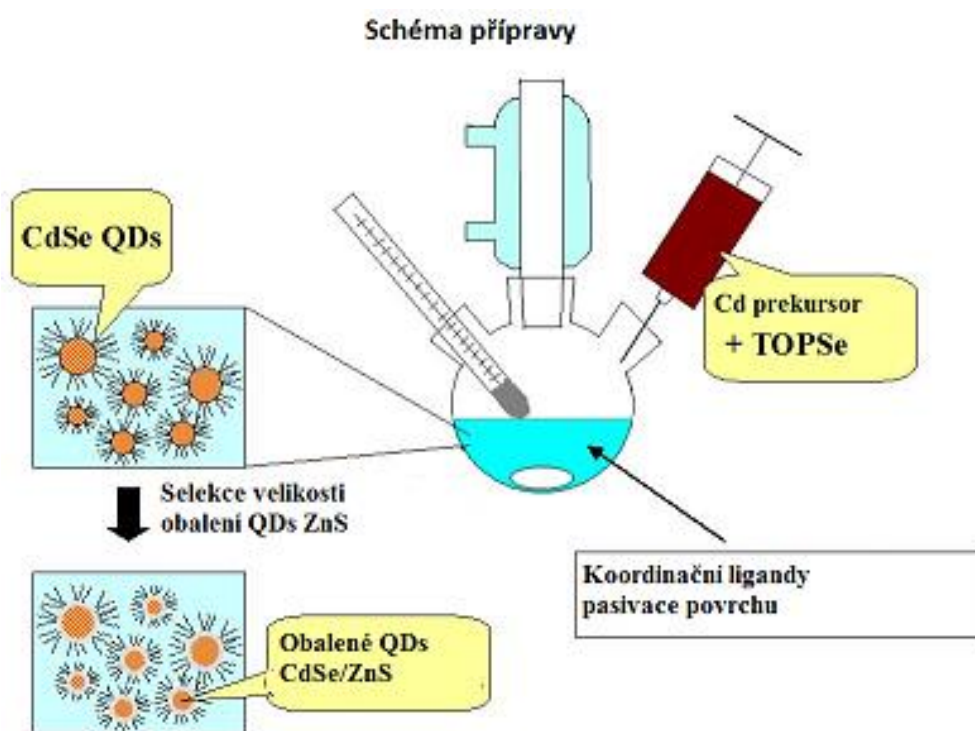
Důležitým cílem při výrobě kvantových teček pro bioaplikace je, aby byly co nejméně toxické, maximálně stabilní, rozpustné ve vodním prostředí, biokompatibilní a měly velký fluorescenční výtěžek. Další podmínkou je vytvoření takových QDs, které jsou schopny v různých prostředích odolávat oxidaci metalového jádra a degradaci obecně. Dle Pierce a kol. vlastnosti kvantových teček závisí na metodě jejich přípravy a povrchové modifikaci. Obvykle se metody přípravy QDs dělí na přípravu ve vodě rozpustných (hydrofilních) a hydrofobních kvantových teček [4, 6-9].

### 2.2.1 Syntéza ve vodě rozpustných QDs

Výhodou syntézy ve vodě rozpustných kvantových teček je vznik QDs o určité velikosti, které mají dobrou stabilitu a biokompatibilitu. Přípravovat ve vodě rozpustné QDs lze pomocí syntézy ve zpětném chladiči nebo syntézou pomocí mikrovlnného záření [4, 6-8].

Syntéza ve zpětném chladiči je uskutečněna v tříhrdlé baňce. Tato metoda spočívá v reakci prekursorů těžkého kovu s prekuzory chalkogenu. Pro stabilizaci QDs se používají například thiooly-MPA, MSA, GSH a další látky. Stabilizace pomocí thiolů zajistí fyzikální a chemickou stabilitu QDs a možnost následné modifikace povrchu. Po smíchání všech látek musí následovat ještě jejich zahřívání při teplotách 90°C až 100° [4, 6-8].

Příprava pomocí mikrovlnného záření trvá mnohem kratší dobu. Po smíchání reaktantů dojde k ohřevu pomocí mikrovln. Následně vzniklé kvantové tečky vykazují výbornou fotoluminiscenci a díky regulaci doby ohřevu, lze upravovat i jejich velikost [4, 6-8].



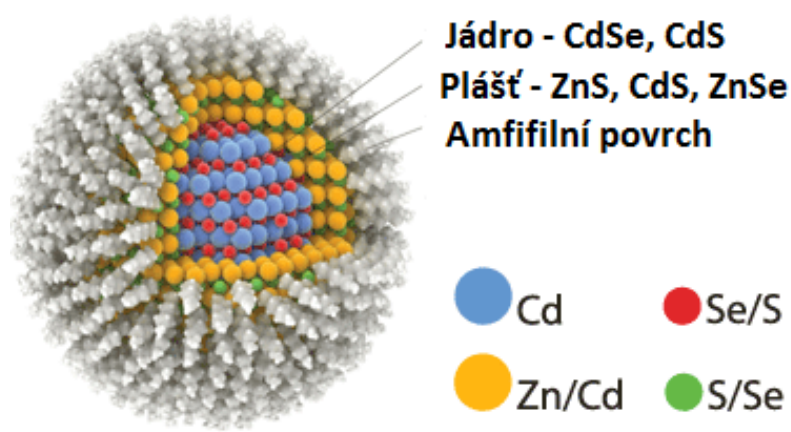
Obrázek 4: Příprava QDs [10]

### 2.2.2 Syntéza hydrofobních QDs

Příprava hydrofobních QDs probíhá pomocí kontrolované nukleace s růstem částic. Vytvoření nanokrystalů se děje v roztocích prekursorů (organokovových či chalkogenových). Reagenty se pomocí vstříknutí dostanou do koordinačního roztoku, který je neustále ohříván na vysokou teplotu a míchán. V tomto případě se nejčastěji využívají koordinační roztoky typu HDA (hexadecylamin), TOP (trioctylphosphin) a TOPO (trioctylphosphin oxid) [4, 6-8].

### 2.2.3 Solubilizace hydrofobních QDs

Připravené hydrofobní kvantové tečky, aby byly vhodné pro použití, se musí následně pomocí určitých procedur solubilizovat. Tyto metody spočívají v tom, že na povrchu QDs se vytvoří vnější obal, díky němuž bude umožněna solvatace QDs v různých vodních prostředích. Využívá se metod hydrofobních vazeb, výměny ligandů a zachycení polymerů. Metoda hydrofobních vazeb spočívá v tom, že na povrch QDs se pomocí těchto vazeb naváží ligandy a polymery (triblokové kopolymery, amfifilní sacharidové deriváty a fosfolipidy). Na povrchu QDs se tedy vytvoří amfifilní molekuly. Metoda hydrofobních vazeb se využívá pro převedení hydrofobních kvantových teček do vodného prostředí. Metoda výměny ligandů spočívá v tom, že na povrch kvantových teček se naváží bifunkční ligandy, jejichž vnější část je tvořena reaktivní skupinou, díky níž je umožněna solvatace. Jako reaktivní skupiny se používají aminoskupiny a karboxylové skupiny. Poslední metodou je zachycení polymerů, kdy se QDs zachytí v polymerních obalech. Polymerní obaly se vytvářejí metodou silanizace, kdy se na povrch kvantových teček nanese vrstva oxidu křemičitého. Výhodou silanizace je snížení toxicity QDs [4, 6-8].



Obrázek 5: Hydrofobní QDs [11]

Při syntézách QDs ve vodných roztocích velikost QDs a jejich emisní vlnovou délku určují jednotlivé složky reakční směsi, délka a teplota zahřívání. Během procesu zahřátí dojde k přenosu atomů, a to tak, že atomy z menších krystalů přejdou na krystaly větší. Tento přenos vede k posunu emisních maxim k delším vlnovým délkám. Na povrch připravených nanokrystalů se nanáší obalová vrstva a vznikají QDs s uspořádáním jádro/obal. Potom lze QDs ještě vysrážet přidáním isopropanolu. Získaná sraženina může být znovu rozpuštěna, nebo po vysušení skladována [4, 6-8].

## 2.2.4 Biosyntéza QDs

Novou metodou výroby kvantových teček je biosyntéza, tzv. syntéza, která probíhá v živých systémech [12]. Její výhodou je šetrnost k životnímu prostředí a biokompatibilita připravených QDs. Tuto syntézu lze spustit několika sloučeninami, např.: alkaloidy, amidy, aminy, fenoly, terpenoidy a další redukční činidla, jež jsou přítomna v biologických extraktech. Kvantové tečky lze touto cestou syntetizovat i pomocí bakterií (*Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*), hub (*Fusarium oxysporum*), kvasinek (*Rhodosporidium diobovatum*) a žížal (*Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus*). Pomocí živočichů lze připravit různé typy kvantových teček, nejvíce se ale připravují tečky CdTe.

## 2.3 Využití QDs

Kvantové tečky díky jejich vysoké fotostabilitě a úzkým emisním spektrům lze využít v mnoha aplikacích. V biologii a bioanalytické chemii lze využít jako značky DNA, dále lze použít ve fluorescenčním značení mikroskopických preparátů, ke značení tkání či protilátek. Dále lze využít jako sondy v detekci prionových proteinů [13]. Kvantové tečky se využívají k analýze přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET - Förstrův rezonanční přenos energie). Metoda FRET využívá přenosu fluorescenční energie z částice na jinou (z dárce na akceptor). Platí, že vzdálenost mezi donorem a akceptorem je menší než kritický poloměr (Frösterův poloměr). Metoda FRET se využívá k měření změn proteinových konformací a k testování aktivity enzymů. QDs se zde využívají jako donorové částice [13]. Modifikovanou verzí FRET je metoda BRET, což je bioluminiscenční rezonanční přenos energie. Tato metoda se inicializuje enzymatickou reakcí katalyzované donorové molekuly, kterou bývá nejčastěji enzym a akceptorovou molekulou je kvantová tečka [13, 14].

Díky konjugaci QDs s biomolekulami lze kvantové tečky uplatnit ve značení v biologických testech. V medicíně je možnost využít QDs jako značky v imunologických testech. Kvantové tečky lze použít v *in vivo* a *in vitro* zobrazování. Do budoucna lze očekávat jejich využití při zobrazení transportu léčiv [13, 14].

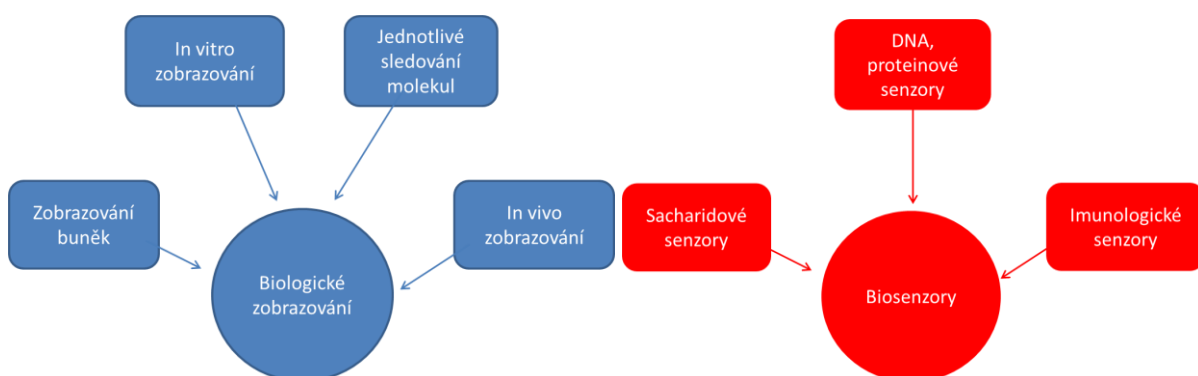
Pro dobré optické vlastnosti a vysokou fotostabilitu našly QDs uplatnění v genetických technologiích. QDs sondy mohou být využity pro detekci ERBB2/HER2/ protilátek, díky nimž se prokazuje rakovina prsu. Navíc v genetických aplikacích se kombinuje metoda QD-FRET. Využívá se pro stanovení dynamiky telomerizace [13, 14].

Dále se tyto nanokrystaly využívají k fluorescenčnímu značení buněčných struktur. Celkem jednoduchá je metoda vnějšího značení buněk. Obtížné je značení látek uvnitř buňky. Problémem je dopravení kvantových teček do cytoplazmy. Nejčastěji se využívá metod nespecifické pinocytózy, peptid-indukované dopravy a dopravy s pomocí mikroinjekcí. Pro některé aplikace je důležitá také buněčná prostorová distribuce QDs v čase (rakovinové

metastázy, embryogeneze) [13]. Při značení proteinů se využívá značení F-aktinových vláken, ovšem enzymová aktivita proteinů musí zůstat zachována [13-15].

Studie doktora T. Jamiesona prokázaly využitelnost QDs jako detektorů toxinů a patogenů. Využilo se QDs konjugovaných na aglutinin pšeničných klíčků a transferinu ke značení bakteriální a houbové populace. Transferin konjugované QDs poskytly test patogenní virulence. Při aplikacích in situ se demonstrovalo také využití QDs k detekci virů hepatitidy B a C [13-15].

Na následujícím obrázku je rozdělení využití kvantových teček v biomedicínských a bioanalytických aplikacích. Využití nalézají v biologickém zobrazování, jak in vitro, tak in vivo, dále lze sledovat celé molekuly, tak jednotlivé buňky. QDs se uplatňují i jako sacharidové, či proteinové senzory, po biofunkcionalizaci i jako imunologické senzory [4].



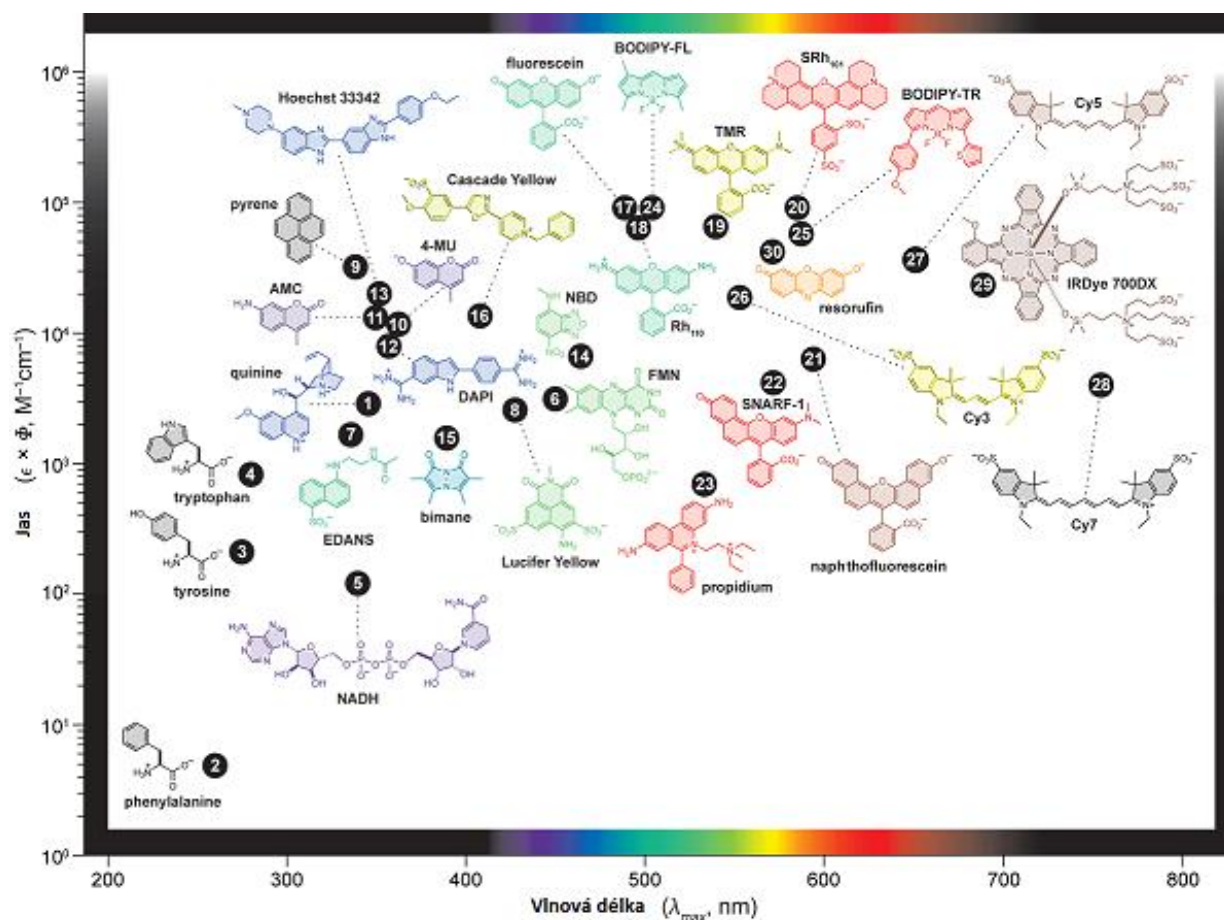
Obrázek 6: Využití QDs v biomedicínských a bioanalytických aplikacích, přejato a upraveno [4]

## 2.4 Fluorofory

Jak již bylo zmíněno, kvantové tečky díky svým dobrým fluorescenčním vlastnostem začínají nahrazovat organické fluorofory. Tyto molekuly využívají jevu fluorescence, což je fyzikálně chemický jev, při kterém světlem ozářené molekuly absorbují energii, kterou se následnou emisí světla o delší vlnové délce zbaví. U jevu fluorescence je důležité zmínit, že k emisi světla dochází jen po dobu buzení, po vypnutí buzení fluorescence téměř okamžitě vymizí [16, 17].

Fluorofory dělíme do dvou skupin a to podle typu fluorescence na vlastní a nevlastní. Vlastní fluorescence se vyskytuje u buněk, které mají vnitřní fluorofory (některé proteiny, redukovaná forma NADH, NADPH, vitamín A, cytochromy, chlorofyl, peroxidáza, hemoglobin a myoglobin). Druhou skupinou jsou tedy fluorofory s nevlastní fluorescencí. Označují se jako fluorofory vnější, protože se přidávají ke vzorku, který chceme zkoumat. Na vzorek se váží kovalentní vazbou (fluorescenční značky) nebo nekovalentně (fluorescenční sondy). Ke značení proteinů se nejčastěji používají fluorescenční značky, které se na protein vážou pomocí

aminového, či histidinového řetězce, nebo thiolových skupin. V chemii, či imunologii se také využívá specifických interakcí avidin-biotin, či protilátka-hapten [16].



Obrázek 7: Fluorofory [18]

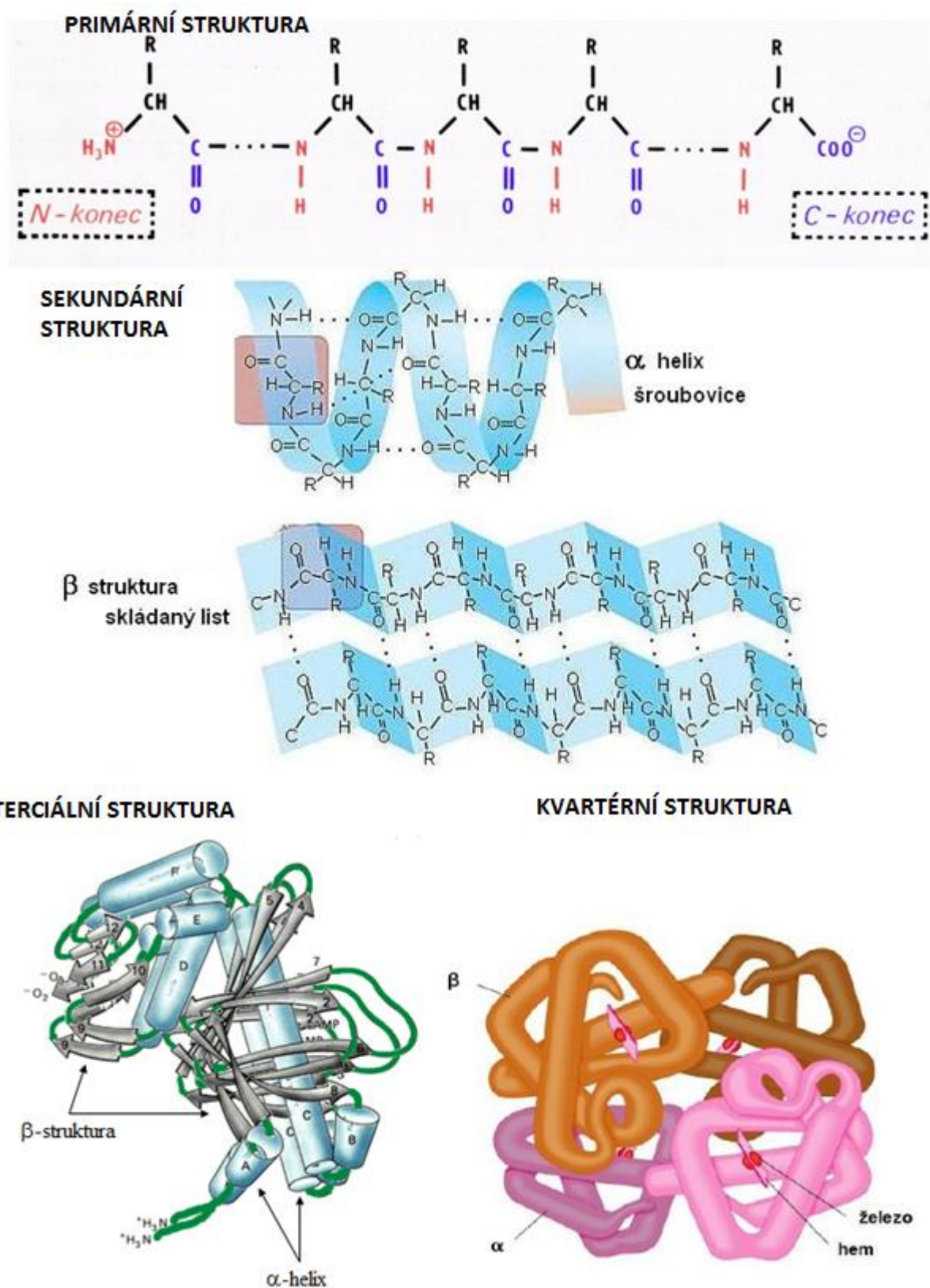
### 3 PROTEINY

Proteiny, jiným názvem bílkoviny, jsou biopolymery, které vznikají geneticky řízenou proteosyntézou. Chemicky jsou to biopolymery složené z aminokyselin spojených peptidovou vazbou do řetězců. Díky nekovalentním vazbám mezi úseky řetězce mají proteiny charakteristické prostorové uspořádání, jež se označuje jako nativní konformace [19, 20].

Proteiny lze dělit dle jejich funkce na proteiny strukturní, s metabolickou funkcí, s transportní funkcí, či signální proteiny s informační funkcí a bílkovinné protilátky neboli imunoglobuliny. Strukturní proteiny tvoří skelet buněčných struktur. Proteiny s metabolickou funkcí mají charakter enzymů. Imunoglobuliny se skládají ze čtyř podjednotek polypeptidového řetězce, jež jsou navzájem spojeny nekovalentními hydrofobními vazbami a disulfidovými můstky, vytvářejí tak útvar ve tvaru písmena Y. Tyto imunoglobuliny mají schopnost rozeznávat antigeny (cizí škodlivé látky) a poté se na ně specificky navázat, čímž se spustí kaskáda dějů, jež antigeny zneškodní [19-21].

Struktura proteinů se rozlišuje do čtyř úrovní. První úroveň je primární struktura, která je dána pořadím aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci. Z primární struktury lze zjistit mechanismus interakcí na molekulární úrovni, vzájemné vztahy k jiným proteinům a samozřejmě i celkovou strukturu. Dle směru proteosyntézy je začátek řetězce označován jako N-konec. Sekundární struktura bílkovin je dána prostorovým uspořádáním hlavního polypeptidového řetězce, který je dán především vodíkovými vazbami. Existují dva hlavní typy sekundární struktury, a to  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -struktura. Struktura  $\alpha$ -helixu má podobu pravotočivé šroubovice, stabilizované vodíkovými vazbami mezi každou čtvrtou peptidovou vazbou. Na jednu otáčku šroubovice připadá 3,6 aminokyselinových zbytků. Struktura  $\alpha$ -helixu se vyskytuje převážně u vláknitých proteinů, u svalových proteinů. Řetězec  $\beta$ -struktury je natažen do hřebene, několik řetězců tvoří spolu dojem skládaného listu. Prostorové uspořádání celé molekuly proteinu se nazývá terciální struktura. Na jejím udržení se podílí vztahy mezi postranními řetězci (hydrofobní, vodíkové, iontové a disulfidové vazby). Posledním typem je struktura kvartérní, ta se však nevyskytuje u všech bílkovin. Tuto strukturu vytváří polypeptidové podjednotky vázané nekovalentními interakcemi. Jako zástupce proteinu s kvartérní strukturou se většinou uvádí hemoglobin, složený ze čtyř podjednotek [19-21].

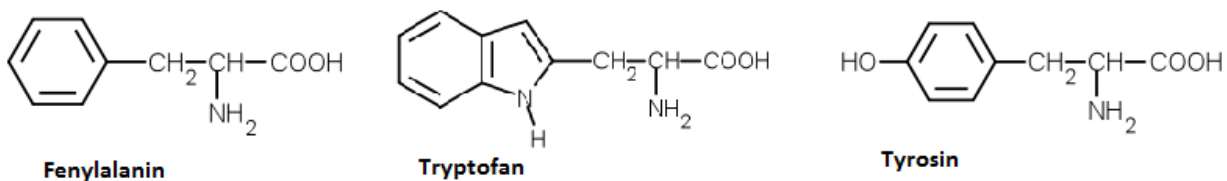
Proteiny lze dělit také dle tvaru, a to na globulární a fibrilární – vláknité, či bílkoviny složené. Složené bílkoviny obsahují i látky nebílkovinné povahy, které jsou spojeny kovalentními vazbami. Do této skupiny patří např. lipoproteiny, glykoproteiny. Globulární bílkoviny mají oblý tvar a jsou často ve vodě rozpustné. Do globulárních proteinů řadíme albumin. Fibrilární bílkoviny jsou naopak většinou ve vodě nerozpustné, jejich funkce je podpůrná, najdeme je v pojivových tkáních a kontraktilních vláknech. Typickými zástupci této skupiny jsou elastin, kolagen či myozin [19-21].



Obrázek 8: Struktura bílkovin [22]

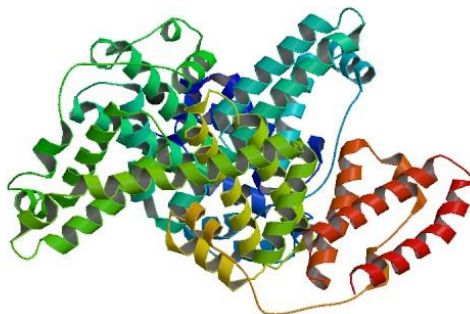
Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, některé proteiny můžeme řadit do skupiny fluoroforů. Patří sem proteiny složené z aromatických aminokyselin tryptofanu, tyrozinu

a fenylalaninu. Jejich absorpční i emisní spektrum leží v ultrafialové oblasti. Nejvýraznějším z nich je aminokyselina s nepolárním řetězcem tryptofan, neboť obsahuje indolovou skupinu, která má široké emisní spektrum. Tryptofan stejně fenylalanin (který má naopak nejmenší fluorescenci) jsou esenciální aminokyseliny. Tryptofan je prekurzorem hormonu melatoninu. Tyrosin patří do skupiny aminokyselin s polárním řetězcem. Tyrosin je prekurzorem melaninu, hormonu dřeně nadledvin, adrenalinu a hormonů štítné žlázy [16, 19, 21].



**Obrázek 9: Fluorescenční aminokyseliny [23]**

Dalším významným proteinem je hovězí sérový albumin (zkráceně BSA), tento protein je důležitý hlavně při přepravě mnoha endogenních a exogenních ligandů. Díky svým vlastnostem a struktuře se podobá lidskému sérovému albuminu (HSA). Kvůli tomu se BSA často využívá při experimentech v laboratořích (např. jako médium), ale také při modifikaci povrchu nanočástic (povrchu QDs) a to díky jeho silné afinitě k nim [24].



**Obrázek 10: Hovězí sérový albumin [23]**

## 4 BIOFUNKCIONALIZACE

Biofunkcionalizace QDs, jinak biokonjugace, je metoda, která umožňuje spojení QDs s biomolekulami. Díky této metodě lze tedy QDs snadno navázat na cílovou látku / tkáň, a tím ji posléze detekovat. Výsledná kvantová tečka (tedy navázaná na biomolekulu) musí splnit následující požadavky:

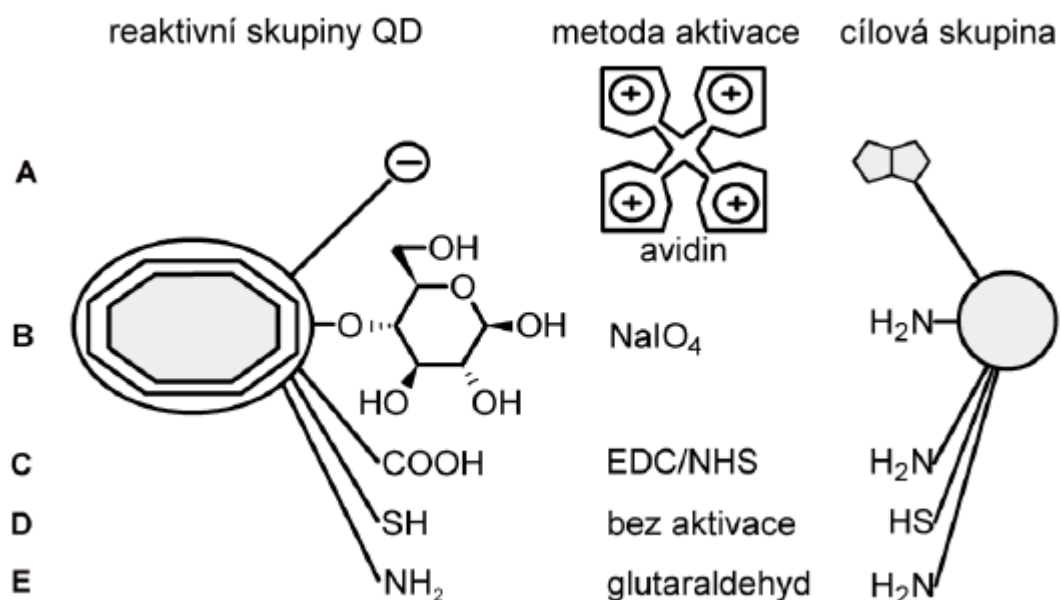
- nesmí narušovat funkce biomolekuly
- konjugované QDs musí mít stejný signál, jako původní
- stabilní vazba QDs-biomolekula
- kontrolovatelnost počtu vazebných míst na povrchu QDs, na které se biomolekuly váží
- malá tloušťka vrstvy s ohledem na velikost QDs.

Navíc výsledné QDs po procesu biokonjugace musí být bioinertní, málo toxické. Nejdůležitějším požadavkem je, aby výsledné QDs spojené s biomolekulami měli vysokou specifitu k cílovým molekulám / tkáním [6, 25, 26].

Samotný proces biokonjugace sestává ze dvou částí. Zaprvé se reaktivní skupiny na povrchu QDs aktivují pomocí konjugačního činidla. Zadruhé do roztoku QDs se přidá biomolekula, jenž se naváže na předem připravené povrchy QDs. Cílová molekula může být na povrchu QDs přichycena přímo, a to pomocí kovalentních nebo nekovalentních vazeb. Další možností je nepřímá biokonjugace, tedy pomocí jiné molekuly [6, 25, 26].

Biokonjugace pomocí přímé kovalentní vazby se provádí za účasti thiolových skupin. Tímto způsobem se na QDs váže BSA nebo DNA. Pokud je žádoucí na povrch kvantových teček navázat streptavidin, využívá se reakce jeho amino skupiny s karboxylovou skupinou QDs. Biokonjugace nekovalentními vazbami se děje za pomoci elektrostatických a hydrofobních sil. Využívá se toho, že povrch CdTe QDs je záporně nabitý a lze na něj navázat kladně nabitě molekuly (např. avidin) [6, 25, 26].

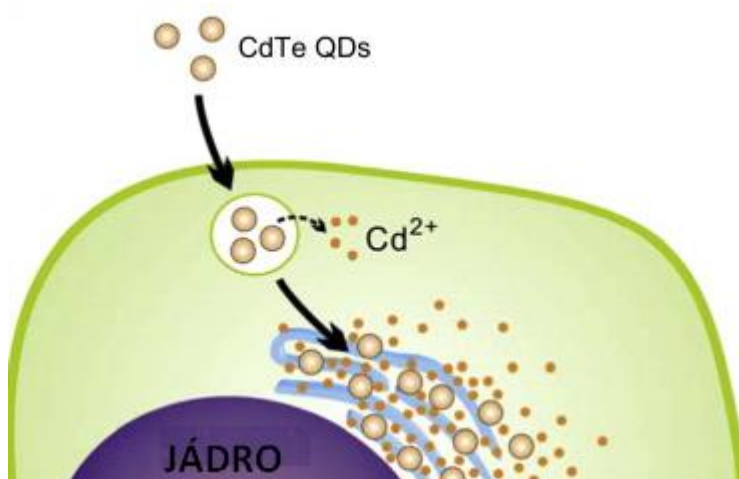
Nepřímá biokonjugace se děje prostřednictvím jiné biomolekuly, tzv. mediátoru. Mediátor se naváže na povrch QDs a na něj se poté naváže cílová molekula. Jsou všeobecně známy dva typy mediátorů: homobifunkcionalizační a heterobifunkcionalizační. Nevýhodou nepřímé biokonjugace je, že nelze dobře kontrolovat množství biomolekul, které se naváží na povrch kvantové tečky [6, 25, 26].



Obrázek 11: Příklady biokonjugace QDs: Pod možnostmi A) zobrazena metoda konjugace záporně nabitého povrchu QDs s pozitivně nabitým avidinem. B) sacharidové jednotky na povrchu QDs se aktivují oxidací  $\text{NaIO}_4$ , následně vzniknou aldehydové skupiny, na něž se váží molekuly s aminoskupinami. C) aktivované karboxylové skupiny reagují s aminoskupinami biomolekul. Na možnosti D) jsou vidět thiolové skupiny QDs a biomolekul, jež se propojí disulfidickým můstkem. E) spojení aminoskupin pomocí glutaraldehydu [6]

## 5 DEGRADACE

Hlavním problémem, který omezuje používání kvantových teček v biologických systémech je jejich vysoká toxicita. Velmi často QDs obsahují ionty těžkých kovů (Cd, Pb, Te). Například kadmium je vysoce toxický a teratogenní prvek, který se v těle hromadí především v játrech a ledvinách. Špatně a pomalu se z těla odbourává. V různých savčích orgánech je jeho poločas rozpadu v rozmezí 7 – 40 let. Další složkou QDs je tellur, jehož sloučeniny jsou také toxické. Působení toxických látek v organismu lze zmírnit povrchovou funkcionalizací QDs, která zmenšuje následné poškození buněk. Povrchově funkcionalizované QDs a nefunkcionalizované QDs mají různé vlastnosti. Také záleží na vlastnostech látky, kterou se funkcionalizace provádí. Některé studie tvrdí, že uvolňování kadmiových iontů z kvantových teček je hypotetickým důsledkem oxidace a degradace metalového jádra teček. A právě uvolnění kadmiových iontů poškozuje buňky. Toxicita QDs vede k buněčné apoptóze. Také srážení QDs na povrchu buňky způsobuje její poškození [4, 27, 28].



Obrázek 12: Uvolnění iontů kadmia z jádra QDs [27]

Na vlastnosti kvantových teček má vliv i jejich stárnutí. Stárnutí mění celkovou morfologii kvantových teček, což způsobuje i jejich rozpad. Dále pokles absorpce ve viditelné oblasti, ale naopak její zvýšení v oblasti blízkého infračerveného záření. Také se mění jejich emisní spektrum, kvantové tečky svítí po mnohem kratší dobu. Proces stárnutí kvantových teček je ovlivněn složením jejich povrchové vrstvy a také prostředím, ve kterém jsou skladovány [29-32].

## 6 METODY CHARAKTERIZACE QDs

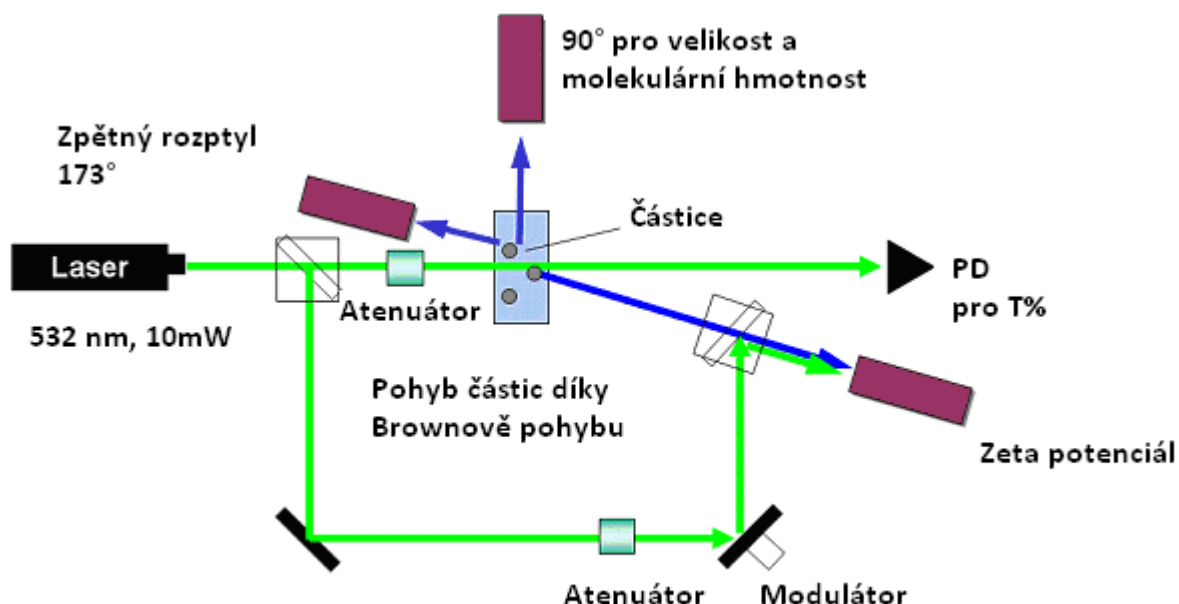
### 6.1 Stanovení velikosti a zeta potenciálu pomocí dynamického rozptylu světla

Zetasizer je analytický přístroj, který pro měření zeta potenciálu, molekulární hmotnosti a velikosti částic využívá dynamický rozptyl světla (DLS). DLS se měří na základě Brownova pohybu, což je neuspořádaný pohyb mikroskopických částic vlivem teplotního pohybu. Brownův pohyb má přímou souvislost s velikostí částic, protože víme, že malé částice se pohybují rychleji a velké pomaleji. Na zetasizeru lze analyzovat nanočástice, různé emulze a koloidy. V závislosti na velikosti vzorku a jeho fyzikálních vlastnostech je měřitelný rozsah velikostí částic v rozmezí 0,3 nm až 8 μm. Pro měření se využívají tři typy kyvet - speciální kyveta (pro určení zeta potenciálu), kyveta plastová (pro určení velikosti částic) a skleněná kyveta (pro určení molekulární hmotnosti částic a také velikosti částic) [33, 34].

Principem měření velikosti částic je měření rozptýleného světla, které je emitované z laserového zdroje a projde částicemi v kyvetě. Signál, který se získá z rozptýleného světla, se přivede na detektor a do vícekanálového korelátoru. Pomocí Stokes-Einsteinova vztahu je možné převést rychlost pohybu částic na jejich velikost [33, 34].

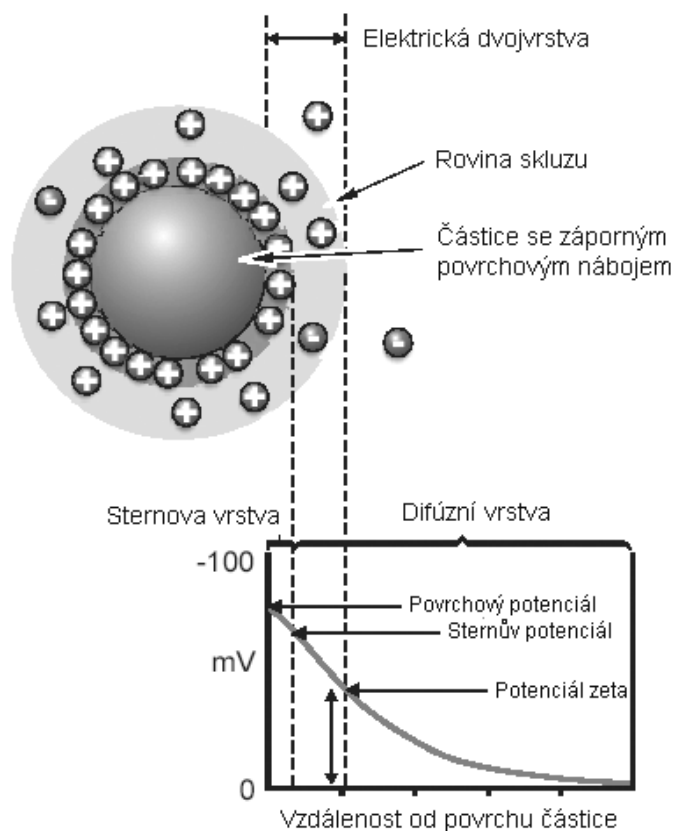
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_i}, \quad (1)$$

kde  $D$ -difúzní konstanta,  $k$ -Boltzmannova konstanta,  $T$ -absolutní teplota,  $\eta$ - dynamická viskozita kapaliny,  $R_i$ -průměr částice.



Obrázek 13: Princip zetasizeru [33]

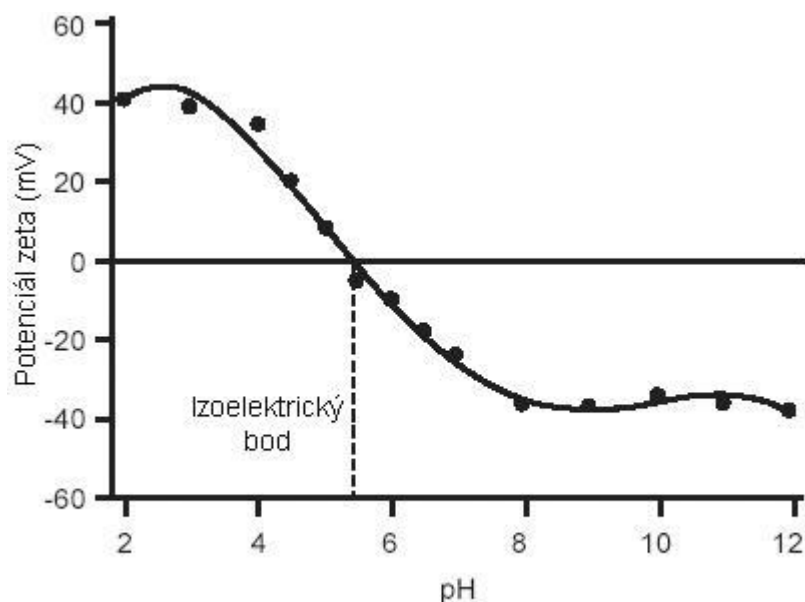
Zetasizer se využívá i k měření molekulové hmotnosti bílkovin, polymerů, či škrobů. Molekulovou hmotnost látky lze vyjádřit jako hmotnost všech atomů obsažených v jedné molekule látky. Molekulovou hmotnost lze získat pomocí dvou metod měření, a to dynamického rozptylu světla a statického rozptylu světla. Metoda dynamického rozptylu světla pracuje na principu Mark-Houwinkova-Sakurada vztahu. Výhodou této metody je její rychlost. Její nevýhodou je, že spoléhá na empiricky dané konstanty a průměrnou molekulovou hmotnost. Při metodě měření statickým dynamickým rozptylem, se využívá měření vzorků o různých koncentracích pod úhlem 90°. Měřením vznikne Debyův graf, ze kterého je následně možné vypočítat molekulovou hmotnost částic [33, 34].



**Obrázek 14: Zeta potenciál [35]**

Měření zeta potenciálu vychází z teorie, že každou částici obklopuje elektrická dvojvrstva. Ta se skládá se z vnitřní (Sternova vrstva) a vnější části (difúzní oblast). Ve vnitřní části jsou ionty pevněji vázané, než je tomu ve vnější části. V difúzní oblasti se dále nachází teoretická hranice, kde ionty a částice vytvářejí stabilní jednotku. Při pohybu částice v prostředí se ionty, které se nacházejí před touto teoretickou hranicí, pohybují zároveň s ní. Zeta potenciál popisuje právě potenciál na této hranici. Velikost zeta potenciálu je důležitý indikátor disperzní stability. Zeta potenciál se měří pomocí elektroforetického rozptylu světla, kdy směr pohybu částic určuje, zda je náboj negativní či pozitivní a velikost náboje je určena rychlostí částic. Frekvence rozptylu světla je funkcí rychlosti částic v důsledku Dopplerova posunu [33-35].

Částice, u nichž zeta potenciál překročí hodnotu + 30 mV nebo hodnotu -30 mV se považují za stabilní. Bod, jenž prochází nulovým potenciálem, se nazývá izoelektrickým bodem. Koloidní roztok, který má zeta potenciál v tomto bodě se považuje za nejméně stabilní. Zeta potenciál je silně ovlivněn hodnotou pH roztoku, a proto při jeho měření musí být pH vždy uvedeno. Bez uvedení pH není hodnota zeta potenciálu vypovídající. Na následujícím obrázku je zobrazena křivka potenciálu zeta oproti pH. Z ní vyplývá, že zeta potenciál látky bude kladný při nízkém pH a při vysokém naopak záporný [33-35].



Obrázek 15: Křivka zeta potenciálu proti pH [34]

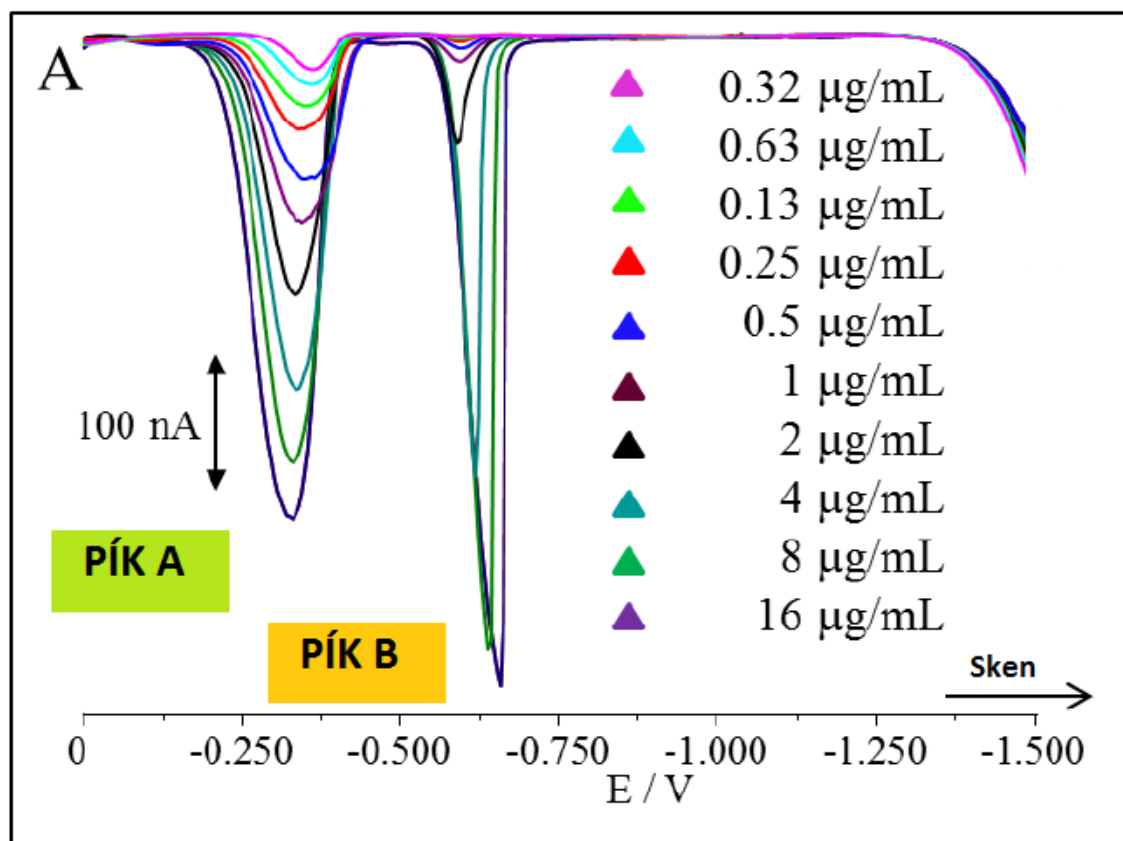
## 6.2 Voltametrie

Voltametrie je elektrochemická analytická metoda využívající elektrolytických dějů na polarizovatelných elektrodách ponořených v analytech. Tato metoda měří závislost proudu na napětí na pracovní elektrodě. Napětí je na pracovní a referenční elektrodu vkládáno z vnějšku. Výsledkem je voltamogram, z něj lze kvantitativně i kvalitativně hodnotit látky v elektrolytech. Voltametrie nejčastěji využívá tříelektrodové zapojení (elektroda pracovní, pomocná a referenční). Pracovní elektrody jsou obvykle elektrody III. druhu (jsou tvořeny z ušlechtilých kovů). Tyto elektrody nejsou rozpustné v roztoku a jsou polarizovatelné. Nejznámějším zástupcem této kategorie je visící rtuťová kapka, zlatá elektroda nebo elektroda uhlíková. Referenční elektrody jsou elektrody II. druhu, které tvoří kov pokrytý vrstvou málo rozpustné soli. Nejčastěji používaná je argentchloridová elektroda s roztokem KCl. Dalším typem je elektroda kalomelová, což je Pt elektroda pokrytá  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , zanořena do Hg, navíc je převrstvena roztokem KCl. Pomocná elektroda bývá uhlíková, či platinová. Tyto elektrody musí mít dostatečně velkou plochu a musí být dobře vodivé. Voltametrie se dělí na několik typů např.: cyklická voltametrie nebo diferenční pulzní voltametrie [3, 36, 37].

Cyklická voltametrie, jak prozrazuje název, pracuje v cyklu. Potenciál se na elektrody vkládá od iniciálního (nejnižšího) a lineárně se zvyšuje po zlomový potenciál, proběhne dopředný sken. Poté je potenciál snižován k finálnímu potenciálu, který bývá shodný s iniciálním. Tato metoda se využívá pro charakterizaci redoxních systémů [3, 37].

Pulzní voltametrie se dále dělí na normální pulzní voltametrii (NPV) a diferenční pulzní voltametrii (DPV). Rozdíl mezi NPV a DPV je v metodě vkládání pulzů na elektrody. U NPV

je potenciál na elektrody vkládán v podobě pulzů, jejichž amplituda roste v čase. Při využití rtuťové pracovní elektrody se pulz vloží na visící kapku těsně před koncem její životnosti. Při DPV se využívá pevně stanovená velikost amplitudy pulzů, kdy pulzy jsou superponovány na potenciálovou rampu, která se lineárně mění. Výhodou diferenční pulzní voltametrie je její vysoká citlivost, proto je možné ji využít i k charakterizaci kvantových teček. Na následujícím obrázku je znázorněn typický průběh DPV voltamogramu pro různé koncentrace kvantových teček [3, 36, 37].



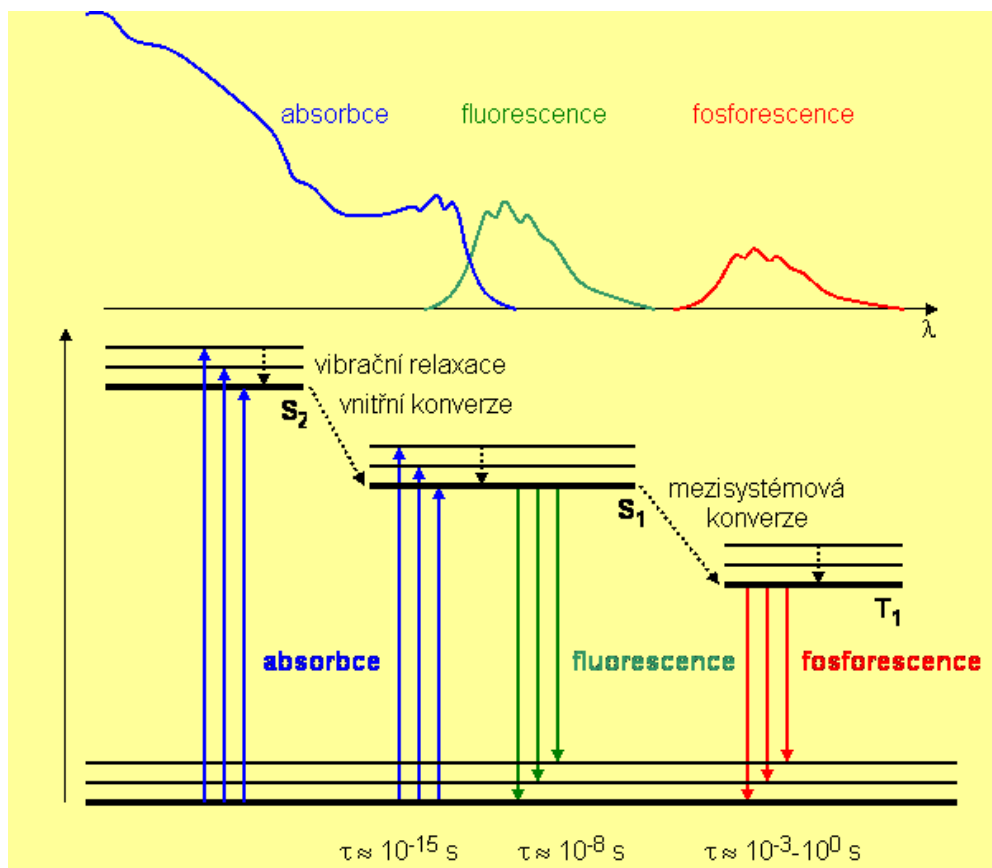
Obrázek 16: DPV voltamogram QDs [36]

### 6.3 Absorpční a fluorescenční spektroskopie

Luminiscence je definována jako emise světla z látky. Elektrony této látky předtím absorbovaly energii ze záření a přešly do excitovaného stavu. Přejodem do základního vztahu vzniká luminiscence [16, 17, 38].

Jakmile elektrony látky absorbují energii ze světelného záření, přejdou ze singletového stavu  $S_0$  do singletových stavů excitovaných ( $S_1$ ,  $S_2$ ) a následně do tripletových stavů ( $T_1$ ,  $T_2$ ). Molekuly látky přejdou z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  do vibrační hladiny stavů excitovaných. K návratu do rovnovážné vibrační hladiny, tedy k deexcitaci, může dojít dvěma procesy. Za prvé pomocí zářivého přechodu, kam spadá luminiscence, nebo nezářivého

přechodu, např. vibrační relaxace. Popis zářivých a nezářivých přechodů je na následujícím obrázku, který se nazývá Jablonského diagram [16].



Obrázek 17: Jablonského diagram [16]

Luminiscence se řídí Stokesovým zákonem, kdy vlnová délka excitačního světla musí být menší, či rovna vlnové délce luminiscenční emise. Kvantový výtěžek luminiscence je roven podílu počtu vyzářených fotonů a excitovaných molekul. Luminiscenci lze dále dělit na fluorescenci, zpožděnou fluorescenci a fosforescenci. Fluorescencí se nazývá jev, kdy emise záření z excitovaného stavu nastane spontánními energetickými přechody. Kritériem fluorescence je možnost pozorování jen při buzení, po jeho ukončení fluorescence vymizí. Zpožděná fluorescence je také zářivý přechod z excitované hladiny, ovšem zpožděná fluorescence má oproti obyčejné fluorescenci delší dobu dohasínání, při které se molekula nachází v nestabilním stavu. Fosforescence je jev, kdy se při emisi záření z excitovaného stavu uplatní metastabilní hladina. Doba dohasínání bývá u fosforescence výrazně delší než u fluorescence [16, 38].

Průběh fluorescence je charakterizován Kashovým a Vavilovým pravidlem. Kashovo pravidlo říká, že před emisí kvanta záření dojde k relaxaci vibrační energie a k vnitřní konverzi. Díky tomu fluorescenční přechod nastane vždy z nejnižší vibrační hladiny prvního

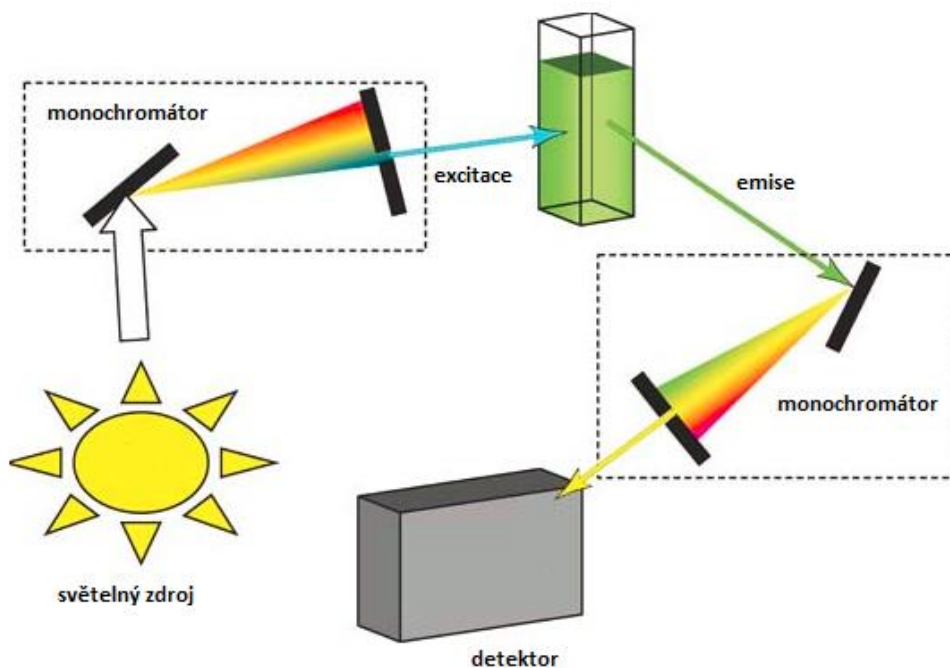
excitovaného stavu  $S_1$ . Vavilovův zákon definuje nezávislost emisních spekter na vlnové délce excitace [16, 38].

Fluorescenční spektroskopie je metoda založená na absorpci světelných kvant dané látky a měření její fluorescence. Díky ní lze zjistit emisní spektra analyzované látky. Absorpční spektra dané látky se měří na absorpčních spektrofotometrech. Při samotném měření je část vstupujícího toku záření absorbována daným vzorkem a zbytek záření projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok. Podíl vystupujícího zářivého toku ke vstupujícímu je nazýván transmitancí (propustností) a značí se písmenkem tau -  $\tau$ . Záporně vzatý logaritmus transmitance se rovná hodnotě absorbance. Absorpční a fluorescenční spektroskopie se využívá k charakterizaci kvantových teček. Je-li k dispozici dobře definované absorpční maximum pro danou kvantovou tečku, lze s jeho pomocí vypočítat její velikost, a to pomocí vzorce:

$$D = (9,8127 \cdot 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \cdot 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - (194,84), \quad (2)$$

kde,  $D$  je průměr kvantové tečky (nm) a  $\lambda$  je vlnová délka maxima absorpce (nm) [39].

Přístroj pro měření fluorescence se skládá ze zdroje záření (možnost buzení v UV a VIS oblasti spektra), následuje monochromátor. Světlo projde kyvetou se vzorkem a dopadne opět na monochromátor, poté je světlo detekováno detektorem [16, 17, 38].



Obrázek 18: Fluorescenční spektroskopie [40]

## 7 KINETIKA CHEMICKÝCH REAKCÍ

Chemická reakce je proces, při kterém z výchozích látek tzv. reaktantů vznikají látky jiné chemické struktury (produkty). Základní rozdělení chemických reakcí je na izolované a simultánní. Izolované proto, že v soustavě probíhá pouze jedna reakce. Druhým typem jsou reakce simultánní, kdy v soustavě probíhají dvě nebo více chemických reakcí. Tento typ reakcí lze dále dělit na bočné, následné, zvrtné a komplexní. Při bočných reakcích vzniká více produktů. Následné reakce se vyznačují tím, že vznikají meziprodukty, které se stávají výchozími látkami pro další reakce. Zvrtné reakce jsou protisměrné a komplexní reakce jsou kombinací reakcí simultánních [41-43].

Dalším typem dělení chemických reakcí je dle fází, ve kterých se nacházejí reagující látky. Pokud se reagující látky nacházejí ve fázi jedné, jedná se o reakce homogenní. Pokud jsou ve více fázích, mluvíme pak o reakcích heterogenních [41, 42].

Kinetika chemických reakcí studuje chemické reakce před ustavením chemické rovnováhy. Zájmem chemické kinetiky je zejména studium rychlosti a mechanismů chemických reakcí. Rychlost reakcí je dána vlastnostmi reaktantů, jejich koncentracemi a teplotou, při které daná reakce probíhá. Výpočet rychlosti v jednoduché chemické reakce:

$$v = -\frac{1}{a} \cdot \frac{d[A]}{dt} = k[A]^{\alpha}[B]^{\beta}, \quad (3)$$

kde  $A$  a  $B$  vyjadřují koncentrace reaktantů,  $k$  je rychlostní konstanta,  $t$  je čas,  $a$  je stechiometrický koeficient,  $\alpha$  je řád reakce vzhledem ke složce  $A$ ,  $\beta$  vyjadřuje řád reakce vzhledem ke složce  $B$ . Rovnice platí pro reakce probíhající v homogenní fázi, za konstantní teploty. Rychlost přeměny reaktantů na produkty je tedy přímo úměrná součinu koncentrací dosud nepřeměněných reaktantů v reakční směsi. Rovnice číslo 3 bývá nazývána rychlostním zákonem, či obecnou kinetickou rovnicí. Exponenty u koncentrací reaktantů jsou dílčí řády reakce vzhledem k dané látce. Součtem všech exponentů získáme celkový řád reakce:

$$n = \alpha + \beta. \quad (4)$$

Kinetika izolovaných reakcí je závislá na řádu reakcí, které se dělí na reakce nultého až třetího řádu [41, 42].

Při reakci nultého řádu rychlost chemické reakce nezávisí na koncentraci reagujících látek. Při reakcích prvního řádu je naopak rychlost chemické reakce za dané teploty přímo úměrná koncentraci jedné výchozí látky. Po úpravě rovnice číslo 3, získáme kinetickou rovnici pro reakci prvního řádu:

$$v = -k[A] \quad (5)$$

Reakce prvního řádu popisují například rozkladné reakce, jež jsou vyvolány vysokými teplotami. Reakcemi prvního řádu lze popsat i průběhy izolovaných biomolekulárních reakcí, ale pouze v případě, že jedna z reagujících látek se vyskytuje v nadbytku a její koncentrace se během reakce nemění. Reakce druhého řádu lze dělit na několik typů: zaprvé produkty vznikají ze dvou stejných reaktantů, zadruhé dílčí řády vznikajících produktů jsou rovny jedné a reaktanty mají jednotkové stechiometrické koeficienty a zatřetí, kdy vzniklé produkty mají dílčí řády rovny jedné a výchozí látky mají stechiometrické koeficienty obecné. Při reakcích druhého řádu je rychlost chemické reakce úměrná kvadrátu koncentrace složek [41-43].

## 8 EXPERIMENTÁLNÍ PLÁN

Cílem práce je studium uvolňování kademnatých iontů z jádra QDs, které tak odpovídá jejich degradaci. Pro tento účel byla měřena koncentrace kademnatých iontů pomocí DPV. Současně byla sledována změna fluorescence jako důležitého aplikační vlastnosti QDs. Do třetice byla sledována změna zeta potenciálu, který vyjadřuje změnu nábojové vrstvy pokrývající QDs.

Celý experiment byl rozdělen na tři části. **První blok** experimentu je zaměřen na přípravu a charakterizaci QDs (MSA-CdTe, MPA-CdTe, CdTe/ZnSe, GSH-CdTe). Připravené částice budou následně charakterizovány, tzn., že bude stanovena jejich velikost, zeta potenciál, množství volných kadmiových iontů, absorpční a fluorescenční spektra. Nakonec bude studován vliv pH na jednotlivé parametry QDs.

**Druhý experimentální blok** bude věnován studiu chování QDs v kyselém prostředí se zaměřením na studium krátkodobé kinetiky (v časech 0, 15, 30, 60, 90 a 120 minut) uvolňování Cd iontů. Prostředkem bude měření fluorescence QDs, měření zeta potenciálu a stanovení koncentrace volných iontů kadmia. Kvantové tečky budou během experimentu skladovány na denním světle při teplotě 25°C. Pokus pro kyselé prostředí bude ještě opakován v dlouhodobém měřítku (v čase 1h, 2h; 1, 7, 17, 21 a 25 dní). Stejný experimentální design bude opakován **ve třetím bloku**, který je spojen se studiem QDs v neutrálním prostředí. Při časových interakcích bude opět měřen zeta potenciál, koncentrace volných iontů kadmia a fluorescence QDs.

Výsledkem experimentu budou data, která popisují kinetiku uvolňování Cd iontů z kvantových teček (stárnutí QDs) v různých prostředích a jež by měla sloužit k možné predikci stability jednotlivých QDs.

## 9 MATERIÁLY A METODY

### 9.1 Chemikálie

Níže uvedené chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich Chemical Corporation (USA) v ACS čistotě.

Na přípravu kvantových teček byly použity tyto chemikálie: destilovaná voda (vyrobená pomocí přístroje Aqual 25 SL), dihydrogenacetát kadmia ( $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dihydrogencitronan sodný ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), telluričitan sodný ( $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ ), tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ), MPA, MSA, GSH, 1 M amoniak ( $\text{NH}_3$ ), octan zinečnatý ( $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ ), seleničitan sodný ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), 2-propanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ).

Pro přípravu pufrů byly použity následující chemikálie: ACS voda, trihydrát octanu sodného ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 0,1 M kyselina citronová ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O} \cdot (\text{COOH})_3$ ), 0,1 M dihydrogencitronan trisodný ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ ), síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), glycín ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ), dihydrogenchlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hydrogenftalát draselný ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ ), hexahydrátchlorid manganatý ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), tetrahydrogenchlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), dekahydrát síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), hydrogenuhlíčitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ ), dihydrogentartrát sodný ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dihydrogencitronan sodný ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), laktát sodný ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$ ) a pyruvát sodný ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ ).

### 9.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy BAS 31 (Boeco, Německo)
- Ultracentrifuga CS 150 NX (Hitachi, Japonsko)
- Transiluminátor MULTIBAND TFX-26.MC (Vilber Lourmat, Francie)
- Fluorimetr Infinite M200 Pro (Tecan, Švýcarsko)
- pH metr inolab, WTW (Weilheim, Německo)
- 797 VA Computrance (Metrohm, Švýcarsko)
- Koloidní analyzátor Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK)
- Multiwave 3000, Microwave reaction system (Anton-Paar, Německo)
- Elektromagnetická míchačka RET control-visc (IKA, Německo)

- Aqual 25 SL (Merci, ČR)

### 9.3 Příprava kvantových teček

Pro pokus byly vybrány čtyři různé typy kvantových teček. Jejich jádra jsou připravena jako CdTe QDs, tři QDs byly modifikovány pomocí MPA, MSA a GSH. Čtvrtý typ teček byl připraven jako jádro-obal (core shell), kde obal tvoří vrstva ZnSe.

Pro přípravu kvantových teček MPA-CdTe bylo v kádince smícháno 43 ml destilované vody s 5 ml  $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , roztok byl míchán pomocí elektromagnetického míchače a postupně byly přidány chemikálie: 100 mg  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,25 ml  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ , 100  $\mu\text{l}$  MPA a 50 mg  $\text{NaBH}_4$ . Dobře promíchaná vzniklá směs byla napipetována do skleněných zkumavek určených pro přípravu QDs pomocí mikrovlnného záření. Tyto zkumavky byly následně vloženy do mikrovlnného přístroje, na němž byly nastaveny parametry: 80 °C, energie 300 W, náběh teploty 10 minut a udržení teploty 10 minut. Poté byly vzorky umístěny pod UV lampu, aby byla zjištěna jejich kvalita.

Při přípravě GSH-CdTe kvantových teček se přistupovalo obdobně, opět za pomoci kádinky a elektromagnetického míchadla byla vytvořena směs ze 43 ml destilované vody, 5 ml  $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,25 ml  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ , 246 mg GSH a 50 mg  $\text{NaBH}_4$ . Takto připravená směs pro kvantové tečky byla opět dokončena pomocí mikrovlnného záření s parametry 70 °C, energie 300 W, náběh teploty 10 minut a udržení teploty 10 minut.

Kvantové tečky typu MSA-CdTe se připravili smícháním 76 ml destilované vody, 10 ml  $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml MSA, 1,8 ml 1 M  $\text{NH}_3$  (vznikne bezbarvý roztok) a přidáním 1,5 ml  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$  (roztok je nažloutlý) a 40 mg  $\text{NaBH}_4$ . Na mikrovlnném zářiči byla nastavena teplota 60 °C, energie 300 W, doba náběhu teploty 10 minut a čas pro udržení teploty také 10 minut.

Posledním připravovaným typem byly kvantové tečky jádro-obal (tzv. core shell) CdTe/ZnSe. Jejich jádro bylo připraveno smícháním stejných chemikálií jako při přípravě teček MSA-CdTe. Tato směs byla vložena do mikrovlnného zářiče s parametry 50 °C, energie 300 W, náběh teploty 10 minut a udržení teploty 10 minut. Mezitím byl připraven jejich obal. Nejprve bylo smícháno 250  $\mu\text{l}$   $\text{Zn}(\text{OAc})_2$  s 21,250 ml destilované vody. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce bylo následně přidáno 250  $\mu\text{l}$  MSA, 332  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{NH}_3$ , 375  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 10 mg  $\text{NaBH}_4$ . Vzniklá směs byla následně promíchávána po dobu dvou hodin. Vzniknuvší roztok byl doplněn na objem 25 ml pomocí destilované vody, následně byl přidán k 25 ml předem připravených CdTe kvantových teček. Vzniklý roztok byl napipetován do skleněných zkumavek a vložen do mikrovlnné trouby nastavenou na teplotu 60 °C, energie 300 W a dobou náběhu teploty 10 minut a udržení teploty 10 minut.

Po přípravě QDs je nutné zbavit se nenavázaného kadmia, proto byla provedena precipitace. Do mikrozkušavky ependorf o objemu 2 ml byl přidán k 1 ml roztoku kvantových teček 1 ml chemikálie 2-propanolu. Tato směs byla umístěna do ultracentrifugy, která byla nastavena na 25 000 otáček na 15 minut při teplotě 4 °C. Poté byl ze zkumavky pomocí pipety odsán supernatant. Ke sraženině QDs byl následně napipetován 1 ml ACS vody, ve kterém byla sraženina opět rozpuštěna.

#### **9.4 Příprava roztoků**

Acetátový pufr byl připraven navážením 27,22 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , který byl rozpuštěn v 1 l ACS vody. Přidavkem kyseliny octové byl pufr pomocí pH metru upraven na hodnotu pH 4,6 [38].

Citrátový pufr o pH 4,6 byl připraven navážkou 16,32 g  $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , která byla rozpuštěna v 555 ml ACS vody, a navážkou 9,35 g 0,1 M kyseliny citronové rozpuštěné v 445 ml ACS vody [38].

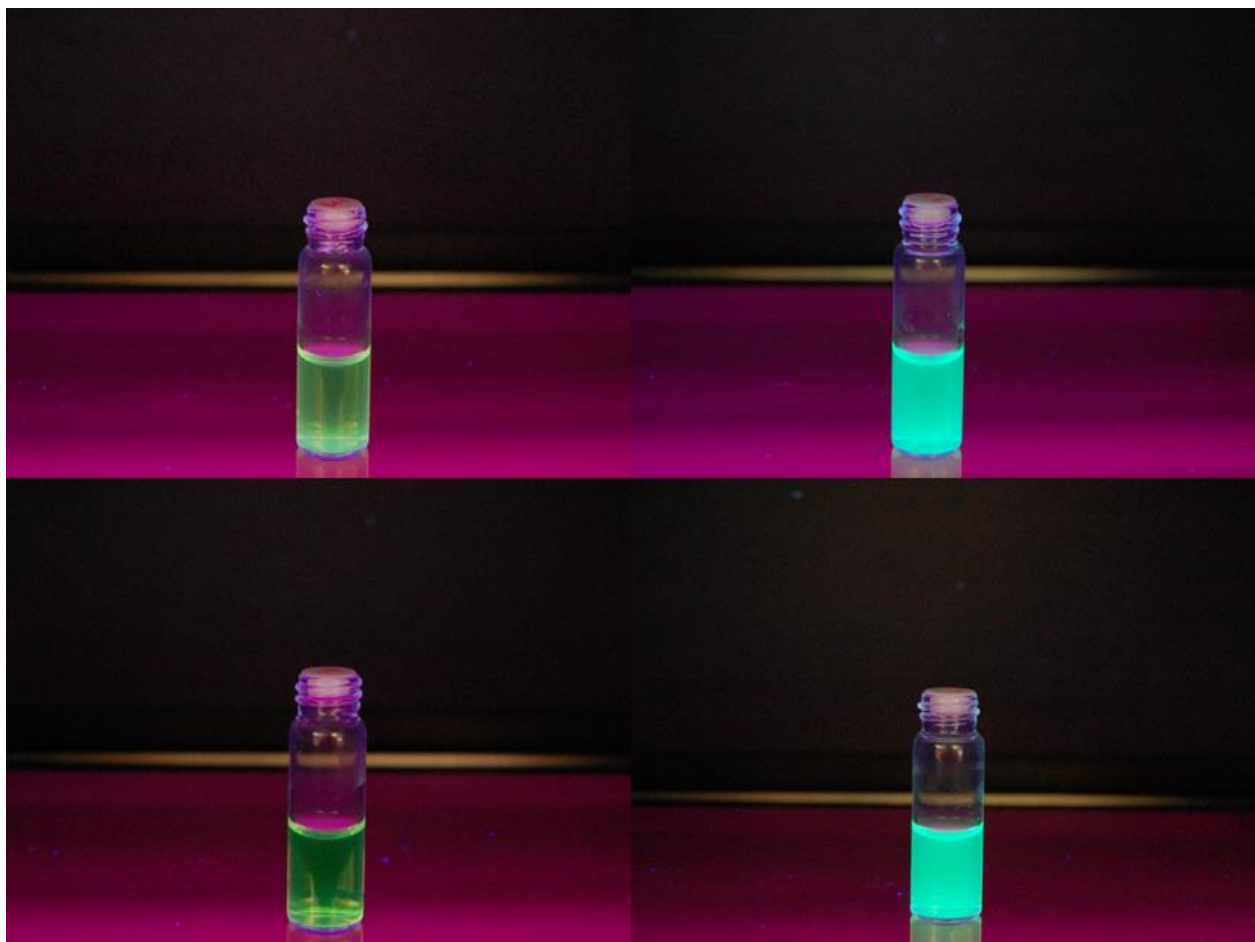
Dále byl vytvořen speciální kyselý roztok o pH 4,6, imitující intracelulární prostředí. Roztok vznikl navážením 142 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6650 mg NaCl, 71 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 450 mg glycinu, 29 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 4084,6 mg hydrogenftalátu draselného. Navážené chemikálie byly rozpuštěny v 1 l ACS vody [44].

Neutrální roztok buněčného prostředí o pH 7,6 byl vytvořen smícháním 148 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6415 mg NaCl, 212 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 318 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 179 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 2703 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 180 mg  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 144 mg  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 175 mg  $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$ , 172 mg  $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$  a 118 mg glycinu [44].

Naposledy byly připraveny fosfátové pufrы. V 1 l ACS vody bylo rozpuštěno 35,61 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ve druhé litru ACS vody bylo rozpuštěno 27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Za teploty 25 °C, tyto dva roztoky míchány v různých poměrech a pomocí pH metru byly vytvořeny fosfátové pufrы o pH 4-9 a navíc fosfátový pufr o pH 7,6 [38].

#### **9.5 Charakterizace kvantových teček pomocí transluminátoru**

Připravené kvantové tečky byly ve skleněných zkumavkách vloženy pod transluminátor (excitovány UV světlem), kde byly pořízeny jejich fotografie. Z nich je patrné, že barva všech připravených teček je zelená a tečky svítí s různou intenzitou. Největší intenzitu vykazují tečky MSA-CdTe a CdTe/ZnSe.

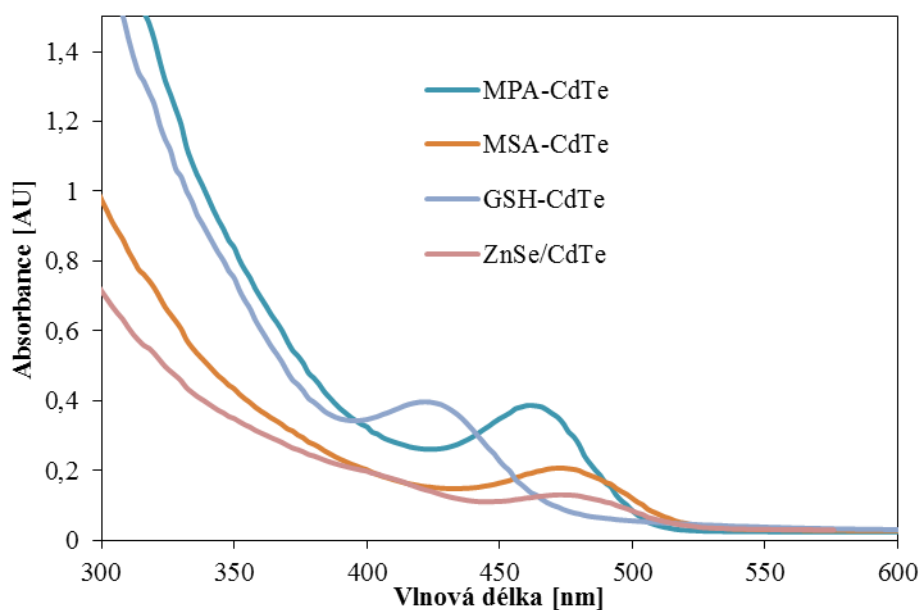


Obrázek 19: Připravené QDs pod transluminátorem (nahore zleva MPA-CdTe, MSA-CdTe, dole zleva GSH-CdTe, ZnSe/CdTe), vlastní zpracování

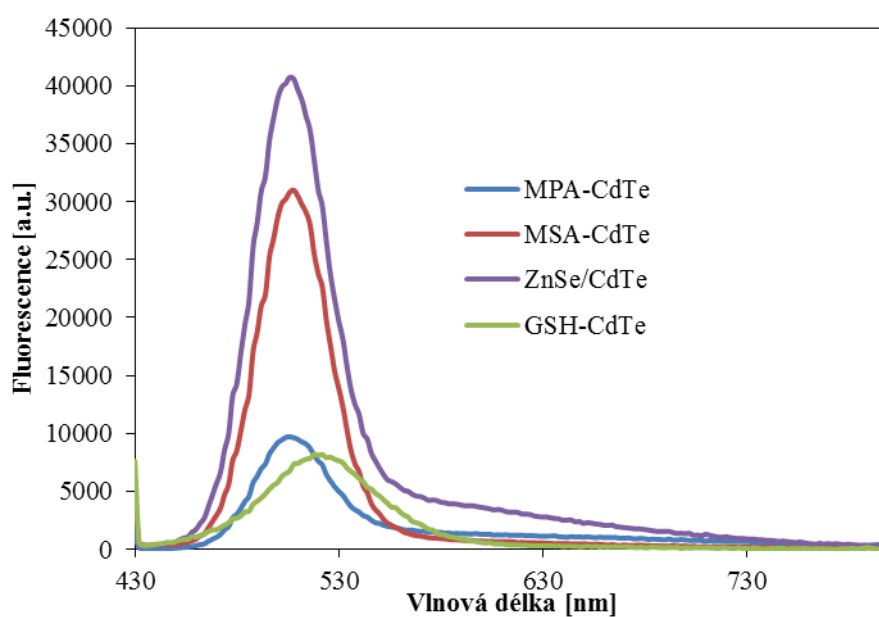
## 9.6 Absorpční a fluorescenční spektroskopie

Přesrážené kvantové tečky jsem charakterizovala pomocí absorpční a fluorescenční spektroskopie. Pro měření se využívalo 200  $\mu$ l vzorku a UV transparentní destička. Absorpční spektrum přesrážených kvantových teček bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 230-800 nm. Z absorpčního spektra se následně volila excitační vlnová délka, ta byla stanovena na hodnotu 400 nm. Emisní spektrum se měřilo na emisních vlnových délkách 430-800 nm. Citlivost fluorescence byla manuálně upravena na hodnotu 80, při vyšších hodnotách docházelo k přesvícení.

Absorpční a emisní spektra teček jsou uvedena na následujících grafech. Z absorpčního spektra bylo zjištěno, že tečky typu MPA-CdTe mají nejvyšší absorbanci při vlnové délce 462 nm, a MSA-CdTe při vlnové délce 472 nm. Tečky GSH-CdTe absorbují nejvíce světlo při vlnové délce 422 nm a CdTe/ZnSe při vlnové délce 474 nm. Z uvedených teček nejvyšších hodnot absorbance dosahují tečky CdTe modifikované MPA.



**Obrázek 20: Absorpční spektrum kvantových teček**

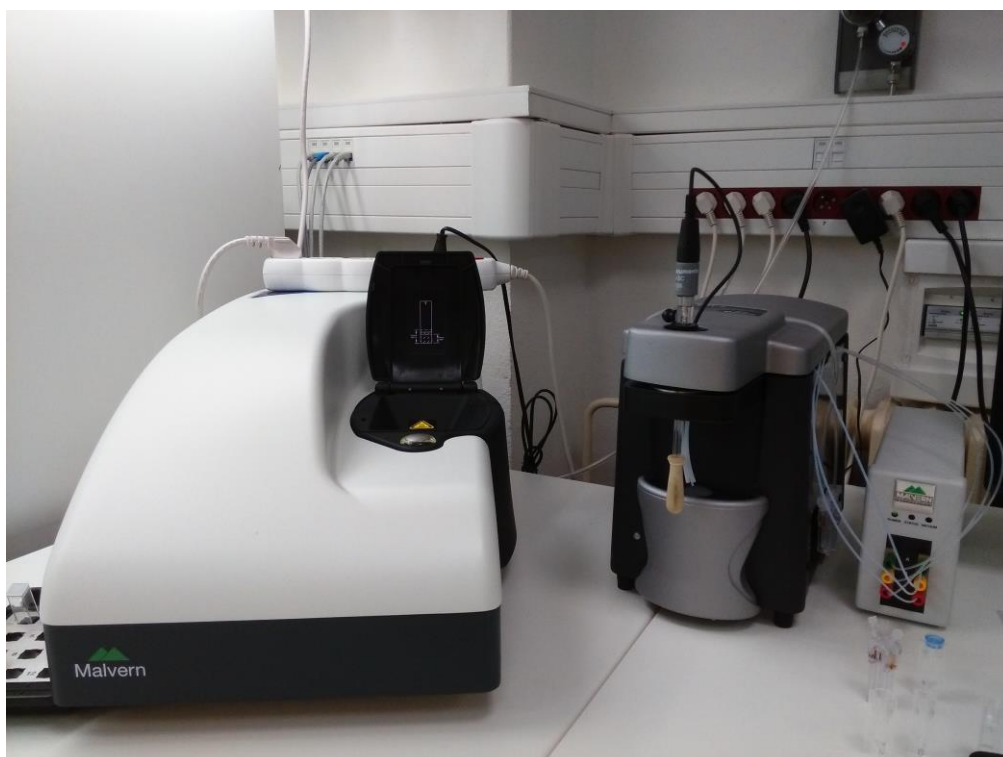


**Obrázek 21: Fluorescenční spektrum připravených kvantových teček**

Z fluorescenčního spektra lze vyčíst, že největší fluorescenci mají ZnSe/CdTe kvantové tečky, tedy typu core/shell. Naopak nejmenší fluorescenci vykazovaly tečky GSH-CdTe. Obrázek fluorescence koresponduje s intenzitami teček pod transluminátorem, zobrazeno na obrázku 19.

## 9.7 Koloidní analyzátor - Zetasizer

Využitím přístroje zetasizer byly vytvořené QDs charakterizovány, a to změřením jejich velikostí a zeta potenciálu. Před samotným měřením byly přesrážené kvantové tečky naředěny ACS vodou v poměru 1 : 3. Pro měření velikosti potenciálu QDs v pufrch došlo k ředění v poměru 1 : 10. Přístroj byl během měření nastaven na automatický režim, tudíž si sám vybíral optimální pozici pro měření vzorku v kyvetě. Při měření velikosti částic byla použita plastová kyveta, do které se vložil vzorek o objemu 200  $\mu\text{l}$ . Do kyvety na měření zeta potenciálu bylo zapotřebí vzorek o objemu 1 ml. Jelikož je zeta potenciál závislý na pH roztoku, bylo také změřeno pH kvantových teček.



Obrázek 22: Koloidní analyzátor Zetasizer (Malvern Instruments, UK), vlastní zpracování

## 9.8 Diferenční pulsní voltametrie

Stanovení bylo provedeno elektrochemickou metodou diferenční pulsní voltametrie s využitím přístroje 797 VA Computrance (Metrohm, Švýcarsko) s klasickým tříelektrodovým zapojením. Výsledkem měření získáme voltamogram, z něj lze kvantitativně (dle proudového píku) i kvalitativně (dle napěťového píku) hodnotit látky v elektrolytech. Koncentrace kadmia se odečítá při potenciálu -650 mV. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapka, referenční elektrodou byla argentchloridová elektroda a jako pomocná elektroda byla zvolena platinová. Všechny analyzované vzorky byly před měřením zbaveny kyslíku a to díky probubláváním argonu (99,999 %) po dobu 90 sekund. Pro měření byla zvolena metoda DPV na HDME (visící rtuťová kapka) s parametry metody: počáteční potenciál byl nastaven na hodnotu -1,3 V

a koncový 0,1999V, amplituda pulsu 0,025 V, čas pulsu 0,04 s, potenciálový krok 0,005035 V, čas potenciálového kroku 0,3 s, čas depozice byl zvolen na hodnotu 240 sekund a jeho potenciál, při kterém se deponují těžké kovy na rtuťovou kapku byl 1,15 V. Objem měřicí cely byl 2 ml (15  $\mu$ l vzorku a 1985  $\mu$ l pufru).

Pro vytvoření kalibračních křivek různých pufrů byla vytvořena desetibodová kalibrační řada vzniklá polovičním ředěním ze zásobního roztoku 1 mM kadmia.

Kvantové tečky se před měřením naředily ACS vodou v poměru 1 : 3. Pro samotné měření v pufrech, byly vzaty 159  $\mu$ l těchto teček a 2084  $\mu$ l pufru. Tato směs byla uchována dle experimentálních plánů.



**Obrázek 23: Přístroj 797 VA Computrance (Metrohm), vlastní zpracování**

## 10 VÝSLEDKY

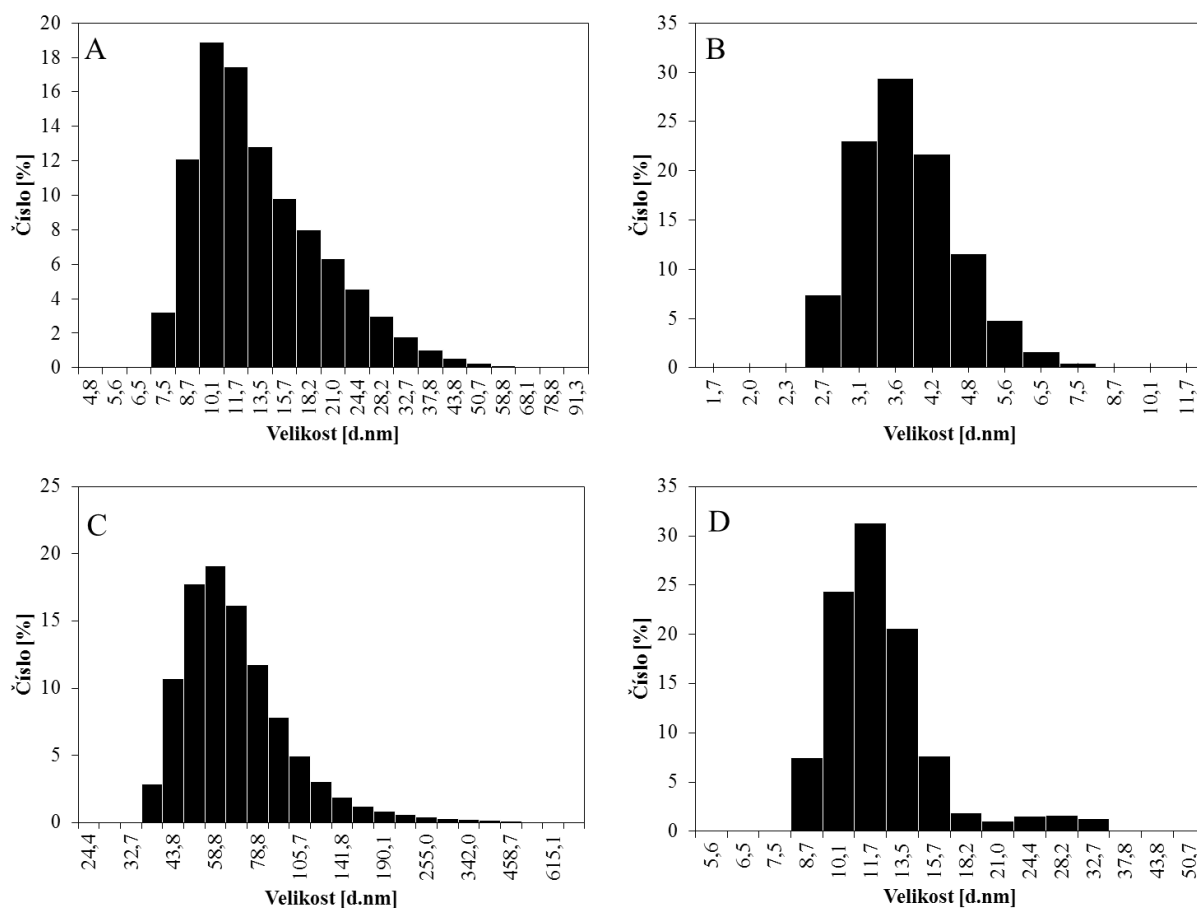
### 10.1 Charakterizace použitých kvantových teček

V prvním kroku byly charakterizovány připravené QDs z hlediska velikosti a zeta potenciálu. Pro úplnost bylo provedeno i měření pH jednotlivých kvantových teček. Kvůli přehlednosti jsou výsledné parametry charakterizace kvantových teček shrnuty v následující tabulce.

**Tabulka 1: Hodnoty pH, velikosti a zeta potenciálu jednotlivých kvantových teček po precipitaci.**

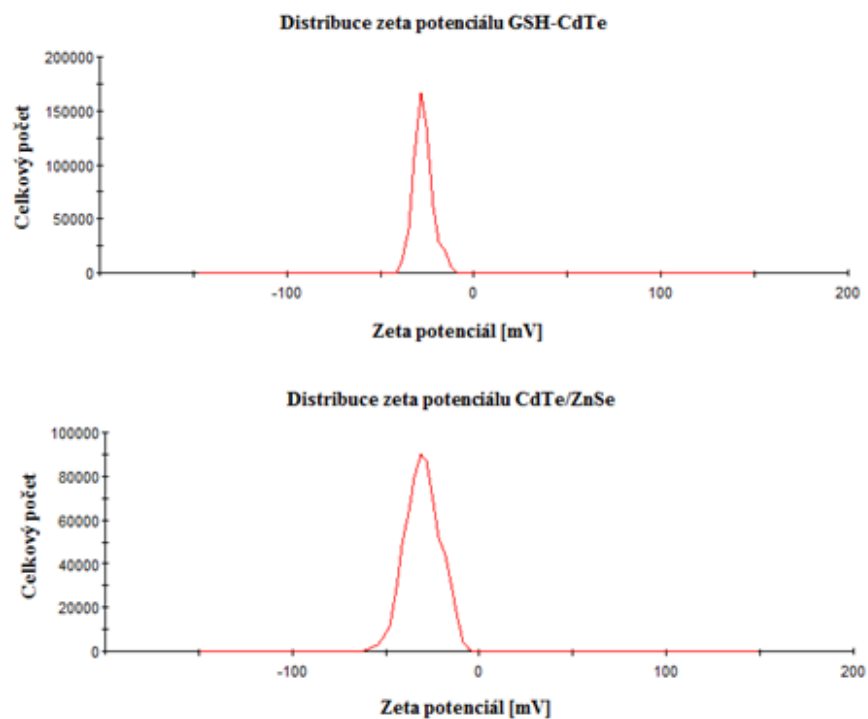
| Typ teček           | MPA-CdTe | MSA-CdTe | GSH-CdTe | CdTe/ZnSe |
|---------------------|----------|----------|----------|-----------|
| pH                  | 6,7      | 6,1      | 6,7      | 6,5       |
| Velikost [nm]       | 3,6      | 10,1     | 48       | 11,7      |
| Zeta potenciál [mV] | -35,4    | -36,5    | -27,2    | -30,3     |

Hodnotou pH jsou si kvantové tečky velmi podobné. Z měření vyplynulo, že kvantové tečky CdTe modifikované MPA a GSH mají stejné pH. Ač měly tyto QDs stejné pH, stojí tyto dva druhy teček na opačných stranách, co se týče velikosti. Z výsledků vyplývá, že nejmenšími QDs byly MPA-CdTe, o velikosti 3,6 nm. Z literatury víme, že, čím menší jsou kvantové tečky, tím jsou i stabilnější [34, 45]. Core/shell kvantové tečky (CdTe/ZnSe) dosahují velikosti 11,7 nm. Největší velikost mají tečky GSH-CdTe a to 48 nm.

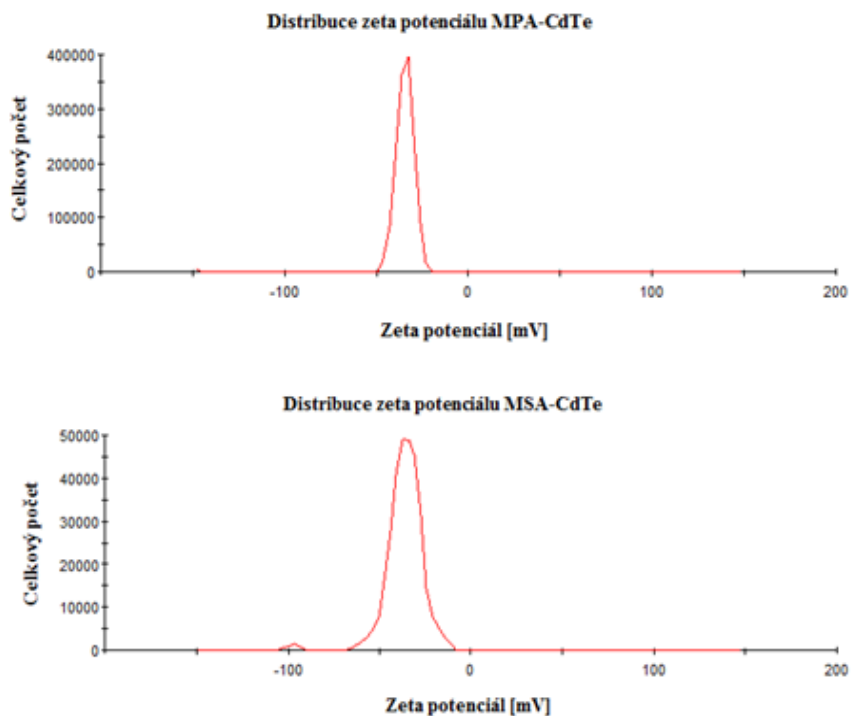


**Obrázek 24: Velikostní distribuce jednotlivých QDs po precipitaci: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D – CdTe/ZnSe**

Zeta potenciál GSH-CdTe kvantových teček byl změřen na hodnotu -27,2 mV, což nepřekračuje hodnotu -30 mV, která je považována za hraniční pro stabilní disperze. Dle měření zeta potenciálu vychází nejstabilnější druhé nejmenší CdTe tečky modifikované MSA. Tečky typu core/shell dosahovaly hodnot velikosti zeta potenciálu -30,3 mV.

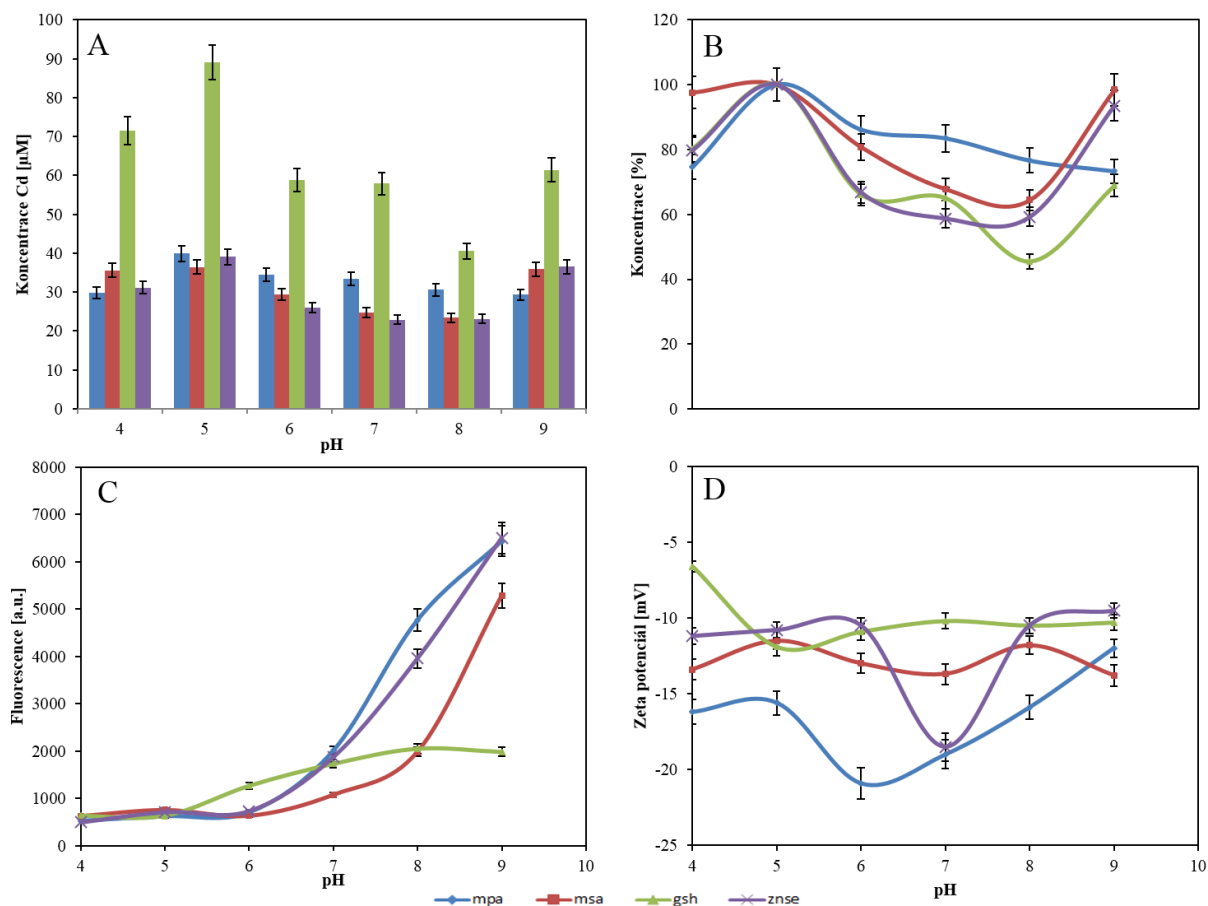


Obrázek 25: Distribuce zeta potenciálu kvantových teček GSH-CdTe a CdTe/ZnSe



Obrázek 26: Distribuce zeta potenciálu kvantových teček MPA-CdTe a MSA-CdTe

Pomocí fosfátových pufrů o pH 4 až 9 byla provedena charakterizace chování připravených kvantových teček v prostředí o různém pH. Byl změřen zeta potenciál, fluorescence a koncentrace uvolněných kadmiových iontů pomocí DPV, a to po 30 minutové inkubaci teček ve fosfátových pufrch.



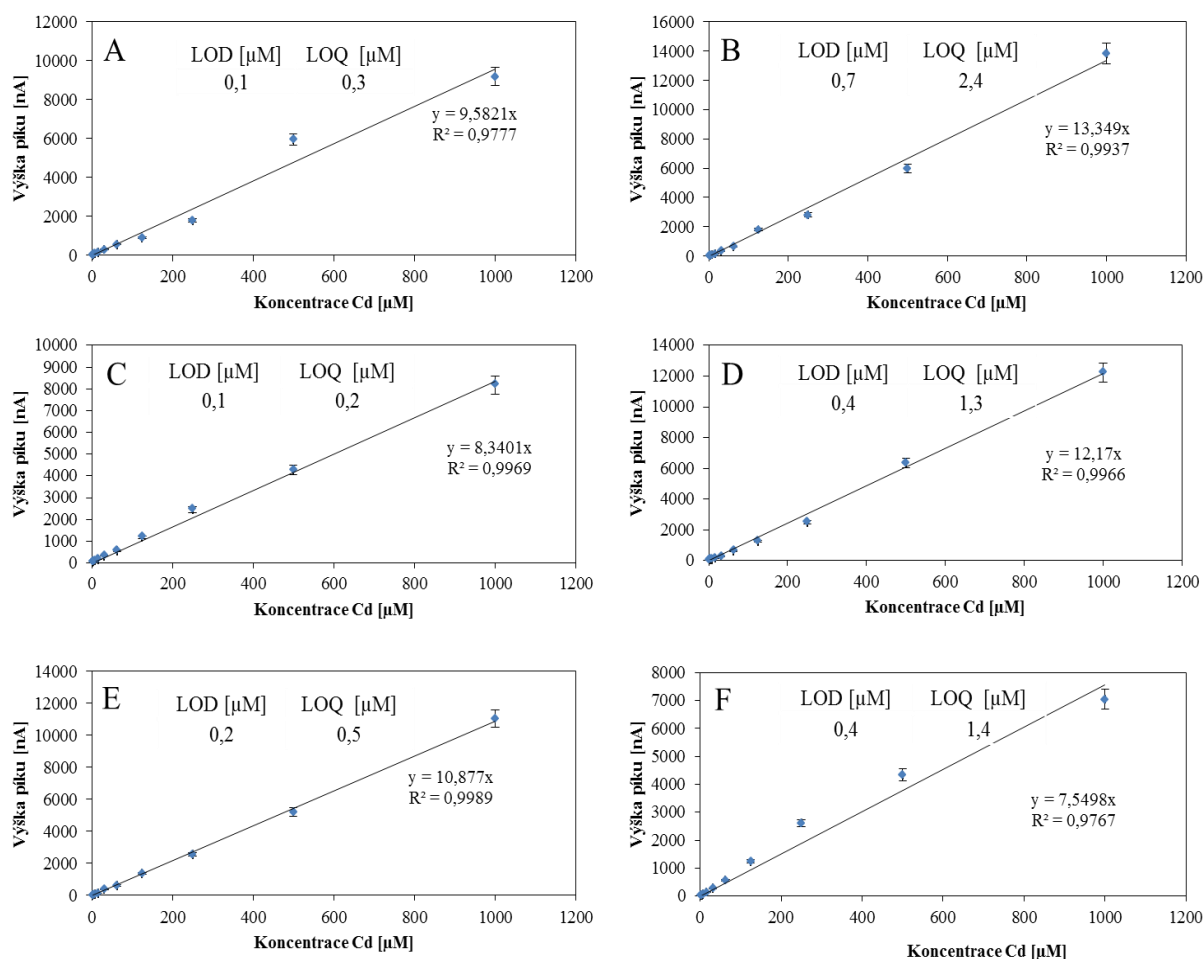
**Obrázek 27: Charakterizace kvantových teček ve fosfátových pufrch o pH 4-9; A – závislost koncentrace kadmia u kvantových teček na pH prostředí, B - procentuální vyjádření koncentrace kadmia, vztaženo k maximálním hodnotám při pH 5, C – závislost fluorescence kvantových teček na pH prostředí, D – závislost velikosti zeta potenciálů na pH prostředí**

Stanovení koncentrace kadmia v závislosti na pH prostředí (fosfátový pufr) bylo provedeno pomocí elektrochemické metody DPV. Nejprve byly naměřeny desetibodové kalibrační křivky pro různá pH fosfátového pufru. Následně byly změřeny velikosti píků kadmia připravených teček po 30 minutové interakci v pufrch. Tyto velikosti se výpočtem převedly na hodnoty koncentrace kadmia. Z grafu závislosti koncentrace kadmia u kvantových teček na pH prostředí, na kterém jsou zobrazeny hodnoty koncentrací kadmia, změřených po 30 minutové interakci kvantových teček ve fosfátových pufrch o různých pH, vyplývá, že nejvyšší hodnoty velikosti koncentrace kadmia bylo dosaženo ve fosfátovém pufru o pH 5. Naopak nejnižší koncentrace kadmia byly zaznamenány ve fosfátovém pufru o pH 8. Hodnoty koncentrace kadmia v pufrch o pH 7 a 8 jsou si ovšem velmi blízké. Nakonec byl vytvořen

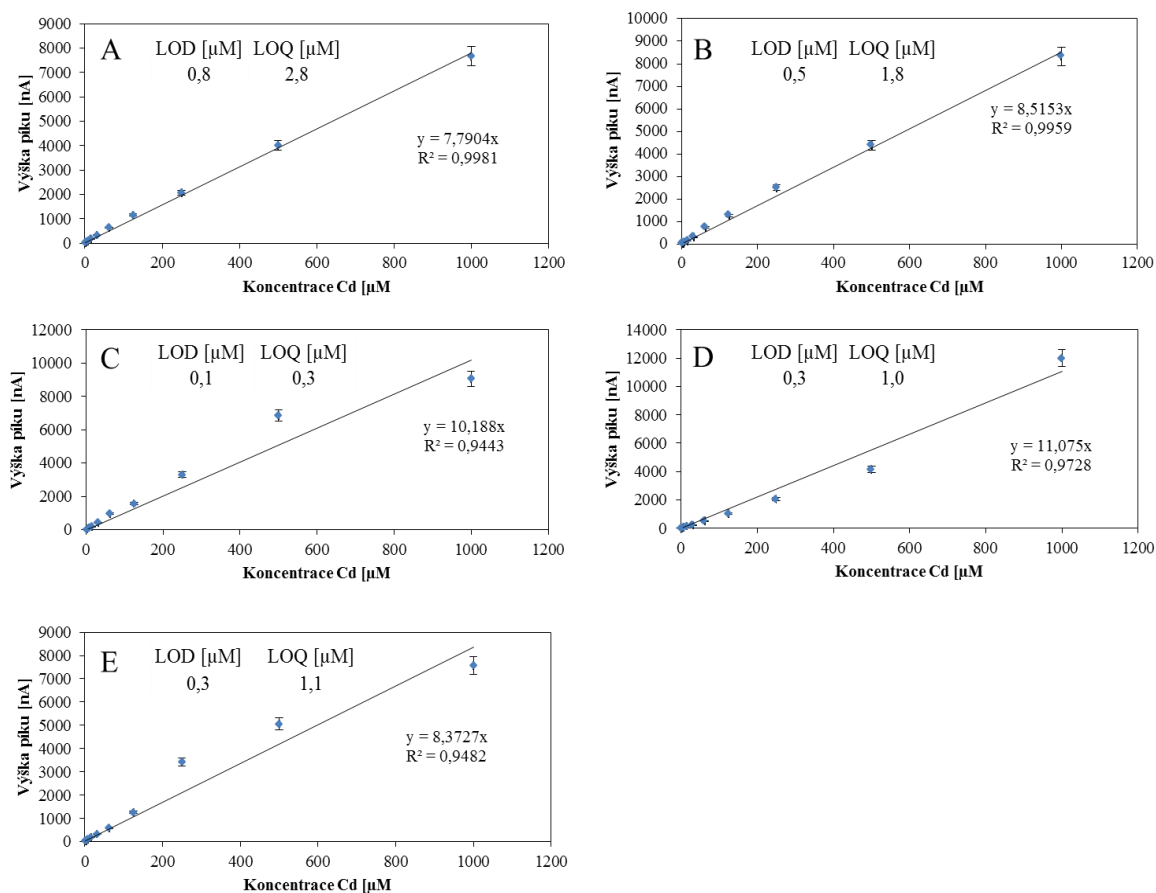
graf procentuálního vyjádření změn koncentrací kadmia oproti pH 5, jež bylo bráno za hodnotu 100%.

Při pH 8 a 9 ve fosfátovém pufru po 30 minutové inkubaci dosahovali připravené kvantové tečky nejvyšší absorpance a také nejvyšší fluorescence. Naopak nejmenších hodnot absorpance a fluorescence bylo dosaženo ve fosfátovém pufru o pH 4. Při hodnotě pH 7, 8 a 9 nejvyšších hodnot fluorescence dosahovaly kvantové tečky MPA-CdTe a CdTe/ZnSe. Při pH 4 a 6 dosahovaly největších hodnot fluorescence tečky GSH-CdTe.

Velikost zeta potenciálu je obecně závislá na hodnotě pH, přičemž při nižších hodnotách pH je velikost zeta potenciálu blíže ke kladným hodnotám. Po porovnání výsledků bylo zjištěno, že nejmenších velikosti zeta potenciálu dosahovaly tečky modifikované MPA ve fosfátovém pufru o pH 6, tedy pH blízském původnímu připravenému roztoku QDs. Při tomto pH tedy docházelo k nejmenšímu procesu shlukování částic. Nejmenší velikost záporného zeta potenciálu dosáhly tečky typu GSH-CdTe, a to hodnotu -6,61 mV, ve fosfátovém pufru o pH 4.



**Obrázek 28:** Kalibrační křivky množství kadmia stanovené pomocí DPV ve: A – fosfátový pufr pH 4, B – fosfátový pufr pH 5, C – fosfátový pufr pH 6, D – fosfátový pufr pH 7, E – fosfátový pufr pH 8, F – fosfátový pufr pH 9



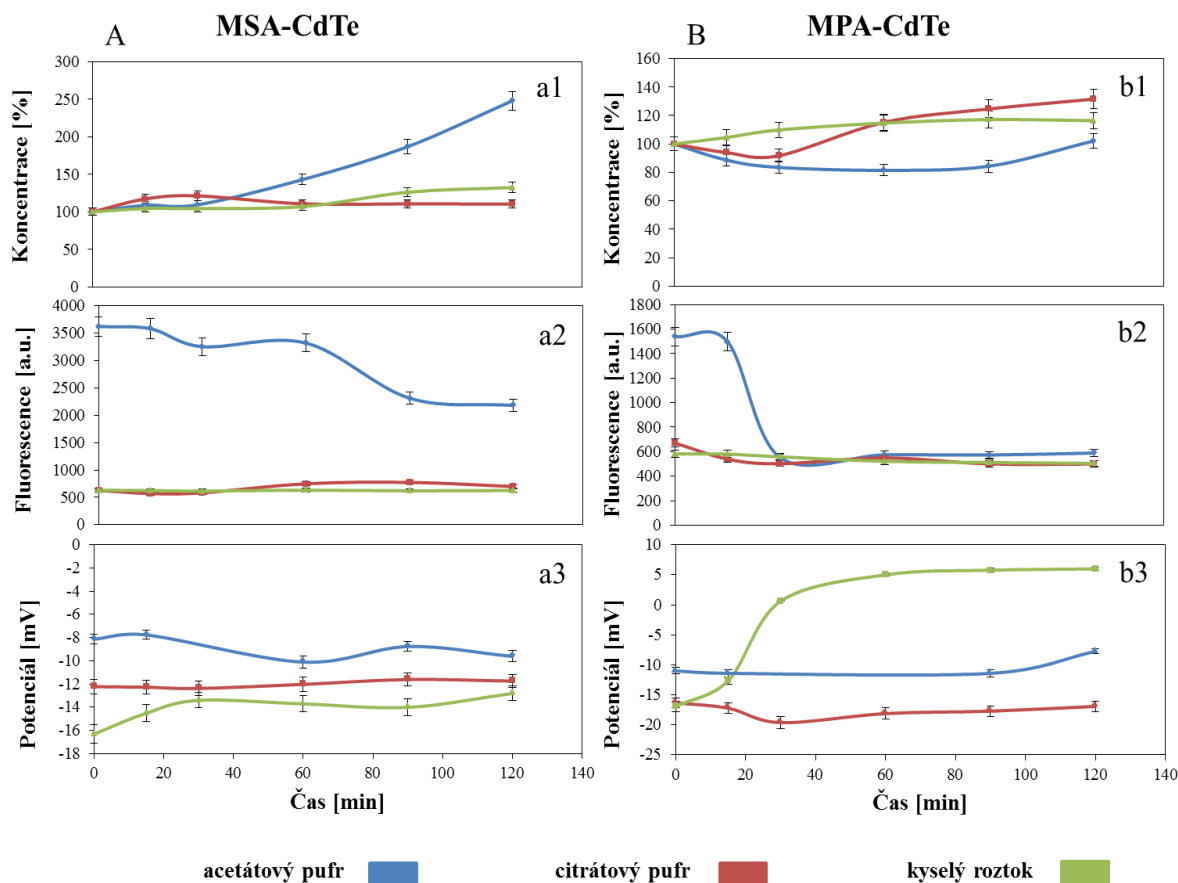
**Obrázek 29: Kalibrační křivky množství kadmia stanovené pomocí DPV: A - v acetátovém pufru, B - v citrátovém pufru, C - v kyselém roztoku, D - ve fosfátovém pufru, E - v neutrálním roztoku**

Pro hodnocení výsledků z DPV byly změřeny desetibodové kalibrační křivky kadmia v různých prostředích. Z hodnot kalibračních křivek byl vypočítán limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) dané metody. Limit detekce nám říká, nejnižší možnou mez, kdy lze stanovenou látku v roztoku prokázat. Limit kvantifikace určuje, jaké množství dané látky v roztoku lze s definovanou přesností stanovit. Nejnižší limit detekce byl vypočítán u kyselého roztoku a nejvyšší limit detekce byl zjištěn u acetátového pufru. Nejcitlivější stanovení bylo v citrátovém pufru, naopak nejméně citlivé v kyselém roztoku.

## 10.2 Studium stability QDs v kyselém prostředí

Tento experimentální blok je rozdělen na část krátkodobou (0, 15, 30, 60, 90 120 minut) a dlouhodobou. Pro porovnání výsledků v dlouhodobé části byl zvolen první, sedmý a čtrnáctý den. Konkrétně pro stanovení koncentrace kadmia pomocí DPV pokračují výsledky až do 25 dne. Výsledky z DPV jsou uvedeny v relativních koncentracích – procentuálně, kde za hodnotu 100% je zvolena velikost koncentrace kadmia v čase 0.

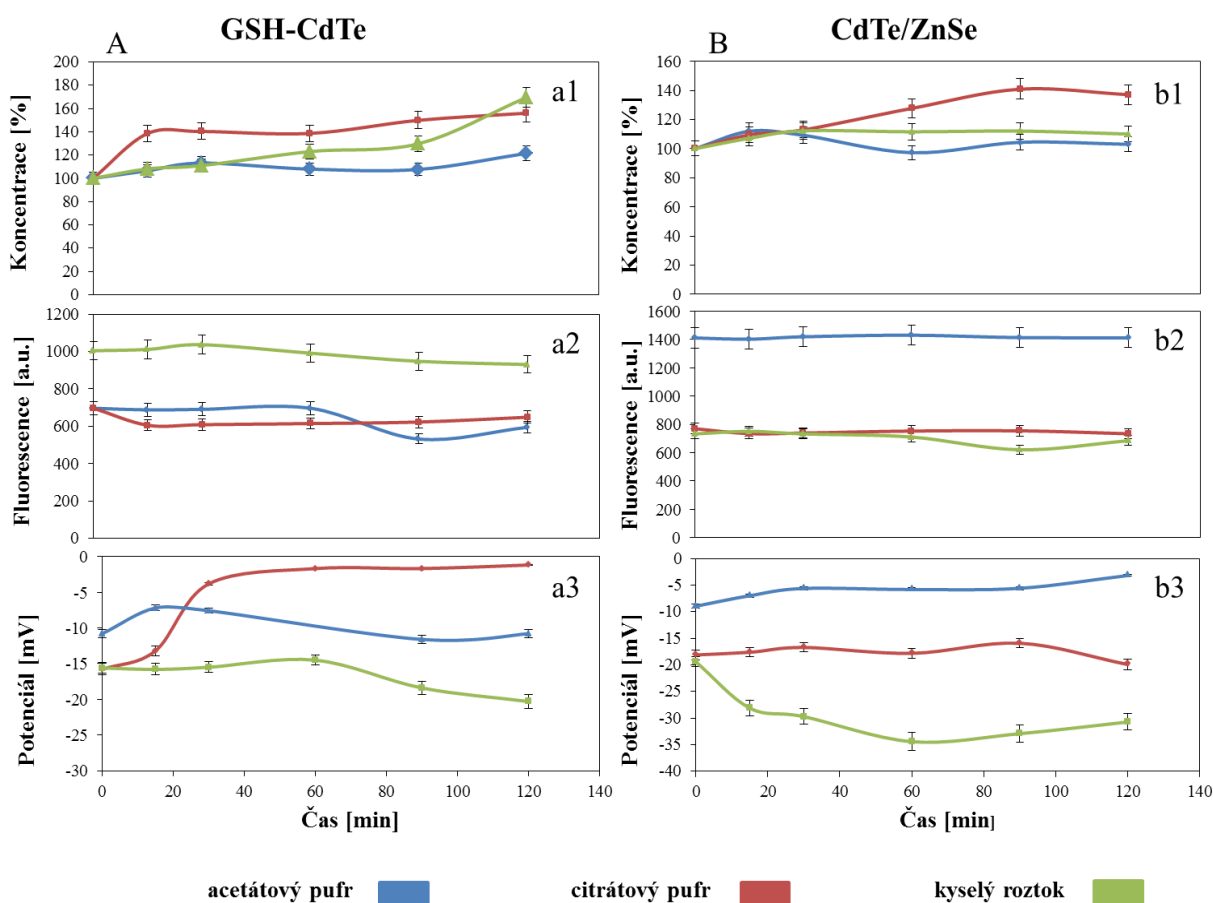
## 10.2.1 Krátkodobá interakce



**Obrázek 30: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe**

Obrázek 30 popisuje chování teček MSA-CdTe a MPA-CdTe v acetátovém a citrátovém pufru a v kyselém roztoku o pH 4,6. Obrázek 30a1 popisuje procentuální změnu velikosti koncentrace kadmia MSA-CdTe teček. Z obrázku 30a1 vyplývá, že v prvních dvou hodinách experimentu došlo k nejvyššímu přírůstku u těchto teček v acetátovém pufru, kde došlo k navýšení koncentrace kadmia o více jak 100 %. V ostatních roztocích tečky nevykazují přílišnou změnu, v kyselém roztoku o 30 % a v citrátovém pufru nastala 10 % změna. Obrázek 30a2 popisuje tutéž časovou řadu za pomoci měření fluorescence. Z hodnot fluorescence vyplývá, že u teček v kyselých prostředích došlo již při prvním měření k výraznému poklesu fluorescence oproti tečkám samotným, tento pokles byl o více než 85 %, viz Obr. 23. Z něj plyne, že tečky modifikované MSA na začátku experimentu nejvíce svítily v pufru acetátovém, kde nastal v rozmezí dvou hodin také nejvyšší pokles jejich fluorescence. Na Obrázku 30a3 lze vidět výsledky měření zeta potenciálu. Zde vidíme, že nedošlo k žádným výrazným změnám a zeta potenciál většinou stagnuje na stejných hodnotách. Z grafu lze dále vyčíst, že největší stabilitu MSA-CdTe vykazují v prostředí speciálního kyselého roztoku. V sektoru B obrázku 30 je naproti tomu porovnání teček modifikovaných MPA. Na obrázku 30b1, popisujícím přírůstky koncentrací kadmia, nevidíme v krátkodobém experimentu příliš

výrazné změny, u citrátového pufru okolo 30 %, v kyselém roztoku změna činí 16 % a v acetátovém pufru nastala změna 3 %. Na obrázku 30b2 popisujícím fluorescenci teček lze vyčíst podobný trend jako u teček MSA, tedy že tečky nejvíce svítí v acetátovém pufru. V tomto případě ovšem dojde ke změně velikosti fluorescence v kratším časovém okamžiku. Obrázek 30b3 nám zobrazuje velikosti zeta potenciálu, kde vidíme nejvýraznější změnu ve speciálním kyselém prostředí. Zde dojde již během první hodiny k překmitu ze záporných hodnot potenciálu k hodnotám kladným.

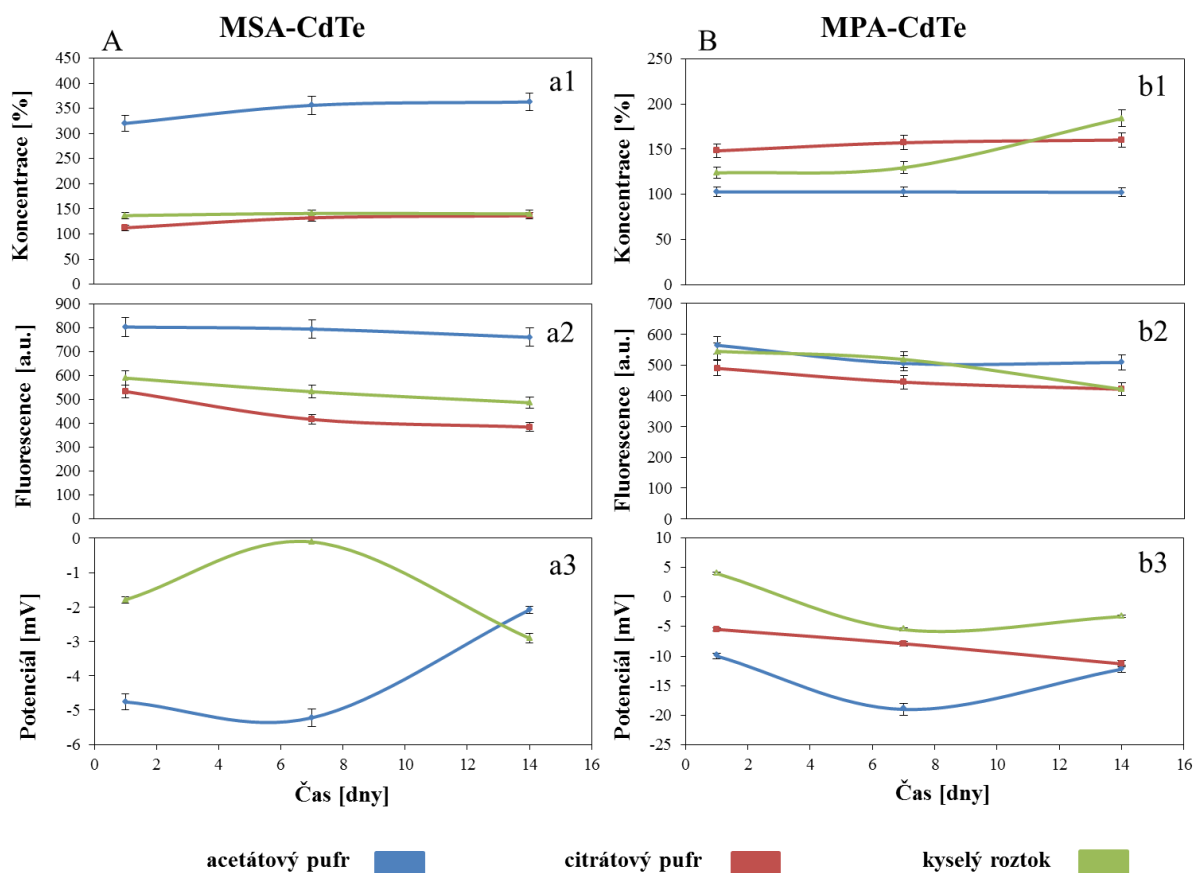


**Obrázek 31: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - GSH-CdTe, B - CdTe/ZnSe**

Obrázek 31 je opět rozdělen na dvě části: část A, GSH-CdTe kvantové tečky, část B, CdTe/ZnSe kvantové tečky. Z výsledků DPV (Obr. 31a1) je vidět, že v citrátu a v kyselém roztoku došlo k nárůstu koncentrace kadmia oproti počátku o 50 %. U teček CdTe/ZnSe došlo k nejvyššímu nárůstu v citrátovém pufru (Obr. 31b1). Fluorescence GSH modifikovaných teček během prvních dvou hodin spíše stagnuje na stejných hodnotách, přičemž tento typ teček nejvíce svítí v kyselém roztoku (Obr. 31a2). Podobné výsledky ukazuje fluorescence i u CdTe/ZnSe, ovšem rozdílem je, že tyto tečky nejvíce svítí v pufru acetátovém (Obr. 31b2). Hodnoty zeta potenciálu GSH-CdTe se nejvíce změnily v citrátovém pufru, a to během první hodiny při nárůstu z -15 mV na hodnotu -5 mV. V ostatních dvou prostředích měla velikost zeta

potenciálu spíše opačný trend, tedy došlo k jejímu mírnému poklesu (Obr. 31a3). V acetátovém a citrátovém pufru u CdTe/ZnSe dochází v krátkodobé části víceméně ke stagnaci zeta potenciálu. Nejvýraznější změna nastala u teček ponořených do speciálního kyselého roztoku, kde došlo k poklesu potenciálu o více než 10 mV během první hodiny. Ve druhé hodině experimentu v tomto prostředí pozorujeme pomalou změnu ke kladným hodnotám (Obr. 31b3).

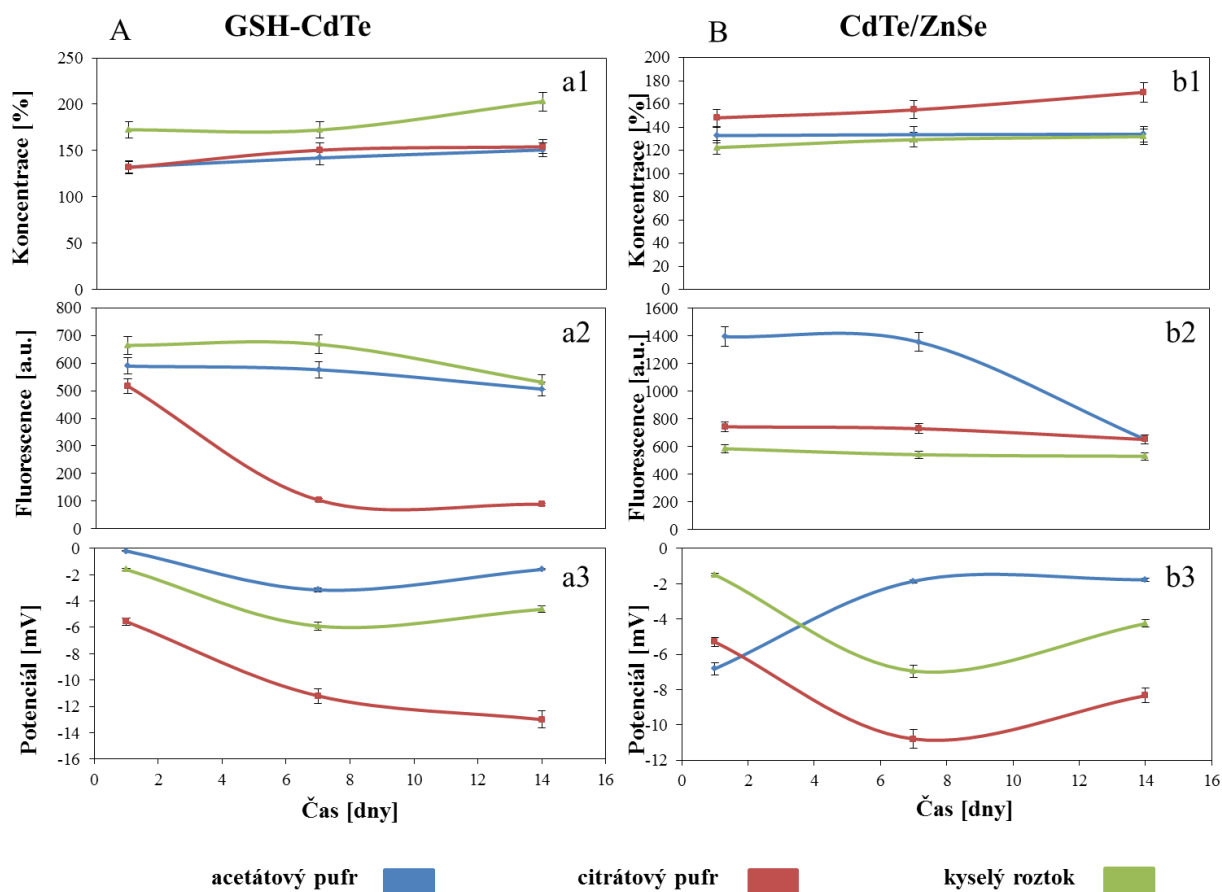
## 10.2.2 Dlouhodobá část



**Obrázek 32: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe obě výsledky**

Obrázky 32 a 33 popisují časový vývoj jednotlivých měřených parametrů v kyselých prostředích v dlouhodobé části experimentu. Opět, jako v případě krátkodobé části, jsou oba obrázky rozděleny na dvě části, A a B. Na obrázku 32 jsou popsány výsledky u teček modifikovaných MSA a MPA. V návaznosti na krátkodobou část vidíme, že nejvyšších hodnot procentuálních změn koncentrace kadmia dosahovaly MSA-CdTe tečky v acetátovém pufru, přičemž ve čtrnáctém dni se přiblížily k hodnotě 400 % oproti počátku experimentu. Výsledky v citrátovém pufru a v kyselém prostředí stagnují na hodnotách kolem 150 % (Obr. 32a1). U MPA modifikovaných teček došlo po 14 dnech v kyselém roztoku k většímu přírůstku koncentrace kadmia, a to o 84 %, v pufru acetátovém dochází ke změně okolo 3 % (Obr. 32b1). Z grafů fluorescence nám u obou typů teček vyplývá, že k výraznému poklesu již nedochází.

Oba typy teček vykazují nejvyšší fluorescenci na konci experimentu v acetátovém pufru (Obr. 32a2, 32b2). Největší změny zeta potenciálu jsou u teček MSA v kyselém a acetátovém pufru (Obr. 32a3). Z neznámých důvodů se nepodařilo naměřit relevantní výsledky u MSA teček v citrátovém pufru. Výsledky zeta potenciálu u teček modifikovaných MPA ukazují na podobný trend v acetátovém pufru a kyselém prostředí, zatímco v citrátovém pufru zeta potenciál mírně klesá (Obr. 32b3).



**Obrázek 33: Studium stability QDs v kyselém prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A - GSH-CdTe, B - CdTe/ZnSe**

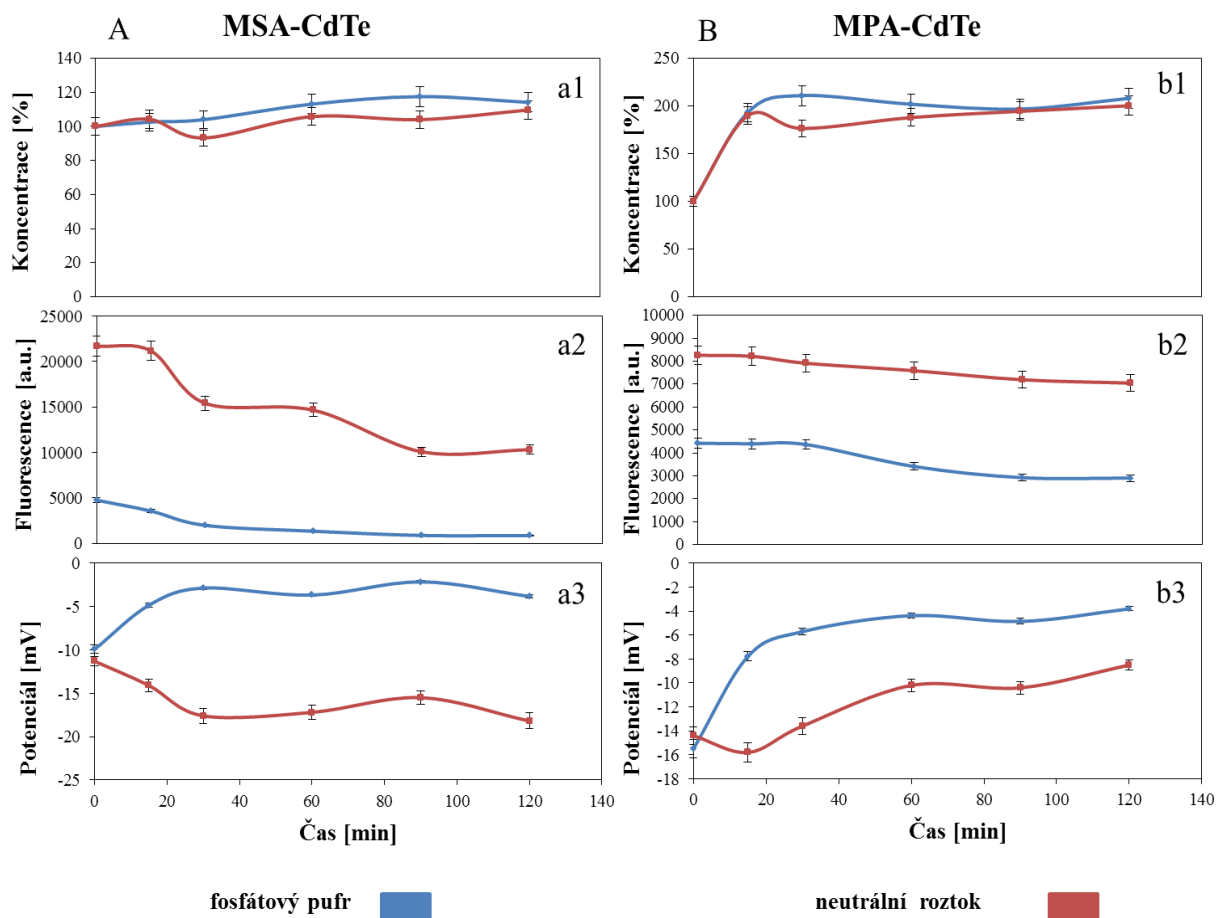
Obrázek 33 popisuje tečky GSH-CdTe a CdTe/ZnSe. Na výsledcích DPV je vidět mírný nárůst hodnot koncentrace kadmia ve všech použitých prostředích. U teček GSH-CdTe dosahují nevyšších hodnot změn koncentrace výsledky v kyselém prostředí (Obr. 33a1) a u teček typu CdTe/ZnSe zase výsledky v citrátovém pufru (Obr. 33b1). Velikosti fluorescence se drží v nízkých hodnotách, ale dochází i ve čtrnáctém dni k jejich poklesům. Největší pokles nastal u GSH-CdTe teček v citrátovém pufru a to o hodnotu 83 % oproti prvnímu dni. Nejvýraznější pokles u teček CdTe/ZnSe nastal v pufru fosfátovém (Obr. 33a2, 33b2). Zeta potenciál GSH modifikovaných teček v kyselém prostředí a acetátu má velmi podobný trend jako v případě teček modifikovaných MPA, s tím rozdílem, že u GSH-CdTe nejvyšších hodnot zeta potenciálu dosahovaly tyto tečky v acetátovém pufru. Tento půlkruhový trend vykazovaly i CdTe/ZnSe

v kyselém roztoku a acetátovém pufru. Nejvyšších hodnot zeta potenciálu tento typ teček dosáhl v pufru acetátovém (Obr. 33a3, 33b3).

### 10.3 Studium stability QDs v neutrálním prostředí

Design experimentu byl ve třetím bloku stejný jako ve druhé části, s tím rozdílem, že probíhal v neutrálním prostředí (fosfátový pufr pH 7,6 a neutrální roztok).

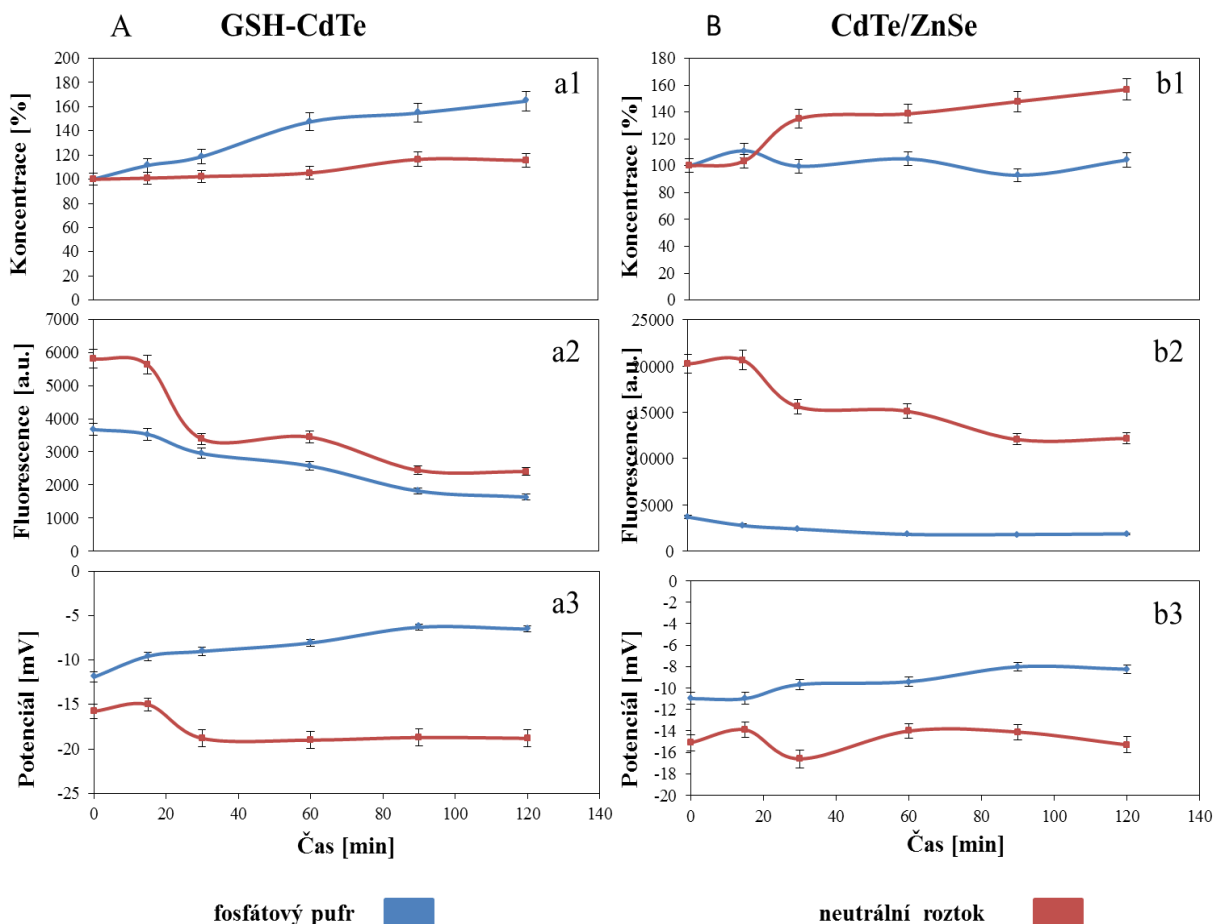
#### 10.3.1 Krátkodobá část



**Obrázek 34: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe**

Výsledky z DPV u MSA modifikovaných teček ukazují, že během prvních dvou hodin experimentu došlo k malým změnám v růstu koncentrace kadmia v neutrálním prostředí, v neutrálním roztoku tato změna byla o 9 % a ve fosfátovém pufru o 14 % (Obr. 34a1). Naopak u MPA modifikovaných teček došlo shodně u obou prostředí k nárůstu koncentrace kadmia o 100 % (Obr. 34b1). Fluorescence obou typů teček v neutrálním prostředí dokazuje, že oba typy teček více svítí ve speciálním neutrálním roztoku, přičemž u teček MSA-CdTe dochází v tomto roztoku během prvních dvou hodin k velkému poklesu fluorescence, zatímco

ve fosfátovém pufru je pokles pomalý (Obr. 34a2). K pomalému poklesu fluorescence dochází v obou typech neutrálního prostředí u MPA-CdTe (Obr. 34b2). Na výsledcích velikosti zeta potenciálů jsou vidět velké změny u obou typů teček a obou prostředí. U teček MSA-CdTe vychází zeta potenciál z prakticky totožného bodu, dále se však časová řada rozchází opačnými směry (Obr. 34a3). Zatímco u teček MPA-CdTe je u obou prostředí podobný trend, i když v neutrálním roztoku s pomalejším náběhem (Obr. 34b3).

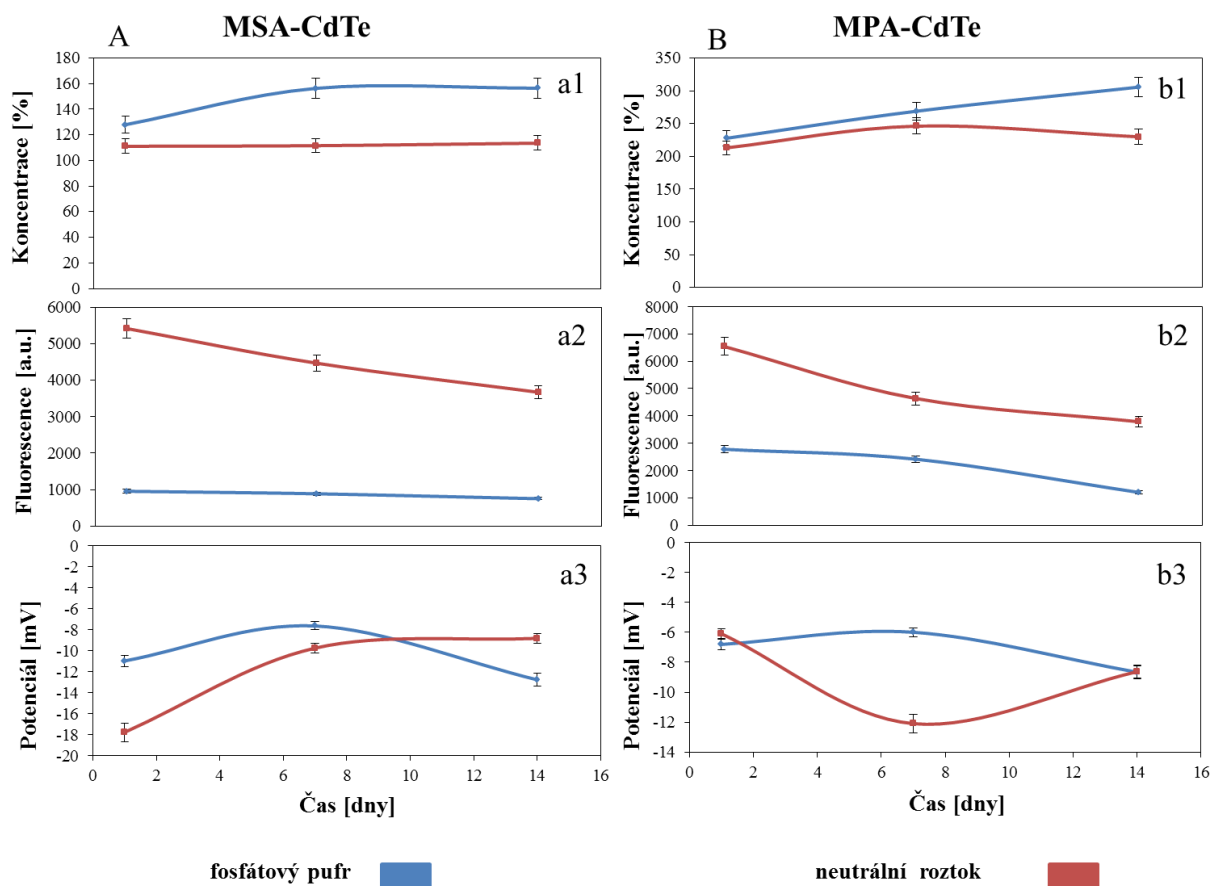


**Obrázek 35: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, krátkodobá interakce: A - GSH-CdTe, B - CdTe/ZnSe**

Na obrázku 35a1 a 35b1 popisujících procentuální přírůstek koncentrace kadmia lze vyčíst podobný průběh nárůstu koncentrace u obou typů prostředí a teček. Avšak u teček typu GSH-CdTe je tento nárůst rapidnější ve fosfátovém pufru, zatímco u teček CdTe/ZnSe je tomu naopak v neutrálním roztoku. U obou typů teček (Obr. 35a2, 35b2) vidíme, že fluorescence dosahuje vyšších hodnot v neutrálním roztoku a s časem klesá, oproti prvním měřeným hodnotám došlo k poklesu GSH-CdTe o 60 % a u CdTe/ZnSe o 40 %. Fluorescence klesá i ve fosfátovém pufru, a to u GSH-CdTe na hodnotu 45 % oproti první měřené hodnotě v pufru. Ve fosfátovém pufru nastal pokles fluorescence u kvantových teček CdTe/ZnSe o 50 % oproti prvnímu měření ve fosfátu. Na obrázcích 35a3 a 35b3 je zobrazena velikost zeta potenciálu.

Hodnoty zeta potenciálů GSH-CdTe ve fosfátovém pufru postupně rostou z hodnoty -11,9 mV na hodnotu -6,5 mV. V neutrálním roztoku lze vidět opačný proces, kdy se hodnota zeta potenciálu snížila o 3 mV. U CdTe/ZnSe je situace velmi obdobná. Ve fosfátovém pufru došlo k růstu o 2 mV, kdežto v neutrálním roztoku se hodnota o dvě desetiny mV snížila.

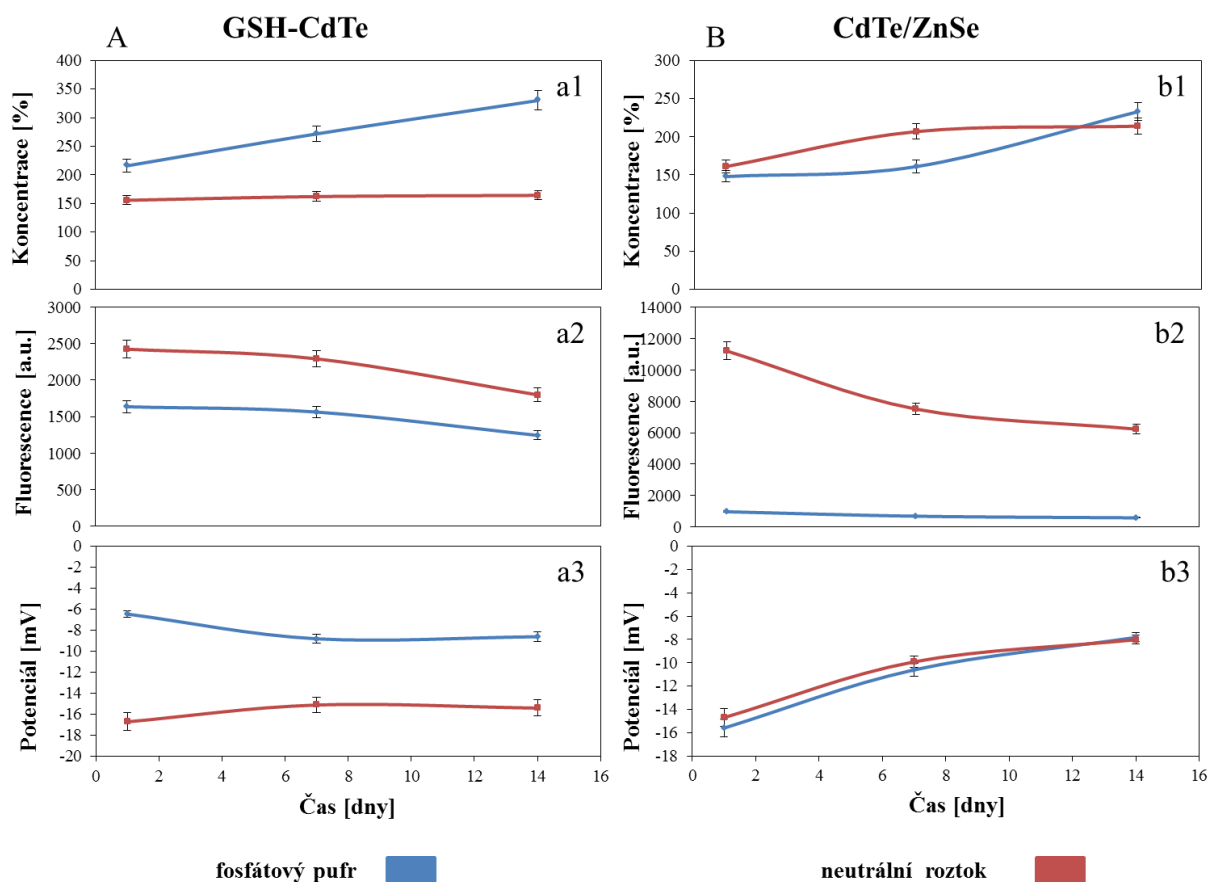
### 10.3.2 Dlouhodobá část



Obrázek 36: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe

Obrázek 36 popisuje výsledky dlouhodobého experimentu pro kvantové tečky modifikované MSA a MPA. Z grafů pro DPV vidíme, že nárůst mezi prvním a čtrnáctým dnem byl u obou typů teček nejvyšší ve fosfátovém pufru (Obr. 36a1, 36b1). Fluorescence v neutrálním roztoku během čtrnácti dnů klesala u teček MSA-CdTe a MPA-CdTe, a oproti prvnímu dni došlo k poklesu u MSA-CdTe o 37 % a u teček modifikovaných MPA o 47 %. Fluorescence MPA-CdTe ve fosfátovém pufru poklesla oproti prvnímu dni o 55 % (Obr. 36b2). U MSA-CdTe se fluorescence ve fosfátu stabilně držela kolem hodnoty 1000 a. u. (Obr. 36a2). Výsledky zeta potenciálů MSA-CdTe vykazují do sedmého dne nárůst směrem ke kladným hodnotám, avšak od sedmého dne opět klesají nebo stagnují (Obr. 36a3). Zeta potenciál u MPA-CdTe má ve fosfátovém pufru opačný trend oproti neutrálnímu roztoku, kde nejprve

nastává pokles k zápornějším hodnotám a poté vzrůst směrem k hodnotám kladným. Ve fosfátu je tomu naopak, ovšem s pomalejším náběhem (Obr. 36b3).



**Obrázek 37: Studium stability QDs v neutrálním prostředí v závislosti na čase, dlouhodobá interakce: A – GSH-CdTe, B – CdTe/ZnSe**

Poslední výsledkový obrázek popisuje výsledky v dlouhodobém časovém experimentu u kvantových teček GSH-CdTe a CdTe/ZnSe v neutrálním prostředí o pH 7,6. Obrázky 37a1 a 37b1 popisují chování teček (uvolňování kadmia) pomocí DPV. Na obrázku 37a1 lze vidět růst koncentrace kadmia ve fosfátovém pufru, a to o 114 % oproti prvnímu dnu, zatímco v neutrálním roztoku spatřujeme spíše stagnaci. Na obrázku 37b1 vidíme, že nárůst koncentrace kadmia u teček CdTe/ZnSe probíhal v obou prostředích až do čtrnáctého dne. V neutrálním roztoku byl tento nárůst o 83 % a ve fosfátovém pufru o 67 % oproti prvnímu dni. Na grafech fluorescence je opět patrný pokles v neutrálním roztoku pro oba typy teček. Fluorescence GSH-CdTe poklesla oproti prvnímu dnu o 30 % a hodnota fluorescence CdTe/ZnSe poklesla o 45 %. Ve fosfátovém pufru je také vidět pokles u GSH-CdTe, a to o 25 %. Fluorescence CdTe/ZnSe ve fosfátovém pufru opět stagnuje kolem jedné hodnoty stejně jako v případě MSA-CdTe (Obr. 37a2, 37b2). Zeta potenciál GSH-CdTe ve fosfátu má velmi pozvolný trend směrem k záporným hodnotám, v neutrálním roztoku je trend opačného směru (Obr. 37a3). Měření

velikosti zeta potenciálů u teček CdTe/ZnSe ukazuje v obou prostředích nárůst směrem ke kladným hodnotám (Obr. 37b3).

## 11 DISKUZE

Kvantové tečky mají velký potenciál ve využití v biomedicíně a klinickém zobrazování. S aplikacemi QDs in vivo ale vzrůstají obavy z jejich toxicity. V poslední době je často diskutována otázka jejich toxicity, zejména v souvislosti s obsahem těžkých kovů (Cd, Te, Se). Toxicita QDs je ovlivněna (zmírněna) především typem modifikace jejich povrchu. V dosavadních studiích in vivo bylo zkoumáno, kde se ionty těžkých kovů z jádra QDs nejvíce akumulují. Zjistilo se, že ionty kadmia se hromadí hlavně v játrech, kde poškozují hepatocyty a také v ledvinách. Ionty telluru se zase nejvíce hromadí ve slezině [27, 45-51].

Na degradaci QDs působí více vnějších vlivů, např. teplota, elektromagnetické záření, a hlavně okolní prostředí (chemické složení, pH). Stejně tak ale jejich degradační vlastnosti ovlivňuje samotná jejich struktura. Tečky, které byly modifikovány pomocí MPA a MSA by si měly být z hlediska vlastností, struktury a velikostí dosti blízké. Tečky typu core/shell CdTe/ZnSe a CdTe tečky modifikovány GSH by kvůli své odlišné struktuře měly dosahovat větších velikostí. Tyto dva typy QDs se od sebe liší z hlediska chemické struktury a také se samozřejmě budou lišit od teček modifikovaných MPA a MSA [27, 45, 51-53].

V mé práci jsem se zaměřila na degradaci metalového jádra QDs u různě modifikovaných kvantových teček a core/shell kvantových teček v neutrálních a kyselých prostředích. Pokus byl uskutečněn na světle při laboratorní teplotě 25 °C, pH 4,6 a 7,6 v různých prostředích. Fyzikálně chemické vlastnosti ve vodě rozpustných kvantových teček závisí na jejich velikosti a povrchové úpravě [45-47, 54]. Menší QDs prostupují do buněk snadněji a více se v nich hromadí, což vede k větší cytotoxicitě [45-47, 54]. Připravované core/shell QDs jsou větší než QDs modifikované monomolekulovou vrstvou (MSA-CdTe, MPA-CdTe). Všeobecně se předpokládá, že menší QDs mají zápornější zeta potenciál a jsou stabilnější, ale například ze studie Wang a kol. vyplynulo, že QDs modifikované MSA vykazovaly při větších velikostech lepší stabilitu [45]. Tato studie sledovala především fotochemickou stabilitu QDs modifikovaných MSA o dvou různých velikostech (menší – fluoreskovaly zeleně a větší červeně). Fotochemická stabilita byla sledována kvůli potenciálnímu využití kvantových teček jako in vitro a in vivo detekčních sond a to v pufrch o různých pH. Z výsledků fluorescence plyne, že MSA QDs jsou stabilní v oblasti o pH 6-9 (pomalý pokles fluorescence), ovšem pokud byly vloženy do pufru o pH 5 a menším, intenzita fluorescence velmi rychle klesla v čase [45]. Také bylo zjištěno, že intenzita fluorescence klesala rychleji u zelených, tedy menších, MSA QDs než u červených, větších MSA QDs. Tudíž se menší kvantové tečky projeví jako méně stabilní [45]. Další experiment na fotostabilitu QDs v pufrch, které byly různě koncentrované, provedl Zhang a kol. [55]. Ten prokázal, že pufr, který má vyšší koncentraci, zhasí fluorescenci QDs rychleji než pufr o nižších koncentracích [55]. I další studie dokazují,

že velikost fluorescence je závislá na hodnotách pH, přičemž fluorescence roste se vzrůstajícím pH [54].

### **11.1 Vliv modifikace QDs na jejich degradaci**

V našem experimentu byly CdTe QDs modifikované pomocí MSA a to u zelených kvantových teček. I další dva typy připravených QDs svítily zelenou barvou, ty byly modifikovány MPA a GSH. Na grafech v minulé kapitole bylo vidět, jak rychle klesala intenzita fluorescence u různých typů kvantových teček v různých pufrách o pH 4,6 a 7,6. V kyselém pH byl pokles intenzity fluorescence mnohem rychlejší než v pH neutrálním, což lze vidět z výsledků experimentů v kyselém prostředí, v neutrálním prostředí (Obr. 32-33 a 36-37) a také z výsledků měření fluorescence ve fosfátovém pufru s různými hodnotami pH (Obr. 29), což potvrzují studie [45, 54]. Z výsledků měření (DPV, fluorescence, zeta potenciál) kvantových teček ve fosfátovém pufru o různých pH lze dojít k závěru, že nejméně stabilní ze všech tří typů modifikovaných kvantových teček jsou tečky CdTe modifikované GSH. Tyto tečky vykazují ve všech měřených pH nejmenší stabilitu. Naopak nejvíce stabilní, z pohledu modifikace, z pokusu vyšly tečky MPA. Z výsledků DPV vyplývá, že kvantové tečky MPA-CdTe jsou nejstabilnější ve fosfátovém pufru o pH 9, MSA-CdTe ve fosfátovém pufru při hodnotě pH 8, GSH-CdTe také při hodnotě pH 8 a CdTe/ZnSe při hodnotě pH 7. V tabulce číslo jedna jsou uvedeny hodnoty pH pro jednotlivé kvantové tečky. Z toho lze usuzovat, že ve fosfátovém pufru nejsou QDs nejstabilnější při hodnotách pH blízkých svým vlastním. Pokud stejné porovnání provedeme pomocí hodnot získaných zeta potenciálů, dojdeme k naprosto totožným výsledkům jako v případě DPV.

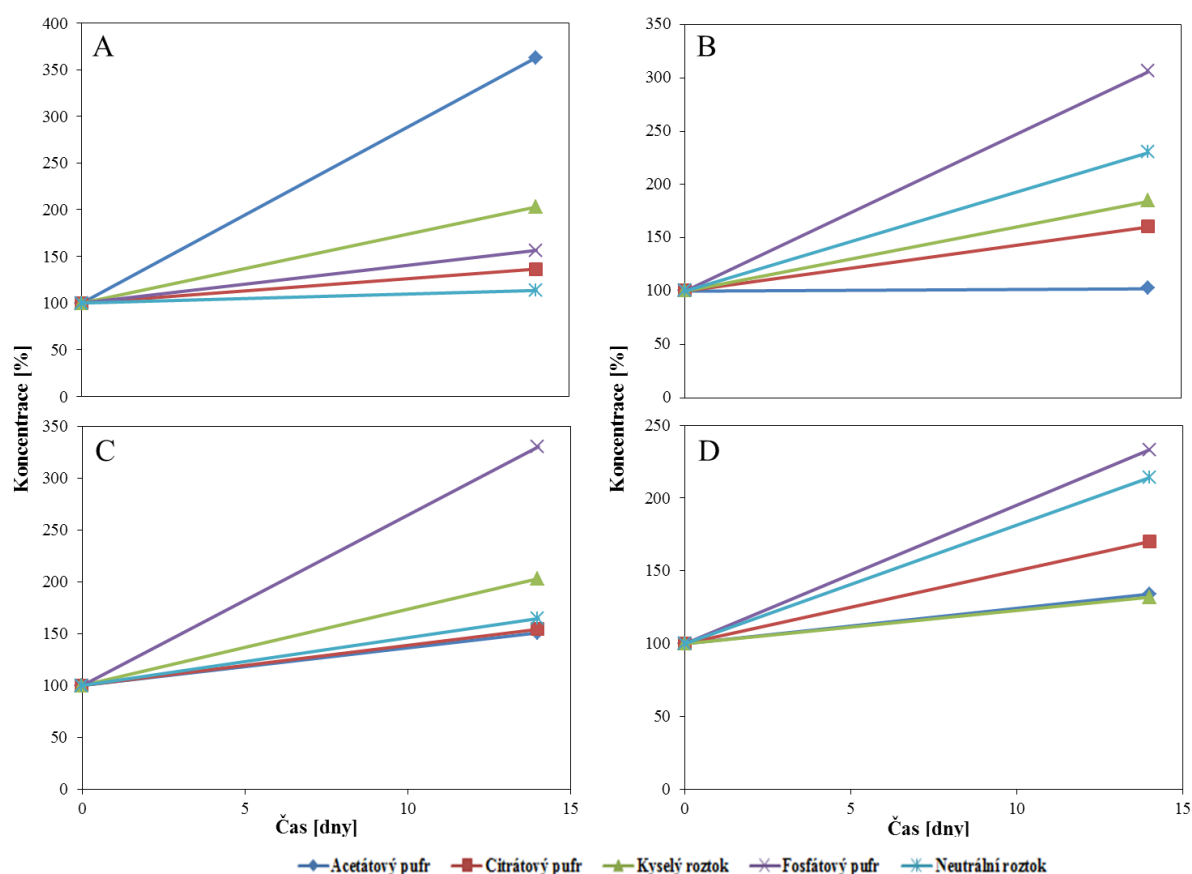
Pro lepší posouzení výsledků z DPV, byly výsledné hodnoty přepočteny na procentuální přírůstky koncentrace kadmia v období 14 dnů, kde se jako výchozí bod zvolila hodnota množství koncentrace kadmia z prvního měření, tedy v čase nula<sup>1</sup>. Tečky, které v daném prostředí uvolnily nejvíce kadmia, byly považovány za nejméně stabilní a naopak. Na obrázku 38 lze vidět procentuální nárůst koncentrace kadmia, u jednotlivých teček ve zkoumaných prostředích, mezi časem 0 a čtrnáctým dnem experimentu. Pořadí stability jednotlivých QDs v daných pufrách je následující:

---

<sup>1</sup> Čas nula je označení pro začátek měření, ne pro zanesení teček do pufru. Je zde nutno připomenout, že při DPV samotné probublávání měřeného roztoku v cele pomocí argonu bylo nastaveno na čas 240 sekund.

|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| Acetátový pufr   | MPA > CdTe/ZnSe > GSH >> MSA |
| Citrátový pufr   | MSA > GSH > MPA > CdTe/ZnSe  |
| Kyselý roztok    | CdTe/ZnSe > MSA > MPA > GSH  |
| Fosfátový pufr   | MSA > CdTe/ZnSe > MPA > GSH  |
| Neutrální roztok | MSA > GSH > MPA > CdTe/ZnSe  |

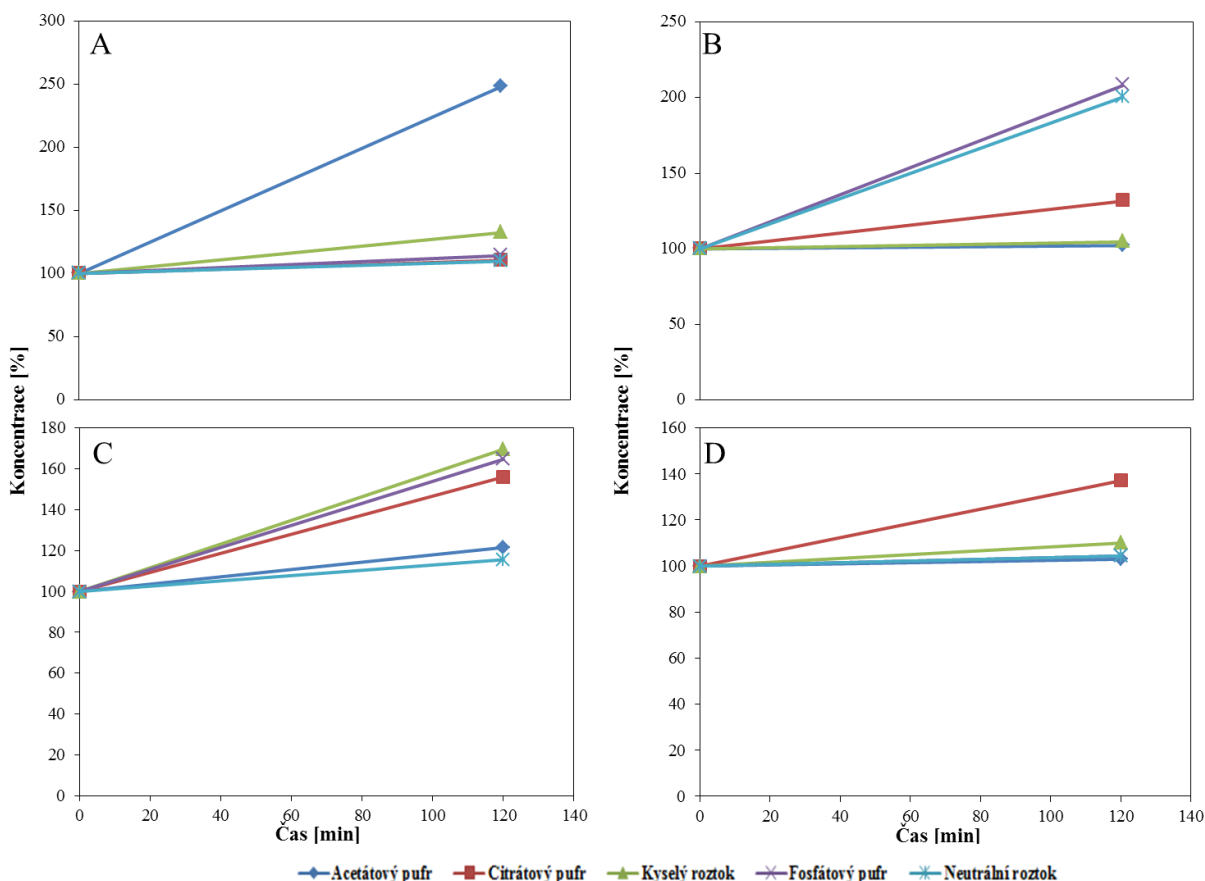
Tyto řady stability jednotlivých QDs ukazují, že porovnání stability, založené na přírůstku koncentrace kadmia v období 14 dnů stanovené pomocí DPV, není porovnatelné v rámci srovnání mezi různými prostředími. Zdá se, že na výslednou stanovenou koncentraci kadmia má vliv nejen pH, ale i složení pufru/roztoku, které pravděpodobně ovlivňuje uvolňování kademnatých iontů z jádra QDs.



**Obrázek 38:** Závislost relativní koncentrace kadmia (vztaženo k začátku experimentu) v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe

Pro porovnání jsou na následujícím obrázku zobrazena data závislosti relativní koncentrace kadmia po dvou hodinách interakce. Kdy vidíme, že nejvyšší přírůstek koncentrace kadmia u MSA-CdTe kvantových teček je v pufru acetátovém, nevyšší přírůstek ve fosfátovém

pufru mají MPA-CdTe a GSH-CdTe mají nejvyšší přírůstek v kyselém roztoku. V neutrálním roztoku se jako nejhorší modifikant pro krátkodobé studie jeví MPA a pro kyselý roztok je nejhorším modifikantem GSH. V neutrálním roztoku a kyselém roztoku vychází nejlepším typem pro krátkodobé studie pomocí DPV modifikant MSA.

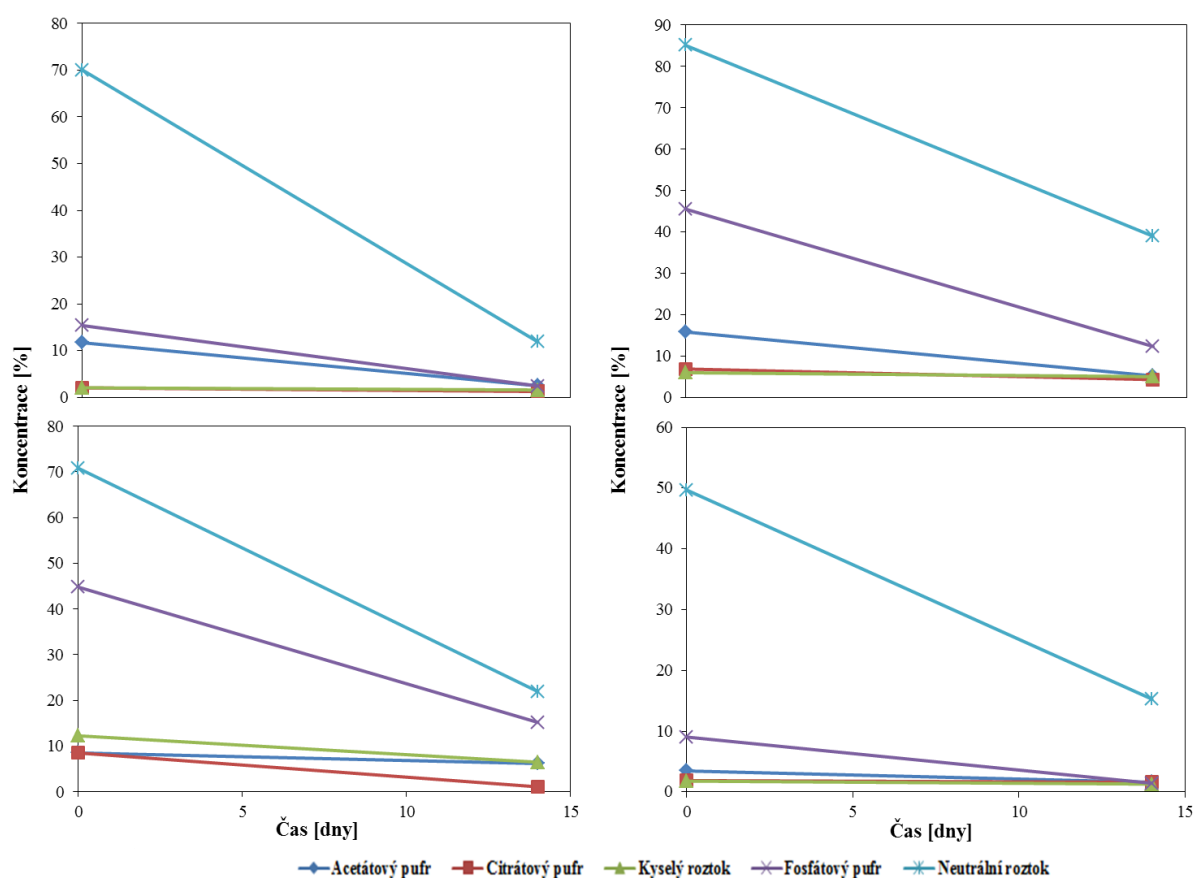


**Obrázek 39: Závislost relativní koncentrace kadmia (vztaženo k začátku experimentu) v různých prostředích na době interakce (dvě hodiny); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe**

Řady stability jednotlivých QDs v různých prostředích ukazují porovnání stability fluorescence, založené na změně velikosti fluorescence v období 14 dnů oproti původním tečkám, měřených bez pufrů.

|                  |                             |
|------------------|-----------------------------|
| Acetátový pufr   | GSH > MPA > MSA > CdTe/ZnSe |
| Citrátový pufr   | MPA > CdTe/ZnSe > MSA > GSH |
| Kyselý roztok    | GSH > MPA > MSA > CdTe/ZnSe |
| Fosfátový pufr   | GSH > MPA > MSA > CdTe/ZnSe |
| Neutrální roztok | MPA > GSH > CdTe/ZnSe > MSA |

V neutrálním pH vykazují QDs mnohem vyšší míru fluorescence a tedy i vyšší stabilitu, což opět shodně souhlasí s výsledky experimentu Wanga a kol. [45]. Nejvyšší hodnoty fluorescence se shodně objevují u všech QDs v neutrálním roztoku. Z teorie víme, že vliv na fluorescence má nejenom samotné pH roztoku, ale i jeho chemické složení [39, 55, 56]. Po čtrnáctém dnu experimentu nejvyšší fluorescence vykazovaly tečky MPA-CdTe a to právě v neutrálním roztoku. Tyto tečky samotné měly ze všech ostatních modifikovaných typů druhé nejvyšší hodnoty fluorescence, po MSA-CdTe. Z měření fluorescence v neutrálním roztoku byly jako nejvíce fotostabilní určeny MPA-CdTe. Obrázek číslo 40 popisuje procentuální úbytek fluorescence v čase oproti fluorescenci samotných teček bez pufrů<sup>2</sup>.

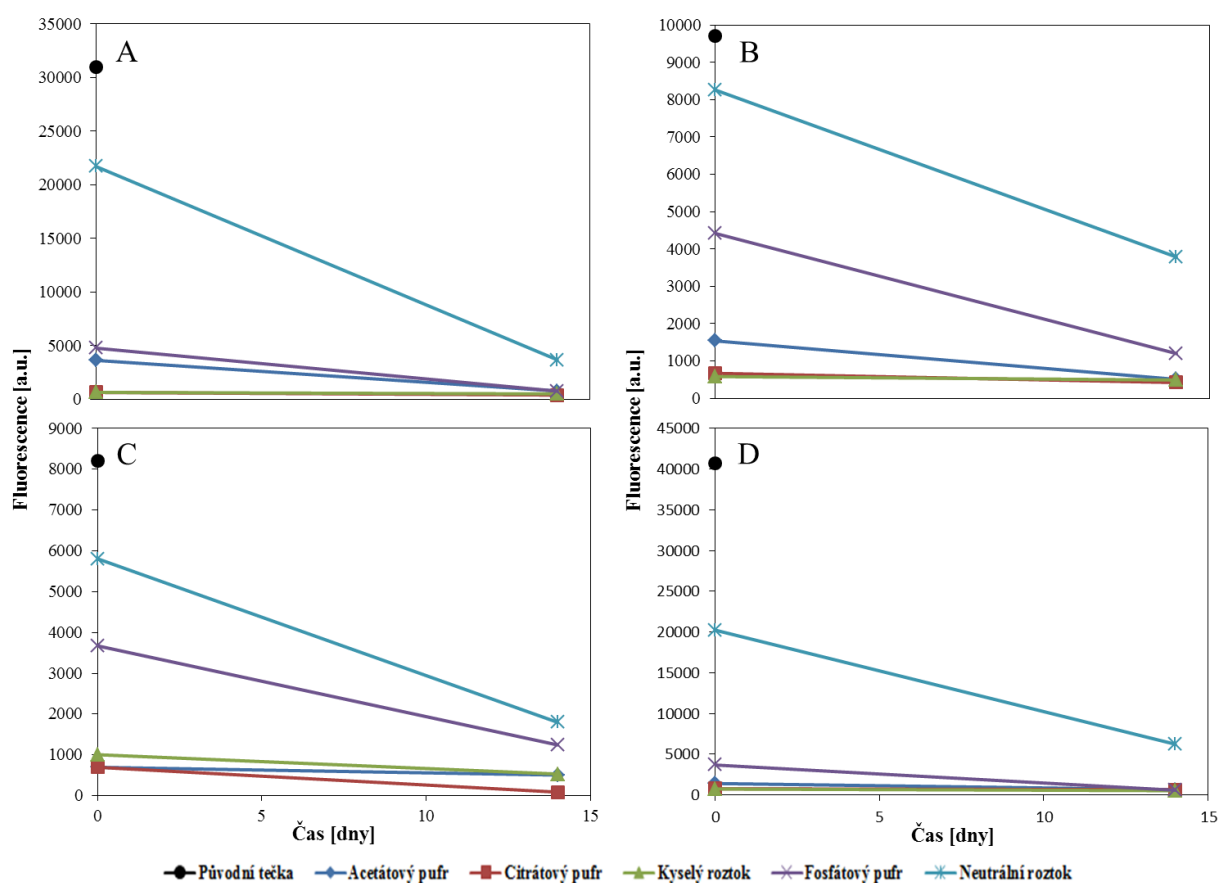


**Obrázek 40: Závislost relativní fluorescence QDs (vztaženo k původním tečkám bez pufru) v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe**

Následující obrázek ukazuje míru poklesu intenzity fluorescence u připravených teček v experimentálních prostředích během 14 dnů experimentu. Tečky byly vždy vloženy do pufru,

<sup>2</sup> Opět zde bylo měření omezeno limity instrumentace, čas nula není časem přesného vložení teček do pufrů.

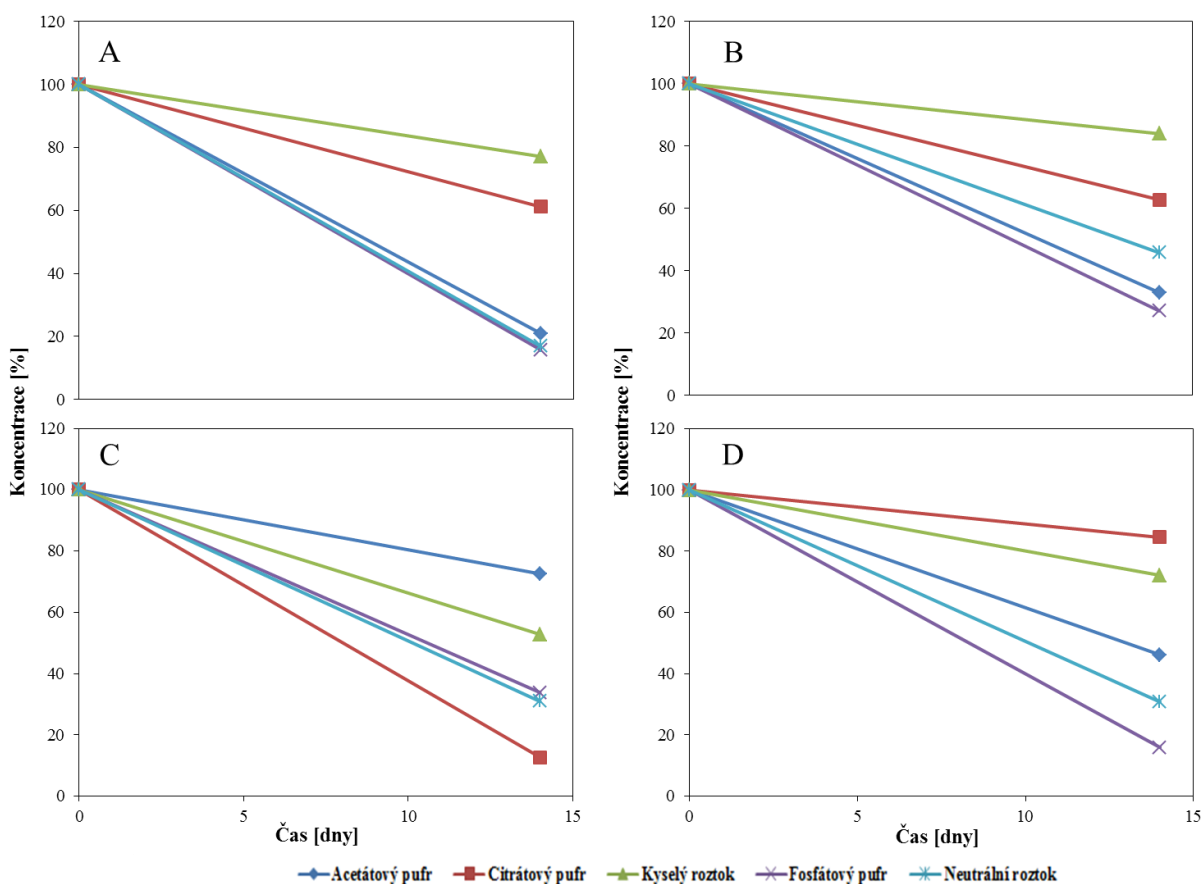
kde byla změřena jejich fluorescence<sup>3</sup>. Pro názornost jsou do grafů vneseny i intenzity fluorescence samotných QDs (bez přidavku pufrů).



**Obrázek 41: Závislost fluorescence v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe**

Následující obrázek popisuje závislost úbytku fluorescence na čase po dobu sledování 14 dní. Pokud porovnáme obrázek 40, 41 a 42, dojdeme k závěru, že v kyselých prostředích docházelo k velmi malé změně fluorescence, neboť první měření v pufrch vykazovalo nízké hodnoty. Naopak při prvním měření v neutrálních prostředích vykazovaly QDs mnohem vyšší hodnoty fluorescence oproti hodnotám v prostředích kyselých. Proto v neutrálním roztoku a ve fosfátovém pufru došlo ve čtrnáctém dnu k mnohem větší procentuální změně oproti tečkám měřeným v čase nula.

<sup>3</sup> Mezi vložení teček do pufru a začátkem měření uplynul nějaký čas a to z důvodu limit našich instrumentů, které nám nedovolily změřit první čas dříve. Tedy měřený čas 0 není přesným časem vložení QDs do pufru.



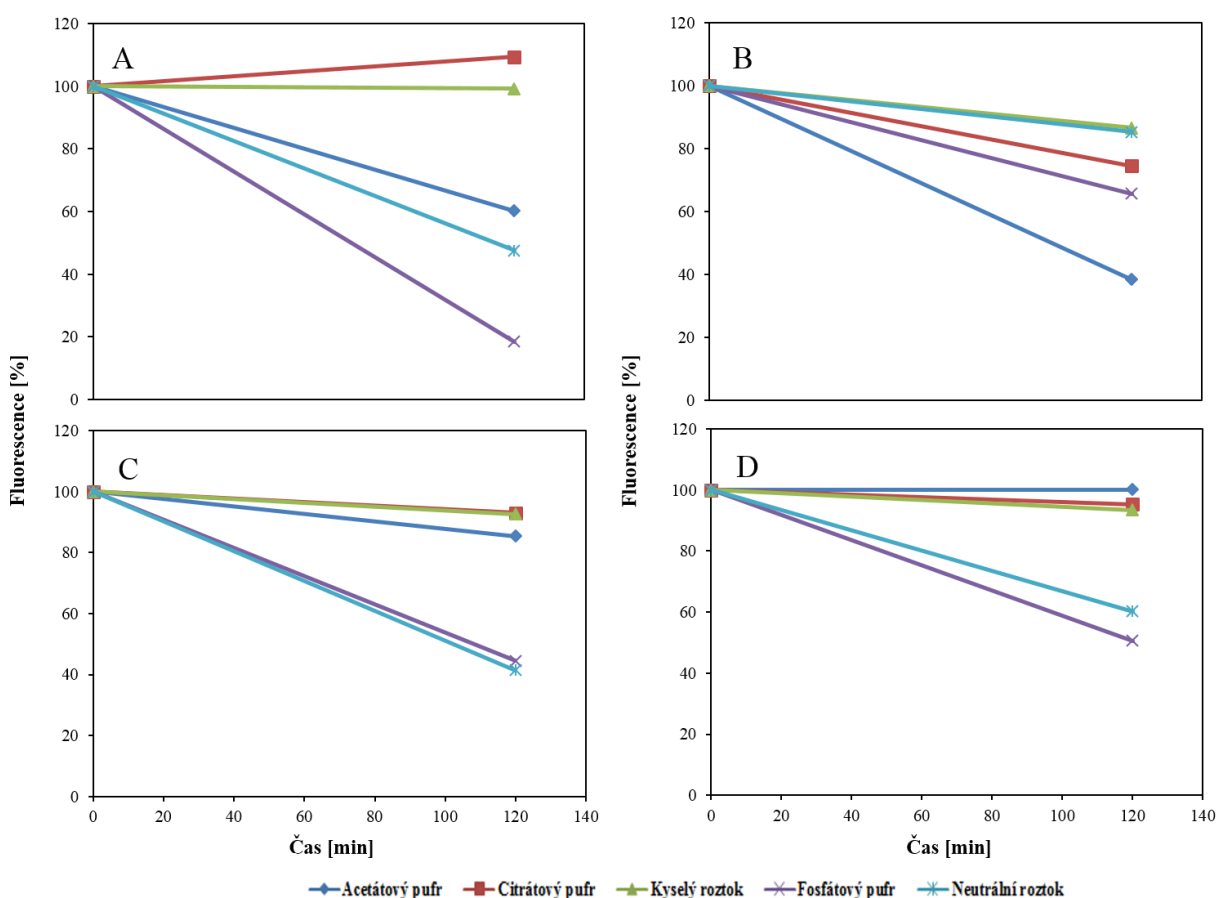
**Obrázek 42: Závislost relativní fluorescence (vztaženo k prvnímu měření v pufrech) v různých prostředích na době interakce (14 dní); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe**

|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| Acetátový pufr   | GSH >> CdTe/ZnSe > MPA > MSA |
| Citrátový pufr   | CdTe/ZnSe > MPA > MSA >> GSH |
| Kyselý roztok    | MPA > MSA > CdTe/ZnSe > GSH  |
| Fosfátový pufr   | GSH > MPA > CdTe/ZnSe > MSA  |
| Neutrální roztok | MPA > GSH > CdTe/ZnSe > MSA  |

Předchozí řady stability určují stabilitu fluorescence QDs v různých prostředích, jsou založeny na relativní změně velikosti fluorescence za 14 dnů oproti prvnímu měření QDs v pufrech.

Z hlediska dlouhodobé fotostability v kyselém roztoku (a celkově i v kyselém prostředí) byl z naměřených dat určen jako nejlepší modifikant typu MPA. Stejné výsledky platí i pro neutrální roztok.

Následující obrázek popisuje procentuální pokles fluorescence kvantových teček oproti prvnímu měření teček v pufru, pokles je zobrazen za dobu dvou hodin. Tedy měření v námi označeném čase nula je bráno jako hodnota 100 %. Z grafů vidíme, že pokles fluorescence v kyselých prostředích je menší než pokles fluorescence v prostředích neutrálních. Ovšem pokud si ještě jednou propojíme data z obrázku 40 a 41, je zřejmé, že samotná fluorescence kvantových teček v prostředích o pH 4,6 je mizivá a osciluje kolem hodnot v čase nula. Tudiž pokles fluorescence v kyselých prostředích nastal ihned v prvním měření. Naopak v prostředích o pH 7,6 kvantové tečky vykazují jistou fotostabilitu, a proto pokles fluorescence v těchto pufrech je větší než v pufrech kyselých. Z tohoto důvodu lze porovnávat fluorescenci jen mezi tečkami v jednotlivých pufrech.



**Obrázek 43: Závislost relativní fluorescence (vztaženo k prvnímu měření v pufrech) v různých prostředích na době interakce (dvě hodiny); A - MSA-CdTe, B - MPA-CdTe, C - GSH-CdTe, D - CdTe/ZnSe**

Pokud vyjdeme z dat krátkodobé studie, tak jako nejlépe vhodný modifikant pro neutrální roztok, jehož relativní fluorescence byla nejvyšší, byl zvolen MPA, což se shoduje s výsledky ze studie dlouhodobé. Pro sledování krátkodobých změn fluorescence v kyselých prostředích se jeví nejvíce fotostabilním modifikantem typ GSH. Tedy v kyselém prostředí výsledky ze studie krátkodobé se neshodují s výsledky studie dlouhodobé, kde byl nejlepším modifikantem MPA.

Pro měření zeta potenciálu je vždy nutné znát pH roztoku, kterém se potenciál měří. Kyselé prostředí byla připravena o pH 4,6 a prostředí neutrální o pH 7,6. Původní pH kvantových teček se pohybovalo v rozmezí 6,1 až 6,7. Kvantové tečky a pufrы byly před měřením smíchány v poměru 1:10, takže pufrы si udržely svoje pH. Po vložení teček do pufrů byla změřena jejich hodnota zeta potenciálů, ale i v tomto případě čas nula neodpovídá přesně času vložení do pufru, jelikož hledání optimálního místa měření a nastavení teploty před samotným změřením potenciálu zabralo minimálně čas dvou minut. Pokud si srovnáme zeta potenciál původních hodnot a prvních hodnot měřených v pufrých, vychází pro všechny typy teček největší změna zeta potenciálu v acetátovém pufru. A po spočtení procentuální změny vychází jako nejméně stabilní v prvním měření tečky MSA-CdTe. Což souhlasí s daty získanými měřením DPV.

Pokud se podíváme na všechna data experimentu, zajímavý trend mají MPA-CdTe v kyselém roztoku (Obr. 30b3), kde během prvních hodin hodnota jejich zeta potenciálu překmitla ze záporných do kladných hodnot. Ale v dalších měřených dnech opět vrátila k hodnotám záporným. Ovšem za nejméně stabilní modifikant z hlediska zeta potenciálu lze pokládat v kyselém a neutrálním roztoku MSA. Nestabilita MSA-CdTe v citrátovém pufru byla také velmi výrazná, což dokazuje, že ve čtrnáctém dnu experimentu nebylo možné změřit hodnotu jejich zeta potenciálu.

Předmětem této kapitoly bylo zjistit typ nejlepšího modifikantu pro kvantové tečky. Na chování různě modifikovaných kvantových teček se pohlíželo pomocí metod DPV, fluorescence a měření zeta potenciálu. Z výsledků krátkodobých studií DPV vychází nejlepším modifikantem pro kyselý roztok typ MSA, ovšem z hlediska dlouhodobé stability vychází lépe modifikant typu MPA. Pro neutrální prostředí vychází jak u krátkodobé, tak u dlouhodobé studie nejstabilnějším modifikantem MSA. Tyto výsledky jsou ale v rozporu ze získaných dat zeta potenciálů, kde modifikant typu MSA je nejméně stabilní. Jelikož prozatím nebyly přesně určeny všechny chemické pochody v QDs nelze tento rozpor plně vysvětlit.

## **11.2 Vliv typu QDs na jejich degradaci**

Ze studií cytotoxicity velmi často vyplývá, že modifikací povrchu kvantových teček, či vytvořením kvantových teček typu core/shell, se toxicita jádra pro okolí sníží, dokonce se tečky typu core/shell uvádí jako stabilnější než tečky modifikované monomolekulovou vrstvou [27, 46, 53].

Z výsledků měření DPV bylo zjištěno, že tečky core/shell tedy CdTe/ZnSe, dosahovaly v kyselém prostředí nejnižších množství koncentrace kadmia ze všech ostatních teček. Ovšem po vypočtení procentuálního přírůstku koncentrace kadmia (Obr. 38), bylo zjištěno, že tento typ teček s časem nejstabilnější nebyl. Stabilnější jsou tečky modifikované MSA, a to v citrátovém

pufru i v kyselém roztoku. V pufru acetátovém byly za nejstabilnější tečky vybrány MPA-CdTe. Ani v neutrálním prostředí data získaná DPV nestanovila core/shell kvantové tečky jako nejstabilnější. Pomocí naměřených a vyhodnocených dat byly tečky CdTe/ZnSe v neutrálních prostředích určeny jako třetí nejstabilnější, a to po MSA-CdTe a GSH-CdTe.

Charakterizace QDs pomocí fluorescenční spektroskopie nám určila, že samotné kvantové tečky CdTe/ZnSe dosahují nejvyšších absolutních hodnot fluorescence ze všech měřených teček. V dlouhodobém experimentu dosahovaly tečky nejvyšší fluorescenci v neutrálním roztoku, po čtrnáctém dnu experimentu nejvyšší fluorescenci vykazovaly v tomto roztoku tečky CdTe/ZnSe (Obr. 41). Ovšem co se týče procentuálního úbytku fluorescence oproti původním tečkám a procentuálního úbytku fluorescence oproti prvnímu změřenému bodu v neutrálním roztoku, tak tečky ZnSe vykazovaly druhou nejvyšší fotostabilitu v tomto prostředí. Ze všech naměřených dat v různých prostředích jsou v průměru za nejvíce fotostabilní QDs určeny MPA-CdTe. Srovnáním výsledků z krátkodobého experimentu bylo zjištěno, že v neutrálním roztoku nejvyšších hodnot fluorescence dosáhly tečky CdTe/ZnSe, přičemž na konci dvouhodinového měření byla jejich hodnota fluorescence opět nejvyšší, oproti ostatním QDs. Ve fosfátovém pufru dosáhly na konci dvouhodinového intervalu nejvyšších hodnot fluorescence opět tečky CdTe/ZnSe. Z obrázku 41 jsou patrné stejné výsledky, jako nám ukazují data z krátkodobého experimentu, a to že CdTe/ZnSe dosáhly druhé nejvyšší stability v neutrálních prostředích (po MPA-CdTe). Na obrázku 41 je označena fluorescence teček bez pufrů. Nejvyšších hodnot dosahovaly tečky core/shell CdTe/ZnSe, dále MSA-CdTe, MPA-CdTe a hodnoty nejnižší fluorescence GSH-CdTe. Tyto hodnoty představují 100 % pro ostatní přepočítané hodnoty fluorescence teček v pufrech. Z obrázku 40 lze zjistit, že největší pokles oproti tečkám samotným nastal u prvního měření v kyselém roztoku a to u CdTe/ZnSe, hodnota fluorescence poklesla na 1,8 %. V neutrálním prostředí nejmenší fluorescence při prvním měření dosáhly opět CdTe/ZnSe a to ve fosfátovém pufru. Nejmenší pokles fluorescence u prvního měření v kyselém prostředí měly MPA-CdTe a v neutrálním roztoku také. Ovšem musíme brát v potaz, že CdTe/ZnSe samotné měly naopak fluorescenci ze všech nejvyšší. Pokud si srovnáme absolutní fluorescenci samotných teček, tak MPA-CdTe dosahovaly 4,2 krát nižších hodnot fluorescence oproti CdTe/ZnSe. Závěrem lze říci, že core/shell kvantové tečky dosahují nejvyšších hodnot fluorescence a to i přesto, že jejich fotostabilita je menší než u MPA-CdTe.

Výsledky měření zeta potenciálů ukazují, že nejméně stabilní v neutrálním a kyselém roztoku ze všech čtyř typů QDs jsou tečky modifikované MSA. Naopak za nejstabilnější lze v těchto roztocích, tedy v kyselém a neutrálním pokládat tečky modifikované GSH. Pokud srovnáme modifikované kvantové tečky s core/shell, tak CdTe/ZnSe co se stability týče, jsou na druhém místě, tedy GSH-CdTe se jeví jako stabilnější.

Celkovým výsledkem porovnání stability core/shell kvantových teček a různě modifikovaných kvantových teček je, že QDs typu core/shell mají vysokou stabilitu v kyselých

prostředích, v neutrálních prostředích je jejich stabilita menší. Ze získaných dat lze ale tvrdit, že core/shell kvantové tečky se nedají univerzálně kvantifikovat jako stabilnější než některé modifikované QDs. V pokusu, ale bylo zjištěno, že velkou výhodou core/shell kvantových teček je jejich vysoká fluorescence. V absolutních hodnotách uvolnily core/shell QDs, oproti modifikovaným QDs, během celého experimentu menší množství iontů kadmia, i když je jejich kinetika uvolňování kadmiových iontů oproti modifikovaným QDs rychlejší. Z hlediska celkové toxicity se tedy core/shell QDs jeví lepší volbou než modifikované QDs. Pro jednoznačné doporučení, zda v aplikacích in vivo zvolit nějaký typ core/shell QDs či různě modifikované QDs, budou muset proběhnout rozsáhlejší studie.

### ***11.3 Degradací procesy QDs a jejich sledování***

K popisu degradačních procesů QDs měla primárně sloužit data získaná z DPV. Data naměřená ze zetasizeru a fluorescenční spektroskopie sloužila k porovnání s daty ze DPV. Proto byly spočítány hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu pro porovnání dat z provedených měření.

Nejprve se podívejme na porovnání výsledků fluorescence a DPV v krátkodobé části. Tímto krokem bylo zjišťováno, jak se výsledky obou měření shodují. Výsledky korelace jsou záporné, jelikož hodnoty koncentrace kadmia, stanovené metodou DPV, stoupají a hodnoty fluorescence naopak klesají. Vypočtené výsledky, které se blíží k hodnotě -1, znamenají nejsilnější korelaci mezi výsledky získanými pomocí obou metod<sup>4</sup>. Pro zjištění, zda jsou výsledky statisticky významné, byla zvolena metoda korelačních matic, výsledky korelací jsou významné na hladině  $p < 0,05$ .

---

<sup>4</sup> V tabulkách jsou zelenou barvou vyznačeny signifikantní hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu.

**Tabulka 2: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, kyselé prostředí, krátkodobé výsledky**

| acetátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | citrátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | 0,3980                         | 0,435 | MPA-CdTe       | -0,3646                        | 0,477 |
| MSA-CdTe       | -0,9368                        | 0,006 | MSA-CdTe       | -0,3596                        | 0,484 |
| GSH-CdTe       | -0,5278                        | 0,282 | GSH-CdTe       | -0,6866                        | 0,132 |
| CdTe/ZnSe      | -0,6379                        | 0,173 | CdTe/ZnSe      | -0,2527                        | 0,629 |
| kyselé roztok  | Pearsonův korelační koeficient | p     |                |                                |       |
| MPA-CdTe       | -0,9616                        | 0,002 |                |                                |       |
| MSA-CdTe       | -0,1979                        | 0,707 |                |                                |       |
| GSH-CdTe       | -0,8471                        | 0,033 |                |                                |       |
| CdTe/ZnSe      | -0,4556                        | 0,364 |                |                                |       |

**Tabulka 3: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, neutrální prostředí, krátkodobé výsledky**

| fosfátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | neutrální roztok | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|------------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | -0,4492                        | 0,372 | MPA-CdTe         | -0,6426                        | 0,169 |
| MSA-CdTe       | -0,9067                        | 0,013 | MSA-CdTe         | -0,3758                        | 0,463 |
| GSH-CdTe       | -0,9694                        | 0,001 | GSH-CdTe         | -0,7175                        | 0,108 |
| CdTe/ZnSe      | -0,7930                        | 0,060 | CdTe/ZnSe        | -0,9834                        | 0,000 |

Z výsledků Pearsonova korelačního koeficientu pro krátkodobá data vyšlo, že v záporné korelaci se vyskytuje celkem šest signifikantních výsledků z celkových dvaceti, a to pro MSA-CdTe v acetátovém pufru, MPA-CdTe a GSH-CdTe v kyselém roztoku, MSA-CdTe a GSH-CdTe v pufru fosfátovém a CdTe/ZnSe v neutrálním roztoku.

Stejně bylo postupováno i v případě výsledků z DPV a zeta potenciálu, opět byly sestaveny tabulky vypočítaných Pearsonových korelačních koeficientů, aby byla zjištěna korelace mezi daty. Jelikož velikosti zeta potenciálů neměly v daném časovém intervalu jednoznačné trendy, nejsou výsledky korelace tak shodné, jako v případě fluorescence.

**Tabulka 4: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, kyselé prostředí, krátkodobé výsledky**

| acetátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | citrátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | 0,3251                         | 0,530 | MPA-CdTe       | 0,2922                         | 0,574 |
| MSA-CdTe       | -0,6452                        | 0,166 | MSA-CdTe       | -0,0641                        | 0,904 |
| GSH-CdTe       | 0,1426                         | 0,788 | GSH-CdTe       | 0,8049                         | 0,053 |
| CdTe/ZnSe      | 0,0402                         | 0,940 | CdTe/ZnSe      | -0,0106                        | 0,984 |
| kyselé roztok  | Pearsonův korelační koeficient | p     |                |                                |       |
| MPA-CdTe       | 0,9792                         | 0,001 |                |                                |       |
| MSA-CdTe       | 0,6167                         | 0,192 |                |                                |       |
| GSH-CdTe       | -0,8477                        | 0,033 |                |                                |       |
| CdTe/ZnSe      | -0,9427                        | 0,005 |                |                                |       |

**Tabulka 5: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, neutrální prostředí, krátkodobé výsledky**

| fosfátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | neutrální roztok | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|------------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | 0,9635                         | 0,002 | MPA-CdTe         | 0,4938                         | 0,319 |
| MSA-CdTe       | 0,6898                         | 0,129 | MSA-CdTe         | -0,1839                        | 0,727 |
| GSH-CdTe       | 0,9437                         | 0,005 | GSH-CdTe         | -0,6192                        | 0,190 |
| CdTe/ZnSe      | 0,4212                         | 0,406 | CdTe/ZnSe        | -0,1448                        | 0,784 |

Nejlepší korelace byla dosažena u MPA-CdTe v kyselém roztoku a fosfátovém pufru, u GSH-CdTe ve fosfátovém pufru a CdTe/ZnSe opět v kyselém roztoku, za statisticky významný se považuje i výsledek GSH-CdTe v kyselém roztoku.

Pokud se podíváme na porovnání korelací mezi všemi daty, vyjde nám, že statisticky signifikantních výsledků dosahujeme pouze u srovnávaných dat u MPA-CdTe a GSH-CdTe v kyselém roztoku a GSH-CdTe ve fosfátovém pufru. Z toho je patrné, že pouze u GSH-CdTe je možné říci, že množství uvolněného kadmia koreluje s hodnotami fluorescence i zeta potenciálu, a to obecně jak v kyselém tak neutrálním prostředí.

### 11.4 Využití DPV pro predikci dlouhodobé stability QDs

Jak už bylo uvedeno, studium stability jednotlivých QDs in vitro by bylo vhodné pro predikci stability in vivo. Možnost využití krátkého časového intervalu pro takovou předpověď by bylo další výhodou takové metody. Proto byly v dalším kroku vypočítány Pearsonovy korelační koeficienty mezi hodnotami získanými pomocí DPV a fluorescence, tentokrát ze všech naměřených dat. Z dvaceti vypočtených hodnot ze všech dat se za statisticky významné považují výsledky u patnácti naměřených hodnot. Statisticky neprůkazné výsledky jsou MPA-CdTe v acetátovém pufru, MSA-CdTe ve fosfátovém pufru, GSH-CdTe v citrátovém pufru a neutrálním roztoku. Pouze dva, z těchto statisticky nevýznamných výsledků, a to MPA-CdTe v acetátovém pufru a GSH-CdTe v pufru citrátovém dosahují nízkých záporných hodnot, což dokazuje, že vztah mezi výsledky fluorescence a DPV je velmi malý.

**Tabulka 6: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, kyselé prostředí, všechny výsledky**

| acetátový pufru | Pearsonův korelační koeficient | p     | citrátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|-----------------|--------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe        | -0,0109                        | 0,978 | MPA-CdTe       | -0,7122                        | 0,031 |
| MSA-CdTe        | -0,9843                        | 0,000 | MSA-CdTe       | -0,7931                        | 0,011 |
| GSH-CdTe        | -0,6884                        | 0,040 | GSH-CdTe       | -0,4587                        | 0,214 |
| CdTe/ZnSe       | -0,5528                        | 0,123 | CdTe/ZnSe      | -0,6923                        | 0,039 |
| kyselé roztok   | Pearsonův korelační koeficient | p     |                |                                |       |
| MPA-CdTe        | -0,7026                        | 0,035 |                |                                |       |
| MSA-CdTe        | -0,7111                        | 0,032 |                |                                |       |
| GSH-CdTe        | -0,9042                        | 0,001 |                |                                |       |
| CdTe/ZnSe       | -0,9116                        | 0,001 |                |                                |       |

**Tabulka 7: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a fluorescenci, neutrální prostředí, všechny výsledky**

| fosfátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | neutrální roztok | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|------------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | -0,8129                        | 0,008 | MPA-CdTe         | -0,7505                        | 0,020 |
| MSA-CdTe       | -0,6460                        | 0,060 | MSA-CdTe         | -0,7360                        | 0,024 |
| GSH-CdTe       | -0,8231                        | 0,006 | GSH-CdTe         | -0,6152                        | 0,078 |
| CdTe/ZnSe      | -0,7589                        | 0,018 | CdTe/ZnSe        | -0,9805                        | 0,000 |

Při srovnání tabulek 2-3 a 6-7 lze pozorovat statisticky významné korelace MPA-CdTe v kyselém roztoku, MSA-CdTe v acetátovém pufru, GSH-CdTe v kyselém roztoku a fosfátovém pufru a nejvyšších hodnot Pearsonova korelačního koeficientu bylo dosaženo u CdTe/ZnSe v neutrálním roztoku.

Obdobně byl vypočten Pearsonův korelační koeficient i pro všechna porovnávaná data z měření DPV a zeta potenciálu. Korelace převažuje v hodnotách kladných. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u GSH-CdTe v acetátovém pufru, dále MSA-CdTe v kyselém roztoku a u MPA-CdTe v citrátovém pufru. Na hladině významnosti  $p < 0,05$  také leží výsledky CdTe/ZnSe v neutrálním a kyselém roztoku a citrátovém pufru.

**Tabulka 8: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, kyselé prostředí, všechny výsledky**

| acetátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | citrátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | -0,2908                        | 0,448 | MPA-CdTe       | 0,8014                         | 0,009 |
| MSA-CdTe       | 0,6542                         | 0,056 | MSA-CdTe       | -                              | -     |
| GSH-CdTe       | 0,8363                         | 0,005 | GSH-CdTe       | 0,4519                         | 0,222 |
| CdTe/ZnSe      | 0,5161                         | 0,155 | CdTe/ZnSe      | 0,7172                         | 0,030 |
| kyselý roztok  | Pearsonův korelační koeficient | p     |                |                                |       |
| MPA-CdTe       | 0,1316                         | 0,736 |                |                                |       |
| MSA-CdTe       | 0,8245                         | 0,006 |                |                                |       |
| GSH-CdTe       | 0,6391                         | 0,064 |                |                                |       |
| CdTe/ZnSe      | 0,7306                         | 0,025 |                |                                |       |

**Tabulka 9: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro DPV a zeta potenciálu, neutrální prostředí, všechny výsledky**

| fosfátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | neutrální roztok | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|------------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | 0,4998                         | 0,171 | MPA-CdTe         | 0,5409                         | 0,158 |
| MSA-CdTe       | -0,5469                        | 0,128 | MSA-CdTe         | 0,3195                         | 0,402 |
| GSH-CdTe       | 0,2722                         | 0,479 | GSH-CdTe         | 0,4471                         | 0,228 |
| CdTe/ZnSe      | 0,0905                         | 0,817 | CdTe/ZnSe        | 0,7837                         | 0,012 |

Pearsonův korelační koeficient z krátkodobých výsledků měření vykazoval méně dobrých korelací než z celkového počtu dat. Pokud srovnáme výsledky Pearsonových koeficientů mezi všemi daty a daty krátkodobými (Tab. 4-5, 8-9), vychází nejlepší korelace v kyselém roztoku s CdTe/ZnSe tečkami. U výsledků vypočtených na základě všech dat vychází průměrně vyšší, tedy lepší výsledky, Pearsonova korelačního koeficientu.

Pro úplné porovnání a zjištění, zda lze využít krátkodobá data z DPV k predikci dlouhodobé stability QDs, byly vypočteny hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu z krátkodobých výsledků DPV a výsledků dlouhodobých.<sup>5</sup>

**Tabulka 10: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro výsledky DPV z krátkodobého a dlouhodobého experimentu, kyselé prostředí**

| acetátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | citrátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | 0,6710                         | 0,215 | MPA-CdTe       | 0,7905                         | 0,111 |
| MSA-CdTe       | 0,9436                         | 0,016 | MSA-CdTe       | 0,4393                         | 0,459 |
| GSH-CdTe       | 0,8456                         | 0,071 | GSH-CdTe       | 0,7828                         | 0,117 |
| CdTe/ZnSe      | 0,0454                         | 0,942 | CdTe/ZnSe      | 0,9038                         | 0,035 |
| kyselý roztok  | Pearsonův korelační koeficient | p     |                |                                |       |
| MPA-CdTe       | 0,8942                         | 0,041 |                |                                |       |
| MSA-CdTe       | 0,9896                         | 0,001 |                |                                |       |
| GSH-CdTe       | 0,8503                         | 0,068 |                |                                |       |
| CdTe/ZnSe      | 0,4558                         | 0,440 |                |                                |       |

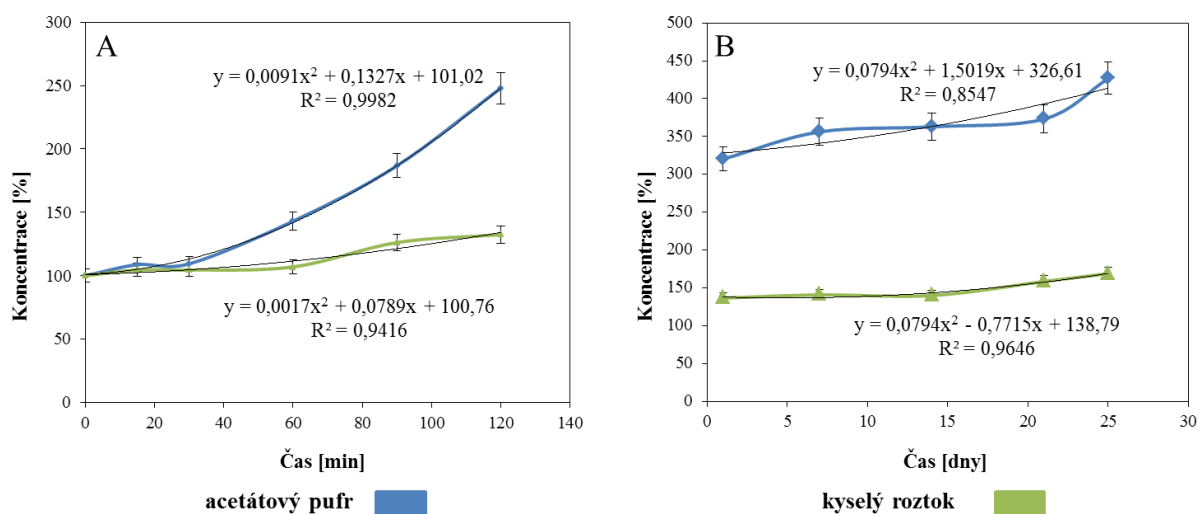
**Tabulka 11: Srovnání Pearsonova korelačního koeficientu pro výsledky DPV z krátkodobého a dlouhodobého experimentu, neutrální prostředí**

| fosfátový pufr | Pearsonův korelační koeficient | p     | neutrální roztok | Pearsonův korelační koeficient | p     |
|----------------|--------------------------------|-------|------------------|--------------------------------|-------|
| MPA-CdTe       | 0,6413                         | 0,244 | MPA-CdTe         | 0,7579                         | 0,138 |
| MSA-CdTe       | 0,8375                         | 0,077 | MSA-CdTe         | 0,7284                         | 0,163 |
| GSH-CdTe       | 0,9939                         | 0,001 | GSH-CdTe         | 0,8285                         | 0,083 |
| CdTe/ZnSe      | 0,5514                         | 0,335 | CdTe/ZnSe        | 0,9967                         | 0,000 |

<sup>5</sup> U krátkodobých dat byla pro zachování kontinuity vyjmuta data z 15 minuty, ostatní krátkodobá data jsou v časovém sledu 30 minut.

Statisticky významné výsledky jsou opět označeny zelenou barvou. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u core/shell kvantových teček – CdTe/ZnSe v neutrálním roztoku, tyto tečky jsou v korelaci i citrátovém pufru. Vysoké hodnoty korelaci vykazují i tečky modifikované MSA a to v kyselém roztoku a acetátovém pufru, korelace se vyskytla u GSH-CdTe v pufru fosfátovém.

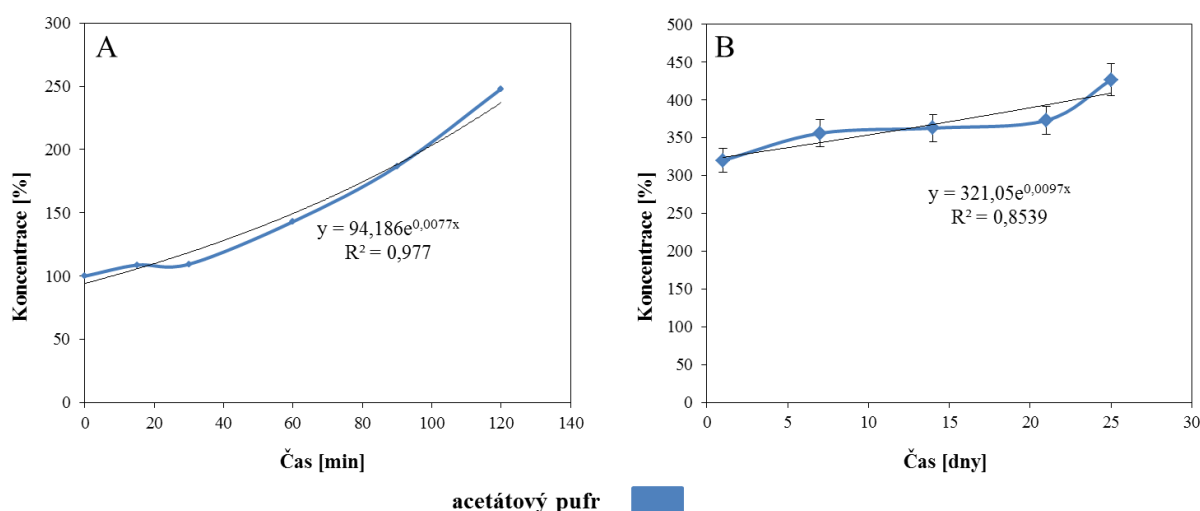
Možnost využití tzv. zrychleného testu stability QDs se ukázala jako relevantní u šesti kombinací kvantová tečka-prostředí. U těchto kombinací byly proloženy časové závislosti, jak krátkodobé tak dlouhodobé, a to spojnicemi trendu, s cílem zjistit zda naměřená data je možné přiřadit k některému základnímu kinetickému modelu chemických reakcí.



**Obrázek 44: Proložení časové závislosti MSA-CdTe (acetátový pufr, kyselý roztok): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce**

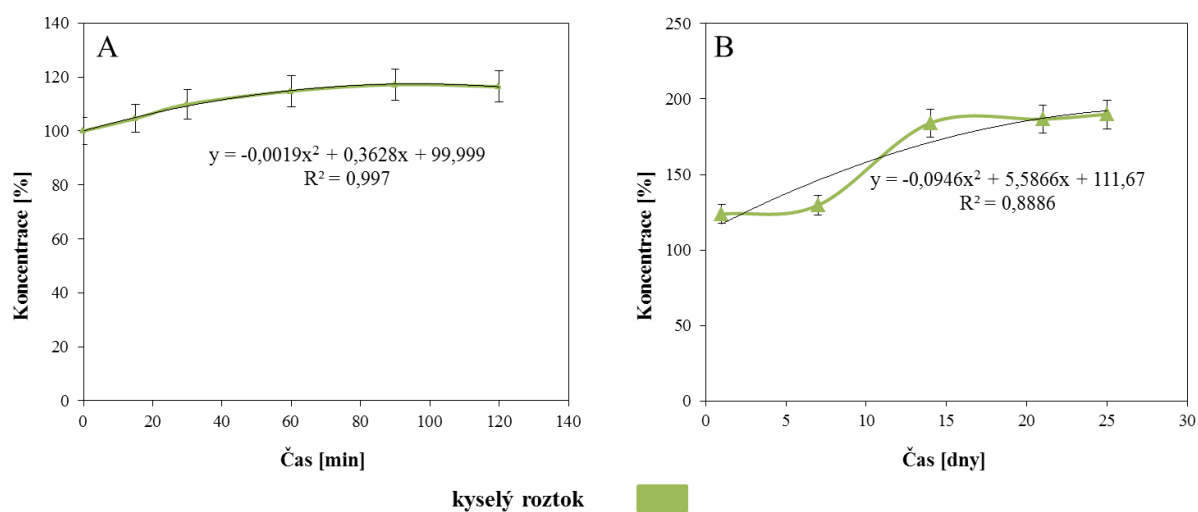
Na obrázku 44 je srovnání proložení časové závislosti MSA-CdTe v acetátovém pufru a kyselém roztoku mezi krátkodobým a dlouhodobým experimentem. Obě možnosti jsou proloženy polynomy druhého řádu. V krátkodobém experimentu v prostředí acetátového pufru vychází vysoký koeficient spolehlivosti 0,99. Ale u dlouhodobé závislosti je koeficient spolehlivosti pouze na hodnotě 0,85. Porovnání proložených časových závislostí MSA-CdTe v kyselém roztoku ukázalo celkově vyšší hodnoty koeficientů spolehlivosti než v acetátovém pufru ( $R^2 = 0,94$  a v dlouhodobé se  $R^2$  rovná hodnotě 0,96).

Průběh MSA-CdTe bylo možné proložit také pomocí exponenciály, viz obrázek 45.



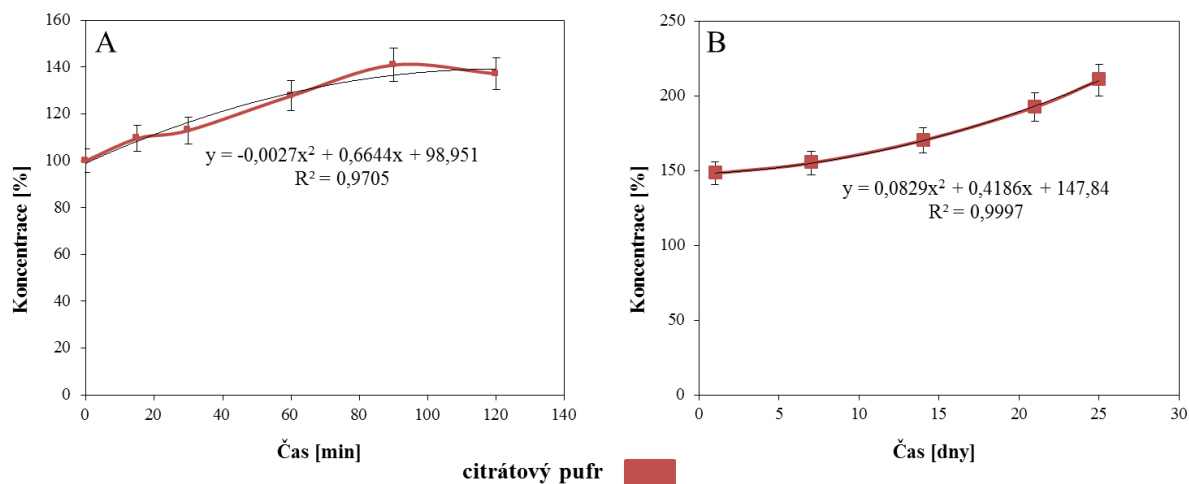
**Obrázek 45: Proložení časové závislosti MSA-CdTe (acetátový pufr): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce**

Nejzajímavější časový průběh kinetiky uvolňování iontů kadmia mají MSA-CdTe v acetátovém pufru, a to průběh exponenciální. Hodnota koeficientu spolehlivosti u krátkodobé interakce vyšla 0,97 a u dlouhodobé 0,85 (Obr. 45). Tento průběh byl na začátku experimentu očekáván u více typů QDs v různých prostředích.



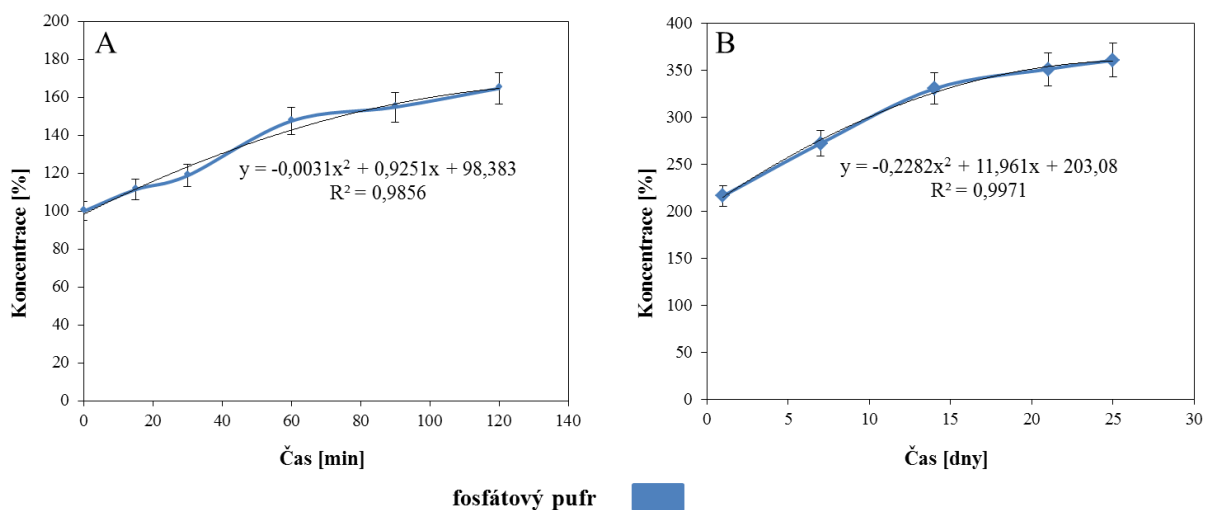
**Obrázek 46: Proložení časové závislosti MPA-CdTe (kyselý roztok): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce**

Na obrázku 46 je vidět srovnání proložení časových závislostí pomocí polynomu druhého řádu pro MPA-CdTe v kyselém roztoku. Koeficient spolehlivosti v krátkodobém časovém experimentu opět dosahuje vysokých hodnot, a to 0,99. V porovnání, koeficient spolehlivosti u dlouhodobého časového experimentu je pouze na hodnotě 0,89.



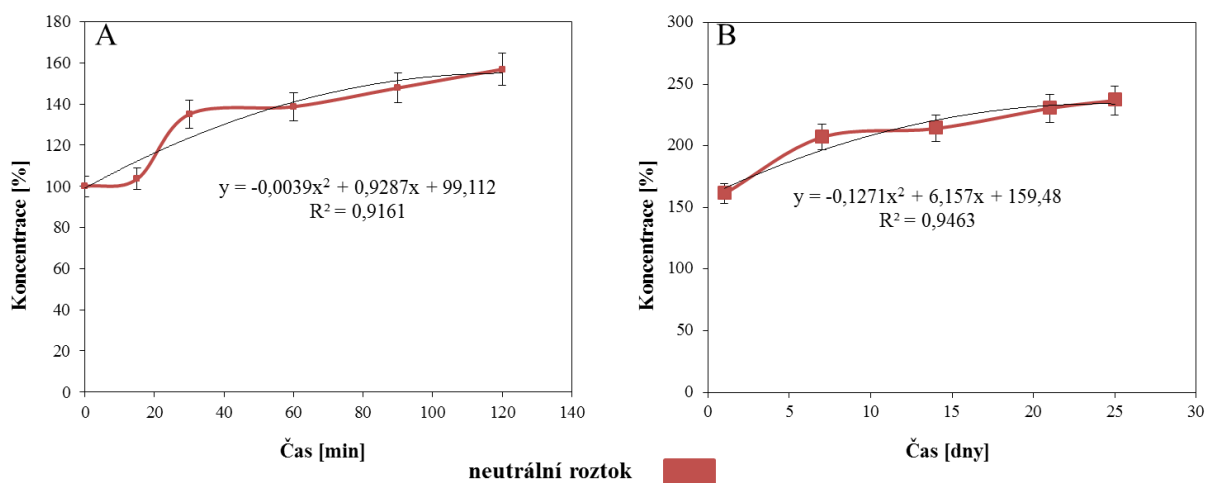
**Obrázek 47: Proložení časové závislosti CdTe/ZnSe (citrátový pufr): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce**

Obrázek 47 zobrazuje proložení časových závislostí polynomem druhého řádu CdTe/ZnSe v citrátovém pufru, oba koeficienty spolehlivosti, tedy u krátkodobé a dlouhodobé časové závislosti, vychází ve vysokých hodnotách.  $R^2$  u krátkodobé interakce je rovno hodnotě 0,97 a u dlouhodobé interakce je 0,99.



**Obrázek 48: Proložení časové závislosti GSH-CdTe (fosfátový pufr): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce**

Obrázek 48 popisuje proložení časových závislostí GSH-CdTe ve fosfátovém pufru, a to pomocí polynomu druhého řádu. Stejně jako v případě CdTe/ZnSe, vychází i zde vysoké hodnoty koeficientů spolehlivosti. Koeficient spolehlivosti u krátkodobé interakce je roven 0,99 a u dlouhodobé interakce také 0,99.



**Obrázek 49: Proložení časové závislosti CdTe/ZnSe (neutrální roztok): A-krátkodobá interakce, B-dlouhodobá interakce**

Poslední proložení časových závislostí bylo provedeno u CdTe/ZnSe v neutrálním roztoku, i zde se opět jako nejvhodnější jevílo proložení polynomem druhého řádu. Hodnota  $R^2$  u krátkodobé interakce je rovna 0,92 a  $R^2$  u dlouhodobé interakce je rovno hodnotě 0,95.

Jak je vidět z výsledků proložení spojnic trendů (Obr. 44 až 49), tak výsledky z DPV nejsou dostatečné k vytvoření odpovídajících základních modelů kinetiky chemických reakcí. Pouze krátkodobý výsledek u MSA-CdTe v acetátovém pufru lze přirovnat k reakci prvního řádu. Data dostupná u ostatních variant naznačují, že k řešení problému kinetiky uvolňování kademnatých iontů z jednotlivých QDs by bylo nutné využít bezmodelových kinetik, respektive iteračních postupů definujících jednotlivé kinetické závislosti.

## 12 ZÁVĚR

Hlavním tématem této diplomové práce bylo studium chování kvantových teček CdTe v různých prostředích. K tomu bylo použito celkem pět různých prostředí, tři s pH 4,6 a dvě s pH 7,6, s tím že největší pozornost byla věnována studiu kinetiky uvolňování kadmnatých iontů z jádra kvantových teček. Jedním z cílů práce bylo i porovnání nestability, neboli uvolňování iontů kadmia z jader kvantových teček, různě modifikovaných QDs s core/shell QDs. Z literárních rešersí bylo zjištěno, že QDs tvořené pouze jádrem, tedy bez pokrytí, či modifikantu, uvolňují oproti modifikovaným a pokrytým QDs mnohem více kadmnatých iontů. Jinými slovy vykazují ze všech druhů QDs nejvyšší nestabilitu. Většina studií také shodně tvrdí, že prozatím nebylo uskutečněno dostatek experimentů, abychom mohli prokázat, který modifikant, či jaký typ pokrytí, má největší vliv na snížení toxicity QDs [48]. Bohužel v žádných studiích nebylo provedeno srovnání mezi QDs modifikovanými monomolekulovou vrstvou a typem core/shell QDs, tedy mezi typy QDs použitými v této práci. Také nebyly nalezeny žádné studie, které by se opíraly o výsledky stability QDs stanovené pomocí DPV.

Hlavním prostředkem pro zjištění kinetiky uvolňování iontů kadmia z jádra QDs bylo měření pomocí DPV, přičemž jako srovnání sloužily výsledky měření fluorescence a zeta potenciálů. Výsledky z měření DPV byly převedeny na hodnoty relativních koncentrací, z nichž vychází modifikant MSA jako nejstabilnější v prostředí speciálního kyselého a neutrálního roztoku. Tyto roztoky imitují speciální intracelulární prostředí, a proto byly z hlediska našeho experimentu nejdůležitějšími prostředími. Výsledky v absolutních hodnotách, tedy množství koncentrace kadmia naměřeného poslední den experimentu (DPV poslední data z 25 dne), vykazují v kyselém i neutrálním roztoku nejmenší množství koncentrace kadmia u QDs typu core/shell. Na konci našeho experimentu bylo tedy u teček CdTe/ZnSe naměřeno pomocí DPV nejmenší množství koncentrace kadmia. Z výsledků fluorescence opět vyplynulo, že v absolutních hodnotách je fluorescence u core/shell QDs nejvyšší, i když procentuální úbytky fluorescence ukazují, že fotodegradace jsou nejstabilnějším typem MPA-CdTe.

Pro hodnocení korelací jednotlivých měření byl proveden statistický test korelačních matic, kde bylo prokázáno, že výsledky z měření DPV a fluorescence spolu úzce souvisí, hlavně v kyselém prostředí. Tento test byl proveden i u výsledků měření krátkodobé a dlouhodobé studie za pomoci DPV, a to pro zjištění, zda lze predikovat dlouhodobý vývoj chování QDs za pomoci krátkodobých studií. Z výsledků vyplynulo, že použití krátkodobých výsledků pro predikci dlouhodobé stability QDs v různých prostředích lze využít pouze u některých kombinací kvantová tečka-prostředí. Nutno dodat, že pouze core/shell QDs vykazovaly korelaci krátkodobých a dlouhodobých dat jak v kyselém, tak neutrálním prostředí (konkrétně v citrátovém pufru a neutrálním roztoku).

Posledním bodem experimentu byl pokus o popis/vytvoření modelu kinetiky uvolňování iontů kadmia z jádra QDs. Ovšem získané výsledky ukázaly, že naměřené závislosti neodpovídají žádnému základnímu kinetickému modelu chemických reakcí. Pro jejich vyhodnocení by bylo nejspíše nutné využít bezmodelových kinetik, respektive iteračních postupů definujících jednotlivé kinetické závislosti, přičemž tyto závislosti by se nejspíše lišily u jednotlivých typů QDs.

## LITERATURA

1. Hošek, J., *Úvod do nanotechnologie* 2010, Praha: Praha, vydavatelství ČVUT. 170.
2. Merkoci, A., *Biosensing Using Nanomaterials. Wiley series in Nanoscience and Nanotechnology* 2009: Wiley 499.
3. Hubálek, J., R. Kizek, and J. Drbohlavová, *Chemosenzory a biosenzory*, 2012: Brno.
4. Drbohlavová, J., et al., *Quantum dots—characterization, preparation and usage in biological systems*. International Journal of Molecular Sciences, 2009. **10**(2): p. 656-673.
5. Blažková, I., *VYUŽITÍ KVANTOVÝCH TEČEK V IN VIVO ZOBRAZOVÁNÍ* Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika 2012.
6. Hlaváček, A. and P. Skládal, *KVANTOVÉ TEČKY: PŘÍPRAVA, KONJUGACE A VYUŽITÍ V BIOANALYTICKÉ CHEMII A BIOLOGII*. Chemické listy, 2011(105): p. 611-615.
7. Walling, M.A., J.A. Novak, and J.R. Shepard, *Quantum dots for live cell and in vivo imaging*. International Journal of Molecular Sciences, 2009. **10**(2): p. 441-491.
8. Chomoucka, J., et al. *Synthesis of Glutathione-coated Quantum Dots*. in 2009 32nd International Spring Seminar on Electronics Technology; 2009, Brno. 2009.
9. Pierce, D.T. and J.X. Zhao, *Trace Analysis with Nanomaterials* 2010: John Wiley & Sons.
10. Bawendi\_group. 2013; Available from: <http://nanocluster.mit.edu/research.php>.
11. Heyman, K. *Quantum Dots Get Smaller*. 2005; Available from: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/16431/title/Quantum-Dots-Get-Smaller/>.
12. Asmathunisha, N. and K. Kathiresan, *A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **103**: p. 283-287.
13. Jamieson, T., et al., *Biological applications of quantum dots*. Biomaterials, 2007. **28**(31): p. 4717-4732.
14. Clift, M.J. and V. Stone, *Quantum dots: an insight and perspective of their biological interaction and how this relates to their relevance for clinical use*. Theranostics, 2012. **2**(7): p. 668.
15. Gao, X., et al., *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*. Nature biotechnology, 2004. **22**(8): p. 969-976.
16. Fišar, Z., *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*, 2009, 1. lékařská fakulta UK, Praha: Praha.
17. Cenková, V., *Fluorescenční mikroskopie a její využití v biologii*, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého: Olomouc.

18. Lavis, L.D., *Tailoring Fluorescent Molecules for Biological Applications* 2008: ProQuest.
19. Dostál, J., et al., *Biochemie pro bakaláře* 2003, Brno: Masarykova univerzita.
20. *Biomedical Hypertextbooks*. 2002; Available from: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/basics/prostruct.html>.
21. Malý, J., *Molekulární a buněčná biologie*, in *Distanční opory pro kombinované studium biologie* 2006, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně Přírodovědecká fakulta: Ústí nad Labem.
22. Střední zdravotnická škola-Karviná. Available from: <http://sszdra-karvina.cz/bunka/che/04bil/bil4.htm>.
23. Wikipedia. *Proteins*. 2014; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Main\\_Page](http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page).
24. CHOMOUCKA, J., et al., *CONJUGATION BOVINE SERUM ALBUMIN WITH CDTE QUANTUM DOTS*.
25. Smith, A.M., et al., *Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging*. *Advanced drug delivery reviews*, 2008. **60**(11): p. 1226-1240.
26. Wang, J. and H. Han, *Hydrothermal synthesis of high-quality type-II CdTe/CdSe quantum dots with near-infrared fluorescence*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **351**(1): p. 83-87.
27. Chen, N., et al., *The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots*. *Biomaterials*, 2012. **33**(5): p. 1238-1244.
28. Hardman, R., *A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors*. *Environmental health perspectives*, 2006: p. 165-172.
29. Nguyen, K.C., W.G. Willmore, and A.F. Tayabali, *Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells*. *Toxicology*, 2013. **306**: p. 114-123.
30. Augusto, O. and M. Sayuri, *Oxygen radicals and related species*. Pantopoulos K, Schippeer HM. *Principles of free radical biomedicine*. New York: Nova Science Publishers, 2011.
31. Hynek, D., et al., *Electrochemical characterization of various synthesized quantum dots and the effect of aging and storage way* 2014: Brno.
32. Mahmoud, W.E. and S. Al-Heniti, *Evaluation and modeling of thermal kinetic degradation for PVA doped PbS quantum dot*. *Materials Research Bulletin*, 2011. **46**(9): p. 1366-1371.
33. HORIBA. *HORIBA Scientific*. SZ-100 2014; Available from: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/particle-size-analysis/details/sz-100-7245/>.
34. Malvern\_Instruments, *Zetasizer nano Series User Manual*, 2004, Malvern Instruments Worcestershire.

35. X-Ray\_Laboratories. *Zeta potenciál zeta*. 2014; Available from: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>.
36. Sobrova, P., et al., *Voltammetry as a Tool for Characterization of CdTe Quantum Dots*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(7): p. 13497-13510.
37. Hubálek, J., et al., *Mikrosenzory a mikroelektromechanické systémy*, 2012: Brno.
38. Skládal, P., *Biosenzory*, 2002, Masarykova univerzita: Brno.
39. Rodrigues, S.S.M., et al., *Fluorescence enhancement of CdTe MPA-capped quantum dots by glutathione for hydrogen peroxide determination*. Talanta, 2014. **122**: p. 157-165.
40. OpenStax\_CNX, *The Application of Fluorescence Spectroscopy*. 2014.
41. Malijevský, A., et al., *Breviář fyzikální chemie*, 2001, VŠCHT: Praha.
42. Novák, J., *Fyzikální chemie*, 2011, VŠCHT PRAHA: Praha.
43. Klika, Z., *Analytická chemie I*, Technická univerzita Ostrava: Ostrava.
44. Corazzari, I., et al., *Localization of CdSe/ZnS quantum dots in the lysosomal acidic compartment of cultured neurons and its impact on viability: Potential role of ion release*. Toxicology in Vitro, 2013. **27**(2): p. 752-759.
45. Wang, T. and X. Jiang, *Size-dependent stability of water-solubilized CdTe quantum dots and their uptake mechanism by live HeLa cells*. ACS applied materials & interfaces, 2013. **5**(4): p. 1190-1196.
46. Derfus, A.M., W.C. Chan, and S.N. Bhatia, *Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots*. Nano letters, 2004. **4**(1): p. 11-18.
47. Han, Y., et al., *Plasma kinetics and biodistribution of water-soluble CdTe quantum dots in mice: a comparison between Cd and Te*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(10): p. 5373-5380.
48. Xu, M., et al., *Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotoxicity on Phaeodactylum tricornutum*. Metallomics, 2010. **2**(7): p. 469-473.
49. Wu, W., et al., *Photoluminescent spectroscopic and kinetic studies on green-emitting CdSeS quantum dot/polymethyl methacrylate composite*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2010. **356**(20): p. 1016-1020.
50. Li, K., et al., *Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots*. Toxicology in Vitro, 2009. **23**(6): p. 1007-1013.
51. Zhang, Y., et al., *Stability and removal of water soluble CdTe quantum dots in water*. Environmental science & technology, 2007. **42**(1): p. 321-325.
52. Smirnov, M., et al., *Decay of electronic excitations in CdS and CdS/ZnS colloidal quantum dots: spectral and kinetic investigations*. Optics and Spectroscopy, 2013. **115**(5): p. 651-659.

53. Lobo, A., et al., *Surface oxidation of CdTe nanocrystals—A high resolution core-level photoelectron spectroscopy study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **286**(1): p. 1-7.
54. Kulvietis, V., G. Streckytė, and R. Rotomskis, *Spectroscopic investigations of CdTe quantum dot stability in different aqueous media*. Lithuanian Journal of Physics, 2011. **51**(2).
55. Zhang, A., et al., *Photoluminescence Stability of Colloidal CdTe Quantum Dots in Various Buffer Solutions*. Journal of Cluster Science, 2013. **24**(2): p. 427-437.
56. Dong, C., et al., *Study of fluorescence quenching and dialysis process of CdTe quantum dots, using ensemble techniques and fluorescence correlation spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(23): p. 11069-11075.

## SEZNAM ZKRATEK

|              |                                          |
|--------------|------------------------------------------|
| <b>BSA</b>   | hovězí sérový albumin                    |
| <b>DLS</b>   | dynamický světelný rozptyl               |
| <b>DPV</b>   | diferenčně pulzní voltametrie            |
| <b>GSH</b>   | glutathion                               |
| <b>HDA</b>   | hexadecylamin                            |
| <b>HSA</b>   | lidský sérový albumin                    |
| <b>MPA</b>   | merkaptopropionová kyselina              |
| <b>MSA</b>   | merkaptojantarová kyselina               |
| <b>NADH</b>  | nikotinamid adenin dinukleotid difosfát  |
| <b>NADPH</b> | nikotinamid adenin dinukleotid trifosfát |
| <b>NIR</b>   | blízká infračervená oblast               |
| <b>NPV</b>   | normální pulzní voltametrie              |
| <b>QDs</b>   | kvantové tečky                           |
| <b>TOP</b>   | trioctylphosphin                         |
| <b>TOPO</b>  | trioctylphosphin oxid                    |
| <b>UV</b>    | ultrafialové záření                      |
| <b>VIS</b>   | viditelné záření                         |