

Priprema i modifikacija ugljikovih kvantnih točaka iz limunske kiseline: Primjena u detekciji metalnih iona

Jandžel, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:286109>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

KRISTINA JANDEL

PRIPRAVA I MODIFIKACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ LIMUNSKÉ
KISELINE: PRIMJENA U DETEKCIJI METALNIH IONA

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

KRISTINA JANDEL

PRIPRAVA I MODIFIKACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ LIMUNSKÉ
KISELINE: PRIMJENA U DETEKCIJI METALNIH IONA

DIPLOMSKI RAD

MENTORICA: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

KOMENTORICA: prof. dr. sc. Stela Jokić

NEPOSREDNA VODITELJICA: Silvija Šafranko, mag. chem.

OSIJEK, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****PRIPRAVA I MODIFIKACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ LIMUNSKKE
KISELINE: PRIMJENA U DETEKCIJI METALNIH IONA****Kristina Jandel****Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju**Mentor:** doc. dr. sc. Anamarija Stanković**Sažetak:**

Ugljikove kvantne točke (CQD) inovativna su i efektivna forma fotoluminiscentnih ugljičnih nanomaterijala. Njihova kemijska stabilnost, niska toksičnost, biokompatibilnost, topljivost i fotoluminiscencija predstavljaju veliki potencijal primjene u biomedicinskim istraživanjima i nanotehnologiji. CQD su veličine obično do 10 nm i sastoje se od ugljične jezgre sa sp^3 hibridiziranim i nešto manje sp^2 hibridiziranim ugljikovim atomima, ali s obzirom na stajanje i skladištenje mogu biti veličine do 60 nm. Prednost CQD je sposobnost dopiranja heteroatomima u strukturu ili dodatkom funkcionalnih grupa na površinu, kako bi se povećalo kvantno iskorištenje (QY) i sposobnost interakcija s drugim biološkim materijalima. CQD se stoga mogu koristiti u detektiranju različitih kemijskih specija, pa tako i metalnih iona i biomolekula. Postoje dva pristupa sinteze CQD; „*top - down*“ i „*bottom - up*“. Glavna prednost „*bottom - up*“ pristupa jest namještanje optimalnih uvjeta sinteze i biranje optimalnih kemijskih prekursora, ovisno o željenoj primjeni. Tako su u ovom radu sintetizirane CQD iz limunske kiseline i aminokiseline; Leucin (Leu), Triptofan (Trp), Arginin (Arg), Alanin (Ala) i Histidin (His) kao izvor dušika. U usporedbi s *blank* uzorkom, N – dopirane CQD pokazale su znatno viši QY pa je tako uzorak CQD@Leu pokazao selektivan odziv na Fe^{3+} ione u probama gdje se gledalo smanjenje intenziteta fotoluminiscencije. Dobiveni rezultati su pokazali potencijalnu primjenu CQD u detekciji metalnih iona, u poljima biomedicine, analitičke kemije i okolišu.

Diplomski rad obuhvaća: 59 stranica, 20 slika, 7 tablice, 4 jednadžbe, 25 literaturnih navoda.**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** ugljikove kvantne točke, sinteza ugljikovih kvantnih točaka, aminokiseline, limunska kiselina, detekcija metalnih iona.**Rad je prihvaćen:** 22.9.2022.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjednica
2. prof. dr. sc. Stela Jokić, komentorka i članica
3. doc. dr. sc. Olivera Galović, član
4. doc. dr. sc. Anamarija Stanković, mentorica i zamjena člana

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

**PREPARATION AND MODIFICATION OF CARBON QUANTUM DOTS FROM
CITRIC ACID: THE APPLICATION IN METAL IONS DETECTION**

Kristina Jandel

Thesis completed at: Department of Chemistry
Supervisor: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Abstract:

Carbon quantum dots (CQD) are new and efficient form of photoluminescent carbon nanomaterials. The CQDs excellent chemical and optical properties are chemical stability, low toxicity, biocompatibility, solubility and photoluminescence. The CQD are mostly used in biomedicine and in nanotechnology fields. CQD are usually in size of 10 nm, but depending on the storage time, size can vary up to 60 nm. The CQD contain of carbon core mainly of sp^2 and less of sp^3 hybridized carbon atoms. One of the many advantages of CQD is the possibility of doping with heteroatoms which can lead to the heteroatom incorporation within the structure or by adding functional groups to the surface of the particles to increase quantum yield (QY) and to enhance possible interactions of CQD with other biomaterials. Hence, CQD can be also used in sensing of different chemical species, metal ions and biomolecules. There are two different methods for CQD synthesis, „top - down“ and „bottom - up“ approaches. The main advantages of „bottom - up“ approach are applying optimal chemical operating conditions and selection of chemical precursors. In this paper, CQD from citric acid and amino acids as N – dopant; Leu, Trp, Arg, Ala i His, have been synthesized. Compared to pure CQD (blank), N – doped CQD have shown higher QY. A sample CQD@Leu has shown a selective response to Fe^{3+} ions when tested changes in photoluminescence intensity. Results have shown potential application of N – doped CQD in metal ion sensing, biomedicine, analytical chemistry and environment.

Thesis includes: 59 pages, 20 figures, 7 tables, 4 equations, 25 references.

Original in: Croatian

Key words: Carbon quantum dots, synthesis of carbon quantum dots, aminoacids, citric acid, nanosensors, metal ion detection.

Thesis accepted: 22.9.2022.

1. assoc. prof. Martina Medvidović- Kosanović, president
2. prof. Stela Jokić, comentor and member
3. assist. prof. Olivera Galović, member
4. assist. prof. Anamarija Stanković, mentor and alternate member

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

SADRŽAJ

1. LITERATURNI PREGLED	3
1.1. UGLJIKOVE KVANTNE TOČKE.....	3
1.2. SINTEZA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA	6
1.2.1. “TOP DOWN” METODE.....	7
1.2.2. “BOTTOM - UP” METODE	8
1.3. KEMIJSKA I STRUKTURNA SVOJSTVA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA	12
1.4. OPTIČKA SVOJSTVA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA.....	15
1.4.1. JABLONSKI DIJAGRAM.....	18
1.5. METODE ANALIZE UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA	22
1.6. AMINOKISELINE.....	25
1.7. LIMUNSKA KISELINA.....	28
1.7.1. KREBSOV CIKLUS	30
1.8. UTJECAJ TEŠKIH METALA NA BIOSFERU	31
1.8.1. ŽELJEZO	32
1.9. SENZORI ZA DETEKCIJU METALA	33
2. MATERIJALI I METODE.....	35
2.1. KEMIJSKE I MATERIJALI.....	35
2.2. INSTRUMENTACIJA I TEHNIKE ANALIZE	36
2.3. POSTUPAK SINTEZE UZORKA	36
2.4. POSTUPAK PROČIŠĆAVANJA UZORAKA.....	37
2.5. ODREĐIVANJE KVANTNOG ISKORIŠTENJA	38
2.6. SELEKTIVNA DETEKCIJA Fe ³⁺ IONA.....	39
3. REZULTATI I RASPRAVA	40
3.1. KVANTNO ISKORIŠTENJE	41
3.2. DETEKCIJA METALNIH IONA	43
3.3. STRUKTURNA ANALIZA SINTETIZIRANIH CQD	46
3.4. OPTIČKA KARAKTERIZACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA	53
3.4.1. UTJECAJ OTAPALA I DISPERZIVNOSTI NA INTENZITET FOTOLUMINISCENCIJE	55
3.4.2. OVISNOST INTENZITETA FOTOLUMINISCENCIJE O pH VRIJEDNOSTI	56
3.4.3. ISPITIVANJE DISPERZIVNOSTI U VODENOM MEDIJU	57
4. ZAKLJUČAK.....	59



Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla “(UIP-2017-05-9909).

UVOD

U zadnjih nekoliko desetljeća, nanomaterijali su pobudili posebnu zainteresiranost znanosti zbog posjedovanja raznolikih svojstva koja se proizvoljno mogu dobiti različitim sintetskim pristupima, prethodnim i/ili naknadnim modifikacijama materijala. Zanimljivo je da se nanomaterijali mogu koristiti u raznolikije svrhe gdje fizikalna i kemijska svojstva makromaterijala ne mogu zadovoljiti kriterije. S obzirom na veličinu i oblik, nekoliko je podjela i kategorizacija samih nanomaterijala. Postoje anorganski, organski nanomaterijali i razni nanokompozitni materijali, a s obzirom na dimenzije u kojima se njihove veličine prostiru, postoje nul – dimenzionalni (0D), jednodimenzionalni (1D), dvodimenzionalni (2D) i trodimenzionalni (3D) nanomaterijali.

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija CQD – nul-dimenzionalnih nanomaterijala koji svojim svojstvima i načinima sinteze nadmašuju sva očekivanja.

Nul – dimenzionalni nanomaterijali skupina su nanomaterijala, najčešće na bazi ugljika ili njegovih alotropskih modifikacija – grafena i fulerena. To su točkasti materijali čiji je promjer manji od 10 nm te posjeduju najviše sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma (i nešto manje sp^2 hibridiziranih C atoma).

CQD odlikuju se vrlo niskom toksičnošću i niskom cijenom radi čega su izuzetno povoljne za sintezu, obradu i analize te u konačnici i za široku upotrebu.

Prednosti CQD su već spomenuta niska toksičnost, niska cijena te njihova multifunkcionalna površina koja se lako može prilagođavati različitim dopiranjem ili pasivizacijama, ovisno o željenoj namjeni sintetiziranih CQD [1]. Osim toga, njihove sinteze su sigurne i okolišno prihvatljive te odgovaraju principima zelene kemije koja je danas itekako bitna za sigurnost i zdravlje živih bića te za očuvanje okoliša. Najčešće metode sinteze CQD spadaju u skupinu „*bottom up*“ pristupa o kojem će se detaljnije govoriti u ovom radu.

Zanimljivo je da se CQD masovno proizvode radi već spomenute multifunkcionalne površine zbog koje se one mogu upotrebljavati u svrhe gdje makromaterijali nemaju baš neki značaj te se koriste u medicini za isporuke lijekova, za detekciju, *bioimaging*, u detekciji pojedinih kemijskih specija i optoelektronici. Najbitnije, usporedno s višedimenzionalnim nanomaterijalima, CQD

imaju više kvantno iskorištenje (eng. *quantum yield*, QY) zbog čega je moguća lakša manipulacija te je za istu potrebna manja količina utrošene energije). QY je bitan u primjeni kako bi se povećala osjetljivost CQD u analitičkim metodama ili kako bi bile fotostabilnije za *bioimaging*.

Uporaba senzora u medicini i u različitim industrijama je danas posebno izražena, posebice zbog specifičnosti analita kojeg je potrebno ili pratiti ili detektirati. Tu do izražaja dolaze CQD koje posjeduju svojstva posebno razvijena, definirana i modificirana za određeni analit kako bi senzor za detekciju bio siguran, netoksičan, točan i precizan.

Također, kao prekursor sinteze CQD najčešće se koristi limunska kiselina i naravno aminokiseline kao netoksičan izvor ugljika i dušika. Do sada još nije napravljen *screening* koji bi pokazao usporedbe svih aminokiselina i svojstava sintetiziranih CQD u vodenoj suspenziji. Iz tog razloga su se za pisanje ovog rada u sintezama koristile aminokiseline kako bi se pokazala svojstva pojedinih CQD bazirana na različitim svojstvima aminokiselina. Isto tako, limunska kiselina je kao izvor dušika također bila zanimljiv prekursor jer je netoksična, široko dostupna u svakodnevnoj upotrebi (koristi se i za jelo i u kućanstvu i za čišćenje,...) te je jeftina i lako dostupna. Cilj rada je bio sintetskim metodama koje pripadaju svim načelima zelene kemije dobiti CQD sa što boljim svojstvima koja će onda biti zaslužna za detekciju pojedinih metalnih iona.

1. LITERATURNI PREGLED

1. 1. UGLJIKOVE KVANTNE TOČKE

Ugljikove kvantne točke, CQD su fotoluminiscentni nanomaterijali koji pripadaju skupini relativno novih i inovativnih ugljikovih nanomaterijala. Njihova svojstva ponajprije ovise o veličini čestica, strukturi i morfološkim karakteristikama, ali najviše se ističu kvantno iskorištenje (eng. *quantum yield*, QY), topljivost u različitim medijima i sposobnost fotoluminiscencije. Optička svojstva su također vrlo bitna te se tu ističe fotoluminiscencija koja je zaslužna za široku primjenu CQD. Ta svojstva također ovise o kemijskim i strukturnim karakteristikama gdje su u prvom planu prisutnost funkcionalnih skupina na površini i defekata u strukturi.

CQD su izrazito biokompatibilne, topljive u različitim medijima ovisno o odabranom sintetskom pristupu te je njihovu multifunkcionalnu površinu moguće lako modificirati i prilagoditi točno određenoj svrsi i vrsti upotrebe. Područja potencijalne primjene su svakako u detekciji pojedinih kemijskih specija, u biomedicini, farmaciji i općenito u širokom spektru nanotehnologije.

Kada se spominje modifikacija površine CQD, postupak modifikacije se najčešće provodi dopiranjem što uključuje ugradnju nekog heteroatoma u samu strukturu CQD ili se provode varijacije u veličini sintetiziranih čestica CQD čime dolazi do promjene fotoluminiscentnih karakteristika. Osim toga, mogu se i na samu površinu dovoditi funkcionalne skupine. Svojstvo modifikacije površine je izuzetno bitno svojstvo jer iz funkcionalizacije površine dobivaju se različita fotoluminiscencijska svojstva.

Već spomenuto, svi nanomaterijali na bazi ugljika potakli su veliki interes radi svojstava poput toplinske stabilnosti, mehaničke čvrstoće, biokompatibilnosti, netoksičnosti i sve to otvara vrata prema različitim poljima istraživanja. CQD klasificiraju se kao nul – dimenzionalni nanomaterijali s prosječnom veličinom manjom od 10 nm, te kao takve posjeduju izvrsna svojstva biokompatibilnosti, fotostabilnosti i relativno jaka fotoluminiscencijska svojstva te mogućnosti funkcionalizacije površine koja dodatno poboljšava svojstva fotoluminiscencije. Javed i sur. govore o CQD čija veličina čestica premašuje veličinu od 50 nm. U svom radu pratili su ovisnost veličina sintetiziranih CQD o vremenu stajanja. Njihove TEM snimke pokazale su kako je početna veličina čestica bila 23 nm, a nakon 13 mjeseci stajanja porasla je na 63 nm. Ono što su opazili

jest kako je rast čestica brži u početnim tjednima, a kasnije sporiji. Ono što su naglasili jest kako te čestice nisu bile pročišćene nakon sinteze te kako je to moguća pojava radi pojave nusprodukata. Zaključili su da se nusprodukti vežu na površinu CQD i da je to razlog za povećanje veličine samih čestica CQD [2].

CQD opisuju se kao monodisperzne sferne nanočestice koje se sastoje od karbonske jezgre s brojnim funkcionalnim skupinama (karboksilnim, hidroksilnim, amino skupinama, ...) na njihovoj površini.

Prisutnost kisika i funkcionalnih skupina poput hidroksilne, karboksilne i amino skupine na površini ugljika daju CQD visoki stupanj topljivosti u vodi i time omogućuju širi spektar primjene u analitičke, biomedicinske i fotoelektroničke (eng. *photoelectronic*) svrhe. Isto tako, priprema, primjerice uključivanje različitih prekursora ugljika i heteroatoma igraju ključnu ulogu u dobivanju fotoluminiscentnih CQD s visokim QY gdje je prisutan veliki potencijal za primjenu CQD kao fotoluminiscentnih sonda ili biomarkera.

Općenito, svojstva svake pojedinačne CQD snažno ovise o tehnikama sinteze te o odabiru prekursora ugljika, pasivizaciji i funkcionalizaciji površine, dopiranjima heteroatomom te temperaturi i vremenu sinteze. Svi ti čimbenici direktno utječu na učinkovitost pripreme CQD te na njihovu primjenjivost u znanstvenim i istraživačkim područjima (elektronika, okoliš, biomedicina). Na primjenjivost pripremljenih CQD utječu biokompatibilnost, topljivost u različitim medijima, QY i valne duljine emisije: plavi i crveni pomaci apsorpcijskog spektra.

Iz svega navedenog jasno je da CQD posjeduju mnogo prednosti u odnosu na druge nanomaterijale [3].

- ◆ Pristupačni cijenom što je vrlo bitno za ekonomiju i dalji razvoj istraživanja.
- ◆ Fotostabilnost: stabilnost i kompozicija CQD vode do veće fotostabilnosti u odnosu na neke organske boje i druge nanomaterijale.
- ◆ Šira ekscitacija i uža emisija: imaju oštrije definiran vrh emisije i širi spektar ekscitacije od organskih boja i nanomaterijala na bazi drugih materijala (primjerice kadmija).
- ◆ Biološka svojstva: hidrofilnost, niska toksičnost, kemijska stabilnost, dobra biokompatibilnost; omogućavaju primjenu u biosenzorima, isporuci lijekova i *bioimagingu*.

- ◆ Fotoluminiscencija: puno veća u odnosu na druge nanomaterijale.
- ◆ Stabilne u vodi: usporedno s nanomaterijalima na bazi kadmija i organskih boja, stabilnost CQD u vodi je vrlo visoka.
- ◆ Elektronska svojstva: jako su dobri elektron donori i elektron akceptori radi elektrokemijske fotoluminiscencije i kemiluminiscencije radi čega se mogu koristiti u katalizi i senzorima.
- ◆ Kemijski inertni: usporedno s drugim nanomaterijalima na bazi metala, CQD posjeduju izrazito dobru kemijsku stabilnost.

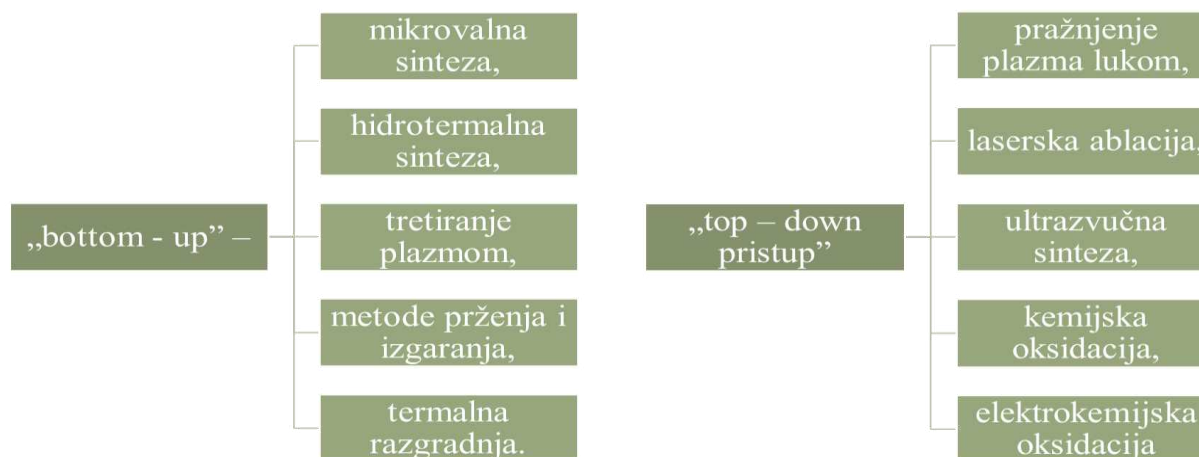
1.2. SINTEZA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA

CQD počele su se proučavati još 2004. godine kada su znanstvenici Xu i sur. uočili pojavu fotoluminiscencije za vrijeme pročišćavanja jednostjenčanih ugljikovih nanocjevčica (eng. *Single walled carbon nanotubes*, SNCNT) postupkom elektrofize. Nastali međuprodukt sinteze SNCNT imao je fotoluminiscencijska svojstva (tada još nisu bile poznate CQD) [4].

Xu i sur. su daljnjim istraživanjem objavili rad u kojem su opisali metodu elektroforeze kojom su pročišćavali SNCWT dobivene sintezom pražnjenja plazma luka (eng. *Arc discharge method*). Nakon toga, koristeći i dalje metodu pražnjenja luka, uspješno su sintetizirali CQD. Dobili su tri tipa CQD i svaka od njih se razlikovala u pogledu mase i fluorescencije. Valna duljina fluorescencije je bila 365 nm te su fluorescirale žuto, narančasto i plavo. Njihova svojstva su bila dobra topljivost u vodi i različita raspodjela u veličinama samih čestica [4].

Dvije godine kasnije Sun i sur. uspješno su laserskom ablacijom sintetizirali luminiscentne čestice. Zanimljivo je bilo da su te čestice posjedovale karakteristiku varijacije valne duljine emisije i iz tog razloga široki spektar primjene. Opisali su CQD kao izrazito jake fluorescentne materijale u čvrstom stanju i u otopinama nakon pasivizacije. Sintetizirali su CQD tako da su koristili ugljikove mete u vodenom mediju (vodena para) te argon kao plinski nosač [5].

Unazad deset godina, istraživanja vezana uz samu sintezu, njenu optimizaciju u svrhe dobivanja CQD sa što boljim svojstvima (QY, topljivosti, veličine i modifikacijske površine) su se intenzivirala (prednosti i nedostaci svake metode vidljivi su u tablici 1). Ono što je u posljednjih nekoliko godina doživjelo procvat jest zelena kemija i svi principi koji joj odgovaraju. Princip zelene kemije podrazumijeva, već spomenuto, sintezu koja daje najveći prinos uz najmanje otpada, zagađenja i štetnosti. U tom razdoblju, predlagalo se više metoda sinteza CQD, ali one se sve mogu podijeliti u dva glavna pristupa; “*bottom – up*” pristup i “*top – down*” pristup (slika 1). Štoviše, prekursori ugljika, poput mljevene kave, iskorišteni listići čaja, trave i lagani sedimenti, također se mogu koristiti za sintezu CQD. To je dobro jer je sam postupak iz takvih izvora ekonomičan.



Slika 1: Shema prikazuje moguće postupke sinteze CQD podijeljene u dva pristupa: “*top - down*” i “*bottom - up*” koje mogu različitim kemijskim, fizikalnim ili elektrokemijskim postupcima pogodovati sintezi CQD s točno određenim svojstvima veličine i karakteristika.

1.2.1. “TOP DOWN” METODE

“*Top - down*” pristup uključuje fizikalne i kemijske postupke u kojima se veći ugljikovi materijali reduciraju s makro na nano skalu, tu se ubrajaju laserska ablacija, postupci oksidacije (kemijska i elektrokemijska oksidacija) te ultrazvučno tretiranje i pražnjenje plazma lukom (slika 1).

Svaka sinteza, odnosno postupak koji spada u “*top-down*” pristup svodi se na to da se od većih materijala dobivaju manji, sve dok se ne dođe do veličine 10^{-9} m, odnosno nanometra. Primjer jedne od sinteza pristupa “*top - down*” jest laserska ablacija koja je vrlo interesantna po tome što ima veliku prednosti kontrole nad sintezom te je moguće utjecati na morfologiju produkta.

Prva sinteza CQD zabilježena je laserskom ablacijom od strane Sun i sur. (2006.). Uvjeti koje su koristili bili su 900°C i tlak od 75 kPa uz prisutnost vodene pare u struji argona te su naknadno modificirali površinu oksidacijom dušičnom kiselinom (HNO_3) i organskim polimerima (polietilenglikolom i PPEI_EI). Tako su dobivene stabilne luminiscentne čestice [5].

Laserska ablacija je termalni ili netermalni postupak uklanjanja atoma iz mete zračenjem intenzivnim snopom zraka koji može biti kontinuirani ili pulsni [6]. Sinteza se može vršiti u različitim medijima (tekućina, plin) i na različitim metama (tekućina, krutina). Postupak je takav da fotoni laserskog snopa reagiraju s elektronima i fotonima mete te energetski pobuđeni elektroni zatim reagiraju s drugim elektronima i fotonima pri čemu dolazi do velikog broja sudara. Ti sudari su procesi koji rezultiraju rastom temperature i tlaka u dubljim slojevima mete te dolazi do difuzije. Efekt je izraženiji ako je laserski snop intenzivnije energije i duljeg trajanja. Prednost laserske ablacije kao postupka sinteze je dobra kontrola morfologije i veličine čestica, ali glavni problem i nedostatak ove metode je njena cijena i neekonomičnost te velika složenost postupka [6].

Još jedna od metoda sinteze koja se karakterizira “*top-down*” pristupom je kemijska oksidacija. Karakterizirana je, kako joj i sam naziv kaže procesom oksidacije u kojem se koriste vrlo jaki oksidansi, poput jakih kiselina; dušične kiseline (HNO_3), sumporne kiseline (H_2SO_4) ili vodikovog peroksida (H_2O_2). Lu i sur. koristili su šipke od grafita visoke čistoće. Pirolitički grafit u dubini je bio smješten kao anoda s pregradom od 2 cm te se koristila platinska žica kao protuelektroda. Nakon toga ugrađivali su se u otopinu ionske tekućine/vode. Eksfolijacija ugljične tvari pokrenuta je radi primjene statičkih potencijala u samom procesu. Produkt se ispirao etanolom i vodom sve dok njegov pH nije bio neutralan. Nakon pročišćavanja centrifugom i filtracijom, dobivene CQD bile su veličine 6-8 nm, s QY od 2,8 – 5,2% [3].

Metoda pražnjenja luka pogodna je za sintezu CQD iz čađe, odnosno sirovog sedimenta ugljikovih nanocijevi. Postupak kojeg su proveli Singh i sur. bio je takav da su sirovi sediment čađe oksidirali sa 3,3 M dušičnom kiselinom da se uvedu dušične skupine. Nastala tvar je zatim ekstrahirana bazičnom otopinom natrijeve lužine s pH vrijednosti od 8,4 te je dobivena suspenzija bila tamne boje. Pročišćavanje je provedeno postupkom elektroforeze na gelu. Veličina CQD iznosila je oko 18 nm. Ono što su zaključili jest da je metoda imala nisku iskoristivost te se sama metoda sastoji od niza kompozitnih segmenata, a to otežava pročišćavanje [3].

1.2.2. “*BOTTOM - UP*” METODE

“*Bottom - up*” pristup uključuje različite šablonske strategije, toplinske i pirolitičke procese, hidrotermalne i vodene metode sinteza, strategije potpomognute mikrovalovima u svrhu polimerizacije molekula prekursora [3]. Velika je prednost “*bottom - up*” pristupa mogućnost

modifikacije površine dobivenih čestica tijekom same sinteze ili dodatnim dopiranjem. QY može se povećati ovisno o kasnijem dopiranjju CQD.

Ono bitno, “*bottom – up*” pristup je bolji izbor za sintezu CQD jer on omogućuje širi izbor prekursora i otapala te radnih uvjeta. Isto tako, moguća je bolja kontrola nad uvjetima kojima se reakcijska smjesa podvrgava. Bolji i širi izbor prekursora ugljika utječe kasnije i na samu primjenu jer veći broj prekursora otvara mogućnosti za više vrsta i načina dopiranja. Dopiranjem različitim heteroatomima i funkcionalizacijom površine mogu se poboljšati fizikalna i kemijska svojstva koja poboljšavaju i QY. Dopiranje povoljno utječe na optička svojstva, na reaktivnost površine koja zatim utječe na selektivni odziv za detekciju metalnih iona te antiradikalnu aktivnost [6].

Termalna razgradnja je postupak koji uključuje toplinu. Sing i sur. su za pripremu CQD koristili sediment svijeće [3]. Sediment su tretirali oksidansom dušičnom kiselinom i $H_2O_2/AcOH$ te je postupak rezultirao nastankom CQD. Kako bi se dobivene CQD izolirale, provedena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu. Dobivene CQD posjedovale su emisiju fotoluminiscencije pri kraćim valnim duljinama emisije. QY iznosio je oko 0,8 – 1,9%. Dijalizom su se CQD dodatno pročistile te je kao rezultat dobiveno svojstvo fotoluminiscencije istih [3].

Guan i sur. istraživali su metodu mikrovalne sinteze za dobivanje fotoluminiscentnih CQD s molekulama folne kiseline ($C_{19}H_{19}N_7O_6$) kao izvorom dušika i ugljika [3]. Reakcijska smjesa dobivena je otapanjem 15 mg folne kiseline u 3 ml dietilen glikola i smjesa je stavljena u kućnu mikrovalnu pećnicu od 750 W te zagrijavana 40 s. Dobivena suspenzija bila je crveno smeđe boje, a dijaliza je provedena 3 dana. Fotoluminiscentne CQD bile su veličine oko 4,51 nm, a QY 18,9%. Maksimum emisije bio je valne duljine od 320 nm do 420 nm. U usporedbi s drugim pristupima, metoda potpomognuta mikrovalovima je praktičnija i brzo zagrijava prekursore ugljika. Pojednostavljuje proces sinteze tako da se CQD lako dobivaju unutar nekoliko minuta s poboljšanim QY [3].

Hidrotermalna sinteza obično podrazumijeva heterogene reakcije koje se odvijaju u vodenom mediju. Primjeri nekih takvih reakcija su nastanak kristala u prirodi prema čemu su geolozi i mineralozi opisali uvjete potrebne za nastanak minerala [7].

Singh i sur. su za razvoj CQD koristili zrna kave koja su bila izložena hidrotermalnoj obradi. Prije mljevenja u fini prah, zrna kave su se sušila u pećnici. Kasnije su autoklavirana i kalcinirana pri

300 °C u struji zraka u periodu od 2 sata te su fotoluminiscentne CQD pripremljene u 4 uzastopne faze: dehidracija, polimerizacija, karbonizacija i pasivizacija [3].

Princip hidrotermalne sinteze korišten je i u ovom radu za sintezu CQD iz limunske kiseline i aminokiselina. Uzorci se izvažu, pripremi se reakcijska otopina koja se stavi u autoklav i pri određenim vrijednostima temperature se odvijala reakcija.

Tablica 1: Prednosti i nedostaci metoda sinteze CQD; usporedba [3].

	METODA	PREDNOSTI	NEDOSTATCI
1.	Pražnjenje luka	najpristupačnija metoda	teški uvjeti, niski QY i niska kompozitna metoda
2	Laserska ablacija	laka i jednostavna metoda kojom se mogu dobiti kvantne točke različitih veličina	potrebna je velika količina ugljikovih prekursora, slaba kontrola nad veličinom i niski QY
3	Elektrokemijske metode	moguće upravljati opsegom CQD promjenom gustoće struje i moguće je sintetizirati CQD topljive u vodi.	kompleksna metoda
4	Termalna razgradnja	jednostavna i jasna metoda, fotoluminiscentna svojstva CQD	niski QY
5	Mikrovalna metoda	jednostavna i prikladna metoda, jeftina i okolišno prihvatljiva	slaba kontrola nad veličinom
6	Hidrotermalna metoda	mogu se sintetizirati visoko disperzibilne u vodi CQD, jeftina i nisko toksična metoda.	slaba kontrola nad veličinom

1.3. KEMIJSKA I STRUKTURNA SVOJSTVA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA

Svojstva konačnog produkta ovise o različitim čimbenicima. Među čimbenicima koji najviše utječu na svojstva CQD su veličina čestica, struktura i morfologija te različite funkcionalne skupine prisutne na njihovoj površini kao i heteroatomi. Najvažniji parametri koji određuju primjenjivost i učinkovitost materijala su QY, određivanje pomaka valne duljine emisije prema crvenom ili prema plavom (eng. *blue/red shift*) dijelu spektra, biokompatibilnost i topljivost u pojedinim medijima [6].

Priroda CQD je najčešće amorfna što znači da posjeduju izrazito niski stupanj kristaliničnosti i sadrže mnogo defekata na svojoj površini. Gledajući njihovu strukturnu građu, sastoje se od ugljikove jezgre na koju su vezane funkcionalne skupine. Taj ugljikov atom koji čini jezgru CQD sp^2 je hibridiziran, a funkcionalne skupine najčešće sadrže kisik. Qu i sur. navode kao CQD posjeduju amorfnu građu, s puno defekata na svojoj površini te da posjeduju niski stupanj kristaliničnosti. Neka druga istraživanja navode kako CQD posjeduju sp^2 hibridizirani ugljik kristalinične prirode [6].

S kemijskog i strukturnog stajališta, CQD se sastoje od ugljične jezgre koja na svojoj površini ima funkcionalne skupine, već spomenuto hidroksilne, karboksilne, amino skupine, te karbonilne i amidne ostatke. Strukturne karakteristike CQD mogu biti različite, ali najčešće posjeduju izuzetno niski stupanj kristaliničnosti s neuređenim domenama. On se pojavljuje radi prisutnosti varijabilnog omjera sp^2/sp^3 hibridiziranih ugljika. Taj se fenomen može otkriti i promatrati u uzorcima pomoću XRD analize. Edison i sur. [8] pripremili su N – dopirane CQD mikrovalnom sintezom iz smjese askorbinske kiseline i β – alanina te su analizirane pomoću FTIR, XRD i Ramanove spektroskopije.

FTIR analiza je korisna za dobivanje uvida u osnovnu građu dobivenog produkta bazirano na funkcionalnim skupinama. XRD je pokazao dva pika otprilike na $2\theta = 23,7^\circ$ i $2\theta = 42^\circ$ što je ukazivalo na heksagonalnu grafitnu strukturu. Prema Braggovoj jednadžbi izračunato je da $d = 0,37$ nm i $d = 0,21$ nm. Širi vrhovi pikova ukazuju na manju veličinu CQD. Osim toga, Ramanov spektar dao je rezultate od 1365 cm^{-1} i 1595 cm^{-1} i to je dokaz za sp^2 hibridizirani ugljik te nekoliko

defekata sp^3 hibridiziranog ugljika. D spektar pokazuje prisutne defekte u grafitnoj rešetci i moguće poremećaje u strukturi (sp^3), dok G prikazuje sp^2 hibridizirani ugljik [8].

Primjer amorfne strukture dali su Jing i sur. koji su sintetizirali CQD iz karbonizirane glukoze zajedno s preostalim ugljikohidratom, a XRD je pokazao dvije široke vrpce na $2\theta = 22^\circ$ što se pripisuje amorfnoj prirodi čestica te $2\theta = 44^\circ$ što ukazuje na prisutnost grafitnog ugljika. FTIR analiza je pokazala prisutnost hidroksilnih i karboksilnih skupina zajedno s kisikom što je potvrđeno odgovarajućim vrpcama [8].

Kada znanstvenici opisuju CQD, obično ih opisuju kao nanočestice s promjerom od 10 nm što je navedeno u različitim literaturnim izvorima gdje se spominje transmisijska elektronska mikroskopija (TEM). Ali, već navedeno, postoje dokazi kako dužim stajanjem CQD mogu biti veće od 50 nm. Karakteristika zajednička svim CQD jest monodisperznost i uska distribucija veličine sa sfernim ili kvazisfernim morfološkim karakteristikama. Monodisperznost se procjenjuje dinamičkim raspršenjem svjetlosti i TEM tehnologijom, dok se fina struktura i morfologija ispituju pomoću TEM – a visoke rezolucije [8].

Osim amorfnih CQD, vrlo rijetko mogu biti i kristalinične. Bandi i sur. [8] sintetizirali su N – CQD koristeći otpad luka kao izvor dušika i ugljika te su dobivene CQD bile dobro raspršene s prosječnom veličinom promjera od 15 nm i to je bilo potvrđeno TEM analizom. Međutim, koristili su i HRTEM (eng. *high resolution transmission electron spectroscopy*) te se pokazalo da su dobivene čestice kristalinične prirode s parametrom rešetke od 0,21 nm uz nagađanja da se to pripisuje sp^2 hibridiziranom ugljiku.

Huang i sur. [8] sintetizirali su N – CQD koristeći limunsku kiselinu (koristila se i u ovom diplomskom radu kao prekursor) i ureu u DMF – u (dimetilformamid) solvotermalnom sintezom 6 sati pri temperaturi od 160 °C. Analizom je pokazano kako vrijeme fotoluminiscencije otopine dobivenih N – CQD varira ovisno o pH vrijednosti (pH = 2,6 – 8,6) u smislu da se povećava linearno kako se povećava vrijednost pH. Zaključeno je kako su se različite funkcionalne skupine pričvršćene na površinu CQD mijenjale ovisno o pH vrijednosti okruženja i to je dovelo do promjena vrijednosti trajanja fotoluminiscencije. Ta studija je pokazala potencijalnu primjenu pH – osjetljivih N – CQD u intrastaničnom pH senzoru u kompleksnim biološkim sustavima. Osim toga, pokazali su kako korištenjem jakih i koncentriranih kiselina se mogu stvoriti korisni

površinski defekti i funkcionalni dijelovi s kisikom (hidroksil, karbonil, karboksil) koji izravno utječu na reaktivnost i topljivost pripremljenih čestica u vodi [9].

Zeta potencijal je naboj na površini koji govori o uspješnosti modifikacije čestica. To je značajna tehnika za karakterizaciju nanokristala kako bi se procijenio površinski naboj koji je bitan za razumijevanje stabilnosti nanosuspenzija. Tako negativne vrijednosti zeta potencijala nanokristala ukazuju na dobru fizikalnu stabilnost nanosuspenzija zbog elektrostatskog odbijanja između pojedinih čestica na površini CQD. Vrijednosti zeta potencijala koje nisu u rasponu od -30 mV do +30 mV posjeduju dovoljno jaku odbojnu silu za postizanje bolje fizikalne koloidalne stabilnosti. Ako su vrijednosti zeta potencijala manje, van der Waalsove privlačne sile koje djeluju na čestice mogu ih potaknuti na agregaciju i flokulaciju što uzrokuje nestabilnost čestica [10].

Kada nanočestica ima neto površinski naboj, on je zaštićen većom koncentracijom suprotno nabijenih iona u neposrednoj blizini površine nanočestice. Taj se ionski sloj kreće zajedno s nanočesticom i tako se formira dvostruki električni sloj (sloj površinskog naboja i sloj suprotno nabijenih iona). Razlika u potencijalu sloja tekućine koji sadrži suprotno nabijene ione i mase tekućine u kojoj je nanočestica suspendirana pridonosi zeta potencijalu. Čestice s negativnim zeta potencijalom vezat će se na pozitivno nabijene površine i obratno. Informacija o stabilnosti nanočestice dolazi od zeta potencijala. Što je veći zeta potencijal, veća je stabilnost radi povećanog elektrostatskog odbijanja [11].

Još jedna metoda karakterizacije CQD je DLS analiza (eng. *dynamic light scattering*) koja govori o raspodjeli veličine čestica u zadanom uzorku. Govori kakva je njihova raspodjela i koliki je udio čestica točno određene veličine, primjerice, koliki je volumni udio čestica veličine 10 nm.

1.4 OPTIČKA SVOJSTVA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA

Općenito, karakteristični optički apsorpcijski spektar CQD promatran u UV području se sastoji od dva pika, s maksimalnim vrhom apsorpcije na oko 260 – 270 nm što odgovara prijelazu $\pi - \pi^*$ (HOMO - LUMO) C=C veze sp^2 hibridiziranih ugljika. Apsorpcijski pikovi pri 300 – 330 nm pripadaju $n - \pi^*$ veze C=O. Produžetak vrpce preko cijele vidljive regije povezan je s funkcionalizacijom nanočestica [8].

Primarna optička svojstva koja su ključna za biosenzore i detekciju različitih kemijskih vrsta su fotostabilnost, fotoluminiscencija i QY. Kod sinteze CQD, važno je da su produkt CQD sa što višim QY i emisijom u crvenom području, odnosno pri valnim duljinama od 635 do 700 nm.

Niži QY može se smatrati kao glavni ograničavajući faktor za aplikaciju CQD u biomedicinskim analizama pošto direktno utječe na osjetljivost i rezoluciju slike. A što je manja osjetljivost senzora, lošija je i detekcija. U posljednje vrijeme je iz tog razloga uloženo puno vremena i truda u sintetiziranje CQD čiji je QY veći od 20%. Do sada je već dobro poznato da CQD bez funkcionalizacije površine i bez ikakvih modifikacija pokazuju niži QY, a pasivizacija površine i njena funkcionalizacija se koriste za poboljšanje optičkih svojstava (uglavnom intenzitet emisije fluorescencije). Pošto se CQD smatraju ugljičnim materijalima sa sp^2 i sp^3 domenama, predlaže se da se na mikro razini dodaju isto tako defekti sa sp^2 hibridizacijom čime bi se stvorio energetski procjep koji bi dao fotoluminiscenciju s istim značajkama kao i CQD [8].

Površinska pasivizacija odnosi se na tretman CQD koristeći polimere i organske molekule koje stabiliziraju površinsku energiju koja sudjeluje u emisiji fluorescencije. Osim toga, prekrivanje netaknutih CQD tankim slojem zaštitnog agensa štiti ih od adhezije nečistoća koje imaju negativan učinak na stabilnost i samim time i na optička svojstva. Isto tako uvođenje heteroatoma u CQD značajno poboljšava optička svojstva, kao i električna i kemijska. Najviše se za dopiranje koristi dušik jer ima sličnu atomsku veličinu i veću elektronegativnost usporedno s atomom ugljika te u vanjskoj ljusci ima 5 elektrona. Uz dušik, za dopiranje se koriste i fosfor i sumpor radi svojih atomskih karakteristika – imaju veći radijus i lako naprave nesavršenosti unutar ugljikove okosnice. Pasivizacija i funkcionalizacija površine mogu inducirati fluorescenciju crvenog pomaka (eng. *red shift*) ili pomak emisije prema većim valnim duljinama i to je uglavnom postignuto uvođenjem skupina koje privlače elektrone na površinu CQD – ova. Ono što je

zabilježeno jest da je emisija crvenog pomaka prikladnija za analizu jer UV zračenje može biti štetno za biološke sustave. A pomicanje ekscitacije prema većim valnim duljinama smanjuje taj rizik [8].

Već spomenute kao novija klasa nanomaterijala, CQD privlače pozornost najviše radi fotoluminiscencije. U suštini, fotoluminiscencija je najintrigantnija karakterizacija CQD. CQD posjeduju određena optička svojstva koja mogu reflektirati udare čestica različitih veličina u uzorku. Osim toga, svaka CQD ima raspoređena emisijska mjesta. Međutim, istraživanja optičkih svojstava CQD male veličine su dvojbena zato što je mehanizam fotoluminiscencije nejasan [3]. No, iako nejasan, postoje tri moguća objašnjenja mehanizma. Prvi je kvantno ograničenje zbog konjugiranih π – domena ugljikove jezgre, drugo su površinska stanja zbog prisutnosti funkcionalne skupine vezane na ugljikovu okosnicu i treće objašnjenje jest molekularno stanje koje se objašnjava fotoluminiscencijom koja potječe od slobodnih i/ili vezanih fluorescentnih molekula [8].

Zuo i sur. [12] su korištenjem površinski modificiranih kuglica silicijevog dioksida kao nosača i resola (CH_2OH) kao prekursora ugljika, sintetizirali CQD promjera 1,5 – 2,5 nm nakon čega im je pasivizirana površina s polimerom PEG1500N. QY pasiviziranih CQD bio je 14,7%. Suspenzija je pokazala jaku plavu fotoluminiscenciju kada je pobuđena na 365 nm. Te CQD imaju širok spektar emisije koji se proteže od 430 do 580 nm i pokazuju fotoluminiscentnu emisiju neovisno o valnoj duljini.

Fotostabilnost je svojstvo CQD koje je vrlo popularno za ispitivanje i istraživanje. U znanstvenom radu objavljenom od strane Javed, N. i sur. istraživala se fotostabilnost CQD izlaganjem svjetlucanju (eng. *blinking*), fotoizbjeljivanju (eng. *photobleaching*) i fotoizmjenjivanju (eng. *photoswitching*) [2].

Svjetlucanje: Tijekom stajanja, mnogi sustavi pokazuju promjene u intenzitetu luminescencije. Ta se pojava okarakterizirala kao blinkanje, odnosno svjetlucanje i ona potječe generalno od elektronskih prijelaza iz svjetlijeg stanja u tamnije nefluorescentno stanje.

Fotoizbjeljivanje je trajni gubitak svojstva luminescencijskih svojstava kada se materijal konstantno izlaže elektromagnetskim radijacijama tijekom nekog vremena. Tijekom nekoliko sati su Zhao i sur. primijetili kako plavo svjetlo luminescencije CQD ostaje isto čak i nakon

elektrokemijske oksidacije grafita u ultra čistoj vodi. Koristili su ksenonovu lampu jačine 8,3 W u vremenu od 6 sati. Zaključili su kako je intenzitet luminiscencije ostao isti.

Fotoizmjenjivanje u nekim slučajevima pokazuje gubitak emisije CQD koji nije trajan te se emisija može kompletno ili djelomično regenerirati tako da se na njih djeluje određenom valnom duljinom svjetlosti. To traje kraće od fotoizbjeljivanja. Princip je jednostavan. Materijal ima svoje emitirajuće stanje i on emitira svjetlost. Kada ono radi prijelaza elektrona izbljedi, na njega se djeluje svjetlošću određene valne duljine i ono ponovno emitira svjetlost. Chen i sur. promatrali su liposome sintetizirane iz trioleina pročišćene dijalizom. Ozračili su materijal valnom duljinom od 530 nm te je crvena svjetlost nakon 20 min gotovo potpuno nestala. Fotoluminiscencija se regenerirala kada su tijekom jedne minute pobudili materijal svjetlošću valne duljine od 405 nm [2].

UV – VIS; ultraljubičasta – vidljiva spektroskopija (eng. *ultraviolet – visible spectroscopy*) metoda je koja se koristi u analizi CQD. Obično CQD sintetizirane različitim metodama pokazuju jaku UV apsorpciju, ali se ipak vrpce razlikuju ovisno o metodi i načinu sinteze CQD. Li i sur. [13] dodali su 4 g aktivnog ugljena u 70 ml vodikovog peroksida da naprave suspenziju te su je sonicirali 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon filtracije dobivene su fotoluminiscentne CQD topive u vodi s dijametrom od 5 do 10 nm, a tipična apsorpcija aromatskog π okvira predstavljena je uobičajenim UV vidljivim vrhom apsorpcijske trake na 250 – 300 nm.

Wang i sur. [14] dodali su 0,5 g bezvodnog ekstrakta citrusa u otopinu N-(b-aminoetil)g-aminopropil metil dimetoksi silana uz snažno miješanje pri 240 °C jednu minutu. Dobivene su CQD dijametra oko 9 nm te su nakon hlađenja i pročišćavanja bile vrlo luminiscentne. QY iznosio je 47%. Tako sintetizirane CQD imale su jak UV vidljivi apsorpcijski maksimum na 360 nm.

Dong i sur. su također koristili organski prekursor ugljika – limunsku kiselinu, koja je korištena i u ovom diplomskom radu. Na 200 °C su sintetizirali fotoluminiscentne CQD iz limunske kiseline. Dobivene CQD bile su nanolistovi debljine od oko pola nanometra do 2 nm i širine oko 15 nm pokazujući UV apsorpciju na 362 nm u apsorpcijskom rasponu. Prema veličina pika bilo je vidljivo kako su dobivene CQD dosljedne u veličini (uski vrh pika). Maksimalna valna duljina emisije ostala je nepromijenjena u točki kada se aktivirala na različitim valnim duljinama pobude [17].

1.4.1. JABLONSKI DIJAGRAM

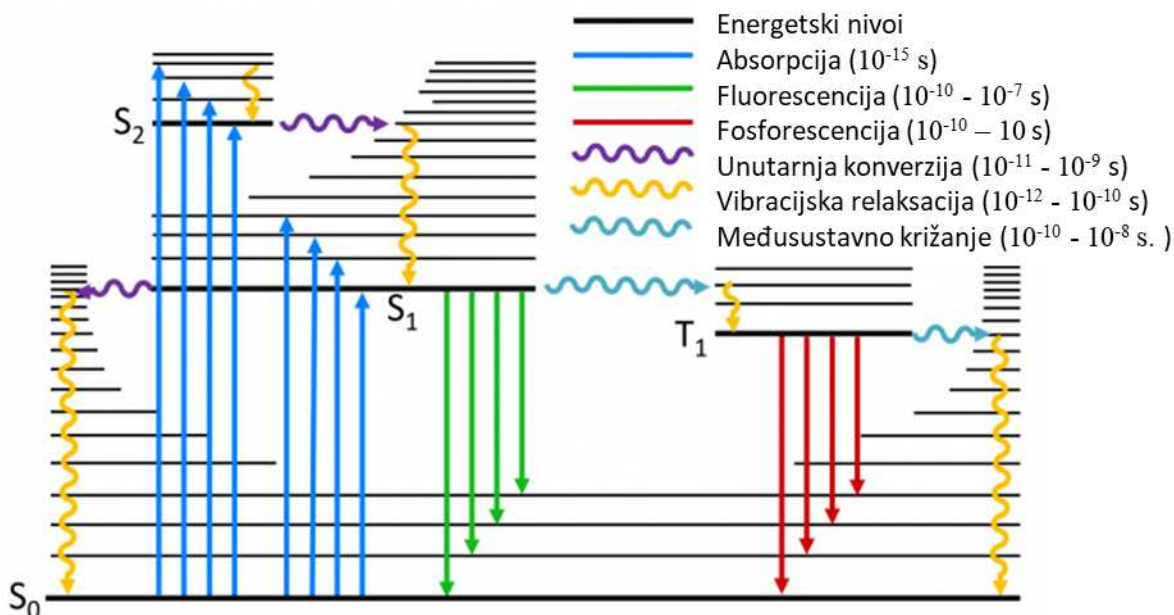
Jablonski dijagram je moćan alat koji omogućuje lakšu spoznaju pojma fluorescencije i srodnog pojma fosforescencije [12]. On prikazuje elektronska stanja molekule i njihove prijelaze. Naširoko se koristi u fluorescentnoj spektroskopiji kako bi se ilustrirala pobuđena stanja molekula te radijacijski i neradijacijski prijelazi koji se mogu pojaviti između tih molekula.

Sama povijest Jablonskog dijagrama potječe iz doba poljskog fizičara Aleksandra Jablonskog (1898. – 1980.) čije ime nosi i sam dijagram zahvaljujući njegovim znanstvenim uspjesima. U svom najpoznatijem radu „Utjecaj promjene valne duljine ekscitacije svjetlosti na fluorescencijski spektar“ eksperimentalno je pokazao da je fluorescencijski spektar ovisan o valnim duljinama ekscitirane svjetlosti. Neki od njegovih najznačajnijih radova pokazuju razumijevanje teorije fluorescentne polarizacije u otopinama: koncept polarizacijskog „*quenchinga*“ te razvoj poznatog dijagrama koji objašnjava spektar i kinetiku svjetlosti, odgođenu (eng. *delayed fluorescence*) fluorescenciju i fosforescenciju [14, 15].

Točniji naziv samog dijagrama je Perrin – Jablonski dijagram uzimajući u obzir podvige francuskog fizičara i dobitnika Nobelove nagrade za znanost radi predstavljanja samog koncepta rezonancijske energije koja se prenosi između molekula te razvoja teorije za objašnjenje termalno aktivirane zakašnjele (ili odgođene) fluorescencije – Jean Baptiste Perrin.

Njegov sin, Francis Perrin, nadopunio je samu teoriju fluorescencije razvojem modela aktivne sfere „*quenchinga*“ čime je ustabilio vezu između fluorescentnog QY i vremena poluraspada (eng. *lifetime decay*) te teoriju fluorescentne polarizacije.

Jean Perrin je bio prva osoba koja je predstavila apsorpciju i emisiju svjetlosti koristeći se dijagramom razina molekularnih energija. Na taj je način objasnio koncept termalno aktivirane zakašnjele fluorescencije predstavljanjem metastabilnog stanja. Ključni je koncept razvoja Jablonski dijagrama dopuštanje radijacijske promjene iz metastabilnog stanja u početno stanje što rezultira sekundarnom emisijom putanje koja se javlja pri većim valnim duljinama (fosforescencija). Konačno, pokazano je kako je to metastabilno stanje zapravo tripletno stanje.



Slika 2: Primjer Jablonski dijagrama koji pokazuje moguće radijacijske i neradijacijske prijelaze [12].

Jablonski dijagram pokazuje moguće prijelaze kada molekula bude fotoekscitirana. Na slici 2, horizontalne crne linije pokazuju energijske razine molekule gdje energija raste uzduž vertikalne apscise dijagrama. Deblje linije prikazuju najnižu vibracijsku razinu svakog elektronskog stanja, a najtanje linije prikazuju najviše vibracijske razine. Te razine se približavaju kako se energija povećava i s vremenom one prelaze u kontinuum.

Singletna stanja (ukupni spinski kutni moment je nula) prikazana su slovom S, a tripletna stanja (ukupni spinski kutni moment jedan) slovom T.

S_0 je singletno početno stanje molekule, S_1 jest prvo pobuđeno singletno stanje, S_n je n-to pobuđeno singletno stanje.

T_1 je prvo pobuđeno tripletno stanje, T_n je n-to pobuđeno tripletno stanje.

Obojene strelice prikazuju različite prijelaze do kojih može doći transferom energije između molekularnih stanja te ti prijelazi mogu biti radijacijski i neradijacijski.

Radijacijski prijelazi su prijelazi između dva molekulska stanja gdje su energijske razlike emitirane ili absorbirane od strane fotona te se u Jablonski dijagramu prikazuju ravnim strelicama.

Neradijacijski prijelazi su prijelazi između dva molekulska stanja bez apsorpcije ili emisije fotona te su u Jablonski dijagramu prikazani uvijenim strelicama.

Apsorpcija je radijacijski prijelaz iz nižeg u više energetska stanje gdje se energija fotona konvertira u unutarnju energiju molekule što je prikazano plavim strelicama na slici 2. To je najbrži prijelaz u Jablonski dijagramu i do njega dolazi na vremenskoj skali u 10^{-15} s. Apsorpcija fotona na dijagramu ide od S_0 do vibracijskih razina singletnih pobuđenih stanja ($S_1, S_2..$). Direktna ekscitacija do tripletnih pobuđenih stanja nije moguća radi očuvanja kutnog momenta.

Vibracijska relaksacija je neradijacijski prijelaz u niže vibracijske razine unutar istog elektronskog stanja. Kada se apsorpcijom molekula prevede u pobuđeno stanje, to je stanje neravnotežno i s vremenom će ta molekula trošiti stečenu energiju i vraćati se u početno stanje. Prvi način gubitka energije je kroz vibracijsku relaksaciju (žute strelice na slici 2) intramolekularno ili intermolekularno sve dok ne postigne najniže vibracijsko stanje.

Idući pojam koji treba objasniti jest unutarnja konverzija. Do nje dolazi neradijacijskim prijelazom između dva radijacijska stanja istog spina. Molekula u višem singletnom elektronskom stanju također može podleći unutrašnjoj konverziji u niže stanje koje je prikazano ljubičastim strelicama na slici 2. Ta je unutarnja konverzija odmah popraćena vibracijskom relaksacijom do najniže vibracijske razine elektronskog stanja. Brzina unutarnje konverzije je obrnuto proporcionalna energetska procjepu između dva energetska stanja ($S_3 \rightarrow S_2, S_2 \rightarrow S_1$) i ona se odvija brzo, 10^{-11} s.

Zelene strelice prikazuju emisiju fotona ($S_1 \rightarrow S_0$), radijacijski prijelaz zvan fluorescencija koji se odvija pri brzini od 10^{-10} s.

Međusustavno križanje (eng. *intersystem crossing*) je neradijacijski prijelaz između dvije izoenergetske vibracijske razine koje pripadaju elektronskim stanjima različitih spinskih multipliciteta ($S_1 \rightarrow T_1$) (svjetlo plave strelice).

Fosforescencija je radijacijski prijelaz između dva elektronska stanja različitih spinskih multipliciteta i to je prijelaz $T_1 \rightarrow S_0$.

Zakašnjela (eng. *delayed*) fluorescencija jest treći tip radijacijskog prijelaza koji se u pravilu ne pokazuje u tipičnom Jablonski dijagramu. Ona označava prijelaz iz T_1 u S_1 koji je popraćen radijacijskim prijelazom u S_0 . Rezultat je identičan valnoj duljini pri kojoj se odvija fluorescencija, ali vrijeme odvijanja je duže. Zakašnjela fluorescencija se odvija kroz dva mehanizma – Termalno aktivirana zakašnjela fluorescencija (E - tip) i triplet – triplet anihilacija (P - tip).

E tip mehanizma je prijelaz iz T_1 u S_1 kroz mehanizam međusustavnog križanja. Proces je dobio ime „termalno aktiviran“ jer molekula mora imati dovoljno termalne energije da prijeđe energetske barijere između T_1 i S_1 stanja.

P – tip je mehanizam gdje dvije molekule koje su u T_1 stanju podliježu energijskom transferu koji jednu molekulu promovira u S_1 stanje, a drugu vraća u S_0 .

1.5. METODE ANALIZE UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA

Prethodno sintezi CQD prvenstveno je potrebno pretpostaviti njihovu potencijalnu primjenu. Kako bi željena svojstva CQD bila postignuta, potrebno je paziti na brojne parametre, a između ostaloga i vrstu sinteze za dobivanje CQD. Već spomenuto, CQD posjeduju mnoga svojstva koja su znanstvenicima širom svijeta korisna, zanimljiva i široko primjenjiva. Tako CQD mogu posjedovati kristalnu ili amorfnu strukturu, mogu biti različitih veličina i mogu fluorescirati pri različitim valnim duljinama. Kako bi se pokazali točni uvjeti pri kojima CQD fotoluminisciraju, kako bi se odredila njihova struktura, opseg, površina, naboj, pa i valna duljina fotoluminiscencije, potrebno ih je analizirati različitim metodama. Tako se njihova struktura određuje XRD metodom, funkcionalne skupine FTIR-om, elementarni sastav EDS analiza, veličina čestica SEM, TEM, AFM i DLS metodama analize, naboj na površini - ZETA potencijal, Određuje se njihova disperzivnost kako bi se pokazala biokompatibilnost i drugo opisano dalje u tekstu.

XRD (*X-ray diffraction analysis*) je metoda analize, tehnika koja se koristi kako bi se pokazala kristalna struktura nekog materijala, njegova fazna čistoća i veličina. Tehnika funkcionira tako da se analizirani materijal ozrači upadnim X-zrakama i zatim mjeri intenzitet i kutove raspršenja X-zraka koje napuštaju taj materijal. Primarna upotreba XRD analize je identifikacija materijala na temelju njihovog difrakcijskog uzorka. Ono bitno jest predviđanje strukture i deformacije koje govore kako struktura odstupa od idealne radi unutarnjih odstupanja i nedostataka.

XRD također određuje i kristalne faze CQD što su Liu i sur. pokazali sintetizirajući CQD pomoću hekso – periheksabenzokoronena kao prekursora i tako su dobili CQD širine oko 60 nm i debljine 2-3 nm. Proizvedene su nakon pirolize na visokoj temperaturi, površinske funkcionalizacije, redukcijskog tretmana i oksidativnog ljuštenja. Sintetizirane i pročišćene CQD imale su fotoluminiscenciju i QY od 3,8%. [3] Osim toga, potvrđena je i prisutnost iznimnih ugljikovih alkilnih skupina koje su površinski modificirane od strane Bourlinosa i sur. [3] koji su sintetizirali CQD kalcinacijom soli amonijeva citrata na 300 °C. Sintezom je dobiven dizajn koji je pokazao dva odraza koja su se slagala jedan na drugi što je pokazalo prisutnost alkilnih skupina ugljika.

TEM (transmisijska elektronska mikroskopija, eng. *Transmission electron spectroscopy*) se koristi za identifikaciju ultrastrukture uzorka jer posjeduje visoku rezoluciju, od 0,1 do 0,2 nm. Ima veliku potražnju u znanosti, farmaceutici, znanosti o materijalima te u drugim odjelima za istraživanja i

razvoj. Ovom tehnikom proučava se morfologija nanočestica kako bi se dobile informacije o njihovom obliku, veličini i disperziji. TEM se široko koristi za karakterizaciju CQD. Osim toga, za karakterizaciju CQD još se koristi i TEM visoke rezolucije. Kristalna priroda CQD može se klasificirati u dvije vrste rešetkastih rubova: međuslojni razmak (eng. *interlayer spacing*) i razmak rešetke u ravnini (eng. *in – plane lattice spacing*). Međuslojni razmak je obično fokusiran na oko 0,34 nm, dok je razmak rešetke u ravnini obično fokusiran na 0,24 nm [12].

Zhang i sur. Proveli su kiselu oksidaciju grafita kako bi sintetizirali CQD i njihov je razmak rešetke bio manji od 0,3 nm i to je pokazalo da je veliki dio CQD zapravo razmaknuti grafen. [12].

Shinde i sur. [16] su elektrokemijskom tehnikom sintetizirali CQD iz MWCNT, a istovremeno su uočene obje vrste rešetkastih rubova na TEM slici visoke rezolucije (HRTEM).

AFM (mikroskopija atomske sile; eng. *atomic force microscopy*) je vrlo moćna i svestrana mikroskopska tehnologija koja se koristi kako bi se proučavali svi uzorci veličina nanometra (10^{-9} m). Funkcionira tako da snima trodimenzionalne slike i uz to pruža uvid u svakakve vrste površinskih mjerenja pri tome zadovoljavajući sve potrebe inženjera i znanstvenika koji žele detaljniji uvid u površinu nanočestice. AFM se koristi kako bi se dobio uvid u sve tri dimenzije površine, uključeno i visinu. Uz to, pomoću AFM tehnike mogu se odrediti međumolekulske sile, kao i sile adhezije te elastičnost ili tvrdoća uzorka. Ono po čemu je AFM koristan jest što može generirati sliku u atomskoj razlučivosti u veličini angstroma bez dugotrajne prethodne pripreme uzorka. U polimernim nanokompozitima, tehnika se koristi za mjerenje površinske hrapavosti i za vizualizaciju površinske strukture mnogih vrsta nanomaterijala. Štoviše, AFM je nedestruktivna tehnika [11].

Princip je takav da se područje interesa skenira konzolom (eng. *cantilever*) te se stvori topografija površine promatranog uzorka. Otklon konzole prati fotodioda. Konstantni položaj lasera se održava kontrolom visine vrha iznad površine uzorka kako bi AFM proizveo točnu topografsku kartu (sliku). S obzirom na vrstu kontakta, postoje tri vrste:

- Kontaktni – (eng. *contact mode*)
- Beskontaktni - (eng. *noncontact mode*)
- Tapkajući - (eng. *tapping mode*) [10,11]

FTIR; infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng: *Fourier – transform infrared spectroscopy*) je također vrlo pouzdana tehnika za analizu uzoraka. Infracrvena spektroskopija je podskup spektroskopije koja se bavi infracrvenim područjem elektromagnetskog spektra. Koristi se za iskazivanje sastava uzoraka ili za njegovo identificiranje. Princip rada je takav da se infracrveni spektar uzorka sakuplja propuštanjem infracrvene zrake kroz uzorak i ispitivanje te svjetlosti otkriva koliko se energije apsorbira na svakoj valnoj duljini. To se određuje pomoću Fourierovog alata za simultano mjerenje svih valnih duljina i iz toga se generira spektar propusnosti ili apsorpcije koji pokazuje na kojim IR valnim duljinama uzorak apsorbira. Ta analiza daje informacije o molekularnoj strukturi uzorka.

U slučaju CQD, za analizu je pogodan FTIR. CQD se sastoje uglavnom od ugljika, vodika i kisika. Ako se oksidacijskim sintezama koriste jake kiseline, onda mogu biti prisutne i epoksi i karboksilne skupine koje sadrže kisik, pa je FTIR metoda korisna za analizu.

Peng i sur. [17] razvili su CQD veličine 1-4 nm oksidacijom ugljičnih niti jednog mikrona te su dobiveni produkt otopili u polarnom otapalu i bile su topive u vodi. Njihov infracrveni raspon je analiziran i karakteristične vrpce bile su pri 1724 cm^{-1} i 3307 cm^{-1} koje ukazuju na prisutnost karboksilnih skupina na površini. Prisutnost dvostruke veze potvrdila je vrpca na 1578 cm^{-1} te eterska veza s vrhom apsorpcije na 1097 cm^{-1} .

1.6. AMINOKISELINE

Aminokiseline su gradivni blokovi proteina. Svaka se aminokiselina sastoji od alfa ugljikovog atoma na kojeg su vezane karboksilna i aminoskupina, vodikov atom i bočni ogranak zvan R skupina [6].

Aminokiseline u neutralnoj pH otopini su u obliku zwitteriona – dipolarni ioni gdje je aminoskupina protonirana (NH_3^+), a karboksilna je deprotonirana (COO^-). Ionizacijska stanja aminokiselina se mijenjaju kako se mijenja pH vrijednost.

Aminokiseline koje grade proteine razlikuju se u svojstvima – obliku, naboju, hidrofobnosti, reaktivnosti i sposobnosti stvaranja vodikovih veza. Bočni ogranci aminokiselina razlikuju se prema tome jesu li oni alifatski (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin i prolin), aromatski (fenilalanin, tirozin i triptofan), bočni ogranci s hidroksilnom skupinom (serin i treonin), sulfhidrilnom (cistein), amidnom skupinom (asparagin i glutamin), bazni ogranak (lizin, arginin i histidin) i kiseli bočni ogranci (asparaginska i glutaminska kiselina) [6].

Prilikom izvođenja ovog diplomskog rada korišteno je pet aminokiselina: leucin, triptofan, arginin, alanin i histidin.

Leucin (Leu, L) je aminokiselina koja ima razgranati lanac. Zbog izobutilnog bočnog lanca, ona je hidrofobna. Leu je esencijalna aminokiselina koju ljudi i životinje moraju unositi hranom, a sintetizira se u biljkama i mikroorganizmima iz piruvatne kiseline pomoću više enzima, od kojih je glavni acetolaktat sintaza. Leu je alifatska aminokiselina, a koristi se kao pojačivač okusa kao prehrambeni aditiv. U hrani se nalazi u govedini, soji, ribi, pšeničnim klicama, svježem žumanjku, kuhanoj leći, žutom kukuruzu, grahu, zobi i mlijeku.

Triptofan (Trp, W) također je esencijalna aminokiselina koja izgrađuje melanin i serotonin te niacin (vitamin B3). Zanimljivo je da Trp djeluje kao prirodni regulator raspoloženja zato što je gradivni element spomenutih hormona. Dokazano je da dodatak prehrani s Trp kontrolira apetit i tjelesnu težinu. U prehranu ga treba unositi polako, povećavajući dozu na oko 6 mg. Njegov nedostatak u tijelu očituje se nedostatkom apetita, lošim raspoloženjem i depresijom te nesanicom. Prevelika doza Trp dovodi do problema s probavom, mučnina, proljeva i pospanosti, glavobolje i

suih usta. Hrana koja sadrži Trp su jaja, perad, ribe poput bakalara i lososa, krumpir, banane, govedina i žitarice.

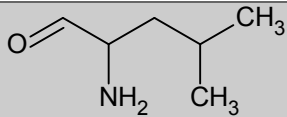
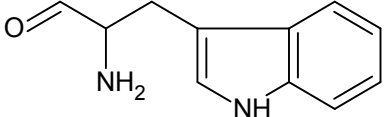
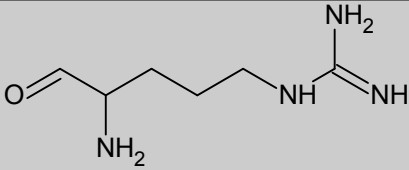
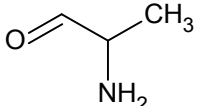
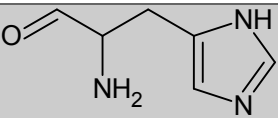
Arginin (Arg, R) je aminokiselina koja nije nužno esencijalna jer njezina sinteza u organizmu ovisi o stupnju razvoja i zdravstvenom stanju ponaosob. Arg najviše koriste sportaši radi stvaranja dušikova dioksida. Potreban je tijelu jer potiče stvaranje kreatina koji je važna hranjiva tvar čiji manjak dovodi do mentalne nesposobnosti. Arg se također koristi prilikom proizvodnje agmatina koji je signalna molekula u tijelu i predstavlja međuprodukt u ciklusu uree. Naravno, Arg pomaže stvaranju proteina u tijelu i oslobađanju inzulina te dušikovog oksida radi čega je toliko zanimljiva aminokiselina sportašima. Najviše Arg ima u crvenom i u mesu peradi, ribama i mliječnim proizvodima.

Alanin (Ala, A) je neesencijalna aminokiselina, druga po redu najjednostavnija nakon glicina koja je uključena u metabolizam šećera i organskih kiselina. Ala je jedan od glavnih sastojaka svilenog vlakna i slobodan se nalazi u krvnoj plazmi. Postoje dva enantiomera alanina – alfa i beta alanin. Nastaje u procesu biosinteze redukcijom piruvata.

Histidin (His, H) je isto tako esencijalna aminokiselina koja se nalazi u bananama, mesu, peradi i mlijeku te u povrću u manjim količinama. His je prvi izolirao njemački liječnik Albrecht Kossel, 1896. godine. On se koristi za održavanje zdravih tkiva u svim dijelovima tijela, posebice u mijelinskim ovojnica živčanih stanica. Pravilna razina histidina u tijelu omogućava mentalno i tjelesno zdravlje dok prevelika količina histidina dovodi do shizofrenije i anksioznosti. Od manjka u početnom stadiju dolazi do pojave ekcema i bolova u zglobovima i mišićima.

U tablici 2 vidljive su strukture aminokiselina koje su se koristile pri izradi ovog diplomskog rada, pKa vrijednosti bočnih ogranaka te izoelektrična točka.

Tablica 2: Prikaz struktura i pKa aminokiselina korištenih pri izradi ovog diplomskog rada [5].

<i>NAZIV</i>	<i>STRUKTURA</i>	<i>pKa</i> C α -NH $_3^+$	<i>pKa</i> C α -COOH	<i>pKa</i> <i>bočnog</i> <i>lanca</i>	<i>pI</i>
<i>Leu</i>		9,60	2,36	.	5,98
<i>Trp</i>		9,44	2,43	.	5,94
<i>Arg</i>		9,04	2,17	12,48	10,76
<i>Ala</i>		9,69	2,34	.	6,02
<i>His</i>		9,17	1,82	6,00	7,59

1.7. LIMUNSKA KISELINA

Limunska kiselina je trikarboksilna kiselina i prirodna je sastavnica metabolizma biljaka i životinja. Javlja se u oksidativnom metabolizmu svih organizama, a taj se ciklus naziva Krebsovim ciklusom. To je metabolički ciklus koji uključuje pretvorbu acetata iz ugljikohidrata, masti i proteina u ugljikov dioksid i vodu. Krebsovim ciklusom otpušta se energija potrebna za rast i razvoj, reprodukciju i sve životne funkcije organizma.

Najšire je korištena organska kiselina u hrani, piću i lijekovima. Izuzetno je funkcionalna i okolišno prihvatljiva te se stoga široko koristi u industriji za keliranje ili izradu pufera i derivatizaciju. Osim toga, prisutna je u šamponima, prašcima za pranje, deterdžentima, kozmetici i sredstvima za čišćenje. Dakle, široko je prisutna i njena upotreba, kemizam, svojstva i zastupljenost (vidljivo u tablici 3) odgovaraju normama zelene kemije.

Povijesno datira u davnu 1200. godinu kada je alkemičar Vincentius Bellovacensis otkrio da limun i limeta u svom soku sadrže kiselu tvar. Nakon toga je 1784. godine Scheele bio prvi koji je izolirao limunsku kiselinu iz limunova soka, a Liebig je 1834. godine prepoznao limunsku kiselinu kao hidroksidnu trobazičnu kiselinu.

Današnja industrijska proizvodnja limunske kiseline, prvi puta je provedena 1893. godine kada je Wehmer indicirao kako pojedine gljive svojom fermentacijom, ako rastu u šećeru, proizvode limunsku kiselinu. Danas se industrijska proizvodnja limunske kiseline temelji na mikrobnjoj fermentaciji ugljikohidrata te je postupak kao takav komercijaliziran.

Tablica 3: Prirodna zastupljenost limunske kiseline

VOĆE I POVRĆE		ŽIVOTINJSKA TKIVA I TEKUĆINE	
<i>Biljke</i>	% limunske kiseline		Limunska kiselina, ppm
<i>Limun</i>	4,8-8,0	ljudska krv	15
<i>Grejp</i>	1,2-2,1	krvna plazma	25
<i>Mandarina</i>	0,9-1,2	eritrociti	10
<i>Naranče</i>	0,6-1,0	ljudsko mlijeko	500-1250
<i>Crni ribiz</i>	1,5-3,0	urin	100-750
<i>Crveni ribiz</i>	0,7-1,3	sjeme	2000-4000
<i>Maline</i>	1,0-1,3	štitnjača	750-900
<i>Jagode</i>	0,6-0,8	bubreg	20
<i>Jabuke</i>	0,008	kost	7500
<i>Krumpir</i>	0,3-0,5	slina	4-24
<i>Šparoge</i>	0,25	znoj	1-2
<i>Repa</i>	0,08-0,2	suze	5-7
<i>Grašak</i>	0,05		
<i>Zrna kukuruza</i>	0,02		
<i>Zelena salata</i>	0,016		
<i>Patliđan</i>	0,01		

Reakcije kojima limunska kiselina podliježe su tipične organske reakcije hidroksi polikarboksilata – esterifikacija, formiranje soli iz otopine i anhidridne reakcije. Podliježe biodegradaciji od strane mnogih organizama i aerobno i anaerobno unutar prirodnog okoliša.

Oko 75% limunske kiseline koja se proizvede konzumira se u industrijama hrane i pića. Najviše se limunske kiseline proizvede u zemljama zapadne Europe, Kine i SAD-a. U Americi se proizvodnja svake godine povećava radi industrije pića gdje se limunska kiselina koristi u izradi ledenih čajeva, dijetalnih gaziranih sokova te sportskih i izotoničnih napitaka.

1.7.1. KREBSOV CIKLUS

Najpoznatiji ciklus biokemijskih reakcija vezanih uz limunsku kiselinu je ciklus limunske kiseline – Krebsov ciklus. Krebsov ciklus kreće od piruvata. On je jedna od mogućih sudbina piruvata (anion pirogroždane kiseline). Kao takav, Krebsov ciklus je konačni put oksidacije molekula goriva te on služi i kao glavni izvor gradivnih sastojaka za biosinteze. Molekule u ciklus ulaze u obliku acetil koenzima A (acetil Co - A) te se on odvija u mitohondrijima stanice. Ciklus limunske kiseline odvija se samo u aerobnim uvjetima jer su mu potrebni nosači elektrona, NAD^+ i FAD, a oni se regeneriraju tako da prenose elektrone transportnim lancem na molekulu kisika pri čemu dolazi do stvaranja ATP -a. Te dvije molekule su nikotinamidni derivati koji prenose vodik i fosfatnu skupinu. Enzimi koji reguliraju taj ciklus su *citrat sintaza*, *izocitrat dehidrogenaza*, *kompleks a - ketoglutarat dehidrogenaza*.

Srž samog ciklusa jest razgradnja organskih molekula do C-2 jedinica (acetil Co-A) te razgradnja tih jedinica u nizu stupnjeva reakcija gdje se odcijepi molekula ugljikovog (IV) oksida i dva atoma vodika ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2) uz izmjenu molekule kako bi moglo doći do dekarboksilacije.

Ciklus limunske kiseline sastoji se od 8 reakcija:

- * (1) Sinteza citrata
- * (2) Izomerizacija citrata u izocitrat
- * (3) Stvaranje a-ketoglutarata i CO_2
- * (4) Stvaranje sukcinil Co-A
- * (5) Fosforilacija supstrata
- * (6-8) Regeneracija oksaloacetata u tri koraka

1.8. UTJECAJ TEŠKIH METALA NA BIOSFERU

Teški metali spadaju u skupinu kronično rizičnih tvari. Njihov konstantni rast u koncentraciji u okolišu vrlo je zabrinjavajući radi štetnog učinka koji imaju na živi svijet. U primarne toksične supstance i zagađivače voda prvog reda spadaju olovo, živa i kadmij. Metali čija gustoća prelazi vrijednost od 5 g/cm^3 svrstavaju se u skupinu teških metala. Oni mogu biti esencijalni (selen i željezo) koji su prijeko potrebni za brojne biokemijske reakcije i biološke funkcije unutar organizma. Moraju se unositi prehranom jer bez njihova prisustva dolazi do teških općih stanja organizma i komplikacija poput anemije, tumorskih bolesti, autoimunih bolesti, neurodegenerativnih bolesti i općenito poremećaja rada hormona (štitnjača).

Problem također nastaje ulaskom teških metala u organizam koji su nepoželjni radi toga što preusmjeravaju tok biokemijskih reakcija pri čemu dolazi do nastajanja nusprodukta, neželjenog produkta ili produkt potreban za normalno funkcioniranje organizma uopće ne nastane. Teški metali također su štetni za okoliš. Ciklusi su jednostavni, ali izrazito štetni i nepovoljni radi same činjenice kako je sve u prirodi povezano. Izvori teških metala mogu biti prirodni i antropogeni, ovisi o proizvodnji, upotrebi i preradi.

Iz svega navedenog jasno je zašto je potrebno omogućiti što lakšu detekciju iona kako bi se oni mogli uspješno detektirati te liječiti ili još bolje prevenirati sva teška i toksična stanja biosfere uzrokovana upravo ionima teških metala. Prilikom izrade ovog diplomskog rada ispitivalo se smanjenje signala fotoluminiscencije senzora na bazi CQD s većim brojem iona teških metala: Mg^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Al^{3+} , Mn^{2+} .

Živa je metal koji u prirodi ne postoji u čistom stanju kao metal, već kao sol živin sulfid zvan cinabarit. Ona je vrlo rijetki metal te je u obliku soli prisutna u Zemljinoj kori. Cinabarit dolazi u dva oblika; crvenom i crnom obliku. Ako ih se žari dobije se živa koja se može destilirati. Crveni oblik žive poznat još povijesno kao vermilion – crvena boja.

Ono po čemu se razlikuje od ostalih metala je njezino agregatno tekuće stanje pri sobnoj temperaturi dok je njena gustoća od $13,6 \text{ g/ml}$ viša od gustoće ostalih metala. Iako je njeno talište $-39 \text{ }^\circ\text{C}$, a vrelište na $360 \text{ }^\circ\text{C}$, lako ju je, ali izuzetno opasno pročišćavati destilacijom zato što su njene pare toksične. Isto tako zanimljivo svojstvo ovog metala je njena površinska napetost. Površinska napetost je izraženija kada su količine žive manje jer inače prevladava gravitacijska

sila i narušava njen sferičan oblik do kojeg dolazi jer se živa radi površinske napetosti uvlači sama u sebe i smanjuje prostor koji zauzima.

Amalgamacija je zanimljivo živino svojstvo – sposobnost da tvori legure s drugim metalima. Najpoznatiji primjer amalgamacije žive je s aluminijem. Aluminij ima površinski sloj koji lako oksidira, ali živa taj sloj narušava i aluminij se izlaže zraku te dođe do brze reakcije oksidacije i nastaje aluminijev oksid – duge, bijele, vlaknaste niti.

Živa je opasna i toksična, ali ne u prirodnom, tekućem stanju, već njene pare. Pare se dobro apsorbiraju kroz pluća, a tekućina kroz kožu baš i ne. Ono što ju zapravo čini opasnom, otrovnom i toksičnom su njeni organski i anorganski spojevi. Ljudska populacija je najviše izložena organskim oblicima jer se prvenstveno nalazi u moru, dakle u ribi i morskim plodovima i tako ulazi u organizam apsorpcijom kroz probavni sustav.

Dimetil živa je najopasniji organski spoj žive. Anorganski živini spojevi topljiviji su u vodi za razliku od organskih topljivijih u mastima. Živin sulfid jedan je spoj žive jedan je od spojeva koji je gotovo netopiv u vodi te je relativno siguran za korištenje pošto postoji neko nenapisano pravilo da toksičnost živinih spojeva ovisi o njihovoj topljivosti. Živin klorid je, s druge strane, jako toksičan i opasan jer je vrlo dobro topiv u vodi.

Ono što je još dobro napomenuti je živina sposobnost bioakumulacije gdje zapravo leži prava opasnost. Živa se tako zadržava u organizmu i samo se nakuplja te s vremenom to prerasta u visoku toksičnost.

1.8.1. ŽELJEZO

Željezo je izuzetno bitan nutrijent koji spada u skupinu esencijalnih elemenata prijeko potrebnih za zdravlje i normalno funkcioniranje cijelog organizma. Od deficita željeza pate mnogi ljudi i to dovodi do brojnih disfunkcionalnih stanja cijelog organizma. Glavni izvori esencijalnog željeza su crveno meso, školjke, riba, sjemenke i orašasti plodovi, mahunarke i lisnato povrće, jetra i spirulina. Suplementi željeza napravljeni su od metalnog željeza, a ne od hema, jer hem može uzrokovati hrđanje stanica (njihovu oksidaciju).

Željezo (lat. *Ferrum*) je najrasprostranjeniji element na planetu Zemlji (većinom u litosferi) te se u prirodi javlja u obliku oksida i karbonata. Od fizikalnih svojstava željeza ističu se metalni sjaj i

siva boja te lakoća kovanja i lijevanja pri visokim temperaturama. Željezo se u svom elementarnom obliku u prirodi pojavljuje samo u obliku meteornog željeza. Spojevi sa željezom mogu biti izgrađeni od željeza u oksidacijskom stanju +2 (fero) ili +3 (feri) te +6 (ferat). Najstabilniji spojevi su oni koji nastaju reakcijama s kiselinama u odsustvu kisika sa željezom u +2 oksidacijskom stanju. Oksidacijom fero oblika nastaju feri oblici.

Željezo ima vrlo bitnu ulogu u sintezi hemoglobina i eritrocita te je prijeko potreban za transport kisika od pluća do stanica.

Pomaže kod menstrualnih bolova jer se unosom željeza krv koja se izgubi prirodno rekonstruira. Bitno je i za pravilno funkcioniranje štitnjače. Deficit se može prepoznati po hematomima koji nastaju lako, a prolaze sporo i otežano što ukazuje na komplikacije s grušanjem krvi. Dolazi do teškoća u spavanju i bolova u nogama te nedostatka energije.

Osim navedenog, deficit željeza u tijelu dovodi do anemije koja uzrokuje mnoga otežana stanja – vrtoglavicu, slabost, loše pamćenje, smanjenu koncentraciju, umor i malaksalost te generalno loše kognitivne sposobnosti. Mozgu je željezo potrebno za sintezu neuroglobina koji opskrbljuje mozak kisikom te služi za sintezu ATP – a. Potrebno je za izgradnju mišićne mase, jačanje imuniteta u borbi protiv različitih bakterijskih i virusnih infekcija. U organizmu, ovisno o enzimu koji se u datom trenutku koristi za sintezu, željezo, kao i ostali minerali, imaju ulogu kofaktora, a to znači da potpomažu zdravlju cjelokupnog organizma [18].

1.9. SENZORI ZA DETEKCIJU METALA

Već spomenuto, dugoročno i često izlaganje teškim i prijelaznim metalima uzrokuje degenerativne bolesti i teška opća stanja organizma. U prethodnom poglavlju objašnjen je utjecaj teških metala na živa bića i okolinu, stoga je bitno držati njihove koncentracije pod kontrolom. Fokus ovog rada je na željezovom feri ionu (Fe^{3+}) koji je najzanimljiviji za poglavlje o CQD. On je jedan od ključnih metala za normalno odvijanje svih vrsta esencijalnih funkcija organizma jer njegov nedostatak uzrokuje anemiju te degenerativne bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti [19].

Fotoluminiscentna svojstva i biokompatibilnost CQD u biološkim sustavima ključna su za primjenu istih u medicinske svrhe. Spomenuto ranije u ovom radu jest da su Suni sur. 2006. godine

sintetizirali i otkrili značaj CQD te od tada počinje njihova intenzivnija primjena i istraživanje. CQD polako zamjenjuju klasične nul – dimenzionalne materijale na bazi teških metala u svim *in vitro* ispitivanjima zahvaljujući veoma lakoj i jednostavnoj modifikaciji i funkcionalizaciji površine čime se njihova fizikalna, kemijska i optička svojstva mogu prilagoditi i poboljšati [6].

Ono bitno jest da radi površinskih funkcionalnih skupina CQD (karboksilne, hidroksilne i amino skupine), one imaju jak afinitet za vezanje metalnih iona što za posljedicu daje prigušenje signala (eng. *quenching*). Chatzmitakos i sur. su 2017. godine pripravili CQD iz kore citrusa (limuna i naranče) s QY od 16,8% iz naranče i 15,5% iz kore limuna. Radili su fotoluminiscentnu probu za detekciju Fe^{3+} iona i azo bojila tartrazina. Rezultati su pokazali selektivan test interferencije na temelju prigušenja fotoluminiscentnog signala za željezov feri ion. Prigušenje je pokazano i za ione žive i olova, ali bilo je zanemarivo jer je redukcija intenziteta iznosila samo 20% i 12%.

Za ion željeza, Fe^{3+} , određen je linearni koncentracijski raspon od 0,1 μM do 100 μM te je LOD = 3,0 μM . Tako su čestice testirane na detekciju feri iona unutar stanice. Uspoređivanjem uzorka s dodanim feri ionom i uzorka bez dodanog feri iona u stanice uočeno je značajno smanjenje intenziteta fotoluminiscencije u testiranom uzorku s dodatkom feri iona [20].

Osim selektivnog odziva na željezo, postignuta je i biološka primjena CQD kao fotoluminiscentne probe za detekciju živina (II) iona unutar stanice. To su postigli Vandarkuzhali i sur. 2018. godine kada su sintetizirali CQD iz kore ananasa s QY od 42% hidrotermalnom sintezom pri uvjetima temperature od 150 °C kroz dva sata. Dobivene CQD pročišćavali su centrifugiranjem i ekstrakcijom diklormetanom (DCM). Dobivene CQD korištene su kao fotoluminiscentna proba za detekciju Hg^{2+} iona. Usporedbom stanica bez i s dodanim Hg^{2+} ionom uočeno je prigušenje intenziteta fotoluminiscencije s uzorkom koji sadrži Hg^{2+} ione [21].

2. MATERIJALI I METODE

2.1. KEMIKALIJE I MATERIJALI:

- ◆ Aminokiseline L-glicin; Merck, Njemačka
- ◆ L-arginin; Merck, Njemačka
- ◆ L-alanin (Ala) $C_3H_7NO_2$ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- ◆ L-histidin $C_6H_9N_3O_2$ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- ◆ L-leucin $C_6H_{13}NO_2$ Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ◆ L-lizin $C_6H_{14}N_2O_2$ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- ◆ $FeCl_3 \times 6H_2O$ (VWR International, SAD),
- ◆ $MgCl_3 \times 6H_2O$ (T.T.T., Hrvatska),
- ◆ $CaCl_2 \times 2H_2O$ (BDH Prolabo, UK),
- ◆ KCl, NaCl (Gram Mol, Hrvatska),
- ◆ $CuCl_2 \times 2H_2O$ (Kemika, Hrvatska),
- ◆ $AlCl_3 \times 6H_2O$ (Brend Kraft, Njemačka),
- ◆ $HgCl_2$ (VWR International, SAD),
- ◆ $MnCl_2 \times 4H_2O$ (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, SAD).
- ◆ Kinin sulfat i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Merck, Njemačka.
- ◆ Otapala i kemikalije: etanol, metanol, dimetil sulfoksid (DMSO), aceton, sumporna kiselina, octena kiselina i klorovodična kiselina: Merck, Njemačka,
- ◆ NaOH pelete: Gram Mol, Hrvatska.
- ◆ Milli-Q čista voda: Milli-Q Millipore sustav (provodnost $\leq 0,054 \mu S/cm$)
- ◆ Membrana za dijalizu Spectra/Por 7 (MWCO 1kDa): Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA, SAD).

Sve su kemikalije analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez prethodnog pročišćavanja.

2.2. INSTRUMENTACIJA I TEHNIKE ANALIZE

- ◆ Shimadzu FT-IR 8400S spektrometar (Shimadzu, Kyoto, Japan) koristeći DRS 8000 dodatak iznad 4000–400 cm^{-1} spektralne regije s rezolucijom od 4 cm^{-1} . Mala količina (~1-2 mg) sušenog uzorka pomiješala se KBr prahom (IR stupanj), dok se dana analiza provodila koristeći software paket IR otopine 1.30, komercijalni softver.
- ◆ Ultraljubičasta - vidljiva (UV-Vis) apsorpcijska spektroskopija. Koristio se uniSPEC 2 spektrofotometar (LLG Labware, Češka).
- ◆ Podatci rendgenske difrakcije praha dobiveni su od Empyrean (Malvern PANalytical, Almelo, Nizozemska) koristeći $\text{CuK}\alpha$ radijaciju ($\lambda = 0,1541 \text{ nm}$) s veličinom pomaka $2^\circ/\text{min}$.
- ◆ Kemijska kompozicija i prisutnost dušikovih skupina detektirana je disperzijom elementa XRD spektroskopije (Oxford Instruments, Abingdon, UK) zajedno sa SEM.
- ◆ Optičko i fotoluminiscentno ponašanje pripremljenih uzoraka analizirali su se koristeći Cary Eclipse Fluorescentni Spektrofotometar (Varian Inc. Santa Clara, CA, SAD).
- ◆ Zeta potencijal (ζ -) CQD u vodenoj suspenziji određen je elektroforetskim svjetlom koristeći Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Zeta potencijal čestica izračunat je mjerenjem elektroforetske mobilnosti prema Henrijevoj jednadžbi koristeći Smoluchowskijevu aproksimaciju ($f(\kappa) = 1,5$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri mjerenja..
- ◆ Podaci su obrađeni korištenjem Zetasizer software 7,13 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Sva mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C.
- ◆ Vakuumski koncentrador (SpeedVac, Savant™ SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific, SAD)

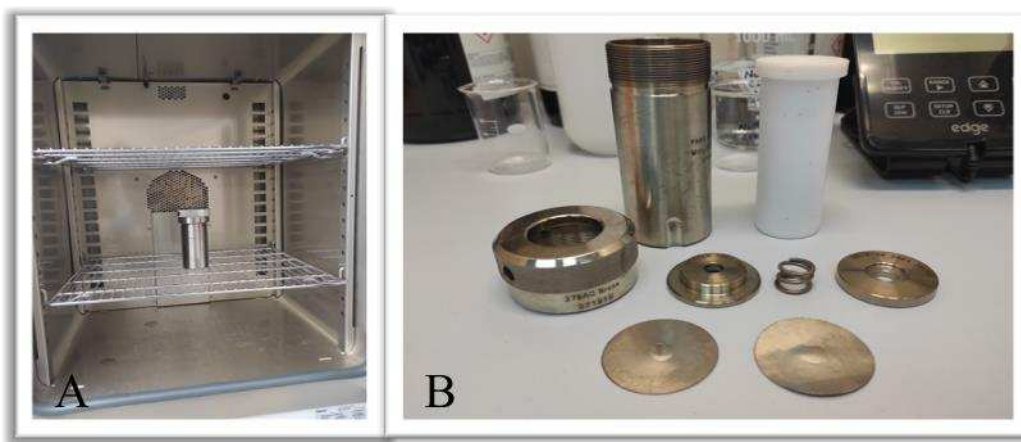
2.3. POSTUPAK SINTEZE UZORKA

Vrsta sinteze koja se odvijala jest hidrotermalna sinteza. Posebno se odrađivala sinteza *blank* uzoraka i nakon određenih uvjeta i sinteza uzorka s aminokiselinom.

Blank uzorak: 1 g limunske kiseline pomoću ultrazvuka se homogenizira u 20 ml miliQ H₂O te se otopina prebaci u autoklav (Parr Instrument Company, Moline, IL, SAD) i sinteza se odvija 9 sati pri uvjetima od 180 °C.

Uzorak s aminokiselinom: u 5ml miliQ H₂O homogenizira se 175 mg aminokiseline pomoću ultrazvuka i 850 mg limunske kiseline u 15 ml miliQ H₂O. Dobivene otopine se homogeniziraju na ultrazvuku i zatim prebace u autoklav 9 sati na 180 °C.

Nakon sinteze, autoklav se otvara u digestoru te se uzorak stavi u plastičnu kivetu od 50 ml, omota aluminijskom folijom i stavi u hladnjak kako bi se zaštili od svjetlosti (uzorci su fotosenzibilni).



Slika 3: Prikazi: A) Smjese limunske kiseline i aminokiseline u autoklavu spremna za sintezu, B) dijelovi autoklava [autor] .

2.4. POSTUPAK PROČIŠĆAVANJA UZORAKA

Pročišćavanje uzorka sastojalo se od nekoliko koraka. Prvi korak bilo je centrifugiranje 20 min pri brzini od 9400 okretaja u minuti. Nakon toga, talog se odvojio filtracijom kroz filter za špricu s veličinom pora 0,2 μm u čistu kivetu za centrifugiranje. Nakon pročišćavanja dobivenih CQD, namještao se pH na neutralan pH = 7 radi pripreme uzorka za dijalizu. Dodavao se, kap po kap, natrijev hidroksid (NaOH) jer je vrijednost pH nakon sinteze iznosila između 2 i 3. Kad je postignuta pH vrijednost iznosila pH = 7, konstantnim miješanjem na magnetskoj miješalici (slika 4), suspenzija CQD prebacila se u vrećicu za dijalizu te se dijaliza odvijala 24 sata u jednoj litri

MilliQ H₂O, uz izmjenu vode nakon 2 sata. Nakon dijalize, uzorak je bio spreman za daljnju obradu i analizu dobivenih produkata. Uzorak se nakon dijalize spremio u hladnjak .



Slika 4: Prikazi: A) uređaja za centrifugu, B) Epica s uzorcima CQD, C) pribor za filtraciju uzoraka, D) pH metar i otopine za kalibraciju. Trebalo je namještati pH uzoraka na pH = 7 za dijalizu, E) uzorak u membrani za dijalizu osiguran kvačicama F) uzorak spreman za dijalizu na magnetskoj miješalici [autor].

2.5. ODREĐIVANJE KVANTNOG ISKORIŠTENJA

QY fotoluminiscencije određivao se korištenjem kinin sulfata kao referentnog standarda. (Kinin sulfat otopio se u 0,1 M otopini H₂SO₄; QY = 54% na 360 nm). Računao se prema jednadžbi 1:

$$\varphi_{CQD} = \varphi_{QS} \left[\frac{I_{CQD}}{A_{CQD}} \right] \left[\frac{A_{QY}}{I_{QS}} \right] \left[\frac{\eta^2 C_{QD}}{\eta^2 QS} \right] \quad (1)$$

Gdje φ označava QY, I integrirani intenzitet fluorescencije pod emisijom spektra, A označava apsorbanciju na valnoj duljini pobude, a η označava indeks loma (za vodene otopine on iznosi 1,33). CQD indeks označava pripremljene ugljikove točke i QS označava kinin sulfat. Treba napomenuti da su se vrijednosti optičke apsorpcije održavale manjima od 0,1 kako bi učinak reapsorpcije bio umanjen [22].

2.6. SELEKTIVNA DETEKCIJA Fe³⁺ IONA

Kako bi se ispitala selektivna osjetljivost sintetiziranih CQD, koristili su se slijedeći metalni ioni: Ca²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, K⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Na⁺, Mn²⁺. Napravljene su temeljne standardne otopine svih metalnih iona ($c = 100 \mu$) iz odgovarajućih metalnih soli. Eksperiment se provodio tako da se u sveukupno 950 μ L suspenzije CQD ($\gamma = 25 \mu\text{g/mL}$) dodalo 50 μ L vodene otopine odgovarajuće soli. Intenzitet fotoluminescencije mjeren je na spektrofluorimetru te su rezultati prikazani kao promjena intenziteta fotoluminescencije u odnosu na blank sustav bez dodatka soli.

Razvoj metode za određivanje Fe³⁺ iona u modelnim sustavima odvijao se pomoću pripremljenih CQD koncentracije 25 $\mu\text{g/mL}$. Osjetljivost prema ionu Fe³⁺ izvodila se s različitim koncentracijama istog iona koje su bile od 0,5 do 300 μM koristeći fluorescentnu spektroskopiju s optimalnom valnom duljinom ekscitacije (nakon ispitivanja maksimalne valne duljine ekscitacije i emisije). Ugrubo, 100 μ L otopine CQD ($\gamma = 25 \mu\text{g/mL}$) dodalo se do ukupnog volumena otopine 900 μ L Fe³⁺ otopine soli različitih koncentracija. Prema istom postupku, proveden je i test osjetljivosti i selektivnosti prema svim ostalim navedenim ionima.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bila je sinteza CQD iz limunske kiseline kao prekursora uz dodatak aminokiselina kao dopant dušika. Koristila se limunska kiselina kao tvar koja je prisutna u svakodnevnoj upotrebi i lako dostupna te aminokiseline koje su također prirodan izvor dušika. Sintaza je kao takva odgovarala principima zelene kemije što je danas vrlo poželjan pristup.

Ukupno je za analizu pripravljeno 6 uzoraka. Jedan uzorak je bio bez dodatka aminokiselina (*blank*), i 5 s dodatkom aminokiselina kako bi se usporedila fizikalno – kemijska, strukturna i optička svojstva produkata. Aminokiseline korištene u sintezi CQD su Leu, Trp, Arg, Ala i His koje su imale ulogu N – dopanata. Početne, okom vidljive, razlike između *blanka* i dopiranih CQD nakon provedene sinteze bile su prvenstveno u boji jer je blank sustav bio prozirniji i svjetliji od dopiranih produkata koji su ovisno o korištenim aminokiselinama imali određeno obojenje ili talog. Talog je bio prisutan kod sustava s dodanom aminokiselinom Trp koja je sama po sebi hidrofobna te nešto manje kod His.

Dobivene CQD posjeduju određen pH te se pH vrijednost mjerila neposredno prije sinteze te nakon sinteze kako bi se za provođenje analiza namjestio na željenih pH = 7. Kako bi se pH vrijednost namjestila na neutralno (pH = 7) dodavala se vodena otopina natrijeva hidroksida, koncentracije $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ M}$ ili klorovodična kiselina, HCl jednake koncentracije.

Mjereni pH prije hidrotermalne sinteze CQD bio je između pH = 1,88 i pH = 2,53, a pH vrijednost nakon sinteze između pH = 1,96 i pH = 2,76.

Bitno je naglasiti da se pH vrijednost namještala na pH = 7 kako bi se čestice uspješno pročistile (membrana za dijalizu MWCO ne podnosi ekstremne pH vrijednosti zbog mogućeg narušavanja strukture pora), ali i zato što se pri nižim pH vrijednostima, uzorak pokazao nehomogen. Kako bi se nanočestice detaljno pročistile, prvo se uzorak centrifugirao, zatim filtrirao te se podvrgnuo postupku dijalize na magnetnoj miješalici (slika 4). Dijaliza se provodila tako da se 20 mL uzorka CQD stavilo u membranu, membrana se sa svake strane zatvorila plastičnim kvačicama te se uzorak uronio u 1 L milliQ H₂O. Dijaliza se provodila kroz 24 sata što se pokazalo kao dovoljno vrijeme za pročišćavanje čestica pošto u samom uzorku nije bilo vidljivih nečistoća te su se koristile kemikalije analitičke čistoće.

Spektrofotometrijskim mjerenjima mjerila se apsorbanacija uzoraka za potrebe određivanja QY. Valna duljina pobude iznosila je $\lambda_{EX} = 360$ nm (slika 17). Za izvođenje mjerenja, radila su se serijska razrjeđenja uzoraka CQD u miliQ H₂O kako bi se dobili uzorci čiji je raspon apsorbanacije između 0,08 i 0,1. Bitno je da apsorbanacija ne prelazi vrijednost 0,1 jer u tom slučaju dolazi do reapsorpcije.

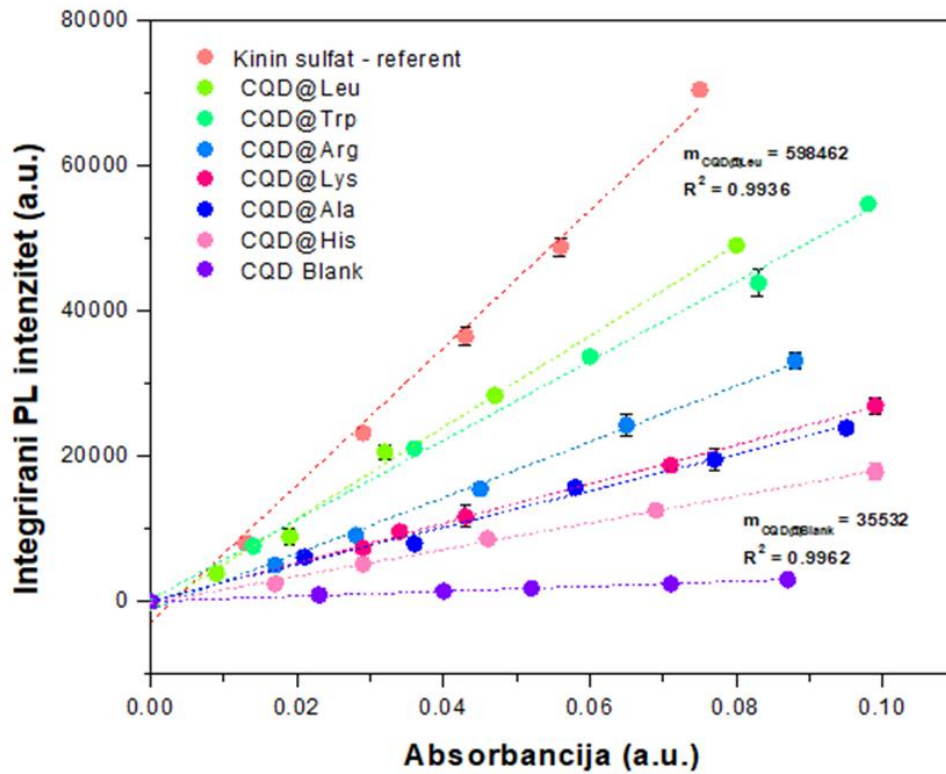
Kada su vrijednosti apsorbanacije bile poznate, spektrofluorimetrijski se mjerio intenzitet fotoluminiscencije s valnom duljinom ekscitacije $\lambda_{EX} = 360$ nm.

3.1. KVANTNO ISKORIŠTENJE

QY izračunat je koristeći referent kinin sulfat ($\varphi_{QS} = 54\%$) prema jednadžbi 1. Najbolji QY ima uzorak CQD@Leu i iznosi 36,43% pri pH = 7 što je vidljivo u tablici 4. Ono što se može zaključiti jest da je povećanje QY rezultat pasivizacije površine sintetiziranih CQD. Literaturni izvori pokazali su kako pasivizacija površine ima bitnu ulogu u poboljšanju optičkih i kemijskih svojstava [16, 22, 23]. Pošto CQD@Leu ima najveću vrijednost QY, odabran je za detaljnu karakterizaciju dalje u radu.

Tablica 4: QY pojedinih sintetiziranih CQD pri pH= 3 i pH = 7, mjereno pri valnoj duljini $\lambda = 360$ nm.

<i>Uzorak</i>	<i>pH = 3</i>		<i>pH = 7</i>		
	<i>Max $\lambda_{EM} / \lambda_{EX}$</i>	<i>QY (%) pri 360 nm</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Max $\lambda_{EM} / \lambda_{EX}$</i>	<i>QY (%) pri 360 nm</i>
<i>Blank</i>	434/335	2,12	<i>Blank</i>	430/320	2,02
<i>CQD@Leu</i>	398/335	35,75	<i>CQD@Leu</i>	406/343	36,43
<i>CQD@Trp</i>	450/373	32,95	<i>CQD@Trp</i>	423/367	33,18
<i>CQD@Arg</i>	407/338	21,39	<i>CQD@Arg</i>	415/335	23,92
<i>CQD@Ala</i>	398/334	15,99	<i>CQD@Ala</i>	398/340	16,42
<i>CQD@His</i>	404/332	15,17	<i>CQD@His</i>	401/335	12,97

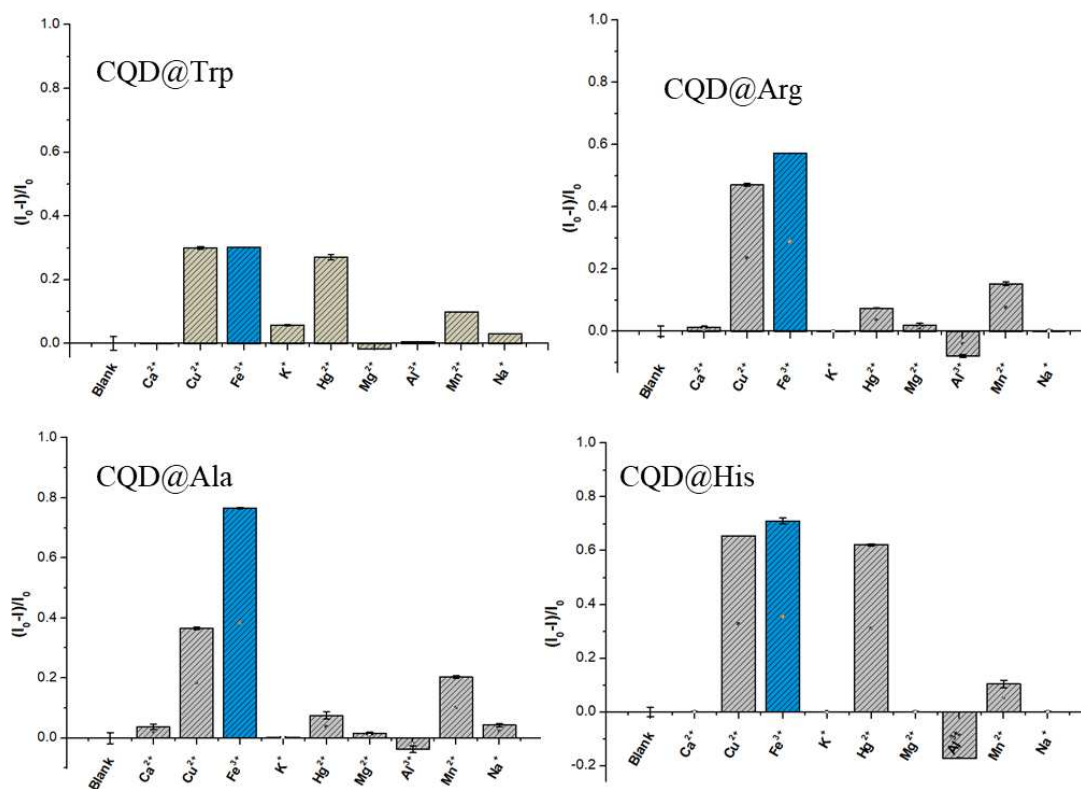


Slika 5: Grafički prikaz QY za pripremljene uzorke CQD prema referentu kinin sulfatu. Prikazuje ovisnost integriranog intenziteta fotoluminiscencije o apsorbanciji sintetiziranih CQD, $\lambda_{EX} = 360$ nm.

3.2. DETEKCIJA METALNIH IONA

Najzanimljivija pojava vezana uz sintetizirane CQD jest smanjenje intenziteta (prigušenje signala; eng. *Quenching*) fotoluminiscencije kada dođu u dodir s određenim metalnim ionima. Konkretno, ispitivanja prema određenim metalnim ionima provodila su se na instrumentu spektrofotometra. Vidljiv je spektar ovisnosti smanjenja intenziteta fotoluminiscencije u ovisnosti o valnim duljinama kada u dodir dođu sintetizirane CQD s navedenim metalnim ionima (slika 6).

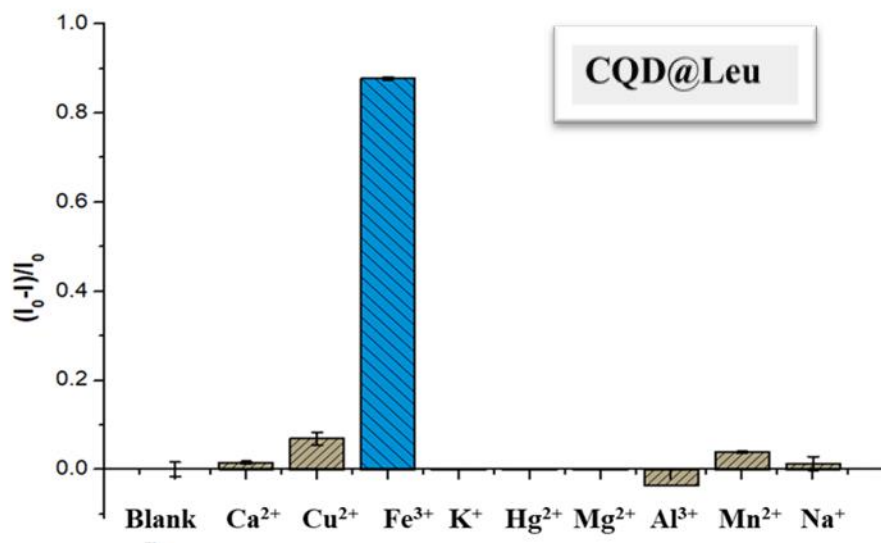
Na slici 6 vidljivi su grafički prikazi testiranja smanjenja intenziteta fotoluminiscencije CQD@Trp, CQD@Arg, CQD@Ala i CQD@His u dodiru s metalnim ionima. Vidljivo je kako svi uzorci CQD daju neki odziv u prisutnosti metalnih iona, dok je samo CQD@Leu dao selektivan odziv na Fe^{3+} ione (slika 7).



Slika 6: Dijagrami prikaza ovisnosti promjene intenziteta fotoluminiscencije ovisno o prisutnosti metalnih iona. Rezultati prikazuju afinitet sintetiziranih CQD na pojedini metalni ion.

Zanimljivo je kako su upravo CQD@Leu dale selektivan odziv (slika 7), odnosno selektivno najjače smanjenje intenziteta fluorescencije upravo prema Fe^{3+} ionima. Zhu i sur. [17, 23] kažu kako Fe^{3+} ioni najvjerojatnije koordiniraju s funkcionalnim skupinama koje su bogate dušikom i kisikom na površini CQD te kako ta pojava uzrokuje prigušenje signala („*quenching*“). Issa i sur. [24] dali su malo detaljniji opis mehanizma. Kažu kako Fe^{3+} ioni mogu koordinirati s funkcionalnim skupinama koje sadrže dušik i kisik na površini CQD te da pojava rezultira migracijom elektrona u pobuđenom stanju do polupopunjene d –orbitale Fe^{3+} iona s elektronskom konfiguracijom $[\text{Ar}]3d^5$ što uzrokuje značajno smanjenje intenziteta fotoluminiscencije.

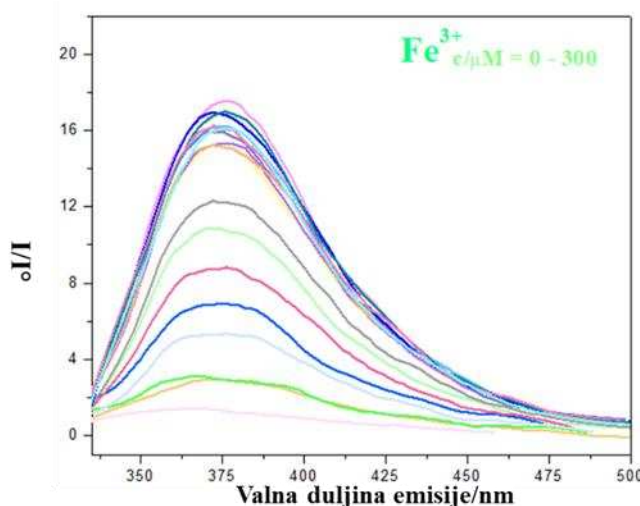
Budući da posjeduje najveću vrijednosti QY i selektivnost prema Fe^{3+} ionu, u nastavku je prikazana njegova fizikalno – kemijska, optička i strukturna karakterizacija.



Slika 7: CQD@Leu + Fe^{3+} spektar ovisnosti intenziteta fotoluminiscencije o valnoj duljini emisije/ nm testirano na različitim metalnim ionima.

Također, pošto su rezultati pokazali kako CQD@Leu daju selektivan odziv na Fe^{3+} ione, testiralo se do koje koncentracije dolazi do smanjenja intenziteta fotoluminiscencije. Na slici 8 je dijagram koji pokazuje kako se povećanjem koncentracije Fe^{3+} iona, povećava i vrijednost smanjenja

intenziteta fotoluminiscencije. Mjerenja su provođena pri koncentracijama u rasponu od 0 (blank proba) do 300 μM .



Slika 8: Dijagram ovisnosti smanjenja intenziteta fotoluminiscencije ovisno o množinskoj koncentraciji Fe^{3+} iona.

S obzirom na to da imamo selektivan odziv prema detekciji Fe^{3+} iona, razvijen je model čiju je primjenu moguće testirati i na realnim sustavima. Na slici 9, prikazana je eksponencijalna funkcija koja prikazuje prigušenje signala fotoluminiscencije ovisno o koncentraciji Fe^{3+} u vodenom sustavu. Jednadžba (2) koja opisuje logističku funkciju je sljedeća:

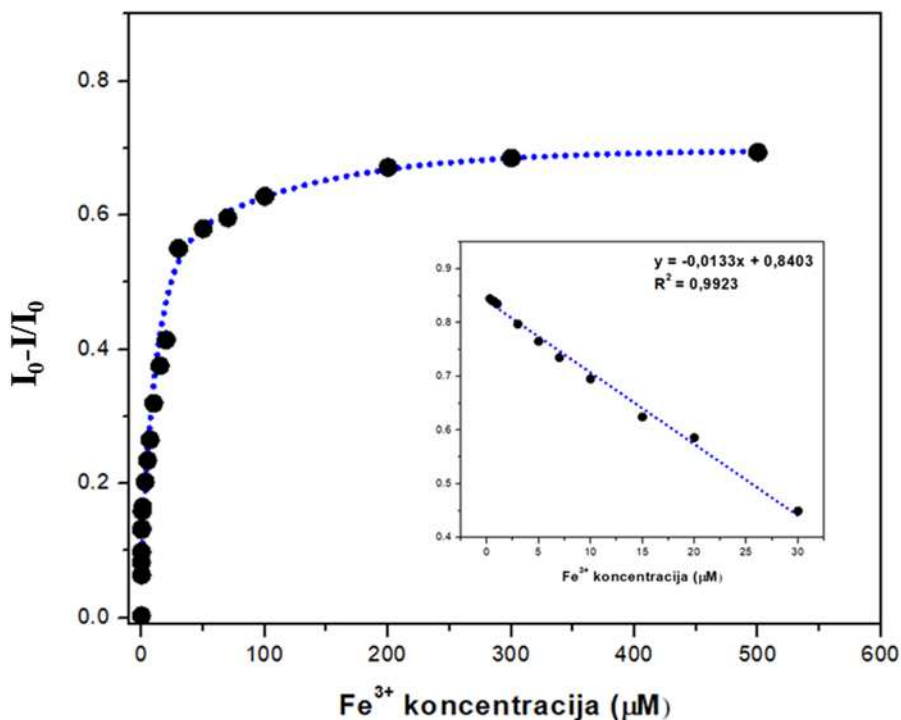
$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (2)$$

gdje A_1 označava početnu vrijednost, A_2 konačnu vrijednost krivulje, x_0 centar funkcije, dok p označava koeficijent strmine. Uvođenjem numeričkih koeficijenata dobije se sljedeća jednadžba (3):

$$y = 0,0903 - 0,7382 / (1 + (x/17,2847)^{0,89}) \quad (3)$$

O dobrom slaganju modela govori zadovoljavajući koeficijent determinacije od $R^2 = 0,9923$, dok je linearni dio ostvaren unutar koncentracijskog raspona od $c = 0,3 \mu\text{M}$ do $c = 30 \mu\text{M}$, s određenim parametrima limita detekcije $\text{LOD} = (1,77 \pm 0,01) \mu\text{M}$ i limita kvantifikacije $\text{LOQ} = (5,88 \pm 0,04) \mu\text{M}$. Ovi rezultati prikazuju potencijalnu primjenu uzorka CQD@Leu u realnim sustavima,

primjerice u monitoringu vode, bioimagingu, detekciji Fe^{3+} u prehrambenim proizvodima i slično [25].



Slika 9: Model za detekciju Fe^{3+} iona u modelnom sustavu. Prikazana je krivulja podataka s eksponencijalnom funkcijom ovisnosti relativnog fluorescencijskog odziva $(I_0 - I) / I_0$ u ovisnosti o koncentraciji Fe^{3+} iona uzorka CQD@Leu. Inset: linearni odziv u koncentracijskom rasponu od 0,3 μM do 30 μM otopine Fe^{3+} iona.

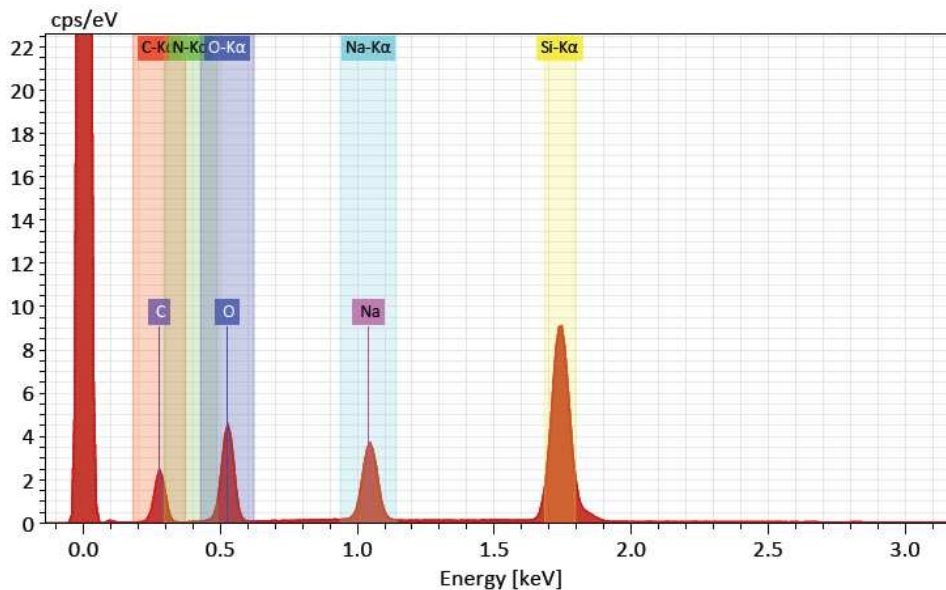
3.3. STRUKTURNA ANALIZA SINTETIZIRANIH CQD

Provedene analize struktura sintetiziranih CQD bile su XRD, AFM, EDS i DLS analize. EDS analiza je elementarna analiza uzorka koja pokazuje koliki je udio pojedinih sastavnih elemenata unutar ispitivanih uzoraka. Sintetizirane CQD sastoje se od ugljika, kisika i dušika što je vidljivo u tablici 5. Blank uzorak sintetiziran je kako bi se dobio referentni sustav za usporedbu s dopiranim CQD te je njegov sastav 28,31 % ugljika i 50,05 % kisika te dušik koji nije prisutan u kemijskom sastavu uzorka (slika 10). Dodatkom aminokiselina u proces sinteze nastaje produkt dušikom dopirane CQD te je iz tablice 5 vidljivo da je dušik prisutan u uzorcima. Na slici 11

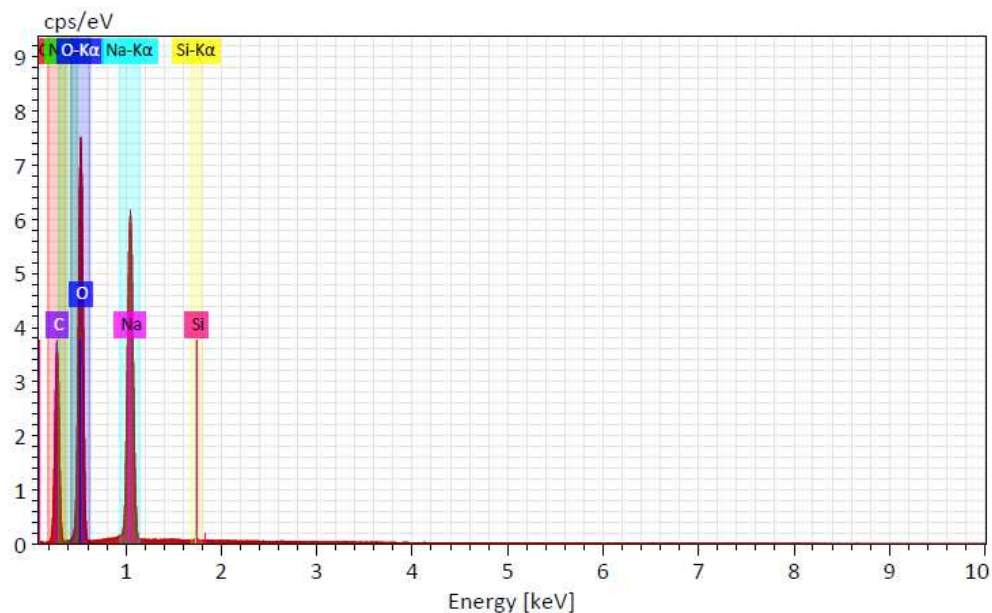
vidljivo je kako je prisutan i sadržaj natrija, a njegova prisutnost pripisuje se dodatku NaOH u koraku namještanja pH otopine na pH = 7.

Tablica 5: Elementarna analiza sintetiziranih CQD.

Uzorak	Maseni udio %			Atomski udio %		
	C (%)	O (%)	N (%)	C (%)	O (%)	N (%)
<i>Blank</i> _{LIMUNSKA}	28,31	50,05	-	46,55	35,07	-
<i>CQD@Leu</i>	40,48	46,44	1,60	45,11	38,85	1,53
<i>CQD@Trp</i>	34,31	42,60	3,23	43,19	40,26	3,49
<i>CQD@Arg</i>	37,83	46,14	5,69	42,18	38,62	5,44
<i>CQD@Lys</i>	24,01	30,14	2,04	42,42	39,98	3,09
<i>CQD@Ala</i>	37,22	49,52	3,33	41,18	41,14	3,16
<i>CQD@His</i>	39,82	42,63	6,21	45,50	36,57	6,09

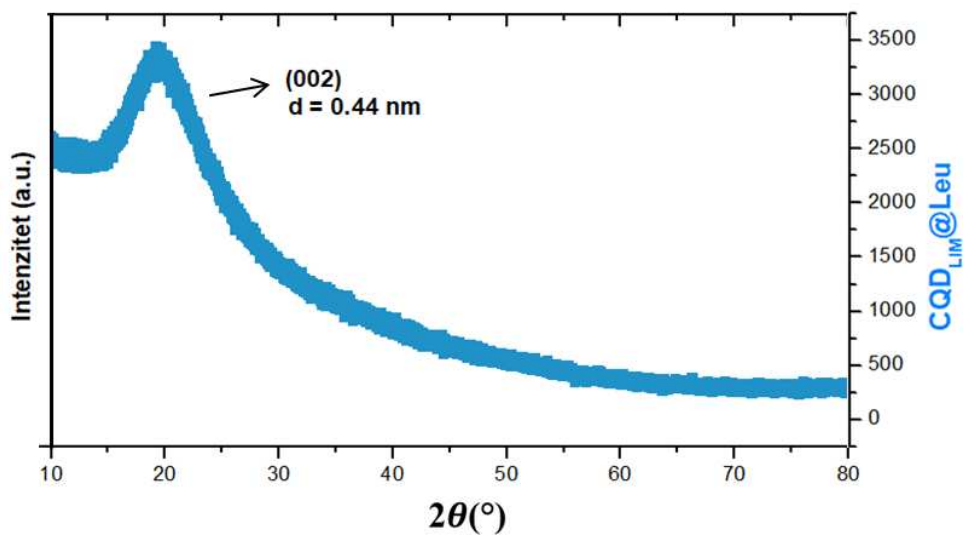


Slika 10: EDS prikaz *blank* uzorka CQD.



Slika 11: EDS prikaz pripremljenih CQD@Leu.

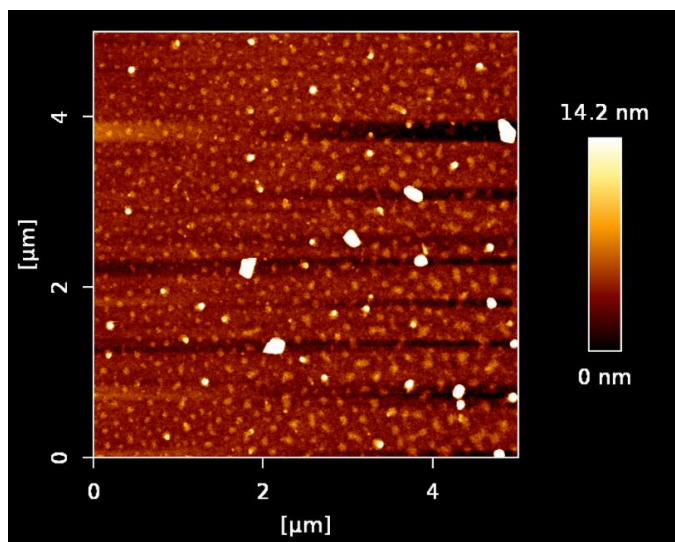
XRD mjerenja sintetiziranih CQD@Leu vidljivi su na slici 12. U radu su prikazani rezultati XRD – a CQD@Leu jer se uzorak pokazao kao najuspješniji produkt sinteze s najboljim svojstvima QY i selektivnosti odziva na Fe^{3+} ione.



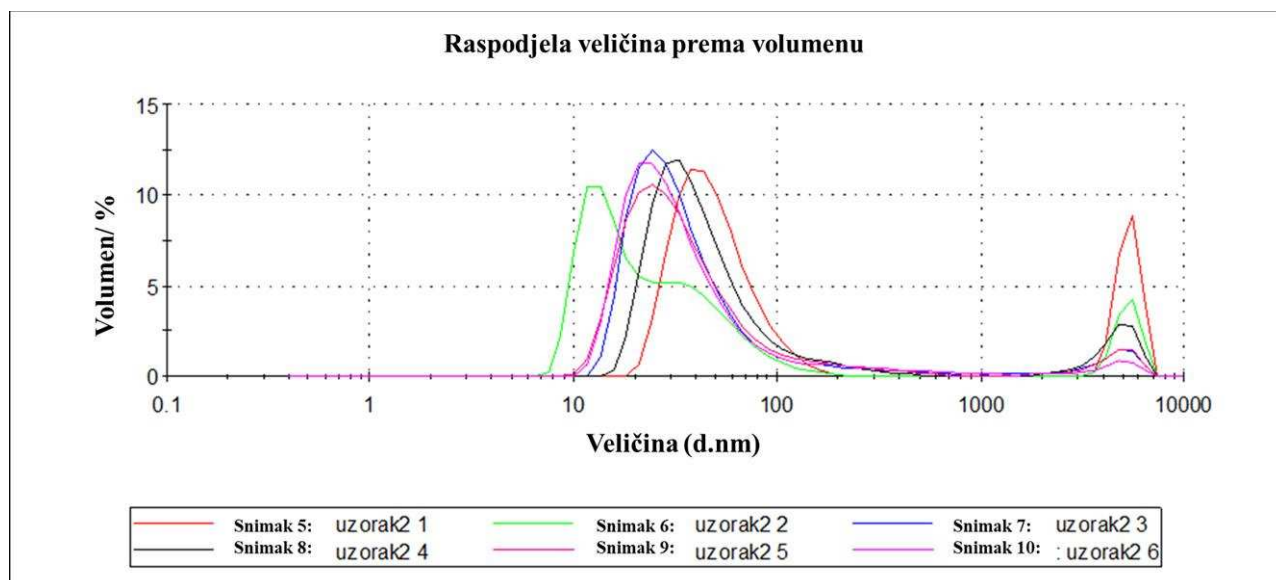
Slika 12. XRD prikaz CQD@Leu.

Prilikom XRD analize, koristio se uzorak CQD@Leu, jer, već spomenuto, ima najbolje karakteristike i svojstva. Rezultati XRD analize (slika 12) pokazuju široku difrakcijsku vrpcu na $2\theta = (20,14 \pm 2,84)^\circ$ što odgovara ravnini (002) i što je pokazatelj amorfne strukture čestica CQD@Leu. Amorfna struktura i naravno niži stupanj kristaliničnosti, uzrokovani su funkcionalizacijom površine. Ta je tvrdnja potvrđena međuslojnim razmakom od $(0,44 \pm 2,84)$ nm. Isto tako, difrakcijski vrh niske gustoće nije detektiran.

AFM analiza pokazuje kako je morfologija dobivenih čestica CQD sferična s maksimalnom detektiranom visinom od 14,2 nm (slika 13). Iz AFM snimki je vidljiva sferična morfologija čestica CQD@Leu te relativno uniformna raspodjela veličine čestica, isključivši prisutnost velikih agregata. Sukladno DLS rezultatima prikazanim na slici 14, vidljiva je prisutnost nanočestica veličine između 15 i 40 nm, što odgovara rasponu veličina čestica od 10-tak nm vidljivih na AFM snimci.

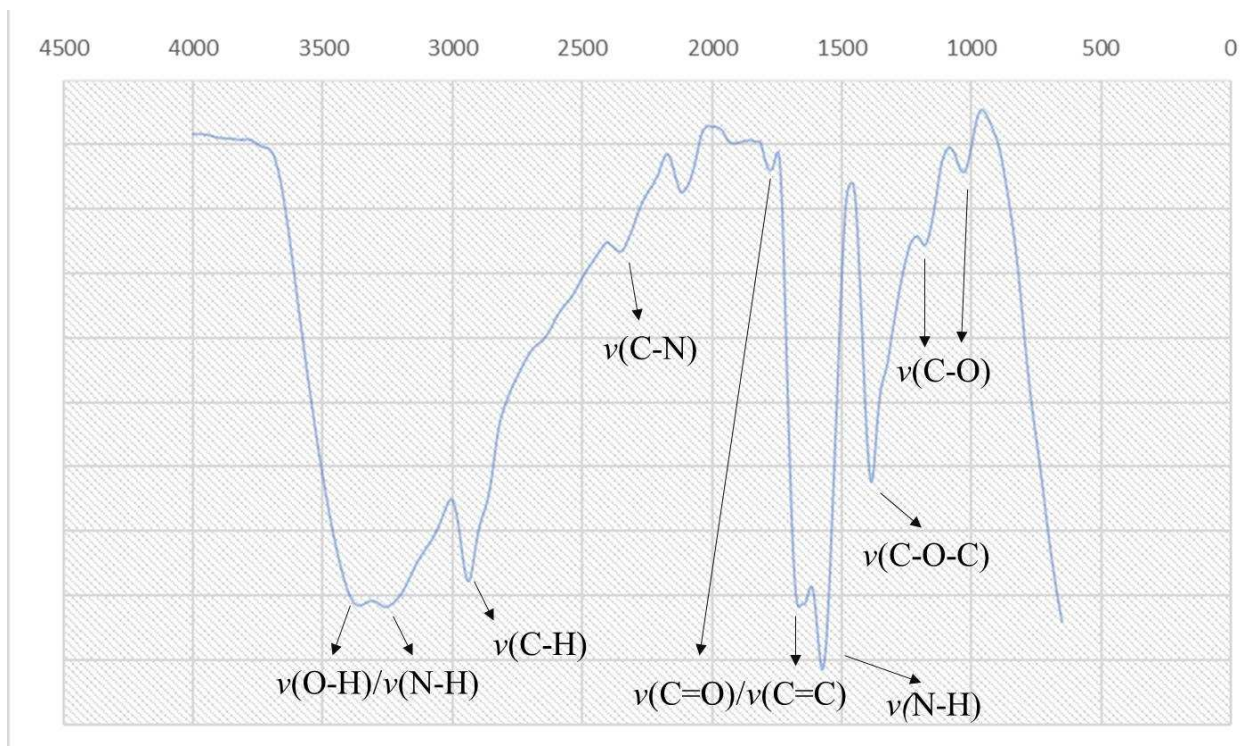


Slika 13: AFM snimka uzorka CQD@Leu. Maksimalna snimljena površina iznosi 14,2 nm.



Slika 14: DLS analiza sintetiziranih CQD@Leu.

Da bi se utvrdilo koje su funkcionalne skupine prisutne u promatranom uzorku CQD@Leu, provela se FTIR analiza (slika 15). Pri valnim brojevima $3220 - 3340 \text{ cm}^{-1}$ vidljive su široke vrpce koje su pokazatelj prisutnosti N – H i O – H veza. Oštra vrpca pri 2920 cm^{-1} upućuje na C – H istežanje, a slabija vrpca pri 2257 cm^{-1} pokazuje C – N istežanje veze. Pri valnim brojevima od $1533 - 1775 \text{ cm}^{-1}$ vidljive su vibracije rastezanja C = O i C = C nezasićenih veza koje su nastale unutar jezgri CQD. Oštra vrpca na 1574 cm^{-1} pokazatelj je N – H savijanja veze, a 1394 cm^{-1} je C – O – C istežanje veze. Vibracije istežanja C – O veza vidljive su na apsorpcijskoj vrpci pri 1029 cm^{-1} .



Slika 15: FTIR spektar CQD@Leu.

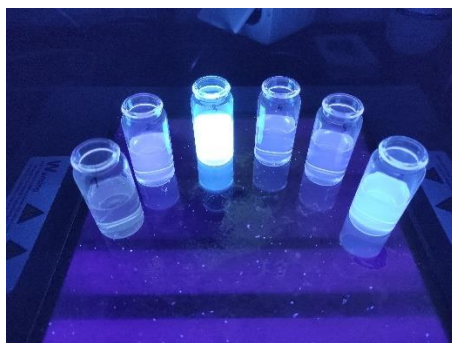
Kako bi se bolje razumjela priroda same površine CQD, provela se analiza mjerenja zeta potencijala čestica prisutnih u uzorcima, odnosno naboj na površini sintetiziranih CQD. Pri pH = 7, vrijednosti zeta potencijala za *blank* uzorak bile su $\zeta = -36 \pm 3,4$ mV. U tablici 6 su prikazane ostale izmjerene vrijednosti zeta potencijala svih uzoraka pri pH = 7 i pH = 3. Ono što je vidljivo iz tablice 6 jest da dodatkom aminokiselina u smjesu CQD, vrijednosti zeta potencijala idu ka manje negativnim vrijednostima (uz izuzetak CQD@Leu pri pH = 7). Pošto se na površini analiziranih CQD@Leu nalaze funkcionalne skupine kao što su karboksilna, hidroksilna i amino skupina, smatra se kako je najvjerojatnije došlo do njihove ionizacije. Radi se o tome da sintetizirane CQD imaju svoju izoelektričnu točku (pI). Pri vrijednosti nižoj od pI, uzorak je protoniran i on posjeduje pozitivan naboj na svojoj površini. Porastom pH vrijednosti iznad vrijednosti pI, (u lužnatom) stvara se negativan naboj na površini jer dolazi do deprotoniranja karboksilnih skupina. Tada vrijednost zeta potencijala ide ka više negativnim vrijednostima. To se još može objasniti tako da dodatkom amino skupina koje su pozitivne, smanjuje se negativan naboj koji se pripisuje karboksilnim skupinama CQD.

Tablica 6: Vrijednosti zeta potencijala (ζ) za CQD pri pH = 7 i pH = 3.

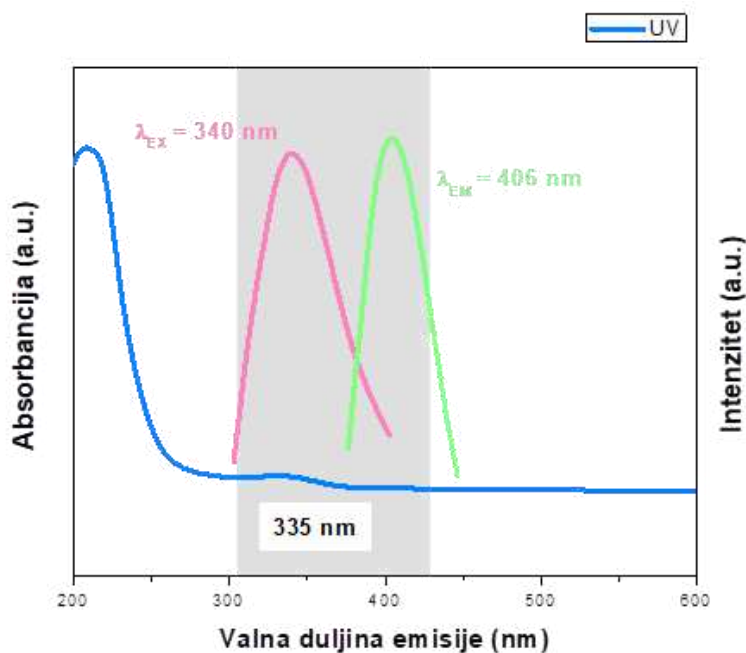
<i>pH</i>	Potencijal/mV StDev		Potencijal/mV StDev	
	3		7	
<i>BlankiMUNSKA</i>	-5,25	1,12	-36	3,4
<i>CQD@Leu</i>	-0,91	2,68	-47,7	3,2
<i>CQD@Trp</i>	-12,70	0,85	-24,2	2,3
<i>CQD@Arg</i>	-13,87	1,38	-14,7	1,7
<i>CQD@Ala</i>	-7,86	0,94	-15,8	1,3
<i>CQD@His</i>	-9,85	1,01	-26,9	2

3.4. OPTIČKA KARAKTERIZACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČKA

Sintetizirane CQD posjeduju svojstvo fotoluminiscencije što je vidljivo na slici 16. Testirala se njihova fotoluminiscencija tako da su se stavile na UV lampu i osvijetlile ultraljubičastim svjetlom u mračnoj prostoriji. Vidljivo je kako CQD@Trp daje intenzivnije svojstvo fotoluminiscencije u odnosu na ostale, a to je zato što aminokiselina Trp sama po sebi također posjeduje to svojstvo.



Slika 16: Sintetizirane CQD, redom; blank, CQD@Leu, CQD@Trp, CQD@Arg, CQD@Ala i CQD@His.

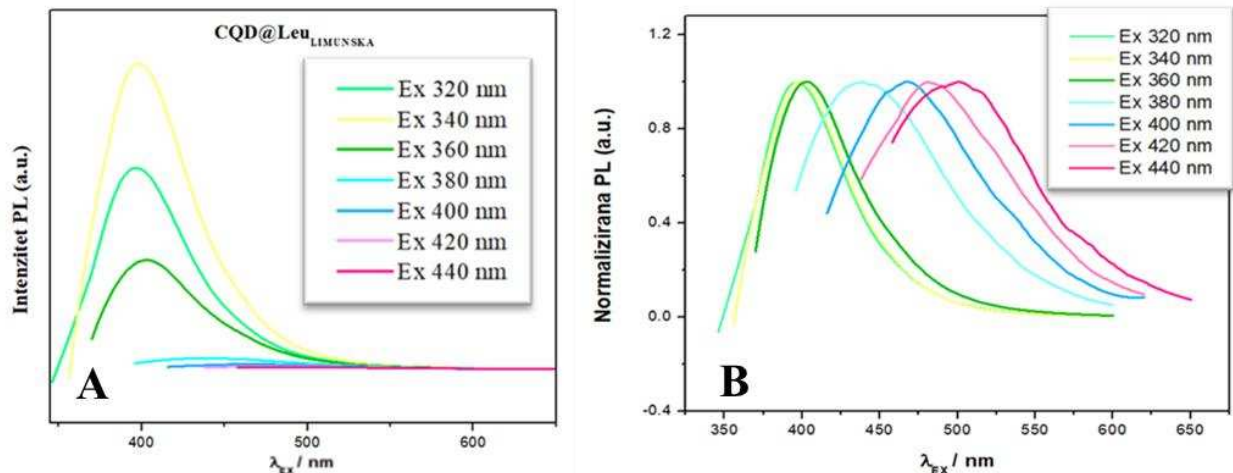


Slika 17: UV – VIS apsorpcijski spektar sa spektrima maksimuma fotoluminiscencije ekscitacije i emisije uzorka CQD@Leu za pH = 7.

Vrlo bitna karakteristika CQD je da pokazuju izraženu apsorpciju u UV području. Tako je snimljen fotoluminiscencijski spektar kako bi se opisalo ponašanje pripremljenih CQD uzoraka ovisno o ekscitaciji. Na slici 17 vidljiv je UV – VIS apsorpcijski spektar pripremljenih CQD@Leu. Literaturni podatci govore kako su vidljive dvije apsorpcijske vrpce od kojih je jedna obično valne duljine $\lambda_{EX}=270-280$ nm i ona ukazuje na C=C dvostruku vezu, a druga je oko $\lambda_{EX}=290-330$ nm te ukazuje na C=O dvostruku vezu [8]. Vidljiva je slabija apsorpcijska vrpca na valnoj duljini od 350 nm te se gledajući literaturu pretpostavlja da je to $\pi - \pi^*$ prijelaz dvostruke C=C veze koja govori da je prisutan sp^2 hibridizirani ugljik. Ugljik sp^2 hibridizacije upućuje na uređenu strukturu kristalinične prirode. Pri višim valnim duljinama dolazi do $n - \pi^*$ prijelaza slobodnih elektrona kisika u π^* protuveznu orbitalu.

Svojstvo fotoluminiscencije je najzanimljivije kada se govori o CQD. Mjerenjem intenziteta fotoluminiscencije CQD@Leu, izmjerena je maksimalna valna duljina emisije $\lambda_{EM} = 406$ nm pri valnoj duljini ekscitacije $\lambda_{EX} = 340$ nm (slika 17).

Vidljivo iz grafičkih prikaza na slici 18 je da se maksimum emisije kreće od 374 nm do 476 nm. Ti maksimumi odgovaraju području emisije plave svjetlosti. To je potvrđeno prema slici 16 gdje su sintetizirani uzroci pobuđeni UV lampom $\lambda_{EX}= 365$ nm gdje se vidi kako svi emitiraju plavu fotoluminiscenciju. Maksimum emisije od $\lambda_{EX}= 406$ nm dobiven je pobudom pod valnom duljinom od $\lambda_{EX}= 340$ nm.



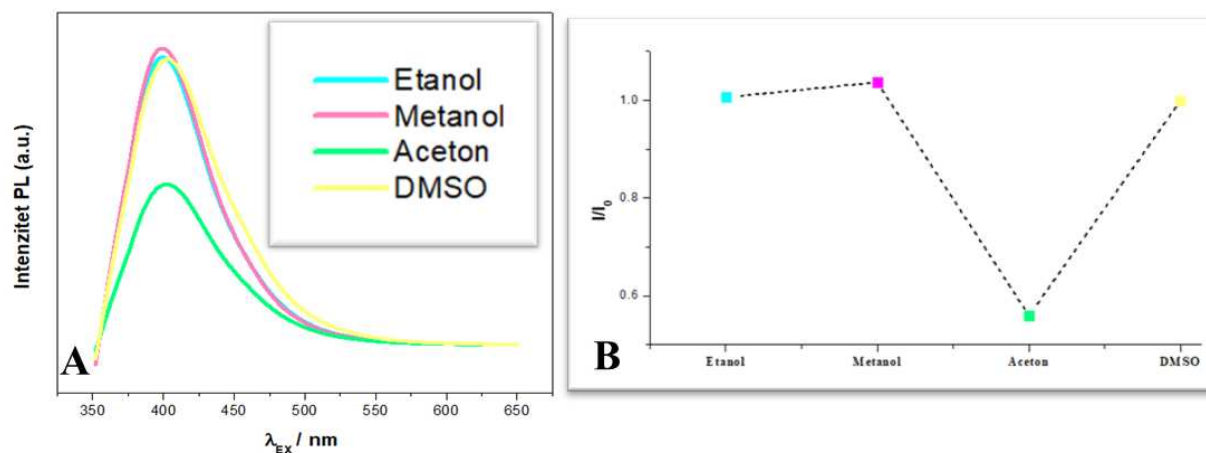
Slika 18. Optička karakterizacija CQD@Leu. A) Fotoluminiscencijski emisijski spektar CQD@Leu pri različitim valnim duljinama pobude od 320 nm do 440 nm (inkrementi od 20 nm); B) Normalizirani spektri emisije fotoluminiscencije CQD@Leu pri valnim duljinama pobude od 320 nm do 440 nm (inkrementi od 20 nm).

3.4.1. UTJECAJ OTAPALA I DISPERZIVNOSTI NA INTENZITET FOTOLUMINISCENCIJE

Kada se ustanovi struktura i funkcionalne skupine koje se nalaze na površini sintetiziranih CQD, tada se prema teoriji topljivosti, ona može opisati i eksperimentalno ispitati. Dakle, kada se radi o CQD, one tvore suspenzije i dispergiraju se unutar medija. Testiralo se kako intenzitet fotoluminiscencije CQD@Leu ovisi o 4 različita otapala – etanolu, metanolu, acetonu i dimetilsulfoksidu (DMSO). Ono što je vidljivo na prvom grafu (slika 19 A) jest da je najveći intenzitet emisije fotoluminiscencije postignut korištenjem DMSO - polarnog aprotičnog otapala. CQD na svojoj površini imaju polarne skupine što su pokazali rezultati FTIR analize, stoga su korištena polarna otapala za njihovo dispergiranje. Vidljivo iz grafova na slici 19, CQD@Leu pokazuje dobru disperzibilnost u etanolu i metanolu koji su polarna protična otapala. Disperzibilnost CQD@Leu u acetonu je manje uočljiva jer je aceton polarno aprotično otapalo. Razlika aprotičnih otapala (tablica 7) od protičnih je da protična otapala mogu donirati svoj proton u vodikovu vezu. Tako polarna protična otapala, poput metanola i etanola, svoj proton iz hidroksilne skupine, daju u vodikovu vezu. Aprotična otapala nemaju tu sposobnost.

Tablica 7: Korištena otapala.

etanol	polarno	protično
metanol	polarno	protično
aceton	polarno	aprotično
DMSO	polarno	aprotično

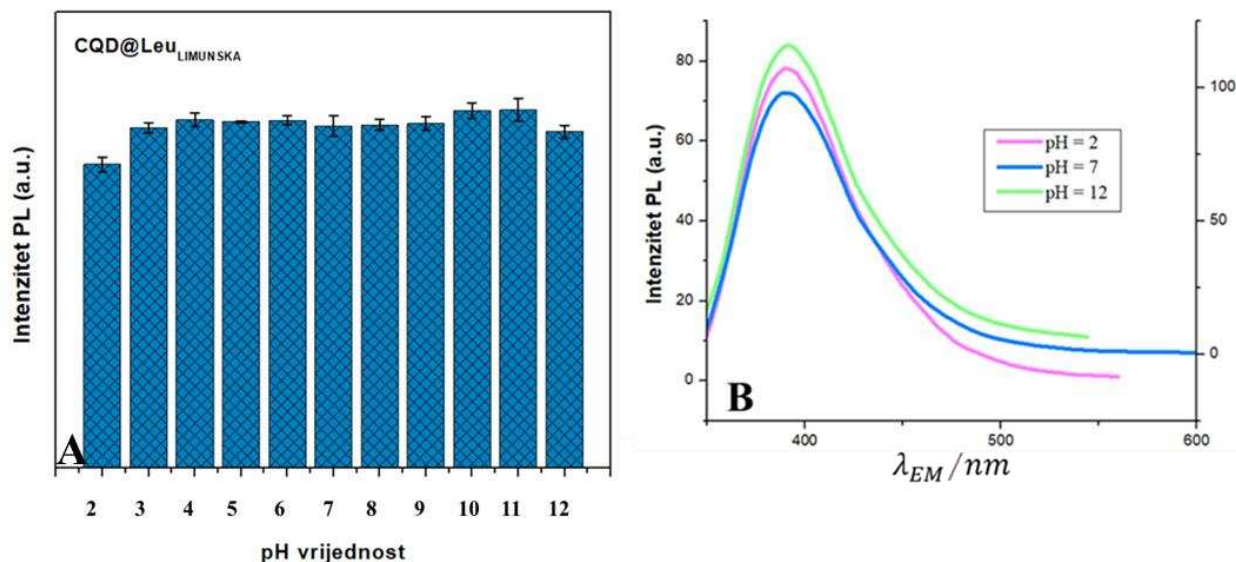


Slika 19. A) Intenzitet fotoluminiscencije u ovisnosti o valnoj duljini emisije/ nm pri $\lambda_{EX}=340$ nm. B) Intenzitet fotoluminiscencije CQD@Leu u otapalima: etanolu, metanolu, acetonu i DMSO – u.

3.4.2. OVISNOST INTENZITETA FOTOLUMINISCENCIJE O pH VRIJEDNOSTI

Intenzitet fotoluminiscencije sintetiziranog CQD@Leu ovisan je o pH vrijednosti medija u kojem se uzorak nalazi, što je vidljivo na slici 20 B gdje su vidljive manje razlike u samom intenzitetu. Stupićasti dijagram na slici 20 A pokazuje razlike u intenzitetu emisije fotoluminiscencije u odnosu na pH uzorka u rasponu pH vrijednosti od pH = 2 do pH = 12. Ono što možemo uočiti da se najveće razlike uočavaju pri ekstremno ispitanim pH vrijednostima pH = 2 i pH = 12. Duž velikog raspona mjenjenog pH područja, neke značajnije razlike nisu uočene. Cijeli fenomen možemo povezati i s mjerenjima ζ -potencijala koji je pri pH = 2 iznosio ζ -potencijal = $(3,71 \pm 1,1)$ mV, dok je kod pH = 12 vrijednost ζ -potencijala iznosio ζ -potencijal = $(-65,37 \pm$

3,68) mV. Iz ovih rezultata, jasno je za zaključiti da prilikom promjene pH vrijednosti medija dolazi do promjene naboja na površini čestica, dok uzrok tome može biti ionizacija funkcionalnih skupina na površini.



Slika 20. A) Ovisnost intenziteta fotoluminiscencije o pH vrijednosti CQD@Leu. B) Ovisnost intenziteta fotoluminiscencije o valnoj duljini emisije za pH vrijednosti pH = 2, pH = 7 i pH = 12 i valnoj duljini pobude $\lambda = 340$ nm.

3.4.3. ISPITIVANJE DISPERZIVNOSTI U VODENOM MEDIJU

Za ispitivanje disperzivnosti vagale su se prvo prazne falkon epruvete, a zatim epruvete koje sadrže sintetizirane uzorke. Nakon toga, stavile su se na otparavanje u uređaj SpeedVac i mjerila se masa nakon. Dobivena masa uzorka se zatim suspendira u 10 mL Milli-Q vode te se nakon centrifugiranja odvoji 5 mL supernatanta. Supernatant se zatim otpari te se masa odvaži. Stupanj disperzivnosti se računa prema jednadžbi (4):

$$L = \left(\frac{10}{5} \cdot \frac{b}{a}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

gdje oznaka L predstavlja stupanj disperzivnosti, simbol a masu uzorka, dok simbol b predstavlja masu supernatanta.

Iz rezultata je vidljivo da nema velike razlike između stupnja disperzivnosti uzoraka prije i poslije pročišćavanja. Ovaj fenomen je bio odmah vidljiv poslije sinteze uzoraka gdje nije bio vidljiv talog ili čestice nečistoće koji bi potencijalno mogao utjecati na disperzivnost uzorka. Na primjeru uzorka CQD@Leu vidi se da je postotak disperzivnosti prije pročišćavanja ($100,05 \pm 0,05$)%, dok je za poslije pročišćavanja razlika u vrijednosti od ($99,00 \pm 1,26$)% zanemariva.

4. ZAKLJUČAK

Hidrotermalnom sintezom pri uvjetima temperature od 180 °C u vremenu od 9 sati polazno od limunske kiseline i aminokiselina dobiju se CQD dopirane dušikom koje imaju jedinstvena kemijska, fizikalna i optička svojstva. Njihovu površinu moguće je modificirati dodatkom funkcionalnih skupina na samu površinu ili dopirati heteroatomima unutar same jezgre. Zahvaljujući tome, CQD mogu imati različita svojstva pogodna za primjenu u detekciji metalnih iona, nanotehnologiji i granama medicine.

Rezultati XRD analize, AFM -a i FTIR-a pokazali su kako je dobiveni produkt amorfne strukture te da posjeduje defekte na površini. AFM je pokazao kako je maksimalna snimljena površina CQD 14,2 nm te da su čestice sferičnog oblika. EDS analizom utvrđeno je kako se sintetizirane CQD sastoje od ugljika, dušika i kisika, dok vrijednost zeta potencijala ovisi primarno o namještenoj pH vrijednosti medija te o karboksilnim i amino skupinama na površini. Karboksilne skupine prinose negativnim vrijednostima zeta potencijala, a dodatkom aminoskupina te vrijednosti idu ka manje negativnima.

CQD od optičkih svojstava posjeduju svojstvo fotoluminiscencije koje je zaslužno za njihovu primjenu. Ovaj diplomski rad temelji se na ispitivanju smanjenja intenziteta fotoluminiscencije u cilju detekcije metalnih iona. Rezultati provedeni na spektrofluorimetru i ispitivanju optičke karakterizacije pokazali su kako CQD dopirane aminokiselinama pokazuju smanjenje intenziteta fotoluminiscencije kada dođu u dodir s određenim metalnim ionima. Tako je odziv bio pozitivan na ione bakra (Cu^{2+}), žive (Hg^{2+}) i željeza (Fe^{3+}). Ono što je bitno za daljnji rad na temu je selektivan odziv CQD@Leu na ione željeza (Fe^{3+}). Pokazalo se kako povećanjem koncentracije Fe^{3+} iona raste i vrijednost smanjenja intenziteta fotoluminiscencije. Svojstvo pokazano ispitivanjem na modelnom sustavu pokazalo se korisnim u korištenju CQD@Leu kao senzora za detekciju Fe^{3+} iona te se njihova primjena može proširiti i u sfere analize realnih uzoraka, primjerice u monitoringu vode, biološkim sustavima, ali i u prehrambenoj industriji.

LITERATURA

- [1] K. Dimos, Carbon Quantum Dots: Surface Passivation and Functionalization, *Current Organic Chemistry*, 20, (2016.), 682-695
- [2] N. Javed, D. M. O'Carroll, Long-term effects of impurities on the particle size and optical emission of carbon dots, *Nanoscale Advances*, 3 (1), (2021.), 182–189.
- [3] I. Singh, A. Riya, H. Dhiman, M. Pahwa, Carbon Quantum dots: Synthesis, Characterization, and biomedical applications; *Turk, J. Pharm, Sci*, (2018.), 15(2): 219 – 230.
- [4] X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H. J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, W. A. Scrivens, Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments, *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), (2004) 12736–12737. doi:10.1021/ja040082h
- [5] J. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija, Školska knjiga*, Zagreb, 2013.
- [6] S. Šafranko, S. Jokić, D. Gašo – Sokač, *Zelene sinteze ugljikovih kvantnih točaka iz biomase – Primjena u biomedicini i farmaceutskoj analizi*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2021.
- [7] L. Jiabao, Z. Sun, W. Zhou, Hydrothermal synthesis of bright blue-emitting carbon dots for bioimaging and fluorescent determination of baicalein, *Elsevier, Optical materials*, vol 13, (2020), 110796
- [8] Šafranko, S., Goman, D., Stanković, A., Medvidović – Kosanović, M., An overview of the recent developments in carbon quantum dots: promising nanomaterials for metal ion detection and (bio)molecule sensing; *Chemosensors*, (2021.) 9, 138.
- [9] M. Huang, X. Liang, Z. Zhang, J. Wang, Y. Fei, J. Ma, S. Qu, L. Mi, Carbon Dots for Intracellular pH Sensing with Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Nanomaterials* (2020), 10, 604, doi:10.3390/nano10040604.
- [10] E. Joseph, G. Singhvi, Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier, *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, (2019.), 91–116.

- [11] D. Titus, J. Jebaseelan, E. Samuel, S. M. Roopan, Nanoparticle characterization techniques. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, (2019.), 303–319.
- [12]. P. Zuo, X. Lu, Z. Sun, Y. Guo, H. He, A review on syntheses, properties, characterization, and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots, *Microchim Acta*. (2016.) 183:519–542.
- [13] H. Li, X. He, Y. Liu, H. Yu, Z. Kang, S. Lee, Synthesis of fluorescent carbon nanoparticles directly from active carbon via a one- step ultrasonic treatment, *Mater Res Bull*. (2011), 4:147–151.
- [14] F. Wang, Z. Xie, H. Zhang, C. Liu, Y. Zhang, Highly luminescent organosilane-functionalized carbon dots. *Adv Funct Mater*. (2011.) 21:1027–1031.
- [15] Y. Dong, J. W. Shao, C. Chen, H. Li, R. Wang, Y. Chi, X. Lin, G. Chen, Blue luminescent graphene QD and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. *Carbon*, (2012.) 50:4738–4743.
- [16] D. B. Shinde, V. K. Pillai, Electrochemical preparation of luminescent graphene Quantum Dots from multiwalled carbon nanotubes. *Chemistry*. (2012.) 18:12522–12528.
- [17] J. Peng, W. Gao, B. K. Gupta, Z. Liu, R. Romero-Aburto, L. Ge, L., Song, L. B. Alemany X. Zhan, G. Gao, S. A. Vithayathil, B. Kaiparettu, A. Marti, T. Hayashi, J. Zhu P. Ajayan, Graphene Quantum Dots derived from carbon fibers, *Nano Lett*, (2012.); 12:844–849.
- [18] Y. Cehn, X. Sun, W. Pan, Fe³⁺ Sensitive Carbon Dots for Detection of Fe³⁺ in Aqueous Solution and Intracellular Imaging of Fe³⁺ Inside Fungal Cells, 7, (2020.), 911.
- [19] D. Zhang, L. Guan, *Comprehensive Materials Processing*, Elsevier 2014.
- [20] T. Chatzimitakos, A. Kasouni, L. Sygellou, A. Avgeropoulos, A. Troganis, C. Stalikas, Two of a kind but different: Luminescent carbon quantum dots from Citrus peels for iron, and tartrazine sensing and cell imaging. *Talanta*, (2019.), 175:305-312.

- [21] S. Vandarkuzhali, S. Natarajan, S. Jeyabalan, G. Sivaraman, S. Singaravadivel, S. Muthusubramanian, B. Viswanathan, Pineapple Peel-Derived Carbon Dots: Applications as Sensor, Molecular Keypad Lock, and Memory Device. *ACS Omega*, (2018.), 3:12584-12592.
- [22] S. Šafranko, A. Stanković, S. Hajra, H. Joon Kim, Preparation of Multifunctional N-Doped Carbon Quantum Dots from Citrus clementina Peel: Investigating Targeted Pharmacological Activities and the Potential Application for Fe³⁺ Sensing, *Pharmaceuticals*, (2021.), 14, 857.
- [23] S. Zhu, Q. Meng, L. Wang, Highly photoluminescent carbon quantum dots for multicolore patterning sensors and bioimaging: *Angew. Chem*, (2013.), 125, 4045 – 4049.
- [24] M. A. Issa, Z. Z. Abidin, S. Sobri, S. A. Rashid, M. A. Mahdi, N. A. Ibrahim, Fluorescent recognition of Fe³⁺ in acidic environment by enhanced-quantum yield N-doped carbon dots: Optimization of variables using central composite design. *Sci. Rep.* 10 (2020), 11710.
- [25] Z. M. Marković, M. Labudova, M. Danko, Highly Efficient Antioxidant F- and Cl-Doped Carbon Quantum Dots for Bioimaging, *American Chemical society*, 8, 43, (2020.) 16327 - 16338