

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

## **Charakterizace nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik**

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Bc. Daniel Baron

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

**Olomouc 2014**

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

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

V Olomouci dne .....

.....

Bc. Daniel Baron

## **Poděkování**

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

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

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik. V prvních kapitolách se věnuje obecným vlastnostem nanočástic a jejich použití v medicíně nebo životním prostředí. Další kapitoly popisují využití magnetických nanočástic, jejich přípravu a možnosti stabilizace. Ve druhé části teorie jsou popsány fyzikální děje v kapilárních elektromigračních technikách, elektroosmotický tok, instrumentace v kapilární elektroforéze a typy elektromigračních technik. Poslední část teorie se zabývá proteiny použitými v experimentální části.

Experimentální část práce ukazuje využití kapilární elektroforézy pro separaci magnetitových ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanočástic, jejich chování v kapilární elektroforéze v různých základních elektrolytech a možnost studia interakcí mezi magnetitovými nanočásticemi a různými proteiny (hovězí sérový albumin,  $\beta$ -laktoglobulin, lysozym, cytochrom C, lidský sérový albumin a křenová peroxidáza) pomocí afinitní kapilární elektroforézy.

Cílem práce bylo ukázat, jak může být kapilární elektroforéza využita ke studiu interakcí nanočástic s biomolekulami, výpočtu interakčních konstant vzniklých komplexů, určení stechiometrických poměrů mezi nanočásticí a ligandem a odhadu typů interakcí.

## ABSTRACT

This thesis deals with the characterization of nanoobjects using capillary electromigration techniques. The first chapters are devoted to general properties of nanoparticles and their use in medicine or the environment. Next chapters describe the use of magnetic nanoparticles, their synthesis and possibility of stabilization. The second part of the theory describes physical phenomena in capillary electromigration techniques, electroosmotic flow, instrumentation in capillary electrophoresis and modes of electromigration techniques. The last part deals with the proteins used in the experimental section.

The experimental section of the work shows the use of capillary electrophoresis for analysis of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles, their electrophoresis behavior in different background electrolytes, and the possibility of studying the interactions between magnetite nanoparticles and various proteins (e.g. bovine serum albumin,  $\beta$  - lactoglobulin, lysozyme, cytochrome C, human serum albumin and horseradish peroxidase) using affinity capillary electrophoresis.

The aim of this work was to show how can be capillary electrophoresis used to study of interactions between nanoparticles and biomolecules and calculating interaction constants of resulting complexes, determination of stoichiometric ratios between nanoparticle and ligand and to estimate the types of interactions.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Daniel Baron
Název práce	Charakterizace nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	Tato diplomová práce ukazuje, jak může být kapilární elektroforéza využita pro charakterizaci nanočástic a v módu afinitní kapilární elektroforézy pro studium interakcí nanočástic s proteiny, z důvodu výskytu nanočástic v biologických vzorcích.
Klíčová slova	Magnetické nanočástice, kapilární elektroforéza, afinitní kapilární elektroforéza, proteiny, interakce
Počet stran	80
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Daniel Baron
Title	Characterization of nanoobjects by capillary electromigration techniques
Type of thesis	Master
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>This thesis shows how can be capillary electrophoresis used for characterization of nanoparticles. Interactions between nanoparticles and proteins can be also studied by an affinity capillary electrophoresis mode, as shown in the thesis. This is very important because of the presence of nanoparticles in biological samples.</p>
Keywords	Magnetic nanoparticles, capillary electrophoresis, affinity capillary electrophoresis, proteins, interactions
Number of pages	80
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

1 ÚVOD .....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1 NANOČÁSTICE.....	12
2.1.1 Historie a vlastnosti nanočástic .....	12
2.1.2 Využití nanočástic .....	13
2.1.2.1 Aplikace nanočástic v medicíně.....	14
Fluorescenční značky .....	14
Cílená doprava léčiv .....	15
Biodetekce patogenů .....	16
Detekce proteinů .....	16
Skenování struktury DNA .....	17
Tkáňové inženýrství .....	17
Likvidace nádorů.....	17
Separace a čištění biologických molekul a buněk.....	17
Kontrastní látky pro MRI .....	18
Fagokinetické studie.....	18
2.1.2.2 Aplikace nanočástic v životním prostředí.....	18
Typy nanočástic používaných v dekontaminačních technologiích .....	19
Nanoželezo .....	19
Bimetalické nanočástice .....	19
Emulgované nanoželezo .....	20
Oxidy a směsné oxidy.....	21
2.1.3 Magnetické nanočástice.....	21
2.1.3.1 Příprava magnetických nanočástic.....	22
Koprecipitace .....	22
Tepelný rozklad.....	22
Reakce v micelách - mikroemulzní techniky .....	23
Hydrotermální syntéza .....	23
2.1.3.2 Stabilita/ochrana a stabilizace magnetických nanočástic.....	24
Stabilita/ochrana magnetických nanočástic .....	24
Stabilizace nanočástic .....	25
Elektrostaticky stabilizované koloidní soustavy.....	26



Stéricky stabilizované koloidní soustavy .....	27
Povrchová pasivace mírnou oxidací .....	27
Pokrytí polymery a povrchově aktivními látkami.....	28
Pokrytí vrstvou ušlechtilého kovu.....	28
Pokrytí vrstvou SiO <sub>2</sub> .....	29
Nanočástice pokryté vrstvou uhlíku.....	29
Kompozitní materiály .....	30
2.1.3.3 Příprava a charakterizace použitých nanočástic.....	30
2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY .....	32
2.2.1 Úvod do kapilárních elektromigračních metod .....	32
2.2.2 Fyzikální děje v kapilární elektroforéze .....	33
2.2.3 Elektroosmotický tok (EOF) .....	35
2.2.4 Instrumentace.....	39
2.2.4.1 Zdroj napětí .....	40
2.2.4.2 Dávkování .....	40
Hydrodynamické dávkování .....	40
Elektrokinetické dávkování.....	40
2.2.4.3 Kapiláry.....	41
2.2.4.4 Detektory.....	41
Spektrofotometrické detektory .....	41
Detektory s laserem indukovanou fluorescencí (LIF).....	42
Amperometrické detektory.....	43
Vodivostní detektory .....	43
Hmotnostní spektrometrie (MS).....	43
Iontové zdroje .....	44
Hmotnostní analyzátory.....	45
Další detektory .....	46
2.2.5 Módy kapilárních elektromigračních metod.....	47
2.2.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	47
2.2.5.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC, MECC) .....	47
2.2.5.3 Kapilární gelová elektroforéza (CGE) .....	48
2.2.5.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	49
2.2.5.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) .....	49

2.2.5.6 Kapilární izotachoforéza (CITP).....	50
2.2.5.7 Afinitní kapilární elektroforéza (ACE).....	50
2.3 PROTEINY .....	53
2.3.1 Hovězí sérový albumin (BSA) .....	53
2.3.2 $\beta$ -laktoglobulin.....	54
2.3.3 Lysozym .....	54
2.3.4 Cytochrom C.....	54
2.3.5 Lidský sérový albumin (HSA).....	55
2.3.6 Křenová peroxidáza (HRP) .....	55
3 CÍL PRÁCE.....	56
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	57
4.1 Chemikálie .....	57
4.2 Příprava roztoků elektrolytů.....	57
4.3 Příprava kalibračních sad roztoků proteinů.....	58
4.4 Instrumentace a experimentální podmínky .....	58
4.5 Laboratorní pomůcky .....	59
5 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	60
5.1 Volba vhodného elektrolytu .....	60
5.2 Studium interakcí nanočástic s hovězím sérovým albuminem (BSA).....	63
5.3 Studium interakcí nanočástic s $\beta$ -laktoglobulinem .....	65
5.4 Studium interakcí nanočástic s lysozymem .....	66
5.5 Studium interakcí nanočástic s cytochromem C .....	68
5.6 Studium interakcí nanočástic s lidským sérovým albuminem (HSA).....	69
5.7 Studium interakcí nanočástic s křenovou peroxidázou (HRP).....	71
6 ZÁVĚR.....	73
7 LITERATURA.....	74
8 SEZNAM ZKRATEK.....	79

# 1 ÚVOD

Nanočástice, díky svým jedinečným vlastnostem zapříčiňují, velmi prudký rozvoj nanotechnologií. Tyto vlastnosti, které silně závisí na jejich rozměrech v řádu nanometrů a spousta druhů materiálů, ze kterých mohou být vyrobeny, činí z nanočástic (připravovaných v nejrůznějších tvarech) stále používanější a vyhledávanější materiál v mnoha oblastech lidské činnosti. Jejich využití v medicíně a biologii (fluorescenční značky, cílená doprava léčiv, biodetekce patogenů, tkáňové inženýrství, ...) nebo životním prostředí (např. při čištění odpadních vod) není výjimkou.<sup>1</sup>

Mezi nejstudovanější, patří nanočástice z magnetických materiálů. Takové částice fungují nejlépe pokud je jejich velikost pod tzv. kritickou hodnotou (obvykle 10 až 20 nm). Pak totiž každá taková nanočástice vykazuje superparamagnetické chování, což znamená, že jednotlivé nanočástice mají velký konstantní magnetický moment a chovají se jako obří paramagnetické atomy s rychlou odezvou na aplikované magnetické pole se zanedbatelným zbytkovým magnetismem a koercivitou. Tyto vlastnosti umožňují jejich použití pro širokou škálu různých aplikací (katalýza, MRI, paměťová média, ...), zejména pak biomedicínských.<sup>2</sup>

Vzhledem k použití nanočástic ve zdravotnictví nebo v životním prostředí je důležité, abychom věděli, jak se chovají v biologických vzorcích. Proto je nutné mít vhodnou techniku pro jejich charakterizaci, jež by umožnila také studium interakcí nanočástic s biomolekulami (proteiny, nukleotidy, ...). Pro svou rychlost, nenáročnou instrumentaci a mnohé další vlastnosti je k tomuto účelu možno využít velmi účinné separační metody – kapilární elektroforézy v módu afinitní kapilární elektroforézy (ACE). ACE experimenty jsou založeny na rozdílech v hodnotách elektroforetické pohyblivosti mezi volným analytem a komplexem analyt-ligand během analýzy. Ligand je přidáván v různých koncentracích do roztoku základního elektrolytu v různých koncentracích. Z vyhodnocených záznamů je pak možno odhadnout o jaký typ interakce se jedná, určit stechiometrický poměr mezi analytem a ligandem nebo dokonce určit interakční konstantu komplexu.<sup>1,3</sup>

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 NANOČÁSTICE

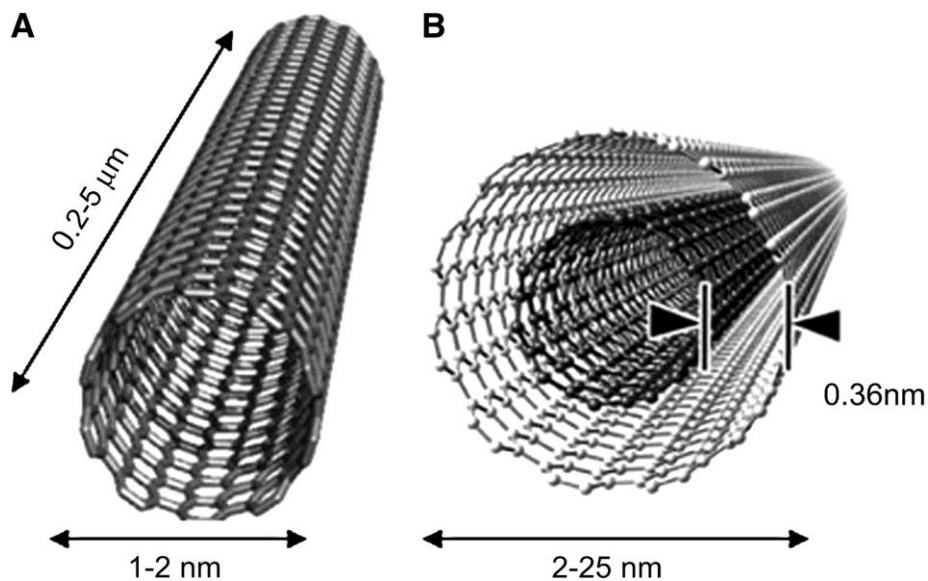
#### 2.1.1 Historie a vlastnosti nanočástic

V posledních desetiletích přitahují nanočástice (objekty s alespoň jedním rozměrem do 100 nm) díky svým unikátním vlastnostem pozornost lidí po celém světě, avšak lidé je znali již v pátém nebo čtvrtém století př. n. l. ve starověkém Egyptě nebo Číně, kdy se také objevují první zmínky o tzv. „rozpustném zlatě“. Již tehdy nanočástice používali jak pro estetické účely (barvení skla a keramiky), tak pro účely léčivé (srdeční a sexuální problémy, úplavice, epilepsie, syfilis atd.). Ve druhé polovině 19. století pak byly připraveny různé kovy v koloidní formě, např. zlato redukcí vodného roztoku  $[\text{AuCl}_4]^-$  (Michael Faraday, 1857).<sup>4,5</sup>

Raketový rozvoj nanotechnologií byl však započat po roce 1959. Tehdy také držitel Nobelovy ceny Richard Feynman vyřkl slavnou větu: „*There is a plenty of room at the bottom*“, kterou lze volně přeložit jako „*Tam dole je spousta místa*“.<sup>6</sup>

Nanočástice jsou připravovány v různých tvarech, velikostech (např. nanotrubic (jednotěnné i vícetěnné), nanodrátky/nanovlákná, nanodestičky, atomové klastry, kulové tvary nebo různé kombinace)<sup>7</sup> a z různých materiálů od organických dendrimerů, liposomů, přes zlato a jiné ušlechtilé kovy, uhlík, polovodiče až po oxidy kovů, zejména železa nebo oxidy křemíku, čímž je dosaženo zajímavých fyzikálních (např. magnetických, optických či elektrických) biologických nebo chemických (např. katalytických) vlastností vzniklých nanočástic, které u makroskopických látek nebo naopak molekul nejsou vůbec pozorovatelné.<sup>4,5</sup>

Jak již bylo zmíněno, v dnešní době existuje velké množství různých druhů nanočástic, avšak podle základního rozdělení rozeznáváme nanočástice kovové (kovy a jejich oxidy nebo sulfidy), polovodičové (selenidy, telluridy těžkých kovů, často označované jako kvantové tečky) a nekovové (různé typy uhlíku, např. fullereny).<sup>8</sup>



Obr.1: Ilustrace uhlíkových nanotrubic (A – jedinstěnná trubice, B – dvoustěnná trubice).<sup>9</sup>

### 2.1.2 Využití nanočástic

Před dvěma desetiletími bylo u nanočástic studováno především to, jak velikost nebo morfologie ovlivňuje jejich fyzikální nebo chemické vlastnosti, avšak dnes je sledováno, jak mohou být využity komerčně.<sup>1</sup>

Využití nanotechnologií a nanomateriálů je velmi rozsáhlé, nalézají uplatnění v mnoha odvětvích, jako je elektronika (paměťová média, spintronika, bioelektronika, kvantová elektronika), strojírenství (supertvrdé povrchy s nízkým třením, obráběcí nástroje), stavebnictví (nové izolační materiály, antiadhezní obklady), chemický průmysl (selektivní katalýza, aerogely), textilní průmysl (nemačkové tkaniny), elektrotechnický průmysl (vysokokapacitní záznamová média, fotomateriály, palivové články), optický průmysl (optické filtry, fotonické krystaly a fotonická vlákna, integrovaná optika), automobilový průmysl, kosmický průmysl nebo vojenský průmysl. Asi nejzajímavější možností jejich uplatnění je však aplikace ve zdravotnictví nebo v životním prostředí.<sup>6</sup>

### 2.1.2.1 Aplikace nanočástic v medicíně

Živé organismy jsou tvořeny buňkami, jejichž rozměry jsou větší než 10  $\mu\text{m}$ , nicméně části buněk jsou mnohem menší a dosahují velikostí sub-mikronů. Ještě menší jsou proteiny, jejichž typická velikost je pouhých 5 nm. Tato velikost je srovnatelná s rozměry uměle vyrobených nanočástic, které se připravují dnes. Toto jednoduché srovnání velikostí podává představu o využití nanočástic jako velmi malých sond, které by nám umožnily studovat buněčné pochody, aniž by došlo k příliš velkému narušování buněk. V posledních třiceti letech bylo organickými chemiky vyvinuto velké množství molekulárních sond, jež by sloužily právě k tomuto účelu. Kvůli vysoce nákladné a obtížné syntéze těchto sond, často špatné rozpustnosti ve vodě a dalším problémům je jejich použití omezené. Naproti tomu syntéza většiny nanostruktur je obvykle realizována jedinou reakcí, zahrnující chemickou transformaci prekursoru z anorganického materiálu s následným procesem nanokrystalizace v jedné nádobě. Díky snadné regulaci podmínek syntézy pak tyto materiály vykazují dobře reprodukovatelné vlastnosti.

Ačkoliv stále existují omezení pro použití nanočástic jako biologických sond (nanočástice jsou výrazně větší než molekulární sondy, a proto mohou stéricky blokovat aktivní místa biomolekul nebo problematická biokonjugace některých nanomateriálů) je jejich struktura a vlastnosti velmi působivé, a přirozeně tak ukazují na biologické využití nanočástic.

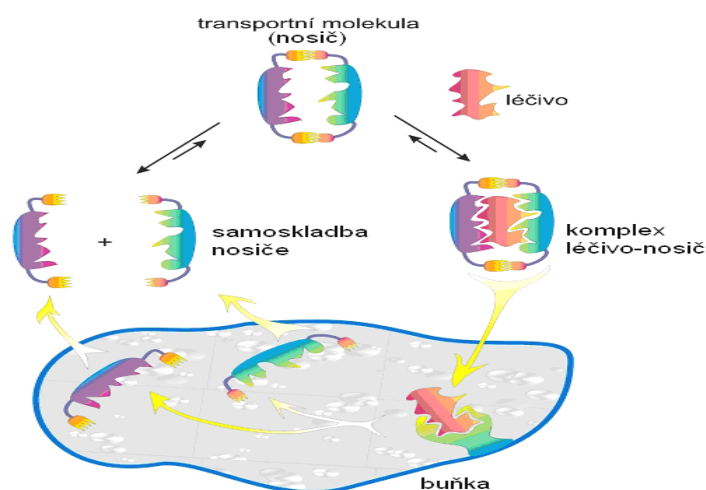
Pochopení biologických procesů pomocí nanomateriálů je významnou hnací silou rozvoje nanotechnologie.<sup>1,10</sup>

#### **Fluorescenční značky**

Různé in vivo, in vitro zobrazovací pokusy, tvorba imunokomplexů fluorescenčních nanočástic (kvantových teček) s proteiny a jejich vysoce citlivá a specifická detekce immunoluminescence. Detekční limity takových analytických postupů na základě FRET jsou pak velmi nízké (desítky ppt).<sup>11</sup>

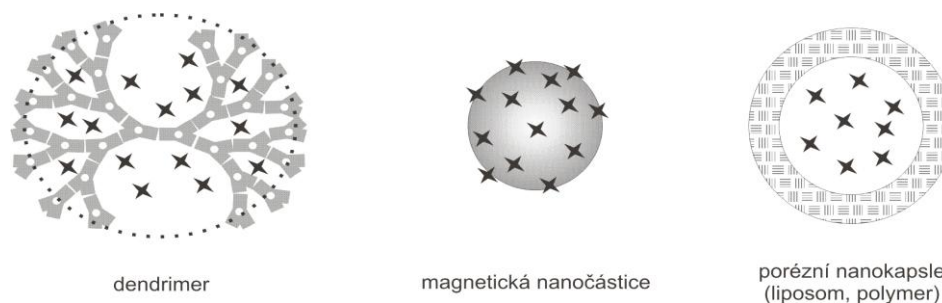
## Cílená doprava léčiv

Řada léků působí velmi nespecificky. Podléhají obecnému distribučnímu pravidlu v organismu což díky ataku zdravých tkání (především u chemoterapií) způsobuje značné vedlejší efekty. Podobně také protizánětlivá léčiva vyžadují (např. v případě chronické artritidy) cílenou lokalizaci, aby bylo zabráněno vedlejším účinkům a byl naopak vyvolán žádoucí terapeutický efekt. Cílený transport léčiv v pohledu nanomedicíny je založen na obecném postupu, kdy je léčivo zainkorporováno v nanočástici. Přitom nanočástice sama, nebo rozpoznávací elementy na jejím povrchu, umějí na základě specifických receptorů na povrchu buňky najít to pravé místo pro účinek. Vlastní realizace zahrnuje přípravu nanočástic, zachycení léčiva a připojení specifického receptoru, např. protilátky.<sup>12</sup>



Obr.2: Příklad transportu léčiva do buňky. Po navázání léčiva na nosič (nanočástici) a jeho dopravě do buňky dojde k disociaci komplexu. léčivo se naváže na příslušný receptor a nosič vycestuje ven.<sup>12</sup>

Dalším způsobem transportu léčiv v organismu je jejich enkapsulace. Tento proces zahrnuje použití liposomů a polymerů, které jsou použity jako nanočástice. Kolem léčiva vznikne kapsle. Z ní je léčivo uvolněno její biodegradací v organismu.<sup>12</sup>



Obr.3: Ukázky nanočástic pro cílený transport léčiv (léčivo je znázorněno hvězdičkou).<sup>12</sup>

### **Biodetekce patogenů**

K tomuto účelu je využíváno tzv. BARC („bead array counter“) biosenzorů. Streptavidinem značené paramagnetické nanočástice se specificky vážou na biotinylovaný vzorek DNA na povrchu čipu. Všechny nanočástice, které nejsou specificky vázány jsou odstraněny pomocí gradientu magnetického pole s elektromagnetem a senzory GMR („giant magnetoresistance“) detekují nanočástice, které zůstávají na povrchu. Intenzita a umístění signálu bude indikovat koncentraci a identitu patogenů přítomných ve vzorku.<sup>13</sup>

### **Detekce proteinů**

Tzv. „bio bar code“ technologie, kde se využívá dvou druhů částic: a) magnetické mikročásticové sondy s navázanými protilátkami, což jsou prvky, které se specificky vážou na cílový antigen (protein) a rozpoznávají unikátní sekvenci na biomolekule a b) nanočástice, které jsou kódovány DNA a tvoří „sendvič“ s cílovou skupinou a magnetickou částicí. Jedná se tedy o imunoreakci, kdy se sledovaný analyt váže pomocí specifických protilátek mezi magnetickou částicí a částicí značenou určitou DNA sekvencí. Po magnetické separaci imunokomplexu následuje dehybridizace oligonukleotidů na povrchu nanočásticové sondy. To umožňuje stanovení přítomnosti cílového proteinu identifikací oligonukleotidové sekvence, uvolněné z nanočásticové sondy.<sup>14-16</sup>



## **Skenování struktury DNA**

Adsorpcí oligonukleotidů na nanočástice CdS se mění intenzita luminiscence, kterou poskytují tyto kvantové tečky (intenzita luminiscence je závislá na jejich povrchu), Pomocí této metody lze potom zjistit, zda jsou tyto oligonukleotidy „rovné“, „zahnuté“ nebo „zauzlené“.<sup>17</sup>

## **Tkáňové inženýrství**

Skutečná kost je nanokompozitní materiál, který se skládá z krystalů hydroxyapatitu v organické matici, která je složena převážně z kolagenu. Díky tomu je kost mechanicky pevná a zároveň plastická, takže pokud je mechanicky poškozená, může se zotavit. Umělý hybridní materiál může být připraven z keramických nanočástic o velikosti 15-18 nm a polymethylmetakrylátového kopolymeru.<sup>1</sup>

## **Likvidace nádorů**

Obecně se využívá absorpčních schopností nanočástic cíleně usazených v nádorových tkáních. Po ozáření infračerveným laserovým nebo vysokofrekvenčním elektromagnetickým zářením dochází k destrukci nádorové tkáně. V terapii nádorů se nanočástice nejčastěji využívají u nádorů prostaty. V buňkách nádoru se shromáždí dostatečné množství magnetických nanočástic oxidu železa, které se rozkmitají vnějším vysokofrekvenčním magnetickým polem a zahřejí k teplotě kolem 50 °C. Tím dojde ke zničení nádorových buněk. Ve stádiu klinických testů je i léčba nádorů na mozku.<sup>18</sup>

## **Separace a čištění biologických molekul a buněk**

Buňky, buněčné membrány, receptory nebo jiné biologické molekuly mohou být kovalentně spojeny s nanočásticemi (např. protein A ze stafylokoka lze navázat na jodistanem oxidované feromagnetické kompozitní železito-dextranové částice). Buňky jež se specificky k těmto částicím váží lze potom jednoduše oddělit od matrice permanentním magnetem.<sup>19</sup>

## **Kontrastní látky pro MRI**

K tomuto účelu je využíváno nanočástic oxidů, zejména železa. Účinek kontrastních látek v MRI je nepřímý, ale jedná se o ovlivnění relaxace protonů (obvykle protony okolních molekul vody) kontrastními látkami. Jinými slovy, je to změna relaxační rychlosti protonů vody v přítomnosti USPIO („ultrasmall superparamagnetic iron oxide“), která je pomocí MRI detekovatelná a je zodpovědná za zvýšení kontrastu obrazu.<sup>20</sup>

## **Fagokinetické studie**

Kvantové tečky (polovodičové nanokrystaly) nám také umožňují zkoumat chování živých buněk po delší časové období a kvantifikovat změny, které v těchto buňkách probíhají. Poskytují tedy účinný nástroj pro studium procesů buněčné motility a migrace - chování, které je odpovědné za metastáze primárních nádorů a vznik sekundárních nádorů.<sup>21</sup>

### **2.1.2.2 Aplikace nanočástic v životním prostředí**

V posledních letech je nanočásticím věnována pozornost také v oblasti ochrany životního prostředí, zejména jejich využití v dekontaminačních technologiích. Jsou to technologie založené na chemickém rozkladu organických kontaminantů nebo imobilizaci/detoxikaci anorganických kontaminantů aplikací vhodných činidel přímo do horninového prostředí.

Nejnovějším trendem, který se začíná uplatňovat je využití reaktivních částic kovového nanoželeza. Díky obrovskému reakčnímu povrchu nanočástic se velká část reaktivních atomů vyskytuje na povrchu, na němž dochází k chemické reakci, což vede k vyšší reaktivitě nanočástic ve srovnání s materiálem vyrobeným z větších částic. Další výhodou nanočástic je, že díky svým rozměrům jsou schopny migrace porézním prostředím spolu s vodou, avšak silně závisí na kvalitě použitého materiálu (rozměry nanočástic). Získání takto kvalitního materiálu není vždy jednoduché, kvůli snadné agregaci nanočástic. Toto shlukování se projevuje růstem částic a jejich následnou sedimentací.<sup>22</sup>

## Typy nanočástic používaných v dekontaminačních technologiích

Nejpoužívanějšími a nejvhodnějšími nanočásticemi jsou pro tento účel částice elementárního železa (nZVI - z angl.: „nanosized zero-valent iron“). Železo zde funguje jako silné redukovačlo a navíc je prvkem, který se v životním prostředí vyskytuje přirozeně. Při jeho použití tedy nedochází ke vnášení cizorodé nebo dokonce toxické látky. Železo lze použít i v různých modifikacích, např. ve formě bimetalických nanočástic (BNP - z angl.: „bimetallic nanoparticle“) Fe/Ni, Fe/Pd, Fe/Pt, Fe/Ag atd., nebo jako emulzi s rostlinným olejem. Dále lze využít nanočástic oxidů (MgO, CaO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>) nebo směsných oxidů (MgO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).<sup>22</sup>

### **Nanoželezo**

Nanoželezo vystupuje jako donor elektronů, naproti tomu většina organických, ale i anorganických polutantů jako akceptor elektronů. Obecně lze tedy říci, že účinek nanočástic železa spočívá v transformaci těchto polutantů na méně toxické nebo dokonce úplně neškodné produkty. Například trichlorethen lze redukovat za vzniku ethanu:



Mezi další běžné kontaminanty, pro které lze použít nanočástic železa patří: chlorderiváty methanu, trihalomethany (chloroform, bromoform,...), chlorderiváty benzenu (hexachlorbenzen), chlorderiváty ethanu (vinylchlorid), chlorované pesticidy (DDT, lindan), polychlorované bifenyly, organická barviva (oranž II), těžké kovy (rtuť, nikl, kadmium, olovo, chrom) nebo některé anorganické anionty (dusičnany, chloristany).<sup>23,24</sup>

### **Bimetalické nanočástice**

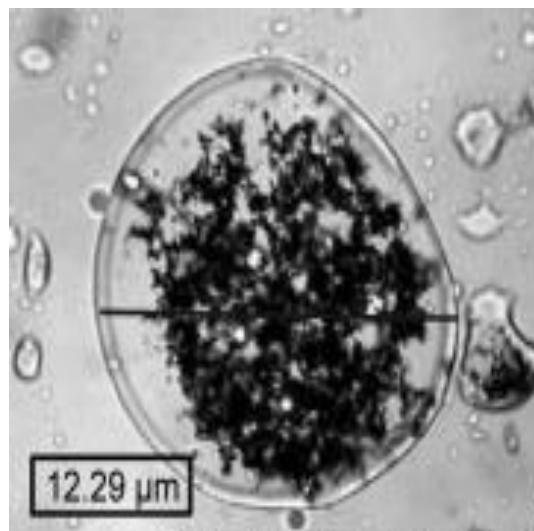
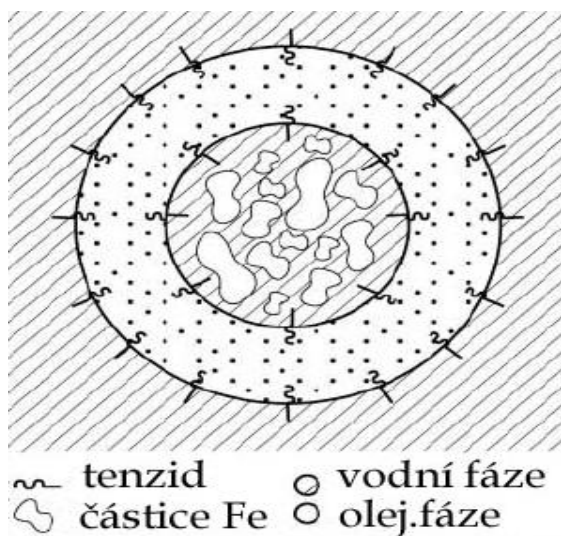
Reaktivita nZVI může být ještě zvýšena, pokud budou částice pokryty tenkou nesouvislou vrstvou (méně než jedno procento hmotnosti částice) ušlechtilého kovu. Páry železo - ušlechtilý kov pár v podstatě vytváří množství galvanických článků, přičemž železo slouží jako anoda a přednostně se oxiduje, zatímco ušlechtilý kov (katoda) je chráněn a zůstává beze změny. Studie rovněž naznačují, že vzácné kovy, jako je palladium může

podporovat dechloraci prostřednictvím katalytických funkcí, jako je hydrogenace. Bimetalické nanočástice jsou využívány především pro dekontaminaci podzemních vod a zemin.<sup>22,23,25</sup>

### ***Emulgované nanoželezo***

Nanočástic železa emulgovaných rostlinným olejem je využíváno při odstraňování hydrofóbních látek z kontaminovaného prostředí. Pokud se totiž kontaminant nemísí s vodou, nemůže jej samotné železo dostatečně rychle odbourávat. Je totiž značně hydrofilní a kontakt mezi železem a polutantem je malý, protože nanoželezo nemůže proniknout do shluku molekul kontaminantu. Zapouzdření nZVI v hydrofobní membráně jej navíc chrání, aby nepřišlo do styku s jinými složkami prostředí (anorganické materiály), které by s ním mohly reagovat, a tak snižovat počet aktivních nanočástic.

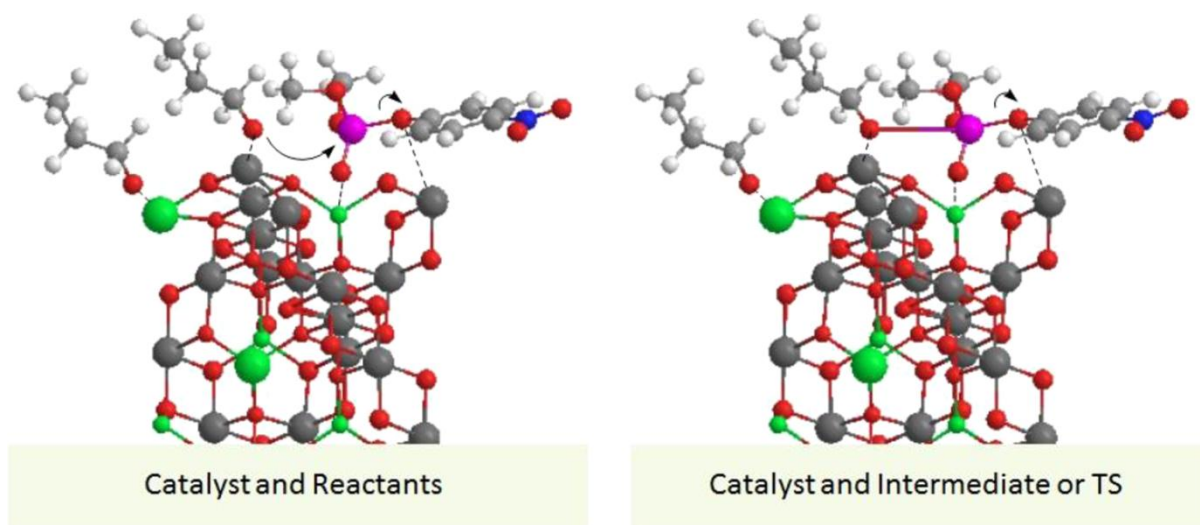
Kapka EZVI („emulgated zero-valent iron“) je složena z emulze oleje ve vodním prostředí, která je stabilizována tensidem a uvnitř níž jsou uzavřeny nanočástice železa ve vodě.<sup>26</sup>



Obr.4 a 5: Schematické zobrazení a fotografie emulzní kapky EZVI.<sup>26</sup>

## Oxidy a směsné oxidy

Tento typ nanočástic se využívá, zejména pokud je prostředí kontaminováno chlorovanými uhlovodíky nebo organofosfáty (organofosforové pesticidy). Nanočástice oxidů kovů mají díky svým rozměrům, polárnímu povrchu a tvarům výborné adsorpční vlastnosti. Odstraňování kontaminantů těmito částicemi je realizováno principem destruktivní adsorpce.<sup>27</sup>



Obr.6: Princip destruktivní adsorpce. Reaktanty a tranzitní stav na povrchu  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ .<sup>27</sup>

### 2.1.3 Magnetické nanočástice

V posledních letech je věnována stále větší pozornost magnetickým nanočásticím. Jedná se o částice, které nejčastěji obsahují magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), avšak připraveno bylo velké množství magnetických nanočástic jiných oxidů železa jako  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , MNP (magnetické nanočástice) čistých kovů, jako například (Fe, Co), spinelů typu feromagnetů ( $\text{MgFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) nebo dokonce nanočástic slitin ( $\text{CoPt}_3$ ,  $\text{FePt}$ ).<sup>2,28</sup>

Tyto částice nacházejí uplatnění při čištění odpadních vod (adsorpce těžkých kovů),<sup>29</sup> v magnetickém záznamu, spintronice, katalýze či v biomedicinských aplikacích.<sup>30</sup>

### 2.1.3.1 Příprava magnetických nanočástic

Obecně lze přípravu všech nanočástic rozdělit na „top – down“ metody, jež spočívají v rozrušování větších celků a „bottom – up“ metody, kdy nanočástice vznikají z molekulárních prekurzorů.<sup>31</sup>

Magnetické nanočástice jsou nejčastěji připravovány tzv. koprecipitací, tepelným rozkladem, redukcí, hydrotermální syntézou, reakcí v micelách nebo technikou laserové pyrolýzy. Tyto postupy umožňují připravit nanočástice, které jsou monodisperzní, vysoce stabilní a lze také dosáhnout požadovaného tvaru.<sup>2</sup>

#### Koprecipitace

Koprecipitace je poměrně pohodlný a snadný způsob, jak syntetizovat oxidy železa (buď  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nebo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) z vodného roztoku  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  solí přidavkem báze pod inertní atmosférou při laboratorní teplotě, přičemž velikost, tvar nebo složení MNP velmi závisí na typu použité soli (nejčastěji se používají chloridy, sírany a dusičnany), poměru kationtů  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , reakční teplotě, hodnotě pH, a iontové síle reakčního prostředí. Pokud jsou dodrženy stanovené podmínky syntézy, je kvalita vzniklých nanočástic plně reprodukovatelná.<sup>2</sup>

#### Tepelný rozklad

Po vzoru přípravy polovodičových nanokrystalů (tzv. kvantových teček) tepelným rozkladem organokovových sloučenin (dimethylcadmium, bis(trimethylsilyl)selenium, bis(terc-butyldimethylsilyl)tellurium apod.) v nevodném prostředí (pyridin, hexan, bezvodý methanol, ...) byly podobné postupy vyvinuty i pro nanočástice magnetické. Takto lze připravit monodisperzní nanočástice o velikostech v řádu jednotek nanometrů. Využívá se vysokovroucích organických rozpouštědel obsahující povrchově aktivní látky, jež zajišťují stabilizaci vznikajících nanočástic. Vychází se nejčastěji těchto prekurzorů: acetylacetonáty  $[\text{M}(\text{acac})_n]$ , kde  $\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cr}$  a  $n = 2$  nebo  $3$ , kovové kupferonáty  $[\text{M}^x\text{Cup}_x]$ , kde  $\text{M} =$  kovový ion a  $\text{Cup} = \text{N-nitrosofenylhydroxylamin}$ , nebo karbonyly (např. pro přípravu nanočástic  $\text{Fe}$  a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se využívá  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ , který je však toxický, a proto jej lze nahradit 2000x méně toxickým  $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ . Jako povrchově aktivních látek je využíváno mastných

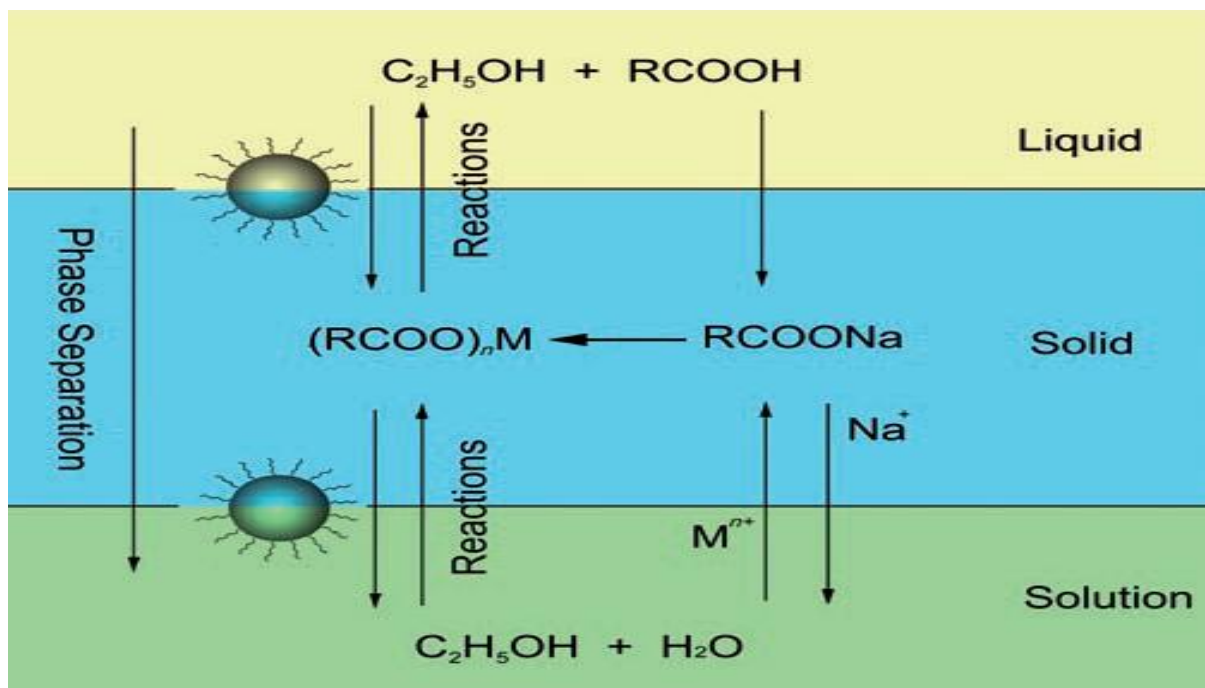
kyselin (olejová) nebo hexadecylaminu. Poměr výchozích reakčních složek, reakční teplota a doba jsou pak rozhodujícími parametry ovlivňující velikost a morfologii připravovaných částic.<sup>2,32,33</sup>

### **Reakce v micelách - mikroemulzní techniky**

Mikroemulze je termodynamicky stabilní izotropní disperze dvou nemísitelných kapalin. Dispergované kapičky jedné kapaliny v druhé jsou stabilizovány filmem PAL (povrchově aktivní látky). Touto metodou se připravují zejména nanočástice spinelů. V případě  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  je syntéza realizována smísením slabých vodných roztoků  $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$  a  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ . Potom je přidána PAL (dodecylbenzensulfonát sodný) a velký nadbytek toluenu, přičemž poměr vodné fáze a toluenu určuje velikost nanočástic. Díky dlouhodobému míchání (přes noc) se ze směsi stane jednofázový roztok. Nanočástice jsou tvořeny uvnitř micel, jakmile je za intenzivního míchání po kapkách přidáván roztok NaOH. Takto lze připravit velmi malé nanočástice o velikosti 2 - 5 nm, avšak o vysoké polydisperzitě.<sup>2,34</sup>

### **Hydrotermální syntéza**

Příprava nanočástic hydrotermální syntézou probíhá za vyšších teplot (200 °C u magnetitu, v případě  $\text{CoCr}_2\text{O}_4$  až 500 °C) a tlaků po dobu od 8 až po 72 hodin v autoklávech. Systém sestává z kovového linoleátu (pevná látka), směsi ethanol-linolová kyselina (kapalná fáze) a roztoku voda-ethanol. Tato strategie je založena na fázovém přenosu a separačním mechanismu, vyskytující se na rozhraní fáze kapalná, pevná a fáze roztoku, jež jsou v systému v průběhu syntézy přítomny. Takto připravované částice bývají monodisperzní a jejich velikost bývá jednotná (kolem 10 nm). Kromě magnetických nanočástic lze touto metodou připravit širokou škálu nanostruktur (polymerní, fluorescenční, polovodičové atd.).<sup>2,35,36</sup>



Obr.7: Schéma přípravy nanočástic hydrotermální syntézou založené na fázovém přenosu a separačním mechanismu, vyskytující se na rozhraní fáze kapalné, pevné a fáze roztoku (LSS).<sup>36</sup>

### 2.1.3.2 Stabilita/ochrana a stabilizace magnetických nanočástic

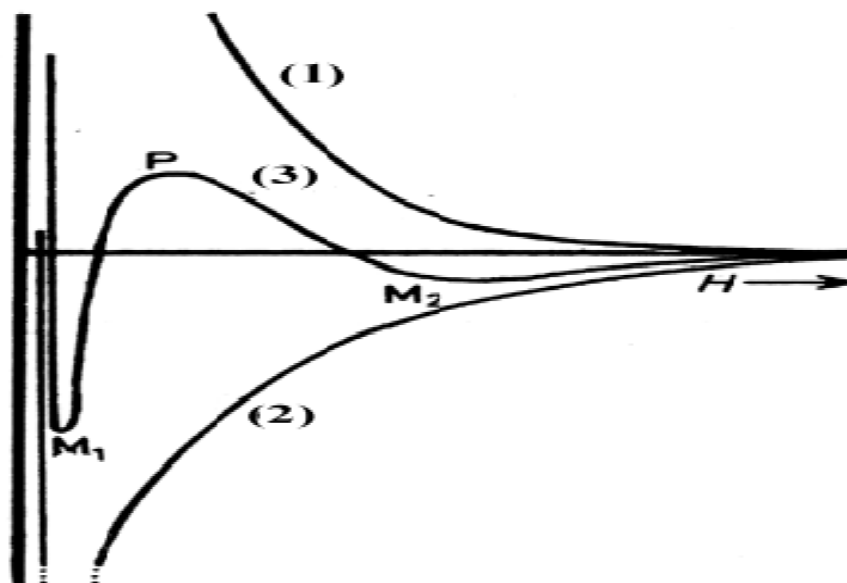
#### Stabilita/ochrana magnetických nanočástic

Stabilita je zásadní podmínkou pro téměř jakékoliv použití nejen magnetických nanočástic. Zejména čisté kovy, jako je Fe, Co, Ni a jejich kovové slitiny jsou velmi citlivé na působení vzduchu. Další důležitou otázkou je, jak uchovat nanočástice po dlouhou dobu bez toho, aniž by docházelo ke spojování do větších celků.<sup>2</sup>

Díky velkému povrchu částic disperzní fáze oplývá koloidní soustava přebytkem povrchové energie. Koloidní soustavy tedy existují ve stavu se zvýšenou energií danou existencí nadbytku povrchové energie a jsou tedy v tzv. metastabilním stavu. Chceme-li, aby koloidní soustava byla stabilní, musíme vytvořit dostatečnou energetickou bariéru, která zabráni poklesu povrchové energie a tím spojování částic. Agregaci částic dělíme na koagulaci a flokulaci a vznik agregátů (koagulátů a flokulátů) lze ukázat na křivce interakční energie. Na této křivce můžeme vidět tzv. první minimum energie ( $M_1$ ), kdy jsou nanočástice pospojovány vlivem silných přitažlivých sil a není je možné převést zpět do koloidní formy.



Jedná se o koagulaci. Pokud jsou částice ve vzdálenosti, kdy křivka dosahuje maxima (P), jedná se o stabilní soustavu, protože odpudivé mezimolekulové síly převažují nad přitažlivými. Toto maximum odpovídá energetické bariéře proti spojování částic. S další vzdáleností částic klesá hodnota interakční energie, protože klesá velikost přitažlivých i odpudivých sil. Někdy se na křivce objevuje ještě sekundární minimum ( $M_2$ ), kdy jsou částice poutány slabými silami a lze je převést zpět do koloidní formy. Jedná se tedy o flokulaci.<sup>37</sup>



Obr.8: Křivka interakční energie (3) v závislosti na rostoucí vzdálenosti částic  $H$ . (1) – křivka odpudivých sil, (2) – křivka přitažlivých sil.<sup>37</sup>

### Stabilizace nanočástic

Zatímco za přitažlivé síly je odpovědná fluktuace elektrického náboje v molekulách (van der Waalsovy interakce) a tyto síly klesají s šestou mocninou vzdálenosti částic, za síly odpudivé jsou odpovědny tzv. Bornovy repulze, klesající s dvanáctou mocninou vzdálenosti částic. Je tedy zřejmé, že odpudivé síly mají v porovnání se silami přitažlivými kratší dosah, a proto je pro stabilizaci nanočástic (dosažení potřebné energetické bariéry) potřeba dodatečně zvýšit odpudivé síly, což lze realizovat elektrostaticky nebo stéricky.<sup>37</sup>

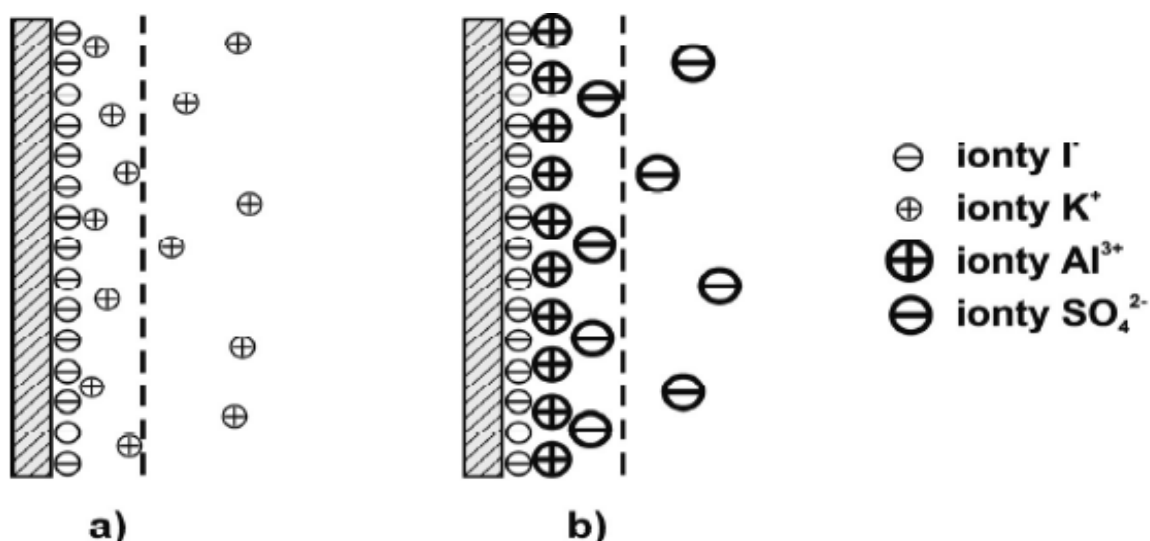
## Elektrostaticky stabilizované koloidní soustavy

U takto stabilizovaných soustav (soustavy stabilizované elektrickou dvojrivrstvou) jsou odpudivé interakce nejčastěji dány elektrickým nábojem elektrickým nábojem na povrchu částice. Elektrostatické chování dvou částic nesoucí stejný náboj popisuje Coulombův zákon:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2} \quad (1)$$

kde  $F$  je elektrická síla,  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $\epsilon_r$  je relativní permitivita prostředí,  $q_1$  a  $q_2$  jsou velikosti nábojů a  $r$  je vzdálenost nábojů od sebe.

Z tohoto zákona vyplývá, že odpudivá síla dvou částic klesá s druhou mocninou jejich vzdálenosti. Pokles těchto odpudivých sil je s rostoucí vzdáleností nanočástic menší než u Van der Waalsových přitažlivých sil, a proto jsou tyto elektrostatické interakce dostatečně velké, aby zabránily agregaci. Pokud je však k takové soustavě přidán elektrolyt, je elektrická dvojrivrstva stlačena a snížen zeta potenciál. Částice se pak mohou více přiblížit, což může mít za následek jejich agregaci.<sup>37</sup>



Obr.9: Stlačování elektrické dvojrivrstvy přidavkem elektrolytu. a) sol AgI bez přítomnosti solí, b) stlačení elektrické dvojrivrstvy vlivem vzrůstu iontové síly.<sup>37</sup>

## ***Stéricky stabilizované koloidní soustavy***

Stérická stabilizace nanočástic spočívá ve vytvoření ochranné vrstvy, která brání jejich agregaci, ale zároveň chrání nanočástici proti okolnímu prostředí, takže např. již zmíněný kyslík se nemůže k povrchu magnetické částice vůbec dostat. Vznikají tak částice se strukturou jádro-obal, jenž jsou nazývány jako „core-shell“ nanočástice. Podle toho, z čeho je složen „obal“ nanočástice (shell) můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin:

- a) „obaly“ organické (povrchově aktivní látky a polymery)
- b) „obaly“ anorganické ( $\text{SiO}_2$ , karbidy, ušlechtilé kovy nebo oxidy vytvořené mírnou oxidací povrchu nanočástice)

Další alternativou je jejich rozptýlení v husté matrici (polymeru,  $\text{SiO}_2$ , ...) za vzniku kompozitního materiálu, což rovněž zabraňuje agregaci a oxidaci. Tyto částice už ale nejsou volně dispergovatelné.<sup>2</sup>

### **Povrchová pasivace mírnou oxidací**

Jedná se o vytvoření tenké vrstvy oxidu na povrchu nanočástice, která zabrání další oxidaci. Tento jev se nazývá pasivace a lze ji provést několika způsoby:<sup>2</sup>

a) agregace v plynnou fázi - Oxid vzniká zaváděním řízeného proudu kyslíku do agregační zóny. např. pro vytvoření filmu  $\text{CoO}$  na nanočásticích  $\text{Co}$ .<sup>38</sup>

b) oxidace pomocí plazmatu kyslíku - Při přípravě nanočástic v micelách jsou pomocí plazmatu kyslíku tyto micely rozrušeny a na povrchu částic je vytvořen film oxidu.<sup>39</sup>

c) oxidace syntetickým vzduchem - Tato metoda byla použita např. při přípravě nanočástic  $\text{Co}$  tepelným rozkladem  $\text{Co}_2(\text{CO})_8$  za přítomnosti  $\text{Al}(\text{C}_8\text{H}_{17})_3$ . Směsí obsahující vzniklé nanočástice byl pak kapilárou probubláván syntetický vzduch po dobu šesti hodin.<sup>40</sup>

Takto připravené „core-shell“ nanočástice mají obvykle dobře definovanou tloušťku „obalu“.<sup>2</sup>

## Pokrytí polymery a povrchově aktivními látkami

Tyto látky jsou často využívány k pasivaci povrchu nanočástic v průběhu syntézy, ale i po syntéze, aby bylo zabráněno jejich agregaci. Mohou totiž být na povrchu nanočástic naadsorbovány nebo pokud mají funkční skupiny (karboxylové kyseliny, fosfáty, sulfáty) chemicky navázány. Tím je vytvořen „obal“, jež stéricky zabraňuje přitahování nanočástic. Asociáty nanočástic s některými biokompatibilními polymery jsou pak velmi intenzivně studovány pro jejich možné využití v medicíně (již zmíněná cílená doprava léčiv a kontrastní činidla pro MRI).<sup>2</sup>

Takto stabilizované nanočástice se připravují např. reakcí v micelách, kdy jsou k reakční směsi přidány monomery a iniciátor pro polymeraci. Směs je pak zahřata na teplotu při které probíhá polymerace.<sup>41</sup>

## Pokrytí vrstvou ušlechtilého kovu

Jako ideální ušlechtilý kov pro tyto účely se zdá být zlato, kvůli jeho nízké reaktivitě, navíc zlatý povrch vzniklé částice může být následně funkcionalizován thiolovými skupinami, čehož bývá využíváno v katalýze, optice nebo elektrochemii (povrchy elektrod).<sup>42</sup>

Bylo však zjištěno, že přímé vytvoření vrstvy zlata na magnetickou nanočástici je kvůli odlišnému charakteru obou povrchů obtížné.<sup>2</sup>

Přípravu takových nanočástic lze realizovat např. redukcí zlatitých solí na povrchu magnetické nanočástice: vpravením připravených nanočástic kobaltu stabilizovaných pomocí 3-(N,N-dimethyldodecylammonium)propansulfonátu (SB12) do roztoku  $\text{KAuCl}_4$  v THF (tetrahydrofuran) dojde k redukci  $\text{Au}^{3+}$  na Au povrchovými atomy kobaltu.<sup>43</sup>



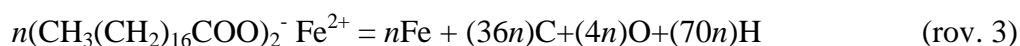
## Pokrytí vrstvou SiO<sub>2</sub>

Mezi výhody „obalů“ magnetických jader z oxidu křemičitého patří jejich stabilita ve vodném prostředí (alespoň, pokud je hodnota pH dostatečně nízká), snadná modifikace povrchu a jednoduchá kontrola mezičásticových interakcí, a to jak v roztoku, tak uvnitř struktury.<sup>2</sup>

Nejpoužívanější techniky pro nanášení SiO<sub>2</sub> na povrch nanočástic jsou Stöberova metoda, kdy se jedná o hydrolyzu alkyl silikátů a následnou kondenzaci kyseliny křemičité v alkoholických roztocích. Jako morfologický katalyzátor se zde používá amoniak<sup>44</sup> a tzv. sol-gel procesy, které jsou založeny na přípravě koloidní suspenze - solu, který je převeden na viskózní gel a následně na pevný materiál. Prvním krokem hydrolytických sol-gelových reakcí je hydrolyza prekurzoru, např. alkoxidu, amidu, chloridu kovu), při které vznikají hydroxylové skupiny. V následujícím kroku dochází k polykondenzaci produktů hydrolyzy mezi sebou nebo s nezreagovanými molekulami prekurzoru. Vznik vrstvy SiO<sub>2</sub> bývá realizován transformací TEOS (tetraethoxysilan) na SiO<sub>2</sub>.<sup>45</sup> Povrchy takových nanočástic jsou hydrofilní a lze je opět modifikovat vnášením různých funkčních skupin, což opět vede k jejich použití v medicíně.<sup>2</sup>

## Nanočástice pokryté vrstvou uhlíku

Tyto částice jsou hodně studované, protože materiál na bázi uhlíku má mnoho výhod, jako např. velká tepelná stabilita, odolnost proti chemikáliím a biokompatibilita.<sup>2</sup> Velmi jednoduše lze takové nanočástice připravit pyrolýzou některých látek. Např. stearát železnatý může být přímo převeden na nanočástice Fe a Fe<sub>3</sub>C zapouzdřené ve struktuře uhlíku o tvaru mnohostěnu.



Nanočástice jsou potom tvořeny řadou procesů, jako je agregace atomů, segregace, difúze, srážení uhlíku na povrchu částic, nukleace atd. Další možností je příprava takových nanočástic pomocí obloukového výboje.<sup>46</sup>

## Kompozitní materiály

Někdy je obtížné zabránit agregaci nanočástic, avšak pokud není nutné, abychom měli nanočástice izolované, relativně jednoduchým způsobem ochrany takových nanočástic je jejich přímé začlenění do matrice. Nanočástice v těchto materiálech jsou náhodně rozděleny v koherentní matici, a proto není systém zcela homogenní. Nicméně, tyto nanočástice mají dobrou stabilitu a kompozitní materiály dokáží udržet požadované magnetické nebo jiné (optické) vlastnosti. Tyto materiály dělíme podle toho, zda nanočástice v nich jsou:

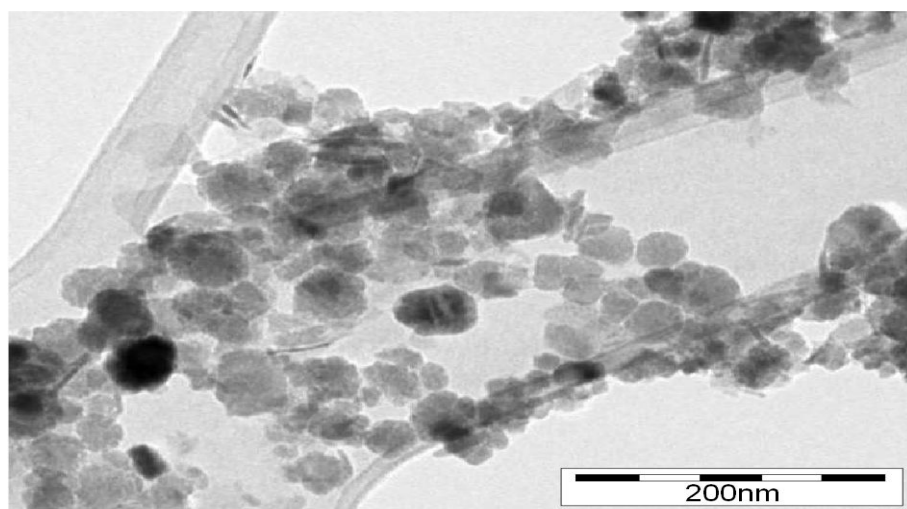
- a) rozptýleny kontinuálně
- b) rozptýleny v „obalech“ jiných, větších částic
- c) aglomeráty částic, jenž jsou propojeny svými „obaly“.<sup>2</sup>

### 2.1.3.3 Příprava a charakterizace použitých nanočástic

V experimentální části této práce byly použity karboxylované magnetitové ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanočástice typu „core-shell“ stabilizované pomocí PAA (polyakrylová kyselina), jež byly připraveny týmem prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) v Olomouci.

600 mg PAA bylo rozpuštěno v 30 ml redestilované vody. Do vzniklého roztoku byl přidán 1 ml vodného roztoku NaOH o koncentraci  $10 \text{ mol.l}^{-1}$  a směs byla zahřáta na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byl připraven roztok  $\text{FeSO}_4$  - 720 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  bylo rozpuštěno ve 20 ml redestilované a předem okyselené ( $60 \mu\text{l}$  37 % HCl) vody. Roztok  $\text{FeSO}_4$  byl potom za stálého míchání přidán do roztoku PAA a směs byla zahřáta na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  a míchána ještě 90 minut. Vytvořené nanočástice byly ponechány aby zchladly na laboratorní teplotu a následně byly magneticky odseparovány. Odseparované magnetické kuličky byly suspendovány ve 40 ml redestilované vody a potom centrifugovány (10000 g) po dobu 60 minut. Poté byly získané částice resuspendovány v redestilované vodě a 15 minut sonifikovány. Po další suspenzaci v redestilované vodě a centrifugaci (opět 10000 g a 60 min.) byl získán finální koloid, který byl nakonec ještě jednou podroben centrifugaci (2000 g) po dobu 20 minut aby došlo k oddělení případných agregátů. Supernatant byl odebrán a uchován při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro charakterizaci připravených nanočástic bylo použito transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM-2010 pracujícím při 160 kV a o rozlišení 1,9 angström. Dále bylo použito Mössbauerovy spektrometrie s  $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$  zdrojem. Zero-field  $^{57}\text{Fe}$  Mössbauerova spektra ukázala, že se jedná o magnetické nanočástice tvořené nestechiometrickým magnetitem. Poslední použitou technikou byla termogravimetrická analýza (analyzátor STA 449 C Jupiter), která ukázala, že obsah polymeru a magnetitu v uvedeném materiálu je 7,4 % a 92,6 %, přičemž polymeru je samozřejmě méně.<sup>47</sup>



Obr.10: TEM snímek použitých magnetitových nanočástic, stabilizovaných PAA.<sup>47</sup>

## 2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

### 2.2.1 Úvod do kapilárních elektromigračních metod

Elektroforéza byla definována jako diferenciální pohyb nabitých částic (iontů), jež se děje jejich přitahováním nebo odpuzováním těchto částic v elektrickém poli. Jedná se tedy o moderní separační metody založené na elektroforetické migraci iontů ve stejnosměrném elektrickém poli (elektrické pole je vytvořeno vložением konstantního stejnosměrného elektrického napětí mezi dvě elektrody), přičemž separace se provádí v kapilárách o velmi malém vnitřním průměru (nejčastěji 25 - 150  $\mu\text{m}$ ). Tím se liší od plošné elektroforézy, kterou přivedl na svět A. Tiselius roku 1937 (1948 - Nobelova cena), a ze které se kapilární elektroforéza vyvinula.<sup>48,49</sup>

Počáteční práci využívající v elektroforéze otevřenou kapiláru o vnitřním průměru 1 mm popsal v roce 1967 S. Hjertén. Později R. Virtanen, F. Mikkers a F. Everaerts pracovali s kapilárami ze skla a teflonu o vnitřním průměru přibližně 200  $\mu\text{m}$ . Počátkem roku 1980 použili J. W. Jørgenson a K. D. Lukacs kapiláru zhotovenou z taveného křemene o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ . Takové kapiláry (avšak často s menšími průměry) se používají neustále. Jørgenson také objasnil teorii, popsal vztahy mezi provozními parametry a ukázal, jak velký potenciál má kapilární elektroforéza (CE) v analytické chemii.<sup>48,50</sup>

Kapilární elektromigrační metody (souhrnně vysokoúčinná kapilární elektroforéza - HPCE) vynikají především malou spotřebou vzorku (1 - 50 nl) a činidel potřebných pro separaci, velkou účinností separace (často vyšší, než  $10^5$  teoretických pater) a velkou rychlostí analýzy. Vysoký elektrický odpor kapiláry totiž umožňuje aplikaci velmi vysokého elektrického napětí (100 až 500 V/cm), přičemž dochází k minimálnímu generování Jouleova tepla. Kromě toho, velký poměr povrchu kapiláry k objemu rovněž účinně odvádí teplo. Také tzv. elektroosmotický tok (EOF) vznikající při analýze v CE často velmi pozitivně ovlivňuje účinnost a rychlost separace. K dalším výhodám těchto technik můžeme zařadit i krátkou dobu potřebnou na optimalizaci separačních podmínek. Proto se kapilární elektroforéza velmi rychle přesunula z výzkumných laboratoří i do praxe, kde slouží jako nástroj pro (bio)farmaceutické, forenzní, klinické, potravinové analýzy, analýzy životního prostředí nebo jiné chemické a biochemické analýzy.



Dnešními trendy v CE jsou miniaturizace (čipy), ultrarychlá CE, nebo také dokonalejší spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií.<sup>48,49,51</sup>

Ačkoliv byla CE původně určena především pro analýzu biologických makromolekul, osvědčila se i pro separaci sloučenin, jako aminokyseliny, chirální léčiva, vitamíny, pesticidy, anorganické ionty, organické kyseliny, barviva, povrchově aktivní látky, peptidy a bílkoviny, sacharidy nebo oligonukleotidy a fragmenty DNA. Velmi zajímavé je její využití v analýze větších částic, jako jsou celé buňky, viry nebo nanočástice.

Protože mechanismy odpovědné za separaci v CE a chromatografii jsou odlišné, může tak navíc záznam z CE (elektroferogram) poskytnout komplementární informaci k chromatogramu.<sup>48</sup>

### 2.2.2 Fyzikální děje v kapilární elektroforéze

Vedení elektrického proudu je v roztocích elektrolytů popisováno Ohmovým zákonem:

$$U = I \cdot R \quad (2)$$

kde  $U$  je elektrické napětí,  $I$  je elektrický proud a  $R$  je elektrický odpor.

V roztocích elektrolytů je vedení elektrického proudu zprostředkováno všemi přítomnými kationty a anionty, přičemž podle Kohlrauschova zákona o nezávislém pohybu iontů migrují anionty směrem k anodě a kationty ke katodě v ekvivalentním množství nezávisle na sobě. Elektroneutralita roztoku zůstává díky elektrolýze probíhající na obou elektrodách zachována.

Elektrolyty, které se používají v kapilární elektroforéze jsou zpravidla tlumivé roztoky (pufry) o určité koncentraci, iontové síle, pH, teplotě, viskozitě, vodivosti a permitivitě. Pohyblivost nabitých částic mohou ovlivnit i přítomné neelektrolyty jako jsou komplexy, asociáty nebo jiné agregáty. Roztok elektrolytu (vodič II. třídy) klade určitý odpor při průchodu proudu, který závisí na druhu elektrolytu, koncentraci a konstrukci elektroforetického zařízení. Jeho důsledkem je Jouleovo teplo, které způsobuje odpařování rozpouštědla a vztlínání roztoku z prostoru elektrod, ale může mít za následek termické změny separovaných analytů.

Jouleovo teplo lze vypočítat podle vztahu:

$$Q = UI t = (U^2 t)/R = RI^2 t \quad (3)$$

kde  $Q$  je Jouleovo teplo a  $t$  je čas.

U elektromigračních metod považujeme za rozhodujícího činitele elektroforetickou pohyblivost (mobilitu) nabitě částice  $\mu$ . Ta je definována jako rychlost této částice při jednotkovém gradientu elektrického pole:

$$\mu = v/E \quad (4)$$

kde  $\mu$  je elektroforetická mobilita,  $v$  je rychlost nabitě částice a  $E$  je intenzita elektrického pole.<sup>52</sup>

Intenzitu pole v kapiláře lze vypočítat jako podíl napětí připojeného ke koncům kapiláry a její délky. Tato intenzita je také svázána Ohmovým zákonem s hustotou procházejícího elektrického proudu prostředím o specifické vodivosti:

$$E = U/L = I/\kappa \quad (5)$$

kde  $L$  je délka kapiláry a  $\kappa$  je specifická vodivost.

Mobilita je pro daný iont a médium konstantou a je tedy pro tento iont charakteristická. Mobilita je určena elektrickou silou, která ionizované molekuly nebo částice uvádí do pohybu:

$$F_e = q \cdot E \quad (6)$$

kde  $F_e$  je elektrická síla a  $q$  je náboj iontu.

Protože proti této elektrické síle působí třecí síla, jež je v ustáleném stavu stejně velká, platí (pro iont kulového tvaru) Stokesův zákon:

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (7)$$

a tedy:

$$q \cdot E = 6\pi\eta r v \quad (8)$$

kde  $r$  je hydrodynamický poloměr iontu a  $\eta$  je viskozita prostředí.<sup>48,51</sup>

Dosazením rovnice (8) do rovnice (4) získáme rovnici popisující mobilitu z hlediska fyzikálních parametrů:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (9)$$

Z této rovnice je zřejmé, že malé, vysoce nabitě ionty mají vysoké mobility, zatímco velké, málo nabitě částice mají pohyblivosti nízké.

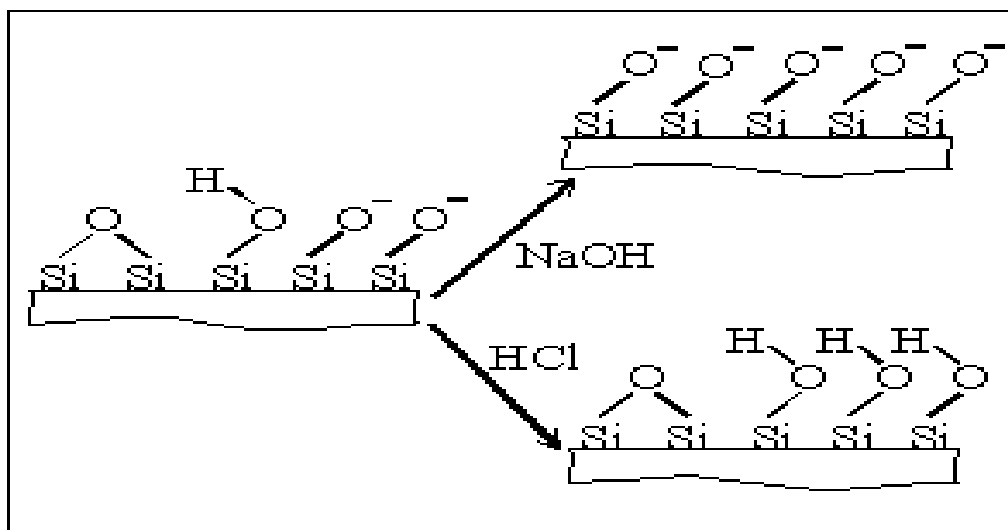
Elektroforetickou pohyblivost lze obvykle nalézt v tabulkách, avšak v praxi se liší od mobility zjištěné experimentálně, tzv. efektivní mobility, která silně závisí na pH pufru:

$$\mu_{eff} = \alpha \cdot \mu \quad (10)$$

kde  $\alpha$  je stupeň disociace (ionizace) molekuly (částice).<sup>48</sup>

### 2.2.3 Elektroosmotický tok (EOF)

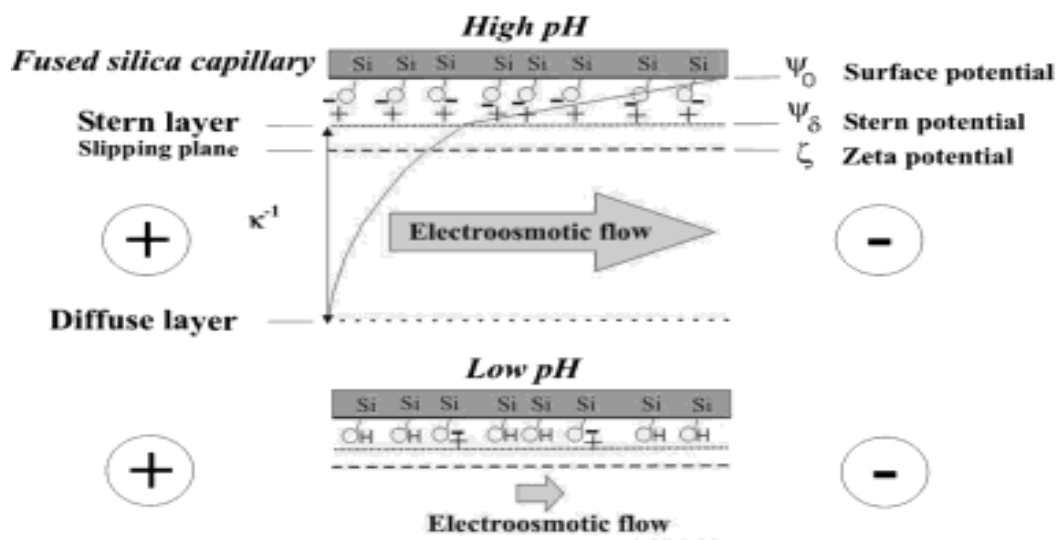
Základním jevem, který se v kapilárních elektromigračních metodách vyskytuje, je elektroosmotický tok. Tento transportní jev je způsoben tzv. elektrickou dvojvrstvou, přítomnou na rozhraní vnitřní povrch kapiláry/roztok. V případě křemenných kapilár naplněných vhodným elektrolytem (elektrolyty s pH vyšším než je pK silanolových skupin) se na jejich vnitřním povrchu vyskytuje v důsledku přítomnosti disociovatelných silanolových skupin záporný náboj.<sup>48,49</sup>



Obr.11: Chování silanolových skupin v kyselém a zásaditém prostředí.<sup>49</sup>

Ke vzniklým záporným nábojům je naadsorbována vrstva protiiontů (nepohyblivá vnitřní vrstva). Další protiionty jsou již vázány slaběji elektrostaticky (vnější difúzní vrstva). Takto vzniká elektrická dvojrstva. Tato dvojrstva vytváří tzv. elektrokinetický potenciál, neboli zeta-potenciál ( $\zeta$ -potenciál). Jakmile aplikujeme na kapiláru separační napětí, dojde k pohybu kationtů tvořících difúzní část dvojrstvy směrem ke katodě. Vzhledem k vnitřnímu tření a k tomu, že jsou tyto kationty solvatovány, pohybuje se směrem ke katodě celý roztok včetně aniontů, protože v drtivé většině případů je rychlost aniontů putujících k anodě menších než rychlost EOF.<sup>48,49</sup>

Ačkoliv je  $pK$   $-\text{Si}-\text{OH}$  skupin obtížné určit, nejčastěji se pohybuje kolem hodnot 6-7.<sup>53</sup> Obecně lze však říci, že se EOF stává významným nad  $\text{pH}$  4. EOF je pozorován také u kapilár zhotovených z látek neiontové povahy, jako je např. teflon. To je zřejmě způsobeno adsorpcí aniontů na povrch PTFE. Z uvedeného je zřejmé, že velikost EOF velmi silně závisí na  $\text{pH}$  (mezi  $\text{pH}$  2-12 se může lišit více než o řád).<sup>48,54</sup>



Obr.12: Schéma vzniku elektrické dvojvrstvy, elektroosmotického toku a jeho závislosti na pH.<sup>55</sup>

Dále je EOF závislý na iontové síle pufru, protože (jak již bylo ukázáno v kapitole 2.1.3.2.2.1.) se zvyšující se iontovou silou dochází ke kompresi elektrické dvojvrstvy. Také bylo zjištěno, že EOF roste lineárně v závislosti na aplikovaném napětí.<sup>48,53</sup>

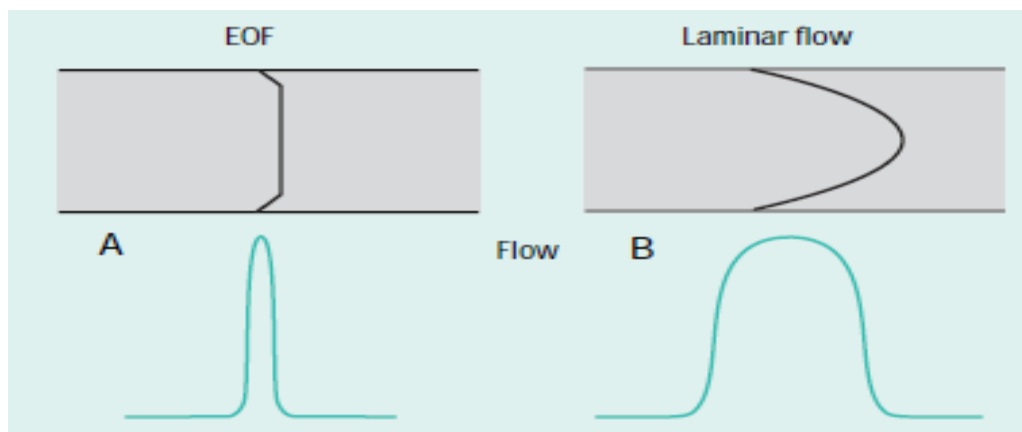
Velikost EOF může být vyjádřena z hlediska rychlosti nebo mobility:

$$v_{EOF} = (\varepsilon\zeta/\eta).E \quad (11)$$

$$\mu_{EOF} = (\varepsilon\zeta/\eta) \quad (12)$$

kde  $v_{EOF}$  je rychlost EOF,  $\mu_{EOF}$  je mobilita EOF,  $\zeta$  je zeta-potenciál a  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta roztoku.<sup>48,53,56</sup>

Unikátní vlastností EOF je jeho plošný profil při průtoku. Elektricky řízený průtok kapilárou je rovnoměrně rozdělen podél kapiláry, takže je rychlost v celém objemu rovnoměrná. Protože takový plošný profil nepřispívá k rozšíření zón analytu, je zřejmé, že EOF neovlivňuje rozlišení, čímž se liší od laminárního proudění s parabolickým profilem.<sup>48</sup>

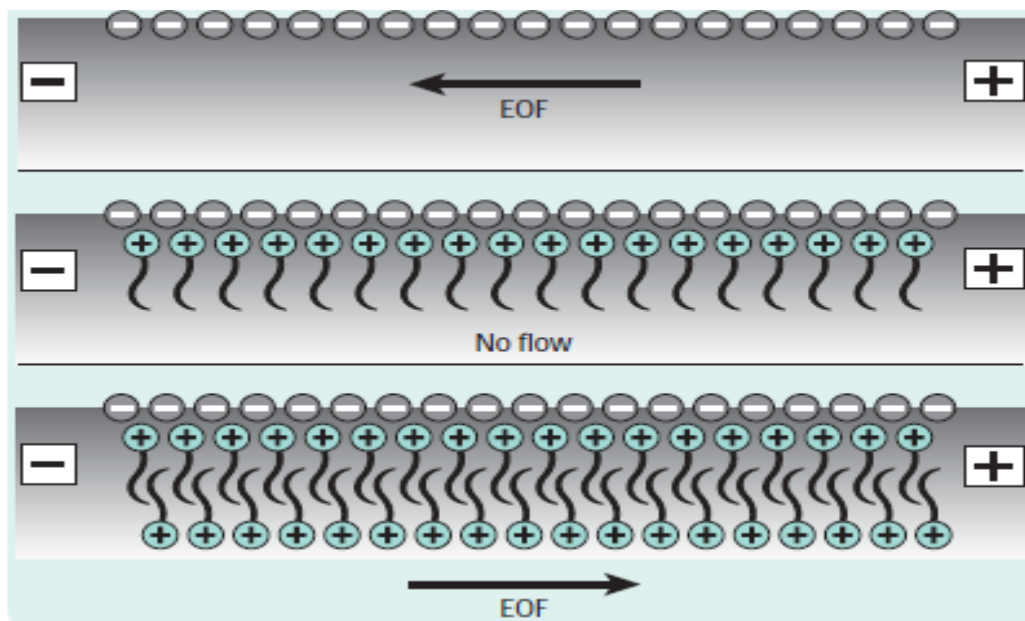


Obr.13: Znáznornění plošného profilu EOF a parabolického profilu u laminárního proudění a souvisejícího srovnání šířky píků v záznamu.<sup>48</sup>

Ačkoliv je většinou EOF při separacích výhodným jevem, občas je vhodné jej zpomalit, zastavit nebo dokonce obrátit.

Zpomalení elektroosmotického toku lze provést např. stlačením elektrické dvojvrstvy (např. přidavek NaCl)<sup>53</sup>, nebo přidavkem některých organických rozpouštědel jako jsou lineární alkoholy (methanol, ethanol, isopropanol, ...). Ke zvýšení rychlosti EOF je rovněž možno využít některých organických rozpouštědel (acetonitril) Organická rozpouštědla mění rychlost EOF kvůli svému vlivu na viskozitu pufru a  $\zeta$ -potenciál.<sup>57,58</sup> Elektroosmotický tok lze také regulovat teplotou (souvislost se změnou viskozity nosného elektrolytu - BGE) nebo, jak již bylo zmíněno, změnou napětí vloženého na elektrody.

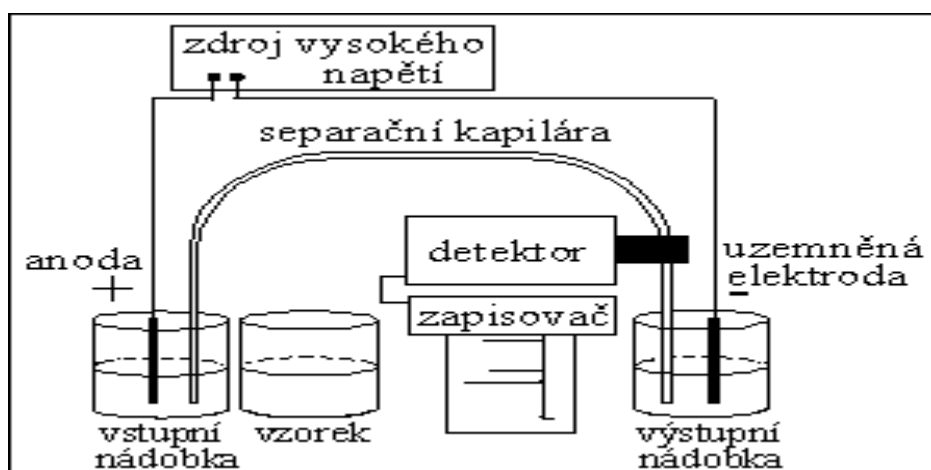
Další možností, jak ovlivnit elektroosmotický tok, je modifikace povrchu kapiláry. Tu je možno provést dynamicky nebo kovalentně. Kovalentní pokrytí lze provést např. uložním polymeru (PEG, PVA, ...) na vnitřním povrchu kapiláry a následnou reakcí s „cross-linking“ činidlem nebo alternativně zahřátím, čímž vznikne polymer nerozpustný v BGE. EOF je pak účinně potlačen. K dynamickému pokrytí se používají PAL (CTAB, TTAB, apod.). Pokud je koncentrace PAL v pufru nižší než je její kritická micelární koncentrace (CMC), dojde k potlačení EOF. Pokud je naopak vyšší, dojde k obrácení EOF.<sup>48,53</sup>



Obr.14: Schéma zastavení a obrácení EOF použitím kationtového tenzidu.<sup>48</sup>

## 2.2.4 Instrumentace

Zařízení pro kapilární elektromigrační metody se skládá ze zdroje vysokého napětí, dvou elektrod (katoda, anoda), vstupní a výstupní nádoby, nádoby na vzorek, separační kapiláry, detektoru a vyhodnocovacího zařízení (počítač s vhodným softwarem).



Obr.15: Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody.<sup>49</sup>

### 2.2.4.1 Zdroj napětí

V kapilární elektroforéze je využíváno zdrojů stejnosměrného vysokého napětí. Aplikované separační napětí se nejčastěji pohybuje v rozmezí 10 - 30 kV, přičemž elektrický proud dosahuje hodnoty do 100  $\mu$ A. Kvůli reprodukovatelnosti výsledků je potřeba, aby napětí bylo stabilní. Pokud je využito křemenných kapilár, EOF bude ve směru katody, proto i detektor je umístěn u katody. Dávkování bude proto probíhat u anody. Je-li směr EOF obrácen, je nutné změnit směr pole přepnutím polarity. Další vlastností napájecího zdroje je možnost programování elektrického pole (analýza při gradientu pole), což je užitečné u snížení doby analýzy komplexních vzorků.<sup>48</sup>

### 2.2.4.2 Dávkování

#### Hydrodynamické dávkování

Jedná se o nepoužívanější metodu zavádění vzorku v CE. Může být realizováno zvýšením tlaku u nádoby se vzorkem, čímž dojde k vtlačení zóny vzorku do kapiláry (nejčastěji používané tlaky se pohybují v rozmezí 25 - 100 mbar po dobu 0,5 - 10 vteřin), podtlakem u konce kapiláry (nasátí vzorku) nebo přepouštěním, kdy je nádobka se vzorkem vyvýšena oproti nádobce výstupní o 5 až 10 cm po dobu 10 až 30 vteřin.<sup>48</sup>

#### Elektrokinetické dávkování

Jedná se o dávkování, jež je provedeno procesem elektromigrace. Kapilára je zavedena do nádoby se vzorkem a následně je na ni po velmi krátkou dobu aplikováno napětí (cca 1 vteřina při napětí 10 kV). Poté je kapilára opět zavedena do vstupní nádoby s pufrem. Nevýhodou však je, že ionty s nejvyšší mobilitou jsou nadávkovány ve větším množství než ionty s mobilitou nižší, což zkresluje kvantitativní analýzu.<sup>53,59</sup>



### 2.2.4.3 Kapiláry

Ideální materiál pro kapiláry má tyto vlastnosti: je chemicky a elektricky inertní, propouští záření v oblasti UV/VIS vlnových délek, je flexibilní, robustní a levný. Proto je dnes nejpoužívanějším materiálem pro výrobu kapilár pro CE tavený křemen. Vzhledem k tomu, jak jsou takové kapiláry křehké, jsou pro lepší manipulaci pokryty ochrannou vrstvou polyimidu, čímž se stanou pružnými. Pro optickou detekci je však nutné polyimid v místě, kde prochází záření odstranit. To lze provést vypálením malého okénka pomocí elektrického oblouku nebo elektricky vyhřívaným drátem. Polyimid lze rovněž odstranit kapkou kyseliny sírové.

Komerčně jsou nejnáze dostupné kapiláry s vnitřním průměrem 10 - 200  $\mu\text{m}$  a řadou vnějších průměrů. Nejčastěji jsou však používány kapiláry s vnitřním průměrem 25 - 100  $\mu\text{m}$  a s vnějším průměrem 350 - 400  $\mu\text{m}$ . Efektivní délka (délka k detektoru) se pohybuje od 25 do 75 cm.

Jako alternativní materiál lze použít teflon, který je pružný, chemicky odolný a má velmi nízký index lomu, což je při optické detekci velmi výhodné. Oproti křemenným kapilárám jsou však teflonové mnohem dražší.

Kapilára je umístěna v kazetě, jež je termostatována kvůli odvodu Jouleova tepla. Stálá teplota také příznivě působí na reprodukovatelnost analýz.<sup>48,60</sup>

### 2.2.4.4 Detektory

#### Spektrofotometrické detektory

Jsou vzhledem ke své univerzálnosti nejpoužívanějšími detektory. Jsou založeny na absorpci záření analytem v ultrafialové nebo viditelné oblasti. Absorpce je podle Lambert-Beerova zákona závislá na koncentraci  $c$ , délce optické dráhy  $l$  a molárním absorpčním koeficientu  $\varepsilon$ :<sup>48</sup>

$$A = \varepsilon cl \quad (13)$$

Pro neabsorbující analyty lze využít nepřímého stanovení, kdy je v BGE přítomen tzv. monitorující ion, který záření absorbuje. Přítomnost zóny neabsorbujícího analytu se projeví poklesem signálu.<sup>61</sup>

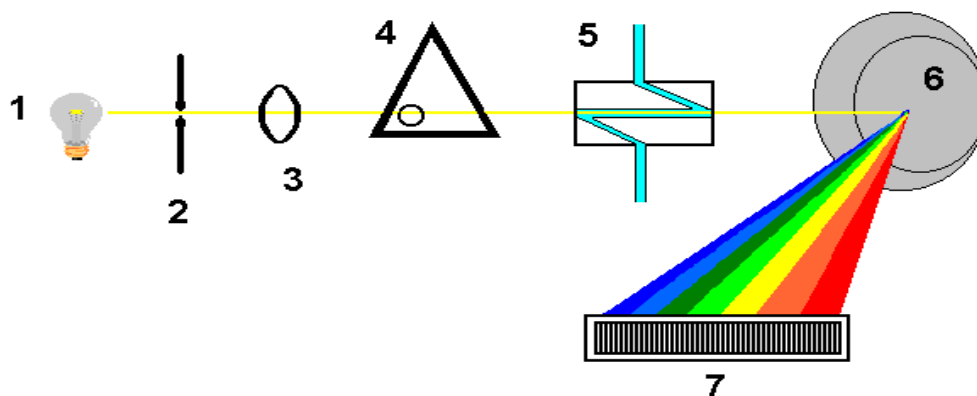
Podle konstrukce lze spektrofotometrické detektory dělit na čtyři typy:

a) Detektory s fixní vlnovou délkou - Jako zdroj záření používají nízkotlakou rtuťovou výbojku.

b) Detektory s měnitelnou vlnovou délkou - Lze si vybrat z předem daných vlnových délek.

c) Detektory s programovatelnou vlnovou délkou - Vlnovou délku lze nastavovat během analýzy v určitém rozmezí (nejčastěji 190 - 700 nm).

d) Detektory s diodovým polem (DAD) - Snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení separace. Jedná se o seskupení několika tisíc fotodiod, které úplně pokrývají vymezený interval vlnových délek. Foton po dopadu na diodu vyvolá fotoelektrický proud, který vybije kondenzátor, se kterým je dioda spojena. Měří se proud, který je nutný na opětovné dobití kondenzátoru.<sup>62</sup>



Obr.16: Schéma DAD detektoru. (1) zdroj záření, (2) štěrba, (3) fokusační optika, (4) clona, (5) měrná cela detektoru, (6) holografická mřížka, (7) seskupení fotodiod.<sup>62</sup>

### **Detektory s laserem indukovanou fluorescencí (LIF)**

Jedná se bezesporu o nejcitlivější detektor, jež se podařilo vyvinout. Je velmi selektivní, což má za následek jeho omezené použití, protože jen velmi málo látek vykazuje fluorescenci. Řešením může být derivatizace na fluorescenční deriváty. Dosažené detekční limity jsou v případě polycyklických aromatických uhlovodíků  $3 - 15 \times 10^{-20}$  mol.<sup>63</sup>

## Amperometrické detektory

Tyto detektory měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Jako měrné elektrody se používají tuhé elektrody, oblíbené jsou v kapilární elektroforéze elektrody na bázi uhlíku (uhlíková vlákna, modifikované uhlíkové pasty a inkousty, borem dopovaná diamantová elektroda, diskové elektrody a soubory uhlíkových mikroelektrod na disku).

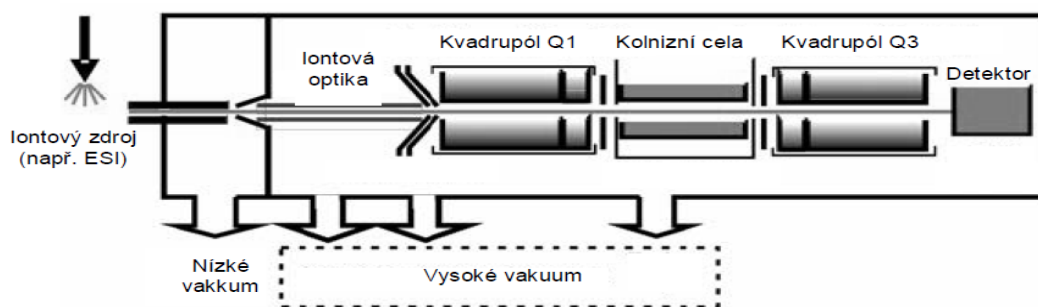
Amperometrických detektorů lze využít např. ve spojení s miniaturizovanými separačními technikami, ať už v HPLC nebo právě v CE (čipy pro kapilární elektroforézu).<sup>64,65</sup>

## Vodivostní detektory

Jedná se o neselektivní univerzální detektor. Je založen na měření vodivosti zóny procházející detektorem. Můžeme je rozdělit na kontaktní (funkci čidla zde plní dva platíkové drátky vzdálené ve směru osy kapiláry asi 0,1 mm) a bezkontaktní, které využívají vysokofrekvenčního pole prostupujícího stěnami kapiláry.<sup>66</sup>

## Hmotnostní spektrometrie (MS)

Tato technika využívá mechanismů separace a detekce iontů nebo jejich fragmentů, vznikajících v iontovém zdroji, podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Obecně se hmotnostní spektrometr skládá z iontového zdroje, akcelérátoru iontů, iontové optiky, hmotnostního analyzátoru a detektoru.<sup>67</sup>



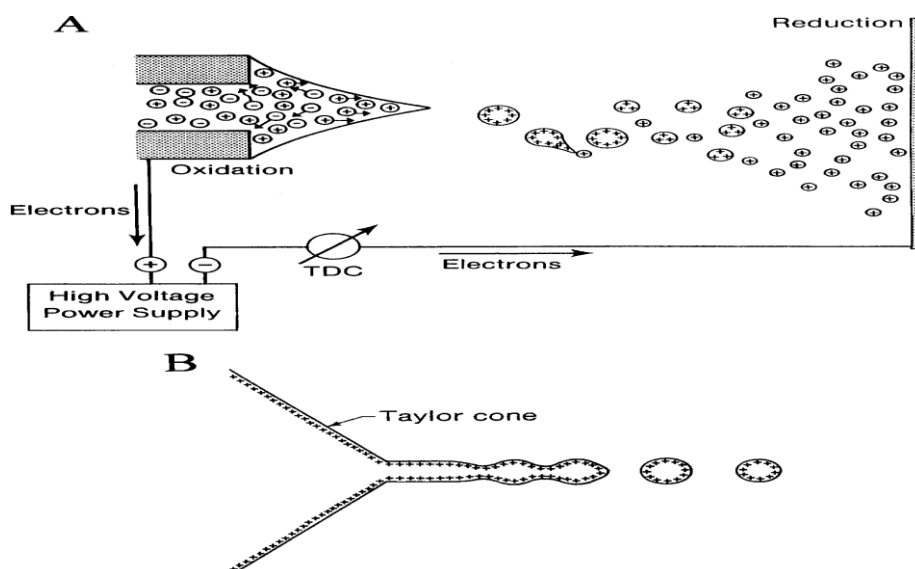
Obr.17: Základní uspořádání hmotnostního spektrometru. Zobrazení ortogonálního zdroje ve spojení s trojitým kvadrupólem.<sup>67</sup>

Vzhledem k technicky náročné instrumentaci spojení byla metoda CE/MS poprvé představena až v roce 1987, avšak díky svému širokému uplatnění, vysoké účinnosti separace, nízkým detekčním limitům a schopnosti podat informace o struktuře analyzované látky se stále více dostává do popředí zájmu analytické chemie.<sup>67,68</sup>

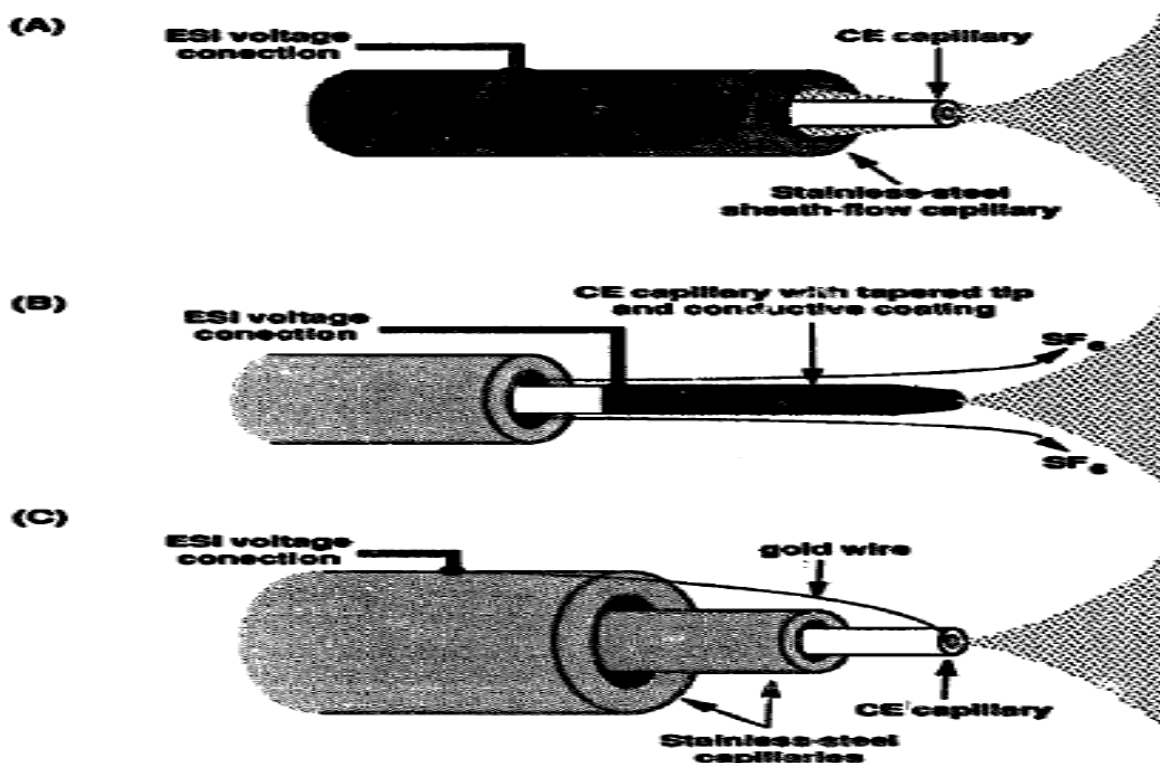
Na rozdíl od běžněji používané techniky HPLC/MS se toto spojení liší např. dávkovaným množstvím vzorku, protože objemy jsou v řádech nanolitřů a závisí na rozměrech kapiláry a viskozitě BGE (u HPLC je dávkovaný objem přesný kvůli dávkovací smyčce). Navíc průtok v CE je díky EOF proměnný a závisí na složení BGE, oproti HPLC, kde je konstantní průtok dán regulovatelnými čerpadly. Z tohoto důvodu je technika CE/MS méně reprodukovatelná, než HPLC/MS.<sup>55</sup>

### ***Iontové zdroje***

Aby bylo možné zavedení vzorku do hmotnostního spektrometru, je nutné převedení jeho molekul z kapalná fáze na ionty ve fázi plynné. Dominantním iontovým zdrojem pro CE/MS je elektrosprej (ESI). V elektrickém poli roztok opouští konec kapiláry ve formě velmi malých kapiček, jež snadno uvolňují neutrální molekuly rozpouštědla. Tím se snižuje velikost a zároveň se rychle zvětšuje povrchový náboj. Tyto kapky se dále rozpadají na menší, kde stejný proces pokračuje. Nakonec zůstávají v plynné fázi jen solvované ionty, jež jsou zaváděny přes akcelerační iontů a iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru.<sup>48</sup>



Obr.18: a) Princip elektrospreje a vznik Taylorova kužele, b) Odtrhávání kapek z Taylorova kužele vlivem odpuzivých sil.<sup>69</sup>



Obr.19: Schématické znázornění CE/ESI-MS interface. a) „sheath-flow“ interface (konec kapiláry je pokryt pláštěm z nerez oceli), b) „sheathless“ interface (s kuželovým hrotem a vodivým povlakem kapiláry), c) „sheathless“ interface (s použitím Au drátkové elektrody).<sup>70</sup>

Mezi další iontové zdroje používané v CE/MS patří termosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).<sup>48,68</sup>

### ***Hmotnostní analyzátory***

Na hmotnostní analyzátor jsou přiváděny ionty vznikající v iontovém zdroji. V nich také dochází k jejich dělení na základě hodnot  $m/z$ . V hmotnostní spektrometrii jsou používány tyto analyzátory: sektorové analyzátory (magnetický nebo kombinace magnetického a elektrického), kvadrupólový, iontová past, detektor doby letu (TOF), „orbitrap“ nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR). Pro snadnější identifikaci analytu je také možno využít tandemové hmotnostní spektrometrie.<sup>67</sup>

## Další detektory

Mezi další možné, avšak méně využívané detektory pro kapilární elektromigrační techniky patří radiometrický detektor, NMR, detektor na principu cirkulárního dichroismu, refraktometrický detektor a IR spektrometrické detektory.<sup>48</sup>

<u>Detektor</u>	<u>LOD (mol.l<sup>-1</sup>)</u>	<u>LOQ (mol.l<sup>-1</sup>)</u>	<u>Výhody/nevýhody</u>
<b>UV/VIS</b>	10 <sup>-12</sup> – 10 <sup>-15</sup>	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>	univerzální
<b>LIF</b>	10 <sup>-18</sup> – 10 <sup>-20</sup>	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-12</sup>	extrémně citlivý, často nutná derivatizace vzorku, drahý
<b>Amperometrie</b>	10 <sup>-18</sup> – 10 <sup>-19</sup>	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-11</sup>	citlivý, selektivní, použitelný jen pro elektroaktivní analyty
<b>Vodivostní detektor</b>	10 <sup>-15</sup> – 10 <sup>-16</sup>	10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>-7</sup>	univerzální
<b>Hmotnostní spektrometr</b>	10 <sup>-16</sup> – 10 <sup>-17</sup>	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-9</sup>	citlivý, podává informace o struktuře analytu, komplikovanost CE/MS interface
<b>nepřímé metody</b>	10 – 100x méně než přímé metody stanovení	-	univerzální, menší citlivost než přímé metody stanovení

Tab.1: Přehled používaných detektorů v CE.<sup>48</sup>

## 2.2.5 Módy kapilárních elektromigračních metod

### 2.2.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší a pro svou univerzálnost také nejhojněji využívanou elektromigrační metodou. Kapilára je zde naplněna základním elektrolytem a je umístěna mezi dvěma zásobníky s pufrem. Po zavedení zóny vzorku do kapiláry je napříč kapilárou aplikováno separační napětí. Analyty jsou pak děleny na základě svých rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Ve většině případů směřuje EOF ke katodě, takže je i detektor umístěn u tohoto konce, zatímco dávkování probíhá u anody.

K největšímu rozšiřování píků (a zhoršení rozlišení) zde dochází vlivem molekulární difúze, jež lze minimalizovat upravením separačních podmínek tak, aby vzorek byl v kapiláře po krátkou dobu (krátké kapiláry, větší napětí, ...).<sup>48,71</sup>

CZE je vhodná pro separace molekul s nábojem a nehodí se pro neutrální molekuly.<sup>49</sup>

### 2.2.5.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC, MECC)

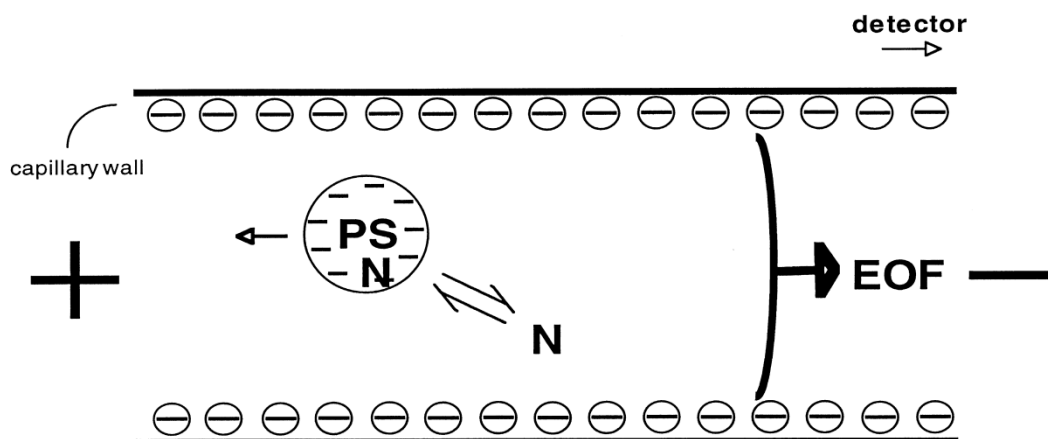
MEKC je metoda, která kombinuje elektroforézu a chromatografii. Představena byla S. Terabem v roce 1984 pro separaci neutrálních složek vzorku hydrofilní i lipofilní povahy.

V této metodě je do BGE přidána iontová povrchově aktivní látka (v koncentraci větší než je její CMC), která zde plní podobnou úlohu jako stacionární fáze v chromatografii. Proto je často nazývána jako „pseudostacionární“ fáze. V případě nejčastěji používaného SDS se zformují micely kulového tvaru nesoucí záporný náboj. Lipofilní analyty se podle své HLB („hydrophilic/lipophilic balance“) rozpouštějí v dutinách micel, zatímco hydrofilní analyty jsou rozpuštěny v BGE. Každý analyt tedy bude rozdělen mezi micelární a vodnou fázi podle své polariry. Analyty budou směrem k anodě tím rychleji, čím více budou micelární fázi solvatovány. Celý roztok i s micelami je však silou EOF unášen ke katodě.

Distribuci analytu v micelách a okolní vodné fázi lze vyjádřit distribučním koeficientem  $K$ :

$$K = c(PSF)/c(VF) \quad (14)$$

kde  $c$  je molární koncentrace látky v „pseudostacionární“ (PSF) nebo vodné (VF) fázi.<sup>49,71,72</sup>



Obr.20: Znázornění dějů v MEKC.<sup>72</sup>

### 2.2.5.3 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Metoda vhodná zejména pro separaci proteinů nebo jiných látek lišících se od sebe molekulovou hmotností. Nejčastěji používaným gelem je polyakrylamid (PAGE), jež se připravuje radikálovou polymerací akrylamidu uvnitř kapiláry. K separaci dochází na základě rozdílných mobilit analytů. Ty jsou ještě prohlubovány tím, že analyty rozdílných velikostí a tvarů jsou nuceny migrovat póry gelu, takže např. menší molekuly se dostanou i do malých pórů, čímž dochází k jejich opoždování za většími molekulami. Protože gel v kapiláře zabraňuje vzniku elektroosmotického toku, lze během jednoho experimentu analyzovat pouze ionty jednoho znaménka. CGE se zařízením pro sběr frakcí může být také použita k přečištění makromolekul.<sup>49,71</sup>



#### 2.2.5.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Jedná se v podstatě o miniaturizovanou kapalinovou chromatografii, kde je mobilní fáze místo čerpadly hnána pomocí elektroosmotického toku. Vzhledem k velké podobnosti s CZE, lze použít stejného zařízení bez větších úprav. Původní myšlenku pocházející z roku 1974 od V. Pretoria rozvedli dále J. Jörgenson a K. Lukacs, avšak tato technika byla zastíněna kapilární zónovou elektroforézou, jenž se v té době rychle rozvíjela. Od roku 1987, kdy J. Knox a I. Grant provedli podrobnou studii hlavních parametrů kapilární elektrochromatografie, došlo k velkému rozvoji této techniky.

Jako mobilní fázi lze použít různé směsi vodných pufrů a organických rozpouštědel. Stacionární fáze je stejná jako u HPLC, částice o velikosti 3 - 5  $\mu\text{m}$  nejčastěji z oktadecyl silikátu (ODS), což jsou uhlíkaté řetězce (C18) navázané na povrchu nosiče z  $\text{SiO}_2$ . Lze použít také tzv. monolitických kolon, což jsou kapiláry vyplněné pórovitými polymery. Ty mohou navíc nést na svém povrchu funkční skupiny, které s procházejícím analytem mohou dále interagovat.<sup>73</sup>

#### 2.2.5.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Metoda nachází uplatnění při separaci látek amfoterního charakteru, které se liší velikostí izoelektrického bodu  $pI$ , při němž jejich náboj nabývá nulové hodnoty. Pro izoelektrickou fokusaci je potřeba vytvořit v kapiláře takové podmínky, aby rychlost pohybu separovaných složek byla funkcí jejich polohy. Základem je přítomnost gradientu pH podél kolony vytvořeného pomocí amfolytů, které účinkem elektrického pole putují do míst svého izoelektrického bodu. Po zavedení vzorku a vložení napětí začnou amfolyty putovat k příslušné elektrodě, dokud se nedostanou do oblasti pH, jež se rovná jejich  $pI$ . Zde se stanou neutrálními a přestanou se pohybovat, čímž se vytvoří úzké zóny vzorku.<sup>52</sup> Po fokusaci je potřeba, aby se dostaly k detektoru, což lze provést buď tlakem nebo přidávkem soli do jednoho ze zásobníků na nosný elektrolyt. Lze také přidat do jednoho zásobníku kyselinu a do druhého bázi.

Kapilární izoelektrickou fokusaci je potřeba provádět v kapilárách s potlačeným EOF.<sup>48</sup>

### 2.2.5.6 Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza je jedinou technikou používající dva typy elektrolytů. Např. pro separaci aniontů je zásobník pro elektrolyt naplněn vedoucím elektrolytem („leading“), jehož anionty mají mobilitu větší než všechny anionty, které obsahuje vzorek. Kationty vedoucího elektrolytu musí mít pufrační kapacitu při stejném pH, jako bude probíhat analýza. Zásobník u katody je naplněn koncovým elektrolytem („terminating“) jehož anionty mají mobilitu naopak menší než všechny anionty ve vzorku. Vzorek je dávkován mezi tyto dva elektrolyty. Po spuštění separačního napětí začnou migrovat všechny anionty ze vzorku a z vedoucího a koncového elektrolytu směrem k anodě (a k detektoru) přičemž se začnou od sebe separovat do úzkých zón na základě svých rozdílných elektroforetických pohyblivostí. První zóna vzorku procházející detektorem obsahuje tedy anionty s největší mobilitou, poslední zóna obsahuje anionty s mobilitou nejnižší.<sup>74</sup>

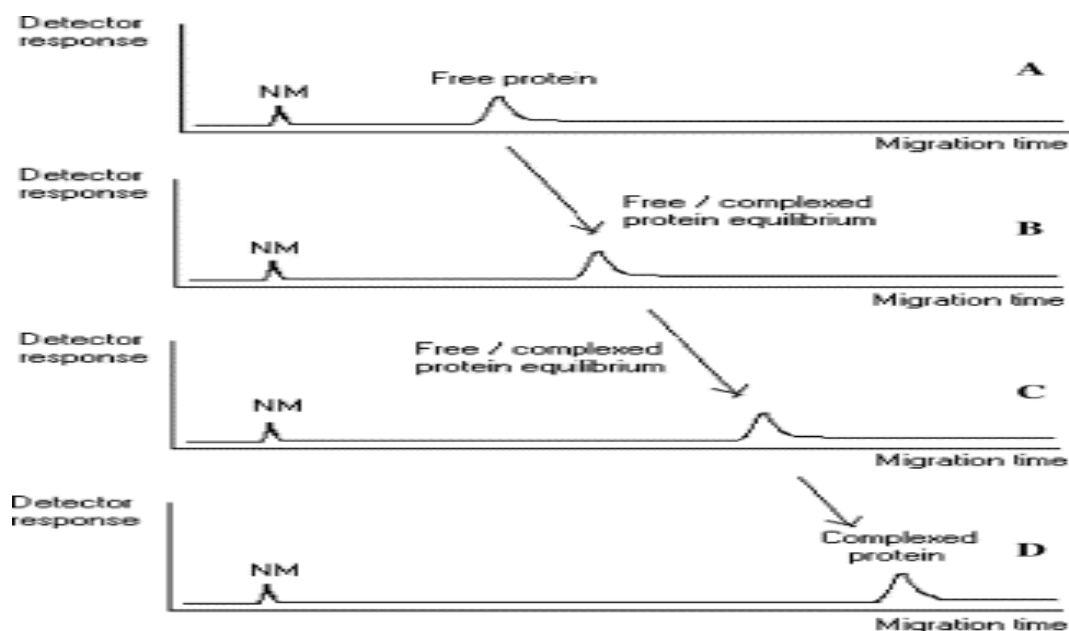
CITP je tedy vhodná pro separaci analytů s nábojem. V jediném experimentu lze separovat pouze ionty jednoho znaménka stejně jako u CGE. U této metody je opět nutno používat kapilár s potlačeným EOF.<sup>49</sup>

### 2.2.5.7 Afinitní kapilární elektroforéza (ACE)

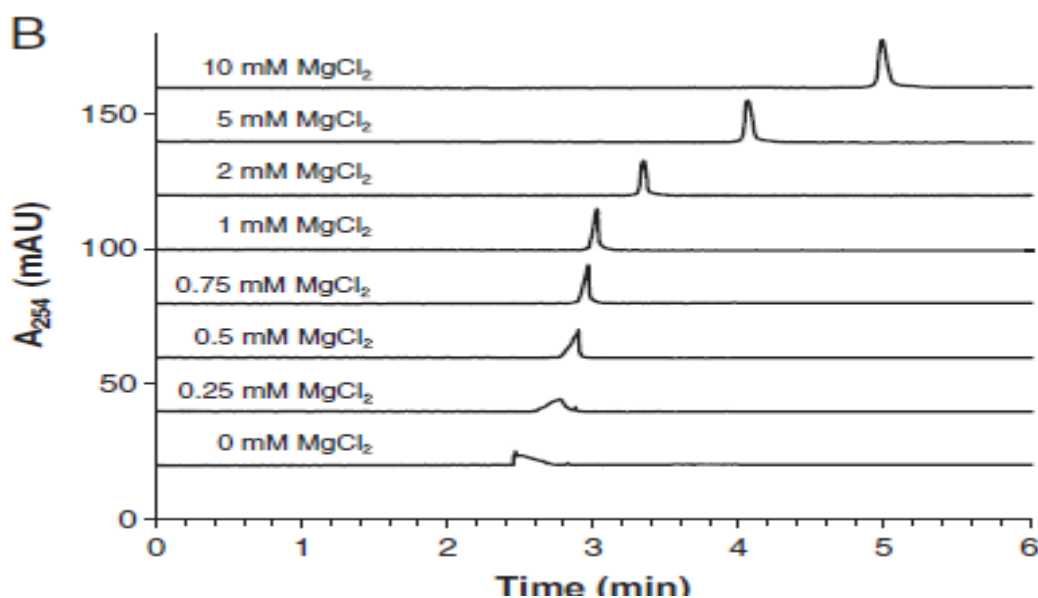
Jedná se o druh kapilární elektroforézy, jenž může být použit pro analýzu některých biologicky aktivních látek (proteiny, nukleotidy, ...) na základě specifických interakcí mezi analytem a přidanou látkou. Jedná se o interakce typu antigen-protilátka, hormon-receptor, enzym-inhibitor, lektin-sacharid apod.<sup>49,51</sup>

Afinitní kapilární elektroforéza je také velmi užitečnou technikou pro určování vazebných konstant různých látek, jenž spolu interagují. Na základě takových interakčních konstant lze potom také odhadnout, o jaké druhy fyzikálních interakcí se jedná (elektrostatické, Van der Waalsovy, ...). Může tak nahradit další techniky, jako je např. hmotnostní spektrometrie, NMR, cirkulární dichroismus, gelová permeační chromatografie, mikrodialýza, kalorimetrie nebo povrchová plasmonová rezonance, jež se ke studiu interakcí biomolekul rovněž používají. Zároveň však ACE pořád plní funkci separační metody.

Metoda pro studium interakce mezi analytem a ligandem pomocí ACE spočívá v přidavku ligandu, který interaguje s analytem, k nosnému elektrolytu. Protože efektivní mobilita volného analytu je jiná, než efektivní mobilita komplexu analyt-ligand, dochází tak v závislosti na koncentraci přidaného ligandu k posunu migračních časů.<sup>3,75,76</sup>



Obr.21: Posun migračního času u proteinu vázaném v komplexu oproti volnému proteinu. Princip ACE.<sup>77</sup>



Obr.22: Posun migračního času lysozymu v závislosti na koncentraci přidaného kationtu Mg<sup>2+</sup>. Princip ACE.<sup>75</sup>

K vyhodnocení záznamů a výpočtu interakčních konstant lze využít např. x-reciproké linearizace dle Scatcharda.

Při této metodě vyhodnocení se nejprve vynáší do grafu závislost naměřených elektroforetických efektivních mobilit analytu na koncentraci přidaného ligandu. Efektivní mobilita je z migračních časů vypočtena podle vztahů:

$$\mu' = \frac{l \cdot L}{U \cdot t} \quad (12)$$

$$\mu_{eof} = \frac{l \cdot L}{U \cdot t_{eof}} \quad (13)$$

$$\mu = \mu' - \mu_{eof} \quad (14)$$

kde  $\mu'$  je zdánlivá mobilita analytu,  $l$  je efektivní délka kapiláry,  $L$  je celková délka kapiláry,  $U$  je vložené napětí,  $t$  je migrační čas,  $\mu_{eof}$  je mobilita elektroosmotického toku,  $t_{eof}$  je migrační čas elektroosmotického toku a  $\mu$  je efektivní mobilita analytu.

Vzniklý graf je potom linearizován tak, že na osu  $y$  se vynáší rozdíl mobilit  $\mu$  a  $\mu_0$ , kde  $\mu$  je efektivní mobilita analytu při určité koncentraci ligandu a  $\mu_0$  je efektivní mobilita analytu při nulové koncentraci ligandu, podělený příslušnou koncentrací ligandu, zatímco na ose  $x$  je vynesena pouze rozdíl  $\mu$  a  $\mu_0$ . Vzniklé lineární oblasti jsou poté proloženy přímkami, z jejichž rovnic lze vypočítat interakční konstanty a stechiometrické poměry podle následujícího vztahu:

$$\frac{\mu - \mu_0}{[L]} = -K_d \cdot (\mu - \mu_0) + n \cdot K_d \cdot (\mu_c - \mu_0) \quad (15)$$

kde  $[L]$  je koncentrace ligandu,  $K_d$  je disociační konstanta komplexu,  $n$  je stechiometrický poměr mezi analytem a ligandem a  $\mu_c$  je efektivní mobilita analytu, jehož všechna aktivní místa, která se mohou účastnit interakcí, jsou obsazena ligandy. Tato rovnice odpovídá obecnému tvaru rovnice:  $y = ax + b$ , přičemž  $a$  se rovná  $-K_d$ ,  $x$  je zde rozdíl  $\mu$  a  $\mu_0$ , koeficient  $b$  odpovídá členu  $n \cdot K_d \cdot (\mu_c - \mu_0)$  a  $y$  odpovídá členu  $\frac{\mu - \mu_0}{[L]}$ . Interakční konstanta komplexu  $K$  je pak převrácená hodnota konstanty disociační.<sup>77</sup>

$$K = 1/K_d \quad (16)$$

## 2.3 PROTEINY

Protein je základní stavební kámen všech živých organismů. Proteiny jsou biopolymery, skládající se z aminokyselin.  $\alpha$ -aminokyselin, ze kterých může být protein složen, existuje 20. Tyto aminokyseliny (typicky 200 - 300) jsou mezi sebou vázány peptidovou vazbou.

Struktura proteinů je tedy tvořena makromolekulami, které jsou tvořeny posloupností různých aminokyselin v přesně definovaném pořadí. Prostorové uspořádání a biologická funkce je dána složením posloupnosti aminokyselin. Strukturu proteinu se dělíme na primární, což je lineární pořadí aminokyselin. Z primární struktury lze odvodit strukturu proteinu nebo např. mechanismus působení na molekulární úrovni. Sekundární struktura proteinu udává prostorové uspořádání polypeptidového řetězce na krátké vzdálenosti a závisí na složení posloupnosti aminokyselin. Terciární struktura je trojrozměrné uspořádání celého proteinu. Zde dochází k vzájemné interakci postranních řetězců. Kvartérní struktura pak vzniká skládáním polypeptidových jednotek.

Funkce proteinů je dynamická (transport, kontrola metabolismu či katalýza chemických reakcí v organismu) nebo strukturální (výstavba orgánů, tkání a jejich podpůrné funkce). Proteiny lze také dělit na základě jejich biologických funkcí (enzymy, hormony, ...).<sup>78</sup>

V experimentální části této práce bylo použito těchto proteinů: hovězí sérový albumin (BSA),  $\beta$ -laktoglobulin, lysozym, cytochrom C, lidský sérový albumin (HSA) a křenová peroxidáza.

### 2.3.1 Hovězí sérový albumin (BSA)

CAS: 9048-46-8

Jedná se o sérový globulární protein tvořící asi 50% všech proteinů skotu. Jeho molekulová hmotnost je 66 430. BSA je polypeptidový řetězec skládající se z asi 583 aminokyselinových zbytků a neobsahující žádné sacharidy při pH 5-7 obsahuje 17 disulfidových můstků a jednu thiolovou skupinu. Hodnota jeho izoelektrického bodu je 4,7.<sup>79</sup>

### 2.3.2 $\beta$ -laktoglobulin

CAS: 9066-45-9<sup>80</sup>

Je hlavně nutričním proteinem nacházejícím se v mléce. Jeho role zřejmě souvisí s transportem mastných kyselin a vitamínu A.<sup>81-83</sup>

Skládá se ze 162 aminokyselinových zbytků. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 18 400 a hodnota jeho izoelektrického bodu je 5,1.<sup>80</sup>

### 2.3.3 Lysozym

CAS: 12650-88-3<sup>84</sup>

Lysozym je enzym katalyzující hydrolýzu vazby mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky v peptidoglykanu a mezi N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky v chitodextrinech. Tato katalytická aktivita je zaměřena na bakteriální buněčné membrány a souvisí s obranou organismu.

Je složen ze 129 aminokyselinových zbytků a jeho molekulová hmotnost je přibližně 14 600.<sup>85</sup> Hodnota jeho izoelektrického bodu je 11,35.<sup>84</sup>

### 2.3.4 Cytochrom C

CAS: 9007-43-6

Cytochrom C je protein odpovědný za přenos elektronů ( $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ ). Hraje tedy důležitou roli v buněčných oxidacích u rostlin i živočichů a je považován za katalyzátor buněčného dýchání.

Je složen ze 104 aminokyselinových zbytků a jeho molekulová hmotnost je 12 384. Hodnota jeho izoelektrického bodu je 10,65.<sup>86</sup>

### **2.3.5 Lidský sérový albumin (HSA)**

CAS: 70024-90-7<sup>87</sup>

HSA je hlavním proteinem lidské krve (představuje 60 % všech plasmatických proteinů), dále je přítomen v lymfatickém systému a v malém množství v kůži. Udržuje osmotický tlak krve a je významným transportním proteinem.

Je složen z 585 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 65 500. Hodnota jeho izoelektrického bodu je 4,7.<sup>88</sup>

### **2.3.6 Křenová peroxidáza (HRP)**

CAS: 9003-99-0<sup>89</sup>

Křenová peroxidáza je metaloenzym (patří do ferroporphyrinové skupiny peroxidáz), jež používá peroxid vodíku k oxidaci organických i anorganických sloučenin. Jedná se o glykoprotein, obsahující 18 % sacharidů.

Její molekulová hmotnost je 44 000<sup>90</sup> a je složena z 308 aminokyselin.<sup>91</sup> Hodnota jejího izoelektrického bodu je 8,8.<sup>92</sup>

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je studium magnetických nanočástic pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí při různě zvolených podmínkách separace (typ a pH pufru, různé koncentrace pufru, doba dávkování, aplikované separační napětí). Předmětem zájmu bylo nalézt vhodný základní elektrolyt pro charakterizaci magnetických nanočástic a pomocí afinitní kapilární elektroforézy zjistit, se kterými z vybraných proteinů budou tyto nanočástice interagovat. Snahou je zpracování získaných elektroforetických záznamů tak, aby bylo možné určení stechiometrického poměru komplexu nanočástice-protein a na základě zjištěných interakčních konstant odhadnout, o jaké typy interakcí se jedná.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

Zkoumané základní elektrolyty byly připraveny z těchto chemikálií: kyselina boritá, kyselina fosforečná, kyselina octová, kyselina citronová, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES), 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS), 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina (CHES) a hydroxid sodný. Ke zkoumaným proteinům patřil hovězí sérový albumin,  $\beta$ -laktoglobulin, lysozym, cytochrom C, lidský sérový albumin a křenová peroxidáza. Všechny chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) v čistotě p.a. Pro přípravu základních elektrolytů byla vždy použita deionizovaná voda, čehož bylo dosaženo přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA). Dále byly použity karboxylované magnetitové ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanočástice typu "core-shell" stabilizované polyakrylovou kyselinou, jež byly poskytnuty týmem prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. Tyto nanočástice byly připraveny v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) v Olomouci.

Použité nanočástice a proteiny byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

K použitým chemikáliím rovněž patří pufrы použité pro kalibraci pH metru.

### 4.2 Příprava roztoků elektrolytů

Příprava roztoků všech elektrolytů (vždy o koncentraci 50 mM) byla založena vždy na stejném principu a to rozpuštěním předem naváženého množství odpovídající kyseliny v deionizované vodě. Vzniklé roztoky byly poté za stálého míchání titrovány roztoky hydroxidu sodného o koncentracích 50 a 10 % (w/w) až na požadovanou hodnotu pH, přičemž hodnota pH byla průběžně sledována pomocí pH-metru. Všechny připravené elektrolyty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

### 4.3 Příprava kalibračních sad roztoků proteinů

Vzhledem k tomu, že jako nejvhodnější pufr byl vybrán borát o pH 9,5, probíhalo studium interakcí nanočástic s proteiny v tomto základním elektrolytu.

Roztoky proteinů byly opět vždy připravovány stejným způsobem. Nejprve bylo naváženo vypočítané množství příslušného proteinu, jenž bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky, následně byl protein v roztoku borátu rozpuštěn a doplněn borátem po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok proteinu v odměrné baňce o koncentraci  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Ředěním pak byly připraveny roztoky proteinů o koncentracích v rozmezí  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> -  $10^{-14}$  mol.l<sup>-1</sup>. Nakonec bylo 150 µl roztoku z každé mikrozkušavky odpipetováno do dvou vialek, přičemž do posledních dvou vialek byl napipetován pouze roztok elektrolytu (koncentrace proteinu je zde 0 mol.l<sup>-1</sup>). Všechny vialky byly uloženy do karuselu přístroje pro kapilární elektroforézu.

### 4.4 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny analýzy byly provedeny na přístroji pro kapilární elektroforézu HP <sup>3D</sup>CE s detekcí s diodovým polem DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Vlnová délka pro UV detektor byla nastavena na 200 nm. Byla použita křemenná kapilára pokrytá na vnějším povrchu vrstvou polyimidu s vnitřním průměrem 50 µm. (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA), jejíž celková délka byla 33 cm. Efektivní délka kapiláry k UV detektoru byla 24,5 cm. Kazeta s kapilárou byla temperována na 25 °C. Dávkování probíhalo tlakem 50 mbar po dobu 10 vteřin, aplikované separační napětí bylo 20 kV.

Před prvním pokusem a každou změnou základního elektrolytu byla kapilára propláchnuta roztokem NaOH o koncentraci 1 mol.l<sup>-1</sup> po dobu 20 minut, poté deionizovanou vodou po dobu 10 minut a následně puftrem po dobu rovněž 10 minut. Před každou analýzou pak byla kapilára proplachována roztokem NaOH o koncentraci 1 mol.l<sup>-1</sup> po dobu 2 minut, deionizovanou vodou rovněž 2 minuty a puftrem po dobu 4 minut. Veškeré proplachování kapiláry bylo prováděno tlakem 940 mbar.



Obr.22: Fotografie přístroje HP <sup>3D</sup>CE Agilent Technologies.

## 4.5 Laboratorní pomůcky

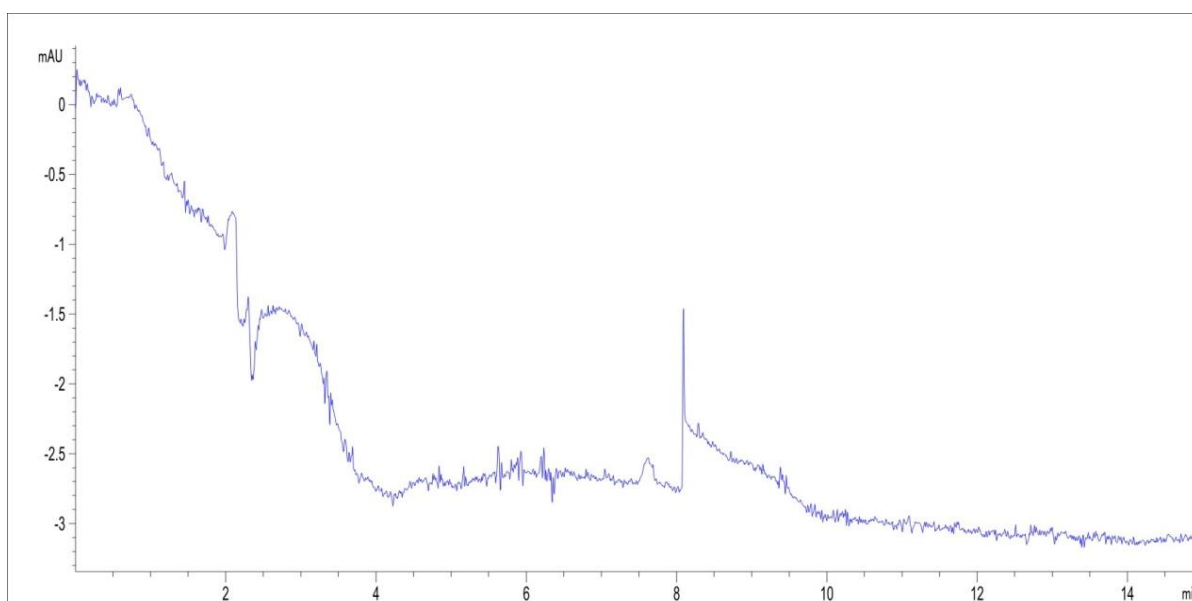
K dalším použitým pomůckám a přístrojům patřily analytické váhy, automatické pipety se špičkami, pH metr, magnetické míchadlo, kádinky, odměrné baňky se zátkami, nálevky, tyčinky, navažovací lodičky, špachtle a lžičky, vialky s víčky a mikrozkuřavky typu eppendorf.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

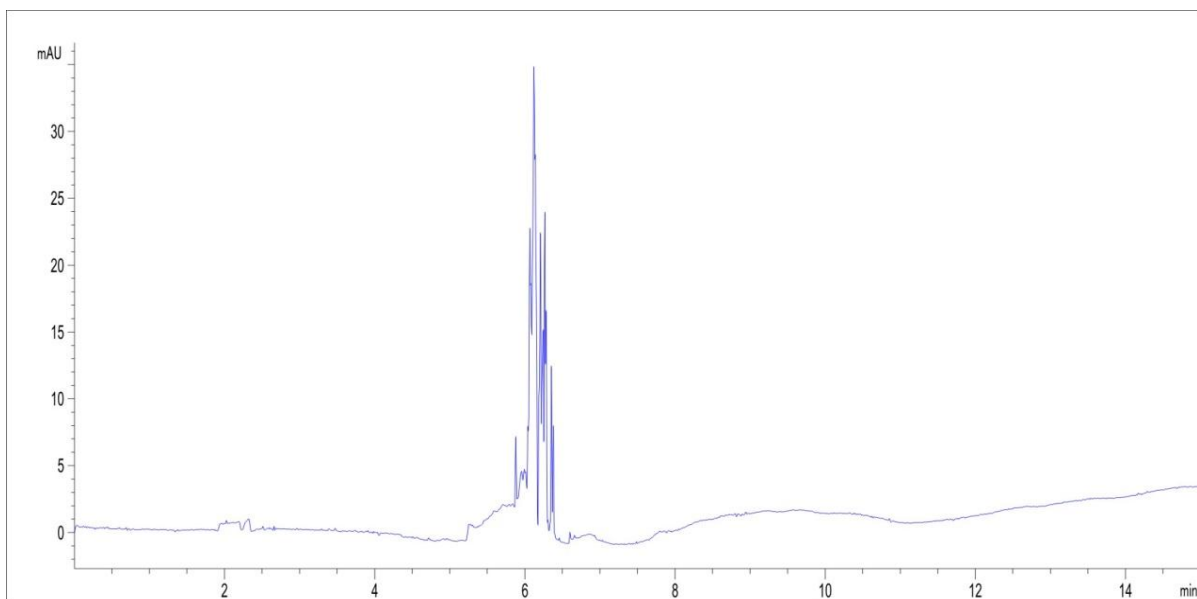
### 5.1 Volba vhodného elektrolytu

Prvním cílem experimentální části této práce byla snaha nalézt nejvhodnější elektrolyt pro další prováděné analýzy. Proto bylo zkoumáno chování magnetických nanočástic v různých druzích elektrolytů. Mezi testované elektrolyty patřily:

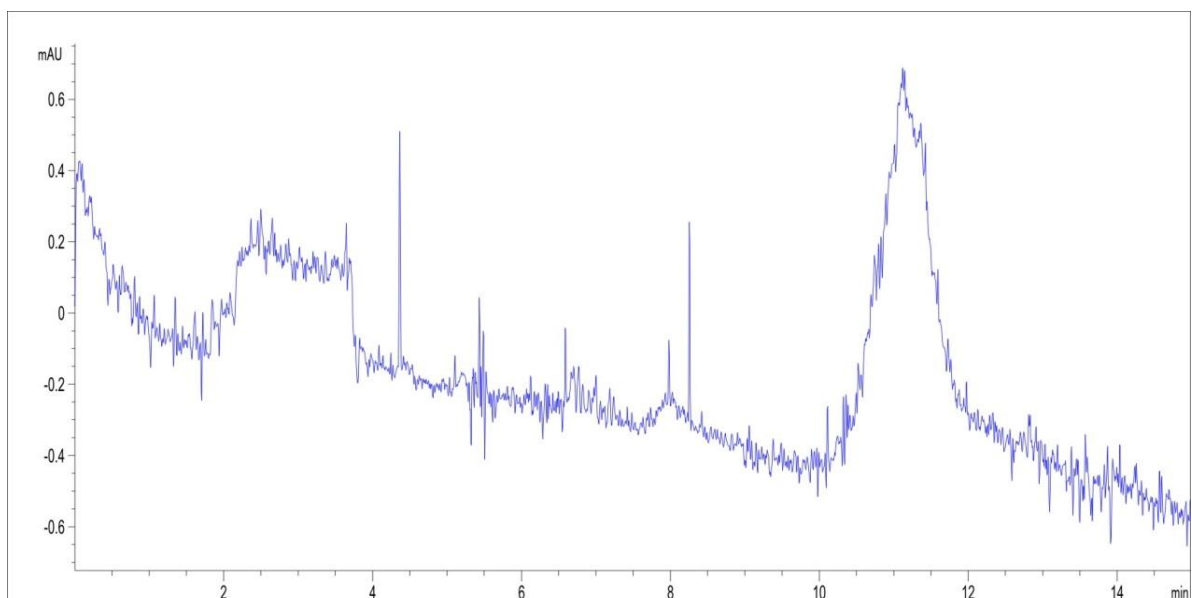
1. Fosfát / NaOH pH 2,5
2. Acetát / NaOH pH 4,0
3. MES / NaOH pH 6,0
4. MOPS / NaOH pH 7,5
5. Citrát / NaOH pH 3,5 a 4,5
6. Borát / NaOH pH 9,5
7. CHES/NaOH pH 9,5



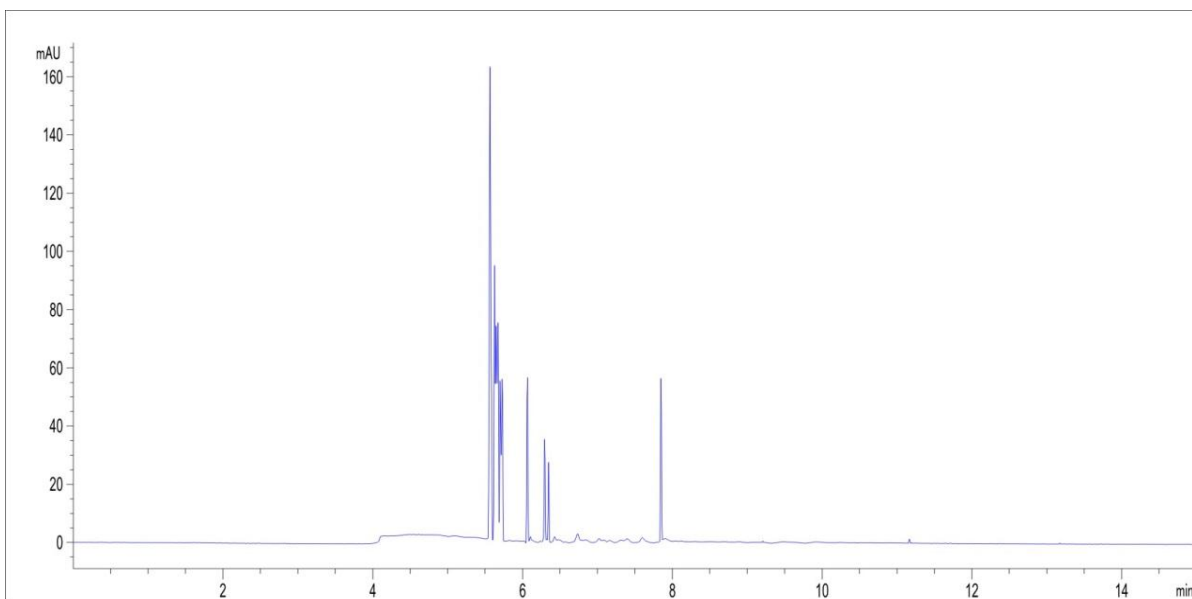
Obr. 23: CE analýza magnetických nanočástic za použití pufru fosfát/NaOH (pH = 2,5)



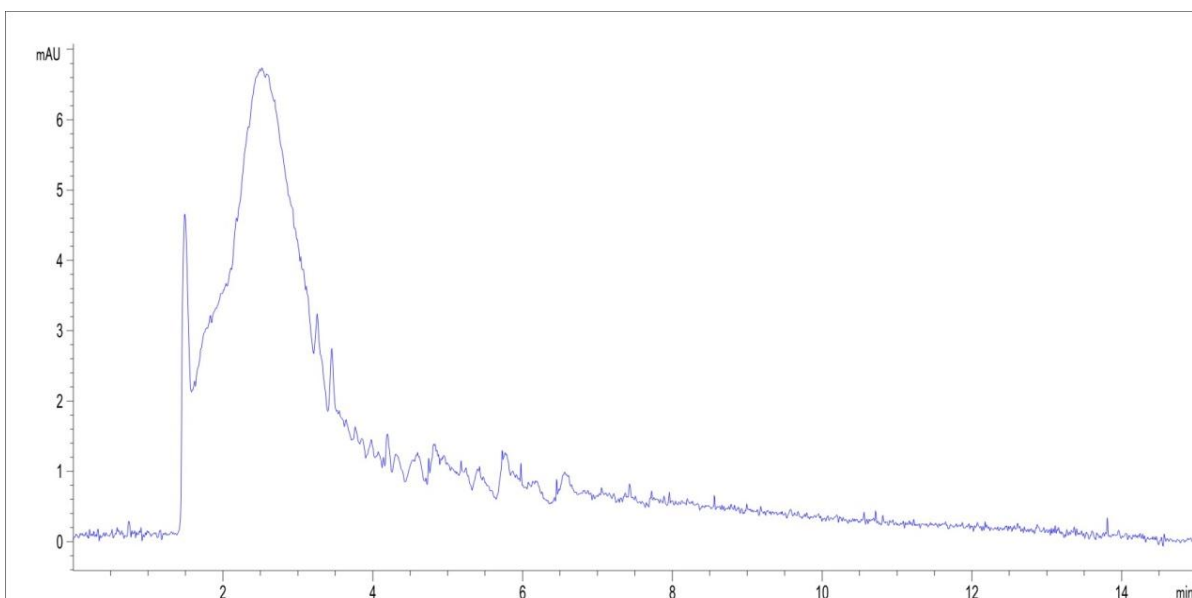
Obr. 24: CE analýza magnetických nanočástic za použití pufru citrát/NaOH (pH = 3,5)



Obr. 25: CE analýza magnetických nanočástic za použití pufru MOPS/NaOH (pH = 7,5)



Obr. 26: CE analýza magnetických nanočástic za použití pufru acetát/NaOH (pH = 4)

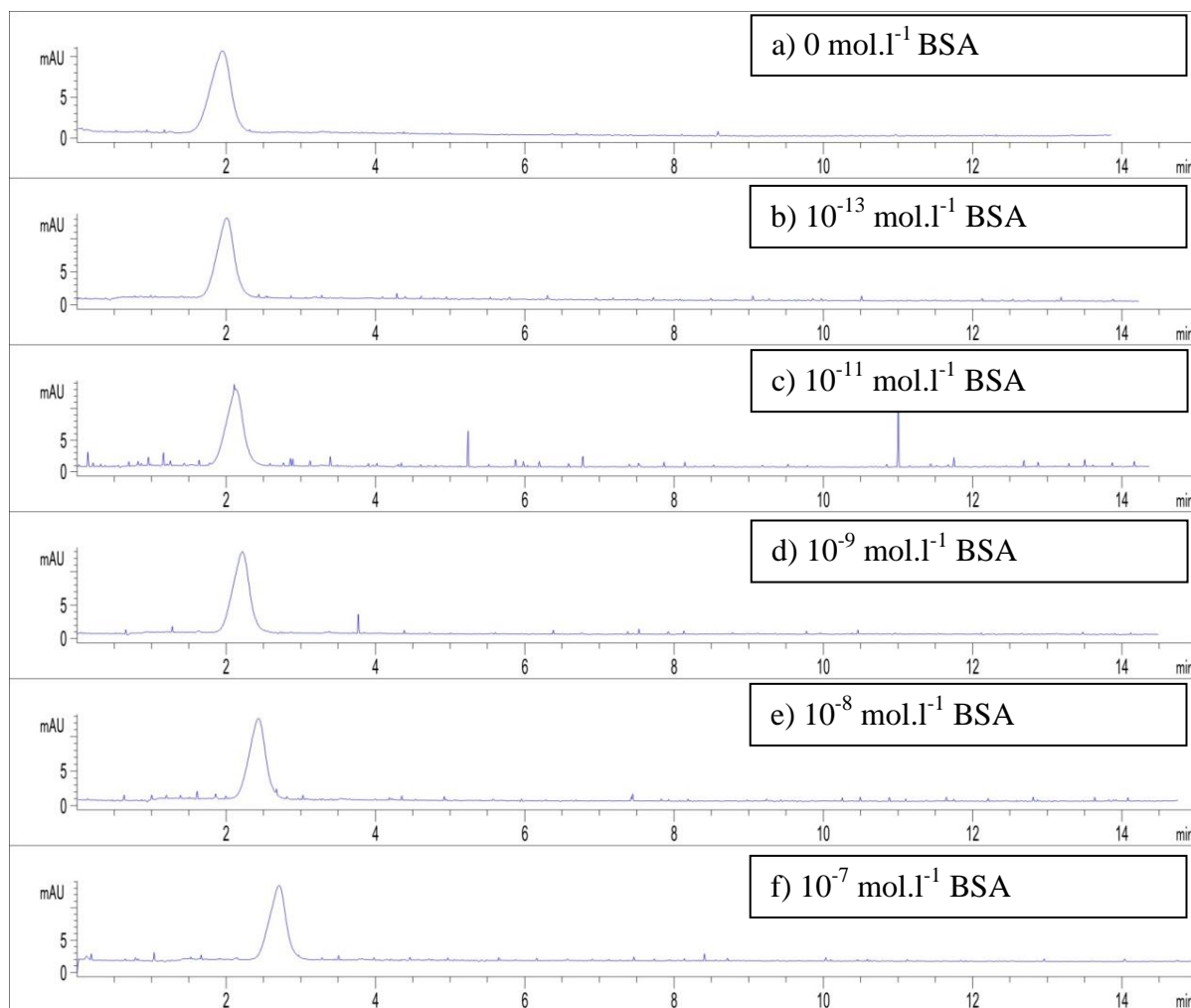


Obr. 27: CE analýza magnetických nanočástic za použití pufru CHES/NaOH (pH = 9,5)

Z uvedených elektroferogramů vyplývá, že nejvhodnějším BGE je borátový pufr při pH 9,5 (obr. 28 a 29). Z hlediska opakovatelnosti analýz (migrační časy a plochy píků) a stability elektrického proudu totiž vykazoval tento základní elektrolyt nejlepší vlastnosti. Z tohoto důvodu byl použit pro další analýzy.

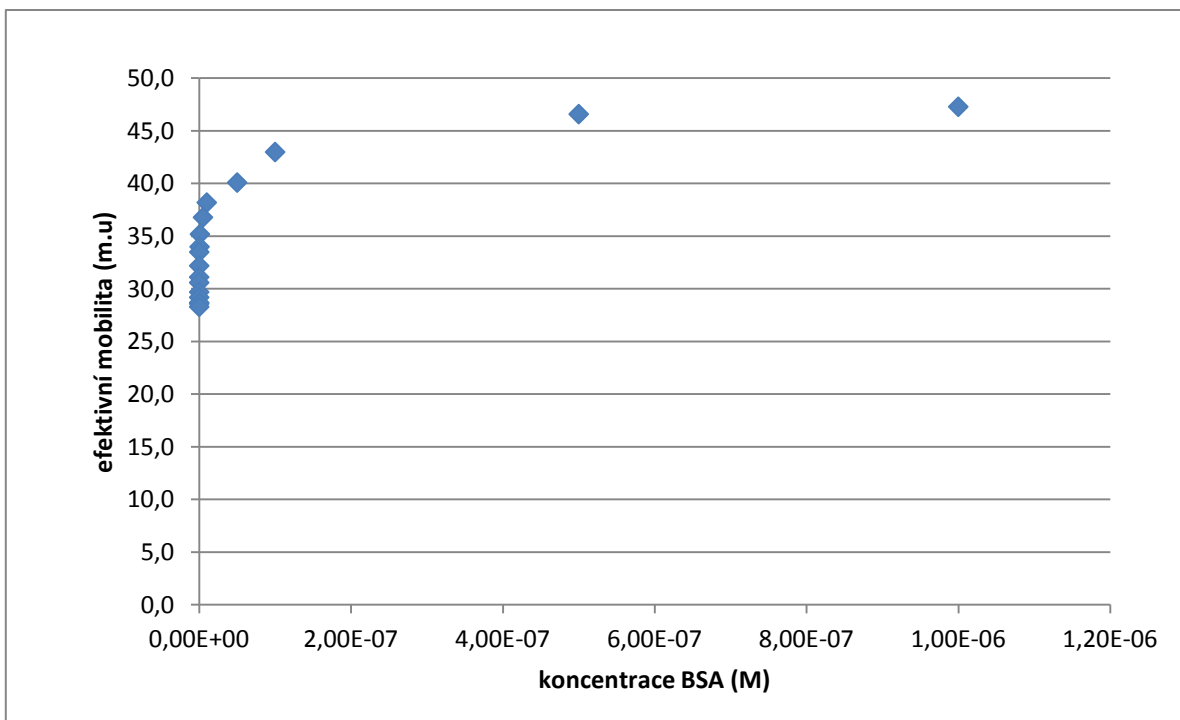
## 5.2 Studium interakcí nanočástic s hovězím sérovým albuminem (BSA)

Jako první byla studována interakce nanočástic s BSA. Posun migračních časů v závislosti na měnící se koncentraci BSA je vidět na obr. 28.



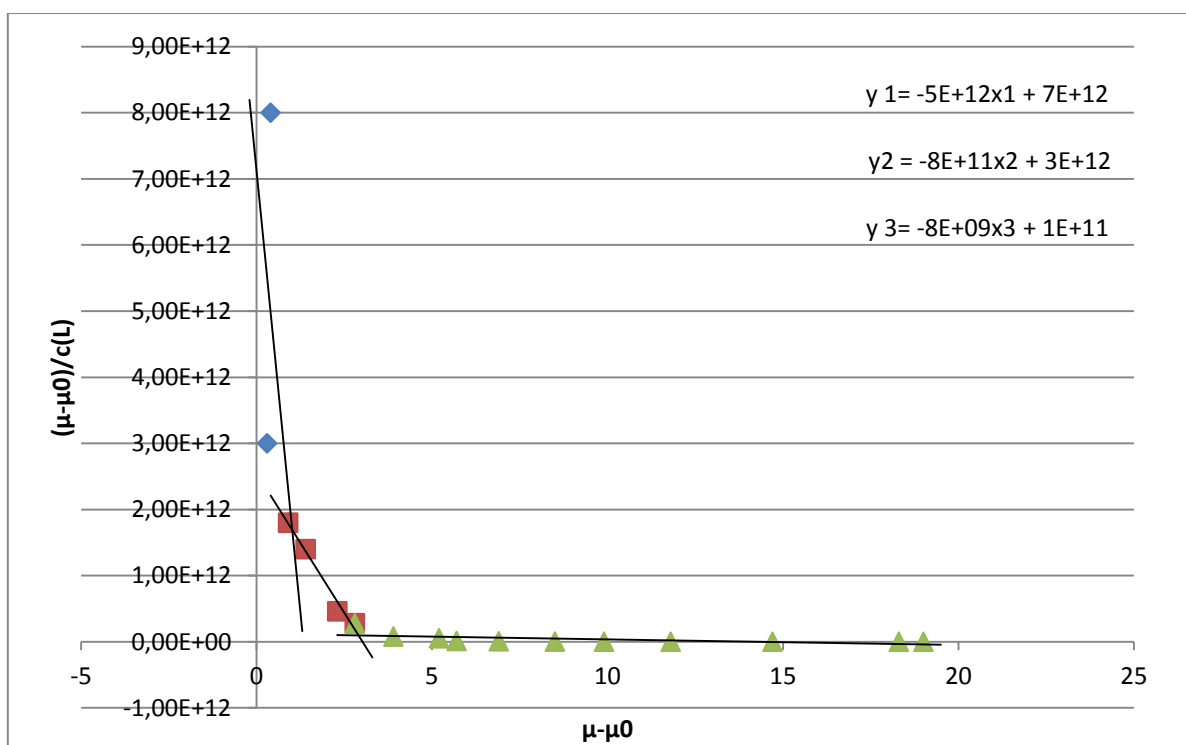
Obr. 28: Změna migračního času nanočástic v závislosti na různé koncentraci BSA.

Z migračních časů potom byla sestrojena závislost efektivní mobility nanočástic na koncentraci koncentraci BSA (graf 1a).



Graf 1a: Závislost efektivní mobility na koncentraci BSA.

Z uvedeného grafu je zřetelné, že s velmi malou koncentrací BSA se mění mobilita nanočástic (v jednotkách m.u. =  $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) skokově, avšak čím je koncentrace proteinu větší, tím je změna mobility menší. To lze vysvětlit tím, že je již obsazena většina míst, kde může dojít k interakci. Dále byla provedena linearizace dle Scatcharda (Graf 1b).



Graf 1b: x-reciproká závislost dle Scatcharda a znázornění lineárních oblastí.

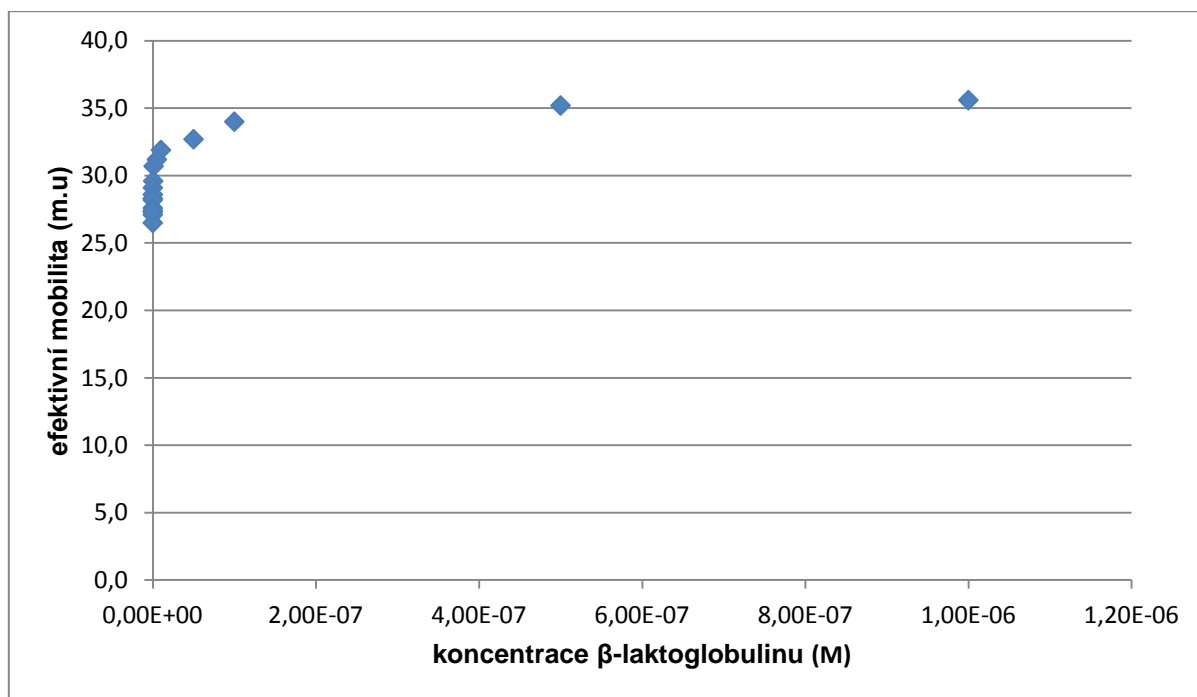


Po linearizaci grafu 1a (graf 1b) jsou zřetelné 3 lineární oblasti, přičemž každé odpovídá jiný stechiometrický poměr a jiná interakční konstanta. Ty jsou vypočteny podle kapitoly 2.2.5.7.

$K_1 = 2 \cdot 10^{-13}$ (nanočástice:protein)	$n_1 = 0,074$ , což přibližně odpovídá poměru 1:14
$K_2 = 1,25 \cdot 10^{-12}$	$n_2 = 0,2$ , což přibližně odpovídá poměru 1:5
$K_3 = 1,25 \cdot 10^{-10}$	$n_3 = 0,658$ , což přibližně odpovídá poměru 1:1,5

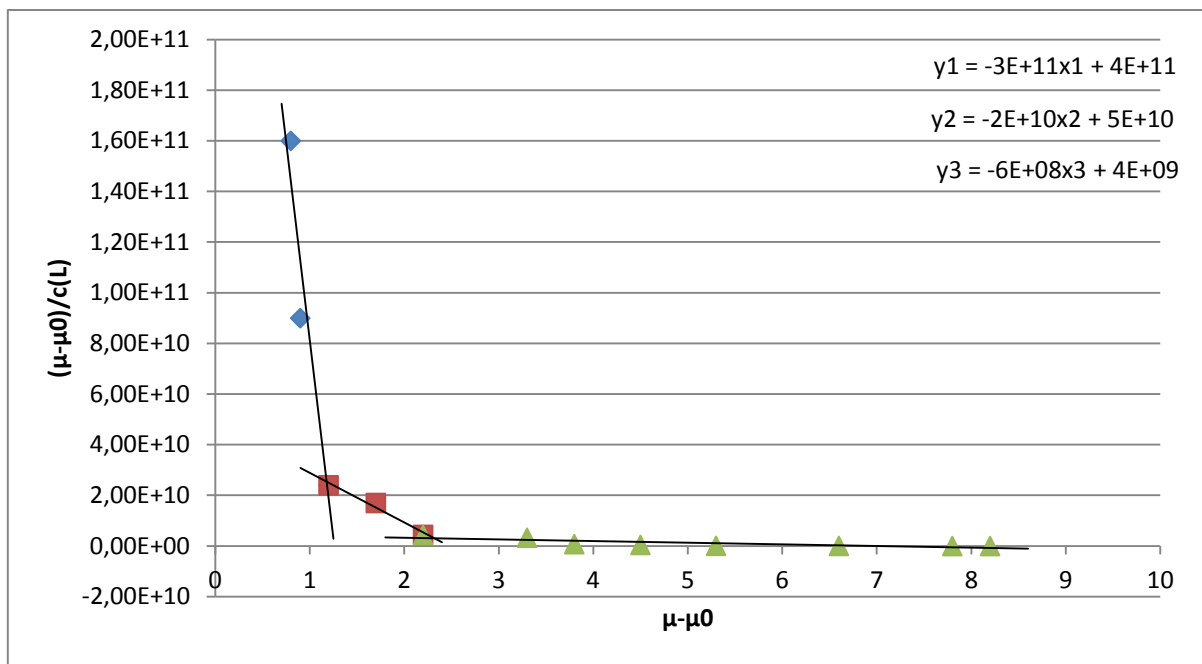
### 5.3 Studium interakcí nanočástic s $\beta$ -laktoglobulinem

Jako druhý protein, u kterého byly studovány interakce s nanočásticemi byl vybrán  $\beta$ -laktoglobulin. Závislost efektivní mobility nanočástic na jeho koncentraci je patrná z grafu 2a.



Graf 2a: Závislost efektivní mobility na koncentraci  $\beta$ -laktoglobulinu.

Tento graf byl poté rovněž linearizován a z vybraných lineárních úseků byly vypočteny interakční konstanty a odpovídající stechiometrické poměry.



Graf 2b: x-reciproká závislost dle Scatcharda a znázornění lineárních oblastí.

$$K_1 = 3,33 \cdot 10^{-12}$$

$$n_1 = 0,162, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:6$$

$$K_2 = 5 \cdot 10^{-11}$$

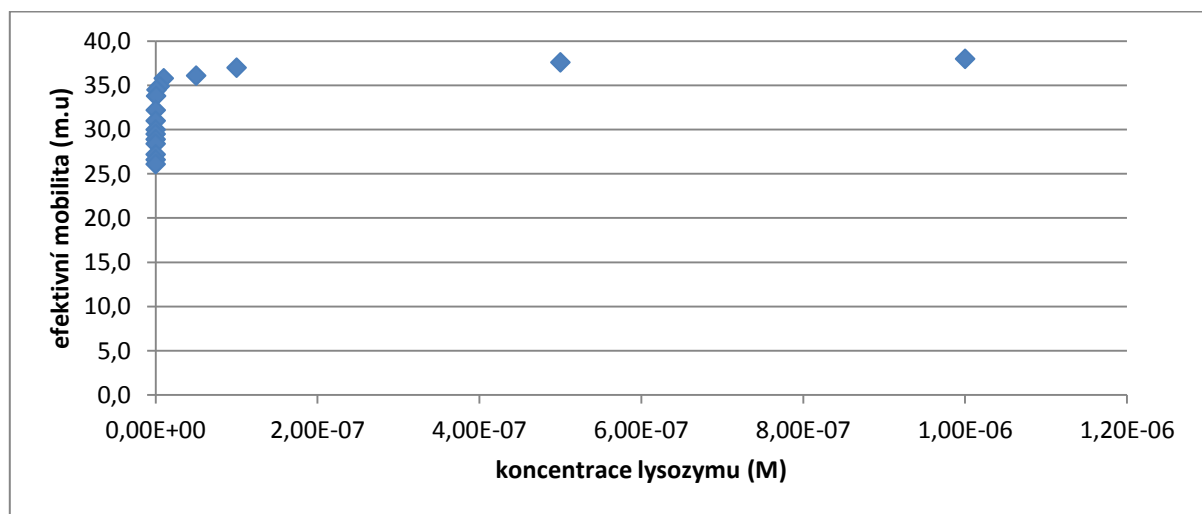
$$n_2 = 0,305, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:3,3$$

$$K_3 = 1 \cdot 10^{-9}$$

$$n_3 = 0,813, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:1,2$$

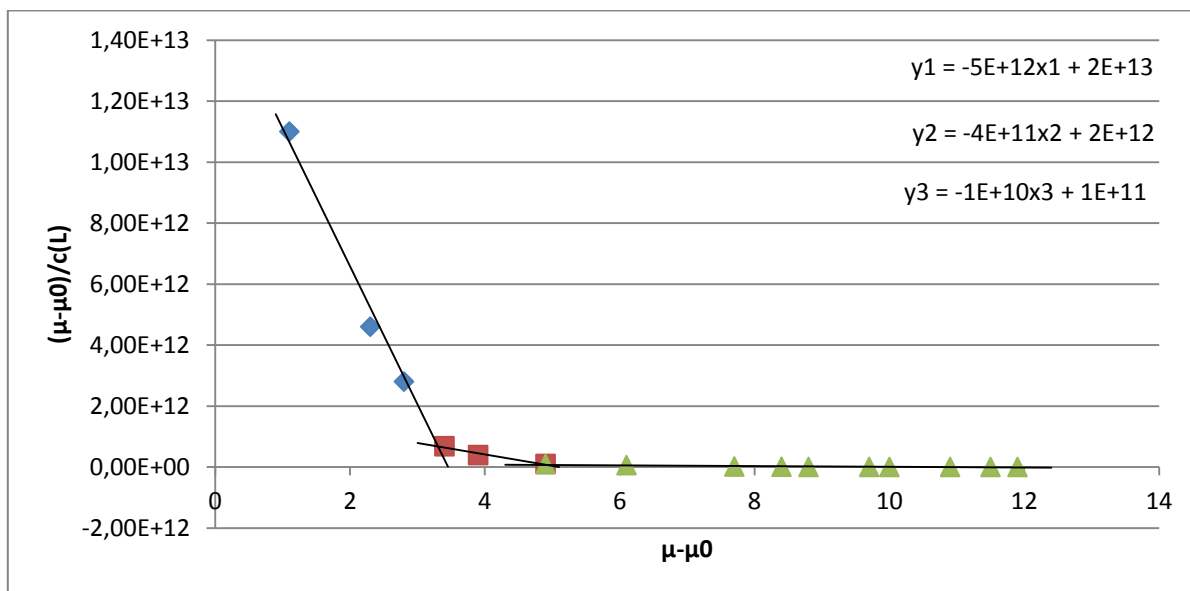
## 5.4 Studium interakcí nanočástic s lysozymem

Dalším proteinem u něhož byly tyto interakce studovány byl lysozym. Změny efektivní mobility nanočástic v závislosti na jeho zvyšující se koncentraci jsou vidět na grafu 3a.



Graf 3a: Závislost efektivní mobility na koncentraci lysozymu.

Pro zjištění interakčních konstant a výpočet stechiometrických poměrů bylo opět využito x-reciproké linearizace.



Graf 3b: x-reciproká závislost dle Scatcharda a znázornění lineárních oblastí.

$$K_1 = 2 \cdot 10^{-13}$$

$$K_2 = 2,5 \cdot 10^{-12}$$

$$K_3 = 1 \cdot 10^{-10}$$

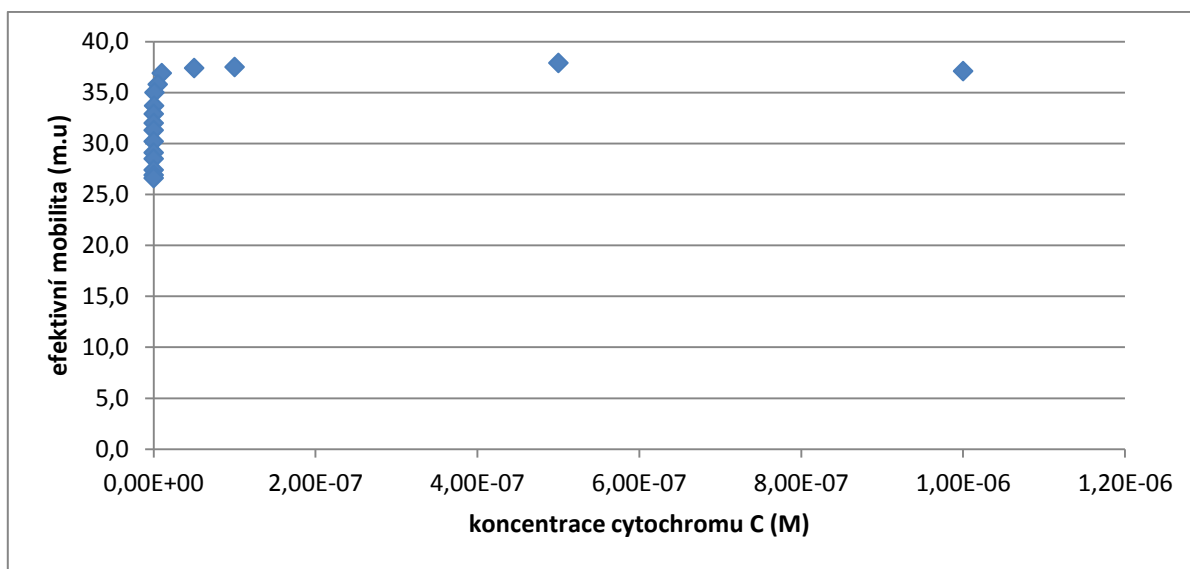
$$n_1 = 0,336, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:3$$

$$n_2 = 0,42, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:2,4$$

$$n_3 = 0,84, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:1,2$$

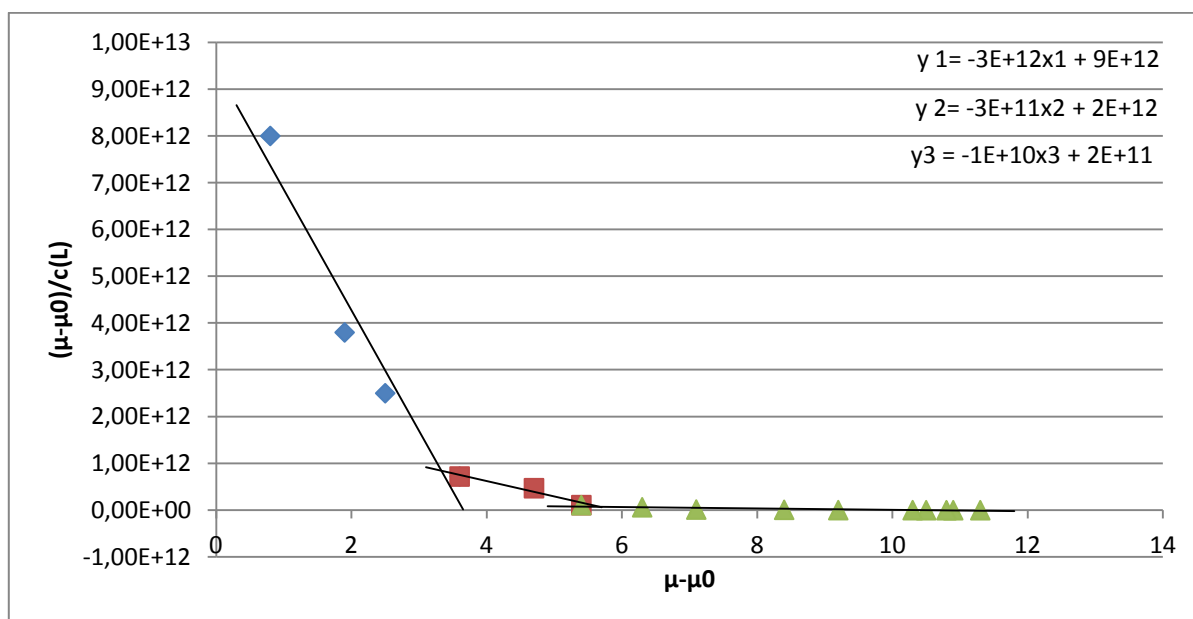
## 5.5 Studium interakcí nanočástic s cytochromem C

Pro další studium interakcí magnetitových nanočástic s proteiny byl vybrán cytochrom C. Změnu efektivní mobility nanočástic s jeho rostoucí koncentrací lze pozorovat na grafu 4a.



Graf 4a: Závislost efektivní mobility na koncentraci cytochromu C.

Po linearizaci grafu 4a dochází opět k rozdělení do tří lineárních úseků, což je zřetelné z grafu 4b.



Graf 4b: x-reciproká závislost dle Scatcharda a znázornění lineárních oblastí.

$$K_1 = 3,33 \cdot 10^{-13}$$

$$K_2 = 3,33 \cdot 10^{-12}$$

$$K_3 = 1 \cdot 10^{-10}$$

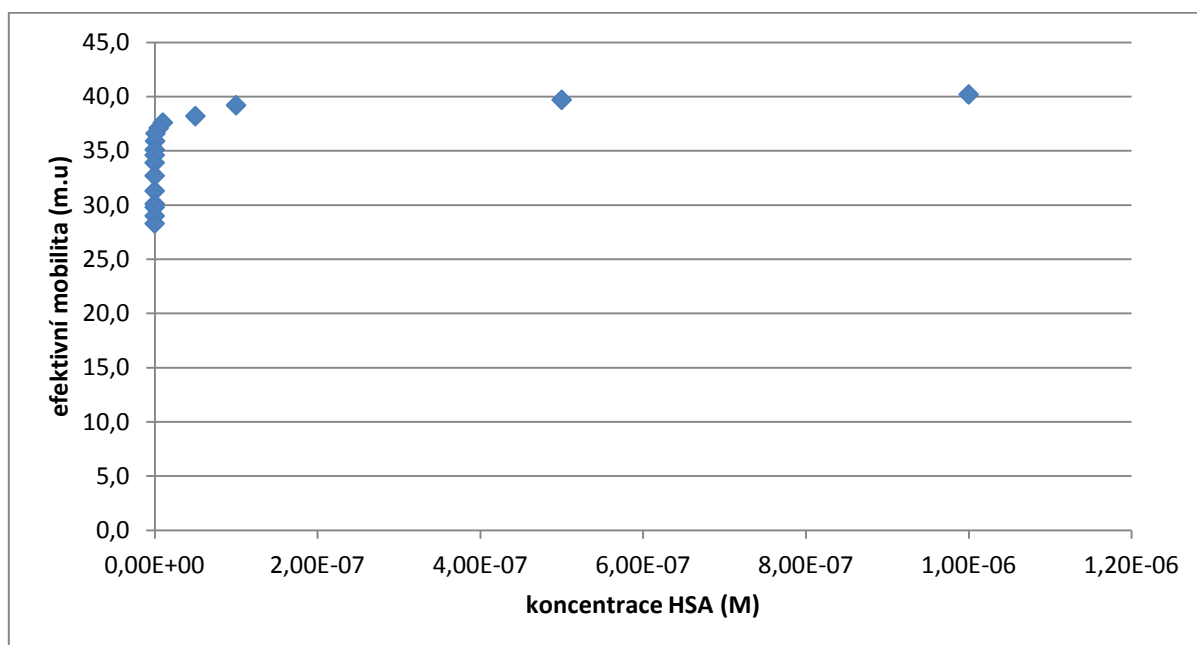
$$n_1 = 0,265, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:4$$

$$n_2 = 0,59, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:2$$

$$n_3 = 1,77, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 2:1$$

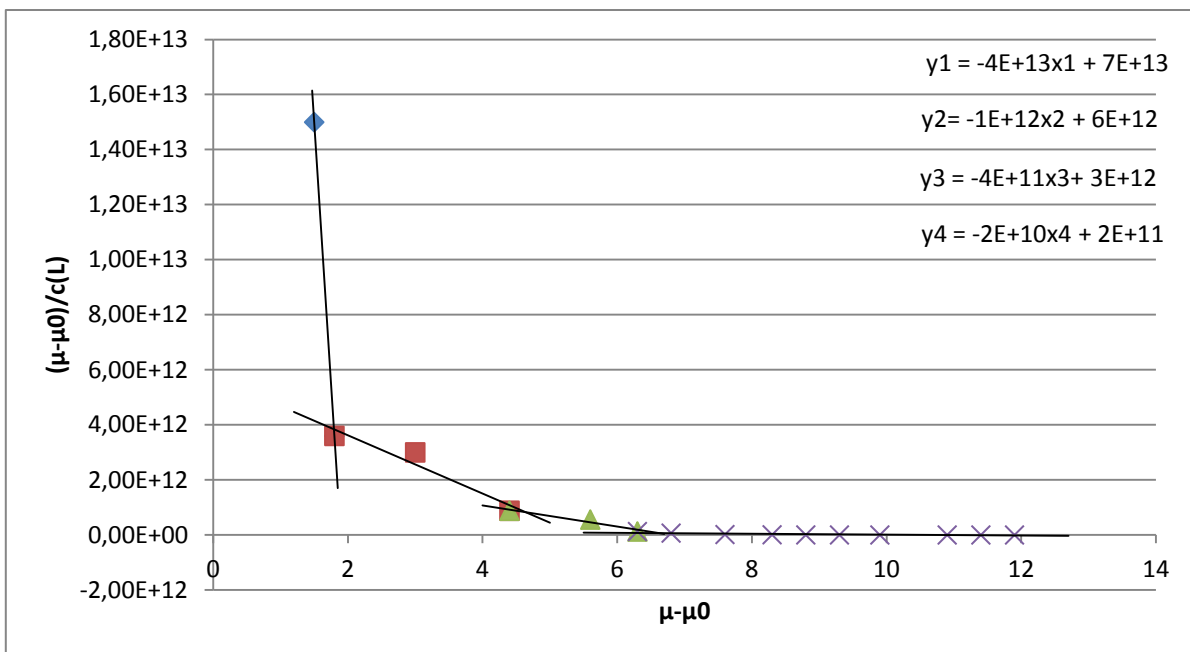
## 5.6 Studium interakcí nanočástic s lidským sérovým albuminem (HSA)

Jako zástupce proteinu, jež se vyskytuje v lidské krvi byl vybrán lidský sérový albumin. Efektivní mobilita nanočástic se mění v závislosti na jeho koncentraci podle grafu 5a.



Graf 5a: Závislost efektivní mobility na koncentraci HSA.

Linearizací tohoto grafu získáme čtyři lineární části, které jsou patrné z grafu 5b.



Graf 5b: x-reciproká závislost dle Scatcharda a znázornění lineárních oblastí.

$$K_1 = 2,5 \cdot 10^{-14}$$

$$K_2 = 1 \cdot 10^{-12}$$

$$K_3 = 2,5 \cdot 10^{-12}$$

$$K_4 = 5 \cdot 10^{-11}$$

$n_1 = 0,147$  , což přibližně odpovídá poměru 1:7

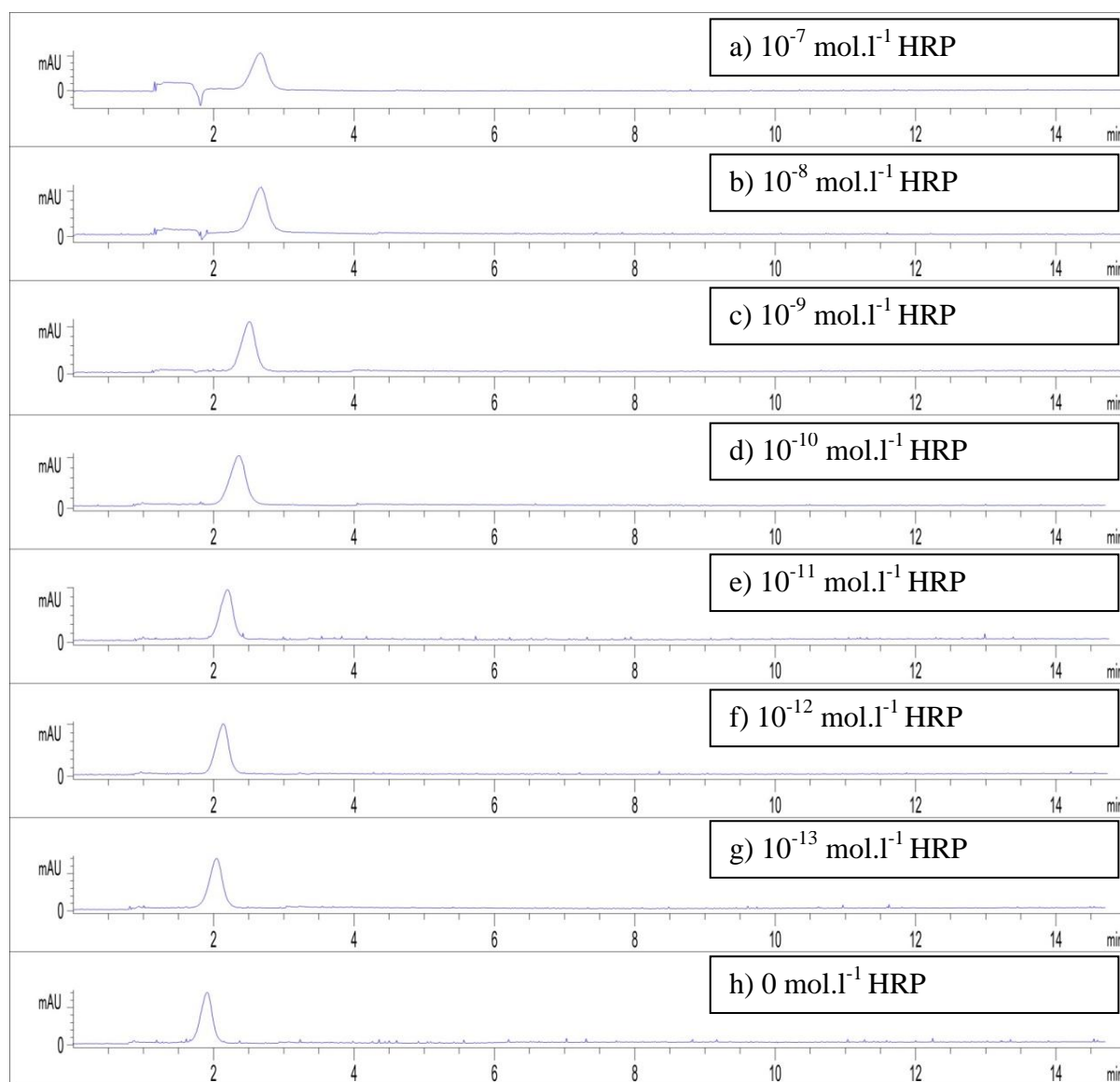
$n_2 = 0,5$  , což přibližně odpovídá poměru 1:2

$n_3 = 0,63$  , což přibližně odpovídá poměru 1:1,6

$n_3 = 0,84$  , což přibližně odpovídá poměru 1:1,2

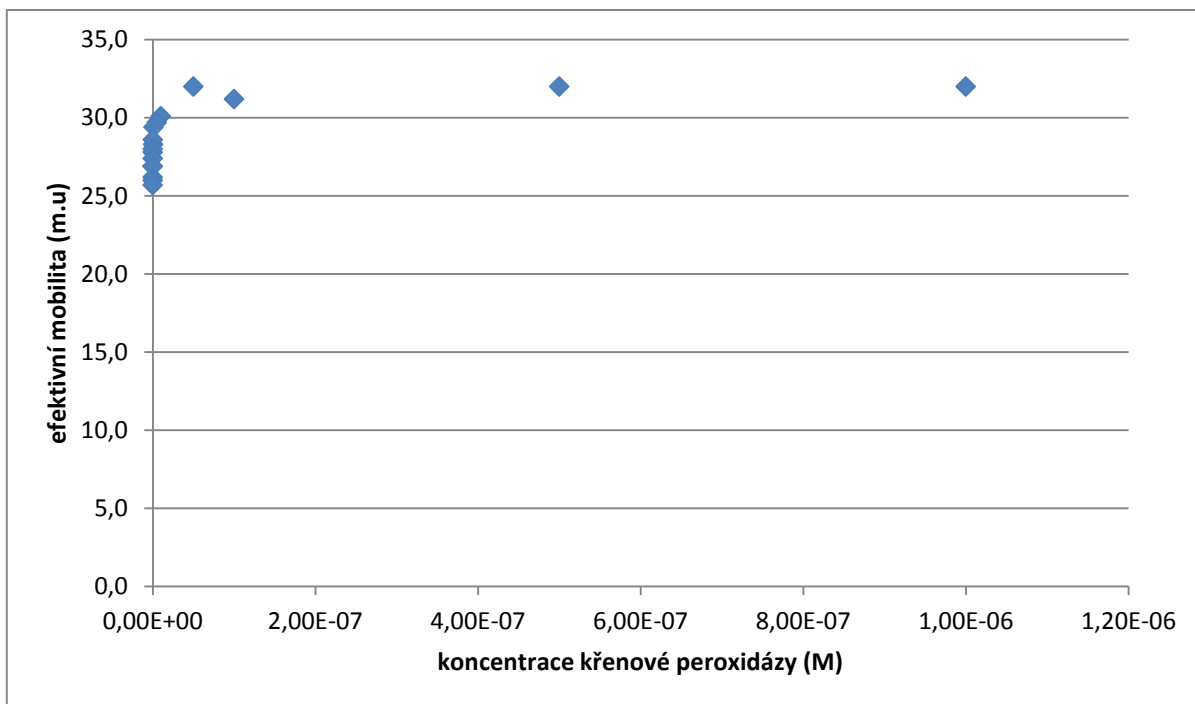
## 5.7 Studium interakcí nanočástic s křenovou peroxidázou (HRP)

Posledním vybraným proteinem, který byl použit pro zkoumání interakcí s magnetitovými nanočásticemi byla vybrána křenová peroxidáza (HRP). Posun migračních časů nanočástic v přítomnosti HRP o různých koncentracích je ukázán na obr. 29.



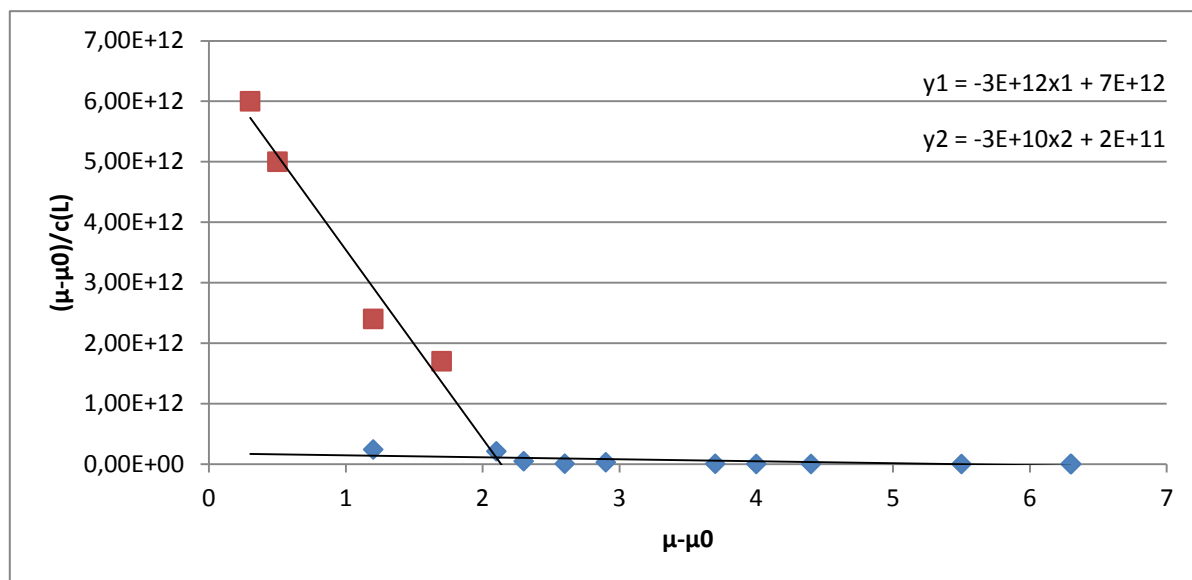
Obr. 29: Změna migračního času nanočástic v závislosti na různé koncentraci HRP.

I zde byla nejprve sestrojena závislost efektivní mobility nanočástic na její různé koncentraci (graf 6a).



Graf 6a: Závislost efektivní mobility na koncentraci křenové peroxidázy.

Po linearizaci dle Scatcharda (graf 6b) lze vidět pouze dvě lineární oblasti, pro které byly následně vypočteny interakční konstanty a stechiometrické poměry.



Graf 6b: x-reciproká závislost dle Scatcharda a znázornění lineárních oblastí.

$$K_1 = 3,33 \cdot 10^{-13}$$

$$K_2 = 3,33 \cdot 10^{-11}$$

$$n_1 = 0,37, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:3$$

$$n_2 = 1,06, \text{ což přibližně odpovídá poměru } 1:1$$



## 6 ZÁVĚR

V práci je ukázáno, jak může být kapilární elektroforéza využita ke studiu nanočástic, zejména magnetických. Pro studium použitých magnetitových nanočástic byly nejprve optimalizovány separační parametry, a to doba dávkování a aplikované separační napětí. Z diplomové práce také vyplývá, jaký vliv má použitý základní elektrolyt na průběh analýz.

Vzhledem k použití nanočástic (nejen magnetických) v medicíně nebo v životním prostředí je nezbytné, abychom věděli, jak se nanočástice chovají v biologických vzorcích. Proto bylo dále ukázáno, jak může být kapilární elektroforéza v módu afinitní kapilární elektroforézy použita pro studium interakcí magnetitových nanočástic s několika vybranými proteiny. Bylo zkoumáno chování nanočástic v kapilární elektroforéze v přítomnosti bazických proteinů (lysozym, cytochrom C a křenová peroxidáza) a kyselých proteinů (hovězí sérový albumin,  $\beta$ -laktoglobulin a lidský sérový albumin). Vzhledem k tomu, že jsou použité nanočástice při pH 9,5 (pH pufru) negativně nabitě, předpokládali jsme, že budou bazické proteiny, které mohou mít při tomto pH ještě pozitivní oblasti struktury, vykazovat vyšší interakční konstanty a kyselé proteiny, které by neměly být při pH 9,5 nabitě kladně (jsou neutrální nebo nabitě záporně), by hypoteticky měly vykazovat nižší interakční konstanty. To by ukazovalo na elektrostatické interakce u bazických proteinů a hydrofóbní interakce u proteinů kyselých. Nicméně, tento předpoklad nebyl potvrzen, protože zjištěné interakční konstanty jsou u všech studovaných proteinů srovnatelné. Podle toho lze usuzovat, že u všech zkoumaných komplexů protein-nanočástice budou převládat hydrofóbní interakce.

Náplní další práce v laboratoři pak bude studium interakcí v prostředí o pH 7,5, které je fyziologické, a také interakce s jinými molekulami, např. DNA.

Z této práce je tedy zřejmé, že afinitní kapilární elektroforéza představuje výkonnou techniku pro studium takových interakcí.

## 7 LITERATURA

1. Salata O. V.: J. Nanobiotechnol. **2**, 1-6 (2004).
2. Lu A. H., Salabas E. L., Schüth F.: Angew. Chem. Int. Ed. **46**, 1222-1244 (2007).
3. Colton I. J., Carbeck J. D., Rao J., Whitesides G. M.: Electrophoresis **19**, 367-382 (1998).
4. Panáček A.: *Řízená příprava a antibakteriální aktivita koloidních částic stříbra*. Doktorská disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci 2006.
5. de Dios A. S., Díaz-García M. E.: Anal. Chim. Acta **666**, 1-22 (2010).
6. <http://nanotechnologie.vsb.cz>, staženo 30. 1. 2014.
7. [http://nanosystemy.upol.cz/upload/31/marsalek\\_rusava\\_2011.pdf](http://nanosystemy.upol.cz/upload/31/marsalek_rusava_2011.pdf), staženo 3. 2. 2014.
8. [http://www.nanocon.cz/files/proceedings/nanocon\\_09/Lists/Papers/030.pdf](http://www.nanocon.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/030.pdf), staženo 24. 4. 2012.
9. <http://jnm.snmjournals.org/content/48/7/1039/F1.large.jpg>, staženo 18. 3. 2014.
10. Taton T. A.: Trends Biotechnol. **20**, 277-279 (2002).
11. Wang S., Mamedova N., Kotov N. A., Chen W., Studer J.: Nano Lett. **2**, 817-822 (2002).
12. Král V., Šotola J., Neuwirth P., Kejík Z., Záruba K., Martásek P.: Chem. Listy **100**, 4-9 (2006).
13. Edelstein R. L., Tamanaha C. R., Sheehan P. E., Miller M. M., Baselt D. R., Whitman L. J., Colton R. J.: Biosens. Bioelectron. **14**, 805-813 (2000).
14. [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/dp.php?ip=80](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/dp.php?ip=80), staženo 8. 2. 2014.
15. Bao Y. P., Wei T. F., Lefebvre P. A. An H., He L., Kunkel G. T., Müller U. R.: Anal. Chem. **78**, 2055-2059 (2006).
16. Nam J. M., Thaxton C. C., Mirkin C. A.: Science **301**, 1884-1886 (2003).
17. Mahtab R., Rogers J. P., Murphy C. H.: J. Am. Chem. Soc. **117**, 9099-9100 (1995).
18. [https://moodle.fp.tul.cz/nano/pluginfile.php/1633/mod\\_resource/content/0/Zdravotn%C3%AD%20rizika%20nano%C4%8D%C3%A1stic%201.pdf](https://moodle.fp.tul.cz/nano/pluginfile.php/1633/mod_resource/content/0/Zdravotn%C3%AD%20rizika%20nano%C4%8D%C3%A1stic%201.pdf), staženo 15. 2. 2014.
19. Molday R. S., MacKenzie D.: J. Immunol. Methods **52**, 353-367 (1982).
20. Elias A., Tsourkas A.: Hematology, 720-726 (2009).
21. Parak W. J., Boudreau R., Le Gros M. A., Gerion D., Zanchet D., Micheel C. M. Williams S. C., Alivisatos A. P., Larabell C. A.: Adv. Mater. **14**, 882-885 (2002).
22. Nováková T., Šváb M., Švábová M.: Chem. Listy **103**, 524-532 (2009).

23. Elliot D. W., Zhang W. X.: Environ. Sci. Technol. **35**, 4922-4926 (2001).
24. Li X., Elliot D. W., Zhang W. X.: Crit. Rev. Solid State Mater. Sci. **31**, 111-122 (2006).
25. Karpinski Z., Early K., d'Itri J. L.: J. Catal. **164**, 378-386 (1996).
26. Quinn J., Geiger Ch., Clausen Ch., Brooks K., Coon Ch., O'Hara S., Krug T., Major D., Yoon W. S., Gavaskar A., Holdsworth T.: Environ. Sci. Technol. **39**, 1309-1318 (2005).
27. Zimmermann L. M., Almerindo G. I., Mora J. R., Bechtold I. H., Fiedler H. D., Nome F.: J. Phys. Chem. **117**, 26097-26105 (2013).
28. Patil R. M., Shete P. B., Thorat N. D., Otari S. V., Barick K. C., Prasad A., Ningthoujam R. S., Tiwale B. M., Pawar S. H.: J. Magn. Mater. **355**, 22-30 (2014).
29. Shen Y. F., Tang J., Nie Z. H., Wang Y. D., Ren Y., Zuo L.: Sep. Purif. Technol. **68**, 312-319 (2009).
30. <http://www.fzu.cz/oddeleni/oddeleni-magnetickych-nanosystemu/vyzkumna-temata/magneticke-nanocastice>, staženo 20. 2. 2014.
31. Baker S. N., Baker G. A.: Angew. Chem. Int. Ed. **49**, 6727 (2010).
32. Amara D., Felner I., Nowik I., Margel S.: Colloids Surf., A **339**, 106-110 (2009).
33. Murray C. B., Norris D. J., Bawendi M. G.: J. Am. Chem. Soc. **115**, 8706-8715 (1993).
34. Liu Ch., Zou B., Rondinone A. J., Zhang Z. J.: J. Phys. Chem., B **104**, 1141-1145 (2000).
35. Zákutná D., Repko A., Matulková I., Nižňanský D., Ardu A., Cannas C., Mantlíková A., Vejpravová J.: J. Nanopart. Res. **16**, 1-14 (2014).
36. Wang X., Zhuang J., Peng Q., Li Y.: Nature **437**, 121-124 (2005).
37. Kvítek L., Panáček A.: *Základy koloidní chemie*. UP Olomouc, Olomouc 2007.
38. González J. A., Andrés J. P., De Toro J. A., Muñoz P., Muñoz T., Crisan O., Binns C., Riveiro J. M.: J. Nanopart. Res. **11**, 2105-2111 (2008).
39. Boyen H. G., Kästle G., Zürn K., Herzog T., Weigl F., Ziemann P., Mayer O., Jerome Ch., Möller M., Spatz J. P., Garnier M. G., Oelhafen P.: Adv. Func. Mater. **13**, 359-364 (2003).
40. Bönnemann H., Brijoux W., Brinkmann R., Matoussevitch N., Waldöfner N., Palina N., Modrow H.: Inorg. Chim. Acta **350**, 617-624 (2003).
41. Dresco P. A., Zaitsev V. S., Gambino R. J., Chu B.: Langmuir **15**, 1945-1951 (1999).

42. Colvin V. L., Goldstein A. N., Alivisatos A. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5221-5230 (1992).
43. Lu Z., Prouty M. D., Guo Z., Golub V. O., Kumar S. S. R., Lvov Y. M.: *Langmuir* **21**, 2042-2050 (2005).
44. Stober W., Fink A., Bohn E.: *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62 (1968).
45. [https://cheminf.ncbr.muni.cz/vibuch/documents/2/vibuch\\_studmat\\_B1.pdf](https://cheminf.ncbr.muni.cz/vibuch/documents/2/vibuch_studmat_B1.pdf), staženo 28. 2. 2014.
46. Geng J., Jefferson D. A., Johnson B. F. G.: *Chem Commun.* **21**, 2442-2443 (2004).
47. Petr J., Dolanská P., Marková Z., Pospíšilová E., Knob R., Zbořil R.: *J. Chromatogr. A*, zasláno.
48. Lauer H. H., Rozing G. P.: *High Performance Capillary Electrophoresis, A Primer*. Agilent Technologies, Germany 2009.
49. Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.
50. Jörgenson J. W., Lukacs K. D.: *Anal. Chem.* **53**, 1298-1302 (1981).
51. Kašička V.: *Chem. Listy* **91**, 320-329 (1997).
52. Churáček J. a kolektiv: *Analytická separace látek*. SNTL Praha 1990.
53. Camilleri P.: *Capillary electrophoresis: theory and practice*, 2. vydání, CRC Press LLC, USA 1998.
54. Hayes M. A., Kheterpal I., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* **65**, 27-31 (1993).
55. Schmitt-Kopplin P., Frommberger M.: *Electrophoresis* **24**, 3837-3867 (2003).
56. Hiemenz P. C., Rajagopalan R.: *Principles of colloid and surface chemistry*, 3. vydání, Marcel Dekker, USA 1997.
57. Fujiwara S., Honda S.: *Anal. Chem.* **59**, 487-490 (1987).
58. Weinberger R.: *Practical capillary electrophoresis*, 2. vydání, Academic Press, USA 2000.
59. Huang X. H., Gordon M. J., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **60**, 375-377 (1988).
60. Huang T., Pawliszyn J.: *Analyst* **125**, 1231-1233 (2000).
61. Hjertén S., Elenbring K., Kilár F., Liao J. L.: *J. Chromatogr. A* **403**, 47-61 (1987).
62. [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html), staženo 15. 3. 2014.
63. Nie S., Dadoo R., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **65**, 3571-3575 (1993).
64. [http://www.hplc.cz/Teorie/EC\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html), staženo 18. 3. 2014.
65. Pecková K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Barek J.: *Chem. Listy* **100**, 124-132 (2006).
66. [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/cze/CZE.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf), staženo 18. 3. 2014.

67. Švidrnich M.: *Analýza ethylglukuronidu pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
68. Olivares J. A., Nguyen N. T., Yonker C. R., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **59**, 1230-1232 (1987).
69. Kebarle P.: *J. Mass Spectrom.* **35**, 804-817 (2000).
70. Cai J., Henion J.: *J. Chromatogr. A* **703**, 667-692 (1995).
71. Ewing A. G., Wallingford R. A., Olefirowicz T. M.: *Anal. Chem.* **61**, 292-303 (1989).
72. Quirino J. P., Terabe S.: *J. Chromatogr. A* **856**, 465-482 (1999).
73. Deyl Z., Švec F.: *Capillary electrochromatography*, Elsevier Science, The Netherlands 2001.
74. Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen T. P. E. M.: *Isotachopheresis: Theory, Instrumentation and applications*, Elsevier Scientific Publishing Company, The Netherlands 1976.
75. Girardot M., Gareil P., Varenne A.: *Electrophoresis* **31**, 546-555 (2010).
76. Girardot M., Li H. Y., Descroix S., Varenne A.: *J. Chromatogr. A* **1218**, 4052-4058 (2011).
77. Varenne A., Gareil P., Colliec-Jouault S., Daniel R.: *Anal. Biochem.* **315**, 152-159 (2003).
78. Duras J.: *Metody predikce aktivních míst v proteinech*, Diplomová práce, Vysoké Učení Technické v Brně, Brno 2012.
79. [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a7906pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a7906pis.pdf), staženo 26. 3. 2014.
80. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l8005?lang=en&region=CZ>, staženo 29. 3. 2014
81. [http://mammary.nih.gov/reviews/gene\\_expression/Watson001/](http://mammary.nih.gov/reviews/gene_expression/Watson001/), staženo 29. 3. 2014
82. Åkeström B. a kolektiv: *Lipocalins*, Landes Bioscience Texas 2006.
83. Kontopidis G., Holt C., Sawyer L.: *J. Dairy Sci.* **87**, 785-796 (2004).
84. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/7/l7651dat.pdf>, staženo 30. 3. 2014.
85. <http://lysozyme.co.uk/>, staženo 30. 3. 2014.
86. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/cytochrome-c.html>, staženo 3. 4. 2014.
87. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/human-albumin.html>, staženo 10. 4. 2014.

88. Fusek M., Káš J., Ruml T.: *Bioléčiva*, VŠCHT, Praha 2008.
89. <http://www.scbt.com/datasheet-280786-horseradish-peroxidase.html>, staženo 10. 4. 2014.
90. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html>, staženo 10. 4. 2014.
91. Azevedo A. M., Martins V. C., Prazeres D. M. F., Vojinović V., Cabral J. M. S., Fonseca L. P.: *Annu. Rev. Biotechnol.* **9**, 199-247 (2003).
92. Lavery C. B., Macinnis M. C., MacDonald M. J., Williams J. B., Spencer C. A., Burke A. A., Irwin D. J., D'Cunha G. B.: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8471-8476 (2010).

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BARC	„bead array counter“ biosenzory
BGE	základní elektrolyt
BNP	bimetalické nanočástice
BSA	hovězí sérový albumin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan (dichlordifenyltrichlorethan)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
EZVI	emulgované nanoželezo
FRET	Förster resonance energy transfer
GMR	„giant magnetoresistance“ senzory
HLB	„hydrophilic/lipophilic balance“
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidáza
HSA	lidský sérový albumin
CHES	2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IR	infračervený

LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LSS	fázový přechod kapalina/pevná látka/roztok („liquid/solid/solution“)
MECC	micelární elektrokinetická chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MNP	magnetické nanočástice
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
MS	hmotnostní spektrometr(ie)
NMR	nukleární magnetická rezonance
nZVI	nanočástice elementárního železa
ODS	oktadecyl silikát
PAA	polyakrylová kyselina
PAGE	polyakrylamidový gel
PAL	povrchově aktivní látka
PEG	polyethylenglykol
PSF	„pseudostacionární“ fáze
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
PVA	polyvinylalkohol
RCPTM	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
SB12	3-(N,N-dimethyldodecylammonium)propansulfonát
SDS	dodecylsulfát sodný
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TEOS	tetraethoxysilan
THF	tetrahydrofuran
TOF	analyzátor doby letu („time of flight“)
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid
USPIO	nanočástice oxidu železitého („ultrasmall superparamagnetic iron oxide“)
UV	ultrafialový
VF	vodná fáze
VIS	viditelný