

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studium metaloforů kapilární elektroforézou

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Daniela Trčková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

Mgr. Daniel Baron, Ph.D.

Konzultant práce:

RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

2024 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Daniela Trčková

Název práce: Studium metaloforů kapilární elektroforézou

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Daniel Baron, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2024

Klíčová slova: Metalofory, kapilární elektroforéza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie

Počet stran: 83

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Anotace:

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu a charakterizaci metaloforů ferrrocinu (Fc) a triacetylfusarininu C (TafC) s Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} kationty pomocí CE-DAD v módu MEKC a dalších technik molekulové a anorganické hmotnostní spektrometrie. Metalofory Fe-Fc a Fe-TafC nebyly potřebné k přípravě, protože se v této formě vyskytují přirozeně a byly využity jako modelový vzorek. Teoretická část se věnuje sideroforům jejím vlastnostem, použitím a jejich produkcí. Další kapitola se věnuje popisu kapilární elektroforézy, jejich částí a jejímu použití. Mezi posledními kapitolami teoretické práce se věnují spojení CE-ICP-MS a HPLC-ICP-MS jejich principy, použití a literární rešerši.

Experimentální část je věnována studiu vzniku komplexů metaloforů (des-Fc, des-TafC) s různými kovovými kationty (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+}). Experimentální část byla rozdělena do tří částí. V první části byla vyvinuta metoda pro separaci DMSO, des-Fc a Fe-Fc pomocí CE-DAD v módu MEKC. Po vývoji metody byly připraveny roztoky kovových iontů s des-Fc, které následně byly měřeny na CE-DAD a byla sledována tvorba komplexů. Druhá část je rovněž zaměřena na vývoj CE metody, tentokrát pro Fe-TafC. Po vývoji metody byly opět připraveny roztoky kationtů s des-TafC, které byly měřeny pomocí na CE-DAD a také byla sledována tvorba komplexů. Poslední část je věnována potvrzení komplexů metaloforů (des-Fc, des-TafC) pomocí FIA-HRMS a HPLC-ICP-MS. Bylo zjištěno, že trojmocné kationty (Ga, Al) ochotně vytvořily komplexy s oběma metalofory (des-Fc, des-TafC). Tyto komplexy byly zmíněnými technikami potvrzeny. Z dvojmocných kationtů byl úspěšně vytvořen komplex Cu-Fc, avšak nepodařilo se vznik tohoto komplexu potvrdit pomocí FIA-HRMS a ani HPLC-ICP-MS. Vznik ostatních komplexů s dvojmocnými kovy se nepodařilo za daných podmínek prokázat.

Bibliographic identification:

Author's first name and surname: Daniela Trčková

Title: Study of metallophores by capillary elektroforesis

Type of thesis: master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Mgr. Daniel Baron, Ph.D.

Consultant: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

The year of submission: 2024

Keywords: Metallophores, capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry, high resolution mass spectrometry

Number of pages: 83

Number of appendices: 0

Language: Czech

Annotation:

This master thesis is focused on the preparation and characterization of ferrocene (Fc) and triacetylfulsarinine C (TafC) metallophores with Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} cations by CE-DAD in MEKC mode and other molecular and inorganic mass spectrometry techniques. The metallophores Fe-Fc and Fe-TafC were not needed for preparation as they occur naturally in this form and were used as a model sample. The theoretical part is devoted to siderophores their properties, applications and their production. The next chapter is devoted to the description of capillary electrophoresis, its parts and its application. Among the last chapters of the theoretical work, I discuss the connection of CE-ICP-MS and HPLC-ICP-MS their principles, applications and literature search.

The experimental part is devoted to the study of the formation of complexes of metallophores (des-Fc, des-TafC) with different metal cations (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+}). The experimental part was divided into three parts. In the first part, a method was developed for the separation of DMSO, des-Fc and Fe-Fc using CE-DAD in MEKC mode. After developing the method, solutions of metal ions with des-Fc were prepared, which were then measured on CE-DAD and the formation of complexes was monitored. The second part also focuses on the development of the CE method, this time for Fe-TafC. After developing the method, solutions of the cations with des-TafC were again prepared and measured on CE-DAD and complex formation was also monitored. The last part is devoted to the confirmation of the complexes of the metallophores (des-Fc, des-TafC) by FIA-HRMS and HPLC-ICP-MS. It was found that the trivalent cations (Ga, Al) readily formed complexes with both metallophores (des-Fc, des-TafC). These complexes were confirmed by the above-mentioned techniques. A Cu-Fc complex was successfully formed from divalent cations, but the formation of this complex could not be confirmed by FIA-HRMS or HPLC-ICP-MS. The formation of other complexes with divalent metals could not be demonstrated under the given conditions.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium metaloforů kapilární elektroforézou“ zpracovala samostatně s použitím odborné literatury a informačních zdrojů.

Souhlasím s tím, aby má diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Daniela Trčková

Poděkování:

Ráda bych vyjádřila svou upřímnou vděčnost všem, kteří mi pomohli při tvorbě této diplomové práce. Nejprve bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce, Mgr. Danielu Baronovi, Ph.D., za jeho neocenitelné vedení, trpělivost a cenné rady po celou dobu mého výzkumu. Jeho podnětné nápady a odborné znalosti byly pro mě inspirací a poskytly mi cenné informace. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi, RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D., za jeho podporu, povzbuzení a odborné rady, které mi poskytl během psaní této práce. Také bych chtěla vyjádřit vděk své rodině, příteli a přátelům za jejich neustálou podporu, povzbuzení a porozumění během tohoto náročného procesu. Jejich podpora mi dodávala sílu a motivaci pokračovat vpřed, i když to bylo obtížné. Dále bych ráda poděkovala Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci a Katedře analytické chemie za poskytnutí chemikálií a přístrojů. Diplomová práce vznikla za finanční podpory projektu IGA_PrF_2024_026.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1 ÚVOD | 1 |
| I. | 2 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 2 |
| 2 SIDEROFORY/METALOFORY | 3 |
| 2.1 HISTORIE SIDEROFORŮ | 4 |
| 2.2 AFINITA A STRUKTURA SIDEROFORŮ | 4 |
| 2.3 KLASIFIKACE SIDEROFORŮ | 4 |
| 2.3.1 HYDROXAMÁTOVÉ SIDEROFORY | 4 |
| 2.3.2 KATECHOLÁTOVÉ (FENOLÁTOVÉ) SIDEROFORY | 5 |
| 2.3.3 KARBOXYLÁTOVÉ A SMÍŠENÉ SIDEROFORY | 6 |
| 2.4 ENVIRONMENTÁLNÍ POUŽITÍ | 6 |
| 2.4.1 SIDEROFORY PODPORUJÍ RŮST ROSTLIN | 6 |
| 2.4.2 SIDEROFOR JAKO POTENCIÁLNÍ BIOKONTROLNÍ ČINIDLO | 7 |
| 2.4.3 VYUŽITÍ SIDEROFORŮ PŘI REMEDIACÍCH A VLIV TĚŽKÝCH KOVŮ NA SYNTÉZU SIDEROFORŮ | 7 |
| 2.4.4 ROZKLAD ORGANICKÝCH KONTAMINANTŮ POMOCÍ SIDEROFORŮ | 8 |
| 2.5 LÉKAŘSTVÍ | 9 |
| 2.5.1 ODSTRANĚNÍ PRVKŮ Z TĚLA POMOCÍ SIDEROFORŮ | 10 |
| 2.5.2 SIDEROFORY JAKO MARKERY RŮZNÝCH ONEMOCNĚNÍ | 10 |
| 2.5.3 VÝVOJ NOVÝCH TERAPEUTICKÝCH STRATEGIÍ..... | 11 |
| 2.6 VLASTNOSTI DES-FC A DES-TAFC | 12 |
| 2.6.1 VLASTNOSTI DESFERRI-FERIKROCIN (DES-FC) | 12 |
| 2.6.2 VLASTNOSTI DESFERRI-TRIACETYLFUSARININ C (DES-TAFC) | 13 |
| 3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA | 14 |
| 3.1 HISTORIE A SOUČASNOST ELEKTROFORÉZY | 14 |
| 3.2 PRINCIP | 14 |
| 3.3 ELEKTROFORETICKÁ MOBILITA | 14 |
| 3.4 ELEKTROOSMOTICKÝ TOK | 15 |
| 3.5 DRUHY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY | 19 |
| 3.5.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA – CZE..... | 19 |
| 3.5.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ KAPILÁRNÍ CHROMATOGRFIE – MEKC | 20 |
| 3.5.2.1 Modifikátory v MEKC | 23 |
| 3.6 PRŮBĚH ELEKTROFORÉZY | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7 INSTRUMENTACE V CE | 24 |
| 3.7.1 ZDROJ NAPĚTÍ | 24 |
| 3.7.2 KAPILÁRY..... | 25 |
| 3.7.3 DÁVKOVACÍ SYSTÉM | 25 |
| 3.7.3.1 Hydrodynamické dávkování..... | 25 |
| 3.7.3.2 Elektrokinetické dávkování | 26 |
| 3.7.4 DETEKTORY..... | 26 |
| 3.7.5 UV/VIS DETEKTOR | 26 |
| 3.7.5.1 Detektor s diodovým polem – DAD, PDA („photodiode-array detector“) | 27 |
| 3.7.6 FLUORESCENČNÍ DETEKTOR | 28 |
| 3.7.7 SPOJENÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ (CE-MS)..... | 29 |
| 3.7.8 SPOJENÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM (CE-ICP-MS) | 29 |
| 4 HPLC JAKO KOMPLEMENTÁRNÍ TECHNIKA K CE | 31 |
| 4.1 HPLC | 31 |
| 4.1.1 ROZDĚLENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE | 31 |
| 4.1.2 INSTRUMENTACE V HPLC | 32 |
| 4.1.3 SPOJENÍ HPLC-ICP-MS | 32 |
| 4.1.4 POUŽITÍ HPLC-ICP-MS | 33 |
| 5 ANALÝZA SIDEROFORŮ/METALOFORŮ | 34 |
| 6 CÍLE DP..... | 36 |
| II. | 37 |
| PRAKTICKÁ ČÁST..... | 37 |
| 7 MATERIÁLY | 38 |
| 7.1 CHEMIKÁLIE | 38 |
| 7.1.1 STANDARDY | 38 |
| 7.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE..... | 38 |
| 7.2.1 LABORATORNÍ POMŮCKY | 38 |
| 7.2.2 ANALYTICKÉ PŘÍSTROJE | 38 |
| 7.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 7.3.1 | PŘÍPRAVA ROZTOKU ZÁKLADNÍ ELEKTROLYTU (BGE) PRO ANALÝZU KATION-Fc | 39 |
| 7.3.2 | PŘÍPRAVA ROZTOKU ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU (BGE) PRO ANALÝZA KATION-TaFC..... | 39 |
| 7.3.3 | PŘÍPRAVA ROZTOKŮ KOMPLEXŮ KATION-Fc, KATION-TaFC..... | 39 |
| 8 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 40 |
| 8.1 | FERRICROCIN..... | 40 |
| 8.1.1 | OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO SEPARACI DES-Fc, Fc A DMSO..... | 40 |
| 8.1.1.1 | Optimalizace složení separačního elektrolytu a pH | 40 |
| 8.1.1.2 | Optimalizace koncentrace H ₃ PO ₄ | 42 |
| 8.1.1.3 | Optimalizace napětí | 43 |
| 8.1.1.4 | Optimalizace pomocného tlaku během analýzy | 44 |
| 8.1.1.5 | Shrnutí optimalizace | 45 |
| 8.1.2 | TVORBA KOMPLEXŮ S DES-Fc A JEJICH ANALÝZA POMOCÍ CE-DAD | 45 |
| 8.1.2.1 | Komplex Cu-Fc | 46 |
| 8.1.2.2 | Komplex Al-Fc..... | 47 |
| 8.1.2.3 | Komplex Ga-Fc | 47 |
| 8.1.2.4 | Studium vzniku komplexů kation-Fc (Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺)..... | 49 |
| 8.2 | TRIACETYLFUSARININ C | 51 |
| 8.2.1 | OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO SEPARACI DES-TaFC A Fe-TaFC..... | 51 |
| 8.2.1.1 | Optimalizace koncentrace SDS | 51 |
| 8.2.1.2 | Optimalizace organické fáze v BGE | 52 |
| 8.2.1.3 | Optimalizace napětí | 53 |
| 8.2.1.4 | Optimalizace koncentrace H ₃ PO ₄ | 53 |
| 8.2.1.5 | Shrnutí optimalizace | 54 |
| 8.2.2 | TVORBA KOMPLEXŮ S DES-TaFC A JEJICH ANALÝZA POMOCÍ CE-DAD | 55 |
| 8.2.2.1 | Komplex Ga-TaFC | 55 |
| 8.2.2.2 | Komplex Al-TaFC..... | 56 |
| 8.2.2.3 | Studium vzniku komplexů kation-TaFC (Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺)..... | 57 |
| 8.3 | POTVRZENÍ TVORBY KOMPLEXŮ METALOFORŮ S KOVY POMOCÍ FIA-HRMS | 61 |
| 8.3.1 | POTVRZENÍ KOMPLEXŮ U DES-Fc | 62 |
| 8.3.2 | POTVRZENÍ KOMPLEXŮ U DES-TaFC | 65 |
| 8.4 | POTVRZENÍ TVORBY KOMPLEXŮ METALOFORŮ S KOVY POMOCÍ HPLC-ICP-MS..... | 67 |
| 8.4.1 | VÝVOJ HPLC METODY | 67 |
| 8.4.2 | POTVRZENÍ KOMPLEXŮ U DES-Fc | 69 |
| 8.4.3 | POTVRZENÍ KOMPLEXŮ U DES-TaFC | 70 |
| 8.4.4 | ANALÝZA VOLNÝCH KOVOVÝCH IONTŮ POMOCÍ HPLC-ICP-MS..... | 71 |
| 9 | ZÁVĚR..... | 72 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 10 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 73 |
| 11 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 82 |

1 ÚVOD

Omezení k přístupu některých stopových prvků má vliv nejen na biologické funkce organismů, ale také na zdraví ekosystémů a globální koloběh prvků. Enzymatické mechanismy mikrobů mají klíčovou roli při řízení důležitých biochemických cyklů v celkovém měřítku, a v mnoha případech může nedostatek základních stopových prvků omezit funkci procesů, které jsou zprostředkovány metaloenzymy. Některé organismy využívají strategii vylučování metaloforů (biogenních ligandů) k přijímání iontů kovů v reakci na omezení živin [1]. Siderofory jsou nejznámějším příkladem metaloforů a jsou používány bakteriemi, houbami a rostlinami k získávání železa (Fe^{3+}). I když je hlavním účelem sideroforů získávání Fe, zdá se, že mají i další funkce. Například některé siderofory mohou vázat také jiné prvky, jako je měď (Cu) a zinek (Zn), a v některých případech může být jejich afinita k těmto prvkům vyšší než k Fe. Proto se pro tyto sekundární metabolity, které mají afinitu k různým kovům, používá termín "metalofor" [2].

Metalofory jsou definovány jako organické ligandy s nízkou molekulovou hmotností, které slouží k dodávání iontů kovů organismu za účelem poskytnutí živin. Siderofory jsou příkladem metaloforů, které jsou vylučovány organismy za účelem zvýšení příjmu Fe^{3+} . Studie ukázaly, že metalofory mají schopnost vázat širokou škálu kovů (Al, Fe, Co, Mn, Ni, Zn, Cu, Mo) [1]. Metalofory nacházejí uplatnění v různých odvětvích např. v zemědělství, kde podporují růst rostlin a pomáhají odstraňovat kovy z kontaminovaných půd [3]. Dále se prokázalo, že mají význam v lékařství, kde mikroorganismy produkující tyto ligandy mohou být odolné vůči antibiotikům, což poskytuje potenciál pro vývoj nových léčivých látek a strategií pro boj s bakteriálními infekcemi [4].

Vzhledem k využití metaloforů v životním prostředí a zdravotnictví je klíčové porozumět jejich chování v biologických vzorcích a hledat metody pro zkoumání interakcí metaloforů s různými kovovými ionty. Jednou z možných metod je kapilární elektroforéza v módu MEKC (mice-lární elektrokinetická chromatografie), která vyniká svými vlastnostmi, jako jsou rychlost, nenáročnost na instrumentaci, malá spotřeba vzorku a chemikálií [5]. Nevýhodou kapilární elektroforézy s UV/Vis detektorem jsou však například vysoké meze detekce a stanovitelnosti, které jsou způsobeny použitím malého množství vzorku, nebo nespecifita UV/Vis detektoru. Z tohoto důvodu je často nutné použití jiných detektorů (ICP-MS) nebo dalších komplementárních technik [6].

I. TEORETICKÁ ČÁST

2 SIDEROFORY/METALOFORY

Železo je pro téměř všechny mikroorganismy, rostliny a živočichy nezbytné kvůli svým jedinečným chemickým vlastnostem. Jeho schopnost koordinovat a aktivovat kyslík a ideální redoxní potenciál jsou klíčové pro přenos elektronů a metabolické procesů [7].

I přes velkou hojnost železa v zemské kůře je v aerobním prostředí jeho biologická dostupnost omezena jeho nízkou rozpustností. Mikroorganismy, houby a rostliny vyvinuly schopnosti, absorbovat železo z půdy, sladké a mořské vody a z jiných organismů. To vedlo ke akumulaci železa a produkci tzv. sideroforů [8].

Siderofory (patřící mezi metalofory), jsou nízkomolekulární sloučeniny (500-1500 Da), produkovány bakteriemi, houbami a rostlinami, mají vysokou afinitu a selektivitu k železu. Jejich biosyntéza je regulována hladinou železa a umožňuje tak jeho vychytávání z okolního prostředí [8].

Biosyntéze sideroforů probíhá za účasti neribozomálních peptidových syntetáz, ale může být nezávislá na těchto enzymech. Tyto procesy zahrnují oligomeraci a makrocyclizaci omega-amino-karboxylových kyselin [9].

Bakterie, houby a rostliny syntetizují siderofory různými způsoby, včetně biosyntézy mikrobiálních sideroforů, závislé na neribozomálních peptidových syntézách (NRPS = nonribosomal peptide synthetases). Enzymy NRPS představují modulární montážní linie obsahující více katalytických domén. Každý modul začleňuje specifický substrát do konečné struktury sideroforu, díky čemuž dochází k rychlejšímu vývoji nových struktur. Siderofory jsou vylučovány za účelem získání železa v prostředí s nízkými koncentracemi, kde dojde k vytvoření komplexu Fe-siderofor, který je rozpoznán a přemístěn dovnitř buňky [10].

Některé bakterie, označované jako bakterie podporující růst rostlin (PGPB = plant growth promoting bacteria) kolonizují rhizosféru a podporují tak příjem železa rostlinami. Tyto mikroorganismy mohou produkovat ionty železa při jeho nedostatku, kdy PGPB syntetizují a získávají za vhodných podmínek siderofory, čímž zvyšují a regulují biologickou dostupnost železa [11].

Siderofory mají vysokou afinitu k železu, že jsou schopny odstranit ho z molekul proteinu například feritinu [12]. Hlavní funkcí je přeměna železa vázaného na proteiny nebo ve sloučenině rozpustné ve vodě na formu, která je přístupná pro mikroorganismy [13]. Existuje více než 500 různých sideroforů z nichž 270 bylo strukturně charakterizováno [7].

2.1 Historie sideroforů

V letech 1949-1952 byly identifikovány tři různé siderofory, které byly izolovány a považovány za růstové faktory: mykobaktin (1), ferrichrom (2) a koprogen (3). V klasické studii provedené Snowem a kolegy byl charakterizován mykobaktin, byly určeny jeho koordinační skupiny a prokázala se vysoká afinitu k Fe^{3+} [8]. V téže době Burton a kol. izolovali růstový faktor známý jako „*Terregensův faktor*“, a prokázali jeho schopnost vytvářet stabilní komplexy s železem [8].

2.2 Afinita a struktura sideroforů

Molekula sideroforu obvykle obsahuje atom železa koordinovaný s atomy kyslíku, přičemž nejčastější geometrie je oktaedrická, což umožňuje uspořádání šesti ligandů kolem centra Fe^{3+} s jejich minimálním odpuzováním. Oktaedrické pole přispívá ke tvorbě termodynamicky stabilních částic Fe^{3+} s vysokým spinem. V závislosti na typu sideroforu může být oktaedrické pole deformováno, a do struktury sideroforu může být začleněn dusík nebo síra jako koordinační atom, přičemž tyto atomy mohou být varianty sideroforu s nižší afinitou k Fe^{3+} [8].

Skelet sideroforů je tvořen peptidy a neproteinogenními aminokyselinami, což vede ke vzniku neribozomálního peptidu [9].

Všechny siderofory vykazují vyšší afinitu k Fe^{3+} než k Fe^{2+} , a jejich afinita k Fe^{3+} je mnohem vyšší než k ostatním dvojmocným nebo trojmocným kationtům [8].

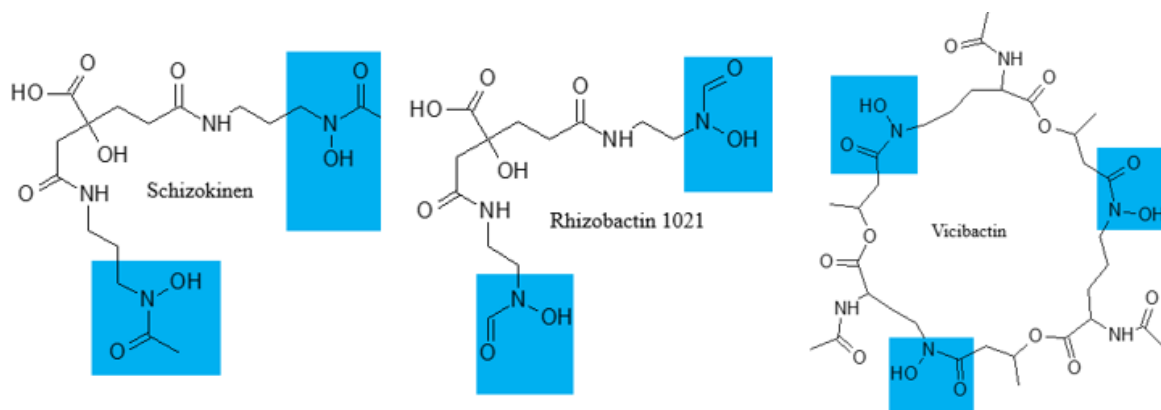
2.3 Klasifikace sideroforů

Podle chemických vlastností se siderofory dělí na hydroxamáty, katecholáty (také známé jako fenoláty), karboxyláty a siderofory smíšeného typu. Siderofory smíšeného typu odpovídají svou strukturou dvěma nebo třem třídám současně, a proto jsou považovány za samostatnou třídu [14][15].

2.3.1 Hydroxamátové siderofory

Jedná se o nejběžnější skupinu sideroforů vyskytujících se v přírodě. Mohou je produkovat jak houby, tak bakterie. Obsahují strukturu $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{OH})\text{R}$, kde R je aminokyselina nebo její derivát obsahující dva atomy kyslíku, tvořící bidentátní ligand s kationty železa [15].

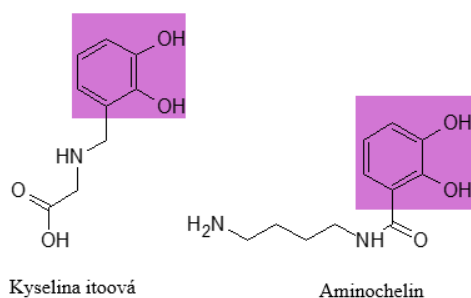
Při spojení hydroxamátu s Fe^{3+} ztrácí jeho funkční skupina proton z hydroxylaminové skupiny (-NOH) za vzniku bidentátního ligandu [16]. Hydroxamátové siderofory, lze vidět na obr. 1.



Obr. 1: Příklady hydroxamátových sideroforů: Schizokinen, rhizobactin, vicibactin. Hydroxamátové funkční skupiny jsou zvýrazněny modře. Převzato a upraveno z literatury [17].

2.3.2 Katecholátové (fenolátové) siderofory

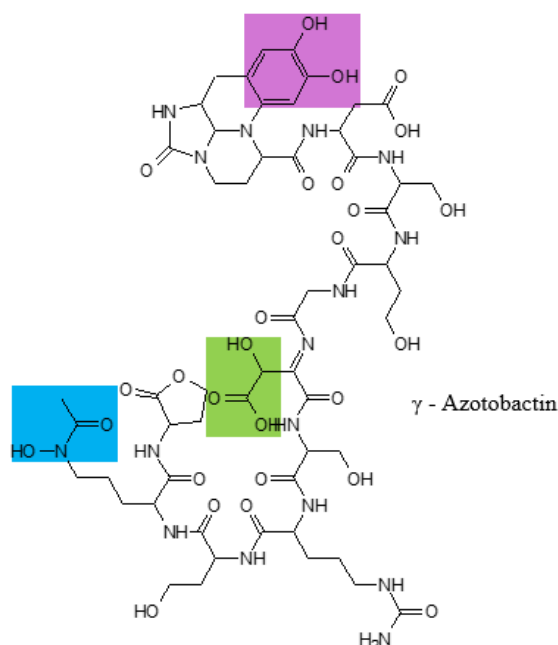
Zde je ion Fe^{3+} vázán na hydroxylové nebo katecholátové skupiny. Po chelataci s Fe^{3+} za účelem vytvoření hexadentního oktaedrického komplexu dodává každá katecholátová skupina dva atomy kyslíku [3]. Všechny katecholátové siderofory jsou deriváty kyseliny salicylové nebo kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové [18]. Katecholátové (fenolátové) siderofory lze vidět na obr. 2.



Obr. 2: Příklady sideroforů katecholátového typu: aminochelin, kyselina itoová. Katecholátové funkční skupiny jsou zvýrazněny fialově. Převzato z literatury [17].

2.3.3 Karboxylátové a smíšené siderofory

Siderofory karboxylátového typu se vážou na železo prostřednictvím karboxylových a hydroxylových skupin [17]. Některé mikroorganismy produkují siderofory smíšeného typu, které obsahují jak katecholátovou, tak hydroxamátovou skupinu, to lze vidět na obr. 3 [3].



Obr. 3: Příklady sideroforů smíšeného typu: γ - Azotobactin. Hydroxamátové skupiny jsou znázorněny modře, katecholátové funkční skupiny fialově a karboxylátové skupiny zeleně. Převzato z literatury [17].

2.4 Environmentální použití

Použití sideroforů se široce zvyšuje v oblasti zemědělství pro podporu růstu rostlin a jejich ochranu proti patogenům. Aby se zabránilo aplikaci syntetických fungicidů a chemických hnojiv, lze aplikovat siderofory, protože jsou to netoxické a přírodní produkty mikrobů [3].

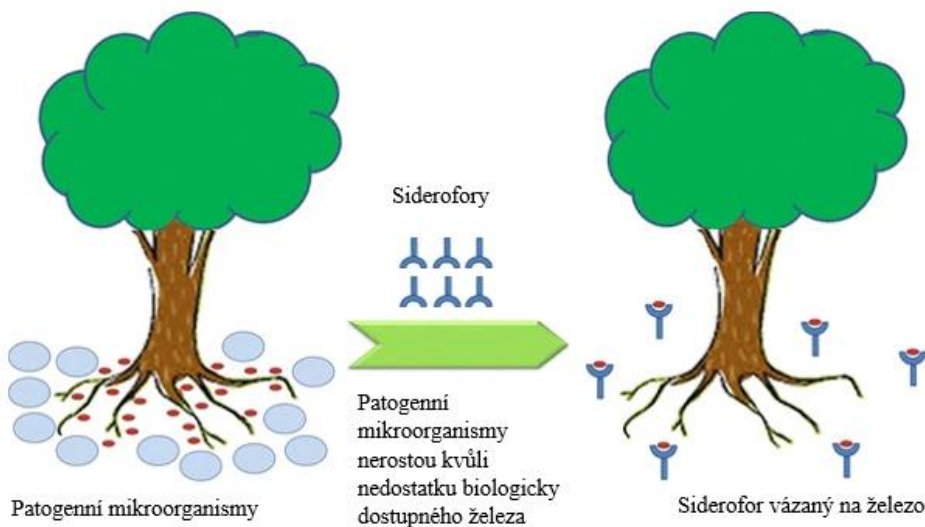
2.4.1 Siderofory podporují růst rostlin

Přestože je železo mikroživinou, je nezbytné pro biosyntézu chlorofylu, redoxní reakce a některé důležité fyziologické činnosti rostlin [19]. Hladovění po železe proto významně snižuje množství a kvalitu rostlinné produkce. Při produkci pyoverdinových sideroforů dochází ke zvyšování růstu rostlin. Byl proveden pokus, kdy rostliny byly pěstovány ve sterilních a nesterilních

podmínkách v půdě. Po inkubaci bylo zjištěno, že rostliny pěstované ve nesterilních podmínkách dobře rostly a vykazovaly vyšší koncentrace Fe v kořenech. Naproti tomu rostliny pěstované ve sterilních podmínkách vykazovaly velmi malý růst a trpěly silným nedostatkem železa [20]. Tímto pokusem bylo prokázáno, že produkce mikrobiálních sideroforů byla u rostlin pěstovaných ve sterilních podmínkách zcela potlačena, a proto lze mikrobiální siderofory považovat za účinný zdroj železa pro rostliny [20][21].

2.4.2 Siderofor jako potenciální biokontrolní činidlo

Siderofory hrají významnou roli v mechanismu biologické kontroly proti některým fytopatogenům, což je znázorněno na obr. 4. Siderofory se pevně váží se železem, takže snižují jeho biologicky dostupné množství pro rostlinné patogeny, čímž usnadňují hubení těchto fytopatogenů [22][23]. Siderofor podporuje růst rostlin tím, že zabíjí patogenní bakterie prostřednictvím sekvence železa. Fytopatogeny se spojují s kořeny rostlin a způsobují patogenezi [21].



Obr. 4: Znázornění hubení patogenních mikroorganismů pomocí sideroforů. Převzato a upraveno z literatury [21][22].

2.4.3 Využití sideroforů při remediacích a vliv těžkých kovů na syntézu sideroforů

Aby došlo k odstranění těžkých kovů (TK) bioremediací nebo mikrobiálně, musí být splněno několik podmínek (obecně): vhodná koncentrace kovu, sideroforu, pH prostředí, teplota [9][24]. Mezi běžné mechanismy mikrobiálního odstraňování TK patří snížení propustnosti buněčné

membrány, redukce nebo vysrážení kovu [9]. Redukcí a vysrážením TK se zabývala studie od Edberga a jeho kolegů [25], kdy bylo studováno odstraňování uranu z vodního prostředí. V této studii bylo zjištěno, že díky přítomnosti pyoverdinu docházelo k uvolňování uranu z testované horniny ve formě uranylového kationtu (UO_2)²⁺. Následně pak docházelo k vysrážení uranu v podobě minerálu uranitu, který je ve vodě nerozpustný [9][25].

Poměrně často se setkáváme s extrakcí kovu z rhizosféry rostlinami [9]. Princip mikrobiálně podpořené fytořemediace je založen na několika schopnostech sideroforů:

- 1) přivádět TK do roztoku i z hůře rozpustných materiálů nebo hornin (vzniká komplex siderofor-toxický kov, který zabraňuje vstupu toxického kovu do buňky a zároveň dochází k extracelulární redukci a vysrážení kovu) [9].
- 2) získávání železa (prospívá růstu rostlin)
- 3) zmírňování toxicity, že se odstraňuje kov z rostlin [9][26].

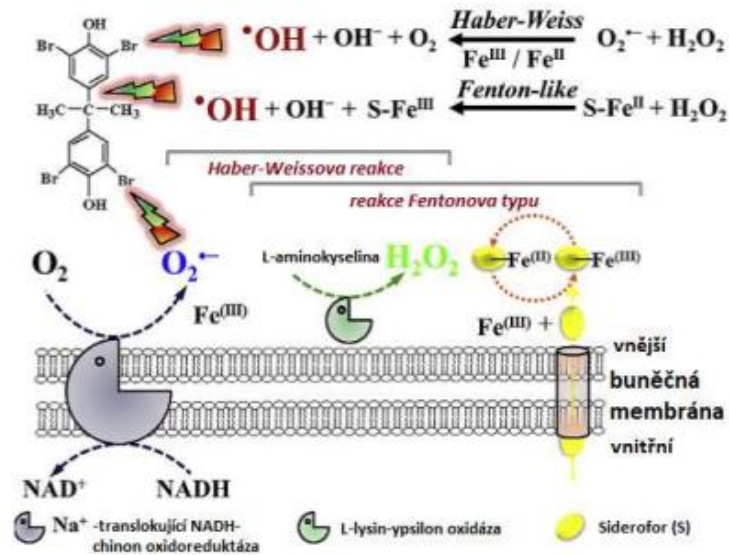
Siderofory se nejčastěji používají k odstraňování As, Cd, Cu, Cr atd. Nejčastěji se aplikují dva siderofory, a to desferrioxaminy nebo pyoverdiny. Díky tomu, že komplexy kov-siderofor mají různými kovy různé konstanty stability může se lišit účinnost fytořemediace [9].

Příkladem je zaměření na odstranění arsenu z půdy, kdy byly použity siderofory produkované *P. azotoformans*, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a kyselina citronová. Výsledky ukázaly, že růst buněk a produkce sideroforů jsou v nepřímém vztahu. Charakterizace sideroforu produkovaného *P. azotoformans* odhalila, že se jedná o katecholát a hydroxamát smíšeného typu. Bylo zjištěno, že smíšený siderofor kromě železa komplexuje těžké kovy jako je Cd, Pb, Ni, As, Al, Zn, Cu. Bylo provedeno 5 promývání sideroforem, EDTA a CA, kdy bylo odstraněno téměř 70 % arsenu [27].

2.4.4 Rozklad organických kontaminantů pomocí sideroforů

Komplex kov-siderofor podléhá biodegradaci uvnitř nebo vně buňky, přičemž dochází také k přeměně oxidačního stupně vázaného kovu. Biodegradace organické hmoty může probíhat Fentonovou nebo Haber-Weissovou reakcí, která je Fentonovou reakcí iniciována. Schéma takové biodegradace uvedenými reakcemi je uvedeno na obr. č. 5. Na biodegradaci sedimentů, které jsou kontaminovány ropnými uhlovodíky, se podílejí mořské bakterie *Alcanivorax borkumensis*, které rozkládají uhlovodíky uvnitř buňky. Aby došlo k rozkladu je třeba dodržovat určité podmínky, jako je

například dostatek Fe. Pokud je nedostatek železa, je produkováno siderofory z okolí. Díky tomu jsou schopny následné produkce a využití enzymů k rozkladu organické hmoty, kterou dále používají jako zdroj uhlíku pro další biosyntézy [9][28].



Obr. 5: Znázornění biogenního vzniku reaktivní formy kyslíku. Převzato a upraveno z literatury [9][29].

2.5 Lékařství

V posledních letech se siderofory stále více používají v lékařství, kdy mikroorganismy jsou rezistentní vůči antibiotikům. Příkladem může být antimalarikum, které může být použito rovněž k léčbě rakoviny. Dále slouží k odstraňování transuranových prvků (vytvoření komplexních sloučenin, které mohou být snáze extrahovány nebo odstraněny z určitého prostředí). Nemocničních infekcí a úmrtí způsobených infekcemi přibývá v důsledku stárnutí populace, zvýšeného počtu pacientů s oslabenou imunitou a výskytu multirezistentních patogenů. Siderofory hrají významnou roli ve virulenci (šíření) patogenu. V kombinaci s radionuklidy nebo chromofory mohou siderofory diagnostikovat infekční onemocnění pomocí optického zobrazování. Proto se siderofory koordinované radionuklidy, jako jsou ^{68}Ga , ^{89}Zr a ^{111}In mohou stát zobrazovacími látkami [4].

2.5.1 Odstranění prvků z těla pomocí sideroforů

Proces výroby elektřiny jadernou energií zvýšil šance na vystavení člověka určitými prvky, jako je hliník a vanad [30]. K nárustu hliníku v těle dochází u pacientů s dialyzační encefalopatií (komplikace, která je způsobena hromaděním hliníku v mozku) a dialyzovaných pacientů s konečným stadiem selhání ledvin. K léčbě lze použít siderofory, jako je např. desferol, který mobilizuje a chelatuje hliník vázaný na tkáň vytvořením aluminoxaminového komplexu, který je volně rozpustný ve vodě a snadno se vylučuje močí nebo stolicí. Desferol může z těla vyloučit také vanad. Bylo zjištěno, že u potkanů desferol snížil obsah vanadu v ledvinách o 20 %, v plicích o 25 % a v játrech o 26 %. Bylo také prokázáno, že desferol zvyšuje vylučování vanadu močí a stolicí [30][31].

2.5.2 Siderofory jako markery různých onemocnění

Aspergillus fumigatus je všudypřítomná saprofytická plíseň, ale také nejčastější příčina plísňových infekcí přenášených vzduchem u imunokompromitovaných pacientů. Výskyt invazivních infekcí vyvolaných *Aspergillus spp.*, označován jako aspergilóza, se v posledních desetiletích enormně zvýšil a úmrtnost se pohybuje od 60 do 90 %. Během saprofytického i patogenního růstu se patogen musí vyrovnávat s rychle se měnícím mikroprostředím. Proto je *A. fumigatus* schopen přizpůsobit svůj metabolismus tak, aby překonal sekvestraci živin (oddělení od zbytku) a obranné mechanismy hostitele. *Aspergillus fumigatus* produkuje čtyři siderofory: fusarinin C (FsC), triacetylfusarinin C (Fe-TafC), ferikrocin (Fe-Fc) a hydroxyferikrocin (Fe-HFc). FsC a Fe-TafC se vylučují pro solubilizaci a příjem železa; Fc se používá pro ukládání a distribuci železa v hyfách (vlákno houby) a HFc je nutný pro ukládání železa v konidiích (nepohyblivá spora houby vzniká nepohlavním způsobem). Vzhledem k úloze Fe-Fc v intracelulárním ukládání a distribuci železa hraje jeho biosyntéza klíčovou roli při klíčení a konidiaci. U *Aspergillus fumigatus* se také ukázalo, že Fe-Fc je nezbytný pro pohlavní vývoj. *A. fumigatus* využívá další systémy příjmu železa (redukativní, nízkoafinitní), ale ty nejsou schopny využívat přímo hostitelské zdroje železa, jako je hem, feritin a transferin. Nedostatek extracelulárních sideroforů způsobuje oxidační stres, protože zvyšuje hladovění po železe, které je nezbytné pro různé metabolické funkce, zejména pro aktivitu antioxidantních enzymů, jako je kataláza obsahující hem [32].

2.5.3 Vývoj nových terapeutických strategií

Současný svět čelí tzv. antibiotické krizi, kdy počet mikroorganismů rezistentních k antibiotikům neustále roste. Soustavně, ale klesá počet antimikrobiálních látek zaváděných na trh navíc většina z nich jsou jen další generace látek (již známých struktur). Díky tomu, že se nedaří identifikovat nové cílové struktury pro léky a vývoj nových skupin léků, každý rok umírá v zemích EU přes 33 000 a v USA přes 23 000 pacientů přímo v důsledku infekcí způsobených rezistentními mikroorganismy. Znalost interakcí hostitelských receptorů s metabolity invazivních patogenů představuje jednu z možných cest k vývoji nových terapeutických strategií. Protože interakce iniciují a řídí osud infekcí, blokování těchto interakcí je jednou z možných variant v boji proti patogenům, ať při použití léčiv nebo terapeutických protilátek. Cílem je vytvořit pokročilou znalostní základnu k navržení budoucích cílených terapií, které by zmírňovaly nebo plně léčily infekční choroby a s nimi související zánětlivé reakce [33].

Bakteriální infekce jsou běžným zdravotním problémem, který může v případě neléčení, nedostupnosti péče nebo antibiotické rezistence vést až k úmrtí postiženého jedince [34].

Mikroorganismy vyvinuly schopnost produkovat tzv. „skryté“ siderofory, látky, které komplexují („vyčytávají“) železité ionty v organismu hostitele, transportují je, a podporují tak růst těchto patogenních organismů. Tyto „skryté“ siderofory, s odlišnou strukturou, unikají rozpoznání imunitním systémem hostitele. Například glykosylace enterobaktinu na salmochelin poskytuje bakteriálnímu rodu *Salmonella* významnou fylogenetickou výhodu. V boji o „živiny“ (nutričně významné ionty) stojí na straně hostitele protein lipokalin – 2 (neutrofilní asociovaný lipokalin s gelatinázou), který je časným markerem různých typů patologických stavů. Tento protein tvoří ternární komplex se železitou formou sideroforu (navíc s dostatečnou velikostí, aby byl rozpoznán imunitním systémem), čímž znemožňuje využití železa pro růst patogenních organismů [33].

Patogenní bakterie hledají vhodné útočiště v organismu, kde se usadí a kolonizují [34]. Je pravděpodobné, že bakterie potřebují i další kationty stopových prvků (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}), protože struktura metaloforů by teoreticky měla umožňovat chelataci i těchto iontů. Proto by mělo být možné, aby metalofory interagovaly s dalšími nutričně významnými ionty, ale stejně tak by mělo být možné, aby se tomu organismus bránil, podobně jako v případě železitých iontů ternárním komplexem. Nicméně, pro potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy dosud nebyly k dispozici dostatečně citlivé techniky, které by umožnily ověřit tuto skutečnost (koncentrace zmíněných kovů jsou v těchto případech nižší než v případě železa).

Znalost interakcí hostitelských receptorů s metabolity invazivních patogenů je klíčová pro vývoj nových terapeutických strategií. Tyto interakce iniciují a řídí průběh infekcí. Blokování těchto interakcí je pak potenciální účinnou moderní terapií, zejména v případě rezistentních bakteriálních kmenů [35].

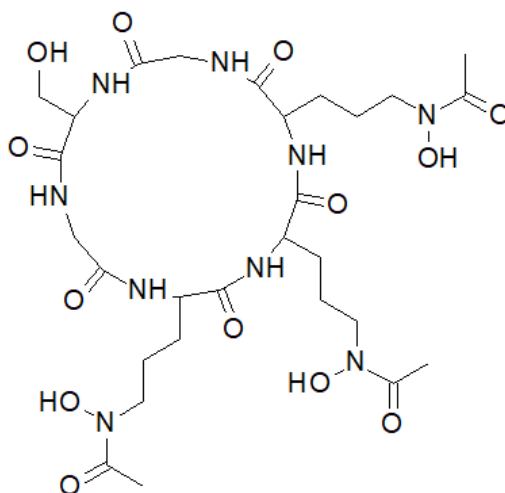
2.6 Vlastnosti Des-Fc a Des-TafC

2.6.1 Vlastnosti Desferri-ferikrocin (des-Fc)

Molekulová hmotnost: 717,7234 g/mol

Sumární vzorec: $C_{28}H_{47}N_9O_{13}$

Triviální název: Desferri-ferikrocin [36]



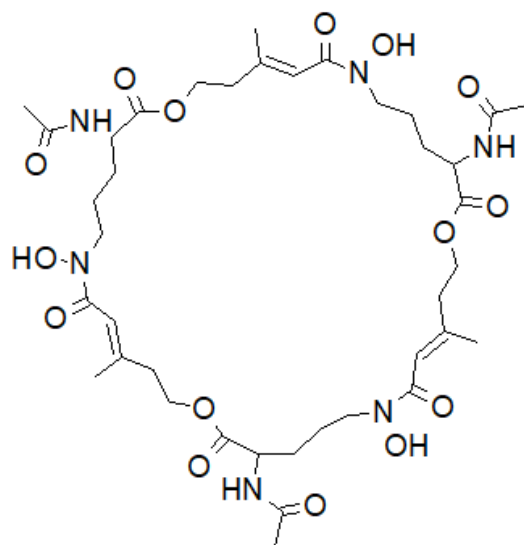
Obr. 6: Struktura desferri-ferikrocinu.

2.6.2 Vlastnosti desferri-triacetylfusarinin C (des-TafC)

Molekulová hmotnost: 852,9225 g/mol

Sumární vzorec: $C_{39}H_{60}N_6O_{15}$

Triviální název: desferri-triacetylfusarinin C [37]



Obr. 7: Struktura desferri-triacetylfusarinin C.

3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

3.1 Historie a současnost elektroforézy

Roku 1892 byl poprvé popsán pohyb anorganických částic v elektrickém poli v koloidním roztoku, kdy se následně zjistilo, že podobně putují i proteiny ve vodných roztocích. V 30. letech 20. století zkonstruoval Arne Tiselius zařízení, které umožňovalo rozdělit proteiny krevního séra na základě jejich rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli. Za tento objev mu byla roku 1948 udělena Nobelova cena [38].

3.2 Princip

Kapilární elektroforéza je analytická metoda založená na migraci elektricky nabitých látek kapilárou, kdy látky jsou rozpuštěny v roztoku elektrolytu. K migraci dochází díky vložení stejnosměrného elektrického pole [39].

Migrační rychlost analytu v elektrickém poli o intenzitě „ E “ je určena elektroforetickou pohyblivostí (mobilitou) analytu a elektroosmotickou pohyblivostí základního elektrolytu uvnitř kapiláry. Elektroforetická mobilita rozpuštěné látky (μ_{ep}) závisí na vlastnostech rozpuštěné látky (elektrický náboj, velikost a tvar analytu) a na vlastnostech základního elektrolytu, ve kterém migrace probíhá (iontová síla elektrolytu, pH, viskozita a aditiva) [40].

3.3 Elektroforetická mobilita

Základní veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost neboli mobilita, která je značena (μ_{ep}), byla definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli (v kapalném prostředí) při dané intenzitě „ E “. Veličinu vyjádříme podle rovnice (1) [41].

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1)$$

Intenzita elektrického pole v kapiláře je dána podílem napětí (U), které je připojené ke koncům kapiláry a délkou kapiláry (L). Intenzitu elektrického pole (E) lze vyjádřit podle rovnice (2) [41].

$$E = \frac{U}{L} \quad (2)$$

(F_{el}) je elektrická síla pole, která je přímo úměrná náboji (q). Elektrickou sílu pole lze vyjádřit podle rovnice (3). Výsledný pohyb iontů v roztoku je dán působením dvou sil. Ion, který nese náboj (q) je uváděn do pohybu silou elektrického pole (F_{el}).

$$F_{el} = qE \quad (3)$$

Pohyb iontu o poloměru (r), je následně zbrzděn frikční silou prostředí, která je dána Stokesovým zákonem. Frikční sílu lze vyjádřit podle rovnice (4).

$$F_{fr} = 6\pi\eta r v_{ep} \quad (4)$$

Dále je frikční síla (F_{fr}) přímo úměrná viskozitě prostředí (η), velikosti náboje částice (q) a velikosti částice (r).

Při kombinaci uvedených rovnic lze získat vztah pro výpočet elektroforetické mobility.

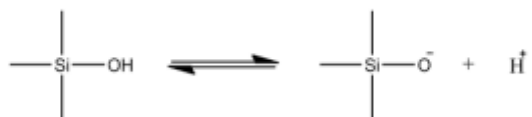
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Z rovnice (5) vyplývá, že pohyblivost iontů (μ_{ep}) je přímo úměrná náboji (q) a nepřímo úměrná jeho poloměru (r) a viskozitě roztoku (η) [41].

Elektroforetická mobilita analytu může působit ve stejném nebo opačném směru, v závislosti na náboji analytu v daném elektrolytu. Při kapilární elektroforéze v „normálním“ uspořádání, kde anoda (kladný pól) je umístěna na vstupu a katoda (záporný pól) na výstupu separační kapiláry (směr detektoru), budou anionty migrovat v opačném směru než elektroosmotický tok a kationty budou migrovat ve stejném směru jako elektroosmotický tok. Tedy pořadí analytů bude následující: kationty, nerozseparované neutrální látky a nakonec anionty [40].

3.4 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok je jev, který vzniká v kapilárách nejčastěji vyrobených z taveného křemene a obsahujících na svém povrchu silanolové skupiny. Tyto skupiny disociují v závislosti na pH roztoku (základního elektrolytu), kterým je kapilára naplněna a tím vytvářejí záporný náboj na stěně kapiláry. Disociace silanolových skupin je znázorněna na obr. 8 [42].

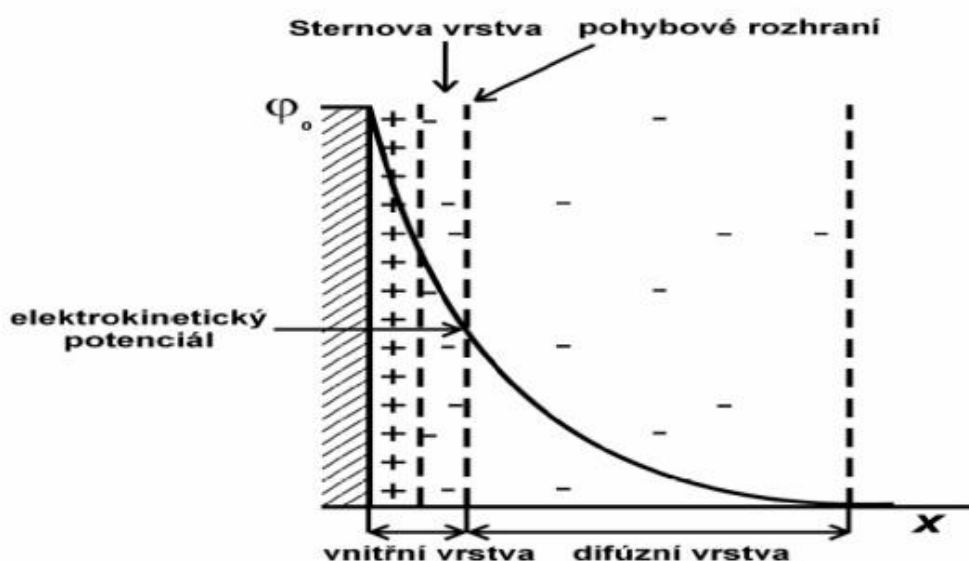


Obr. 8: Disociace silanolových skupin. Převzato a upraveno z literatury [42].

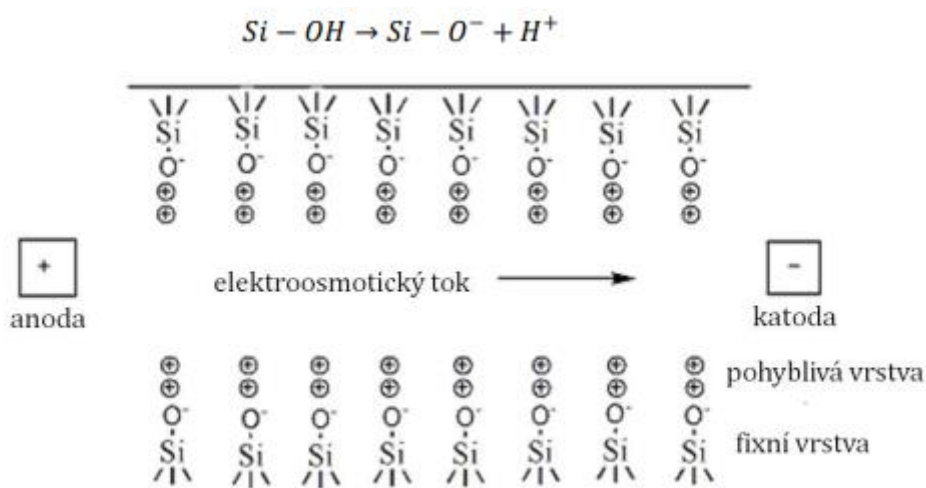
V důsledku toho dochází na vnitřním povrchu kapiláry k tvorbě elektrické dvojvrstvy. Tato dvojvrstva se skládá z vnitřní části, nazývané fixní, která ovlivňuje interakce mezi elektrolytem a povrchem kapiláry, a vnější části, nazývané difúzní, která ovlivňuje rozlišení mezi jednotlivými píky v elektroforegramu. Díky solvataci iontů a vnitřnímu tření unáší celý roztok v elektrickém poli [42].

Schéma vzniku elektrické dvojvrstvy je znázorněno na obr. 9. První vrstva protiiontů, nazývaná Sternova vrstva, drží pevně na silanoátových skupinách. Vnější vrstva, označovaná jako difúzní, je vzdálenější od silanoátových skupin. Difúzní vrstva kationtů je při působení elektrického pole vedena směrem k záporně nabitě katodě. Protože jsou tyto kationty solvatovány, migruje objemný BGE spolu s difúzní vrstvou, což způsobuje elektroosmotické tok elektrolytu [42].

V kapiláře z taveného oxidu křemičitého se silanolové (Si-OH) skupiny vázané na vnitřní stěně kapiláry ionizují na záporně nabitě silanoátové (Si-O-) skupiny při $\text{pH} > \sim 3$. Ionizaci stěny kapiláry lze zvýšit tím, že před zavedením BGE se kapilára nejprve promyje (kondicionuje) silně zásaditým roztokem (1M NaOH, KOH). Jiné typy kapilár, včetně teflonových, také vykazují elektroosmotický tok. Příčinou elektroosmotického toku v těchto kapilárách je adsorpce elektricky [33] nabitých iontů elektrolytického roztoku na stěny kapiláry [43][44].



Obr. 9: Uspořádání elektrické dvojvrstvy (Sternův model). Převzato a upraveno z literatury [45].



Obr. 10: Princip elektroosmotického toku. Převzato a upraveno z literatury [46].

Rychlost elektroosmotického toku závisí na intenzitě elektrického pole a hustotě náboje na stěnách kapiláry. Hustota náboje je přímo úměrná pH a nepřímo úměrná iontové síle BGE, což ovlivňuje stlačování elektrické dvojvrstvy a odstínění náboje. Elektroosmotický tok se zvyšuje s rostoucí hodnotou pH, dokud nejsou všechny silanolové skupiny [36] na stěně kapiláry plně ionizovány [46].

EOF unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, což z hlediska separace působí jako neselektivní síla, ale významně ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a účinnost separace po celou dobu analýzy [41].

Disociací vzniklé ionty tvoří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, přičemž v její difuzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. To vytváří potenciálový rozdíl v blízkosti stěny, který se nazývá elektrokinetický potenciál nebo Zeta potenciál [41].

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta r} \quad (6)$$

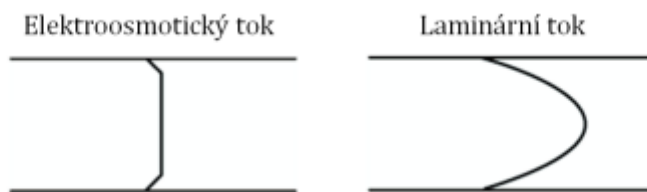
Z rovnice (6) vyplývá, že mobilita elektroosmotického toku (μ_{eo}) je přímo úměrná zeta potenciálu (ζ) a permitivitě základního elektrolytu (ε) a nepřímo úměrná poloměru kapiláry (r) a dynamické viskozitě (η) [41].

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \mu_{eo} \frac{U}{l} \quad (7)$$

Z rovnice (7) vyplývá, že lineární rychlost elektroosmotického toku (v_{eo}) je přímo úměrná mobilitě elektroosmotického toku (μ_{eo}) a vloženého napětí (U) a nepřímo úměrná délce kapiláry (l) [41].

Elektrokinetický potenciál a elektroosmotický tok lze regulovat změnou složení BGE pomocí pH, iontové síly nebo úpravou vnitřního povrchu kapiláry (kovalentní nebo dynamická pokrytí) [47].

Elektroosmotický tok má téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry, na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku. Jeho příspěvek k celkové difúzi analytů je zanedbatelný při elektromigrační separaci, což využívá zejména v kombinovaných technikách kapilární elektroforézy, jako je elektrokinetická chromatografie a elektrochromatografie, kde elektroosmotický tok slouží jako tažná síla BGE [41].



Obr. 11: Porovnání elektroosmotického a laminárního toku. Převzato z literatury [48].

3.5 Druhy kapilární elektroforézy

- 1) Kapilární zónová elektroforéza – CZE („*Capillary zone electrophoresis*“)
- 2) Kapilární gelová elektroforéza - CGE („*Capillary gel electrophoresis*“)
- 3) (bio) Afinitní kapilární elektroforéza - BACE [„*(bio) Affinity capillary electrophoresis*“]
- 4) Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie – MEKC („*Micellar electrokinetic chromatography*“)
- 5) Kapilární elektrochromatografie - CEC („*Capillary electrochromatography*“)
- 6) Kapilární izoelektrická fokusace – CIEF („*Capillary isoelectric focusing*“)
- 7) Kapilární izotachoforéza - CITP („*Capillary isoelectric focusing*“) [48][49][50]

3.5.1 Kapilární zónová elektroforéza – CZE

Jde o nejčastěji používanou variantu CE. Při této technice jsou analyty separovány v kapiláře obsahující pouze tlumivé roztoky. Princip spočívá v různé rychlosti migrace jednotlivých složek migrujících v oddělených zónách. Rychlost každé zóny závisí na elektroforetické mobilitě rozpuštěné látky a elektroosmotickém toku v kapiláře. Pro zvýšení účinnosti separace látek, které se mohou adsorbovat na křemenný povrch, mohou být použity kapiláry s vnitřním pokrytím [40].

Tato varianta kapilární elektroforézy může být použita pro analýzu malých ($2000 < M_r$), velkých molekul (proteiny) a větších částic (buňky, viry, nanočástice atd.) Díky vysoké účinnosti, které je v kapilární zónové elektroforéze dosahováno, může být prováděna separace molekul, jež mají jen nepatrný rozdíl v poměru z/m (náboje/hmotnosti). Tento způsob separace umožňuje také separaci chirálních látek přidáním chirálního sektoru do separačního tlumivého roztoku, ale zde se nejedná jenom o použití módu CZE, ale i ACE [39][40].

3.5.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie – MEKC

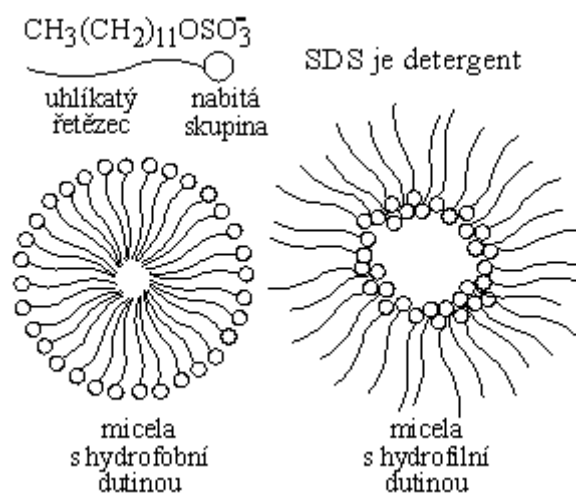
MEKC vyvinuli Terabe a kol., kteří tuto techniku označili jako elektrokinetickou separaci. V pozdější době ji nazvali, jako elektrokinetickou chromatografií, protože se domnívali, že princip je podobný rozdělovací chromatografii. Tento mód kapilární elektroforézy se běžně označuje zkratkou MEKC. Výstup z detektoru se označuje jako elektrokinetický chromatogram namísto elektroforegramu jako u CZE [44].

Princip tohoto módu je založen na dělení rozpuštěných látek mezi tzv. „pseudostacionární“ fázi (micely) a pufr. Surfaktanty, známé také jako povrchově aktivní látky, jsou molekuly, které mají na jednom konci hydrofilní část (dobře rozpustnou ve vodě) a na druhém konci hydrofobní část (špatně rozpustnou ve vodě). Některé tenzidy mají na hydrofilním konci molekuly iontovou skupinu [44].

Vývoj MEKC představoval významný pokrok v kapilární elektroforéze, protože umožnil separaci elektricky neutrálních sloučenin. Bez MEKC by byla CE v podstatě omezena na separaci pouze ionizovatelných sloučenin, čímž by bylo její použití významně omezeno. MEKC umožnila separaci i extrémně hydrofobních sloučenin, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky. Kromě toho může MEKC být použita k separaci ionizovaných sloučenin a peptidů [44].

Příkladem široce používaného aniontového detergentu je SDS (dodecyl síran sodný – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-O-SO}_3\text{H}$). Na jednom konci SDS je hydrofilní skupina $-\text{SO}_3\text{H}$ a na druhém konci hydrofobní - $(\text{CH}_2)_{11}\text{-CH}_3$ uhlíkatý řetězec. Surfaktanty mohou být také kationtové, zwitteriontové nebo neiontové [44].

Pokud je koncentrace surfaktantu v roztoku vyšší než kritická micelární koncentrace (CMC), dochází k vytvoření micel, což je důsledek asociace molekul surfaktantu. Tyto micely se skládají z různého počtu molekul surfaktantu, což je vyjádřeno jako tzv. agregačního čísla (AN). Micely mají obvykle kulovitý tvar a jejich molekuly jsou (ve vodném prostředí) orientovány tak, že hydrofilní skupiny surfaktantu jsou na vnější straně micely směrem k vodnému pufru, zatímco jejich hydrofobní části směřují do středu micely (směrem od vodného pufru). Struktura micely je znázorněna na obr. 12 [44].



Obr. 12: Znázornění micely SDS. Převzato a upraveno z literatury [51].

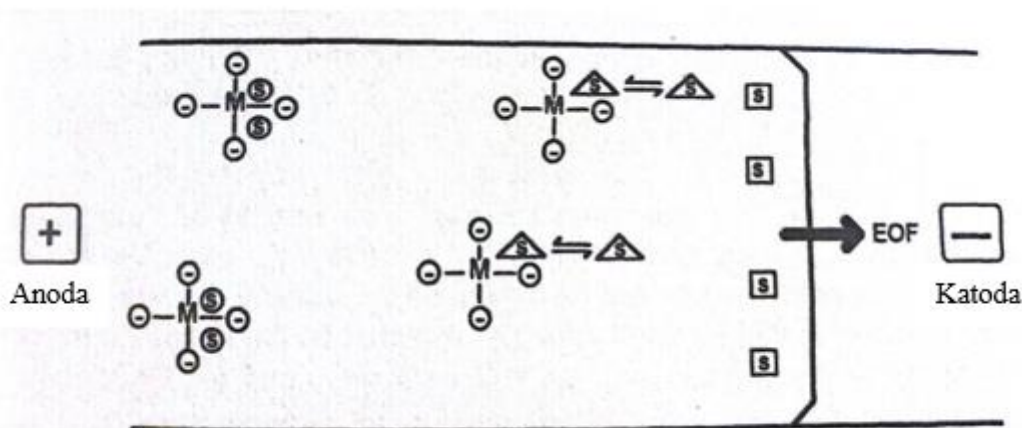
Tabulka 1. příklady detergentů – jejich kritická micelární koncentrace a agregační číslo [44]

| Detergenty | CMC [mM] | AN |
|----------------------------------|----------|-----|
| Aniontové detergenty | | |
| SDS | 8,27 | 62 |
| NaCl | 14 | 2-4 |
| Kationtové detergenty | | |
| Dodecyltrimethylamonium bromid | 14 | 50 |
| Hexadecyltrimethylamonium bromid | 0,026 | 169 |
| Obojetné detergenty | | |
| CHAPS | 8 | 10 |
| CHAPSO | 8 | 11 |
| Neiontové detergenty | | |
| n-decyl-β-D-glukopyranosid | 2,2 | 0 |
| Triton X-100 | 0,24 | 140 |

Když se do vodného roztoku obsahující micely přidá hydrofobní sloučenina, která není rozpustná ve vodě, dochází k jejímu rozdělení mezi vodnou fází a fází organickou (micelární) na základě rozdělovacího koeficientu [44].

Při použití aniontového tenzidu (např. SDS), který nese záporný náboj, v elektrolytu o vyšším pH (kdy elektroforetická rychlost micel je menší než rychlost elektroosmotického toku) a analyzovaná látka je elektricky neutrální, probíhá separace následovně: i když jsou záporně nabitě micely přitahovány k anodě, elektroosmotický tok je odnáší ke katodě. Molekuly vzorku jsou pak distribuovány mezi pufr a micely, takže doba, kterou vzorek stráví v micelách je úměrná jejich hydrofobicitě. Pokud by se použil kationtový tenzid, směr elektroosmotického toku by byl obrácen, a proto by bylo nutné obrátit polaritu použitého napětí [44].

Hydrofilní molekuly, které jsou rozpustné ve vodě a nemají náboj, stráví veškerý čas v pufru, protože se do micel nedostanou a nemohou interagovat elektrostaticky. Tyto molekuly jsou nesený kapilárou rychlostí elektroosmotického toku a migrují jako první, jak znázorňuje čtverec na obr. 13. Tyto molekuly jsou v micelách zcela nerozpustné a migrují při čase t_0 . Velmi hydrofobní molekuly, které jsou v micelách zcela rozpustné, stráví v micelách veškerý čas, a proto jsou kapilárou unášeny stejnou rychlostí jako micely, jak znázorňují kolečka na obr. 13. Migrují v čase t_{mc} . Molekuly, které jsou částečně rozpustné (tzn. hydrofobnější) v micelách, se rozdělí mezi micely a pufr a migrují mezi časem t_0 a t_{mc} , jsou znázorněny jako trojúhelníky na obr. 13. Jejich retenční časy t_r jsou úměrné době, kterou stráví v micelách a která je úměrná jejich hydrofobicitě [44].



Obr. 13: Schematické znázornění MEKC v kapiláře. Micely (M) nesou záporné náboje kolem sebe. Záporně nabitě micely jsou přitahovány anodou, ale EOF je přenáší ke katodě. Rozpuštěné látky jsou znázorněny písmeny S. Čtverečky jsou označeny rozpuštěné látky, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a do micel se vůbec nerozdělují. Migrují stejnou rychlostí jako EOF a eluují v čase t_0 . Kruhy představují rozpuštěné látky, které jsou zcela rozpuštěny v micelách a nestráví v roztoku žádný čas. Migrují stejnou rychlostí jako micely a eluují v čase t_{mc} . Trojúhelníky představují rozpuštěné látky, které se rozdělují mezi micely a vodný roztok. Převzato a upraveno z literatury [44].

V posledních letech je velký zájem o použití polymerních pseudostacionárních fází. Byly popsány tři různé typy:

- a) Polymerní micely (v nich jsou polymerizovány monomery povrchově aktivních látek, které jsou spolu volně spojeny).
- b) Kaskádové makromolekuly (hvězdicovité dendrimery)
- c) Iontové blokové kopolymery

Hlavní výhodou je stabilita jejich struktury v přítomnosti organických modifikátorů o vysokých koncentracích. Běžně používané povrchově aktivní látky mohou tolerovat přibližně 20-30 % organického modifikátoru, než dojde k inhibici tvorby micel. Použití vysoké koncentrace organického modifikátoru je nezbytné pro separaci vysoce hydrofobních rozpuštěných látek, které silně interagují s micelami. Například separace PAU (polyaromatické uhlovodíky) byla dosažena pomocí jiných polymerních fází, jako jsou hvězdicovité dendrimery s 90 % rozpouštědla methanolu a kopolymery iontových bloků s 50 % methanolu ve vodném pufru [52].

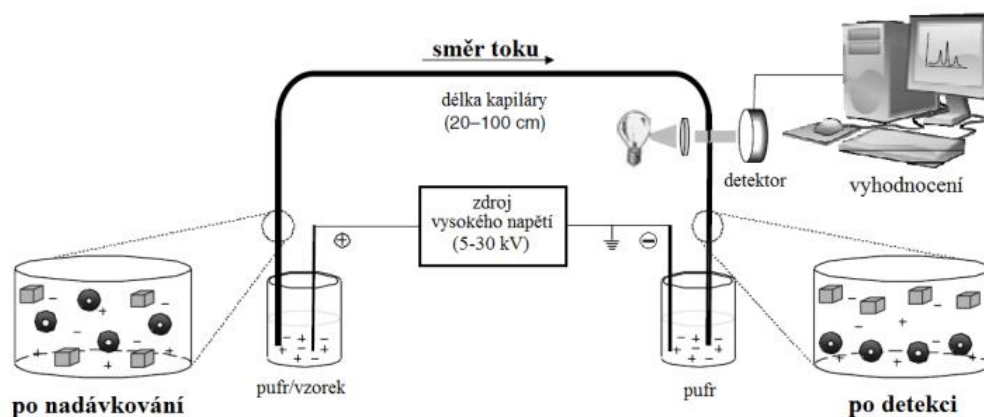
3.5.2.1 *Modifikátory v MEKC*

Do pufru, lze přidávat další látky (modifikátory), aby došlo ke zlepšení separace. Modifikátory mohou ovlivnit náboj micel nebo rozpuštěné látky a změnit rozpustnost rozpuštěné látky v micelách. Například Nishi a kol. pozorovali, že přídavek tetraalkylamoniových solí (TAA) do SDS rozpuštěného v pufru zlepšil separaci karboxylových kyselin [44].

Organické modifikátory způsobují změny v elektroosmotickém toku tím, že mění zeta potenciál a viskozitu pufru. Zároveň mohou ovlivnit selektivitu separací, že mění distribuci rozpuštěných látek mezi puftrem a micelami. V HPLC s reverzními fázemi je selektivita rozpouštědel způsobena rozdíly v Hildebrandově parametru rozpustnosti, který lze rozdělit na specifitější interakce, včetně disperze, dipólové interakce a vodíkové vazby. Stejně jako v HPLC s reverzními fázemi, lze v MEKC měnit selektivitu změnou organického modifikátoru, protože stejně jako v HPLC (řeší se rozdělení podle hydrofobicity/hydrofilicity) je i MEKC založena na rozdílech v distribuci analytu mezi hydrofobními a hydrofilními fázemi [44].

3.6 Průběh elektroforézy

Elektroforéza se provádí naplněním vialky roztokem pufru (základním elektrolytem), kdy oba konce kapiláry jsou do nich vloženy společně s elektrodami. Samotná kapilára je rovněž naplněna elektrolytem, který vede elektrický proud. Vzorek je dávkován do vialky, které jsou umístěny ve vzorkovacím zásobníku. Vzorek je z vialky nasáván do kapiláry. Následně je kapilára vložena zpět do vialky s pufrem a na elektrody se přivádí elektrické napětí. Rozpuštěné látky následně migrují kapilárou do detekčního okénka, kde jsou detekovány nejčastěji DAD detektorem, kdy jeho výstup je odeslán do počítače. Výstup je zobrazen jako elektroforegram, což je graf závislosti odezvy detektoru na čase [42][44].



Obr. 14: Princip CE. Převzato a upraveno z literatury [53].

3.7 Instrumentace v CE

3.7.1 Zdroj Napětí

Účelem zdroje napětí je zajistit elektrické pole. Většina zdrojů může být provozována v režimu konstantního napětí, konstantního proudu nebo konstantního výkonu a má možnost přepínání. Nejčastěji se používá režim konstantního napětí (0-30 kV), proudů (až do 300 μ A) a výkonu (do 6 W). Je nutné mít stabilní napětí, protože jakékoliv odchylky způsobí změny ve vytvořeném elektrickém poli, a tudíž migračních časech, což rovněž může vést ke zkresleným výsledkům [44].

3.7.2 Kapiláry

Kapiláry mohou být vyrobeny z různých materiálů, jako je teflon, sklo (pyrex), ale nejčastěji se používají kapiláry z taveného oxidu křemičitého, který je však křehký, a proto jsou jejich vnější stěny pokryty vrstvou polyimidu. Při UV/Vis detekci, je však nutné tuto vrstvu z kapiláry, v místě, kde prochází paprsek záření, odstranit (vznik optického okénka). To lze provést např. pomocí nízkoteplotního plamene. Vzniklé „optické okénko“ je třeba opatrně (vypálená část je velmi křehká) očistit rozpouštědlem nejčastěji methanolem nebo acetonem. Kapiláry mají obvykle průměr 50 nebo 75 μm a jejich délka je okolo 25-100 cm. Čím větší je vnitřní průměr kapiláry, tím více tepla se během analýzy generuje a tím větší je teplotní rozdíl mezi středem a oběma konci kapiláry. Nadměrné teplo je nežádoucí, dochází ke změně viskozity, difúze, rozkladu analytů a dochází k varu BGE [44].

Kapiláry, které jsou ze skla (pyrex), nepotřebují vnější potah polyimidu, jsou pevnější než ty z taveného skla. Nejsou však tak opticky průhledné, jako tavený oxid křemičitý, a proto je nelze použít při kratších vlnových délkách (menší než 280 nm). Kapiláry bývají často chlazeny, aby rychleji odváděly vzniklé teplo, a tím minimalizovali rozšíření píku v důsledku tepelné konvekce [44].

3.7.3 Dávkovací systém

Dávkování může být hydrodynamické (hydrostatické, tlakové nebo vakuové) a elektrokinetické [42]. Například kapilára o průměru 50 μm a délce 50 cm má objem okolo 1 μl . V CE se nejčastěji se odebírá pouze 1 -50 nl vzorku na rozdíl v HPLC, kde se dávkované objemy pohybují v μl [44].

3.7.3.1 Hydrodynamické dávkování

Tlakové dávkování se provádí na začátku kapiláry, kdy je konec kapiláry ponořen do vialky se vzorkem, na kterou je vyvíjen tlak. Objem dávkovaného vzorku závisí na velikosti a času působení tlaku, viskozitě roztoku vzorku a rozměrech kapiláry. Po nadávkování se konec kapiláry vrátí zpět do vialky s roztokem pufru. Aby se minimalizovalo jakékoliv nasátí vzorku nebo pufru při dávkování, měly by být hladiny kapaliny ve vialkách vyrovnány. Tyto odchylky [34] pak mohou způsobit nereprodukovatelné výsledky [44].

3.7.3.2 Elektrokinetické dávkování

Kapilára a elektroda jsou umístěny ve vialce se vzorkem. Vkládá se napětí, které způsobí migraci iontů z vialky se vzorkem do kapiláry v důsledky elektroosmózy a vlastní mobility. Množství dávkovaného vzorku závisí na elektroforetické pohyblivosti rozpuštěných látek, rychlosti EOF, napětí, rozměrech kapiláry a koncentraci rozpuštěných látek (po dávkování je různé zastoupení nabitých složek v kapiláře). Po nadávkování vzorku se kapilára a elektroda vrátí zpět do vialky s pufrům a aplikuje se napětí [42] [44].

3.7.4 Detektory

- UV/Vis detektor
- Fluorescenční detektor
- Hmotnostní spektrometrie (MS)
- Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

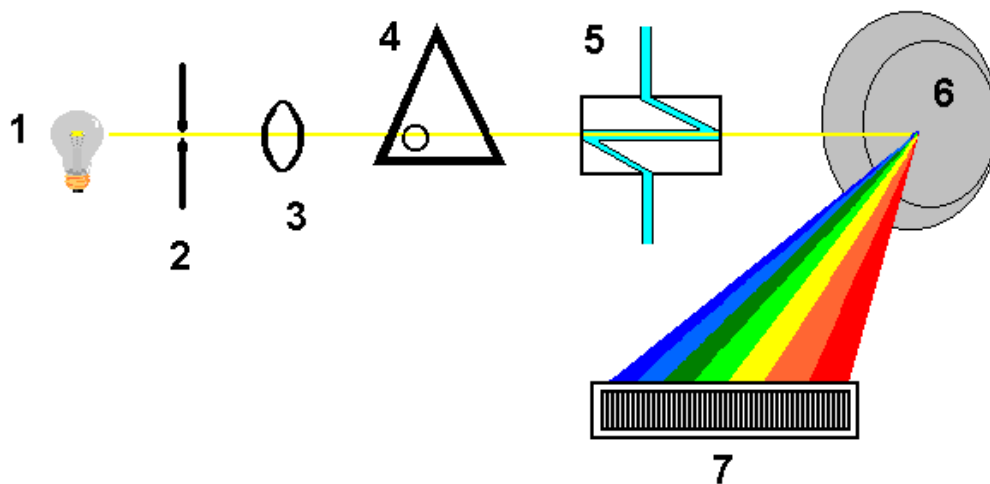
Nejčastěji se používá UV/Vis absorpční detektor. Mez detekce je přibližně 1 mg/l (ppm) až 1 µg/l (ppb). Ve výjimečných případech lze zapojit více detektorů (např. vodivostní, UV/Vis a MS v sérii) [44].

3.7.5 UV/Vis detektor

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a velikostí absorpce, která je vyjádřena absorbancí (A). Zdrojem světla je nejčastěji deuteriová výbojka pro UV oblast a wolframová lampa pro viditelnou oblast. Bílé světlo všechno vlnových délek UV záření, dopadá na mřížku, která světlo rozptyluje na různé vlnové délky. Vlnová délka se volí otáčením mřížky tak, aby příslušná vlnová délka procházela štěrbinou, která blokuje světlo jiných vlnových délek. Kapilárou prochází monochromatické světlo a je snímáno fotonásobičem což bývá nejčastěji fotodioda [44].

3.7.5.1 Detektor s diodovým polem – DAD, PDA („photodiode-array detector“)

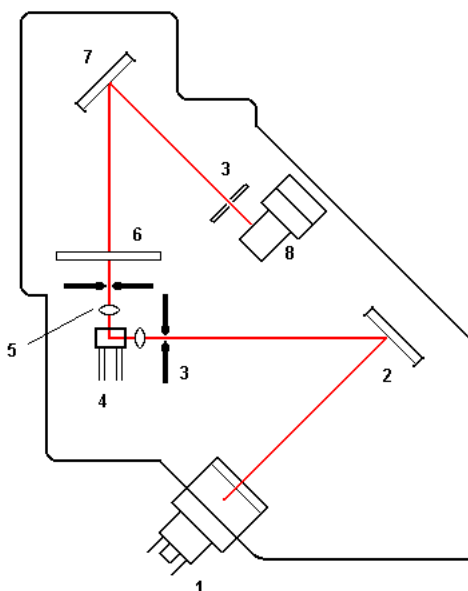
Snímající celé spektrum v reálném čase bez přerušení separace. Schéma je vyobrazeno na obr. č. 15, kdy záření ze zdroje (1) po průchodu štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4) a měrnou celou detektoru (5) se spektrálně rozkládá na holografické mřížce (6), takže na každou z fotodiód (7) dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu pak vybijí kondenzátor, který je úměrný intenzitě dopadajícího záření. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud, který je potřebný na dobití příslušných kondenzátorů. Velikost tohoto proudu se ukládá do paměti řídicí jednotky. Tato sekvence vybíjení a nabíjení se velmi rychle opakuje (řádově milisekundy – 10 ms na rozsah 190 až 600 nm) a takto se zaznamenávají údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Spektrální rozlišení je dáno počtem diód na poli, který se pohybuje mezi 512 až 1024 diód. Tento detektor umožňuje detekci při jakékoliv zvolené vlnové délce v daném rozsahu. V současnosti je jeden z nejužívanějších nejen v CE, ale i HPLC [54].



Obr. 15: Schéma DAD detektoru. Převzato a upraveno z literatury [54].

3.7.6 Fluorescenční detektor

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundární záření (emisního), které látka vyzařuje po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Doba trvání fotoluminiscence bývá u fluorescence 10^{-8} až 10^{-5} sekundy. Absorpcí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního singletového elektronového stavu (základní vibrační stav) do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu. Absorbovanou energii může excitovaná molekula opět vyzařit jako fluorescenci nebo ji přeměnit zcela jiným mechanismem na energii vibrační nebo předat jiným molekulám. Ztrátou vibrační energie přejde molekula nejprve do základního vibračního stavu a pak emituje fluorescenční záření, které má stejnou vlnovou délku jako absorbované záření [55].



Obr. 16: Schéma fluorescenčního detektoru: výbojka - rtuťová nebo xenonová (1), monochromátor – excitační mřížka (2), štěrbina (3), průtoková cela (4), mikročočky (5), cut-off filtr (6), monochromátor – emisní mřížka (7), fotonásobič (8). Převzato a upraveno z literatury [55].

3.7.7 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS)

I když je spojení CE-MS jednou z nejmladších analytických technik, má oproti technikám GC-MS a LC-MS různé výhody. Použití CE-MS je dáno elektroforetickým principem separace i povahou zvolené ionizační techniky spektrometrie. CE umožňuje separace nenabitých i nabitých látek s velmi širokým spektrem vlastností. Od nízkomolekulárních anorganických i organických iontů, polárních látek, přes málo polární a nepolární látky (např. aromatické uhlovodíky) až po vysokomolekulární látky (proteiny, fragmenty nukleových kyselin) nebo jiné větší objekty (např. viry a bakterie). Nejčastěji je využíváno spojení CE-ESI-MS, kdy dochází k ionizaci elektrosprejem a je vhodné pro polární a středně polární látky s velkým rozsahem molekulových hmotností [56].

Výhodou spojení CE-MS oproti LC-MS je velmi nízká spotřeba vzorků, chemikálií a rozpouštědel. Spojením CE s MS se také z velké části řeší nedostatečná citlivost déle zavedené CE s DAD detekcí. Výhodou spojení CE-MS je přesná identifikace separovaných látek a spotřeba vzorku pro jednu analýzu je 20 nl. To je dáno použitím delší kapiláry, kvůli tomu se dávkuje větší objemy vzorku, ale dávkovací objemy se příliš neliší od běžné CE-DAD. [56].

3.7.8 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (CE-ICP-MS)

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je komerčně dostupná analytická technika prvkové analýzy, která vyniká svou univerzálností, schopností současné detekce více prvků, možností stanovení izotopů či jejich poměrů, širokým dynamickým rozsahem a nízkými mezemi detekce [57][58].

ICP-MS se běžně používá v různých oborech, jako je geochemie, životní prostředí, průmysl (potravinářský, chemický, polovodičový, jaderný), forenzní vědy, medicína, biologie a archeologie. Po uvedení prvního komerčně dostupného přístroje vybaveného kvadrupólovým analyzátozem v roce 1980 se tato technika neustále zdokonaluje [59].

Principem ICP-MS je zavádění kapalného vzorku (nejčastější případ) do zmlžovače pomocí čerpadla (peristaltického), kdy vzorek je pomocí kinetické energie nosného plynu převeden na aerosol (polydisperzní). Aerosol pak vstupuje do mlžné komory, kde dochází k separaci jemného aerosolu od částic, které jsou větší než 10 μm . Dále jemný aerosol prochází injektorem (horizontálně), který je umístěn v plazmové hlavici do ICP, ve které je teplota 6 000 až 10 000 K, zde dochází k desolvataci, odpaření, atomizaci a ionizaci prvků a dochází ke vzniku kladně nabitých iontů. Další

částí přístrojů s nízkou rozlišovací schopností je kolizní celou, která eliminuje spektrální interference (polyatomické). Následně jsou ionty vedeny do hmotnostního analyzátor a separovány podle poměru m/z . Nejčastější typem analyzátoru je kvadrupólový analyzátor ($R = 300$). Nakonec separované ionty dopadají na detektor (elektronásobič), který je tvořen sériemi dynod, které převádějí proud iontů na měřitelný signál [60].

Nejdůležitější pro spojení CE-ICP-MS je robustní rozhraní („interface“), díky kterému dochází k získání věrohodných a opakovatelných výsledků. Rozhraní musí splňovat určité podmínky: zajištění opakovatelného a dostatečného průtoku pomocné kapaliny (nejčastěji 20 x zředěný pufr), opakovatelné mísení efluentu z CE s pomocnou kapalinou, aby docházelo k nejnižšímu rozmytí zón analytů, aby byla zachována separace z CE, mezi poslední podmínku patří zajištění stabilního elektrického obvodu mezi inletovou elektrodou a vstupem do ICP-MS [6].

4 HPLC JAKO KOMPLEMENTÁRNÍ TECHNIKA K CE

4.1 HPLC

Na rozdíl od kapilární elektroforézy (CE), která je založená na migraci elektricky nabitých látek kapilárou v elektrickém poli [39], v HPLC jsou látky separovány na základě rozdílné afinity k mobilní fázi a stacionární fázi [57]. I když je micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) hybridní technikou mezi CE a HPLC, tak se od sebe MEKC a HPLC se liší různými mechanismy separace, použitou stacionární fází, resp. pseudostacionární fází a aplikacemi. Výhody MEKC oproti HPLC zahrnují spotřebu malého množství vzorku, rychlost analýzy (v závislosti na typu analyzovaných látek), účinnost a široký rozsah pH použitého pufru, nebo možnost použití online pre-koncentračních technik, zatímco hlavní výhodou HPLC je vysoká reprodukovatelnost [61].

4.1.1 Rozdělení kapalinové chromatografie

Podle různých principů se z hlediska fyzikálních a chemických vlastností kapalinová chromatografie dělí:

- Rozdělovací chromatografie – látky se zachycují ve s.f. (kapalná), která je nanášena na pevném nosiči.
- Afinitní chromatografie – umožňuje oddělení podobných proteinů z komplexní směsi. Díky tomu, že dochází k interakci nosiče s imobilizovanými ligandy.
- Adsorpční chromatografie – dochází k separaci díky speciálním interakcím látek se stacionární fází, která je tvořena pevnými nemodifikovanými částicemi.
- Iontově výměnná chromatografie – dochází k separaci iontů na stacionární fází, to bývá nosič s navázanými nabitými funkčními skupinami.
- Gelová permeační chromatografie – dochází k separaci látek na principu různé velikosti částic, které se zachytávají ve stacionární fází, která je tvořena gelem a má přesně definovanou velikost pórů [62].

4.1.2 Instrumentace v HPLC

- Vysokotlaké čerpadlo – pumpy – používají se k transportu mobilní fáze (m.f.).
- Zařízení pro dávkování vzorku – manuální nebo automatické.
- Kolony – jsou naplněny stacionární fází (s.f.) – může se vyskytovat v prostoru, který je termostatovaný.
- Detektor – zaznamenává signál, který vzniká rozdílem mezi průchodem čisté m.f. a mobilní fáze obsahující vzorek [62].

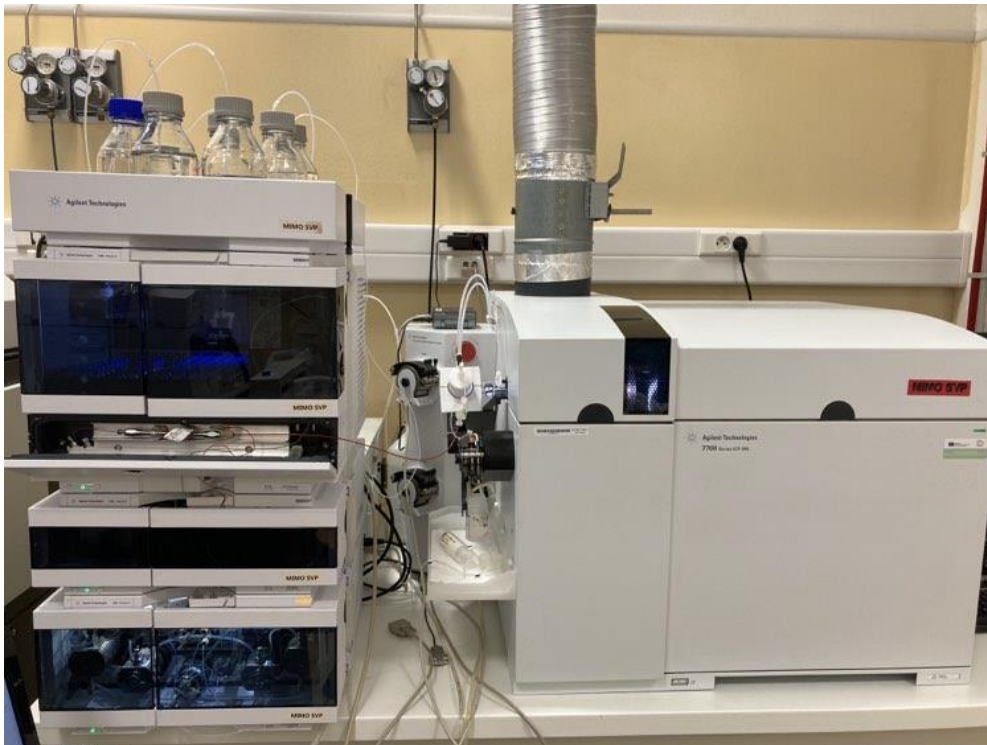
4.1.3 Spojení HPLC-ICP-MS

HPLC byla mezi prvními separačními technikami, která byla spojena s ICP-MS a je také kompatibilní díky vybavení HPLC a široce dostupné literatuře, chemické složení mobilních fází a průtoky používané v HPLC jsou kompatibilní se systémy vzorkování ICP-MS systémů [58]. Používá se pro analýzy netěkavých látek nebo iontů v roztoku, roztok může být organický, vodný nebo jejich směs [58]. Díky flexibilitě, výběru mobilní a stacionární fáze a použití gradientových technik, kde mobilní fáze mění složení během průběhu analýzy, díky tomuto je HPLC mocná separační technika a používá se v mnoha odvětvích [58].

Chromatografie na obrácené fázi (RP-HPLC): analyty jsou v polární mobilní fázi (voda, voda-methanol, voda-acetonitril. Kolona je naplněna stacionární fází silikagel obsahující chemicky vázaný uhlodíky (C4-C18). Obvykle se analyzují polární nenabitě sloučeniny s $M_r < 3000$. Počet aplikací se však neustále zvyšuje díky vynikajícímu rozlišení – schopnost rozlišit proteiny [57].

Při spojení RP-HPLC-ICP-MS, se řeší hydrofobicita biomolekuly, která určuje její retenci, postupné eluce jednotlivých druhů směsi se dosahuje snižováním polaritu mobilní fáze přidávkou methanolu nebo acetonitrilu. Dostupnost RP kolon s různými rozměry umožňuje přizpůsobit průtok zaváděného vzorku, tak, jak vyžaduje detekční systém. Průtoková rychlost silně závisí na geometrii kolony. Například, změna vnitřního průměru kolony od 8 do 0,18 mm, umožňuje snížit průtok od 10 ml/min do 2 ml/min. Vysoká koncentrace organického modifikátoru v m.f. činí RP-HPLC špatně kompatibilní s ICP-MS, protože negativně ovlivňuje stabilitu plazmatu, v extrémních případech až do vyhasnutí. Organická rozpouštědla jsou také zodpovědná za usazování uhlíku na kónusech a plazmové hlavici. Vyšší radiofrekvenční výkon pomáhá snížit vliv zatížení plazmatu rozpouštědlem, zatímco použití chlazené mlžné komory omezuje množství par rozpouštědla, které putují do

plazmatu. Je doporučeno použít Pt kónus, desolvatační jednotky a přidání kyslíku (1-3 %) do proudu rozprašovací plynu (Ar) [57].



Obr. 17: Spojení HPLC-ICP-MS

4.1.4 Použití HPLC-ICP-MS

HPLC-ICP-MS má využití zejména ve speciální analýze různých prvků např.:

- Speciace organických sloučenin cínu v mořských sedimentech, živočichů nebo potravinách
- Speciace arsenu v potravinách a pitných vodách
- Speciace chromu ve vzorcích z životního prostředí a stavební materiály [58]

5 ANALÝZA SIDEROFORŮ/METALOFORŮ

Pro detekci různých typů sideroforů lze použít spektrofotometrické nebo kolorimetrické stanovení. Schwyn a kol. vyvinuli univerzální stanovení sideroforů s použitím dvou indikátorů: Chromazurol S (CAS) a hexadecyltrimethylamonium bromid (HDTMA). Komplexy CAS/HDTMA se pevně spojují s železem, což způsobuje vznik modrého zbarvení. Silný chelátor, jako je siderofor, má schopnost odstranit železo z komplexu barviva, což vede k změně zbarvení z modré na oranžovou. Perez Miranda a kol. popsali novou, rychlou, netoxickou a snadnou metodu, která umožňuje stanovení různých mikroorganismů (hub), schopných produkce sideroforů na pevném médiu (O-CAS-test). Je však třeba poznamenat, že všechny tyto testy založené na různých barevných komplexech jsou velmi nespecifické a poskytují minimum informací o struktuře sideroforů. V poslední době se proto používají moderní instrumentální metody, včetně nukleární magnetické rezonance (NMR) nebo častěji vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detekcí pomocí diodového pole (DAD) a ESI-MS [63].

Při charakterizaci pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) je kov z komplexu obvykle odstraněn před získáním dat, protože Fe^{3+} způsobuje rozšíření čar NMR signálů. Pro získání NMR spekter sideroforů ve formě chelátovaného kovu se často používají diamagnetické analogy sideroforu Ga^{3+} nebo Al^{3+} [64].

Vzhledem k tomu, že v přírodních zdrojích (mořská voda, půda, biologické vzorky) jsou siderofory často přítomny v nízkých koncentracích a často existují ve více proteinových komplexech, využívá většina analytických strategií pro siderofory prekoncentraci vzorků pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) s kolonami naplněnými sorbenty s reverzní fází (RP) nebo sorbenty s iontovou výměnou, následovanou separací pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [64].

Paul McCormack a kol. provedli studii, ve které zjistili, že pomocí techniky SPE-HPLC-ESI-MS je možné efektivně separovat a identifikovat siderofory v komplexních matricích. Tato metoda přináší několik výhod, včetně rychlé identifikace jak známých, tak i neznámých sideroforů, a schopnosti získat strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. Tato technika je vysoce citlivá, s detekčními limity v řádu nmol/l. Nicméně, i přes vysokou citlivost je pro detekci těchto sloučenin v nízkých koncentracích ve vzorcích mořské vody nezbytná prekoncentrace. Výsledky jejich studie naznačují, že mořský bakterioplankton je schopen produkovat ferrioxaminy, což je důležitá třída sideroforů hydroxamátového typu [65].

V další studii Ringo Schwabe a kol. sledovali siderofor desferrioxamin B (DFOB) a jeho afinitu k různým kationtům kovů. Afinita DFOB ke kovům byla potvrzena pomocí HPLC a ICP-MS. Výsledky ukázaly, že pořadí afinit kovů bylo následující: $\text{Fe}^{3+} > \text{Ga}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Zn}^{2+} >$ ostatní dvojmocné ionty. Zjistilo se, že dvojmocné ionty nejsou vhodné pro chelataci pomocí DFOB [66].

Zajímavá analýza sideroforů je popsána v publikaci od Tomáše Pluháčka a kol., kteří identifikovali dva mikrobiální siderofory, Fe-Fc a Fe-TafC. Markery infekce plicní invazivní aspergilózy (IPA), identifikovali neinvazivním způsobem, v moči infikovaných hostitelů. Tyto molekuly mohou být přítomny ve formě ferri- nebo desferri-varianty. Dále byly ve vzorcích séra a plicní tkáň pozorovány jejich kombinace s ionty sodíku a draslíku, což však komplikuje kvantifikaci sideroforů. Pluháček a jeho kolegové poskytli robustní kvalitativní a kvantitativní údaje, které naznačují silný analytický potenciál přístupu zvaného CASI (kontinuální akumulace vybraných iontů)-FTICR. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí HPLC-ESI-CASI-FTICR [67].

Metalofory lze detekovat pomocí mikrobiální databáze sideroforů (CycloBranch). Tato databáze umožňuje snadnou identifikaci všech sloučenin, které mají předem definované izotopové vlastnosti v chromatografickém datovém souboru. CycloBranch je aplikovatelný jak na soubory dat z elementární (ICP-MS), tak molekulární (ESI nebo MALDI) hmotnostní spektrometrie (MS) [68].

Jak již bylo naznačeno, kapilární elektroforéza představuje vhodnou alternativu k HPLC. Např. Piotr Mucha a kol. využili kapilární zónovou elektroforézu a micelární elektrokinetickou chromatografii pro analýzu ferrioxaminů. V této práci je ukázáno, že CE je vhodná pro detekci, charakterizaci sideroforů a pro sledování osudu železa v mořském prostředí. Jejich výzkum prokázal přítomnost sideroforů z rodiny ferrioxaminů v podpovrchové mořské vodě, což je nový a důležitý objev, neboť tyto sloučeniny nebyly v mořské vodě, konkrétně Baltském moři, dosud identifikovány [69]. Využití spojení CE s ESI-MS v analýze sideroforů pocházejících z různých kmenů endofytických methylobakterií je pak ukázáno ve studii Colnaghi Simionata a kol. [70].

6 CÍLE DP.

V souladu s potenciálním použitím metaloforů v lékařství (viz kapitola 2.5) byly stanoveny následující cíle DP:

1. Vývoj a optimalizace metod pro separaci volných a komplexních forem jednotlivých metaloforů, přičemž jako zástupce komplexní formy byly vybrány běžně se vyskytující Fe-Fc a Fe-TafC. Byl kladen důraz zejména na to, aby byly vyvinuté metody rychlé, opakovatelné, levné (malá spotřeba vzorku a činidel), a také kompatibilní s potenciálně používanými detektory dosahujícími velmi nízké meze detekce (ICP-MS).
2. Studium komplexace des-Fc a des-TafC s různými ionty biogenních prvků (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+}) a Ga^{3+} v různých poměrech kation-siderofor a jejich analýza již vyvinutými metodami, aby bylo případně možné zjistit stechiometrické poměry nebo kinetiku vzniku komplexu.
3. Potvrzení vzniku komplexů pomocí vysoko rozlišujícího MS - (Synapt G2-S) ve spojení s FIA (průtoková injekční analýza) a pomocí HPLC-ICP-MS využívající separaci volného nenasázaného kationtu od komplexu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁLY

7.1 Chemikálie

Pro přípravu pufrů byly použity následující chemikálie: H_3PO_4 , H_3BO_3 , NaOH, dodecylsulfát sodný. Všechny tyto použité chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich o čistotě p.a., Na kalibraci pH metru byly použity pufrы o pH: 4,7 a 10 od společnosti Xylem Analytics Germany GmbH WTW. Na rozpuštění a ředění byla použita demineralizovaná voda, která byla vyráběna systémem Milli-Q-Reference od firmy Millipore (Molsheim, Francie). Dále byly použity referenční materiály Astatol Mn, Al, Ga, Cu, Zn, Ni a Co o koncentracích $1 \pm 0,002$ g/l, které jsou již stabilizovány v 2 % HNO_3 a byly zakoupeny od firmy Analytika, spol. s.r.o.

7.1.1 Standardy

Standardy sideroforů Fe-Fc, Fe-TafC, des-Fc a des-TafC byly získány od pana prof. Ing. Vladimíra Havlíčka, Dr. z Laboratoře charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologického ústavu A V ČR, v. v. i. Již vysušené standardy 100 μg byly rozpuštěny v deionizované vodě na výslednou koncentrací 1000 mg/ml (1000 ppm). Jako marker elektroosmotického toku byl použit dimethylsulfoxid (DMSO), který byl zakoupen od společnosti Sigma Aldrich.

7.2 Pomůcky a přístroje

7.2.1 Laboratorní pomůcky

Byl použit pH metr InoLab Multi 931 OP od firmy Heildolph, chemické špachtle, kádinky, automatické pipety, analytické váhy, ultrazvuk a použité kapiláry s vnitřní průměrem 50 μm byly od firmy Molex (IL, USA).

7.2.2 Analytické přístroje

Všechny experimenty týkající se kapilární elektroforézy byly provedeny na přístroji CE7100 od firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Německo), který obsahuje detektor UV/Vis (DAD). Pro potvrzení vzniku komplexu kation-siderofor byl použit vysokorozlišující hmotnostní spektrometr (HRMS) s kvadrupólovým filtrem a analyzátořem doby letu (qTOF) Synapt G2-S od firmy Waters (Manchester, Velká Británie). Dále bylo pro potvrzení vzniklých komplexů využito spojení

HPLC s ICP-MS, přičemž přístroj pro kapalinovou chromatografii byl pořízen od společnosti Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) a následně spojen pomocí rozhraní s ORS-ICP-MS 7700x od firmy Agilent Technologies (Tokyo, Japan). Separace byla provedena na Waters, VanGuard, UPLC BEH C8 1.7 μm , rozměry 2,1 x 5 mm.

7.3 Příprava roztoků

7.3.1 Příprava roztoku základní elektrolytu (BGE) pro analýzu kation-Fc

BGE byl připraven rozpuštěním vypočítaného objemu H_3PO_4 v deionizované vodě na koncentraci 15 mM. Dále byla kyselina pomocí 50% NaOH titrována na $\text{pH} = 7,0$, kdy pH bylo kontrolováno již nakalibrovaným pH metrem. Výsledný BGE byl poté přidán, k již vypočítanému a naváženému množství SDS tak, aby výsledná koncentrace byla 50 mM.

7.3.2 Příprava roztoku základního elektrolytu (BGE) pro analýza kation-TafC

BGE byl připraven stejně jako v kapitole 7.3.1 s tím rozdílem, že k 25 mM roztoku $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$, na $\text{pH} = 2,5$ po rozpuštění požadovaného množství SDS (100 mM) bylo k roztoku přidáno 10 % (v/v) MeOH.

7.3.3 Příprava roztoků komplexů kation-Fc, kation-TafC

Nejprve bylo odebráno 200 μl ze zásobních roztoků kovů (1 mg/ml). Roztoky byly následně odfoukány pod proudem N_2 (200 μg) a poté doplněny deionizovanou vodou (200 μl) zpět na koncentraci 1000 g/l. Roztoky byly odfoukány, protože bylo potřeba odstranit většinu kyseliny dusičné, kvůli případné nestabilitě komplexů. Z již vytvořených roztoků se pak odebraly vypočítané objemy 1000 mg/l a byly připraveny roztoky o koncentraci 10 mg/l, které byly dále použity na vytvoření komplexů kation-Fc a kation-TafC. Pro analýzy byly tvořeny roztoky metaloforů s kovovými kationty, kde procentový obsah kovového kationtu, zde značí procenta látkového množství daného metaloforu tzn., že 100 % kovového kationtu znamená přídavek v ekvimolárním poměru.

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Ferricrocin

První byla optimalizována a vyvíjena metoda pro stanovení des-Fc, Fe-Fc a DMSO. Poté byly k des-Fc přidávány různé kovy, kdy pomocí CE-DAD bylo zjišťováno, jestli docházelo k interakci a došlo k vytvoření komplexů.

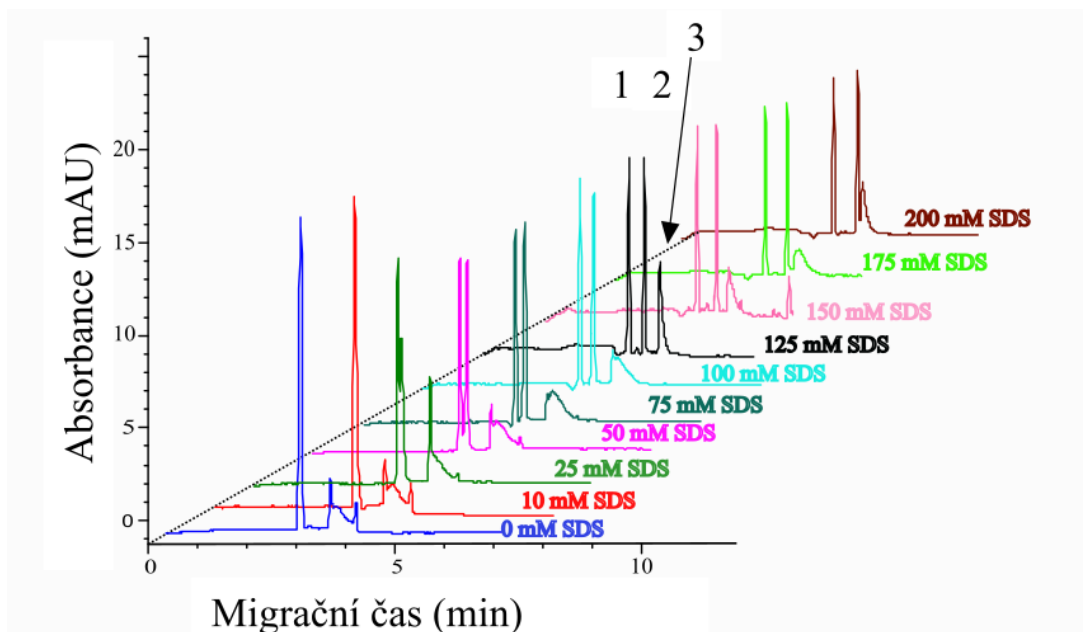
- Optimalizace podmínek pro separaci směsi des-Fc, Fe-Fc a DMSO
- Podmínky pro měření CE-DAD
- Výsledky daných analýz na CE-DAD

8.1.1 Optimalizace podmínek pro separaci des-Fc, Fc a DMSO

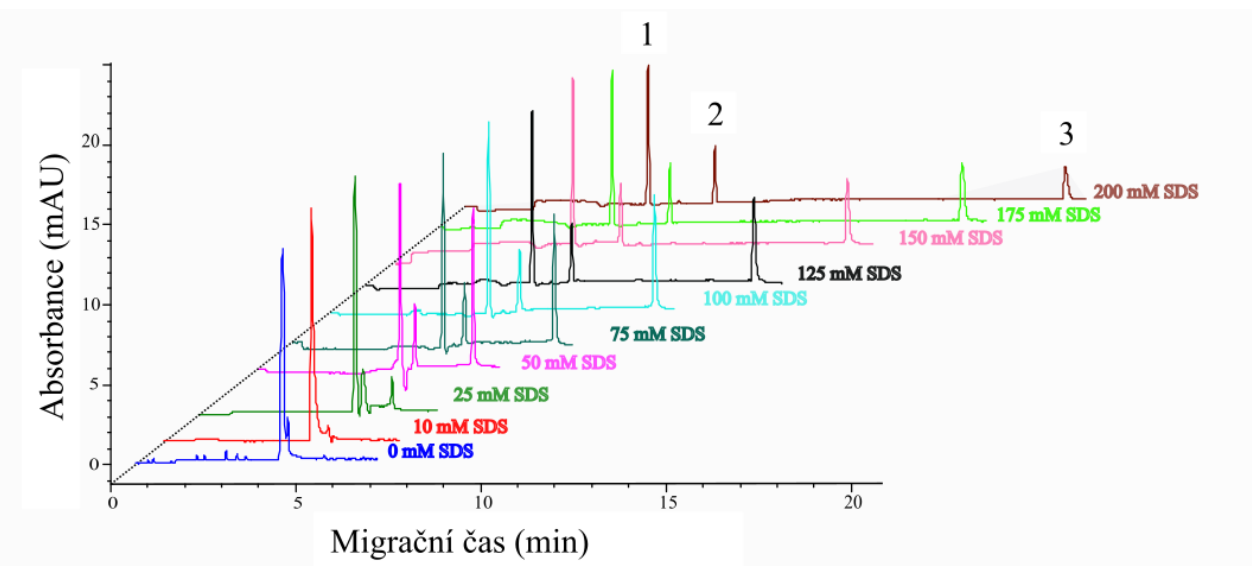
Bylo optimalizováno pH, koncentrace SDS, koncentrace kyseliny (iontová síla), napětí a pomocný tlak.

8.1.1.1 Optimalizace složení separačního elektrolytu a pH

Byly testovány tyto základní elektrolyty: $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ (pH = 8,5-10) a $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH = 7,0), kdy byla zjišťována nejlepší separace a zároveň byla v těchto prostředích zjišťována optimální koncentrace SDS v rozsahu 0-200 mM. První byla testována $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ o v rozmezí pH = 8,5-10, kdy bylo zjištěno, že je potřeba vysoké koncentrace SDS (125 mM), nicméně bylo zjištěno, že analýzy za těchto podmínek jsou nereprodukovatelné a značně dochází ke změnám velikosti signálu u des-Fc, což je pravděpodobně způsobeno vysokým pH. Z toho důvodu bylo dalším krokem testování jiného pufru. Byl vybrán $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$ o pH = 7,0, kdy se také testovala koncentrace SDS. Z hlediska tvaru píku, rozlišení a doby analýzy byla vybrána koncentrace 50 mM SDS. Optimalizace pH a koncentrace SDS jsou shrnuty na obr. 18 a 19.



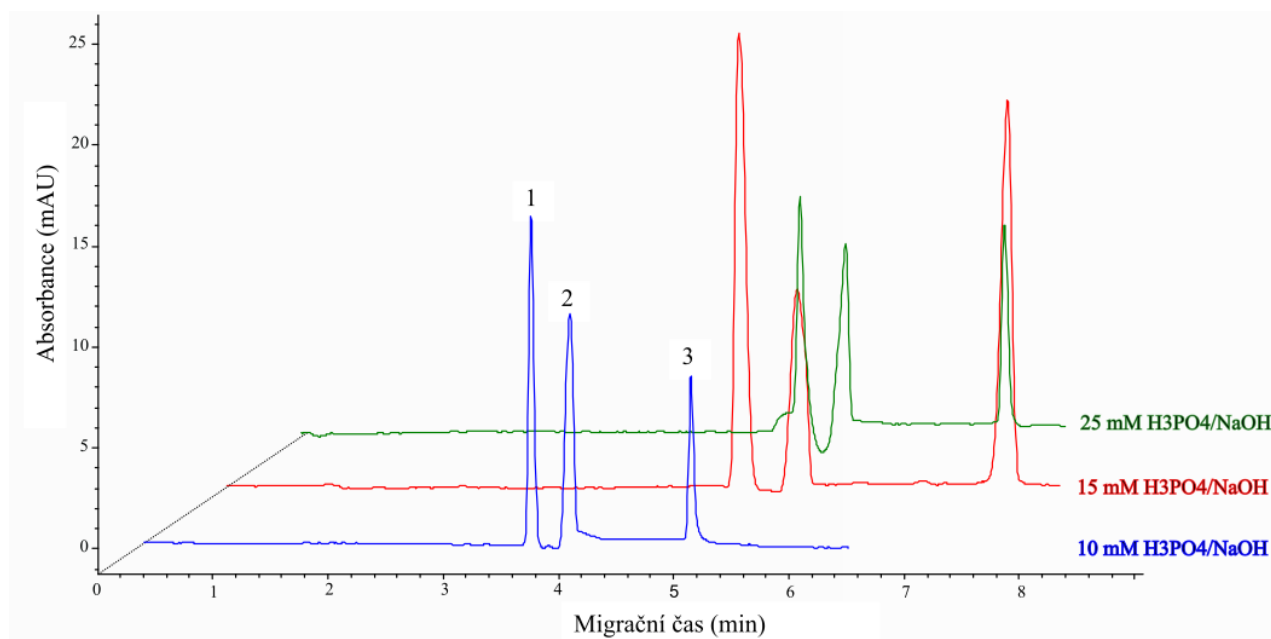
Obr. 18: Optimalizace pH a SDS; Byla použita 50 mM $H_3BO_3/NaOH$ o pH = 9,5; koncentrace SDS byla v rozmezí 0-200 mM. Popis: 1- DMSO; 2-Fe-Fc; 3-Des-Fc



Obr. 19: Optimalizace pH a SDS; Byla použita 25 mM $H_3PO_4/NaOH$ o pH = 7,0; koncentrace SDS byla v rozmezí 0-200 mM. Popis: 1- DMSO; 2-Fe-Fc; 3-Des-Fc

8.1.1.2 Optimalizace koncentrace H_3PO_4

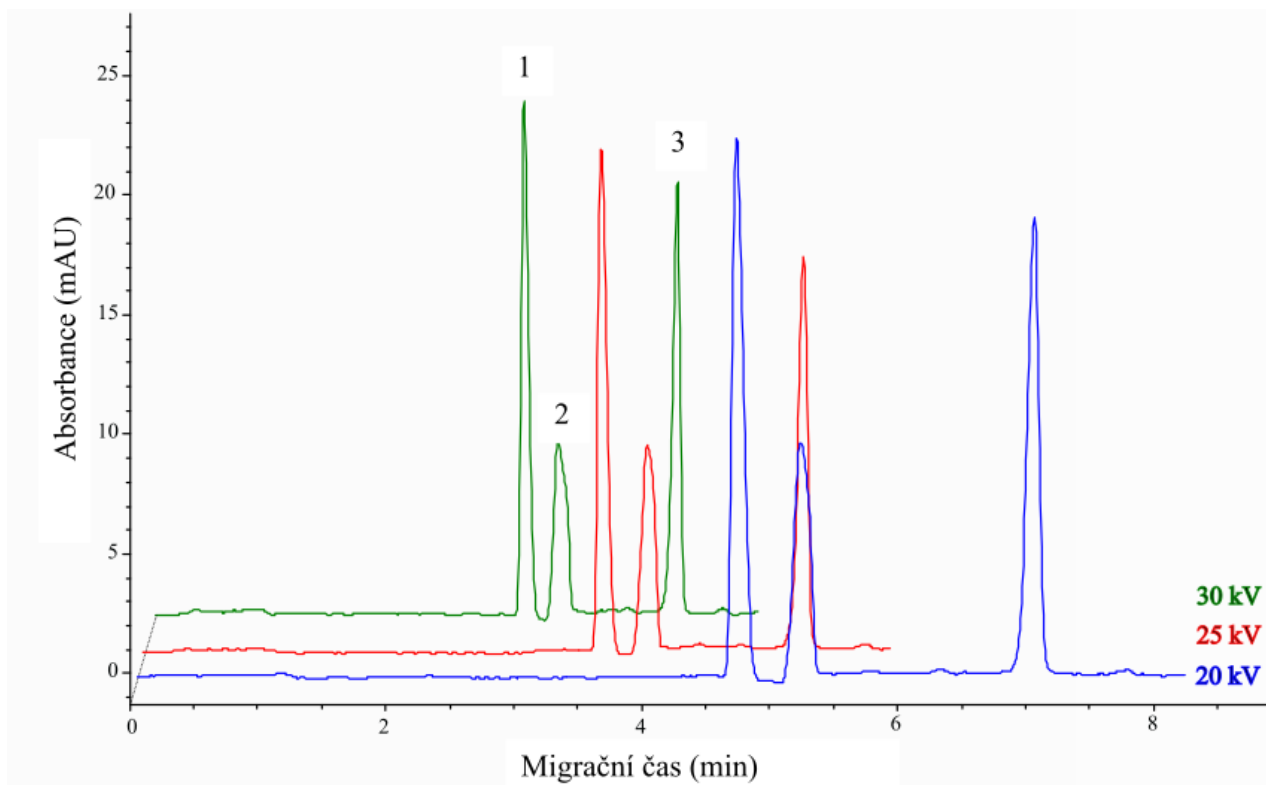
Byly testovány koncentrace H_3PO_4 v základním elektrolytu: 10, 15 a 25 mM. Sledoval se vliv iontové síly na separaci. Z grafů bylo vyčteno, že při 10 mM $H_3PO_4/NaOH$ je dosaženo nejrychlejší analýzy, nicméně při opakovaných analýzách bylo zjištěno, že ne vždy je pík Fe-Fc dostatečně odseparován od EOF (DMSO), oproti 15 mM $H_3PO_4/NaOH$. Ta dosahuje nejlepší separace a doba analýzy je dostatečně rychlá. U 25 mM $H_3PO_4/NaOH$ je doba analýzy nejdelší, proto byla vybrána 15 mM $H_3PO_4/NaOH$.



Obr. 20: Optimalizace koncentrace $H_3PO_4/NaOH$; Byla použita $H_3PO_4/NaOH$ o $pH = 7,0$ v rozmezí koncentrací 10-25 mM a koncentrace SDS byla 50 mM. Popis: 1- DMSO; 2-Fe-Fc; 3-Des-Fc

8.1.1.3 Optimalizace napětí

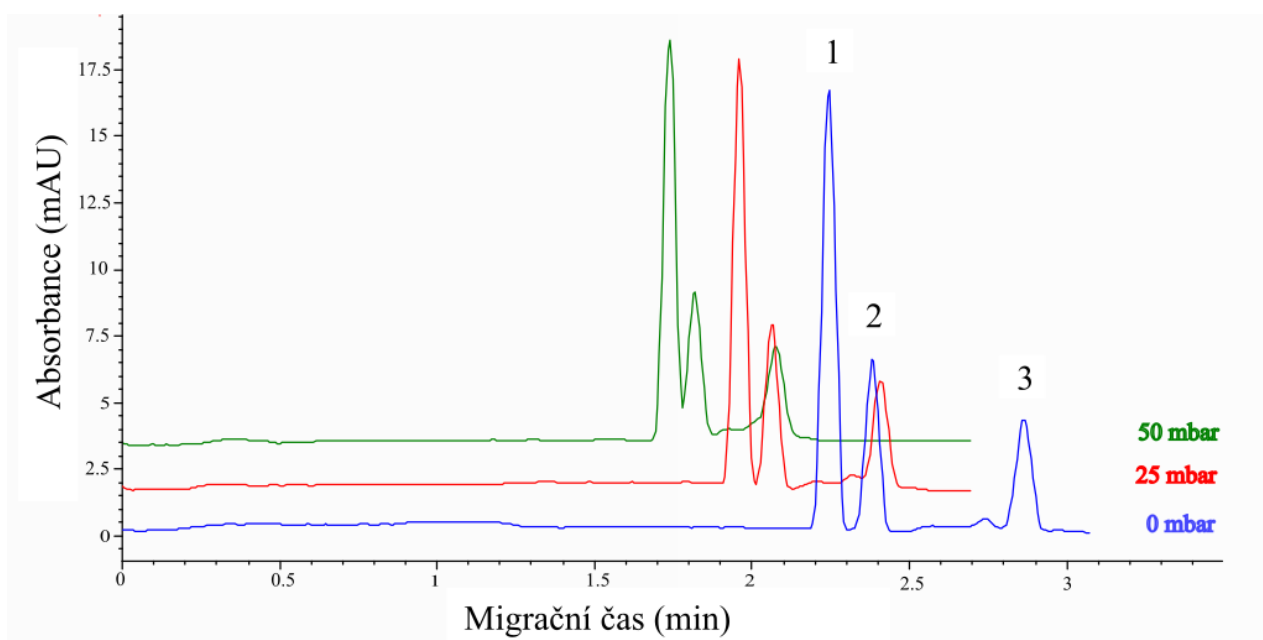
Bylo optimalizováno napětí v rozmezí 20–30 kV při již z optimalizovaných podmínkách. Bylo zjištěno, že nejlepší napětí je 30 kV, kdy došlo k výraznému snížení doby analýzy.



Obr. 21: Optimalizace napětí v rozmezí 20–30 kV; byla použita 15 mM $H_3PO_4/NaOH$ o pH = 7,0 a koncentrace SDS byla 50 mM. Popis: 1-DMSO; 2-Fe-Fc; 3-Des-Fc

8.1.1.4 Optimalizace pomocného tlaku během analýzy

Pro urychlení byla testována aplikace pomocného tlaku během analýzy. Tlak byl optimalizován v rozmezí 0–50 mbar, kdy při 50 mbar sice došlo k zrychlení analýzy, ale nedošlo k úplné separaci DMSO a Fe-Fc, proto byl vybrán tlak 25 mbar, kdy došlo ke zrychlení analýzy za současného zachování akceptovatelného rozlišení (na základní linii) mezi elektroosmotickým tokem, resp. DMSO a Fe-Fc.



Obr. 22: Optimalizace dávkování vzorku v rozmezí 0-50 mbar; byla použita 15 mM $H_3PO_4/NaOH$ o $pH=7,0$; koncentrace SDS byla 50 mM a napětí bylo 30 kV. Popis: 1-DMSO; 2-Fe-Fc; 3-Des-Fc

8.1.1.5 *Shrnutí optimalizace*

Po optimalizaci jsou finální podmínky pro analýzu Fc a jeho kovových forem pomocí CE-DAD následující:

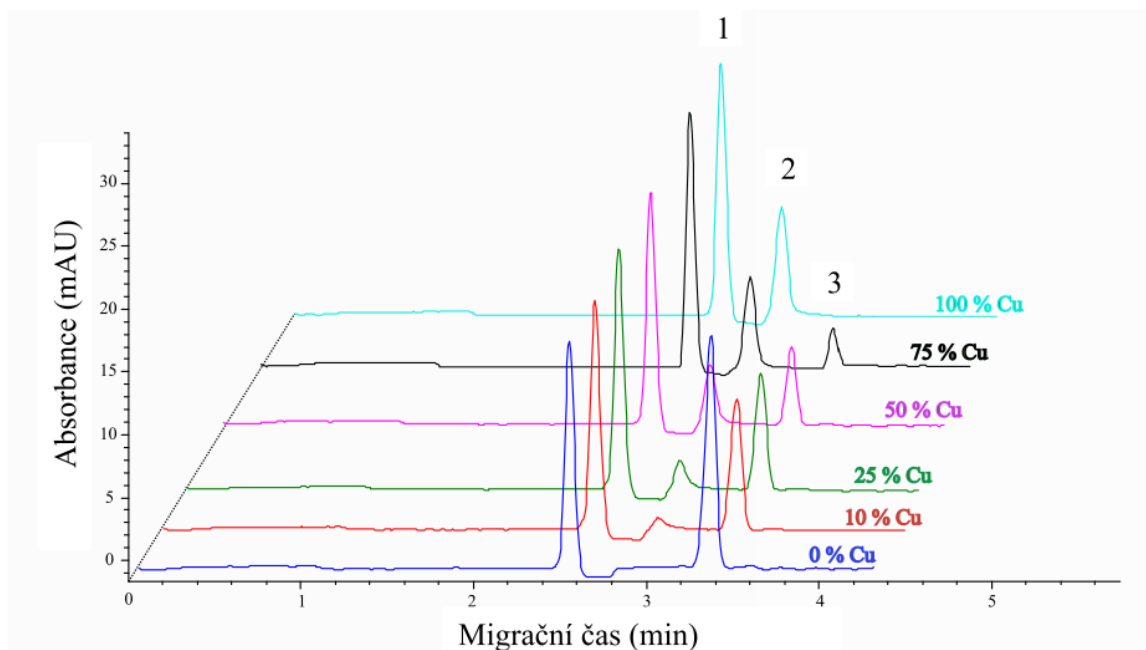
- 15 mM H₃PO₄/NaOH o pH = 7,0
- Koncentrace SDS = 50 mM
- Napětí = 30 kV
- Pomocný tlak = 25 mbar
- Dávkování = 100 mbar/5s
- Detekce = 200 nm
- Celková délka kapiláry = 48,5 cm
- Efektivní délka kapiláry = 40,5

8.1.2 **Tvorba komplexů s des-Fc a jejich analýza pomocí CE-DAD**

Výsledky jsou vyjádřeny pomocí grafického znázornění, kdy u třech kovů lze vidět, že došlo ke vzniku komplexu kation-Fc (Ga, Cu, Al) a je prokázána separace tohoto komplexu od DMSO a des-Fc, přičemž se zvyšující se koncentrací kovového kationtu došlo i ke postupnému snižování signálu des-Fc.

8.1.2.1 Komplex Cu-Fc

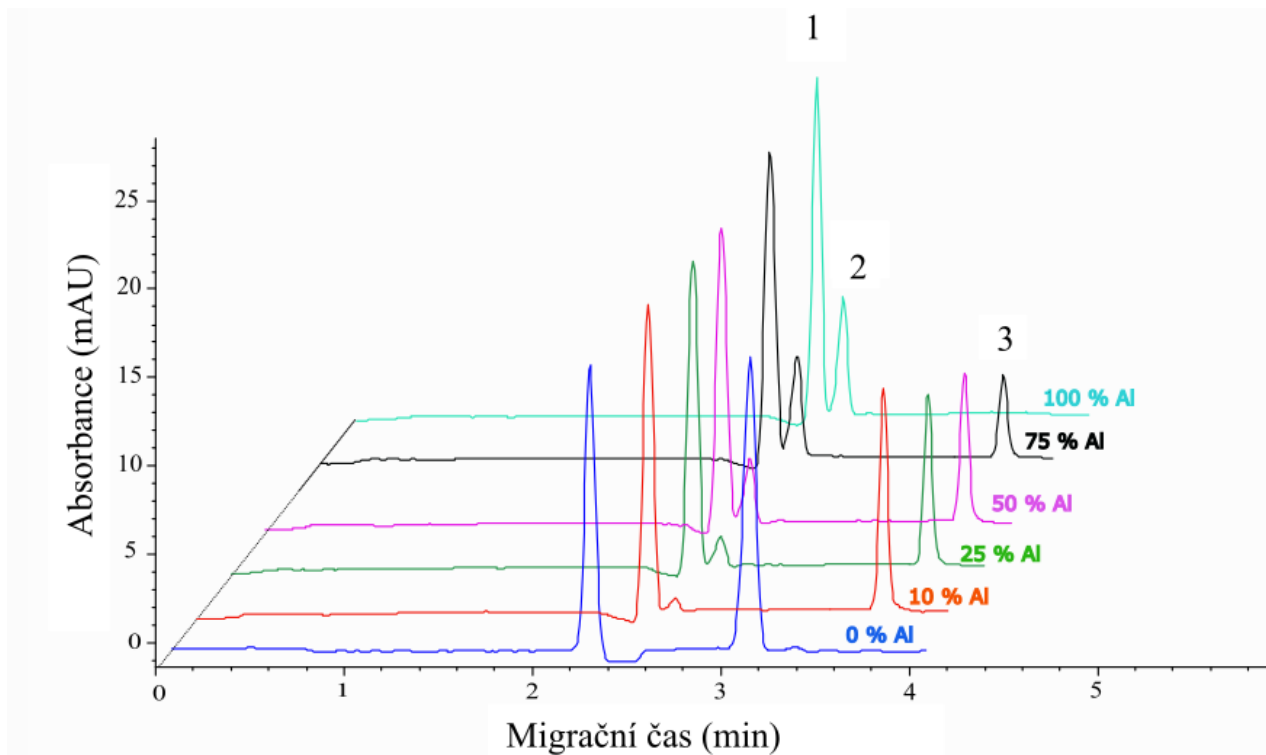
Z obr. 23 lze vidět, že došlo k interakci des-Fc s Cu^{2+} ve stechiometrickém poměru v rozmezí 0-100 % Cu^{2+} .



Obr. 23: Vznik komplexu Cu-Fc v rozmezí od 0-100 % Cu^{2+} . Popis: 1-DMSO; 2-Cu-Fc; 3-Des-Fc

8.1.2.2 Komplex Al-Fc

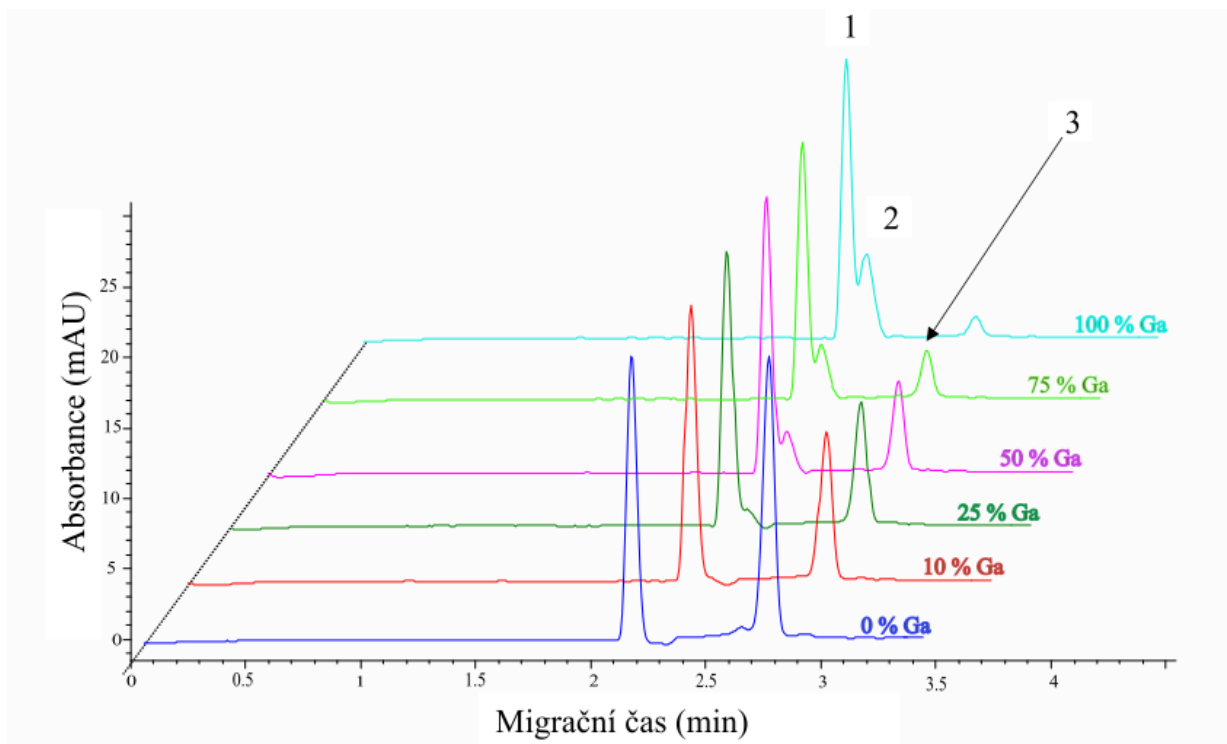
Z obr. 24 je opět potvrzena interakce des-Fc s Al^{3+} ve stechiometrickém poměru v rozmezí 0-100 % Al^{3+} .



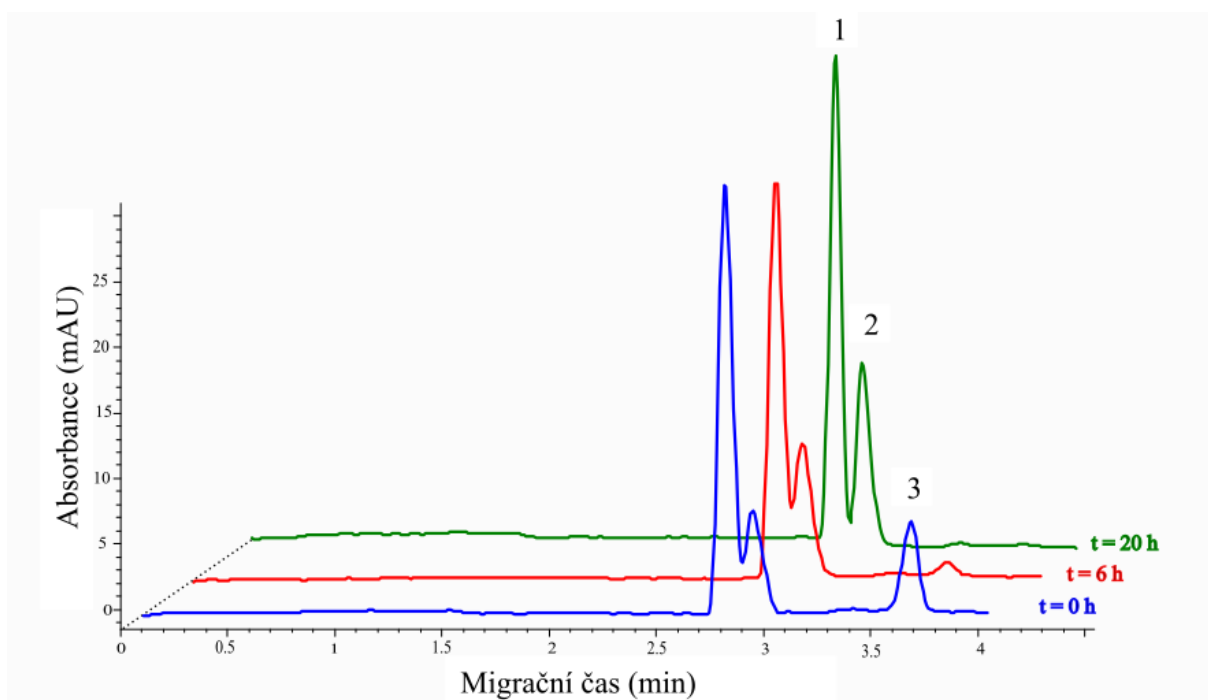
Obr. 24: Vznik komplexu Al-Fc v rozmezí od 0-100 % Al^{3+} . Popis: 1-DMSO; 2-Al-Fc; 3-Des-Fc

8.1.2.3 Komplex Ga-Fc

Na obr. 25 je znázorněn vznik komplexu des-Fc, tentokrát s Ga^{3+} , ale zde došlo k interakci ve stechiometrickém poměru až po určité době, což je dáno pomalejší kinetikou reakce, to je zřejmé z obr. 26. Ačkoliv není komplex Ga-Fc úplně odseparován od DMSO, nárůst jeho píků je se zvyšujícím množstvím Ga^{3+} zřetelný.



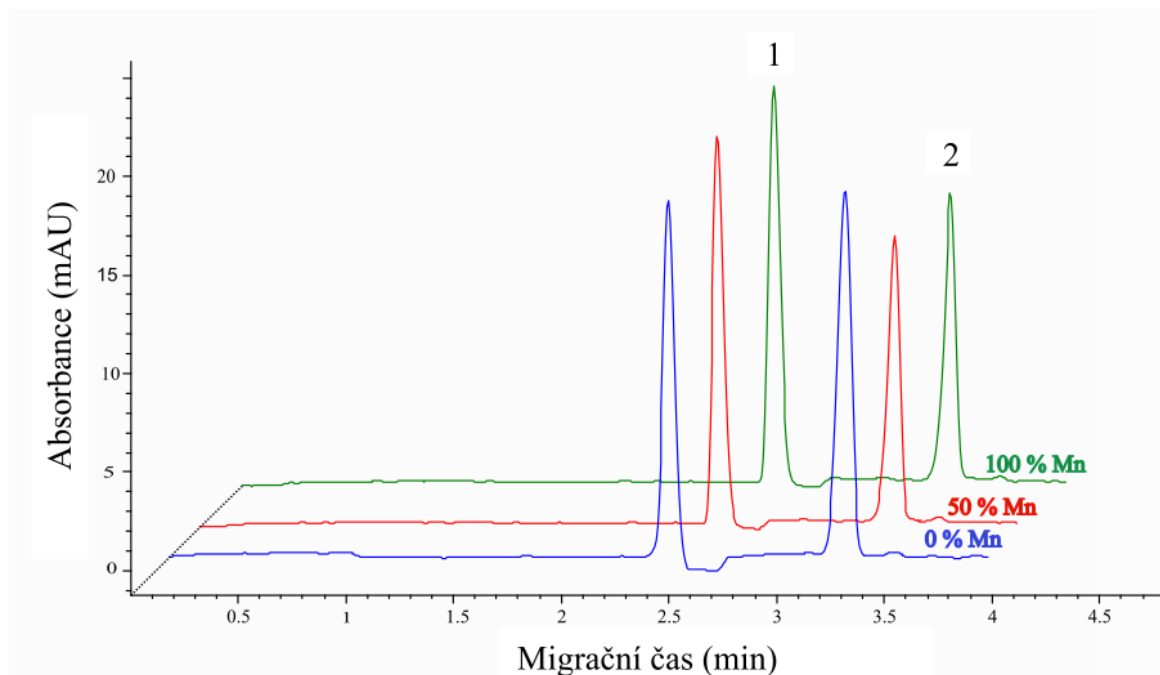
Obr. 25: Vznik komplexu Ga-Fc v rozmezí od 0-100 % Ga^{3+} . Popis: 1-DMSO; 2-Ga-Fc; 3-des-Fc



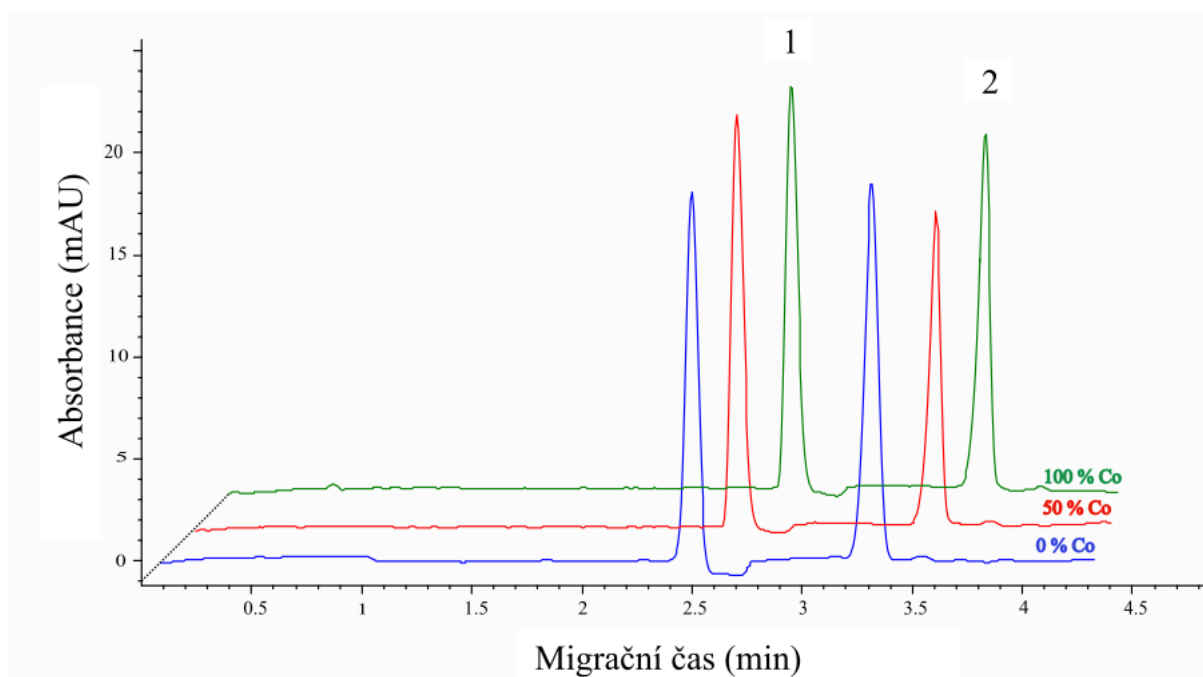
Obr. 26: Kinetika komplexu Ga-Fc (125 %) v rozmezí času od 0-20 h. Popis: 1-DMSO; 2-Ga-Fc; 3-Des-Fc

8.1.2.4 Studium vzniku komplexů kation-Fc (Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+})

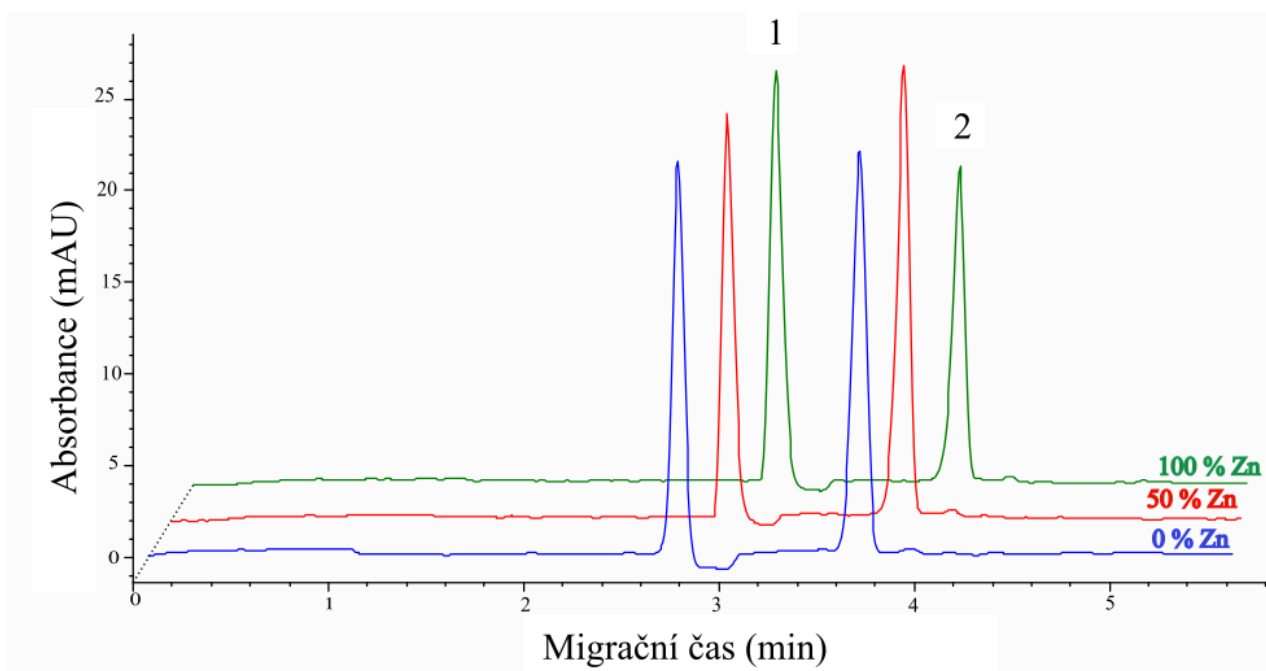
U zbylých kovů, nebyla pomocí CE-DAD interakce kation-Fc prokázána, jak lze vidět na obr. 27–30. Ačkoliv nebyl vznik komplexů prokázán, je možné, že úpravou reakčních podmínek (teplota, pH, koncentrace pufru) by k jejich vzniku došlo.



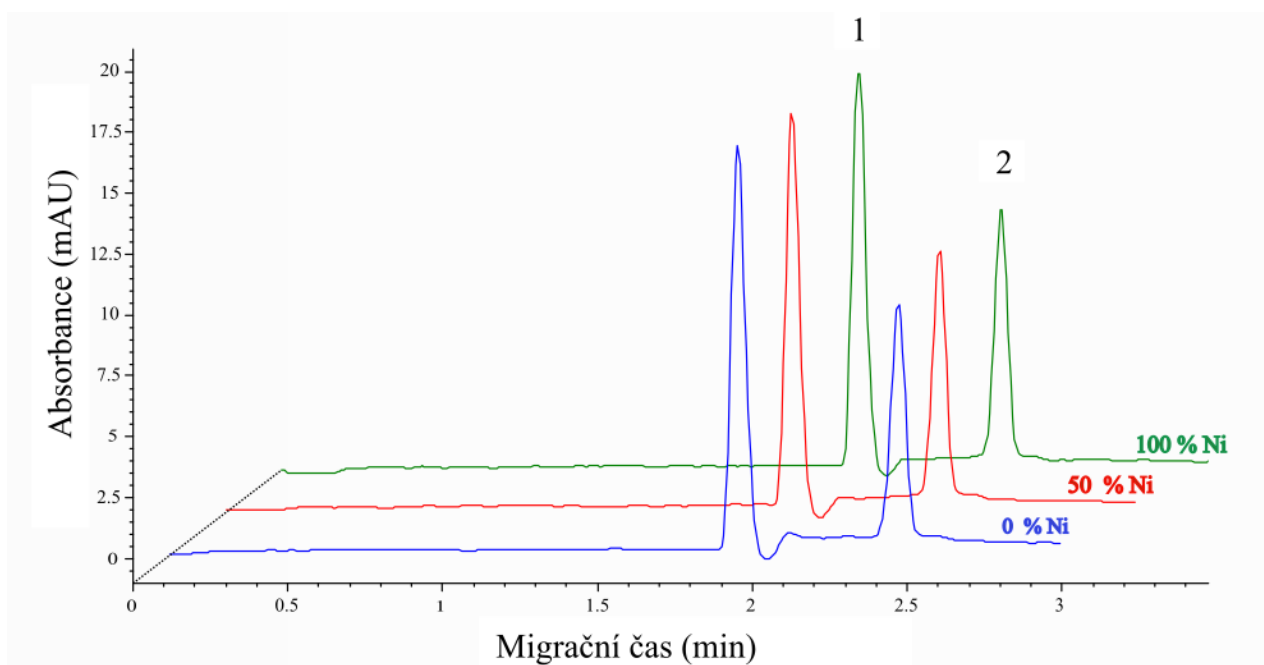
Obr. 27: Analýza des-Fc s přidavky Mn^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-DMSO; 2-Des-Fc



Obr. 28: Analýza des-Fc s přidavky Co^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-DMSO; 2-Des-Fc



Obr. 29: Analýza des-Fc s přidavky Zn^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-DMSO; 2-Des-Fc



Obr. 30: Analýza des-Fc s přidavky Ni^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-DMSO; 2-Des-Fc

8.2 Triacetylfusarinin C

Jako druhá byla optimalizována a vyvíjena metoda pro stanovení des-TafC a TafC. Následně se po optimalizaci postupovalo stejně jako u des-Fc.

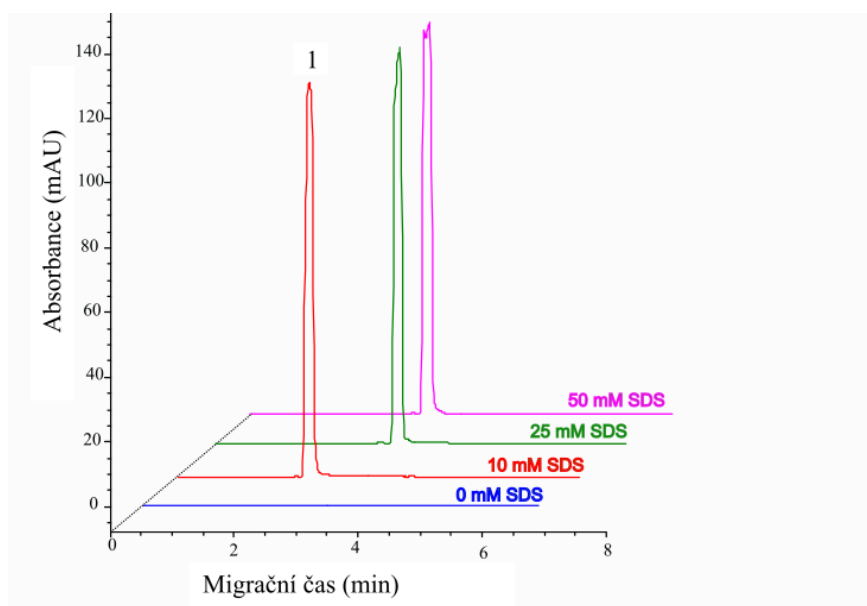
- Optimalizace podmínek pro separaci směsi des-TafC a Fe-TafC
- Podmínky pro měření CE-DAD
- Výsledky daných analýz CE-DAD

8.2.1 Optimalizace podmínek pro separaci des-TafC a Fe-TafC

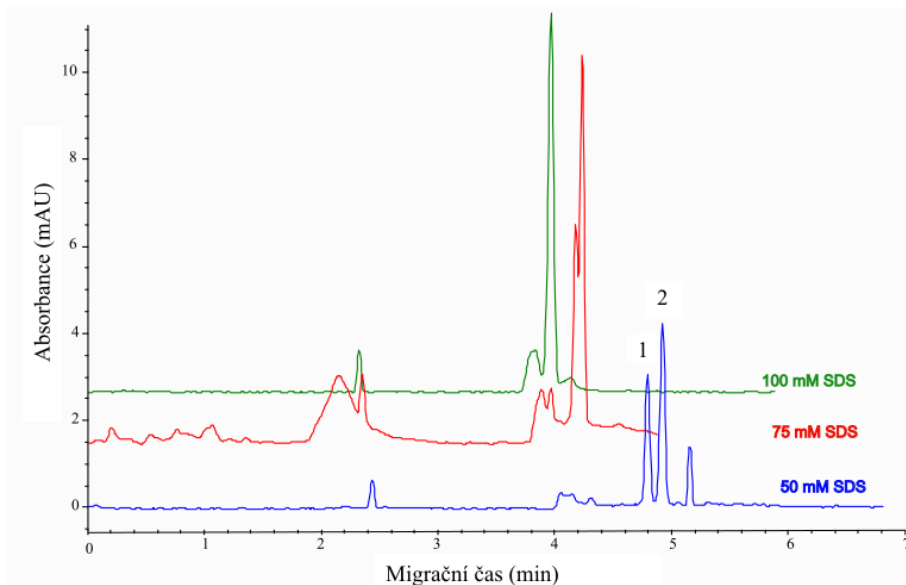
Byla optimalizována koncentrace SDS, procentuální obsah MeOH v základním elektrolytu, napětí a koncentrace pufru.

8.2.1.1 Optimalizace koncentrace SDS

Pro analýzu des-TafC a jeho komplexů s kovy byl vybrán $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$ o $\text{pH} = 2,5$ nejprve o koncentraci 55 mM. Koncentrace SDS v separačním pufru byla testována v rozmezí 0-50 mM. Protože u 50 mM SDS dochází k částečné separaci, tak byl poté sledován vliv MeOH. Vzhledem k tomu, že s přidavkem MeOH dochází k prodlužování doby analýzy, byla dále optimalizována koncentrace SDS spolu s obsahem MeOH.



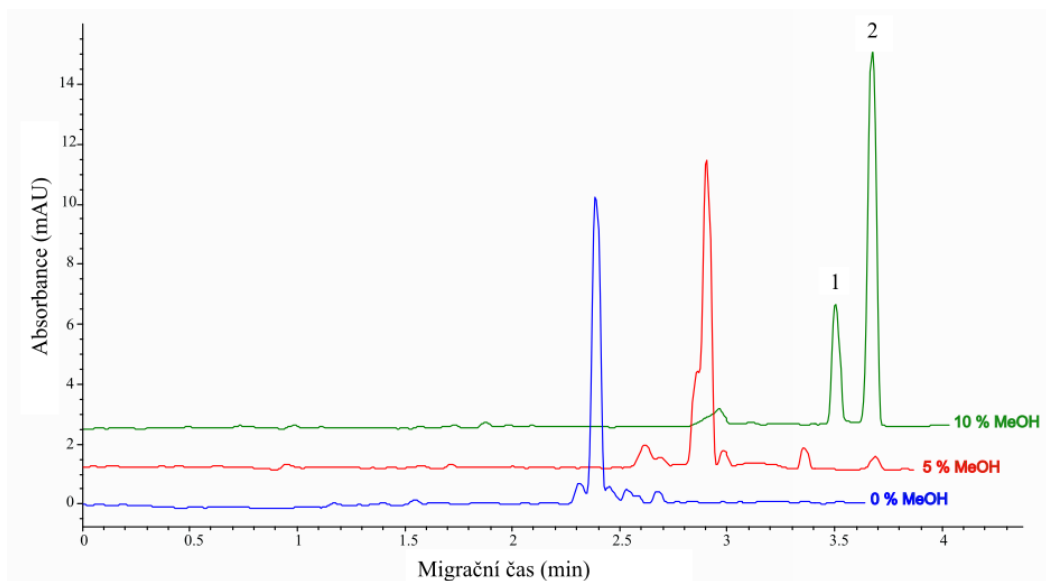
Obr. 31: Optimalizace koncentrace SDS; Byla použita 55 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$ o $\text{pH} = 2,5$; koncentrace SDS byla v rozmezí 0-50 mM. Popis: 1-Fe-TafC + Des-TafC



Obr. 32: Optimalizace koncentrace SDS s přidavkem 5 % MeOH; Byla použita 55 mM $H_3PO_4/NaOH$ o $pH=2,5$; koncentrace SDS byla v rozmezí 50-100 mM. Popis: 1-Fe-TafC; 2-des TafC

8.2.1.2 Optimalizace organické fáze v BGE

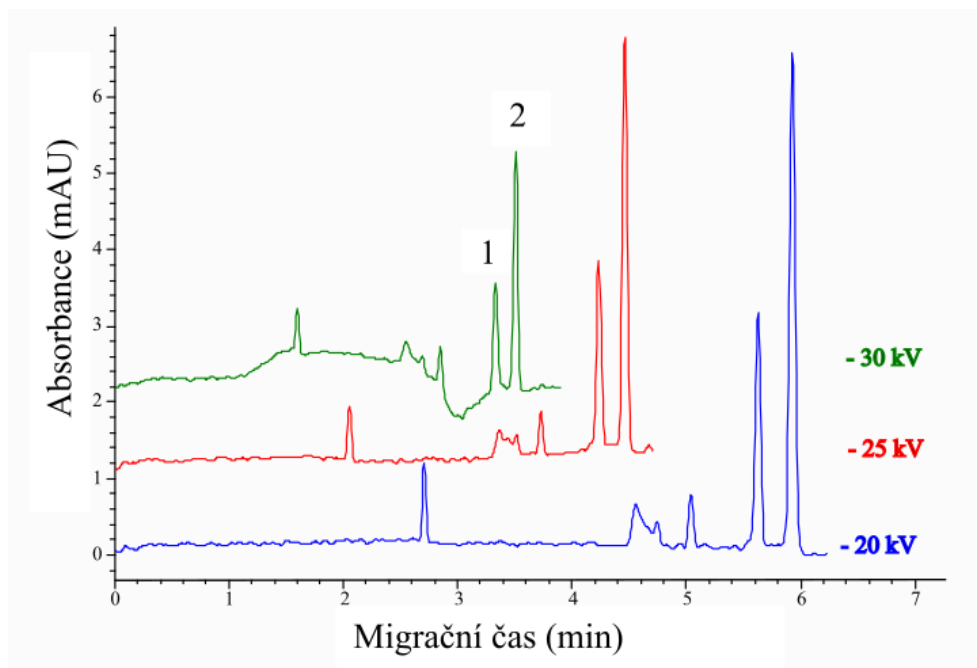
První volbou organického modifikátoru byl MeOH, přičemž byl testován jeho obsah v základním elektrolytu v rozmezí 0-10 % (v/v). Z obr. 33 lze vidět, že se zvyšujícím se obsahem MeOH v BGE docházelo ke zvětšujícímu rozlišení, ale také prodlužování doby analýzy. Na základě naměřených dat z obr. 33 je zřejmé, že optimální je přidavek 10 % MeOH.



Obr. 33: Optimalizace MeOH v rozmezí 0-10 % z celkového objemu BGE; Byla použita 55mM $H_3PO_4/NaOH$ o $pH = 2,5$; koncentrace SDS byla 100 mM. Popis: 1-Fe-TafC; 2-Des-TafC

8.2.1.3 Optimalizace napětí

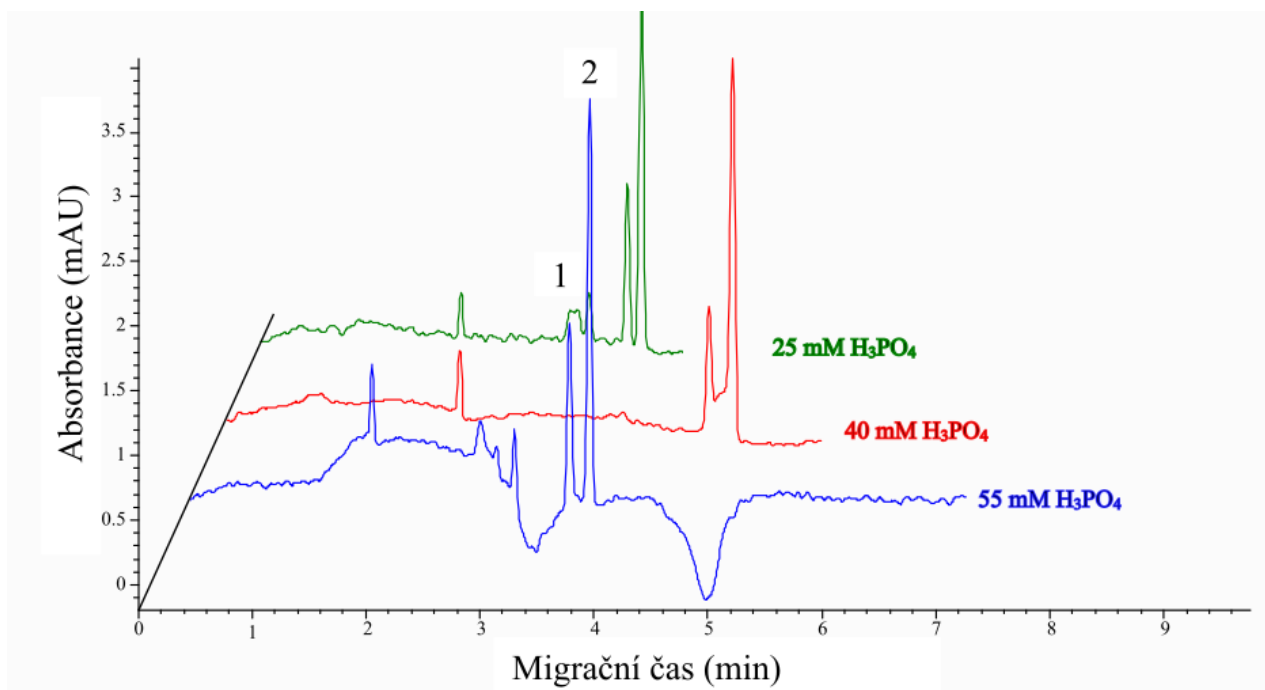
Napětí bylo optimalizováno v rozmezí od -20 do -30 kV. Z obr. 34 lze vidět, že při -30 kV byla doba analýzy oproti -20 kV zkrácena téměř o polovinu, ale také došlo ke zvýšení pozadí, proto musela být snížena i koncentrace použitého pufru.



Obr. 34: Optimalizace napětí. Byla použita 55mM $H_3PO_4/NaOH$ o $pH = 2,5$; koncentrace SDS byla 100 mM s přídavkem 10 % MeOH. Popis: 1-Fe-TafC; 2-Des-TafC

8.2.1.4 Optimalizace koncentrace H_3PO_4

Byly testovány 3 koncentrace H_3PO_4 v základním elektrolytu: 55, 40 a 25 mM. Doba analýzy je u všech koncentrací H_3PO_4 podobná, ale s postupným snižováním koncentrace se snížil i elektrický proud během měření, což vedlo k reprodukovatelnějším analýzám a rovněž snížení odezvy základní linie. Proto byla vybrána koncentrace 25 mM $H_3PO_4/NaOH$, která také byly vybrána z důvodu nejlepšího rozlišení.



Obr. 35: Optimalizace koncentrace $H_3PO_4/NaOH$ o $pH = 2,5$ v rozmezí koncentrací 25-55 mM, koncentrace SDS byla 100 mM, obsah MeOH byl 10 % a napětí bylo -30 kV. Popis: 1-Fe-TafC; 2-des-TafC

8.2.1.5 Shrnutí optimalizace

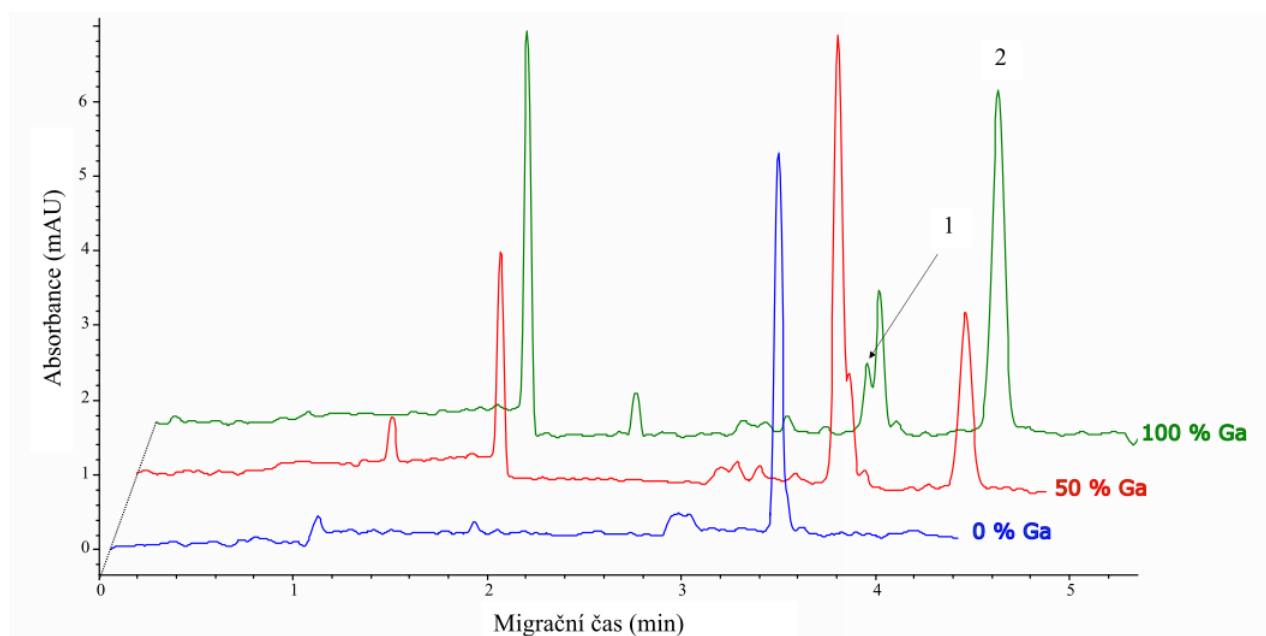
- 25 mM $H_3PO_4/NaOH$ o $pH = 2,5$
- Koncentrace SDS = 100 mM
- Napětí = - 30 kV
- Dávkování = 100 mbar/5s
- Detekce = 200 nm
- Celková délka kapiláry = 48,5 cm
- Efektivní délka kapiláry = 40,5

8.2.2 Tvorba komplexů s des-TafC a jejich analýza pomocí CE-DAD

Výsledky byly opět vyjádřeny pomocí grafického znázornění, kdy u 2 kovů lze vidět, že došlo ke vzniku komplexu kation-TafC (Ga, Al) a je prokázána separace tohoto komplexu od des-TafC, přičemž se zvyšující se koncentrací kovového iontů došlo i ke postupnému snižování signálu des-TafC.

8.2.2.1 Komplex Ga-TafC

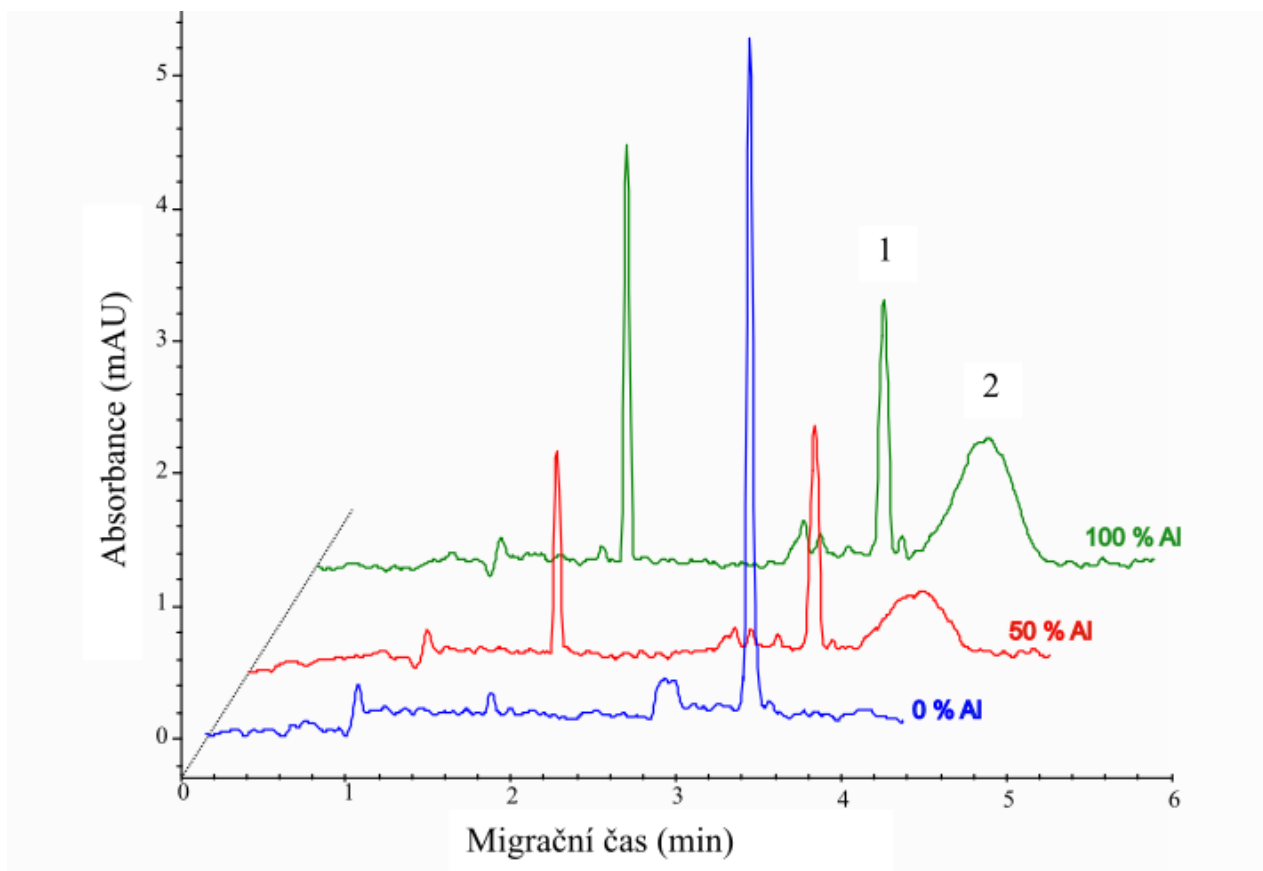
Z grafického znázornění jde vidět, že došlo ke vzniku komplexu Ga-TafC v rozmezí 0-100 % Ga^{3+} , a došlo i k separaci od ubývajícího des-TafC.



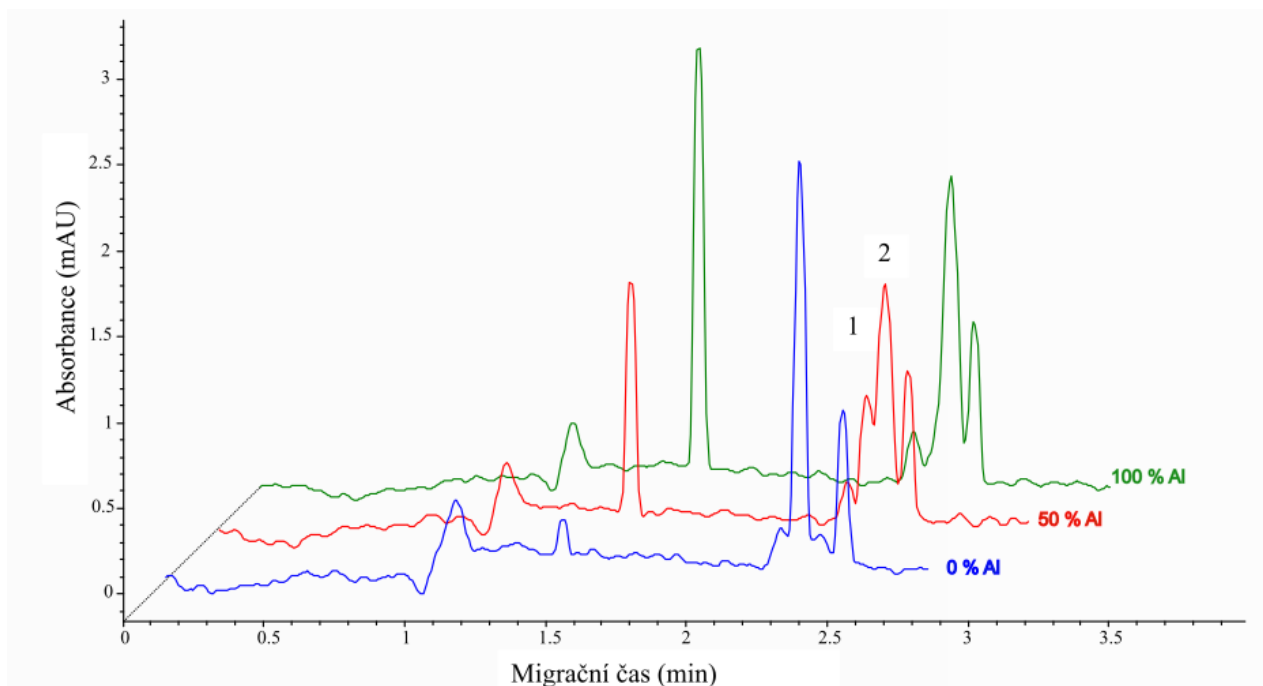
Obr. 36: Vznik komplexu Ga-TafC v rozmezí od 0-100 % Ga^{3+} . Popis: 1-Des-Tafc; 2-Ga-TafC

8.2.2.2 Komplex Al-TafC

Z obr. 37 jde vidět, že také došlo k interakci a vzniku komplexu Al-TafC v rozmezí 0-100 % Al^{3+} , ale pík vzniklého komplexu byl značně rozmytý. Podezřelý byl rovněž velký signál des-TafC i po přidavku 100 % ekvimolárního množství Al^{3+} (předpokládaná stechiometrie je zde 1:1). Proto bylo dále testováno, zda nebude vhodnější se vyhnout MeOH v základním elektrolytu. Bylo zjištěno podle obr. 38, že tento předpoklad byl oprávněný. Ačkoliv nejsou od sebe obě formy dokonale odseparovány, vznik komplexu je zde zřetelný.



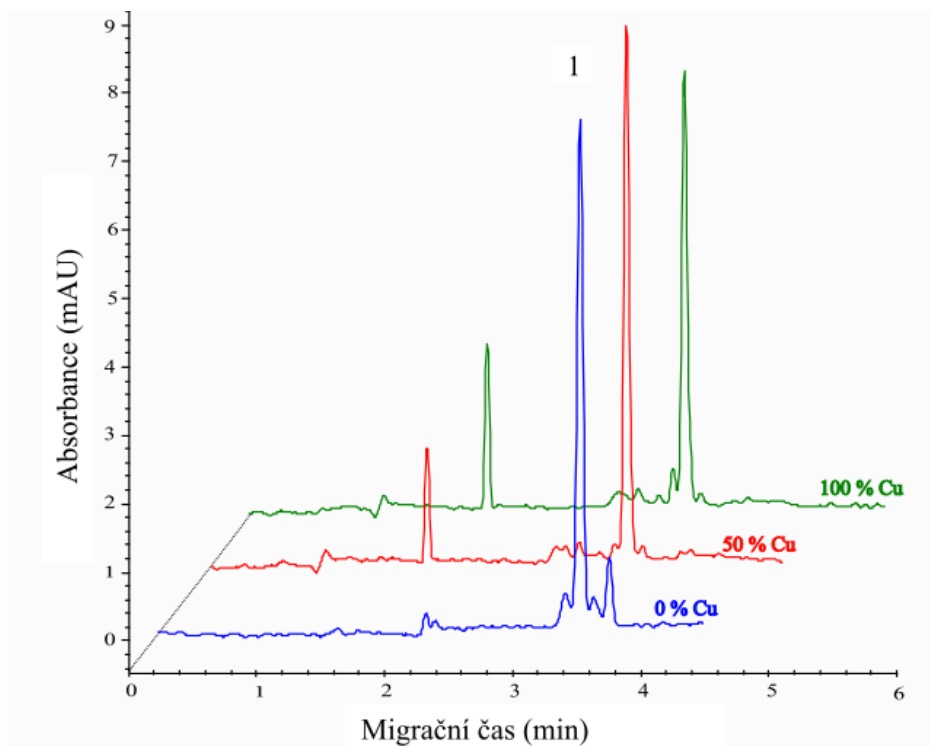
Obr. 37: Vznik komplexu Al-TafC v rozmezí od 0-100 % Al^{3+} . Popis: 1-Des-TafC; 2-Al-TafC



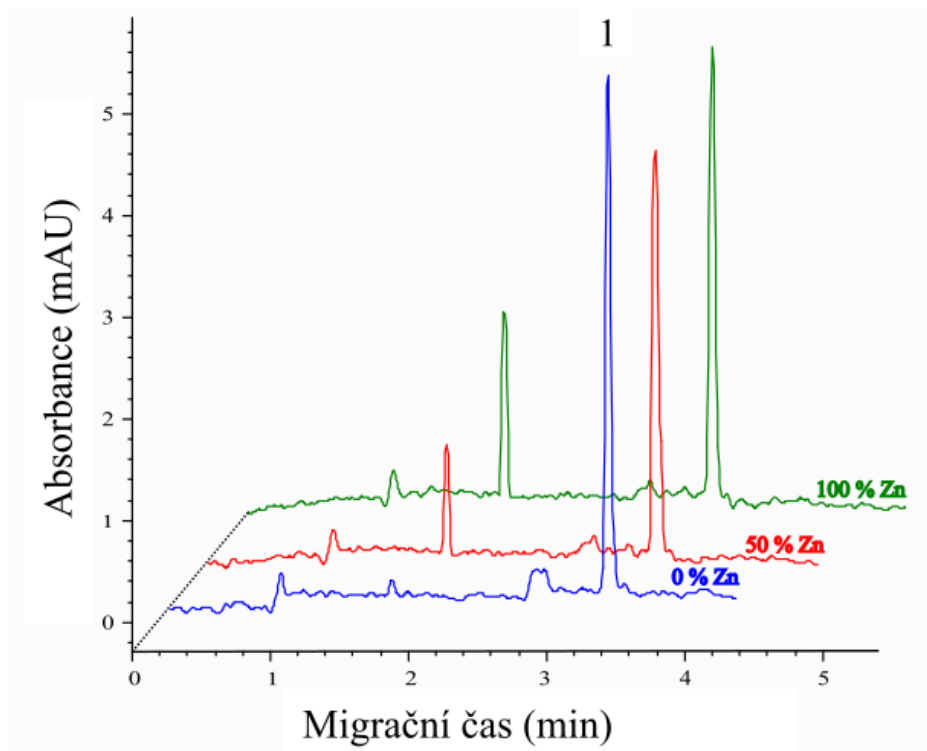
Obr. 38: Analýza Al-TafC po odstranění MeOH v pufru. Al-TafC v rozmezí od 0-100 % Al³⁺. Popis: 1-Des-TafC; 2-Al-TafC

8.2.2.3 Studium vzniku komplexů kation-TafC (Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Co²⁺)

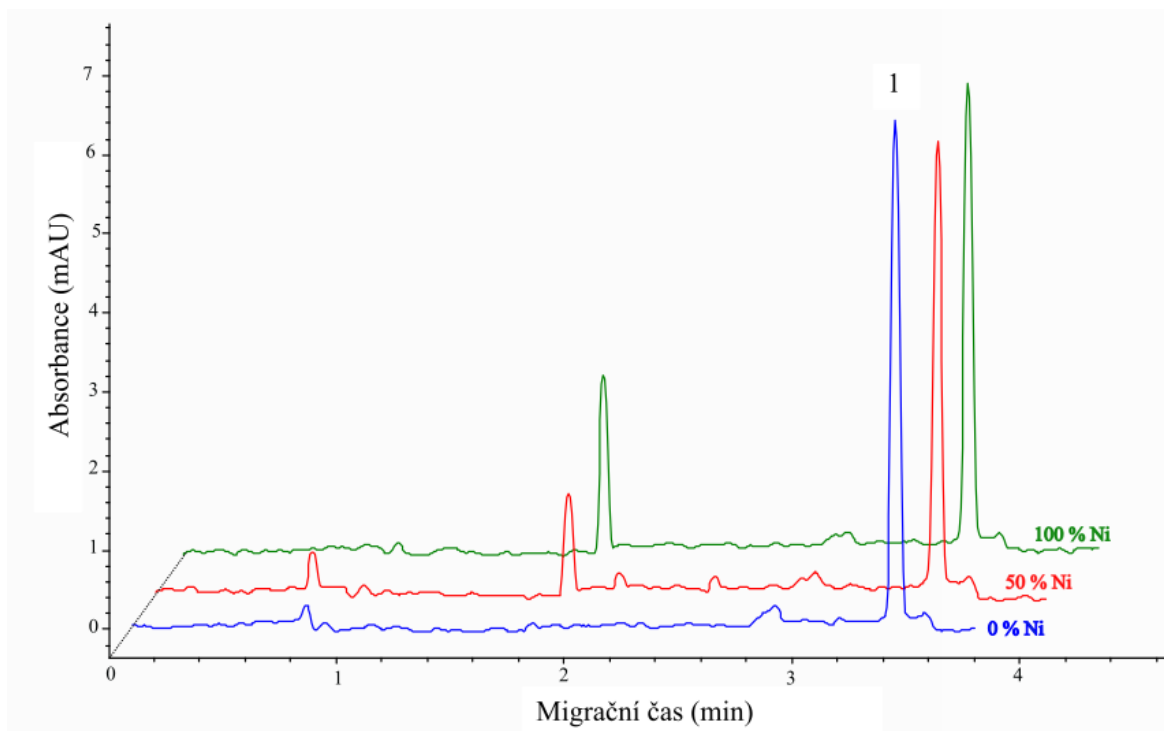
Ačkoliv došlo s přidavkem určitých kovových iontů (Mn²⁺ a Co²⁺) ke zvýšení signálu des-TafC, nebyl pozorován nárůst dalšího píku odpovídající vzniklému komplexu. Proto byly upraveny separační podmínky (50 mM SDS a 20 % MeOH) tak, aby došlo ke zvětšení rozlišení mezi oběma formami (podezření na nedostatečnou separaci). Tento předpoklad však nebyl potvrzen a nebyl pozorován žádný pík. Opačný efekt měly přídavky Zn²⁺ a Ni²⁺, kdy nedocházelo k nárůstu signálu, ale k jeho úbytku. V žádném z těchto případů tedy nebyl pomocí CE-DAD prokázán vznik komplexů kation-TafC, což je znázorněno na obr. 39-43. Ačkoliv nebyl vznik komplexů prokázán, je možné, že úpravou reakčních podmínek by k jejich vzniku došlo, jak je zmíněno v kapitole 8.1.2.4.



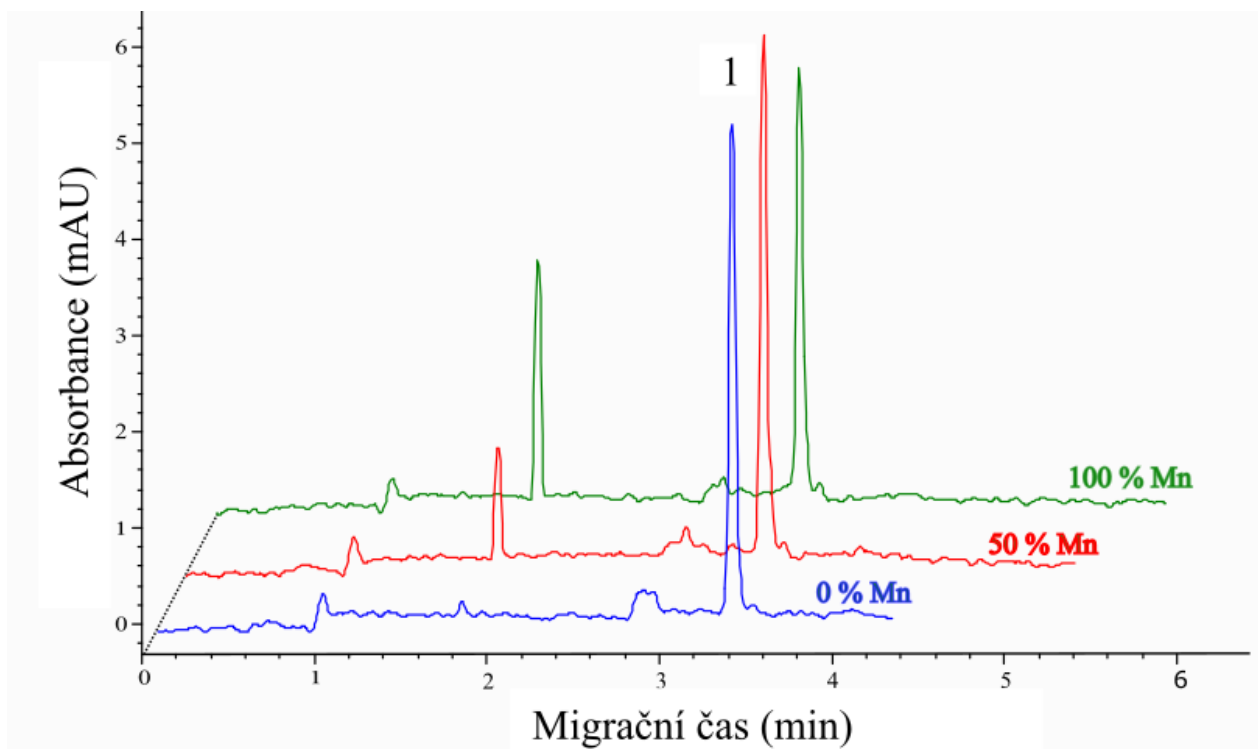
Obr. 39: Analýza des-TafC s přidavky Cu^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-Des-TafC



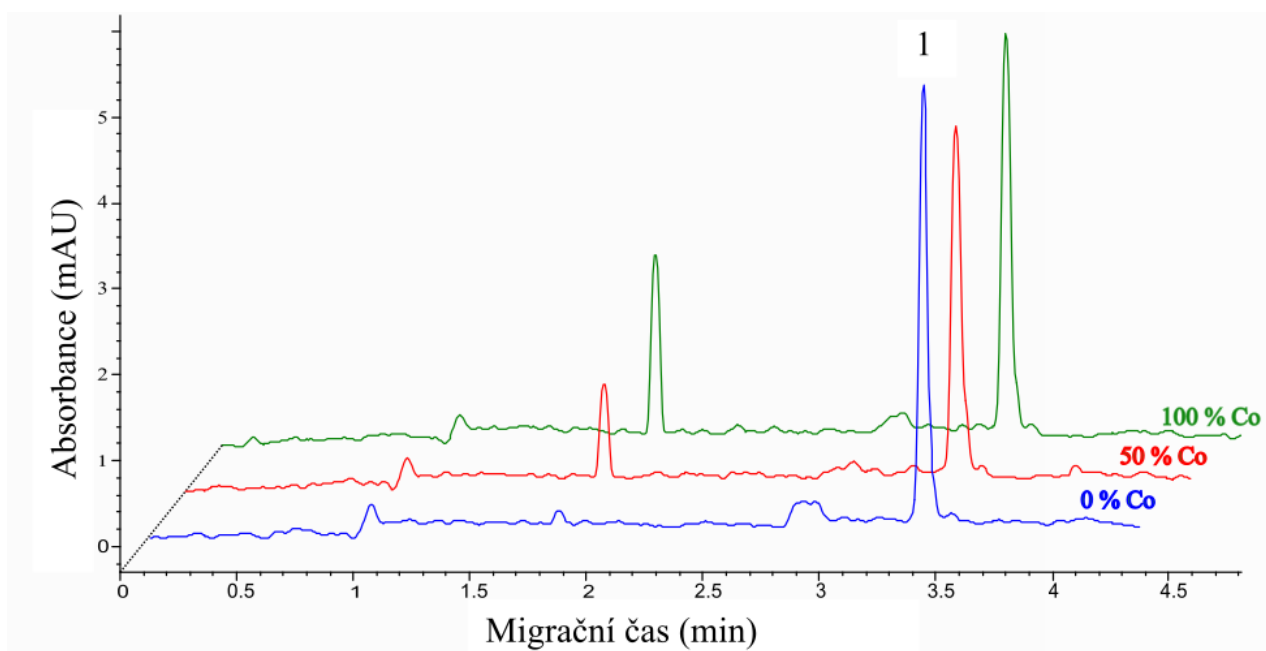
Obr. 40: Analýza des-TafC s přidavky Zn^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-Des-TafC



Obr. 41: Analýza des-TafC s přidavky Ni^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-Des-TafC



Obr. 42: Analýza des-TafC s přidavky Mn^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-Des-TafC



Obr. 43: Analýza des-TafC s přidavky Co^{2+} rozmezí od 0-100 %. Popis: 1-Des-TafC

8.3 Potvrzení tvorby komplexů metaloforů s kovy pomocí FIA-HRMS

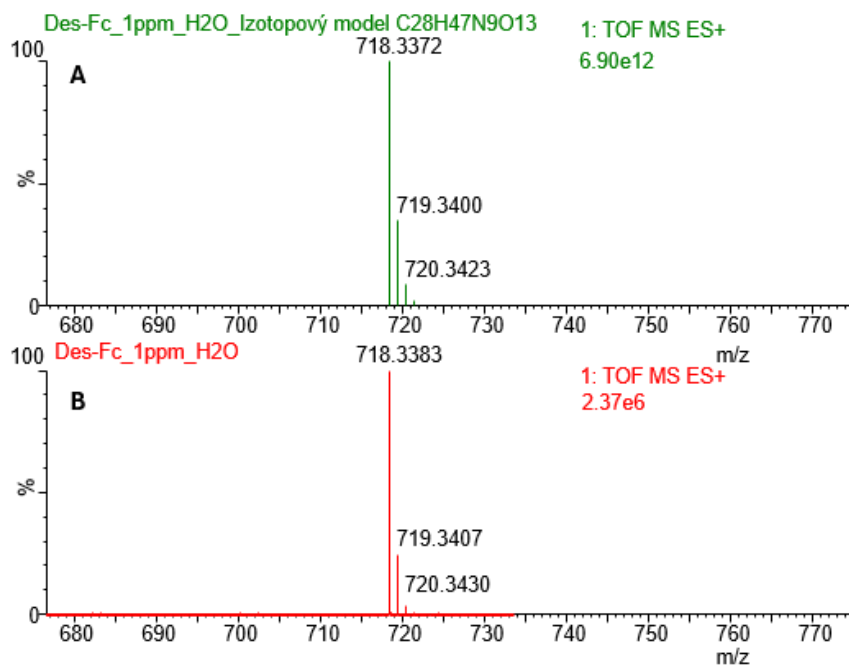
Výsledky jsou vyjádřeny pomocí grafického znázornění pouze u těch kovů, kde byl prokázán vznik komplexu pomocí CE-DAD. Vzorky na měření byly připraveny stejně jako pro analýzu CE-DAD s tím rozdílem, že vše bylo ředěno v 15% ACN a výsledná koncentrace des-Fc a des-TafC byla 1 mg/l.

Tab. 2 Podmínky pro přístroj SYNAPT G2-S v kladném módu

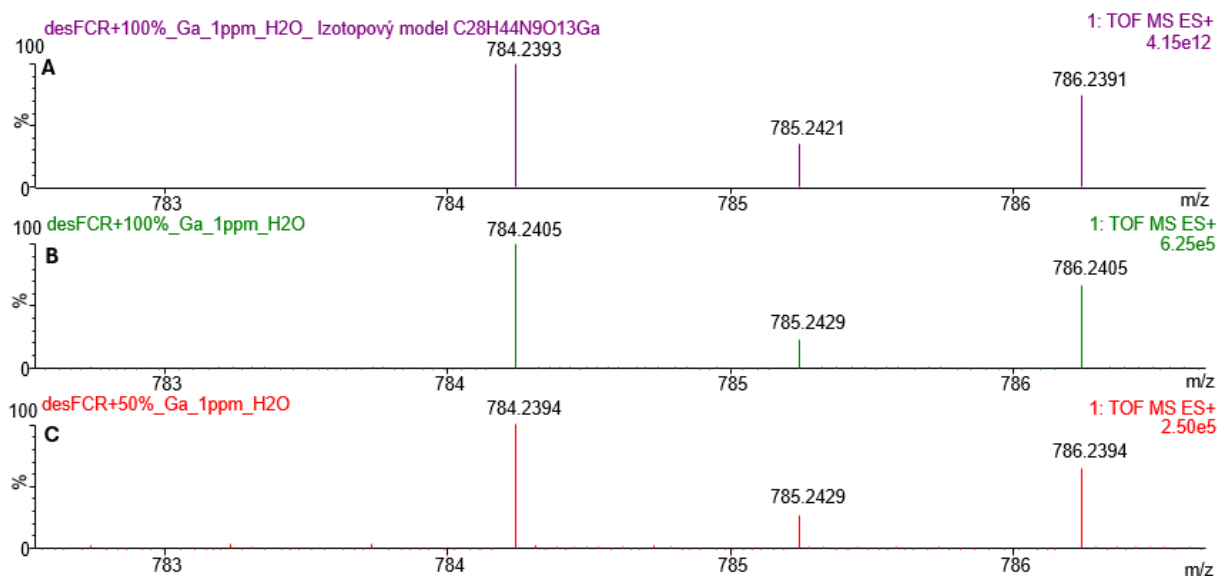
| Podmínky | hodnoty |
|------------------------------------|----------------|
| Napětí na sprejovací kapiláře [kV] | 3 |
| Teplota zdroje [° C] | 120 |
| Napětí na kónusu [V] | 40 |
| Offset zdroje [V] | 80 |
| Desolvatační teplota [° C] | 220 |
| Průtok plynu kónusem [l/h] | 151 |
| Průtok desolvatačního plynu [l/h] | 500 |
| Rychlost putující vlny [m/s] | 249 |
| Výška vlny [V] | 0,5 |

8.3.1 Potvrzení komplexů u des-Fc

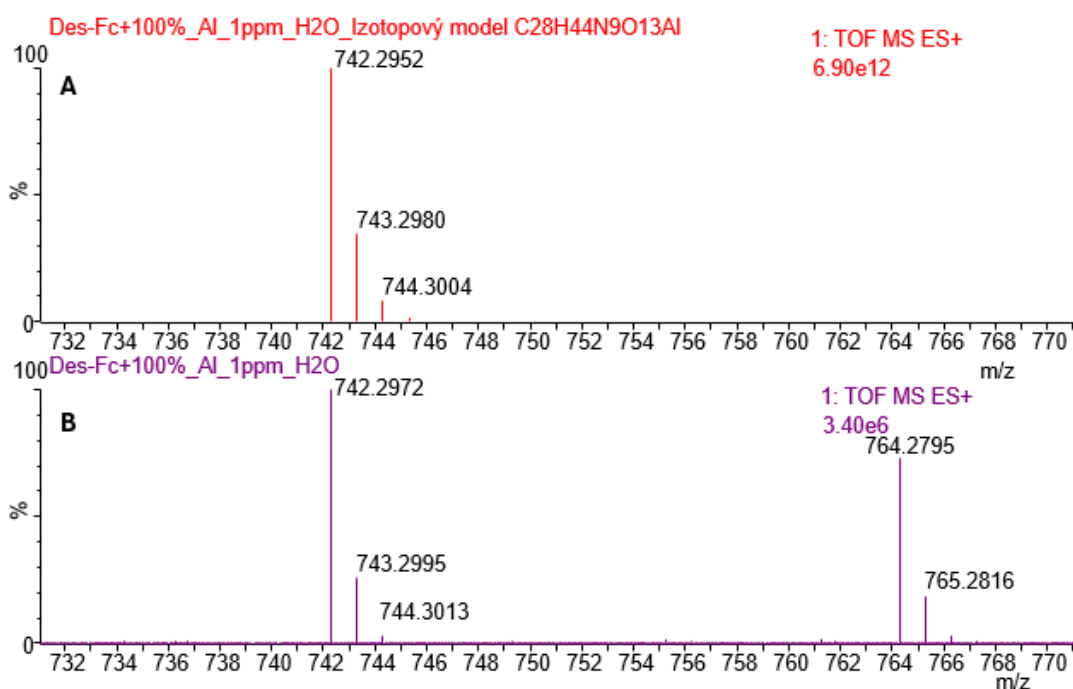
Pomocí HRMS ve spojení s FIA byly měřeny všechny připravené roztoky kovů (iontů), které byly ve směsi s des-Fc. Byl také změřen samotný des-Fc o koncentraci 1 mg/l. U Ga-Fc a Al-Fc došlo k potvrzení vzniku komplexu.



Obr. 44: Porovnání Analýzy des-Fc o koncentraci 1 ppm (B) s izotopovým modelem des-Fc (A), který měl hmoty 718,3372; 719,3400 a 720,3423. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 2 ppm.

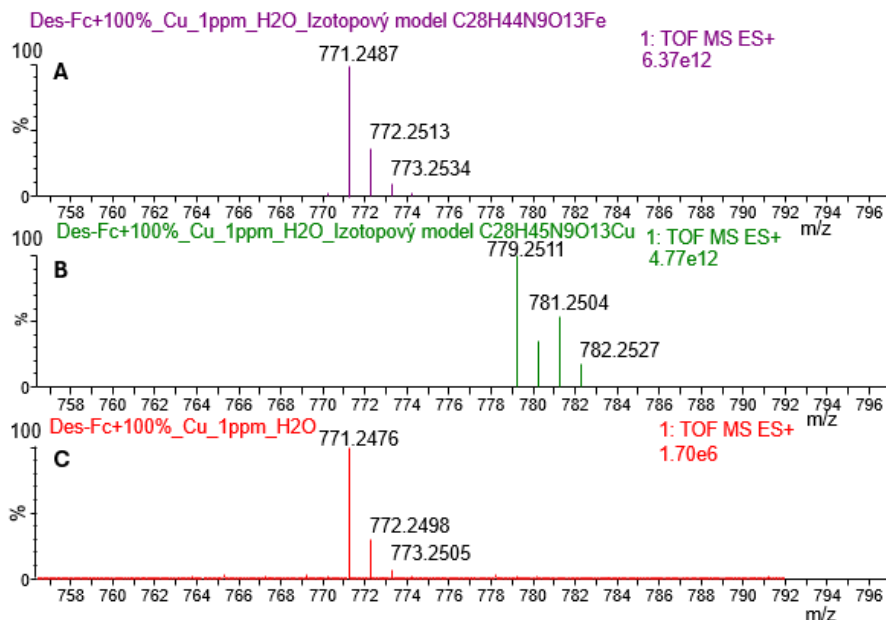


Obr. 45: Analýza des-Fc s přidavky Ga^{3+} 50 a 100 %. U Přídavku se 100 % Ga^{3+} (B) lze pozorovat, že intenzita je oproti přidavku s 50 % (C) přibližně 2x větší, což potvrzuje vznik komplexu Ga-Fc. Dále byly oba přidavky porovnány s izotopovým modelem Ga-Fc (A), který měl hmoty 784,2393; 785,2421 a 786,2391 m/z. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 2 ppm.



Obr. 46: Analýza des-Fc s přidavkem Al^{3+} 100 % (B). Přídavek byl porovnán s modelovým izotopovým profilem Al-Fc (A), který měl hmoty 742,2952; 743,2980 a 744,3004 m/z. Dále lze sledovat adukty se sodíkem u hmot 764, 2795 a 765,2816 m/z. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 3 ppm.

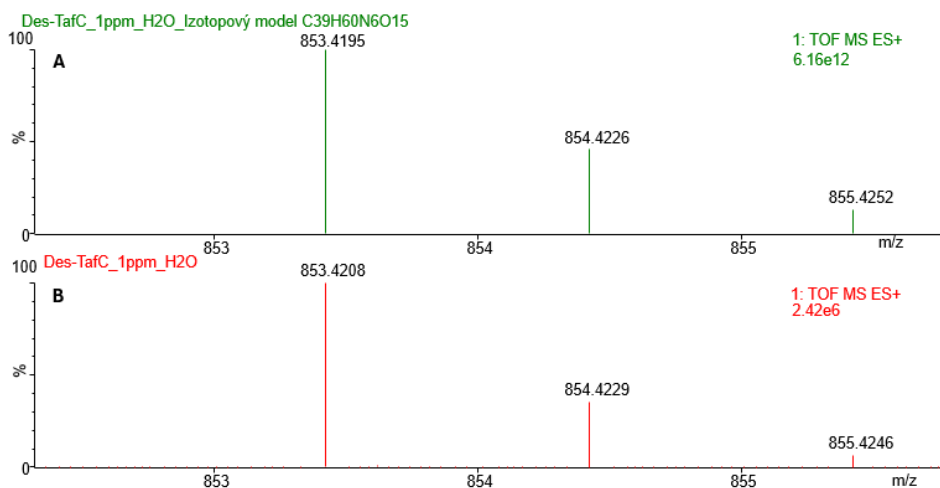
Ačkoliv na CE-DAD byl potvrzen vznik Cu-Fc, tak pomocí FIA-HRMS byly výsledky neprůkazné. Mohlo to být způsobeno kontaminací železem, která by se dala odstranit pomocí 10 % HNO₃ ve které, by se nechaly všechny materiály (kádinky, špičky a vialky) naložit. Díky tomuto postupu by mohlo dojít k zabránění kontaminace Fe³⁺, se kterým má des-Fc velkou afinitu a došlo k pravděpodobnému vytlačení iontu Cu²⁺.



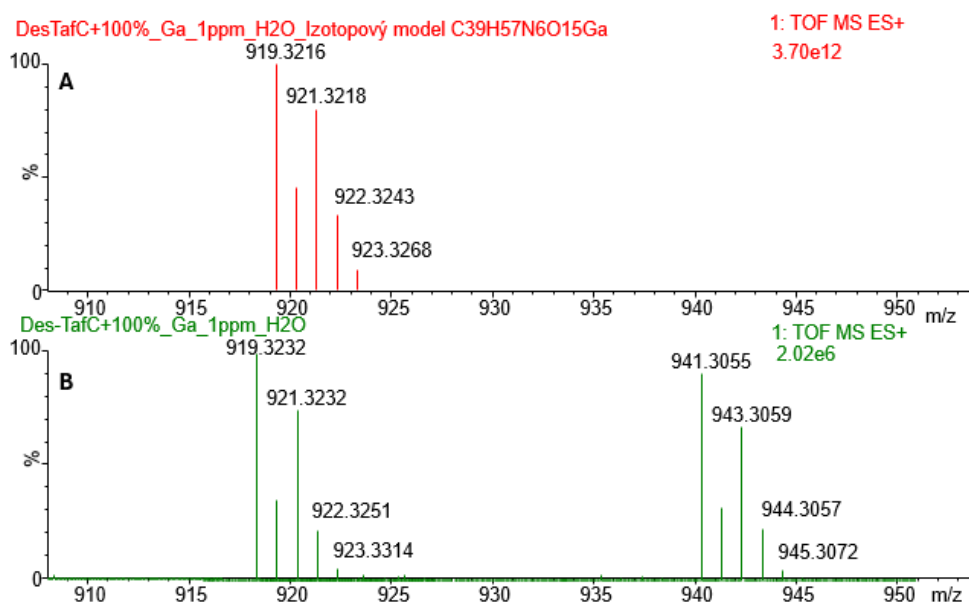
Obr. 47: Analýza des-Fc s přidavkem Cu²⁺ 100 % (C). Přídavek byl porovnán s modelovým izotopovým profilem Cu-Fc (B), který měl hmoty 779,2511; 781,2504 a 782,2527. Profily hmot se vůbec neshodují, proto byla analýza porovnána s modelovým izotopovým profilem Fe-Fc (A), který měl hmoty 771,2487; 772,2513 a 773,2534 m/z. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 2 ppm.

8.3.2 Potvrzení komplexů u des-TafC

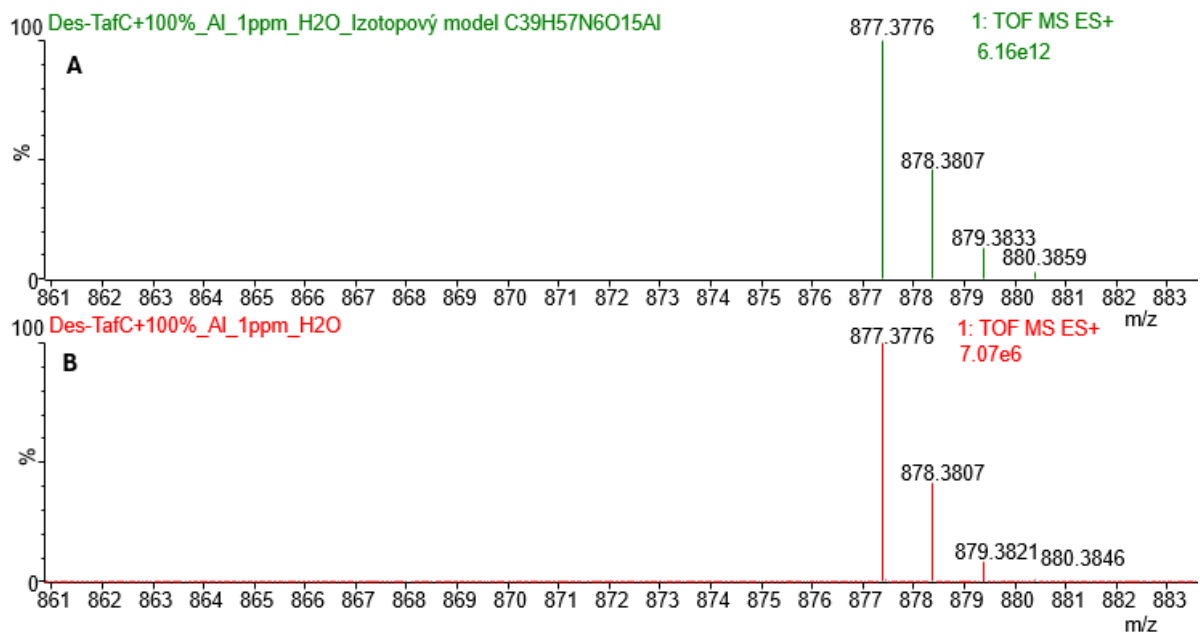
Pomocí HRMS ve spojení s FIA byly měřeny všechny připravené roztoky kovů (iontů), které byly ve směsi s des-TafC. První byl změřen samotný des-TafC o koncentraci 1 mg/l. U Ga-TafC a Al-TafC došlo k potvrzení vzniku komplexu.



Obr. 48: Porovnání Analýzy des-TafC o koncentraci 1 ppm (B) s izotopovým modelem des-TafC (A), který měl hmoty 853,4195; 854,4226 a 855,4252 m/z. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 2 ppm.



Obr. 49: Analýza des-TafC s přidavky Ga^{3+} 100 % (B). Přídavek byl porovnán s izotopovým modelem Ga-TafC (A), který měl hmoty 919,3216; 921,3218; 922,3243 a 923,3268 m/z. Dále lze sledovat adukty se sodíkem o hmotě 941,3055; 943,3056; 944,3057 a 945,3072 m/z. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 2 ppm.



Obr. 50: Analýza des-TafC s přidavky Al^{3+} 100 % (B). Přídavek byl porovnán s izotopovým modelem Al-TafC (A), který měl hmoty 877, 3776; 878,3807; 879,3833 a 880,3859 m/z. Odchylka mezi naměřenými signály a teoretickou hodnotou (signály z izotopického modelu) je menší než 1 ppm.

8.4 Potvrzení tvorby komplexů metaloforů s kovy pomocí HPLC-ICP-MS

8.4.1 Vývoj HPLC metody

Cílem bylo odseparování volných iontů od jejich komplexů s metalofory. Byla provedena optimalizace výběru organické mobilní fáze (ACN, MeOH) a programu gradientu, přičemž ACN se později ukázal být nevhodný kvůli nestabilitě plazmatu a jeho zhášení. Anorganickou mobilní fází byla deionizovaná voda. Optimalizace byla provedena za použití standardů Fe-Fc a Fe-TafC o koncentracích 10 mg/l. Ukázka separace obou metaloforů za finálních podmínek je na obr. 51. Byly použity stejné vzorky jako pro FIA-HRMS.

Tab. 3 Parametry pro HPLC-DAD

| Parametry | hodnoty |
|----------------------|---------|
| Průtok [ml/min] | 0,200 |
| Teplota [° C] | 25 |
| Vlnová délka [nm] | 422 |
| Dávkovaný objem [μl] | 3 |

Tab. 4 Složení m.f.

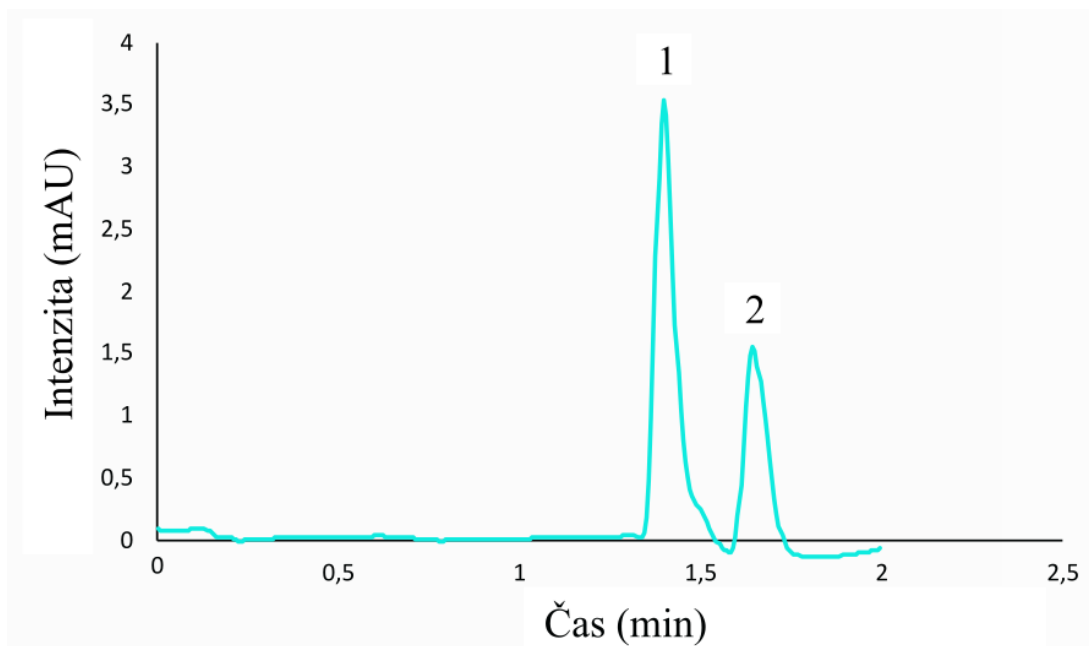
| Označení m.f. | Složení rozpouštědla |
|---------------|----------------------|
| A | 100 % voda |
| B | 100 % MeOH |

Tab. 5 Program rozpouštědel

| Program | Čas [min] | A [%] | B [%] | Průtok [ml/min] |
|---------|-----------|-------|-------|-----------------|
| 1 | 0,50 | 100 | 0 | 0,200 |
| 2 | 0,60 | 50 | 50 | 0,200 |
| 3 | 1 | 50 | 50 | 0,200 |
| 4 | 1,10 | 100 | 0 | 0,200 |
| 5 | 2 | 100 | 0 | 0,200 |

Tab. 6 Parametry pro ICP-MS

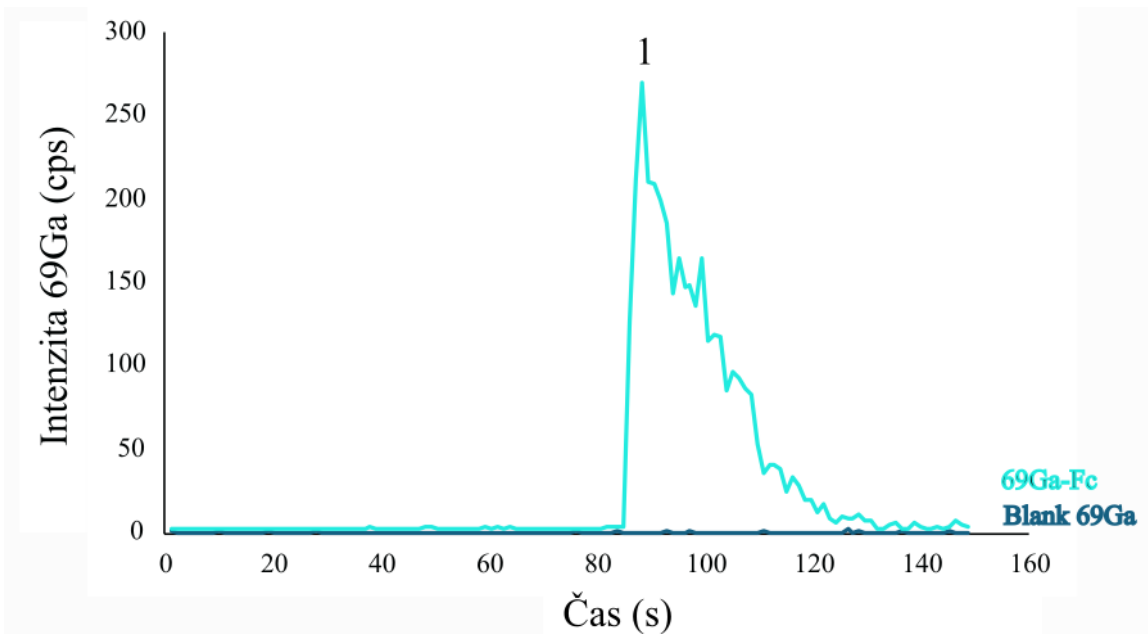
| Parametry | Hodnoty |
|-------------------------------|---|
| Příkon generátoru [W] | 1550 |
| Vnější plazmový plyn [l/min] | 1 |
| Střední plazmový plyn [l/min] | 0 |
| Nosný plyn [l/min] | 3 |
| Pomocný plyn [l/min] | 0 |
| Monitorované izotopy | ^{27}Al , ^{45}Sc , ^{54}Fe , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{69}Ga , ^{72}Ge |



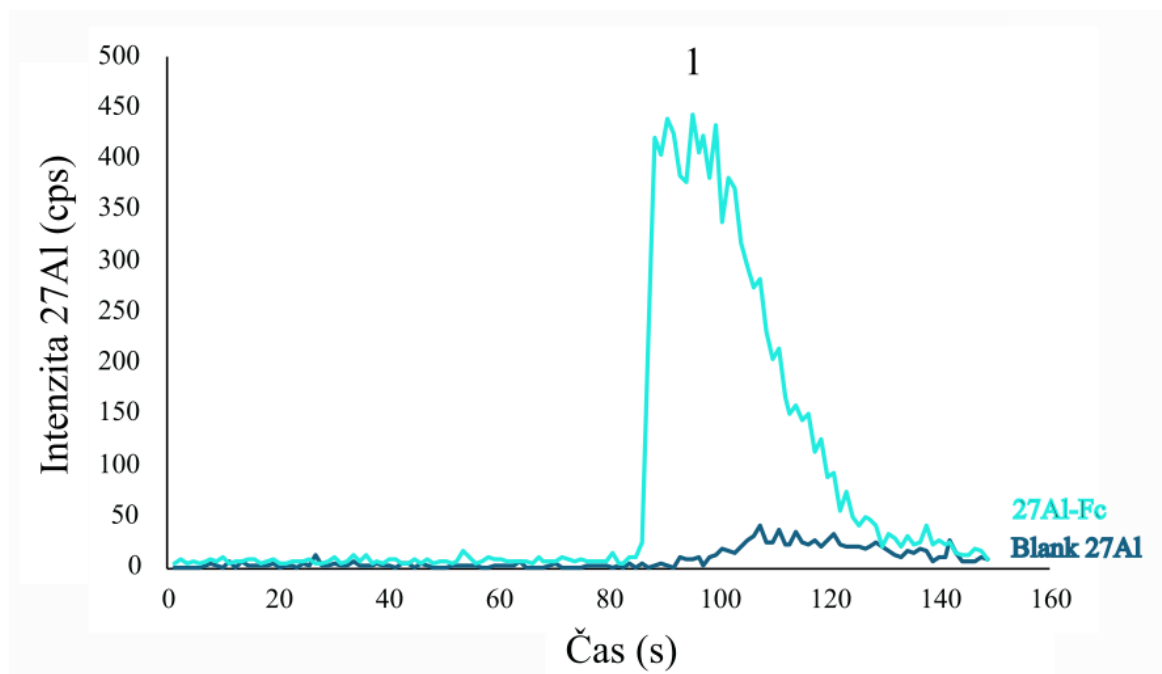
Obr. 51: Separace Fe-Fc a Fe-TafC za finálních podmínek na HPLC-DAD. Popis 1–Fe-Fc; 2-Fe-TafC

8.4.2 Potvrzení komplexů u des-Fc

Pomocí HPLC-ICP-MS byl u des-Fc potvrzen vznik komplexu pouze se dvěma ionty. Ukázka jejich analýz je na obr. 52 a 53.



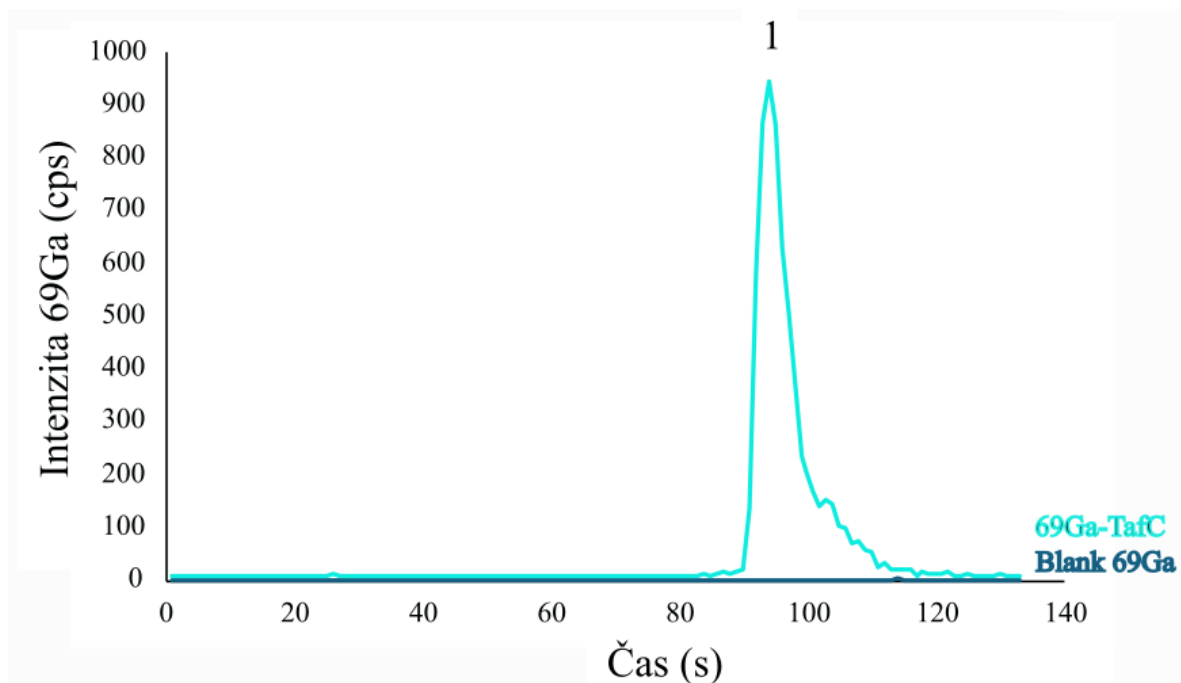
Obr. 52: Potvrzení vzniku komplexu Ga-Fc a porovnání intenzity signálu ^{69}Ga vůči blanku. Popis: 1-Ga-Fc



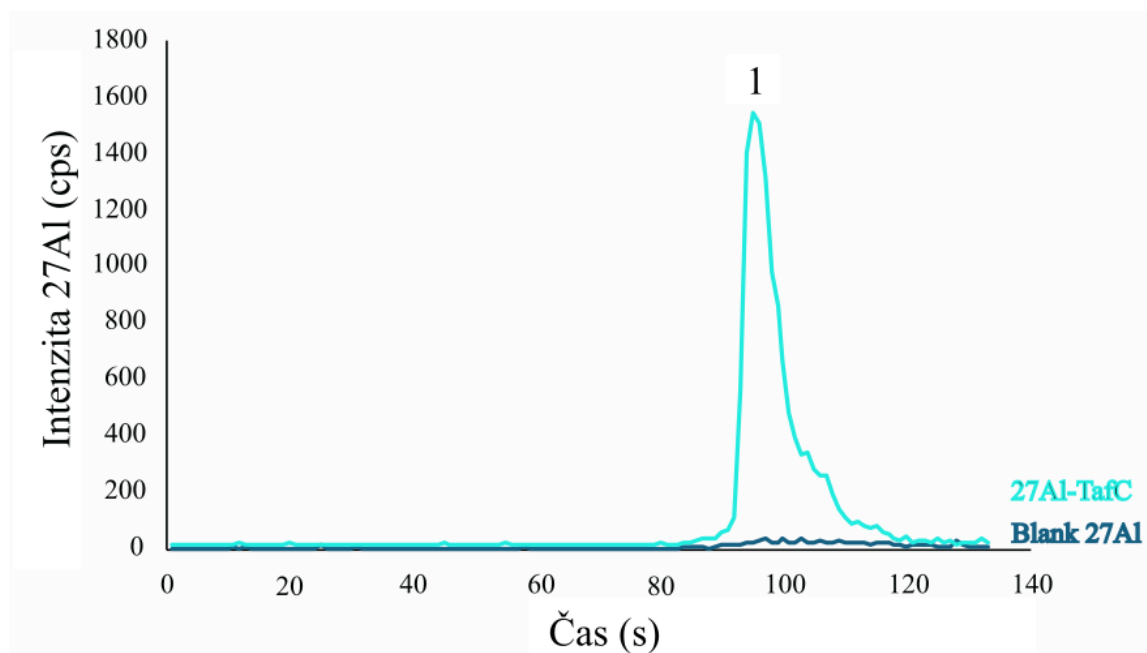
Obr. 53: Potvrzení vzniku komplexu Al-Fc a porovnání intenzity signálu ^{27}Al vůči blanku. Popis: 1-Al-Fc

8.4.3 Potvrzení komplexů u des-TafC

Pomocí HPLC-ICP-MS byl u des-TafC potvrzen vznik komplexu pouze se dvěma ionty. Ukázka jejich analýz je na obr. 54 a 55.



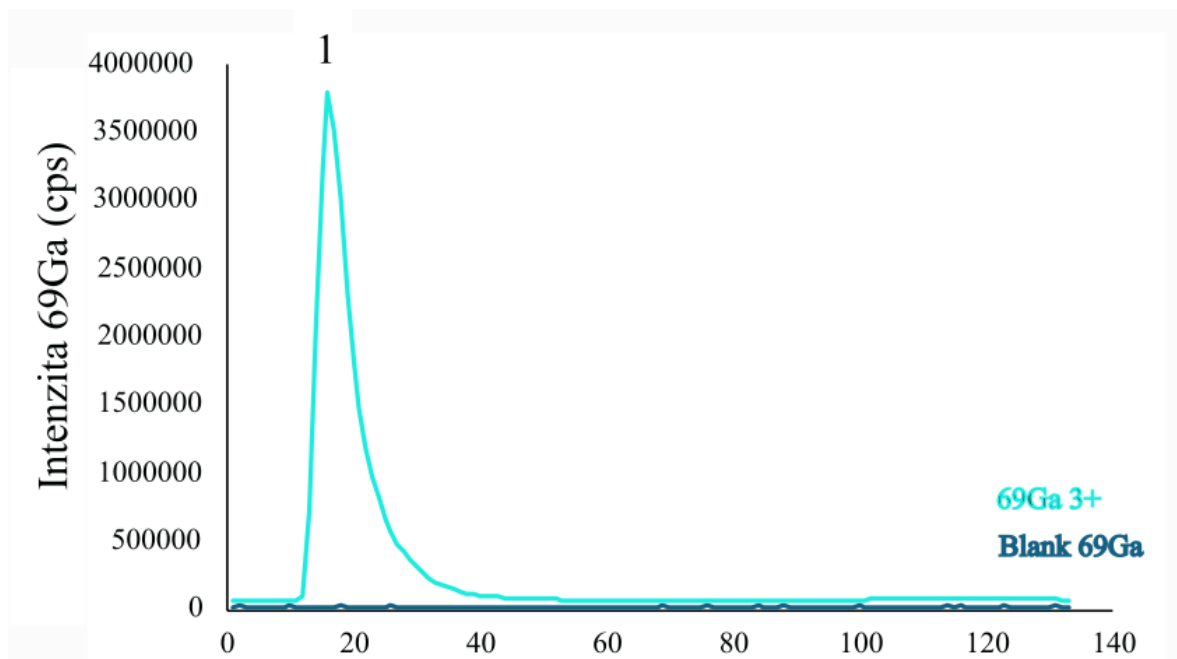
Obr. 54: Potvrzení vzniku komplexu Ga-TafC a porovnání intenzity signálu ^{69}Ga vůči blanku. Popis: 1- Ga-TafC



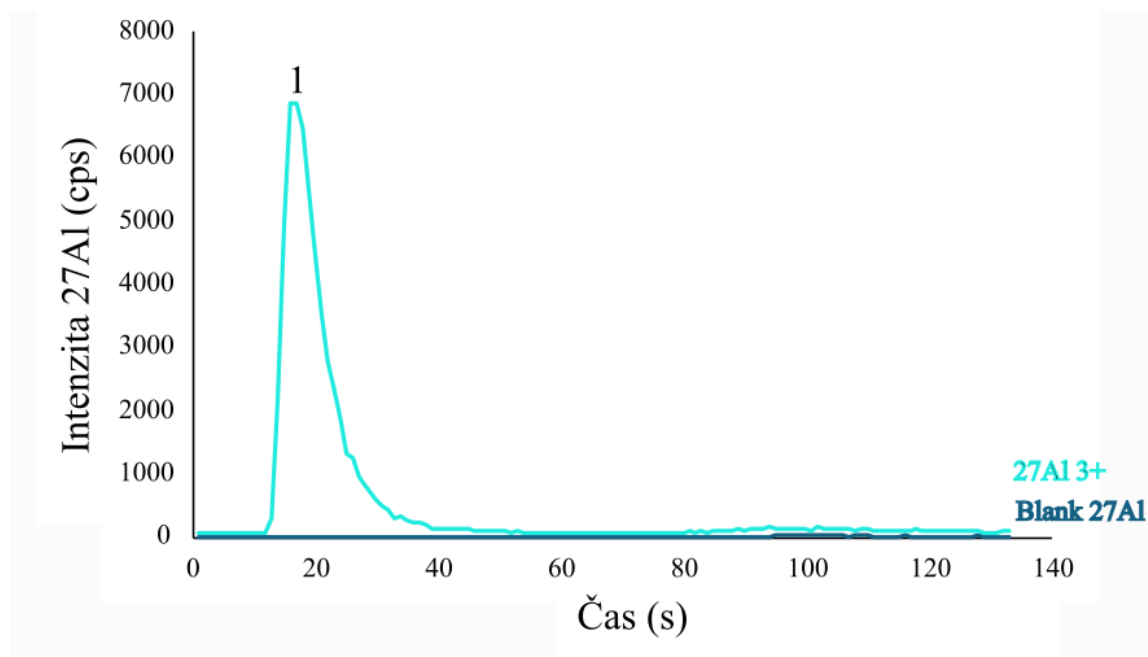
Obr. 55: Potvrzení vzniku komplexu Al-TafC a porovnání intenzity signálu ^{27}Al vůči blanku. Popis: 1- Al-TafC

8.4.4 Analýza volných kovových iontů pomocí HPLC-ICP-MS

Byly dále také analyzovány volné kovové ionty (Al^{3+} , Ga^{3+}), které nebyly na předkoloně zadrženy a byly eluovány v mrtvém čase. Důkazem je, že signály z předešlých analýz odpovídají signálům izotopů pocházejících z daných metaloforů.



Obr. 56: Analýza volného Ga^{3+} a porovnání signálu ^{69}Ga vůči blanku. Popis: 1- Ga^{3+}



Obr. 57: Analýza volného Al^{3+} a porovnání signálu ^{27}Al vůči blanku. Popis: 1- Al^{3+}

9 ZÁVĚR

V diplomové práci bylo demonstrováno, že pomocí metody kapilární elektroforézy v módu MEKC je možné efektivně separovat volné ligandy (des-Fc, des-TafC) a komplexy s kationty biogenních kovů (metalofory), což ukazuje na její obrovský potenciál v dané problematice. V první části práce byly vyvinuty metody pro separaci DMSO, des-Fc a Fe-Fc. Po vyvinutí metody byly připraveny roztoky kovových iontů (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+}) s des-Fc a provedena měření. Bylo zjištěno, že snadno dochází ke vzniku komplexů především s trojmocnými ionty (Al^{3+} , Ga^{3+}), a že tyto komplexy jsou relativně stabilní (potvrzení komplementárními technikami). U dvojmocných kationtů došlo za daných podmínek k vytvoření pouze jednoho komplexu, a to Cu-Fc, jehož vznik však nebylo možno prokázat použitými komplementárními technikami, a proto je v tomto případě potřeba dalšího prozkoumání. Tvorbu dalších komplexů s dvojmocnými kovy se pomocí použitých metod nepodařilo prokázat, což je pravděpodobně způsobeno nízkou afinitou těchto iontů k des-Fc.

V druhé části práce byla vyvinuta metoda pro stanovení des-TafC a Fe-TafC. Dále byly připraveny roztoky kovových kationtů s des-TafC a provedena měření. Opětovně bylo potvrzeno, že dochází ke vzniku komplexů především s trojmocnými ionty (Al^{3+} , Ga^{3+}). U žádného z testovaných dvojmocných kovů (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) nebyl vznik komplexu kation-TafC za daných podmínek potvrzen.

Ve třetí části práce bylo pro potvrzení vzniku komplexů kation-siderofor využito komplementárních technik FIA-HRMS a HPLC-ICP-MS. Je zřejmé, že výsledky z těchto technik velmi dobře korelují s poznatky získanými pomocí CE-DAD, přičemž významného rozdílu bylo dosaženo pouze v případě Cu-Fc. To by mohlo být způsobeno případnou kontaminací Fe^{3+} , které mají vyšší afinitu k des-Fc než Cu^{2+} , což bylo potvrzeno i pomocí FIA-HRMS, kdy modelový izotopový profil Fc-Fe se shodoval s analýzou Cu-Fc.

Věřím, že výsledky a poznatky, kterých jsem během své diplomové práce dosáhla mohou být cenné pro další zkoumání sideroforů/metaloforů nejen pro jejich lékařské použití. Mé zkušenosti z CE-DAD, FIA-HRMS a HPLC-ICP-MS rovněž plánuji využít ve svém budoucím zaměstnání.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KRAEMER, Stephan M., Owen W. DUCKWORTH, James M. HARRINGTON a Walter D. C. SCHENKEVELD. Metallophores and Trace Metal Biogeochemistry. *Aquatic Geochemistry* [online]. 2015, **21**(2-4), 159-195 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1380-6165. Dostupné z: doi:10.1007/s10498-014-9246-7
- [2] SKEBA, Stephanie, Morgan SNYDER a Chris MALTMAN. Metallophore Activity toward the Rare Earth Elements by Bacteria Isolated from Acid Mine Drainage Due to Coal Mining. *Microorganisms* [online]. 2023, **11**(11), 11 [cit. 2024-04-16]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11112672
- [3] GHOSH, Swapan Kr, Tanmay BERA a Ananda M. CHAKRABARTY. Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences. *Biological Control* [online]. 2020, **144** [cit. 2024-01-05]. ISSN 10499644. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104214
- [4] FAN, Di a Qiaojun FANG. Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, **597** [cit. 2024-01-05]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120306
- [5] BARON, Daniel. *Charakterizace nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik*. Olomouc, 2014. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [6] TRČKOVÁ, Daniela. *Analýza metalosloučenin*. Olomouc, 2022. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [7] ANDREWS, Simon C., Andrea K. ROBINSON a Francisco RODRÍGUEZ-QUIÑONES. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2003, 2003-06-01, **27**(2-3), 215-237 [cit. 2024-01-05]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-6445(03)00055-X
- [8] HIDER, Robert C. a Xiaole KONG. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* [online]. 2010, **27**(5), 637 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0265-0568. Dostupné z: doi:10.1039/b906679a

- [9] *Sanační technologie ...: sborník konference ...* Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s r.o., [1998]-. ISBN 978-80-88238-20-1.
- [10] ALBELDA-BERENGUER, Magdalena, Mathilde MONACHON a Edith JOSEPH. Siderophores: From natural roles to potential applications. In: *Advances in Applied Microbiology* [online]. 2019. Elsevier, 2019, s. 193-225 [cit. 2024-01-05]. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780128169759. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aambs.2018.12.001
- [11] RAYMOND, Kenneth N., Emily A. DERTZ a Sanggoo S. KIM. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, **100**(7), 3584-3588 [cit. 2024-01-06]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0630018100
- [12] LI, Kunhua, Wei-Hung CHEN a Steven D. BRUNER. Microbial siderophore-based iron assimilation and therapeutic applications. *BioMetals* [online]. 2016, **29**(3), 377-388 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0966-0844. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-016-9935-3
- [13] DERTZ, Emily A., Jide XU, Alain STINTZI a Kenneth N. RAYMOND. Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, 2006-01-01, **128**(1), 22-23 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja055898c
- [14] BUTLER, Alison a Roslyn M. THEISEN. Iron(III)–siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2010, **254**(3-4), 288-296 [cit. 2024-01-05]. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2009.09.010
- [15] USTIATIK, Reni, Yulia NURAINI, Suharjono SUHARJONO a Eko HANDAYANTO. Siderophore Production of the Hg-Resistant Endophytic Bacteria Isolated from Local Grass in the Hg-Contaminated Soil. *Journal of Ecological Engineering*. 2021, s. 129-138. ISSN 2299-8993. Dostupné z: doi:10.12911/22998993/135861
- [16] FEISTNER, Gottfried J., Douglas C. STAHL a Ann H. GABRIK. Proferrioxamine siderophores of *Erwinia amylovora*. A capillary liquid chromatographic/electrospray tandem mass spectrometric study. *Organic Mass Spectrometry* [online]. 1993, **28**(3), 163-175 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0030-493X. Dostupné z: doi:10.1002/oms.1210280307

- [17] TIMOFEEVA, Anna M., Maria R. GALYAMOVA a Sergey E. SEDYKH. Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants* [online]. 2022, **11**(22), 1-22 [cit. 2024-01-06]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11223065
- [18] ROSKOVA, Zuzana, Radek SKAROHLID a Lenka MCGACHY. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **819** [cit. 2024-01-05]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153144
- [19] BRIAT, Jean-François, Isabelle FOBIS-LOISY, Nicole GRIGNON, et al. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell* [online]. 1995, **84**(1-2), 69-81 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0248-4900. Dostupné z: doi:10.1016/0248-4900(96)81320-7
- [20] MASALHA, J., H. KOSEGARTEN, Ö. ELMACI a K. MENGEL. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2000, 2000-3-3, **30**(5-6), 433-439 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0178-2762. Dostupné z: doi:10.1007/s003740050021
- [21] SAHA, Maumita, Subhasis SARKAR, Biplab SARKAR, Bipin Kumar SHARMA, Surajit BHATTACHARJEE a Prosun TRIBEDI. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, **23**(5), 3984-3999 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-4294-0
- [22] BENEDUZI, Anelise, Adriana AMBROSINI a Luciana M.P. PASSAGLIA. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* [online]. 2012, **35**(4 suppl 1), 1044-1051 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1415-4757. Dostupné z: doi:10.1590/S1415-47572012000600020
- [23] AHMED, E. a S. J. M. HOLMSTRÖM. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* [online]. 2014, **7**(3), 196-208 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12117
- [24] GHOSH, Pallab Kumar, Tushar Kanti MAITI, Krishnendu PRAMANIK, Sudip Kumar GHOSH, Soumik MITRA a Tarun Kumar DE. The role of arsenic resistant *Bacillus aryabhattai* MCC3374 in promotion of rice seedlings growth and alleviation of arsenic phytotoxicity.

- Chemosphere* [online]. 2018, **211**, 407-419 [cit. 2024-01-05]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.07.148
- [25] LARRY E. HERSMAN, ALLISON HUANG, PA. Siderophore Production and Iron Reduction by *Pseudomonas mendocina* in Response to Iron Deprivation. *Geomicrobiology Journal* [online]. 2010, 2010-10-29, **17**(4), 261-273 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0149-0451. Dostupné z: doi:10.1080/01490450050192965
- [26] YANG, Chongyang, Ying-Ning HO, Chihiro INOUE a Mei-Fang CHIEN. Long-term effectiveness of microbe-assisted arsenic phytoremediation by *Pteris vittata* in field trials. *Science of The Total Environment* [online]. 2020, **740** [cit. 2024-01-05]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140137
- [27] NAIR, Anupa, Asha A. JUWARKAR a Sanjeev K. SINGH. Production and Characterization of Siderophores and its Application in Arsenic Removal from Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution* [online]. 2007, 2007-2-5, **180**(1-4), 199-212 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0049-6979. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-006-9263-2
- [28] DENARO, R., F. CRISAFI, D. RUSSO, et al. *Alcanivorax borkumensis* produces an extracellular siderophore in iron-limitation condition maintaining the hydrocarbon-degradation efficiency. *Marine Genomics* [online]. 2014, **17**, 43-52 [cit. 2024-01-05]. ISSN 18747787. Dostupné z: doi:10.1016/j.margen.2014.07.004
- [29] DUCKWORTH, Owen W., John R. BARGAR a Garrison SPOSITO. Quantitative Structure–Activity Relationships for Aqueous Metal–Siderophore Complexes. *Environmental Science & Technology* [online]. 2009, 2009-01-15, **43**(2), 343-349 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es802044y
- [30] NAGOBA, Basavraj a Deepak V. VEDPATHAK. Medical applications of siderophores—a review. *European Journal of General Medicine* [online]. 2011, **3**(8), 230-233 [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/61479>
- [31] ACKRILL, P., A.J. RALSTON, J.P. DAY a K.C. HODGE. SUCCESSFUL REMOVAL OF ALUMINIUM FROM PATIENT WITH DIALYSIS ENCEPHALOPATHY. *The Lancet*

- [online]. 1980, **316**(8196), 692-693 [cit. 2024-03-03]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(80)92728-2
- [32] BLATZER, Michael, Markus SCHRETTL, Bettina SARG, Herbert H. LINDNER, Kristian PFALLER a Hubertus HAAS. SidL, an *Aspergillus fumigatus* Transacetylase Involved in Biosynthesis of the Siderophores Ferricrocin and Hydroxyferricrocin. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, 2011-07-15, **77**(14), 4959-4966 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00182-11
- [33] GOLONKA, Rachel, Beng San YEOH a Matam VIJAY-KUMAR. The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *Journal of Innate Immunity* [online]. 2019, 2019-5-2, **11**(3), 249-262 [cit. 2024-03-23]. ISSN 1662-811X. Dostupné z: doi:10.1159/000494627
- [34] ROSA, Luigi, Antimo CUTONE, Maria LEPANTO, Rosalba PAESANO a Piera VALENTI. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(9), 18 [cit. 2024-03-23]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18091985
- [35] DAUNER, Martin a Arne SKERRA. Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. *ChemBioChem* [online]. 2020, 2020-03-02, **21**(5), 601-606 [cit. 2024-03-23]. ISSN 1439-4227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201900564
- [36] National Library of Medicine. *Pubchem* [online]. 2021 [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Desferri-ferricrocin>
- [37] National Library of Medicine. *Pubchem* [online]. 2021 [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triacetylfusarinine-C>
- [38] GAŠ, Bohuslav. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír.cz* [online]. 2001 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-7/kapilarni-elektroforeza.html>
- [39] *Český lékopis ...: Pharmacopoea Bohemica ..* [online]. 1997. Praha: Grada Publishing, [1997]- [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm

- [40] CAPILLARY ELECTROPHORESIS. *US Pharmacopeia* [online]. 2019, 2020 [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/bio-technology/harmonization-september-2019-m859.pdf>
- [41] KAŠIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 1997, **91**(5), 320-329. ISSN 0009-2770.
- [42] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 9788086369075.
- [43] SKOOG, Douglas Arvid, F. James HOLLER a Stanley Ross CROUCH. *Principles of instrumental analysis*. 6. Belmont (Kalifornie): Thomson, Brooks/Cole, 2007. ISBN 9780495012016 0495012017.
- [44] BAKER, Dale. *CAPILLARY ELECTROPHORESIS*. 1995. United States: John Wiley & Sons, 1995. ISBN 9780471117636.
- [45] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 9788024416694.
- [46] WEHR, Tim, Robert L. CUNICO a Karen M. GOODING. *Basic HPLC and CE of Biomolecules*. 1. Bay Bioanalytical Laboratory, 1998. ISBN 978-0966322903.
- [47] POPPE, Hans, Alejandro CIFUENTES a Wim Th. KOK. Theoretical Description of the Influence of External Radial Fields on the Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* [online]. 1996, 1996-03-01, **68**(5), 888-893 [cit. 2024-01-06]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac950900b
- [48] LAUER, Henk H. a Gerard P. ROZING. *High Performance Capillary Electrophoresis*. 2. Germany: Agilent Technologies, 2014. ISBN 5990-3777EN.
- [49] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [50] JORGENSON, James W. a Kryn DeArman. LUKACS. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry* [online]. 1981, 1981-07-01, **53**(8), 1298-1302 [cit. 2024-01-06]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00231a037

- [51] COUFAL, Pavel. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC. *Https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/welcome.html* [online]. 1996 [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/mecc.html>
- [52] KHALEDI, Morteza Gholi. *High - performance capillary electrophoresis: Theory, techniques and applications*. 1998. United States: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 9780471148517.
- [53] *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 3. Editor James P. LANDERS. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 9780849333293.
- [54] *UV/VIS HPLC detektory* [online]. [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html#_Obr
- [55] *Fluorescenční HPLC detektory* [online]. [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/teorie/fl_detector.html
- [56] MAIER, Vítězslav, Martin ŠVIDRNOCH a Jan KOVÁŘ. Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. *LabRulez* [online]. 2021 [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/1145>
- [57] SZPUNAR, Joanna. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *The Analyst* [online]. 2000, **125**(5), 963-988 [cit. 2024-03-19]. ISSN 00032654. Dostupné z: doi:10.1039/a909137h
- [58] ICP-MS pro speciální analýzy. *Altium* [online]. [cit. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://hpst.cz/hmotnostni-spektrometrie/icp-ms-hmotnostni-spektrometry-s-indukcne-vazanym-plazmatem/icp-ms-pro>
- [59] JARVIS, K.E., A.L. GRAY a R.S. HOUK. *Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry*. 1992. London: Blackie ; Chapman and Hall, Glasgow, 1992. ISBN 9780412025013.
- [60] PLUHÁČEK, Tomáš. *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v metabolomice a forenzní analýze*. Olomouc, 2017. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [61] STEPPE, Martin, Maria S AURORA PRADO, Marina F M TAVARES, Teresinha J A PINTO, Erika R M KEDOR-HACKMANN a Maria Inês R M SANTORO. Comparison of

- Micellar Electrokinetic Chromatography, Liquid Chromatography, and Microbiologic Assay for Analysis of Cephalexin in Oral Suspensions. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2003, 2003-07-01, **86**(4), 707-713 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/86.4.707
- [62] TEORIE, PRAXE A ÚDRŽBA: HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie – základy a principy. *LabRulez* [online]. 2020, 2.12. [cit. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/874>
- [63] ŘEZANKA, Tomáš, Andrea PALYZOVÁ, Helena FALTÝSKOVÁ a Karel SIGLER. Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. In: *Studies in Natural Products Chemistry* [online]. 5. Elsevier, 2019, s. 157-188 [cit. 2024-04-22]. *Studies in Natural Products Chemistry*. ISBN 9780444641816. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-64181-6.00005-X
- [64] PLUHÁČEK, Tomáš, Karel LEMR, Dipankar GHOSH, David MILDE, Jiří NOVÁK a Vladimír HAVLÍČEK. Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35**(1), 35-47 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21461
- [65] MCCORMACK, Paul, Paul J. WORSFOLD a Martha GLEDHILL. Separation and Detection of Siderophores Produced by Marine Bacterioplankton Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2003, 2003-06-01, **75**(11), 2647-2652 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0340105
- [66] SCHWABE, Ringo, Marlene Kirstin ANKE, Katarzyna SZYMAŃSKA, Oliver WICHE a Dirk TISCHLER. Analysis of desferrioxamine-like siderophores and their capability to selectively bind metals and metalloids: development of a robust analytical RP-HPLC method. *Research in Microbiology* [online]. 2018, **169**(10), 598-607 [cit. 2024-04-19]. ISSN 09232508. Dostupné z: doi:10.1016/j.resmic.2018.08.002
- [67] LUPTÁKOVÁ, Dominika, Tomáš PLUHÁČEK, Miloš PETŘÍK, et al. Non-invasive and invasive diagnoses of aspergillosis in a rat model by mass spectrometry. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 1-10 [cit. 2024-04-20]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-16648-z

- [68] PATIL, Rutuja H., Dominika LUPTÁKOVÁ a Vladimír HAVLÍČEK. Infection metallomics for critical care in the post-COVID era. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2023, **42**(4), 1221-1243 [cit. 2024-04-22]. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21755
- [69] MUCHA, Piotr, Piotr REKOWSKI, Alicja KOSAKOWSKA a Gotfryd KUPRYSZEWSKI. Separation of siderophores by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **830**(1), 183-189 [cit. 2024-04-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00907-8
- [70] SIMIONATO, Ana V. Colnaghi, Carolina SIMÓ, Alejandro CIFUENTES, Paulo Teixeira LACAVA, Wellington Luiz ARAÚJO, João Lúcio AZEVEDO a Emanuel CARRILHO. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of citrus endophytic bacteria siderophores. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2006, **27**(13), 2567-2574 [cit. 2024-04-23]. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200500933

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---------|--|
| BAGE | Bioafinitní kapilární elektroforéza (<i>bioaffinity capillary electrophoresis</i>) |
| BGE | Základní elektrolyt |
| CA | Kyselina citrónová |
| CASI | Kontinuální akumulace vybraných iontů (<i>Continuous Accumulation of Selected Ions</i>) |
| CE | Kapilární elektroforéza (<i>Capillary Electrophoresis</i>) |
| CEC | Kapilární elektrochromatografie (<i>capillary electrochromatography</i>) |
| CGE | Kapilární gelová elektroforéza (<i>capillary gel electrophoresis</i>) |
| CIEF | Kapilární izoelektrická fokusace (<i>Capillary isoelectric focusing</i>) |
| CZE | Kapilární zónová elektroforéza (<i>Capillary zone electrophoresis</i>) |
| DAD | Detektor diodového pole (<i>Diod array detector</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraoctová |
| EOF | Elektroosmotický tok (<i>Electro Osmotic Flow</i>) |
| FIA | Průtoková injekční analýza (<i>Flow injection analysis</i>) |
| Fe-Fc | Ferrikrocin |
| Fe-TafC | Triacetylfusarinin C |
| FsC | Fusarinin C |
| FTICR | Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>) |
| GC | Plynová chromatografie (<i>Gas chromatography</i>) |
| HDTMA | hexadecyltrimethylamonium bromid |
| HFC | Hydroxyferikrocin |
| HPLC | Vysoce účinná kapalinová chromatografie (<i>High pressure liquid chromatography</i>) |
| HRMS | Vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie |
| CAS | Chromazurol S |

| | |
|--------|---|
| ICP | Indukčně vázané plazma (<i>Inductively coupled plasma</i>) |
| ICP-MS | Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>) |
| Lcn2 | Lipokalin - 2 |
| LIF | Laserem indukovaná fluorescence (<i>Laser Induced Fluorescence</i>) |
| LOD | Mez detekce (<i>Limit of detection</i>) |
| LOQ | Mez stanovitelnosti (<i>Limit of quantitation</i>) |
| MEKC | Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (<i>Micellar electrokinetic chromatography</i>) |
| MS | Hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry</i>) |
| NMR | nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| NRPS | Neribozomální peptidové syntézy (<i>Nonribosomal peptide synthetases</i>) |
| OTP | Kapilární izotachofóza (<i>Capillary isotachopheresis</i>) |
| PAA | Polyakrylamidu |
| PDA | Fotodiodové pole (<i>Photodiode-array detector</i>) |
| PGPB | Bakterie podporující růst rostlin (<i>Plant growth promoting bacteria</i>) |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| PVA | Polyvinylamid |
| SDS | Dodecylsírán sodný (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>) |
| TAA | Tetraalkylamoniová sůl |
| TK | Těžké kovy |
| UV/Vis | Ultrafialový/viditelný |