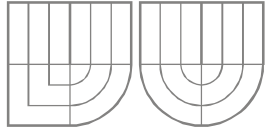




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ



ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ



FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND
COMMUNICATION

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MAGNETICKÉ ČÁSTICE JAKO ANALYTICKÝ NÁSTROJ V MEDICÍNĚ

MAGNETIC PARTICLES AS ANALYTICAL TOOL IN MEDICINE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR ' S THESIS

AUTOR PRÁCE

Evelína Polievková

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

doc. Ing. JAROMÍR HUBÁLEK Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma „Magnetické částice jako analytický nástroj v medicíně“ jsem vypracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité prameny a literaturu, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 25. května 2012

.....
podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce doc. Ing. Jaromíru Hubálkovi, Ph.D. a konzultantce semestrální práce Ing. Petře Bušinové za odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost, které mi poskytli při zpracování této semestrální práce.

V Brně dne 25. května 2012

.....
podpis autora

Abstrakt

Tato práce shrnuje poznatky o magnetických nanočásticích (MNPs), funkcionalizaci jejich povrchu, a jejich využití v různých oblastech. V literární rešerši popisuje využití magnetických nanočástic v separačních technikách analytické biochemie pro separaci nukleových kyselin a proteinů. V experimentální části se zabývá syntézou MNPs metodou koprecipitace solí železa a následnou modifikací jejich povrchu. Při přípravě MNPs byl sledován vliv přítomnosti PEG v reakční směsi a vliv teploty na výsledné vlastnosti MNPs. Povrch MNPs byl modifikován dvěma různými metodami, metodou emulzní polymerace s výchozími látkami MMA a AAc, a metodou karboxylace pomocí 11-merkaptoundekanové kyseliny. PEG ani teplota neměli téměř žádný vliv na vlastnosti připravených MNPs. Navázání karboxylových skupin se podařilo pouze při použití metody emulzní polymerace.

Klíčová slova: Magnetické nanočástice, syntéza, funkcionalizace, emulzní polymerace, karboxylové skupiny

Abstract

This work reports on knowledge of magnetic nanoparticles, modification of their surface and their using in different areas. Literature review describes using MNPs in separation techniques of analytic biochemistry to immobilize nucleic acids and proteins. The matter of experimental part is synthesis of MNPs using coprecipitation of iron salts and next modification of their surface. In MNPs preparation the effect of the presence of PEG in the reaction mixture and the temperature effect on the resulting properties of MNPs was examined. MNPs surface was modified by two different methods, emulsion polymerization method with precursors MMA and AAc, and carboxylation method using 11-mercaptoundecanoic acid. PEG or temperature had little effect on the properties of the prepared MNPs. Establishing carboxyl groups succeeded only when the method of emulsion polymerization was used.

Key words: Magnetic nanoparticles, synthesis, functionalization, emulsion polymeration, carboxyl groups

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Magnetické nanočástice	8
2.1	Využití magnetických nanočástic	8
2.2	Příprava magnetických nanočástic.....	11
2.3	Funkcionalizace povrchu magnetických nanočástic.....	11
3	Experimentální část.....	15
3.1	Chemikálie	15
3.2	Příprava magnetických nanočástic oxidů železa	15
3.2.1	Bez přítomnosti PEG	15
3.2.2	V přítomnosti PEG	15
3.3	Modifikace povrchu MNPs	16
3.3.1	Metoda emulzní polymerace	16
3.3.2	Karboxylace pomocí 11- merkaptoundekanové kyseliny	16
3.3.3	Titrace koncových karboxylových skupin.....	16
4	Výsledky a diskuse.....	18
4.1	Příprava magnetických nanočástic na bázi oxidů železa.....	18
4.2	Modifikace povrchu MNPs	21
5	Závěr	23
6	Literatura.....	24

1 Úvod

Dnes jsou nanotechnologie populárním tématem, které zasahuje do celé řady průmyslových odvětví i vědních oborů od elektroniky až po medicínu.

Patří sem i magnetické nanočástice, které jsou v posledním desetiletí intenzivně zkoumány pro jejich unikátní magnetické vlastnosti. Od doby jejich objevu již bylo vyvinuto mnoho syntézních metod a postupů funkčních modifikací jejich povrchu. Magnetické partikule jsou obvykle připravovány synteticky, ale mohou být izolovány i z magnetotaktických bakterií.

Magnetické částice jsou oblíbené pro své malé rozměry, které se pohybují v jednotkách nano- až mikro- metrů, a částice tak mohou snadno pronikat do potřebných míst. Z tohoto důvodu mohou nanočástice interagovat s organismy na buněčné úrovni, což je předurčuje i pro medicínské či biomedicínské aplikace. Na vhodně upraveném povrchu magnetické nanočástice lze imobilizovat cílovou molekulu čehož lze využít např. při cíleném zavádění léčiv nebo v bioseparačních chemických postupech pro izolaci DNA, RNA a nukleových kyselin, či proteinů. Základní požadavky, které jsou kladeny na částice používané v medicíně, jsou biokompatibilita, biodegradabilita a netoxičita. Pokud jsou nosiče určeny pro průmyslové aplikace, neměly by ohrožovat životní prostředí a jejich příprava musí být jednoduchá a levná.

Tato bakalářská práce se zabývá obecným popisem syntézy a funkční modifikace povrchu magnetických nanočástic na bázi oxidů železa, které umožní jejich další použití v bioseparačních analytických metodách.

Cílem této práce bylo syntetizovat magnetické nanočástice oxidů železa metodou koprecipitace železnatých a železitých solí a provést modifikaci povrchu navázáním karboxylových skupin a dokázat přítomnost těchto karboxylových skupin.

2 Magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice jsou částice s rozměrem obecně 1 až 500 nm, které mohou být manipulovány vnějším magnetickým polem. Obvykle obsahují některý z magnetických prvků, jako jsou železo, kobalt, nikl nebo jejich chemické sloučeniny, např. spinely MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 nebo slitiny CoPt_3 , FePt [1–2]. Mezi nejznámější patří magnetické nanočástice na bázi oxidů železa. Existuje celkem 16 oxidů železa, které zahrnují oxidy, oxi-hydroxidy a hydroxidy. Ve většině těchto sloučenin se železo vyskytuje v trojmocném stavu (Fe^{3+}). Existují tři sloučeniny, FeO , Fe_2O_3 a Fe_3O_4 , ve kterých je obsaženo dvojmocné železo (Fe^{2+}). Oxid železnatý, FeO , který obsahuje pouze Fe^{2+} , se v přírodě vyskytuje jako minerál wüstit. Oxid železnato-železitý, Fe_3O_4 (magnetit), je černý feromagnetický minerál, který obsahuje (Fe^{2+}) i (Fe^{3+}). Oxid železitý, Fe_2O_3 , má několik krystalových forem ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$) z nichž nejznámější jsou hexagonální $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ s mineralogickým názvem hematit a kubická spinelová modifikace $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ známá pod názvem maghemit [3]. Z uvedených oxidů železa jsou v popředí zájmu hlavně magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Magnetické nanočástice mají velmi dobré chemické a fyzikální vlastnosti, vysokou koercivitu, nízkou Curieovu teplotu a vysokou magnetickou susceptibilitu [4]. Další výhodné aplikační vlastnosti jsou vysoká tvrdost, chemická a termická stabilita i polymorfní charakter, který lze kombinovat s unikátními magnetickými, elektrickými, optickými, katalytickými či sorpčními vlastnostmi nanočástic jednotlivých strukturních forem [5]. Pokud mají MNPs velikost menší než 30 nm, pak mohou vykazovat superparamagnetické vlastnosti. V tak malých rozměrech částic existuje pouze jedna doména (magnetická monodoména), a důsledkem je magnetizační cyklus bez hysteréze [6].

Díky své netoxicitě, biokompatibilitě a nízkým výrobním nákladům, je možné jejich použití v široké škále mnoha oborů. [7]. Pro praktické využití modifikovaných částic v biologických vědách je důležité, aby byl jejich povrch vhodný pro navázání biomolekuly, nebo byl biokompatibilní, a to buď bioaktivní, nebo bioinertní [8].

2.1 Využití magnetických nanočástic

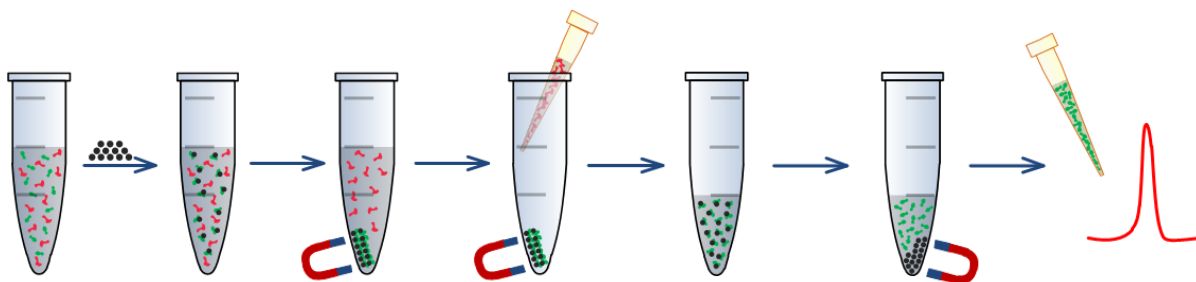
Specifické vlastnosti magnetických nanočástic umožňují jejich využití v různých oblastech. V oblasti biomedicíny to mohou být například magnetická separace, cílená distribuce léčiv, hypertermie, magnetofekce či jako kontrastní látka pro magnetickou rezonanci. Dále se s magnetickými nanočásticemi na bázi oxidů železa můžeme setkat například jako s katalyzátory, transparentními pigmenty, při produkci senzorů plynů, magnetických záznamových medií, ferrofluidů (ferrokapalin) či při dekontaminaci a čištění odpadních vod [10].

Ve fázi klinického testování je již použití magnetických nanočástic na bázi oxidů železa jako kontrastního materiálu ke zvýšení citlivosti MRI (magnetické rezonance). Zobrazování pomocí magnetické rezonance je velmi výhodné pro zobrazování měkkých tkání. Hojně se využívá např. při diagnostikách nádorů vnitřních orgánů nebo kardiovaskulárních onemocněních [11].

Další možnosti využití je také cílené zavádění léků. Zde se využívá právě unikátních magnetických vlastností, díky kterým by bylo možné pomocí vnějšího magnetického pole přesně nasměrovat magnetické nanočástice do konkrétního místa v pacientově organismu [12].

Jako výhodné se jeví využití magnetických nanočástic při léčbě rakoviny tzv. hypertermii. Terapie hypertermií je založena na vystavení tkáně vysokým teplotám. Výzkum ukázal, že vysoké teploty mohou poškodit a zabít rakovinné buňky, přičemž okolní zdravá tkáň je poškozena minimálně [12]. Jednou z možností, jak dosáhnout lokální hypertermie je nahromadění MNPs v místě zasaženém rakovinou a následně umístění pacienta do proměnného magnetického pole s vysokou frekvencí [13]. Díky tomu dojde k rozkmitání přítomných nanočástic, čímž se v místě nádoru výrazně zvýší teplota. Tato metoda je již ve fázi klinického testování na lidech, ale je téměř vždy kombinována s jinou, konvenční formou léčby, jako je ozařování nebo chemoterapie. Díky využití hypertermie je však nádorová tkáň daleko citlivější, a proto nejsou nutné tak vysoké dávky ozáření popř. cytostatik aplikovaných při chemoterapii.

Magnetické nanočástice tvořené železem s oxidačním číslem 0 (Fe^0) se díky svým mimořádným redukčním schopnostem a velkému povrchu s úspěchem používají k čištění odpadních vod. Jsou schopny redukovat celou řadu toxických chlorovaných uhlovodíků za vzniku neškodných chloridů železa a dokážou také redukovat rozpustné sloučeniny těžkých kovů, jako je uran, olovo, arzen nebo chrom, které se poté stávají nerozpustnými a lze je z daného prostředí odstranit [14–15].



Obr. 1 Průběh bioseparace pomocí MNPs

Magnetické částice mají rovněž velký potenciál k aplikaci v magnetické separaci, kdy usnadňují a urychlují některé běžně používané separační postupy. Umožňují manipulaci, separaci a izolaci zvolených organických či anorganických sloučenin, biomolekul (proteiny, peptidy, nukleové kyseliny) a dokonce i buněk a bakterií z heterogenních systémů. Separace proteinů pomocí magnetických částic je ve většině případů realizována prostřednictvím afinitních interakcí, avšak lze využít také interakce hydrofobní a iontové, popř. vodíkové vazby. Afinitní ligandy, jež byly imobilizovány na povrch magnetických částic, zahrnují barviva – Cibachrom Blue F3GA nebo Reactive Red 120; cheláty přechodných kovů – Ni^{2+} , Cu^{2+} ; monoklonální protilátky; streptavidin; inhibitory enzymů a jiné. Magnetické nosiče, na jejichž povrch je ukotven krátký úsek oligonukleotidů, jsou vhodné pro rychlou a selektivní izolaci nukleových kyselin, DNA a RNA. Na základě komplementarity bází dochází k párování (hybridizaci) mezi řetězcem oligonukleotidů a cílovou nukleovou kyselinou. Při použití magnetického separačního zařízení je takto navázaná nukleová kyselina lehce odstraněna z analyzovaného vzorku (sérum, plasma, homogenáty

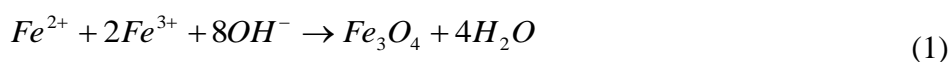
živočišných nebo rostlinných tkání, buněčné lyzáty). Po vazbě cílových molekul na magnetické nosiče dojde k separaci částic s navázanou látkou přiložením magnetického pole. K uvolnění izolované látky dochází po promytí komplexu magnetická částice – navázaná látka. Pak jsou nosiče odseparovány působením magnetického pole a původně navázaná látka zůstává v roztoku (Obr. 1). Magnetické separace jsou jednou z perspektivních možností, jak ve vybraných případech urychlit nebo usnadnit některé běžně používané postupy a metody. Obecně je použití selektivní magnetické separace výhodné zejména v heterogenních suspenzních systémech. V současné době se magnetické separace využívají především v mikrobiologii, buněčné biologii, molekulární biologii, lékařství, biochemii, biotechnologiích a ekologii. Pro separaci v magnetickém poli je potřebné základní vybavení, především vhodný magnetický separátor a, podle charakteru práce, příslušný magnetický sorbent [16].

Využití magnetické separace je velmi výhodné zejména při izolaci biologicky aktivních látek, subcelulárních organel i celých buněk, protože reálné vzorky obsahují příměsi, které snižují citlivost detekčních metod. V porovnání s klasickými metodami je práce s magnetickými částicemi rychlá, jednoduchá, dostatečně citlivá a bezpečná. Příkladem jiné aplikace je tzv. imunomagnetické separace buněk, např. buněk rodu *Salmonella* z reálných vzorků potravin, pomocí magnetických mikročástic s navázanými protilátkami pro rod *Salmonella*. Proto je např. perspektivní použití magnetických sorbentů v aplikované enzymologii při izolaci a imobilizaci enzymů. Tyto sorbenty umožňují selektivní separaci enzymů z heterogenních systémů např. přímo z kultivačních médií, suspenzí dezintegrováných buněk, z tkáňových kultur i dalších zdrojů. Imobilizace enzymů na magnetické nosiče je výhodná vzhledem k tomu, že takto modifikovaný biokatalyzátor je možno pomocí magnetického pole snadno odstranit ze systému po proběhnutí enzymové reakce. Pro izolaci biologicky aktivních látek, buněk a buněčných organel se často využívají dvoufázové systémy vodných roztoků dvou polymerů (např. dextranu a polyethylenglykolu) nebo polymeru a soli. Jednou z nevýhod tohoto způsobu separace je poměrně dlouhá doba potřebná k oddělení jednotlivých fází. Bylo zjištěno, že přidáním magnetických oxidů železa (v přítomnosti magnetického pole) se oddělení fází urychlí. Velmi často se magnetických technik používá v molekulární biologii při práci s nukleovými kyselinami. Využívá se přitom skutečnosti, že většina eukaryotní m-RNA obsahuje na 3'konci polyadenylový řetězec a dochází tedy k párování bází. Alternativně je možné použít oligodeoxythimidin s imobilizovaným biotinem po hybridizaci s m-RNA je vzniklý komplex izolován pomocí magnetických částic nesoucích streptavidin. K izolaci eukaryotních mRNA, se používají komerčně dostupné magnetické částice Dynabeads® Oligo(dT)25 (Invitrogen Dynal AS) nesoucí oligodeoxythimidin. Izolovanou m-RNA lze poté využít k syntéze c-DNA. Izolace biotinylovaných biologických aktivních látek pomocí streptavidinu imobilizovaného na magnetické nosiče je velmi často používanou metodou. Magnetické sorbenty byly použity i pro izolaci DNA vazebných proteinů, při detekci amplifikovaných sekvencí DNA, při izolaci vektorů a při mnoha dalších aplikacích [12].

2.2 Příprava magnetických nanočástic

MNPs na bázi oxidů železa lze připravit mnoha způsoby: přes mikroemulze [17], sol-gel syntézy, sonochemické reakce, hydrotermální reakce, hydrolyzy a termolýzy prekurzorů [18], průtokové injekční syntézy [19–20] či elektrosprejové syntézy [21]. Při syntéze je vždy kladen velký důraz na kontrolu velikosti částic. Tyto syntetické postupy v sobě zahrnují i separační procesy vedoucí k izolaci magnetických nanočástic o definované velikosti neboť připravené částice nejsou jednotné ve velikosti. Separačními procesy obvykle bývají ultracentrifugace a magnetická filtrace [24–27].

Nejpoužívanější metodou přípravy magnetických nanočástic oxidů železa je chemická koprecipitace solí železa [28]. Koprecipitace je označována za nejjednodušší a zároveň neúčinnější metodu přípravy Fe_3O_4 magnetických nanočástic. Mezi její výhody patří nízká cena a velké množství částic, které lze touto metodou připravit [22–23]. Principem této metody je srážení roztoku železnatých a železitých solí alkalickým roztokem, nejlépe v neoxidační atmosféře [22–23]. Probíhající reakci formálně popisuje rovnice 1:



Pro dokonalé vysrážení Fe_3O_4 je nutné pH v rozmezí 8–14. Z rovnice 1 je patrné, že pro stechiometrickou konverzi je nutné, aby byly železnaté a železité soli v roztoku smíchány v molárním poměru 1:2. Jelikož jsou soli Fe^{2+} náchylné k oxidaci, bývá často publikován molární poměr železnatých a železitých solí v roztoku o něco vyšší než 0,5. Koprecipitační reakce v sobě zahrnují dvě fáze. V první krátké fázi, označované jako nukleace, se tvoří jádra budoucích krystalů, kdy koncentrace rozpuštěných látek překročí kritické nasycení. Ve druhé fázi dochází k pomalému růstu jader krystalů difúzí rozpuštěných látek k povrchu částic. Aby byly nanočástice monodisperzní, měly by se tyto dvě fáze od sebe oddělit a fázi růstu by se mělo zcela zamezit. Velikost monodisperzních částic je pak určena rychlostí s jakou nukleace proběhne.

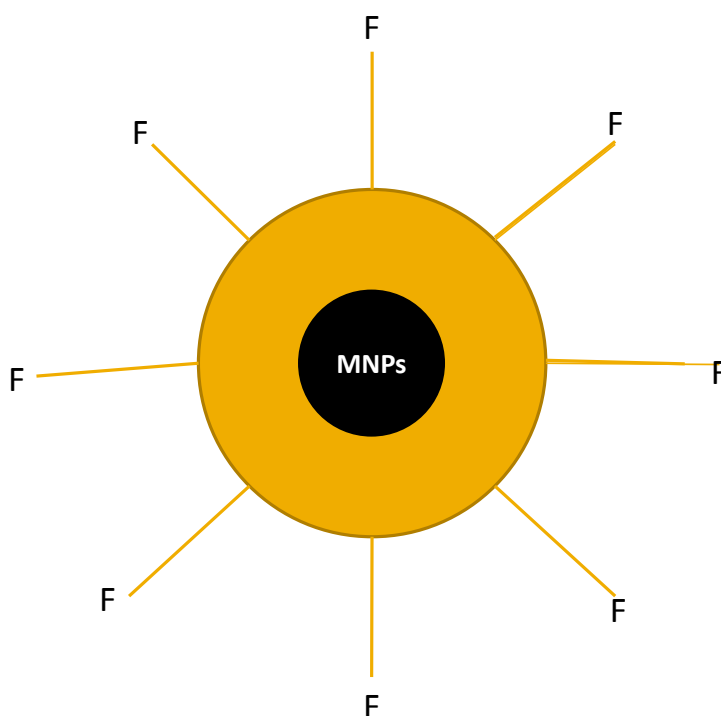
Nastavením různých parametrů, jako jsou molární poměr Fe^{2+}/Fe^{3+} , rychlost míchání, reakční teplota, volba vhodného pH, volba vhodné iontové síly, použitá báze, její koncentrace, apod., lze ovlivnit velikost, tvar i povrchové vlastnosti výsledných částic. [22–24,28–30]. Pro kontrolu velikosti nanočástic se někdy přidávají chelatující organické látky (např. kyselina citrónová, glukonová, olejová) nebo polymery (dextran, polyvinylalkohol, polyethylenglykol) [31]. I zde záleží na jejich koncentraci a volbou vhodného poměru mezi solemi železa a organickými látkami lze řídit velikost krystalových jader [32].

2.3 Funkcionalizace povrchu magnetických nanočástic

Povchová modifikace MNPs potlačuje interakce mezi částicemi a umožňuje vnesení specifických funkčních skupin, které dovolují navázání zvolených cílových látek (Obr. 2). Takto upravené částice pak lze využít pro imunostanovení, enzymatická stanovení, DNA hybridizace,

bioseparace nukleových kyselin, proteinů apod. V případě klinického využití magnetických nanočástic je nutné povrch částic vhodně upravit, aby byly biokompatibilní a netoxické [33]. Použití magnetických nanočástic závisí na jejich stabilitě za různých podmínek. Magnetické nanočástice mají v roztoku tendenci se shlukovat, aby snížily energii spojenou s jejich velkým povrchem vzhledem k malému objemu a nejsou stabilní pro delší časové období. Jejich povrch je třeba modifikovat vhodnou inertní nízko- či vysokomolekulární látkou. Agregace magnetických nanočástic je také podmíněna jejich kritickým průměrem. Každá částice se chová jako samostatná magnetická doména v určitém rovnovážném poměru mezi energií stěn takové domény a statickou magnetickou energií vlastního materiálu částic. Pokud je poměr překročen, je pro částice energeticky výhodnější tvořit agregáty [34].

Pro existenci magnetických koloidních suspenzí je zásadní stabilizace magnetických nanočástic oxidů železa. V roztoku na nanočástice působí Van der Waalsovy, elektrostatické a magnetické síly. Pokud by odpuzivé a přitažlivé síly nebyly v rovnováze, částice by se shlukovaly. Atomy železa se na povrchu magnetických nanočástic oxidu železa chovají jako Lewisovy kyseliny. Ve vodném prostředí molekuly vody koordinují s atomy železa jako donory volných elektronových párů. Molekuly vody disociují a na povrchu magnetických částic jsou hydroxylové skupiny. Tyto hydroxylové skupiny mají amfoterní charakter a v závislosti na pH udělují částici pozitivní nebo negativní náboj. Ke stabilizaci magnetických nanočástic lze použít celou řadu anorganických, organických nebo polymerních látek. [34].



Obr. 2 : Magnetická nanočástice s funkcionalizovaným povrchem

Modifikace povrchu magnetických nanočástic může být realizována s využitím anorganických i organických látek. Některé jsou uvedeny v přehledu v tabulce 1.

Tabulka 1: Látky vhodné pro funkcionalizaci povrchu MNPs [41].

Typ látky	Obalový materiál
Polymery – přírodní	chitosan
	celulosa
	dextran
	alginát
Polymery – syntetické	polyethylenglykol
	polyvinylalkohol
	polymethylmethakrylát
	polystyren
Látky organické	kys. stearová, olejová
	3- aminopropyltriethoxysilan
Látky anorganické	Al ₂ O ₃
	SiO ₂
	Au

Pro separaci nukleových kyselin se často využívá magnetických nanočástic modifikovaných karboxylovými skupinami a streptavidinem.

Streptavidin je protein vykazující nižší specifické interakce. Skládá se ze čtyř podjednotek (vazebných míst pro biotin), jeho molekulová hmotnost je přibližně 66 kDa (isoelektrický bod 6.1), přičemž neobsahuje žádné sacharidy ve své molekule. Zmíněný protein získal své jméno podle dychtivosti (avidity) s jakou se váže k biotinu (vitamin H). Bylo zjištěno, že disociační konstanta této vazby se pohybuje okolo 10-15 M. Biomolekuly jsou před imobilizací streptavidinem nejprve biotinylovány, a poté navázány na magnetické nosiče pomocí vazby streptavidin- biotin. Komplex je velmi stabilní, odolává vysokým teplotám, pH i silným denaturačním činidlům. Této vzácné interakce je využito v mnoha typech avidin-biotinových technologií, jako je imunohistochemie, elektronové mikroskopie, ELISA, DNA hybridizace a konstrukce biosenzorů [35].

Pro reverzní imobilizace biologicky významných proteinů se používá metoda fyzikální sorpce, která je jednoduchá a levná, ale méně spolehlivá a ve srovnání s kovalentními vazbami málo stabilní. Kovalentní imobilizace je nejčastější imobilizační technikou. Vyžaduje, aby nosič

obsahoval funkční skupiny (nejčastěji $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ nebo $-\text{CONH}_2$), které se musí před navázáním aktivních molekul aktivovat. Karboxylové skupiny se aktivují karbodiimidy (např. hydrochloridem 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimidu) [36– 38]. Požadované COOH skupiny se dají na povrch MNPs navázat několika způsoby. Erdem a kolektiv použili jako výchozí látky na tvorbu těchto specifických skupin komonomery MMA a AAc [39]. Liu a kolektiv ve své práci modifikovali povrch MNPs pomocí zlata a 11- merkaptoundekanovou kyseliny [40].

3 Experimentální část

V této části jsou uvedeny použité chemikálie a popsány metody přípravy magnetických nanočástic na bázi oxidů železa a následná modifikace jejich povrchu.

3.1 Chemikálie

V práci byly použity dodecylsulfát sodný (SDS), chlorid železitý ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hydroxid amonný (NH_4OH), kyselina akrylová (AAc), polyethylenglykol (PEG) od firmy Merck. Chlorid železnatý ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a methylmetakrylát (MMA) byli dodány firmou Fluka. Peroxodisíran draselný (KPS) a kyselina 11-merkaptoundekanová (MUA) byly z firmy Sigma- Aldrich. Metanol a etanol byly od firmy Penta.

3.2 Příprava magnetických nanočástic oxidů železa

Pro přípravu roztoků i promývání připravených částic byla použita MilliQ voda (Millipore, USA), která byla vždy 10 min probublána dusíkem, aby z ní byl odstraněn obsažený kyslík.

Postup byl proveden při třech různých teplotách, 25 °C, 50 °C a 80 °C, na které byly výchozí roztoky vždy nejdříve vytemperovány a až poté smíchány. Zvolená teplota byla udržována po celou dobu reakce.

3.2.1 Bez přítomnosti PEG

Bylo připraveno 50 ml vodného roztoku $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, který obsahoval 5,41 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1,99 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 50 ml vodného roztoku NH_4OH o koncentraci 1,5 mol/l. Vodný roztok $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ byl umístěn na magnetickou míchačku a za stálého míchání k němu byl z byrety přikapán roztok NH_4OH konstantní rychlostí 0,1 ml/ 10 s. Vzniklá sraženina byla při zvolené teplotě nadále míchána po dobu 60 min, aby vzniklé částice vyžrály. Vzniklé magnetické částice byly pomocí magnetu 3× promyty MilliQ vodou a nakonec usušeny v sušárně při teplotě 60 °C.

3.2.2 V přítomnosti PEG

Bylo připraveno 50 ml vodného roztoku $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, který obsahoval 5,41 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1,99 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 50 ml vodného roztoku NH_4OH o koncentraci 1,5 mol/l. Do obou roztoků byl přidán PEG o hmotnosti 0,5 g. Vodný roztok $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ byl opět umístěn na magnetickou míchačku a za stálého míchání k němu byl z byrety přikapán roztok NH_4OH s přidáním PEG konstantní rychlostí 0,1 ml/ 10 s. Vzniklá sraženina byla při zvolené teplotě nadále míchána po dobu 60 min, aby vzniklé částice vyžrály. Vzniklé magnetické částice byly pomocí magnetu 3× promyty MilliQ vodou (Millipore, USA) a nakonec usušeny v sušárně při teplotě 60 °C.

3.3 Modifikace povrchu MNPs

Pro přípravu roztoků i promývání částic byla použita MilliQ voda (Millipore, USA), která byla vždy 10 min probublána dusíkem, aby z ní byl odstraněn obsažený kyslík.

3.3.1 Metoda emulzní polymerace

Magnetické nanočástice byly pokryty polymerní vrstvou s obsahem funkčních karboxylových skupin (pocházejících z komonomeru kyseliny akrylové, AAc) metodou emulzní polymerace provedené v systému olej ve vodě (o/w) za účasti iniciátoru KPS. MMA a AAc byly použity jako komonomery o hmotnostním poměru 90/ 10.

Pro přípravu roztoků i promývání připravených částic byla použita MilliQ voda (Millipore, USA), která byla vždy 10 min probublána dusíkem, aby z ní byl odstraněn obsažený kyslík.

Částice o hmotnosti 0, 5 g byly přidány do 50 ml MilliQ vody (Millipore, USA), vznikla tak 1% suspenze. Poté byly částice umístěny na 10 minut do ultrazvuku, aby se dobře rozdispergovali. Pak bylo 4, 664 g SDS rozmícháno v 10 ml MilliQ vody (Millipore, USA), přidáno a dobře rozmícháno do rozdispergované suspenze částic. Poté byly částice opět umístěny na 10 minut do ultrazvukové lázně. V dalším kroku byly smíchány 3ml MMA a 0, 5 ml AAC v 5 ml MilliQ vode (Millipore, USA). Vodní roztok MMA a AAc byl přidán do suspenze částic, které pak byli znovu umístěny do ultrazvuku na dobu 40 minut. V dalším kroku byla suspenze MNPs ochlazena pod tekoucí vodou, protože KPS iniciátor je citlivý na vliv teploty. Poté bylo 0, 5 g iniciátoru KPS rozmícháno v 5 ml MilliQ vody (Millipore, USA) a přidáno do suspenze MNPs. Polymerace byla provedena při konstantní teplotě 70 °C za stálého třepání po dobu 24 hodin. Poté byly MNPs posbírány pomocí magnetu a přečištěny roztokem, který obsahoval 50 ml metanolu a 50 ml MilliQ vody (Millipore, USA). V dalším kroku byly částice uskladněny do roztoku 0, 1 M H₂ SO₄ na dobu 48 hodin aby se částice nepokryté polymerem rozpustily. V posledním kroku byly částice znovu 3x přemyty, ale tentokrát pouze MilliQ vodou (Millipore, USA), poté byly vysušeny při teplotě 60 °C.

3.3.2 Karboxylace pomocí 11- merkaptoundekanové kyseliny

11- merkaptoundekanová kyselina s koncentrací 20 mM o hmotnosti 0, 8766 g byla rozpuštěna v 200 ml etanolu. Poté bylo 0, 2 g MNPs přidáno do roztoku kyseliny 11- merkaptoundekanové a etanolu. V dalším kroku byla suspenze umístěna do ultrazvuku na 15 minut. Poté byly MNPs umístěny na třepačku na dobu 24 hodin. Po provedení karboxylace byly částice pomocí magnetu posbírány a 3x přemyty MQW. Posledním krokem bylo vysušení částic při teplotě 60 °C.

3.3.3 Titrace koncových karboxylových skupin

Byl připraven 0,5 M vodný roztok octanu vápenatého. Do 100 ml skleněných lahvíček se šroubovacím uzávěrem bylo naváženo 100 mg vzorku MNPs a k nim následně přidáno 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml MilliQ vody (Millipore, USA). Stejným způsobem byl připraven slepý vzorek, který neobsahoval MNPs. Lahvičky byly umístěny na laboratorní třepačku s horizontálním

pohybem a třepány 24 h. Částice byly z roztoku odseparovány magnetem a kapalná část titrována 0,1 M roztokem NaOH.

4 Výsledky a diskuse

Tato kapitola shrnuje výsledky analýz připravených a modifikovaných magnetických nanočástic na bázi oxidů železa.

4.1 Příprava magnetických nanočástic na bázi oxidů železa

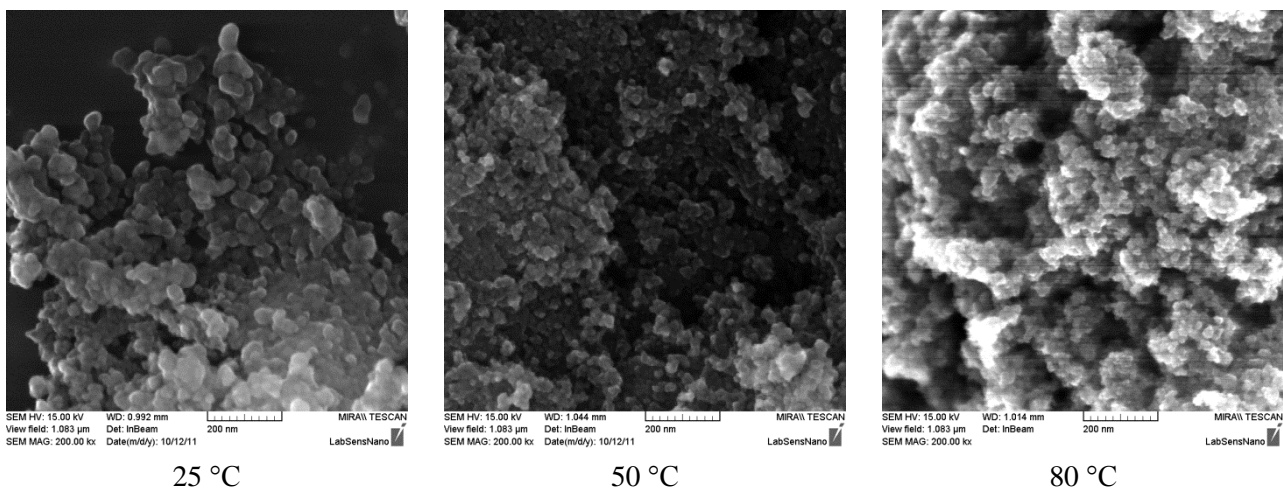
MNPs byly připraveny metodou chemické koprecipitace solí železa. Byly použity 2 různé postupy. V prvním případě byly připraveny částice bez přítomnosti PEG v reakční směsi, v druhém případě byl do výchozích roztoků přidán PEG. V obou případech byly připraveny tři vzorky při třech různých teplotách 25 °C, 50 °C a 80 °C. Byl sledován vliv reakční teploty na vlastnosti připravených částic. Všechny vzorky připravených částic byly analyzovány na rastrovacím elektronovém mikroskopu (SEM, Mira II LMU) a ty připravené bez PEG dále předány na charakterizaci na Ústav fyziky materiálů Akademie věd ČR (ÚFM AVČR).



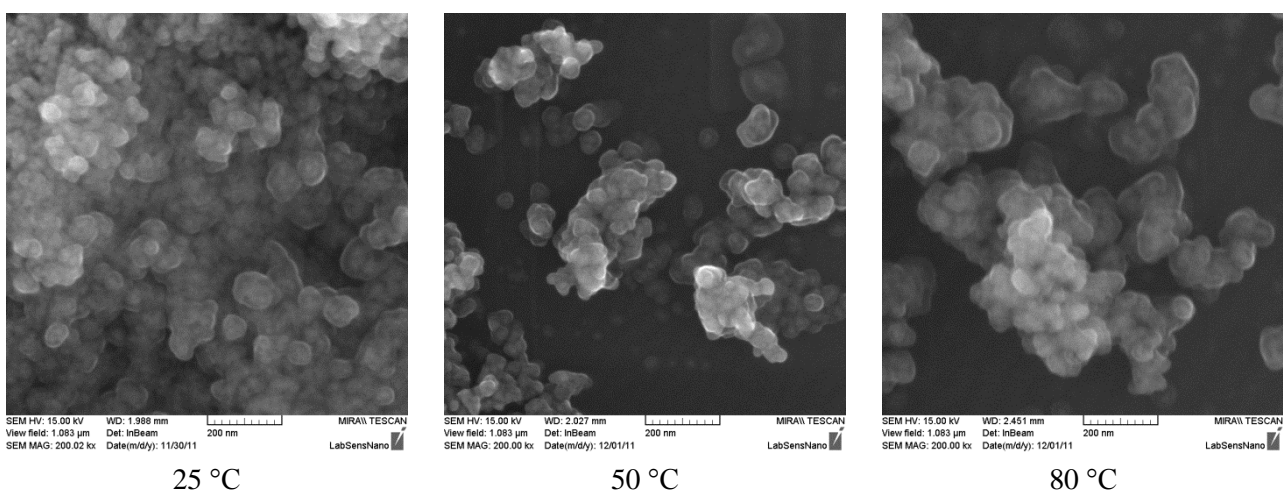
Obr. 3 Demonstrace magnetických vlastností MNPs

Všechny vzorky připravených nanočástic měly hnědo-černou barvu a po přiložení magnetu vykazovaly magnetické vlastnosti, jak může být vidět na obr. 3. Na základě SEM analýzy bylo zjištěno, že připravené nanočástice jsou menší než 20 nm, mají přibližně kulovitý tvar, vytvářejí shluky a jsou polydisperzní. SEM snímky vzorků připravených bez přítomnosti PEG při teplotách 25 °C, 50 °C a 80 °C a v přítomnosti PEG při teplotách 25 °C, 50 °C a 80 °C jsou vidět na obr. 4 a obr. 5.

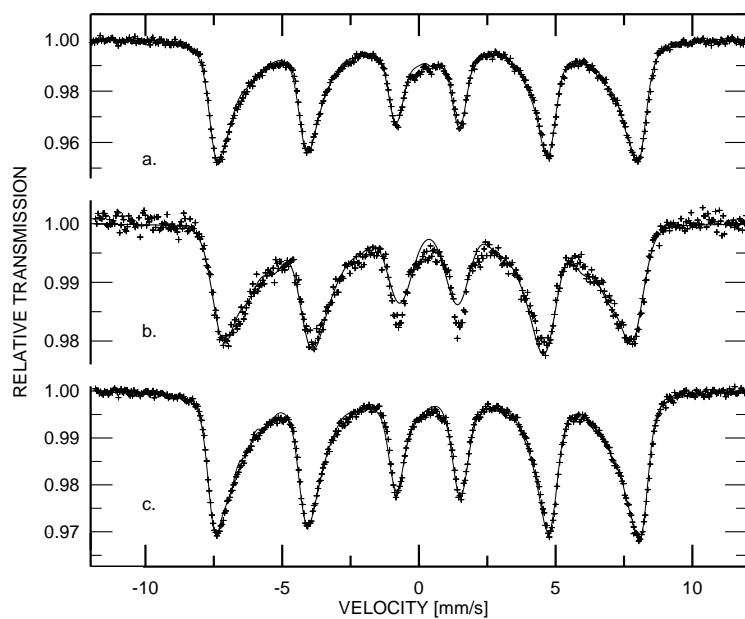
Pomocí rentgenové práškové difrakce a Mössbauerovy spektroskopie bylo určeno fázové složení vzorků. Rentgenová měření byla provedena na difraktometru PANalytical X'Pert Pro MPD s Co K α zářením. Mössbauerovská spektra na izotopu ^{57}Fe byla měřena v transmisní geometrii s použitím zářiče ^{57}Co v matici Rh. Spektra byla zpracována pomocí programu CONFIT. Výsledná Mössbauerovská spektra pro jednotlivé vzorky MNPs připravené při různých teplotách jsou ukázána na obr. 6 a nijak výrazně se neliší. Bylo zjištěno, že všechny vzorky připravených nanočástic jsou heterogenní povahy, směs maghemitu s magnetitem. Je možné, že původně převažoval obsah magnetitu, který však na vzduchu zoxidoval na maghemit.



Obr. 4 SEM snímky magnetických nanočástic připravených bez přítomnosti PEG

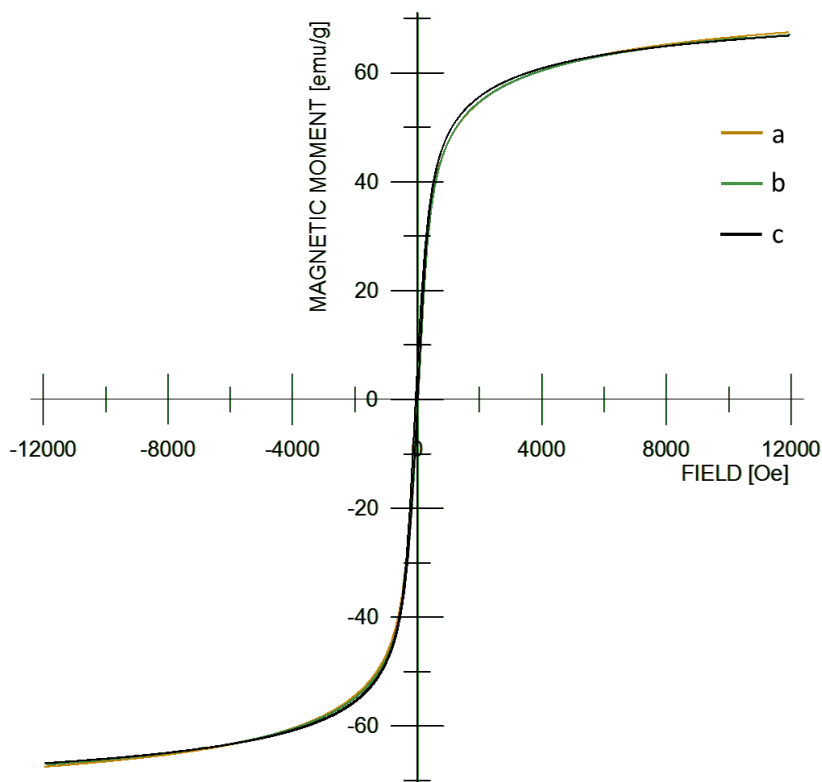


Obr. 5 SEM snímky magnetických nanočástic připravených v přítomnosti PEG



Obr. 6 Mössbauerovská spektra vzorku 25 °C, 50 °C, 80 °C měřená při 293 K

Vzorky byly dále charakterizovány měřením hysterezních smyček, které bylo prováděno na magnetometru s vibrujícím vzorkem firmy LakeShore za pokojové teploty ve vnějším poli ± 1.2 T rovněž na ÚFM AVČR. Pro tato měření byly vzorky částic slisovány do tabletky o průměru 3 mm.



Obr. 7 Porovnání hysterezních smyček vzorků 25 °C (a), 50 °C (b) a 80 °C (c) změřených při teplotě 293 K

Srovnání naměřených hysterezních smyček pro vzorky připravené při třech různých teplotách je uvedeno na obr. 7. Z obrázku je patrné, že všechny vzorky částic jsou paramagnetické a mají dostatečně velkou saturační magnetizaci. Je patrné, že reakční teplota, při které byly částice připraveny, neměla z tohoto hlediska žádný významný vliv.

Tabulka 2: Parametry odvozené z hysterezních smyček (H_C a M) a z mössbauerovských spekter ($\langle B_{hf} \rangle$) měřených při 293 K

Vzorek	Koercivita H_C [A/m]	Magnetizace M [Am ² /kg]	Střední hodnota hyperjemné indukce $\langle B_{hf} \rangle$ [T]
25°C	1520	67.1	43.1
50°C	1120	63.0	39.8
80°C	2480	66.8	43.3

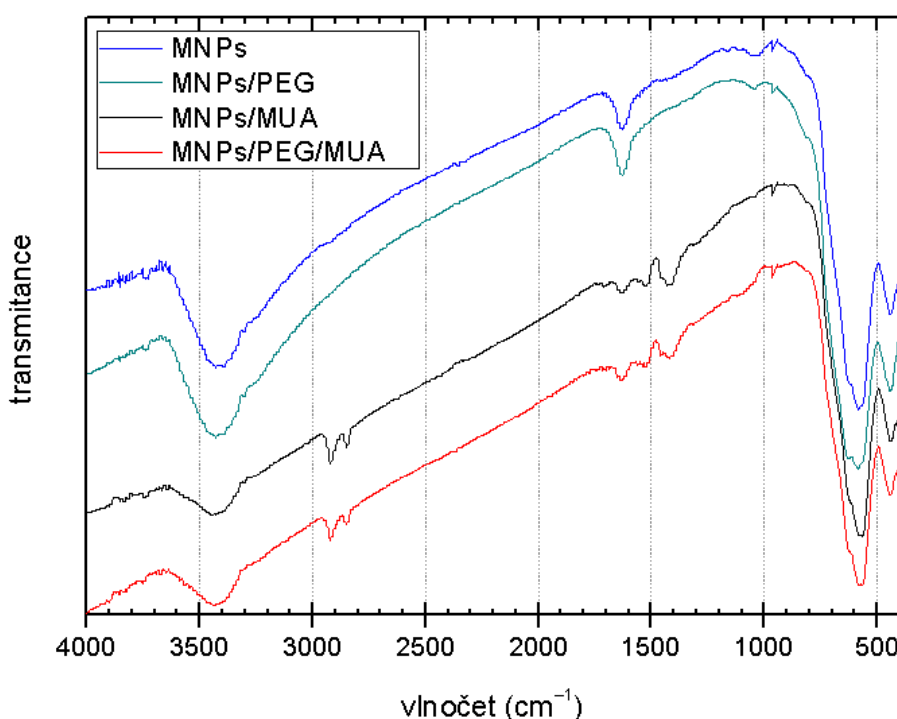
Magnetizace M při vnějším poli 1.2 T

I magnetická měření potvrdila heterogenní povahu magnetických vzorků. Ve srovnání s magnetizací uváděnou v literatuře pro čistý magnetit (92–100 Am²/kg) a maghemit (60–80 Am²/kg) rovněž naznačují, že vzorky mají svým složením blíže maghemitu. Tento závěr je ve

shodě s výsledky získanými fázovou analýzou pomocí Mössbauerovy spektroskopie i rentgenové difrakce. Významné parametry získané z hysterezních smyček a z mössbauerovských spekter jsou shrnuty v tabulce 2.

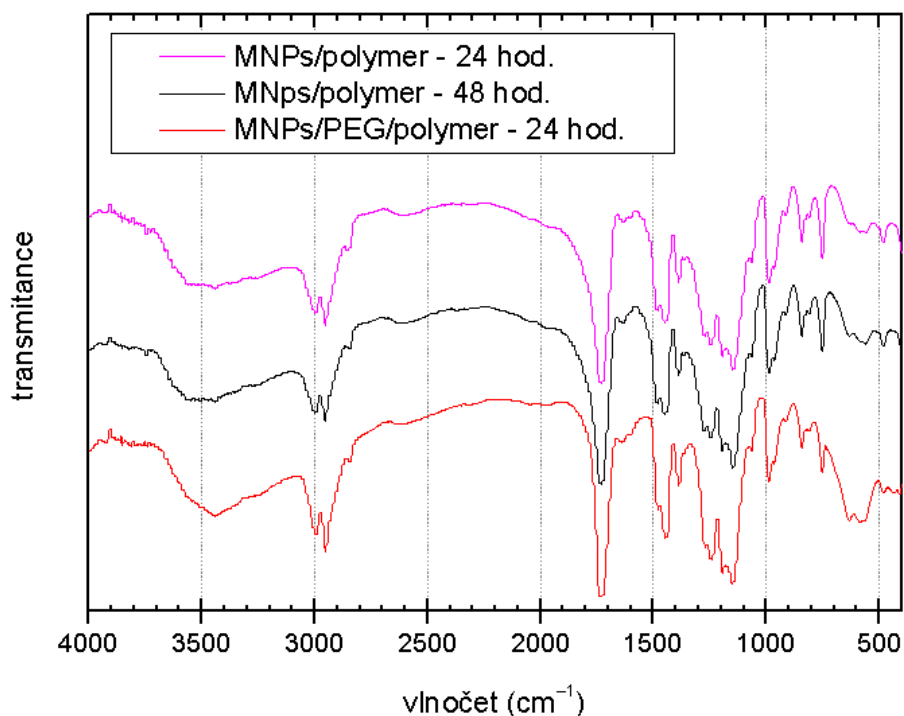
4.2 Modifikace povrchu MNPs

Modifikace povrchu magnetických částic byla provedena dvěma metodami, emulzní polymerací a karboxylací 11-merkaptoundekanovou kyselinou (MUA). Modifikovány byly jak vzorky připravené bez přítomnosti PEG tak vzorky připravené v přítomnosti PEG. Doba polymerace byla 24 a 48 h. Úspěšnost modifikace byla ověřena s využitím metody infračervené spektroskopie a vliv délky polymerace titračním stanovením množství navázaných $-\text{COOH}$ skupin. Infračervená spektra byla naměřena na FT-IR spektrometru Nicolet Impact 400 metodou KBr tablet.



Obr. 8 Infračervená spektra nemodifikovaných magnetických nanočástic (připravených bez přítomnosti PEG a v přítomnosti PEG) a spektra jim odpovídající modifikovaných vzorků MUA

Vibrační spektra nemodifikovaných magnetických nanočástic (připravených bez přítomnosti PEG a v přítomnosti PEG) a spektra jim odpovídající modifikovaných vzorků MUA jsou uvedena na obr. 8. Z obrázku je patrné, že spektra získaná z měření částic připravených bez PEG jsou téměř totožné se spektrem získaným pro částice připravené v prostředí PEG. To naznačuje, že PEG použitý při syntéze nanočástic neměl zásadní vliv na funkční vlastnosti jejich povrchu. U vzorků modifikovaných MUA se na spektrech objevuje pík v rozmezí vlnových délek 3000 až 2850 cm^{-1} , který charakterizuje přítomnost alifatických skupin C–H. Pík typický pro karboxylové skupiny v oblasti okolo 1726 cm^{-1} však chybí, což poukazuje na to, že metodou karboxylace 11-merkaptoundekanovou kyselinou (MUA) nebyly $-\text{COOH}$ skupiny na povrchu částic vytvořeny.



Obr. 9 Infračervená spektra modifikovaných magnetických nanočástic (připravených bez přítomnosti PEG a v přítomnosti PEG) metodou emulzní polymerace

Na obr. 8 jsou znázorněna infračervená spektra magnetických nanočástic modifikovaných metodou mikroemulzní polymerace. Naměřená spektra mají opět téměř stejný charakter a v oblasti vlnové délky okolo 1726 cm^{-1} je patrný charakteristický vibrační pás pro $\text{C}=\text{O}$, který potvrzuje přítomnost PMMA na povrchu nanočástic.

Metodou acidobazické titrace bylo stanoveno množství navázaných karboxylových skupin po 24 h a 48 h polymeraci. Výsledné hodnoty se lišily, po 24 h polymeraci bylo množství karboxylových skupin $1,65\text{ mmol/g}$ a po 48 h $2,40\text{ mmol/g}$.

5 Závěr

V této bakalářské práci byly připraveny MNPs na bázi oxidů železa metodou koprecipitace solí železa. Povrch připravených magnetických vzorků byl modifikován dvěma různými metodami, metodou emulzní polymerace s výchozími monomery MMA a AAc, a metodou karboxylace pomocí 11- merkaptoundekanové kyseliny. Při přípravě MNPs byl sledován vliv přítomnosti PEG v reakční směsi a vliv teploty na výsledné vlastnosti MNPs. PEG ani teplota neměly téměř žádný vliv na vlastnosti připravených MNPs. Navázání karboxylových skupin bylo úspěšné pouze v případě použití metody emulzní polymerace. Tyto magnetické nanočástice s modifikovaným povrchem jsou připraveny pro možnou další funkcionalizaci např. streptavidinem pro separaci nukleových kyselin a proteinů.

6 Literatura

- [1] AN-HUI LU, E. L. SALABAS and FERDI SCHÜTH; Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Protection, Functionalization and Application; Angew. Chem. Int. Ed. 2007, Pages 1222-1244.
- [2] BAUMGARTEN, D. a kol. Magnetic Imaging of Nanoparticles Using Minimum Norm Algorithms. In *2007 IEEE SENSORS*. 2007. s. 63-65. ISBN: 1-424-41262-5.
- [3] POOLE, CHARLES P., OWENS, FRANK J. Introduction to Nanotechnology. 1. vyd. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003, 400 s. ISBN 9780471079354.
- [4] BUŠINOVÁ, P.; CHOMOUCÁ, J.; HUBÁLEK, J. Applications of iron oxide nanoparticles. In *XI. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků - sborník příspěvků*. Brno: Mendelova Univerzita, 2011. s. 85-88. ISBN: 978-80-7375-514- 0.
- [5] ZBOŘIL, R. Nanočástice oxidů železa připravené reakcí v pevné fázi: mechanismus tvorby, vlastnosti, aplikace. Olomouc, 2005. 4s., 5s. Habilitační práce na Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci na katedře fyzikální chemie.
- [6] Cite them right – electronic information.
- URL:< <https://www.greyc.fr/sites/default/files/users/mdenoual/magneticnanoparticle.htm> >[cit. 2012-03-05]
- [7] BUŠINOVÁ, P.; CHOMOUCÁ, J.; PRÁŠEK, J.; HRDÝ, R.; DRBOHLAVOVÁ, J.; SEDLÁČEK, P.; HUBÁLEK, J. Polymer-coated iron oxide magnetic nanoparticles – preparation and characterization. In *NANOCON 2011 - sborník příspěvků*. Tangerang, 2011. s. 1-6. ISBN: 978-80-87294-23- 9.
- [8] JULIA MÜRBE, ANNETE RECHTENBACH, JÖRG TÖPFER: Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles. *Material chemistry and Physics*, 2008, 110 (2- 3), 426-433.
- [9] Q A PANKHURST et al (2003), Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys.D: Appl. Phys.* 36 R167.
- [10] BUŠINOVÁ P., CHOMOUCÁ J., HUBÁLEK J.; Applications of iron oxide nanoparticles. In *XI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists 2011*. Brno: Masarykova univerzita, Mendelova univerzita, 2011. 85-88 ISBN: 978-80-7375-514- 0.
- [11] NA, H. B., SONG, I. C. and HYEON, T. (2009), Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents, *Advanced Materials*, 21: 2133–2148.
- [12] Van Der Zee J. (2002), Heating the patient: A promising approach?, *Annals of Oncology*, 13:1173 1184.
- [13] RUDOLF HERGT et al (2006), Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 S2919.

- [14] M. PUPEZA, M. CERNIK, M. GRECO (2007), Dechlorination of chlorinated hydrocarbons by zero-valent iron nano-particles, *NATO Science Series*, Volume 75, Part 3, 111-118.
- [15] SHERMAN M. PONDER, JOHN G. DARAB, and, THOMAS E. MALLOUK (2000), Remediation of Cr(VI) and Pb(II) Aqueous Solutions Using Supported, Nanoscale Zero-valent Iron, *Environmental Science & Technology*, 34 (12), 2564-2569.
- [16] SETCHELL C. H.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B. 175 (1985).
- [17] CHIN, A. B., YAACOB, I.I. (2007) Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *Journal of Materials Processing Technology* 191: 235-237.
- [18] KIMATA, M., NAKAGAWA, D., HASEGAWA, M. (2003) Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide. *Powder Technol.* 132: 112-118.
- [19] LUCAS FRENZ, A.EI H.M.P.S.B.-C.ANDREW D.G.J.-C.B. (2008) Droplet- Based Microreactors for the Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles 13. *Angewandte Chemie International Edition* 47: 6817-6820.
- [20] SALAZAR-ALVAREZ, G., MUHAMMED, M., ZAGORODNI, A.A. (2006) Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chemical Engineering Science* 61: 4625-4633.
- [21] BASAK, S., CHEN, D. R., BISWAS, P. (2007) Electro spray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law. *Chemical Engineering Science* 62: 1263-1268.
- [22] SAYAR F., GÜVEN G., PIŞKIN E.; *Magnetically loaded poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) nano-particles*. *Colloid and Polymer Science*, 284 (2006), 9, 965-978, DOI: 10.1007/s00396-005-1383-5
- [23] ZHAO Y., QIU Z. a HUANG J.; *Preparation and analysis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16 (2006), 3, 451-455
- [24] BABES, L., DENIZOT, B., TANGUY, G., LE JEUNE, J.J., JALLET, P. (1999) Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *Journal of Colloid and Interface Science* 212: 474-482.
- [25] NUNES, A.C., Yu, Z.-C. (1987) Fractionation of a water-based ferrofluid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 65: 265-268.
- [26] SJÖGREN, C.E., JOHANSSON, C., NČVESTAD, A., SONTUM, P.C., BRILEY-SČBŘ, K., FAHLVIK, A.K. (1997) Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magnetic Resonance Imaging* 15: 55-67.
- [27] THURM, S., ODENBACH, S. (2002) Magnetic separation of ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252: 247-249.
- [28] SUN J. a kol.; *Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles*. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 80 (2007), 2, 333-341

- [29] THAPA, D., PALKAR, V.R., KURUP, M.B., MALIK, S.K. (2004) Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. *Materials Letters* 58: 2692-2694.
- [30] ITOH, H., SUGIMOTO, T. (2003) Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 265: 283-295.
- [31] PARDOE, H., CHUA-ANUSORN, W., St. PIERRE, T.G., DOBSON, J. (2001) Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225: 41-46.
- [32] BEE, A., MASSART, R., NEVEU, S. (1995) Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 149: 6-9. [44] Massart, R., Dubois, E., Cabuil, V., Hasmonay, E. (1995) Preparation and properties of monodisperse magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 149: 1-5.
- [33] AN-HUI LU, E. L. SALABAS and FERDI SCHÜTH; Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Protection, Functionalization and Application; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, Pages 1222-1244.
- [34] LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., ELST, L.V., MULLER, R.N. (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 108: 2064-2110.
- [35] PETRLOVÁ, Jitka - BEKLOVÁ, Miroslava - POTĚŠIL, David - ADAM, Vojtěch - TRNKOVÁ, Libuše - HAVEL, Ladislav - KIZEK, René. Avidin a streptavidin - možnosti jejich elektroanalytického stanovení. In *Vyziva zvířat 2006 - PROTEINY*. Vyd. první. Brno : Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, 2006. ISBN 80-7157-954-8, s. 194-200. 6.6.2006, Brno.
- [36] PEČOVÁ, M, et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, roč. 105, s. 524 - 530. ISSN 1213-7103.
- [37] HÄFELI, U., et al. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. New York: Plenum Press, 1997. ISBN 0-306-45687-7.
- [38] HORÁK, D., et al. Streptavidin-modified magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres for selective isolation of bacterial DNA. *European Polymer Journal* [online]. 2011, vol. 47, no. 5, p. 1090-1096 [cit. 2012-05-03]. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.02.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305711000607>.
- [39] ERDEM, A., et al., Development of streptavidin carrying magnetic nanoparticles and their applications in electrochemical nucleic acid sensor systems, *Electroanalysis*, 2007, 19, 7-8, 798-804
- [40] HONG LING LIU, CHUNG HEE SONN, JUN HUA WU, KYUNG-MI LEE, YOUNG KEUN KIM, Synthesis of streptavidin-FITC-conjugated core-shell Fe₃O₄-Au nanocrystals and their application for the purification of CD4⁺ lymphocytes, *Biomaterials*, Volume 29, Issue 29, October 2008, Pages 4003-4011, ISSN 0142-9612, 10.1016/j.biomaterials.2008.06.031.

[41] POSPÍŠILOVÁ, M. Imobilizace α -amylas na magnetické nosiče. Olomouc, 2010. 34s. Diplomová práce Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci na katedře biochemie. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.