

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

## **Nanočástice v kapilární elektroforéze**

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Daniel Baron

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

**Olomouc 2019**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Jana Petra, Ph.D. a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne .....

.....

Daniel Baron

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a množství předaných zkušeností nejen při vypracování disertační práce, ale během celého postgraduálního studia.

Velké díky patří doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu, pomoc a množství času a zkušeností, které mi při práci v laboratoři věnoval.

Rovněž bych chtěl poděkovat všem kolegům z Katedry analytické chemie, zejména pak RNDr. Tomášovi Pluháčkovi, Ph.D. za realizaci a nápady při spojení CE s ICP-MS, Mgr. Janu Rozsypalovi za pořízení AFM snímků, Mgr. Andreji Šebestové, Mgr. Petře Švecové, Mgr. Danielovi Rimanovi, Ph.D. a Mgr. Radce Pechancové za pomoc, spolupráci a mnoho dalších rad v laboratoři i mimo ni.

Obrovské poděkování patří také samozřejmě mým rodičům, sourozencům a dalším přátelům za nepřetržitou podporu po celou dobu studií.

Dále bych chtěl poděkovat týmům prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. (RCPTM v Olomouci) a Jean-Michela Siauguea (Sorbonne Universités, Paříž, Francie) za poskytnuté nanočástice.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat projektům GA ČR (16-23938Y), GA ČR (19-23033S), NPU LO1305 (MŠMT), IGA\_PrF\_2015\_020, IGA\_PrF\_2016\_016, IGA\_PrF\_2017\_020, IGA\_PrF\_2018\_027 a IGA\_PrF\_2019\_028, za jejichž finanční podpory disertační práce vznikla.

## SOUHRN

Předložená disertační práce je zaměřena na problematiku nanočástic v kapilárních elektromigračních analytických technikách.

Teoretická část práce je dělena na čtyři hlavní kapitoly. První z těchto kapitol se věnuje nanočásticím, jejich obecným vlastnostem, a také možnostem jejich charakterizace. Druhá kapitola je zaměřena na kapilární elektromigrační techniky, které jsou pro charakterizaci nanoobjektů velmi vhodné. Je zde diskutována historie těchto metod, principy separace a nejběžnější operační módy s důrazem na afinitní režim. Další kapitoly se věnují již nanočásticím v těchto separačních analytických technikách. Protože detekce nanočástic může být v kapilární elektroforéze problematická, jsou nejprve rozebrány používané detektory, přičemž je kvůli zaměření práce kladen důraz na DAD a ICP-MS a možnosti on-line prekoncentrace. Dále jsou popsány teoretické aspekty migrace nanočástic v kapilární elektroforéze a vlastnosti nanočástic, které tuto migraci ovlivňují. Zde je kladen důraz na povrchovou chemii, protože velmi úzce souvisí s interakčními studii, čemuž se také věnuje experimentální část. Poslední část teorie se zabývá použitím nanočástic pro zlepšení vlastností kapilárních elektromigračních technik (např. selektivity separace, zlepšení detekce, úprava vzorku, atd.).

Experimentální část je dělena do tří hlavních okruhů, které se zabývají charakterizací karboxylovaných magnetitových nanočástic a jejich detekcí v kapilární elektroforéze.

Nejprve bylo studováno, jak se nanočástice chovají na rozhraní dvou prostředí s různými specifickými vodivostmi. S tím souvisí tzv. „stacking“ a „de-stacking“ efekt. Oba tyto efekty byly pozorovány, pokud je iontová síla zóny, ve kterém jsou nanočástice dispergovány, rozdílná od iontové síly elektrolytu, do něhož jsou při analýze dávkovány. Při těchto efektech může rovněž docházet k agregaci nanočástic. Toto chování lze vysvětlit pomocí DLVO teorie, která předpokládá, že nanočástice agregují, pokud je překročena energetická bariéra definovaná elektrostatickými a Van der Waalsovými silami. Navíc bylo zjištěno, že za optimálních podmínek, lze vzorek nanočástic „stacking“ efektem 76-krát zakoncentrovat (srovnání se standardním dávkováním).

Další možností, jak prekoncentrační faktor nanočástic zvýšit, je kombinace „stacking“ efektu s elektrokinetickým dávkováním vzorku. To je druhým tématem experimentální části. On-line elektrokinetická prekoncentrace karboxylovaných

magnetitových nanočástic byla studována za „normálních“ podmínek, a také v křemenných kapilárách, ve kterých je elektroosmotický tok obrácen nebo potlačen. Bylo zjištěno, že k reprodukovatelným analýzám vede pouze použití kapilár kovalentně pokrytých polyvinylalkoholem. Poté byla optimalizována doba dávkování zóny vody, doba dávkování nanočástic a dávkovací napětí. Srovnáním s běžným hydrodynamickým dávkováním došlo tímto způsobem k 860-násobné prekoncentraci nanočástic.

V poslední části práce jsou studovány pomocí afinitní kapilární elektroforézy interakce nanočástic s polypeptidovým antibiotikem (polymyxin B). Pro specifickou a citlivou detekci byla kapilární elektroforéza spojena s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Samotnému studiu interakcí tedy předcházelo testování funkčnosti spojení těchto dvou technik. Při interakční studii byla sestrojena závislost efektivní mobility nanočástic na koncentraci ligandu v základním elektrolytu. Analýzou naměřených dat (x-reciproká linearizace dle Scatcharda) byly zjištěny dvě různé interakční oblasti, jež se liší svými interakčními konstantami a rovněž stechiometrií vznikajícího komplexu. Tyto rozdíly mohou být opět vysvětleny začátkem agregace nanočástic, a to z důvodu snížení elektrostatického odpuzování nanočástic (záporný náboj je kompenzován polymyxinem B, takže se mění hodnota zeta potenciálu). Tato hypotéza je rovněž v souladu s tvary profilů nanočástic. Píky nanočástic jsou úzké při nízkých koncentracích ligandu, zatímco při vysokých koncentracích jsou rozšířeny.

## SUMMARY

The submitted dissertation thesis is focused on problematics of nanoparticles in capillary electromigration analytical techniques.

The theoretical part is divided into four main chapters. The first chapter deals with nanoparticles, their general properties, and the possibilities of their characterization. The second chapter is focused on capillary electromigration techniques, which are very suitable for characterization of nanoobjects. The history of these methods, principles of separation and most common operating modes with an emphasis on affinity mode are included in this chapter. Next chapters deal with nanoparticles in this analytical technique. Since the detection of nanoparticles in capillary electrophoresis can be problematic, used detectors are first discussed. Because of experimental part, DAD and ICP-MS are emphasized here and also possibilities of on-line preconcentration are discussed. Theoretical aspects of nanoparticles' migration in capillary electrophoresis and the properties of nanoparticles affecting this migration are depicted. Here, the emphasis is on surface chemistry, because it is very closely related to the interaction studies, which is the aim of experimental part too. The last part of the theory deals with the use of nanoparticles to improve capillary electromigration techniques (e.g. selectivity of separation, improvement of detection, sample pretreatment, etc.).

The experimental part is divided into three main areas dealing with the characterization and detection of carboxylated magnetite nanoparticles by capillary electrophoresis.

Firstly, nanoparticles' behaviour at the interface of two environments with different specific conductivities was explored. This is related to the stacking and de-stacking effects. Both of these effects have been observed when the ionic strength of the zone in which nanoparticles are dispersed differed from the ionic strength of the running electrolyte. These effects may also result in aggregation of nanoparticles. This behaviour can be explained by the DLVO theory, which assumes that nanoparticles aggregate when the energetic barrier defined by electrostatic and Van der Waals forces is exceeded. In addition, it has been found that under optimal conditions, stacking effect allowed 76-fold preconcentration of nanoparticles (compared to standard injection).

Another way to increase the preconcentration factor of nanoparticles is combination of the stacking effect with the electrokinetic injection of the sample. This is the second topic

of the experimental part. On-line electrokinetic preconcentration of carboxylated magnetite nanoparticles has been studied in fused silica capillaries and also in silica capillaries with reversed or suppressed electroosmotic flow. It has been found that analyzes in polyvinylalcohol covalently coated capillaries were most reproducible. Then the the setup was further optimized in terms of water plug injection time, sample injection time, and injection voltage. In comparison with the standard hydrodynamic injection, the electrokinetic injection allowed 860-fold preconcentration of nanoparticles.

Lastly, the interaction study of nanoparticles with the polypeptide antibiotic (polymyxin B) via affinity capillary electrophoresis has been performed. For specific and sensitive detection, inductively coupled plasma mass spectrometry instrument has been hyphenated to capillary electrophoresis instrument. After testing of the interface of these two techniques, interactions between nanoparticles and ligand were studied. The analysis of interaction data (x-reciprocal Scatchard linearization of dependence between effective mobility of nanoparticles and ligand concentration in running electrolyte) showed two distinct interaction regions. These regions differed in the strength of the interaction, and in the stoichiometry of emerging complex. These differences can be explained by the start of aggregation of nanoparticles due to the decrease of electrostatic repulsion of nanoparticles (nanoparticles' negative charge is compensated by polymyxin B, so the value of zeta potential changes). This hypothesis is also in the agreement with the peak shapes of nanoparticles. Peaks are narrow at low ligand concentrations and broadened at high ligand concentrations.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	3
2.1	NANOČÁSTICE.....	3
2.1.1	Historie nanočástic a úvod do nanotechnologií.....	3
2.1.2	Vlastnosti nanočástic a koloidních soustav.....	6
2.1.2.1	Kinetické vlastnosti.....	6
2.1.2.2	Optické vlastnosti.....	6
2.1.2.3	Elektrické vlastnosti – elektrická dvojvrstva a stabilita koloidů.....	8
2.1.3	Metody charakterizace NPs.....	11
2.2	KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ TECHNIKY.....	13
2.2.1	Historie a úvod do kapilárních elektromigračních metod.....	13
2.2.2	Principy separace a elektroosmotický tok.....	15
2.2.3	Módy kapilárních elektromigračních metod.....	20
2.2.3.1	Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	21
2.2.3.2	(Micelární) elektrokinetická chromatografie (EKC, MEKC, MECC).....	21
2.2.3.3	Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	22
2.2.3.4	Kapilární gelová elektroforéza (CGE).....	23
2.2.3.5	Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).....	23
2.2.3.6	Kapilární izotachoforéza (CITP).....	24
2.2.3.7	Afinitní kapilární elektroforéza (ACE).....	24
	Úvod do ACE.....	24
	Teorie.....	25
2.3	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA NANOČÁSTIC.....	28
2.3.1	Historie zkoumání nanočástic pomocí CE.....	28



2.3.2 Detekce nanočástic a možnosti jejího zlepšení v kapilární elektroforéze .....	29
2.3.2.1 UV/Vis detektory a jejich vlastnosti.....	29
2.3.2.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	31
Úvod a historie .....	31
CE-ICP-MS .....	32
Princip ICP-MS .....	32
2.3.2.3 On-line prekoncentrační techniky v CE .....	34
Diskontinuální systémy .....	34
„Stacking“ efekt a jeho modifikace .....	35
Elektrokinetické dávkování a kombinace s dalšími on-line prekoncentračními technikami .....	36
2.3.3 Teoretické aspekty migrace nanočástic v kapilární elektroforéze.....	37
2.3.4 Faktory ovlivňující elektroforetickou mobilitu nanočástic .....	39
2.3.4.1 Velikost nanočástic.....	39
2.3.4.2 Povrchová chemie nanočástic.....	42
Charakterizace povrchové chemie nanočástic pomocí CE.....	42
Studium interakcí (nejen) pomocí kapilární elektroforézy.....	44
Nekovalentní molekulární interakce s nanočásticemi .....	44
Metody stanovení interakčních konstant .....	45
ACE a ACE-ICP-MS pro stanovení interakčních konstant.....	45
2.3.4.3 Další faktory ovlivňující mobilitu NPs.....	47
2.4 APLIKACE NANOČÁSTIC V KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH TECHNIKÁCH .....	50
2.4.1 „Pseudostacionární“ fáze v (micelární) elektrokinetické chromatografii.....	50
2.4.2 Stacionární fáze v kapilární elektrochromatografii .....	51
2.4.3 Nanočástice jako chirální selektory v CE.....	54

2.4.4 Nanočástice pro prekoncentraci a úpravu analytů v CE.....	56
2.4.5 Nanočástice pro zesílení signálu analytů v CE.....	58
2.4.6. Nanočástice pro modifikace vnitřních stěn CE kapilár .....	60
2.4.7 Elektrochemické detektory na bázi nanočástic v CE.....	61
2.4.8 Nanočástice pro zlepšení analýzy DNA pomocí CE .....	62
3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	63
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	64
4.1 STUDIUM „STACKING“ EFEKTU KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC .....	64
4.1.1 Chemikálie.....	64
4.1.1.1 Pufry .....	64
4.1.1.2 Nanočástice.....	64
4.1.2 Charakterizace nanočástic .....	65
4.1.3 Příprava základních elektrolytů .....	66
4.1.4 Instrumentace a experimentální podmínky.....	66
4.2 ELEKTROKINETICKÁ PREKONCENTRACE KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC .....	68
4.2.1 Chemikálie.....	68
4.2.1.1 Pufry .....	68
4.2.1.2 Nanočástice.....	68
4.2.2 Příprava základních elektrolytů .....	69
4.2.3 Příprava polyakrylamidem pokrytých kapilár .....	69
4.2.4 Instrumentace a experimentální podmínky.....	70
4.3 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI KARBOXYLOVANÝMI MAGNETITOVÝMI NANOČÁSTICEMI A POLYMYXINEM B POMOCÍ CE-ICP-MS .....	71
4.3.1 Chemikálie.....	71
4.3.1.1 Pufry .....	71

4.3.1.2 Nanočástice.....	72
4.3.2 Charakterizace nanočástic .....	72
4.3.3 Příprava vzorků .....	74
4.3.4 Příprava základních elektrolytů .....	74
4.3.5 Instrumentace a experimentální podmínky.....	74
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	77
5.1 STUDIUM „STACKING“ EFEKTU KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC .....	77
5.1.1 Úvod .....	77
5.1.2 Studium chování nanočástic dispergovaných v různých prostředích.....	78
5.1.2.1 Homogenní elektrické pole.....	78
5.1.2.2 Studium „stacking“ efektu.....	80
5.1.2.3 Studium „de-stacking“ efektu.....	85
5.1.3 Závěr.....	86
5.2 ELEKTROKINETICKÁ PREKONCENTRACE KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC .....	87
5.2.1 Studium elektrokinetického dávkování NPs a jejich prekoncentrace za různých podmínek .....	87
5.2.1.1 Elektrokinetické dávkování nanočástic za „normálních“ podmínek.....	87
5.2.1.2 Elektrokinetické dávkování nanočástic při obráceném elektroosmotickém toku .....	88
5.2.1.3 Elektrokinetické dávkování nanočástic při potlačeném elektroosmotickém toku .....	91
5.2.2 Závěr.....	95
5.3 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI KARBOXYLOVANÝMI MAGNETITOVÝMI NANOČÁSTICEMI A POLYMYXINEM B POMOCÍ CE-ICP-MS .....	96
5.3.1 Testování spojení CE s ICP-MS.....	96

5.3.2 Interakční studie Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @COOH-PMB.....	97
5.3.2.1 Experimentální část .....	97
5.3.2.2 Vyhodnocení.....	100
5.3.3 Závěr.....	102
6 ZÁVĚR.....	103
7 LITERATURA .....	105
8 SEZNAM ZKRATEK .....	124
9 ŽIVOTOPIS .....	128

# 1 ÚVOD

Objev materiálů nanometrových rozměrů, a také procesů a jevů probíhajících na „nanoúrovni“, otevřel dokořán dveře jejich rozsáhlému využití v řadě průmyslových a vědeckých odvětví. Díky svým rozměrům a nepřebornému množství materiálů, z nichž mohou být v nejrůznějších tvarech připraveny, poskytují nanočástice velmi zajímavé vlastnosti. Ty je navíc možno ještě měnit povrchovými modifikacemi těchto částic. Proto jsou nanomateriály stále vyhledávanější v široké škále oblastí lidské činnosti. Z těchto důvodů mají nanotechnologie obrovský hospodářský dopad a jsou jedním z nejrychleji se rozvíjejících technologických odvětví.

Některé nanomateriály jsou používány již po desetiletí (např. barvení skla), zatímco jiné jsou objeveny nově (např. v kosmetických prostředcích, textiliích, výbušninách a pyrotechnice) nebo jsou v současné době vyvíjeny (např. v bateriích, solárních článcích, palivových článcích, zdrojích světla, elektronických paměťových médiích, zobrazovacích technologiích, bioanalýze a biodetektorech, dekontaminačních technologiích, cílené dopravě léčiv a lékařských implantátech). K enormnímu nárůstu v produkci nanočástic však došlo v posledních dvou dekadách. Je vhodné poznamenat, že pravděpodobně nejvíce se nanotechnologie uplatňují ve zdravotnictví nebo příbuzných oblastech.

Nicméně, znalosti o mechanismu působení nebo nepříznivých účincích těchto nově používaných materiálů na živočichy nebo životní prostředí jsou v současnosti stále velmi omezené.

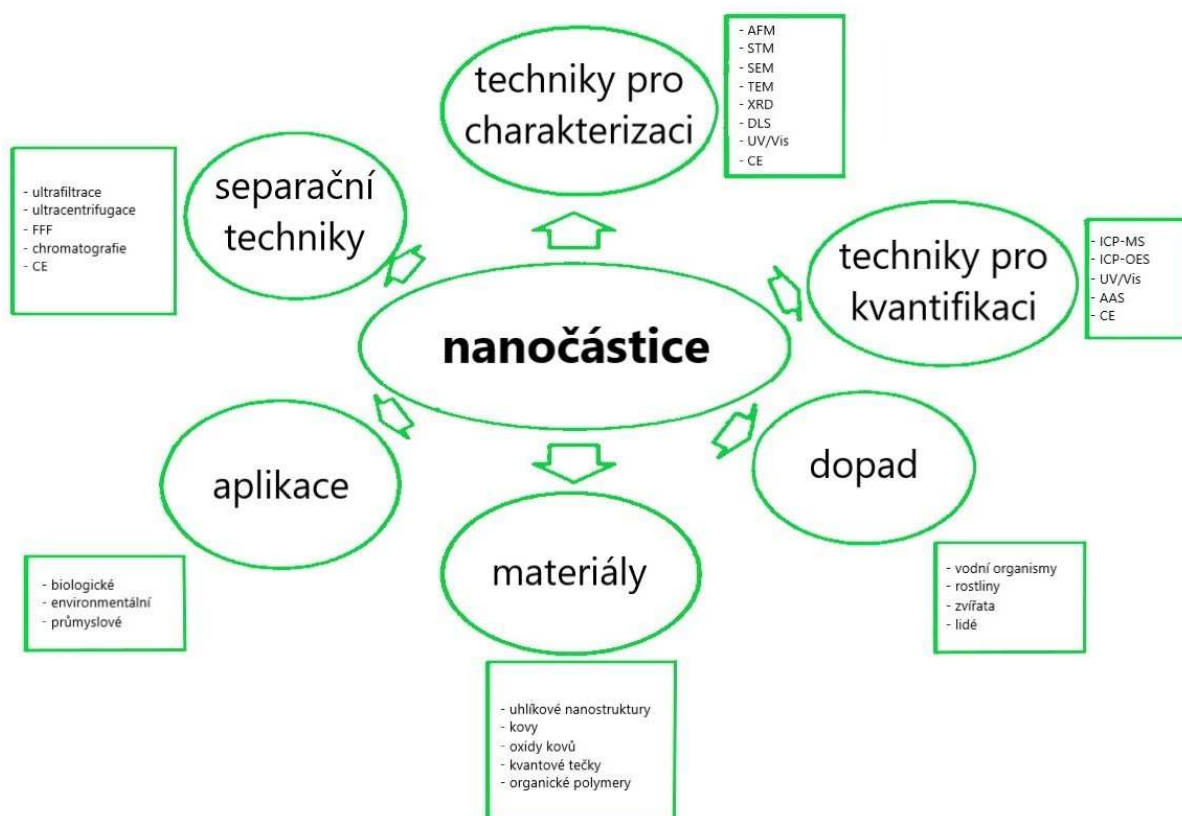
Některé studie odhalily, že právě ty vlastnosti, které činí z nanočástic tak unikátní a atraktivní materiál, mohou být potenciálně odpovědné také za škodlivé účinky na životní prostředí a živočichy.

Současný výzkum je zaměřen na působení různých typů nanočástic zejména na vodní organismy, rostliny a lidi. Velmi často problematika nanočástic tkví v jejich těžko předvídatelném chování v biologických vzorcích, a proto je v tomto kontextu velmi důležité mít k dispozici velmi přesné techniky pro jejich charakterizaci (distribuce velikosti částic, tvar, chemické složení apod.) a kvantifikaci v reálných podmínkách (obrázek 1) [1].

V tomto ohledu nabízí kapilární elektromigrační techniky velmi efektivní řešení, protože poskytují rychlé analýzy nanočástic, včetně polydisperzních systémů nebo částic

nekulových tvarů, přičemž náklady jsou relativně nízké. Kapilární elektroforéza (CE) může být tedy využita pro separaci a kvantifikaci nanomateriálů s rozdílnými tvary, velikostmi, chemickým složením a povrchovými úpravami. CE však také poskytuje podle tvaru záznamu nanočástic nebo třeba změny jejich elektroforetických mobilit v závislosti na měnících se experimentálních podmínkách mnoho informací i o chování nanočástic v různých prostředích (základních elektrolytech, jejichž složení může být nasimulováno tak aby přibližně odpovídalo např. tělním tekutinám), na rozhraní různých prostředí nebo může být dokonce využita k interakčním studiím nanočástic s různými typy (bio)molekul. Při takových studiích je velmi výhodné kombinovat CE s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). ICP-MS pak dovoluje stanovení prvkového složení nanomateriálů s velmi nízkými detekčními limity (ng/l) v komplexních maticích [2].

Protože nemusí být nanočástice vnímány v analytické chemii jen jako analyt, ale lze je použít také pro zlepšení vlastností (nejen) separačních metod (prekoncentrace, rozlišení, detekce, atd.) je jejich problematika v této vědecké disciplíně velmi atraktivní.



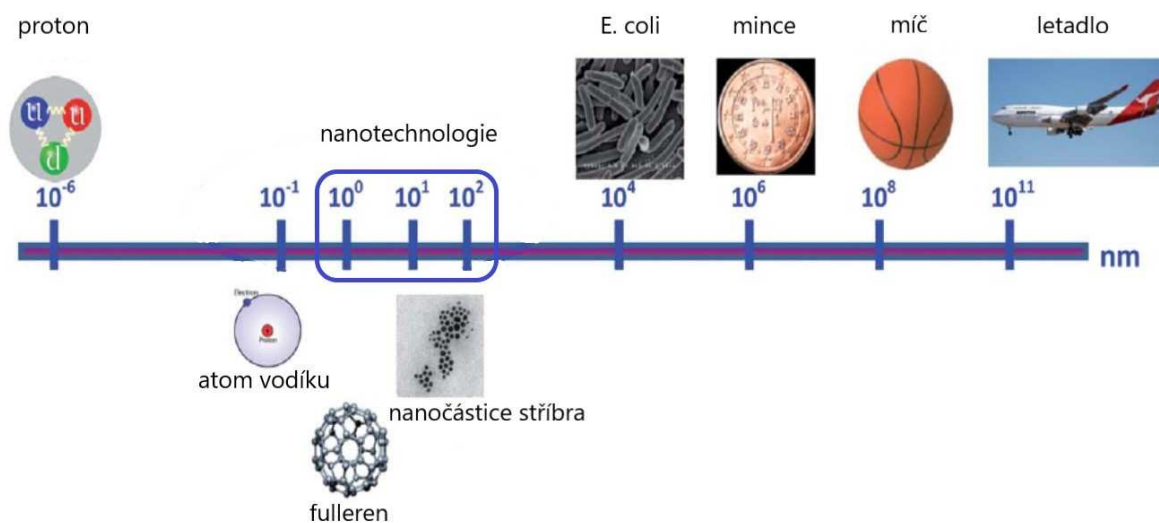
*Obrázek 1: Komplexní pohled na nanočástice. Převzato a upraveno z publikace [1].*

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 NANOČÁSTICE

#### 2.1.1 Historie nanočástic a úvod do nanotechnologií

Nanočástice (NPs) jsou objekty s rozměry menšími než 100 nm. Patří tedy mezi koloidní soustavy. To jsou disperzní systémy tvořené částicemi o rozměrech v rozmezí od 1 nm do 1000 nm. Koloidní (nano-) částice jsou nejčastěji rozptýlené v kapalném a plynném, případně ale i v pevném disperzním prostředí [3, 4]. Představu o velikosti „nanosvěta“ podává obrázek 2.



*Obrázek 2: Srovnání velikostí „nanosvěta“ a dalších různých entit. Převzato z publikace [1].*

Lidstvo pozorovalo koloidní systémy od prvních dnů civilizace a velmi brzy se naučilo využívat jejich vlastností a vyrábět máslo, sýry, jogurty nebo chléb, jež lze taktéž zahrnout do těchto soustav. Navíc, koloidy hrají významnou roli v mnoha přírodních jevech (mraky, dým apod.). I přes takto dlouhou historii, vědecké zkoumání těchto částic (zpočátku zejména zlatých) začalo poměrně nedávno.

Například alchymisté připravovali a používali různé formy koloidního zlata, tzv. „Aurum Potabile“ („pitné zlato“), které považovali za elixír života, nebo tzv. „Cassiův purpur“ k přípravě rubínového skla. První, kdo systematicky studoval koloidní částice zlata, byl v roce 1857 M. Faraday. Ve své práci rovněž nastínil stabilitu takových disperzí. Slovo „koloid“ pak poprvé použil v roce 1861 T. Graham [5]. Raketový rozvoj nanotechnologií byl však započat na začátku 60. let 20. století. Laureát Nobelovy ceny, Richard P. Feynman, měl 29. prosince 1959 v Kalifornském technologickém Institutu, na výročním zasedání Americké fyzikální společnosti přednášku s názvem „There’s Plenty of Room at the Bottom“. V rámci této přednášky představil technologickou vizi extrémní miniaturizace několik let předtím, než se slovo „chip“ stalo součástí slovníků. Inspirován například buňkami, mluvil o problému manipulace s věcmi ve velmi malém měřítku. Feynman představil technologii, kde by bylo lidstvo schopno budovat nanoobjekty, atom po atomu nebo molekula po molekule. Od 80. let 20. století, byla jeho vize potvrzena mnoha vynálezy a objevy v oblasti nanotechnologií. Nanotechnologie doslova znamená jakoukoli technologii v nanometrovém měřítku, kterou můžeme aplikovat v reálném světě [6]. Zahrnují v sobě tedy jak tzv. „lab on chip“ technologie (laboratoř na čipu) a mikro/nanoelektromechanické systémy, tak i právě nanočástice. Nanočástice nejčastěji dělíme do pěti hlavních skupin:

- fullereny a nanočástice na bázi uhlíku,
- kovové nanočástice a NPs připravené z oxidů kovů,
- keramické NPs,
- kvantové tečky (polovodičové a uhlíkové),
- polymerní NPs.

Mezi nanoobjekty však můžeme zařadit také organické útvary, jako jsou dendrimery, liposomy a micely. Navíc lze NPs připravovat v různých tvarech (např. kulové částice, jedno- i vícestěnné nanotrubičky, nanoklece, nanodestičky, klastry atomů, nanovlákna a nanodrátky nebo různé kombinace těchto tvarů) [3, 7], a to metodami dispergačními („top-down“) nebo kondenzačními („bottom-up“).

V případě dispergačních metod vyrábíme nanočástice z látek makroskopických rozměrů mechanickým nebo vibračním (ultrazvukovým) rozměňováním, případně elektrickým rozprašováním nebo peptizací. Naopak, u kondenzačních metod připravujeme nanočástice z analyticky disperzních systémů změnou fyzikálně-chemických podmínek



(teplotou, tlakem nebo snížením rozpustnosti) nebo chemickou přeměnou rozpuštěné látky na látku nerozpustnou různými typy chemických reakcí (srážecí, redukční, oxidační, hydrolytické, výměnné, apod.) [4, 8].

Díky tzv. „quantum size“ efektu a velkému povrchu se fyzikálně-chemické vlastnosti (mechanické, optické, elektrické, magnetické, či katalytické) a interakce takových materiálů s biologickými systémy zásadně a často neočekávaně liší od molekul nebo makroskopických látek, ze kterých byly připraveny [7, 9]. Příkladem může být závislost UV/Vis absorpčních spekter na rozdílných tvarech a velikostech zlatých a stříbrných nanočástic, nebo změna emise viditelného záření tzv. kvantových teček na jejich velikosti [10]. Kvůli těmto unikátním vlastnostem, a také širokým možnostem různých povrchových modifikací, se během několika posledních dekad staly nanoobjekty stále používanějším a vyhledávanějším materiálem v mnoha oblastech lidské činnosti, jako je např. stavebnictví, textilní průmysl, elektrotechnika, strojírenství, optika, chemický průmysl a mnoho dalších [7].

Navíc, u nanočástic s podobnými rozměry jako mají biomolekuly, může docházet k inkorporaci dovnitř buněk a tkání [11], což otevírá nové možnosti jejich využití v medicíně. Asi nejčastěji je této vlastnosti využíváno v tzv. cílené dopravě léčiv při léčbě nádorů. Na rozdíl od klasické chemoterapie, kde účinná látka postihuje celé tělo, cílená terapie zvyšuje koncentraci léčiva v místě onemocnění. Může být tedy použita ke zvýšení účinnosti, snížení vedlejších účinků nebo k dosažení obojího [12, 13]. Dále lze nanočástic v medicíně využít jako fluorescenčních značek [14], pro (bio)detekci patogenů [15], detekci proteinů (tzv. „bio bar code“ technologie) [16], při skenování struktury DNA [17], ve tkáňovém inženýrství [18], k separaci a čištění biologických molekul a buněk [19] nebo jich lze využít jako kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) [18, 20]. Takové aplikace, však přináší spoustu otázek ohledně chování nanoobjektů přítomných v živých organismech. Z těchto důvodů v současné době existuje velká poptávka po vývoji a validaci nových, vysoce výkonných, spolehlivých a přesných technik pro charakterizaci a kvantifikaci NPs.

## **2.1.2 Vlastnosti nanočástic a koloidních soustav**

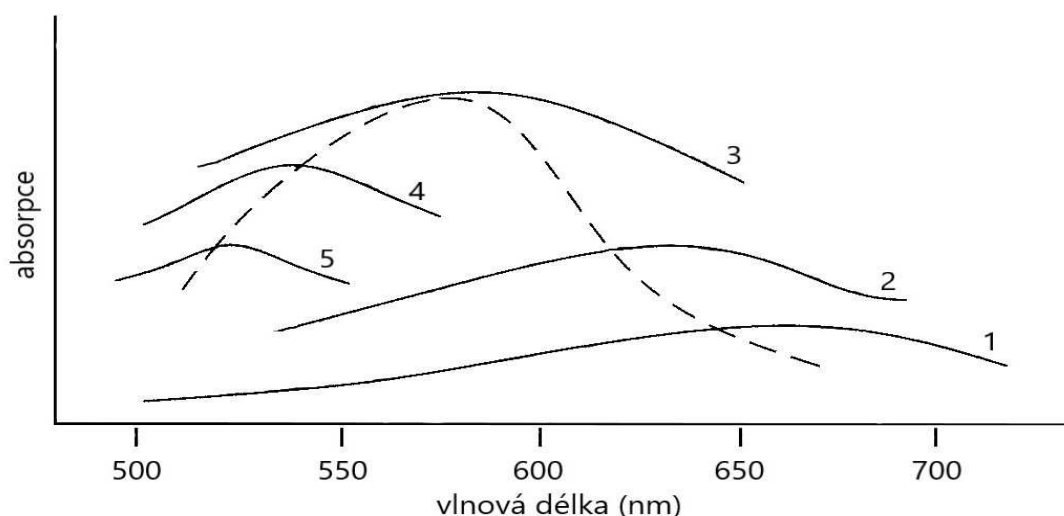
### **2.1.2.1 Kinetické vlastnosti**

V 19. století bylo pozorováno (Brown), že malé mikroskopické částice rozptýlené v kapalině vykazují nepravidelné pohyby, jako kdyby byly zasaženy jinými sousedními molekulami. Tento nepravidelný, Brownův pohyb, vzniká nárazy molekul disperzního prostředí, jež jsou způsobeny tepelným (kinetickým) pohybem těchto molekul. Koloidní částice se pak tedy pohybuje ve směru výslednice sil nárazů, dokud ji další nárazy molekul disperzního prostředí nevychýlí jiným směrem. Pokud tedy nejsou silou gravitace táhnuty ke dnu, zůstávají tyto částice rozptýleny v disperzním prostředí. Kinetická stálost koloidních soustav závisí na poměru rychlosti difúze a sedimentace. Nanočástice jsou vlivem difúze (Brownův pohyb), která působí proti sedimentaci, schopny udržet se v celém objemu disperzní fáze – jsou tedy kineticky (sedimentačně) stálé [8, 21].

### **2.1.2.2 Optické vlastnosti**

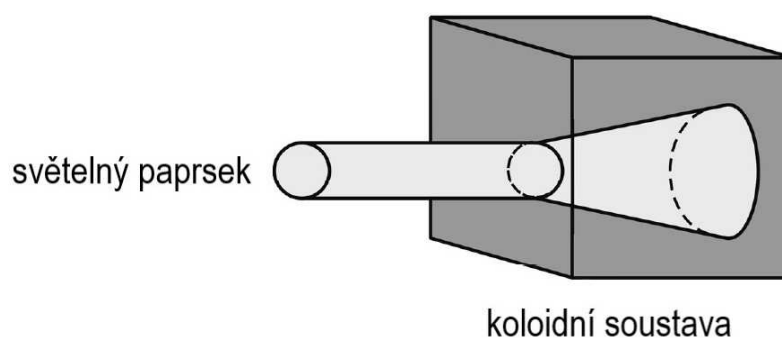
Při interakci elektromagnetického záření s částicemi koloidní soustavy lze pozorovat i lom a odraz záření, avšak nejvíce charakteristickými optickými vlastnosti těchto soustav jsou rozptyl záření nebo jeho absorpce. Podle charakteru koloidní soustavy (chemické složení disperzní fáze, velikost částic) pak jeden z uvedených jevů (absorpce nebo rozptyl) převládá. U analyticky disperzních systémů se uplatňuje převážně absorpce, zatímco s rostoucí velikostí částic se začíná více projevovat rozptyl.

Absorpcí záření dochází ke zvýšení vnitřní energie molekul systému, která se přemění v energii tepelnou. Jak známo, absorpci světla látkou popisuje Lambert-Beerův zákon. Ten je však u koloidních soustav komplikován již zmíněnou závislostí absorpce záření na velikosti částic disperzní fáze (obrázek 3), což je pozorovatelné zejména u elektricky vodivých koloidních částic (částice kovů).



*Obrázek 3: Absorpční spektra koloidů zlata měnící se s narůstajícím stupněm disperzity částic. S rostoucím stupněm disperzity se posouvá absorpční maximum částic zlata ke kratším vlnovým délkám. Vyšší pořadové číslo křivek odpovídá vyššímu stupni disperzity. Převzato z publikace [8].*

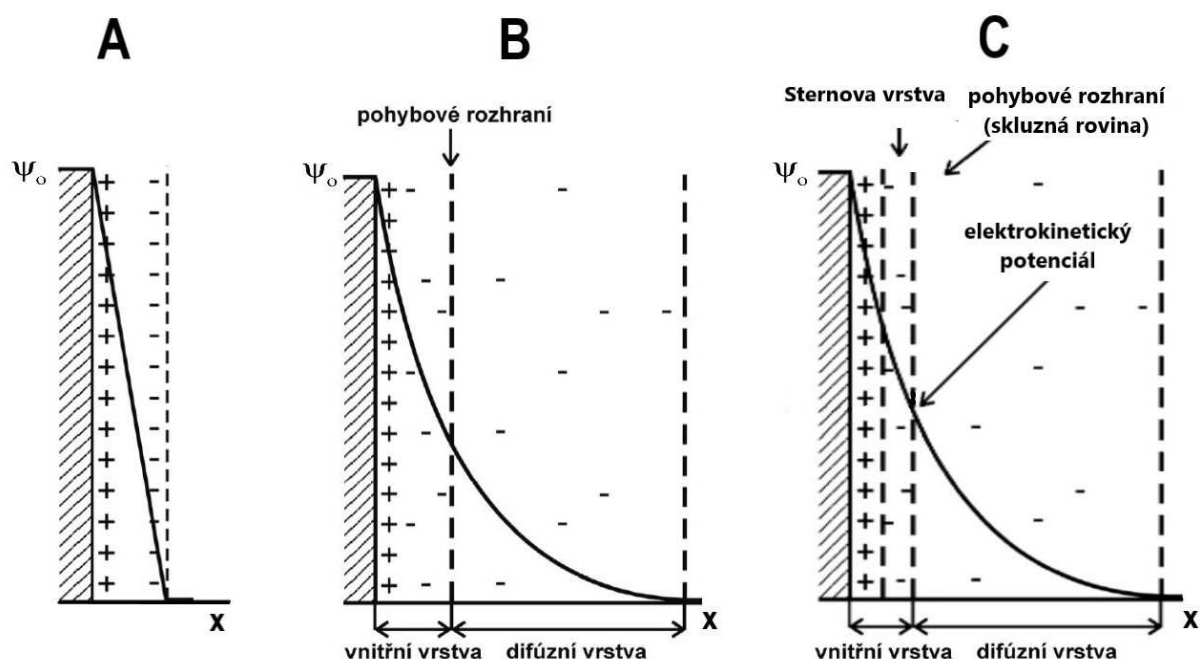
Rozptyl světla je složitým jevem, který v sobě podle okolností zahrnuje odraz, lom, ohyb i interferenci světla a je pozorovatelný pouze u systémů s různými indexy lomu disperzních částic a disperzního prostředí. Při rozptylu záření na rozdíl od absorpce nedochází k energetickým změnám vazebných elektronů, ale kvantum přijaté energie je následně vyzářeno náhodně všemi směry, přičemž se nemění jeho vlnová délka. Na rozdíl od hrubých disperzí v koloidních systémech, s rozměry částic srovnatelnými s vlnovou délkou světla nebo menšími (nanočástice), je intenzita rozptýleného světla nižší. Proto jsou koloidní disperze v tenkých vrstvách obvykle v procházejícím světle čiré a jemný zákal se projeví až v silnějších vrstvách. Rozptyl světla jako první kvalitativně pozoroval v 17. století Tyndall (efekt rozšiřujícího se paprsku procházejícího disperzním prostředím je znázorněn na obrázku 4), zatímco Rayleigh vypracoval teoretický popis rozptylu světla na malých, dostatečně od sebe vzdálených koloidních částicích, které nevykazují vlastní absorpci záření (1871) [4, 8].



*Obrázek 4: Tyndallův jev. Převzato z publikace [8].*

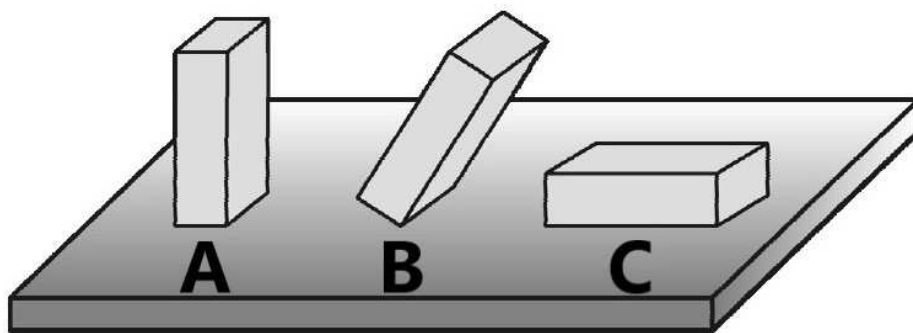
### **2.1.2.3 Elektrické vlastnosti – elektrická dvojvrstva a stabilita koloidů**

Pokud jsou koloidní a nano- částice elektricky nabitě, dojde v okolní kapalině k uspořádání iontů do struktury nazývané elektrická dvojvrstva. Základní model vypracoval Helmholtz, na základě podobnosti s uspořádáním deskového kondenzátoru, jež byl dále zpřesněn Gouyem a Chapmanem a později Sternem. Sternův model rozděluje druhou polovinu elektrické dvojvrstvy s kompenzujícími ionty na dvě části - kompaktní (vnitřní nebo Sternovu) a difúzní vrstvu (vnější). Toto rozdělení je velmi důležité, poněvadž na hranici mezi kompaktní a difúzní částí elektrické dvojvrstvy (tzv. skluzná rovina) zůstává nevykompenzovaný náboj o hodnotě určující tzv. elektrokinetický (zeta,  $\zeta$ -) potenciál. Ten je odpovědný za interakci s vnějším elektrickým polem, tedy za tzv. elektrokinetické jevy (elektroforéza, elektroosmóza, potenciál proudění a sedimentační potenciál) [8]. Vývoj modelu elektrické dvojvrstvy je ukázán na obrázku 5.

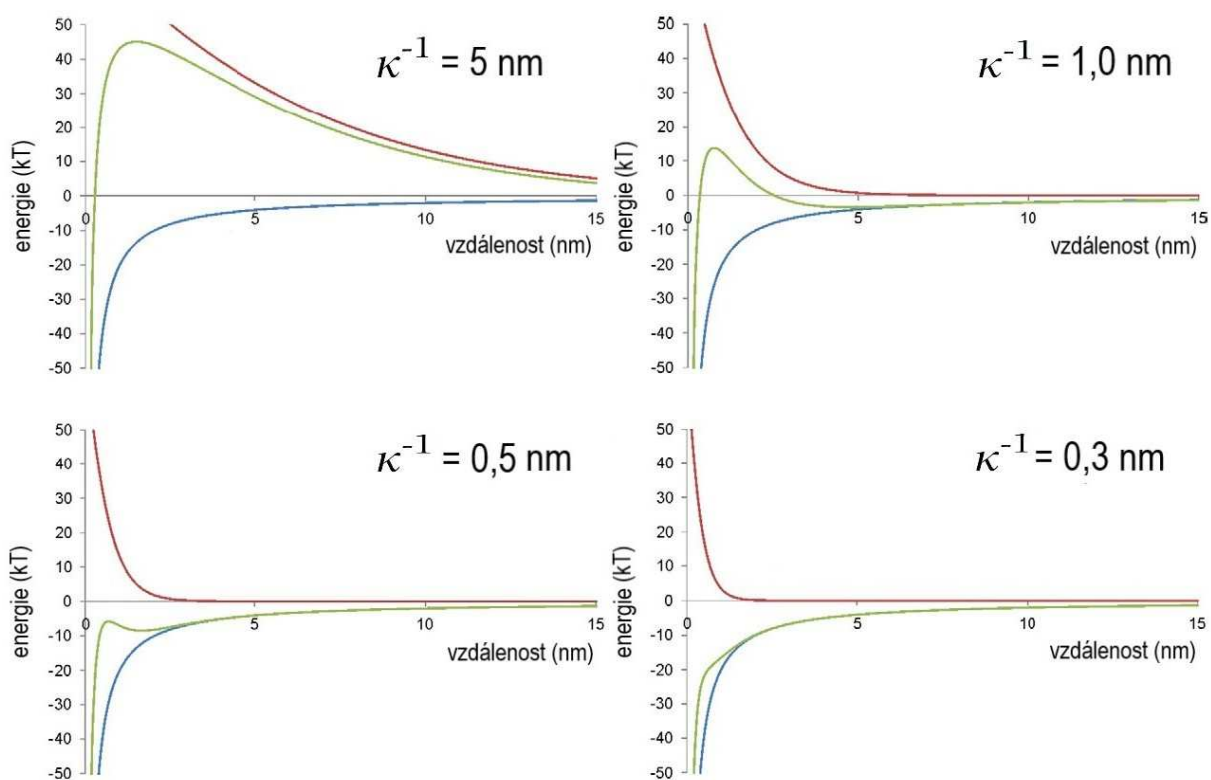


*Obrázek 5: Vývoj modelu uspořádání elektrické dvojvrstvy. A) Helmholtzův model, B) Gouyho-Chapmanův model, C) Sternův model.  $\Psi_0$  značí povrchový potenciál částice a  $x$  je vzdálenost od povrchu částice. Převzato a upraveno z publikace [8].*

Obecně platí, že nanočástice nejsou příliš stabilní (vyskytují se v tzv. metastabilním stavu – obrázek 6) a relativně ochotně aglomerují do větších celků, což je termodynamicky výhodnější. Tato tendence k agregaci je způsobena vysokou povrchovou energií a velkým povrchem. Aby se zabránilo této aglomeraci, musí být NPs stabilizovány, a to buď elektrostaticky nebo stericke. Zeta potenciál hraje významnou roli, také z pohledu stability. Obecně platí, že čím je vyšší jeho absolutní hodnota, tím je vyšší i stabilita u elektrostaticky stabilizovaných částic (silnější elektrostatické odpuzování částic). Při stericke stabilizaci jsou na nanočástice (koloidy) silně koordinačně navázány ochranné ligandové vrstvy. Tyto ligandy pak poskytují zejména stericke ochranu, ale rovněž mohou částice stabilizovat elektrostaticky. Mezi takové ochranné ligandy patří např. polymery, povrchově aktivní látky nebo iontové kapaliny. Stabilitu koloidů a nanočástic, popisuje DLVO teorie, kterou vyvinuli Derjaguin a Landau (1941) + Verwey a Overbeek (1948), jako rovnováhu mezi Coulombovými silami a van der Waalsovými přitažlivými silami (obrázek 7) [22].



*Obrázek 6: Znáornění mechanické rovnováhy: A) metastabilní, B) nestabilní a C) stabilní poloha. Převzato z publikace [8].*



*Obrázek 7: Příklad závislosti interakční energie (zelená křivka) na vzájemné vzdálenosti dvou objektů kulového tvaru ( $R = 0,5 \text{ nm}$ ,  $\zeta = 15 \text{ mV}$ ), vypočtených podle DLVO teorie. Červeně je znázorněna křivka odpudivých sil, modře křivka přitažlivých sil.  $\kappa^{-1}$  je zde tzv. Debyeho délka (viz kapitola 2.3.3),  $R$  je poloměr částice. Převzato z publikace [23].*

Je zřejmé, že povrchová chemie NPs, má zásadní dopad na jejich chování. Například různě stabilizované NPs (citrátem, polyethyleniminem nebo polyvinylpyrrolidonem, atd.) jsou přítomny v různých koloidních formách, lišících se zeta potenciály a hydrodynamickými průměry [24]. Navíc bylo zjištěno, že různé formy NPs (např. nanostříbro stabilizované různým množstvím citrátu) má různý vliv na jeho toxicitu [25]. Elektroforetickou agregaci částic popsali Nichols a kol. [26]. Ve své práci vypočítali kritéria stability a „agregační spád“ pro ne-Brownovské kulové částice s rozdílnými zeta potenciály a různými tloušťkami elektrických dvojvrstev. Někteří autoři také diskutovali vliv elektrolytu na stabilitu koloidů [27-29]. Například Petr a kol. [30] studovali pomocí CE stabilitu  $\alpha$ -laktalbuminem funkcionalizovaných nanočástic typu „core-shell“, kde je maghemitové jádro obklopeno vrstvou oxidu křemičitého ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>), v pufrech o různém složení, různém pH, iontové síle apod. Je zde ukázáno, jak lze pomocí CE podle profilů píků odhalit počátek agregace nanočástic o přibližně 1-2 dny dříve, než je viditelná okem. Kromě toho také používali didecyldimethylammoniumbromid (DDAB) pro dynamické pokrytí vnitřního povrchu kapiláry, kvůli minimalizaci interakce mezi stěnou kapiláry a nanočásticemi.

### 2.1.3 Metody charakterizace NPs

Nanomateriály jsou charakterizovány z hlediska:

- velikosti částic,
- distribuce velikosti,
- morfologie,
- chemického složení,
- povrchového náboje.

Běžně používanými technikami pro takovou charakterizaci jsou: transmisní elektronová mikroskopie (TEM), mikroskopie atomárních sil (AFM), dynamický rozptyl světla (DLS, také nazýván jako fotonová korelační spektroskopie), fluorescenční korelační spektroskopie (FCS), povrchová plazmonová rezonance (SPR), analýza trasování nanočástic (NTA), analytická ultracentrifugace (AUC), frakcionace tokem v asymetrickém tokovém poli (aF-FFF nebo AF4), infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR), rentgenová difrakce (XRD), řádkovací tunelová mikroskopie a řádkovací tunelová spektroskopie (STM a STS), diferenční mobilní analýza (DMA), Taylorova disperzní analýza (TDA) nebo již zmíněná UV/Vis spektrometrie.

Nicméně, některé tyto techniky jsou velmi časově náročné, komplikované a většina z nich vyžaduje úpravu vzorku, kde některý krok takové operace může zničit biologicky aktivní prostředí. To je samozřejmě nevýhodné, protože je velmi důležité znát chování a koncentraci nanočástic v biologických vzorcích pro stanovení jejich toxicity, stability, a také zkoumat interakce těchto částic s (bio)molekulami v biologických vzorcích nebo buněčných médiích [3, 31-37]. Tyto nevýhody však lze překonat použitím separačních metod, zejména pomocí (ultra)vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC, případně UHPLC nebo UPLC) nebo, jak už bylo naznačeno, různých módů kapilární elektroforézy (CE).

Majedi a Lee ve svém přehledovém článku shrnuli nedávné pokroky v separaci a kvantifikaci kovových nanočástic s důrazem na možnost použití prvkově specifických detektorů a použitelnost těchto technik na vzorky životního prostředí [38]. Je zřejmé, že kapilární elektromigrační techniky, jež odrážejí velikost a iontové chování NPs, představují jedinečný nástroj pro charakterizaci nanomateriálů ve vodném, nevodném, nebo biologickém prostředí [31]. To jsou hlavní důvody, proč se v současné době charakterizace koloidních částic nebo nanočástic (včetně mikroorganismů) těmito metodami těší zvýšenému zájmu. Tato oblast výzkumu se stále rozšiřuje, ačkoli byla CE původně vyvinuta pro separaci jiných typů analytů [31, 39].



## 2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ TECHNIKY

### 2.2.1 Historie a úvod do kapilárních elektromigračních metod

Ačkoliv byl termín „elektroforéza“ (z řečtiny, obecně znamená transport pomocí elektriny) vytvořen již v roce 1909 Michaelisem, první průkopnické elektroforetické experimenty byly provedeny až roku 1937 Tiseliem, který za výzkum elektroforézy a adsorpční analýzy (zejména objevy týkající se komplexní povahy sérových proteinů), získal Nobelovu cenu [40]. Tiselius jako první použil elektroforézu (tzv. metodu pohyblivého rozhraní) pro separaci sérových proteinů – albuminu a  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -globulinů. Touto aplikací začala být elektroforéza vnímána jako potenciální nástroj pro separaci biologicky aktivních molekul. Zprvu však bylo použití elektroforetických technik omezeno neúplnou separací proteinů, relativně velkou spotřebou vzorku a nutností použít relativně nízké intenzity elektrického pole, kvůli vznikajícím vysokým elektrickým proudům, které způsobují nadměrné uvolňování Jouleova tepla.

Ve čtyřicátých letech 20. století bylo vynaloženo velké úsilí zaměřené na vývoj lepších, médií pro zónovou elektroforézu. Zatímco papírová elektroforéza byla v té době použitelná k analýze široké škály molekul (analýza bílkovin, dělení nízkomolekulárních látek nebo aminokyselin), gely na bázi škrobu a později agarózy byly vyvinuty zejména pro analýzu peptidů, proteinů a oligonukleotidů [41]. Počátkem 60. let pak Hjertén položil základy kapilární elektroforézy (CE). V tomto období prováděl elektroforetické experimenty v křemenné U-trubicí o vnitřním průměru 3 mm. To lze považovat za první zónovou elektroforézu ve volném roztoku. V tomto uspořádání bylo dosaženo značného snížení potřebného množství vzorku proteinů pro analýzu, zároveň zvýšení účinnosti, zlepšení detekčních limitů (bylo možno stanovit 0,1 % proteinů ve vzorku), a také došlo k významnému zvýšení přesnosti stanovení.

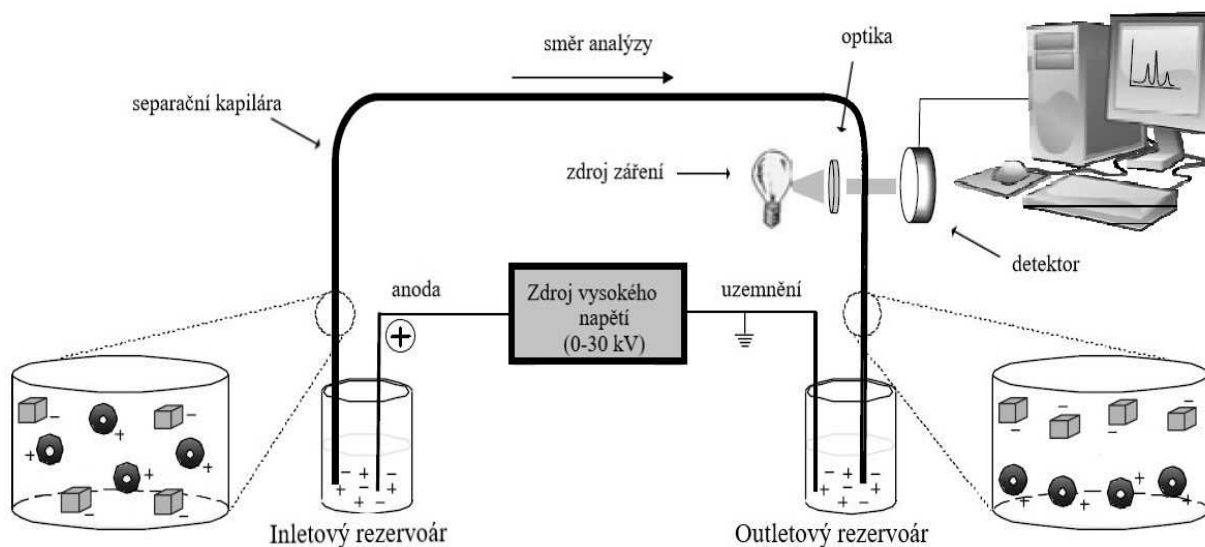
Bylo také zjištěno, že snížením průměru trubice může být dosaženo lepšího rozlišení (elektroosmóza byla v těchto pokusech eliminována pokrytím trubice methylcelulózou). Například Everaerts již v roce 1963 použil skleněnou kapiláru s vnitřním průměrem 0,5 mm. V roce 1967 Hjertén prezentoval práci, ve které představil zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu ve volném roztoku. Zde bylo kapilárou otáčeno kolem osy, pro minimalizaci

účinků konvekce. Toto zařízení navíc mohlo být použito i pro další, v té době již známé, kapilární elektromigrační techniky (izoelektrická fokusace a izotachofóreza). Problémy s konvekcí byly vyřešeny dalším snižováním vnitřního průměru použitých kapilár (0,2 mm – Virtanen), čímž bylo rovněž dosaženo zjednodušení Hjerténova přístroje. Jorgenson a Lukacs pak ve své práci na počátku 80. let použili kapiláru o průměru 75  $\mu\text{m}$ , na něž je možno vkládat vysoké napětí, a které jsou používány dodnes [41-43]. Jorgenson také objasnil teorii, popsal vztahy mezi provozními parametry a kvalitou separace a demonstroval potenciál CE stát se analytickou technikou [44].

Kapilární elektroforetické metody, souhrnně nazývány vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE), se dnes tedy provádějí v kapilárách o vnitřním průměru nejčastěji v rozmezí 25-100  $\mu\text{m}$ . Díky vysokému elektrickému odporu těchto kapilár je na ně možno vkládat vysoké elektrické napětí (nejčastěji do 30 kV). Intenzita elektrického pole se pak v takových kapilárách nejčastěji pohybuje v rozmezí 100 až 500 V/cm, při minimálním generování Jouleova tepla. To lze navíc účinně odvádět díky příznivému poměru povrch/vnitřní objem. Použití napětí v řádu kV má za následek krátké časy analýz, dobré rozlišení a vysokou účinnost separace, často přesahující  $10^5$  teoretických pater. Mezi další výhody CE patří jednoduchost zařízení, relativně nízká provozní a pořizovací cena, velmi malá spotřeba vzorků (typicky 1-20 nl) a reagensů, včetně organických rozpouštědel a možnost detekce analytů přímo v kapiláře. Jedna z největších výhod kapilárních elektromigračních metod však spočívá v jejich univerzálnosti. Lze pomocí nich stanovovat jak anorganické ionty, tak složitější látky, jako například aminokyseliny, chirální léčiva, vitamíny, pesticidy, organické kyseliny, barviva, tenzidy, peptidy a proteiny, sacharidy, oligonukleotidy, fragmenty DNA, atd. Velmi zajímavá je aplikace kapilárních elektromigračních technik pro analýzu a charakterizaci větších objektů, jako jsou buňky, viry nebo třeba právě nanočástice [44, 45].

Na obrázku 8 je ukázáno schéma přístroje pro kapilární elektromigrační techniky. Základními částmi jsou zdroj vysokého napětí, kapilára vedoucí optickou dráhou detekčního systému (DAD detektor) připojeného k zařízení pro sběr dat a zařízení pro zavádění vzorku. CE přístroj je v dnešní době v drtivé většině případů ovládán pomocí osobního počítače. Kapilára, nejčastěji křemenná (mohou být i teflonové nebo ze skla, tzv. Pyrex), je před analýzou naplněna vhodným základním elektrolytem (pufrem) a je do ní zavedena zóna vzorku, a to do jejího konce, který je (nejčastěji) dále od detektoru. Oba její konce jsou

umístěny v rezervoárech obsahujících pufr, kde se pro zajištění elektrického kontaktu mezi zdrojem napětí a kapilárou nachází také elektrody. Jedna z elektrod je kabelem připojena ke zdroji napětí, zatímco druhá je připojena k zemnicímu kabelu. Elektrody jsou vyrobeny z inertních materiálů, nejčastěji však z Pt [44, 45].



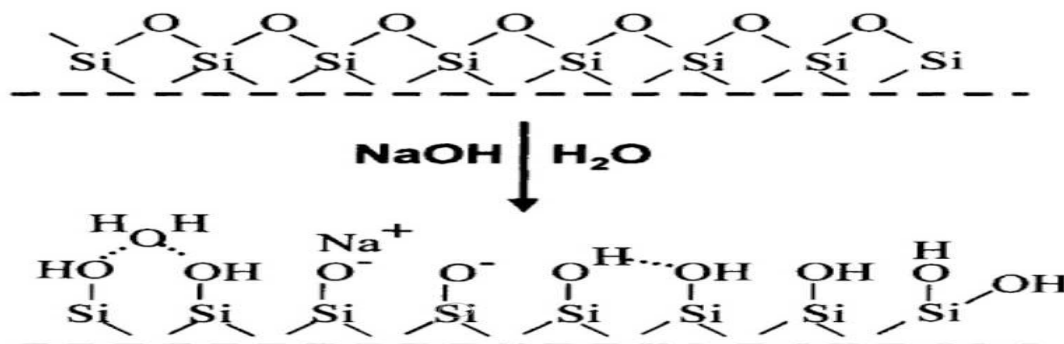
*Obrázek 8: Obecné schéma zařízení pro kapilární elektromigrační techniky. Převzato a upraveno z publikace [41].*

## 2.2.2 Principy separace a elektroosmotický tok

Elektroforéza je tedy pohyb elektricky nabitých částic (iontů) nebo molekul ve vodivém kapalném médiu (většinou vodném) vlivem elektrického pole. Elektricky nabitě analyty zavedené do kapiláry po aplikaci napětí migrují k příslušným elektrodám. A to svými charakteristickými pohyblivostmi (elektroforetickými mobilitami), jež závisí na poměru náboj/velikost. Pokud tedy máme ionty o stejném náboji, ale různé velikosti, budou menší ionty migrovat rychleji než ionty větší. Pokud máme naopak ionty o stejné velikosti, avšak lišící se nábojem, budou migrovat rychleji ty ionty, které nesou větší náboj. Tímto způsobem dochází k separaci analytů [46].

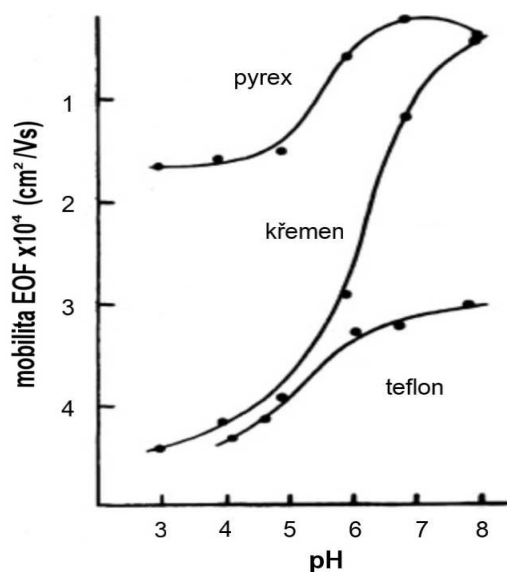
Velmi důležitým jevem, vyskytujícím se v kapilárních elektromigračních technikách, je tzv. elektroosmotický tok (EOF). Ten byl poprvé popsán Helmholtzem koncem 19. století. Elektroosmotický tok vzniká (v případě křemenných kapilár) v důsledku ionizace kyselých silanolových skupin přítomných na vnitřním povrchu (křemenné) kapiláry, které jsou

v kontaktu s elektrolytem. Pokud je tedy pH použitého elektrolytu vyšší, než je pK silanolových skupin, dochází k jejich disociaci (obrázek 9).



*Obrázek 9: Povrch kapiláry před a po hydrolyze. Převzato z publikace [47].*

Výsledkem je pak záporně nabitá stěna kapiláry. Aby byla zachována elektroneutralita, jsou u povrchu kapiláry silně drženy kationty a vytváří vnitřní vrstvu elektrické dvojvrstvy. Další kationty, nacházející se v difúzní části elektrické dvojvrstvy, se začnou po aplikaci napětí pohybovat i se svými solvatačními obaly. Tím dochází k pohybu celého roztoku uvnitř kapiláry. Elektroosmotický tok tedy plní úlohu „elektrokinetické pumpy“. EOF je však pozorovatelný nejen u kapilár vyráběných z taveného křemene, ale také u kapilár, které jsou neiontové povahy (např. teflon), což bývá připisováno adsorpcí iontů na povrch těchto kapilár [44, 45]. Vliv pH na mobilitu elektroosmotického toku v kapilárách z různých materiálů je ukázán na obrázku 10.



*Obrázek 10: Vliv pH na mobilitu elektroosmotického toku v kapilárách z různých materiálů. Převzato z publikace [44].*

Pohyb EOF je za normálních operačních podmínek ve směru od anody ke katodě a jeho velikost může být vyjádřena mobilitou  $\mu_{EOF}$ :

$$\mu_{EOF} = \varepsilon\zeta/4\pi\eta \quad (1)$$

kde  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta použitého základního elektrolytu,  $\zeta$  je zeta potenciál přítomný na rozhraní vnitřní a vnější elektrické dvojvrstvy kapiláry a  $\eta$  je viskozita pufru.

Na rozdíl od rychlosti elektroosmotického toku, která závisí i na velikosti aplikovaného napětí (intenzitě elektrického pole), je jeho mobilita závislá hlavně na vlastnostech použitého elektrolytu, kterými jsou: pH, koncentrace nebo iontová síla nebo přítomnost organických rozpouštědel. Dalšími možnostmi jak ovlivnit mobilitu EOF je teplota, modifikace stěny kapiláry nebo aplikace radiálního napětí na stěnu kapiláry [41, 44, 46]. V systémech, kde se vyskytuje EOF je pohyblivost analytů v CE ovlivňována jak elektroosmotickým tokem, tak vlastní (efektivní) mobilitou ( $\mu_{eff}$ ). Experimentálně měřenou veličinou je migrační čas, z něhož lze přímo vypočítat tzv. zdánlivou mobilitu ( $\mu'$ ). Pro zjištění efektivní mobility analytů, je tedy potřeba odečíst vliv EOF („vektory“):

$$\mu' = \mu_{eff} + \mu_{EOF} \quad (2)$$

Vzhledem k tomu, že je mobilita EOF obvykle vyšší, než mobilita záporně nabitých analytů, je veškerý roztok přítomný v kapiláře účinně „čerpán“ k detektoru [46]. EOF je většinou u kapilárních elektromigračních technik výhodným jevem a to zejména ze dvou hlavních důvodů. Prvním je, že směs aniontů a kationtů může být stanovená v jedné analýze. Bez něj by pro stanovení iontů v takovém vzorku bylo zapotřebí dvou analýz, přičemž každá by probíhala při jiné polaritě. Druhou hlavní výhodou je, že ionty, které se poměrně hodně liší svými poměry náboj/velikost, mohou být separovány v relativně rozumném čase a analýza tedy není příliš dlouhá. I přes tyto výhody je někdy lepší EOF zastavit, změnit jeho velikost, nebo dokonce obrátit. Například analýza aniontů, může být obrácením EOF značně urychlena, zpomalením EOF může být dosaženo lepšího rozlišení, jeho zastavení bývá často využíváno v kapilární izotachofórze, kapilární izoelektrické fokusaci, tzv. metodě částečného plnění (viz kapitola 2.2.3.7), apod. Zastavení nebo výrazné snížení elektroosmotického toku bývá realizováno chemickou modifikací povrchu kapiláry a to buď dynamicky, nebo kovalentním pokrytím. U dynamické modifikace je jednoduše modifikátor přidán do pufru. Velmi často je k těmto účelům využíváno derivátů celulózy (hydroxyethylcelulóza – HEC, methylhydroxyethylcelulóza – MHEC), neiontových tenzidů (polyoxyethylensorbitan monooleát – TWEEN, ethoxylovaný *p-terc.*-oktylfenol – Triton X) nebo různě dlouhých řetězců polyethylenglykolu (PEG). Při kovalentním pokrytí dochází k navázání vhodných polymerů na stěnu kapiláry, za vzniku monomolekulární vrstvy. Těmi jsou nejčastěji polyakrylamid (PAM), polyvinylalkohol (PVA) nebo polyvinylpyrrolidon (PVPP) [46, 48]. Nejběžnější metody, jak měnit EOF jsou shrnuty v tabulce 1.

*Tabulka 1: Nejběžnější metody pro kontrolu elektroosmotického toku. Převzato z publikace [44].*

<b>Proměnná</b>	<b>Důsledek</b>	<b>Poznámky</b>
<b>Intenzita elektrického pole</b>	Mobilita EOF se mění úměrně síle elektrického pole.	Velká intenzita el. pole generuje více tepla v kapiláře. Může dojít i ke zkratu nebo jiskření.
<b>pH elektrolytu</b>	Mobilita EOF klesá se snižující se hodnotou pH a naopak .	Může dojít ke změně náboje analytů
<b>Iontová síla (<i>I</i>)</b>	Zvýšení <i>I</i> vede ke snížení zeta potenciálu, čímž klesá mobilita EOF	Vysoká <i>I</i> - větší generování Jouleova tepla. Nízká <i>I</i> – možnost adsorpce analytů na stěnu kapiláry Deformace tvaru píku, pokud je vodivost BGE jiná než vodivost zóny vzorku
<b>Teplota</b>	Zvýšení teploty vede ke snížení viskozity a zvýšení mobility EOF (2-3 %/°C).	Kapiláru je potřeba termostatovat
<b>Organická rozpouštědla</b>	Mění zeta potenciál, permitivitu a viskozitu elektrolytu.	Komplexní změny EOF, je potřeba měřit experimentálně. Mohou měnit selektivitu separace.
<b>Tenzidy</b>	Mění velikost a směr EOF (dochází ke změně hustoty náboje nebo jeho znaménka).	Dynamická adsorpce na stěnu kapiláry skrz hydrofobní a elektrostatické interakce
<b>Neutrální hydrofilní polymery</b>	Snižují velikost EOF stíněním náboje povrchu kapiláry a zvyšováním viskozity.	Adsorpce na kapilární stěnu skrz hydrofilní interakce. Potlačení interakcí analyt-stěna kapiláry.
<b>Kovalentně pokrytý povrch kapiláry</b>	Zastavují EOF nebo mění jeho velikost v závislosti na charakteru pokrytí (náboj, polarita).	Možnost mnoha modifikací. Může být problematická stabilita pokrytí. Změna povrchových vlastností, a tudíž interakcí analyt-stěna kapiláry

## 2.2.3 Módy kapilárních elektromigračních metod

CE analýzy mohou být provozovány v několika různých režimech (módech). Mezi tyto módy patří:

- kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- (micelární) elektrokinetická chromatografie (EKC, MEKC, MECC)
- kapilární elektrochromatografie (CEC)
- kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
- kapilární izotachoforéza (CITP)
- afinitní kapilární elektroforéza (ACE)

Volba módu pak závisí na analytu, a také na tom, co operátor od analýzy očekává (zvýšení rychlosti, selektivity, apod.) [47]. V tabulce 2 je ukázán přehled nejběžnějších módů CE a typických aplikací.

*Tabulka 2: Typické aplikace nejběžnějších módů CE. Převzato a upraveno z publikace [41].*

CZE	MEKC	CEC	CGE	CIEF	CITP	ACE
Ionty	Neutrální látky	Malé molekuly	Nukleové kyseliny	Peptidy	Malé ionty	Separace látek podléhajících specifickým interakcím
Malé molekuly	Malé molekuly	Peptidy	Proteiny	Proteiny	Proteiny	Zjišťování interakčních konstant
Peptidy		Proteiny		Aminokyseliny	Peptidy	
Proteiny		Sacharidy			Zředěné vzorky	
Sacharidy						



### 2.2.3.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE (občas nazývána jako elektroforéza ve volném roztoku) je pro svou jednoduchost a univerzálnost nejčastěji používanou elektroforetickou metodou. Při analýze v tomto uspořádání jsou od sebe látky separovány pouze na základě jejich poměrů náboj/velikost a nedochází k žádným interakcím nebo dalším rovnováhám (kromě občasných interakcí analytů, často proteinů, se stěnou kapiláry, které jsou však nežádoucí).

Je použitelná pro separaci téměř všech ionizovaných látek, které jsou rozpustné v použitém pufru. Díky dostatečně silnému elektroosmotickému toku mohou být kationty i anionty separovány v jedné analýze, avšak neutrální látky separovány nejsou (jsou unášeny v jedné zóně pouze rychlostí EOF). Pro látky nerozpustné ve vodném prostředí, lze použít kapilární elektroforézu v prostředí nevodném. Nevodné systémy v CE jsou na bázi rozpouštědel, jako je acetonitril, methanol, formamid a dimethylformamid, ke kterým se přidá malé množství bezvodé kyseliny nebo solí [46, 47].

### 2.2.3.2 (Micelární) elektrokinetická chromatografie (EKC, MEKC, MECC)

MEKC byla poprvé představena Terabem a kol. roku 1984 a velmi rozšířila aplikovatelnost elektroforetických metod. Kromě iontů lze díky ní analyzovat a separovat také neutrální látky.

Princip elektrokinetické chromatografie spočívá v přidání nabitě látky (nebo částic) do nosného elektrolytu, která dokáže různě silně interagovat s různými neutrálními analyty. Tak dochází k jejich pohybu také. V případě MEKC (nejčastější případ) tuto úlohu plní tenzidy (velmi často dodecylsulfát sodný – SDS). Ty jsou do separačního pufru přidávány v dostatečné koncentraci, aby byla umožněna tvorba micel (nad kritickou micelární koncentrací – CMC). Micely jsou útvary, jež mají (ve vodném prostředí) hydrofobní vnitřní jádro, zatímco jejich vnější povrch je hydrofilní. Vytvořené micely pak v elektrickém poli migrují opět podle svých poměrů náboj/velikost. Neutrální látky, které se liší svými rozdělovacími koeficienty mezi vodnou fází (pufr) a vnitřním jádrem micel jsou pak na základě různě silných interakcí od sebe separovány.

Vzhledem k tomu, že separační mechanismus je analogický s mechanismem uplatňujícím se v HPLC s reverzními fázemi (RP-HPLC), bývá micelární fáze často nazývána

jako „pseudostacionární“. Jedná se tedy o hybridní techniku, kombinující výhody CZE a HPLC.

Hydrofilní neurální látky, které s micelami vůbec neinteragují, jsou tedy unášeny pouze elektroosmotickým tokem a jsou eluovány v čase  $t_0$ . Jedná se tedy o EOF „markery“, a patří mezi ně např. metanol nebo acetonitril. Naproti tomu extrémně hydrofobní látky, které jsou celou dobu přítomny v micelách, tzv. „markery“ micel, jsou eluovány v čase  $t_{mic}$  (např. Sudan III, dodekanofenon, tokoferol). Tyto dva extrémy definují tzv. retenční (eluční) okno, což znamená, že mezi těmito časy je potřeba aby byly eluovány všechny analyty. Eluční okno lze zvětšit přidávkem organických rozpouštědel nebo modifikací stěny kapiláry. Lepšího rozlišení a selektivity lze v MEKC dosáhnout použitím jiného tenzidu, nebo vnesením další interakční rovnováhy, např. použití neiontových tenzidů nebo třeba přidávkem cyklodextrinu (cyklodextrinem modifikovaná MEKC) [46, 47, 49].

Časy  $t_0$  a  $t_{mic}$  jsou rovněž důležité pro výpočet kapacitních faktorů analytů. Navíc, vzhledem k tomu, že existuje lineární vztah mezi logaritmy kapacitních faktorů látek a logaritmy jejich rozdělovacích koeficientů ( $\log P$ ), je možno pomocí MEKC tyto koeficienty stanovit pouhým srovnáním s kapacitními faktory získanými analýzou standardů o známých  $\log P$  za stejných podmínek [50-52].

### 2.2.3.3 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

CEC je vlastně typem kapalinové chromatografie. Využívá však pro průtok mobilní fáze a unášení analytů kolonou místo klasické pumpy (používané v HPLC) elektroosmotického toku. Kapiláry pro CE v tomto případě plní funkci kolon a jsou nejčastěji naplněné sorbenty typickými pro RP-HPLC.

První CEC analýzu provedli Jorgenson a Lukacs roku 1981 za použití kapiláry (170  $\mu\text{m}$  vnitřní průměr), která byla naplněna C18 částicemi (stacionární fáze) o velikosti 10  $\mu\text{m}$ .

Separace neutrálních látek je dosaženo pouze rozdílnými interakcemi se stacionární fází, zatímco nabitě látky jsou separovány jak tímto mechanismem, tak navíc i díky svým rozdílným mobilitám. Oproti HPLC lze u CEC zvyšovat účinnost snížením velikosti částic stacionární fáze, aniž by docházelo ke zvyšování tlaku uvnitř kolony a je tedy možno použít delších kapilár. Další výhodou je plochý profil elektroosmotického toku, který (oproti parabolickému hydrodynamickému toku) nepřispívá tolik k rozmývání zón [44, 49].

### **2.2.3.4 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)**

V tomto módu je kapilára naplněna gelem nebo velmi viskózním roztokem. EOF je často eliminován, takže analyty migrují pouze svými vlastními mobilitami. V CGE jsou větší molekuly (a částice) zpravidla více zpomalovány viskózním separačním médiem, než menší molekuly, takže separace je založena zejména na rozdílech ve velikostech analytů. Proto je CGE vhodná hlavně pro separaci nabitých molekul, lišících se velikostmi, ne však svými poměry náboj/velikost (fragmenty DNA).

Kapilární gelová elektroforéza je tedy srovnatelná s tradiční plošnou elektroforézou, protože separační mechanismy jsou totožné. Kapilární formát však nabízí oproti tradičnímu uspořádání řadu výhod, včetně možnosti použití 10 až 100x vyšších intenzit elektrického pole bez nadměrného vývoje Jouleova tepla, on-line detekci v kapiláře, automatizaci, atd. Polymerní gely mohou být v CGE kovalentně zesíťované, vázané vodíkovými můstky nebo jednoduše rozpuštěné v pufru (nezesíťovaný polyakrylamid, methylcelulóza, apod.) [44, 46, 47].

### **2.2.3.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)**

CIEF je metoda založená na separaci vzorků nesoucích jak záporně, tak kladně nabitě skupiny. Jedná se tedy zejména o proteiny a aminokyseliny. Takové analyty, které se liší svými izoelektrickými body (pI) o více než cca 0,005 jednotek, mohou být touto metodou stanoveny. pI je hodnota pH, při které se zwitteriontová látka chová jako neutrální, protože má stejný počet kladných i záporných nábojů (je navenek elektroneutrální), tudíž nemá v elektrickém poli tendenci migrovat.

CIEF je provedena tak, že vzorek je společně s pufrem nadávkován do kapiláry a je aplikováno napětí. Pufrem je směs (běžně komerčně dostupných) amfolytů, což jsou rovněž zwitteriontové látky. Tím dojde k vytvoření gradientu pH v kapiláře, který je držen mezi silnou kyselinou (anolyt) a silnou zásadou (katolyt). Složky vzorku se zastaví tam, kde dosáhnou svého pI. Po dosažení ustáleného stavu je potřeba, aby vzorek prošel detektorem, což je realizováno hydrodynamicky (tlakem) nebo elektroforeticky (výměna anolytu za katolyt nebo obráceně, nebo přidávkem soli buď do anolytu nebo do katolytu).

Touto metodou je možno stanovit velmi zředěné vzorky, protože je dávkováno větší množství vzorku a jednotlivé složky vzorku jsou fokusovány do úzkých vysoce koncentrovaných zón. Pomocí CIEF lze rovněž stanovit pI vzorku [44, 46].

### **2.2.3.6 Kapilární izotachoforéza (CITP)**

Izotachoforéza je jednou z nejstarších elektroforetických technik a lze při ní analyzovat jen jeden druh iontů. Je také jedinou elektroforetickou technikou, která probíhá v diskontinuálním systému elektrolytů.

Kapilára, ve které je potlačen EOF, je v CITP naplněna tzv. vedoucím („leading“) elektrolytem, jehož ionty (ty, které jsou analyzovány – kationty nebo anionty) mají největší mobilitu v celém systému. Tzv. „outletový“ rezervoár (blíže detektoru) je rovněž naplněn tímto roztokem. Vzorek je pak nadávkován a na tzv. „inletový“ konec kapiláry (dávkovací, který je dále od detektoru) je nasazen rezervoár, jež je naplněn tzv. koncovým („terminating“) elektrolytem, kde jeho ionty mají naopak mobilitu nejnižší. Po aplikaci elektrického pole dojde k postupné separaci iontů dle jejich efektivních pohyblivostí. Jakmile je dosaženo ustáleného stavu, všechny zóny se pohybují stejnou rychlostí (izotachoforetická migrace). Tato rychlost je dána mobilitou iontů vedoucího elektrolytu. Jednotlivé zóny vzorku jsou pak seřazeny dle klesajících mobilit a nakonec migrují ionty koncového elektrolytu [49]. Navíc, díky koncentračnímu přizpůsobení („Kohlaschova regulační funkce“) jsou majoritní složky vzorku nařaděny, zatímco stopové jsou zakoncentrovány. Koncentrace je pak úměrná délce zóny. Tuto techniku lze tedy rovněž použít k prekoncentraci zředěných analytů [46].

### **2.2.3.7 Afinitní kapilární elektroforéza (ACE)**

#### **Úvod do ACE**

Podobně jako afinitní HPLC, je ACE založena na kombinaci (bio)specifických interakcí typu antigen-protilátka, enzym-inhibitor, hormon-receptor, apod. Obecně metody, které využívají (bio)afinitní princip, mají výhodu v tom, že se v nich uplatňuje jedna z nejvýznamnějších vlastností biomolekul, kterou je specifické rozpoznávání. To tvoří základ všech vysoce selektivních biologických procesů [53, 54].

Afinitní kapilární elektroforéza bývá tedy používána pro separaci látek, které podléhají takovýmto specifickým interakcím (obecně receptor (analyt)-ligand). Tyto interakce mohou probíhat na povrchu kapiláry, na niž byl předtím navázán ligand (podobně jako v CEC) nebo častěji a také výhodněji, kdy jsou ligand i cílový analyt (receptor) přítomny ve volném roztoku (podobně jako v EKC) [55, 56].

## **Teorie**

Více než pro separaci analytů je však ACE využíváno pro studium interakcí analyt-ligand. Síla nekovalentních interakcí mezi dvěma interagujícími sloučeninami nebo třeba právě nanočásticemi je tedy charakterizována zdánlivou konstantou stability vzniklého komplexu (nazývaná také jako vazebná, asociační nebo interakční konstanta), která je definována vztahem:

$$K_b = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (3)$$

kde  $[A]$ ,  $[L]$  a  $[AL]$  jsou rovnovážné molární koncentrace analytu  $A$ , ligandu  $L$  a jejich komplexu  $AL$  [57]. Tento vztah vychází z obecné rovnice:



První rovnice, která dává do souvislosti elektroforetickou mobilitu a zdánlivou vazebnou konstantu byla odvozena již v roce 1951 pro popis interakce mezi kademnatými a jodidovými ionty Albertym a Kingem [58].

Při ACE jednoduše zvyšujeme koncentraci ligandu v základním elektrolytu. Základním principem stanovení vazebných konstant je tedy měření změny migračních časů, resp. z nich spočítaných efektivních mobilit volného analytu a komplexu analyt-ligand. Změna je způsobena jiným poměrem mezi nábojem a velikostí volného analytu a vznikajícího komplexu (viz kapitola 2.3.4.2) [55, 57]. Tento on-line přístup je nejpoužívanější. ACE však může být prováděna i v off-line módu, kdy je analyt smícháván s pufrům obsahujícím vzrůstající množství ligandu. Takový roztok je pak inkubován po určitou dobu a následně analyzován pomocí CZE. Tento přístup je využíván, pokud je kinetika disociace komplexu

pomalá [59]. Všechny tyto přístupy jsou rovnovážné. Existují i nerovnovážné, které jsou však, co do vyhodnocení, mnohem složitější [60].

ACE analýzy jsou nejčastěji prováděny ve vodných prostředích [56, 61], nicméně je možno použít vodných pufrů s přidávkem organické složky [62, 63] nebo nevodných prostředí [64, 65].

Vzhledem k tomu, že je v kapilární elektroforéze nejčastěji využito UV/Vis detektoru a přidaný ligand může absorbovat záření v této oblasti, je někdy výhodné využití selektivního detektoru (např. ICP-MS [66]) nebo může být ACE provedena v tzv. „partial-filling“ módu (metoda částečného plnění). Při této metodě je kapilára naplněna pufrém obsahujícím ligand jen zčásti a podmínky jsou zvoleny tak, aby ligand nedosáhl detektoru (nemigruje vůbec, migruje mnohem pomaleji než analyt nebo migruje opačným směrem) [57, 67].

Obecně může být asociace mezi analytem a ligandem popsána vazebnou izotermou:

$$y = dx/(f+ex) \quad (5)$$

Závislá proměnná  $y$  je experimentálně změřená odezva systému analyt-ligand (v tomto případě efektivní elektroforetická mobilita). Proměnná  $x$  v rovnici je koncentrace volného ligandu a konstanty  $d$ ,  $e$  a  $f$  se vztahují k vlastnostem analytu, ligandu a komplexu, zahrnující vazebnou konstantu a informaci o stechiometrii. Pokud je volný analyt dávkován do elektrolytu obsahujícího ligand, výsledná efektivní mobilita analytu ( $\mu_A^{eff}$ ) v rovnováze s ligandem je dána průměrem absolutních mobilit volných ( $\mu_A^0$ ) a vázaných ( $\mu_{AL}^0$ ) forem analytu:

$$\mu_A^{eff} = \frac{[A]}{[AL]+[A]}\mu_A^0 + \frac{[AL]}{[AL]+[A]}\mu_{AL}^0 \quad (6)$$

Zavedením vztahu (3), lze rovnici (6) převést na následující tvar rovnice vazebné izotermy:

$$\mu_A^{eff} = \frac{1}{1+K_b[L]}\mu_A^0 + \frac{K_b[L]}{1+K_b[L]}\mu_{AL}^0 \quad (7)$$

Pro určení vazebné konstanty komplexu lze tuto rovnici transformovat do linearizovaných forem [55, 58]. Různé metody linearizace jsou uvedeny v tabulce 3.

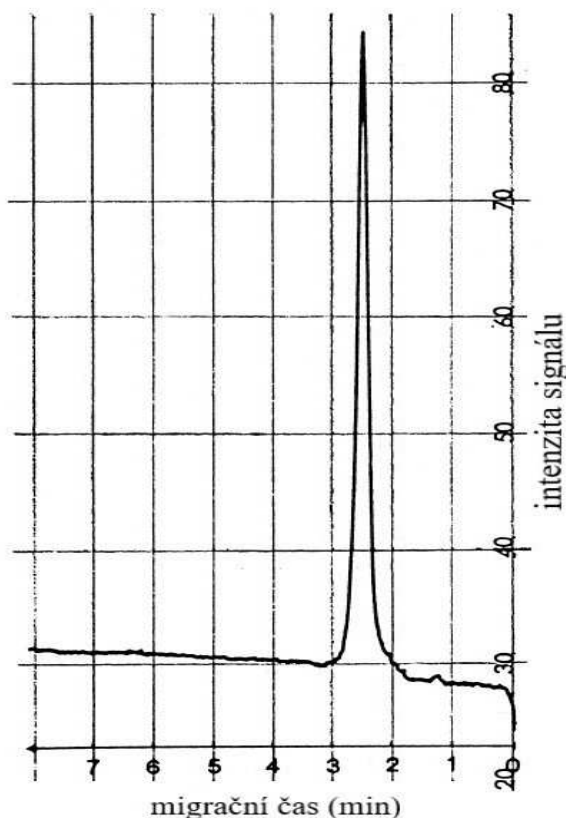
*Tabulka 3: Různé metody linearizace grafů. Převzato z publikace [58].*

Metoda		stanovení $K_b$	$(\mu_{AL}^0 - \mu_A^0)$
izotermní	$\frac{\mu_A^0 - \mu_A^{eff}}{\mu_A^{eff} - \mu_{AL}^0} = K_b[L] = f[L]$	Směrnice	musí být stanoveno experimentálně
x reciproká	$\frac{\mu_A^{eff} - \mu_A^0}{[L]} = -K_b(\mu_A^{eff} - \mu_A^0) + K_b(\mu_{AL}^0 - \mu_A^0) = f(\mu_A^{eff} - \mu_A^0)$	-směrnice	úsek/směrnice
y reciproká	$\frac{[L]}{\mu_A^{eff} - \mu_A^0} = -\frac{1}{\mu_{AL}^0 - \mu_A^0} \times [L] + \frac{1}{K_b(\mu_{AL}^0 - \mu_A^0)} = f(\mu_A^{eff} - \mu_A^0)$	směrnice/úsek	1/směrnice
dvojitě reciproká	$\frac{1}{\mu_A^{eff} - \mu_A^0} = -\frac{1}{K_b(\mu_{AL}^0 - \mu_A^0)} \times \frac{1}{[L]} + \frac{1}{\mu_{AL}^0 - \mu_A^0} = f\left(\frac{1}{[L]}\right)$	úsek/směrnice	1/úsek

## 2.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA NANOČÁSTIC

### 2.3.1 Historie zkoumání nanočástic pomocí CE

Historicky první pokus analyzovat větší objekty pomocí CE je datován do roku 1987, kdy Hjertén a kol. [68] ukázali možnosti analýzy buněk a virů kapilární elektroforézou. Ve své práci popsali, jakým způsobem byly virus tabákové mozaiky (TMV) a bakterie kmene *Lactobacillus casei* unášeny elektroosmotickým tokem (EOF) uvnitř kapiláry. Analýza TMV je ukázána na obrázku 11. VanOrman a McIntire jako první začali s CE syntetických polymerních částic. Nejprve studovali separaci různě velkých polystyrénových mikročástic pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE), což připisovali různě silným interakcím částic se stěnou kapiláry [69, 70]. Ve své pozdější publikaci ukázali shodu mezi elektroforetickými mobilitami stejného typu částic zjištěnými pomocí CZE a laserovou Dopplerovou velocimetrií (LDV) [71]. Další, kdo se zabýval tímto typem analytů, byl Chrambach a kol. [72].



*Obrázek 11: Kapilární zónová elektroforéza viru tabákové mozaiky. Převzato z publikace [68].*



Zatímco velká část počátečních prací zabývajících se analýzou koloidů kapilární elektroforézou byla provedena na částicích polystyrenu [39, 69-75] a částicích oxidů kovů mikrometrových a sub-mikrometrových velikostí [76-78], jsou v dnešní době pomocí CE analyzovány téměř všechny typy nanoobjektů [3]. Trapiella-Alfonso a kol. [79] nedávno shrnuli postupy a metodologie v CE, jež byly vyvinuty jak pro řízení a optimalizaci syntéz nanočástic, tak i pro jejich charakterizaci ve smyslu jejich fyzikálně-chemických vlastností, a také strategie vedoucí ke zlepšení detekčních limitů elektroforetických metod. Publikovali také článek, kde je kladen důraz na CE metody vyvinuté pro NPs používané v biomedicínských vědách, které pomáhají předpovídat chování těchto objektů v biologických systémech [80]. Zatímco Liu ve svém článku sumarizuje možnosti analýzy a aplikace nanočástic zlata nejen v elektroforéze, ale i v HPLC nebo FFF [81], Hu a kol. [82] věnují větší pozornost charakterizaci a analytické separaci fluorescenčních uhlíkových kvantových teček. Existují také některé přehledové práce, jež podávají obecný přehled o stanovení a analýze různých typů nanočástic v CE [83-86].

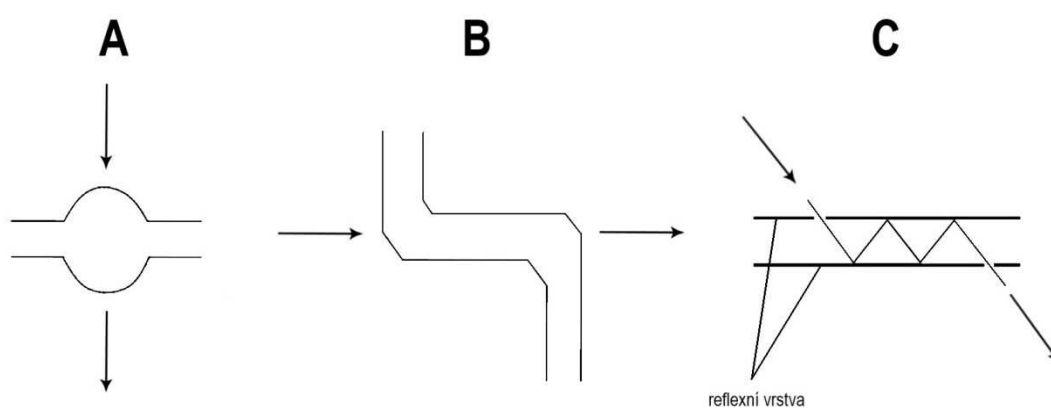
## **2.3.2 Detekce nanočástic a možnosti jejího zlepšení v kapilární elektroforéze**

### **2.3.2.1 UV/Vis detektory a jejich vlastnosti**

Detektory pracující na principu absorpce záření v UV/Vis (zejména DAD) jsou pro svou univerzálnost, a také díky možnosti měření přímo v kapiláře, nejpoužívanějšími detektory v CE.

DAD (někdy též PDA) pracuje na principu průchodu záření ze zdroje, kterým je deuteriová výbojka, kapilárou. Ta je v daném místě zbavena vrstvy polyimidu. Prošlé záření je pak rozloženo holografickou mřížkou a takto rozložené záření dopadá na destičku, na níž je umístěn velký počet fotodiod. Na každou z miniaturních fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorbující látkou v kapiláře. Každá z fotodiod je spojena s kondenzátorem nabitým na určitou hodnotu. Vzniklý fotoelektrický proud (vzniká po dopadu záření na diodu) vybijí kondenzátor úměrně velikosti intenzity záření. Následně se kondenzátor dobije a je měřen spotřebovaný proud na jeho dobítí [87].

Velkou výhodou tohoto detektoru je simultánní záznam v celé oblasti UV/Vis spektra. Nicméně, vzhledem k tomu, že UV/Vis detektory pracují na principu Lambert-Beerova zákona, jsou při použití v CE jejich výhody zastíněny nízkou citlivostí (velmi malá optická dráha daná vnitřním průměrem kapiláry). Detekční limity jsou proto vyšší, typicky v řádu 10  $\mu\text{M}$  [88]. Navíc lze očekávat, že koncentrace nanočástic v biologických vzorcích a ve vzorcích životního prostředí budou velmi malé, a proto je často potřeba, aby byla detekce těchto analytů citlivější [89]. Toho lze v případě UV/Vis detektorů docílit použitím např. tzv. „bubble“ cel, „Z“-cel nebo cel s vícenásobným odrazem (obrázek 12) [46].



*Obrázek 12: Možnosti prodloužení optické dráhy v kapiláře. A) „bubble“ cela, B) „Z“-cela a C) cela s vícenásobným odrazem.*

Jiným způsobem, jak docílit vyšší citlivosti při detekci NPs v CE, je použití jiných detektorů, např. amperometrických nebo detektorů s laserem indukovanou fluorescencí (LIF) [44, 46, 87, 90]. Poslední dobou se však pro tyto účely jeví jako velmi slibné spojení CE s ICP-MS, protože dovoluje přímou analýzu nanomateriálů ve složitých maticích, často bez nutnosti extrakce nebo jiných náročných úprav vzorku [91].

### 2.3.2.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

#### Úvod a historie

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) vznikla spojením dvou dobře zavedených technik, a to indukčně vázaného plazmatu (ICP) a hmotnostní spektrometrie (MS).

ICP je popisováno jako ideální zdroj iontů pro anorganickou hmotnostní spektrometrii. Velmi vysoká teplota plazmového výboje ( $\sim 10\,000\text{ K}$ ) zajišťuje téměř úplné rozložení vzorku na jeho atomy a ionizační energie ICP ( $15,8\text{ eV}$ ) umožňuje ionizaci většiny prvků periodické tabulky, s výjimkou F, He a Ne, za vzniku kladně nabitých iontů [92, 93].

ICP-MS je dnes nepochybně nejrychleji se rozvíjející technikou pro multielementární analýzu ultra-stopových koncentrací kovů, polokovů a některých nekovů, která je dnes k dispozici. Na trh byl první ICP-MS přístroj s kvadrupólovým analyzátozem uveden roku 1983. Dnes je tato technika rutinně využívána pro mnoho různých a rozmanitých aplikací. Těmi nejběžnějšími, které dnes představují přibližně 80 % ICP-MS analýz, jsou aplikace environmentální, geologické, archeologické, polovodičové, biomedicínské, a také nanotechnologie.

Přestože lze touto technikou obecně stanovit stejný soubor prvků jako jinými technikami atomové spektrometrie, jako je plamenová atomová absorpce (FAA), elektrotermická atomizace (ETA) a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), má oproti zmíněným technikám ICP-MS řadu výhod. Mezi tyto výhody patří zejména možnost simultánní multielementární analýzy, informace o izotopovém složení a vysoká selektivita [93]. ICP-MS tedy představuje univerzální techniku dosahující detekčních limitů v řádu sub-ppt. Nejde však jen o nízké detekční limity, ale i o velmi široký lineární dynamický rozsah ICP-MS, běžně přesahující deset řádů. To dovoluje současné stanovení jak matričních prvků, tak i minoritních prvků (nečistot). Další velkou výhodou je možnost spojení se separačními technikami (např. HPLC, GC, FFF, CE). Takto spojené techniky pak dovolují analýzu různých specií prvků a ICP-MS pak plní úlohu mimořádně citlivého, prvkově specifického detektoru [93-95].

## **CE-ICP-MS**

Práci, kde jsou oba přístroje spojeny, poprvé publikoval v roce 1995 Olesik a kol. [96]. Rozhraní musí udržet elektrický kontakt s výstupním koncem CE kapiláry, aby byl zajištěn stabilní elektrický proud, což je nutné pro získání reprodukovatelných elektroforetických separací. Schématické znázornění podobného rozhraní vyvinutého v naší laboratoři je ukázáno v kapitole 4.3.5 na obrázku 31. Problematika spojení CE s ICP-MS je detailně rozebrána v přehledovém článku, který publikovali Prange a Pröfrock [97].

Dnes je CE-ICP-MS využíváno zejména pro speciální analýzy zejména kovových prvků ve složitých maticích [98]. Typickým příkladem je analýza léčiva (na bázi kovu) v tělních tekutinách, kdy CE- ICP-MS rozlišuje signál užitého léčiva a jeho metabolitů. Lze tedy říci, že CE-ICP-MS je jedním z mála analytických nástrojů, které lze použít k detailnímu studiu transportu a interakci takového léčiva s biomolekulami v lidském těle, a který tak může pomoci vysvětlit mechanismus jeho účinku na molekulární úrovni [66, 99].

Kromě toho, úskalí (stabilita plazmového výboje, polyatomické interference, aj.) se zaváděním mobilních fází (a pomocných kapalin) obsahujících vysoký obsah organických rozpouštědel či rozpuštěných solí v mobilní fázi, vyskytující se při častější kombinaci HPLC-ICP-MS, nejsou pro spojení CE-ICP-MS tak významná [100]. U CE-ICP-MS rovněž odpadají omezení, která se objevují u běžnějšího spojení CE-ESI-MS. Jedná se hlavně o nutnost použití těkavých pufrů, které jsou kompatibilní s ESI-MS nebo aplikaci takového uspořádání, kdy netěkavé složky nedosáhnou iontového zdroje (ESI) [101].

## **Princip ICP-MS**

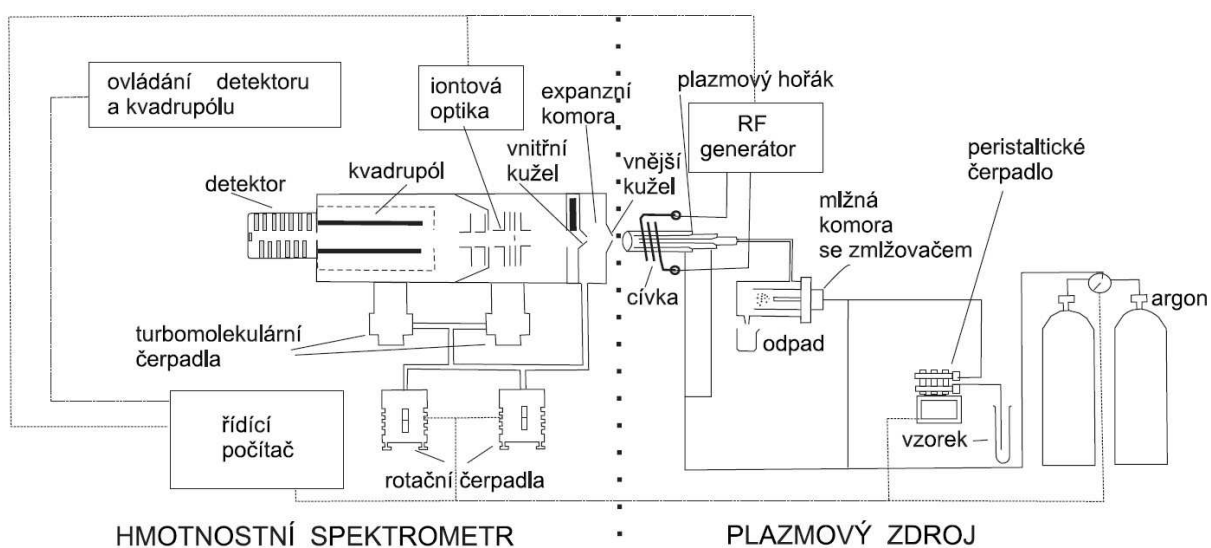
Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem je na obrázku 13. Vzorek je převeden na aerosol ve zmlžovači proudem nosného plynu (Ar). Vzniklý polydisperzní aerosol je pak zbaven větších kapek v mlžné komoře a výsledný jemný aerosol je zaváděn do ICP. Zde dochází díky vysoké teplotě (6 000 – 10 000 K) k jeho rychlé desolvataci, odpaření, atomizaci a ionizaci obsažených prvků.

Argonové plazma je vytvořeno v tzv. plazmové hlavici, díky radiofrekvenčnímu generátoru a indukční cívce. Oscilacemi v elektromagnetickém poli dochází v prostředí argonu (po dodání elektronů z Teslova generátoru) ke kolizím rychle se pohybujících

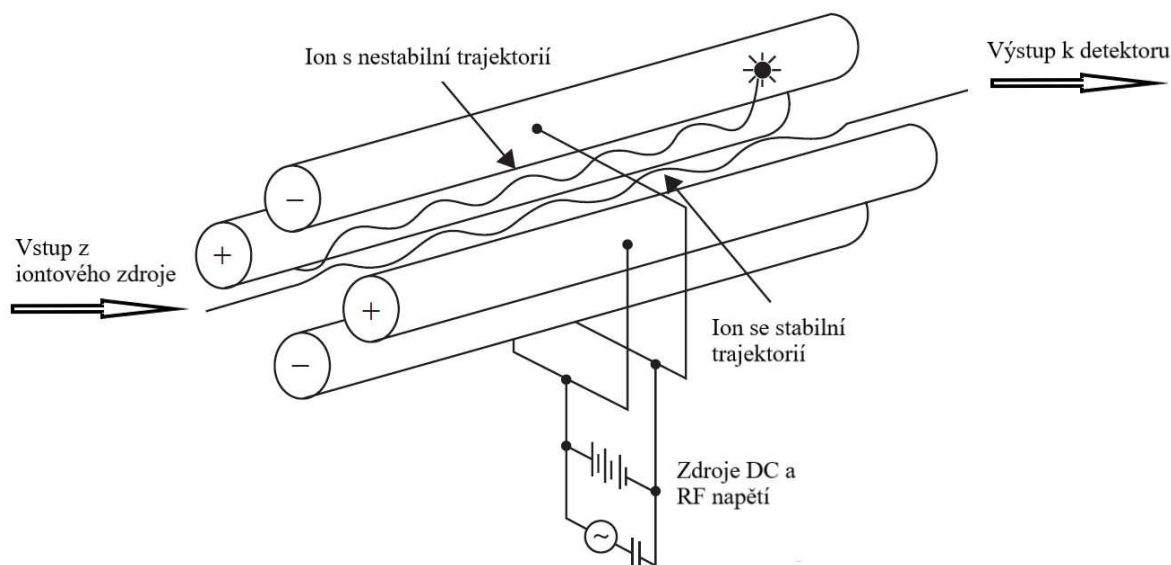
elektronů s neutrálními atomy Ar. Tím dochází k dalšímu odtrhávání elektronů z atomů Ar. Touto řetězovou reakcí, je pak tvořeno a udržováno plazma [95, 102, 103].

Kladně nabitě ionty produkované v plazmatu jsou potom extrahovány do vakuové části hmotnostního spektrometru přes „interface“ tvořený dvojicí kónusů a fokusovány iontovou optikou do hmotnostního analyzátoru (nejčastěji kvadrupólový analyzátor).

V hmotnostním analyzátoru jsou pak ionty děleny podle svých poměrů  $m/z$  (hmotnost/náboj). Kvadrupólový hmotnostní analyzátor (obrázek 14) je tvořen čtyřmi tyčemi s kruhovým (ideálně hyperbolickým) průřezem, kdy na protilehlé tyče je současně vkládáno stejnosměrné napětí shodné polarity (U) a vysokofrekvenční střídavé (V) napětí. Poměr stejnosměrného a střídavého elektrického pole je fixní, avšak amplituda vkládaného napětí na tyče je postupně měněna tak, aby bylo možné skenovat celý rozsah  $m/z$  od 0 do 300 Da. Dané nastavení napětí umožní průchod pouze jednoho iontu, ostatní se vybijí na tyčích a jsou odstraněny vakuovými pumpami. Prošlé ionty potom dopadají na detektor, jímž je elektronásobič. Podmínky na kvadrupólu se mění během zlomků vteřiny, takže umožňují analýzu v celém hmotnostním spektru během několika sekund [102, 103].



*Obrázek 13: Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Převzato z publikace [102].*



*Obrázek 14: Schéma kvadrupólového analyzátoru. Převzato z publikace [104].*

### 2.3.2.3 On-line prekoncentrační techniky v CE

#### Diskontinuální systémy

Dalším způsobem, jak zvýšit citlivost elektroforetických technik, je využití tzv. on-line prekoncentračních technik. Ty jsou povětšinou založeny na tom, že probíhají v tzv. diskontinuálních systémech (kapilára je naplněna dvěma nebo více různými elektrolyty s různými vlastnostmi). Po aplikaci napětí dojde k vytvoření heterogenního elektrického pole v kapiláře a analyt se chová v každé zóně jinak. Intenzita elektrického pole je nepřímo úměrná koncentraci a mobilitě složek elektrolytu. Proto je větší ve zředěných elektrolytech než v koncentrovaných. To je typické pro dávkování vzorku, který je rozpuštěn v méně vodivé matici, než je elektrolyt. Po aplikaci napětí začne analyt migrovat v zóně matrice a po dosažení koncentrovanějšího elektrolytu se zpomalí (na tomto rozhraní se tedy zakoncentruje), protože elektroforetická mobilita je vlastně konstantní. Na tomto principu je založeno zakoncentrování, tzv. normální „stacking“ efekt, jež může být různě modifikován [105].

## **„Stacking“ efekt a jeho modifikace**

V posledních několika letech bylo využito on-line „stacking“ efektu k prekoncentraci a studiu nanočástic v CE na rozhraní dvou různých prostředí. Např. Liu a kol. [80, 106, 107] se ve svých publikacích zabývali zakoncentrováním vzorku z velkého objemu, tzv. „large volume sample stacking“ metodou, pro analýzu Ag a Au nanočástic. Jak napovídá název, tato technika využívá „stacking“ efekt při dávkování velkého množství vzorku. Po nadávkování dlouhé zóny vzorku je aplikováno napětí při záporné polaritě (v případě prekoncentrace aniontů, které se pohybují rychleji než EOF opačného směru). Po aplikaci napětí se anionty pohybují směrem k detektoru, zatímco kationty a neutrální látky v matrici migrují zpět do „inletového“ rezervoáru. Jakmile procházející proud dosáhne 95-99% své původní hodnoty, je polarita změněna a dojde k separaci pomocí CZE [108]. V těchto studiích byl použit micelární BGE, takže „stacking“ efekt probíhal při podmínkách MEKC. V tomto případě se jedná o zakoncentrování s přepínáním polarity, tzv. „reversed electrode polarity stacking mode“ (REPSM). Technika prekoncentrace látek rozptýlených v matrici bez micel, při dávkování do micelárního pufru je též znám jako tzv. nametení („sweeping“) [109-112]. Cacho a kol. [113] publikovali roku 2014 studii zabývající se „stackingem na bázi pH“, kdy zředěné karboxylované maghemitové NPs dispergované v acetátovém pufru o pH 4,5 byly dávkovány do borátového pufru o pH 9,5. Tato technika je známá pod názvem přechodné pH rozhraní, tzv. „dynamic pH junction“ a je založena na změně ionizace látek v prostředích o různém pH. Pokud je použit zmíněný systém (v kyselém pufru je rozptýlen slabě kyselý analyt), dojde po aplikaci napětí k titraci hydroxidovými ionty z bazického prostředí. Záporně nabitý analyt pak začne migrovat směrem k anodě. Jakmile však dosáhne kyselého prostředí, bude opět protonován a tedy zastaven [105, 108]. Pro prekoncentraci lze rovněž využít tzv. přechodnou izotachoforézu (tCITP). Např. Riley a kol. [114] použili tCITP k prekoncentraci a separaci různých zlatých nanomateriálů. U této techniky je vedoucí ion dávkován společně se vzorkem, proto je izotachoforetický krok pouze přechodný a separace dále probíhá jako v případě klasické CZE.

## **Elektrokinetické dávkování a kombinace s dalšími on-line prekoncentračními technikami**

On-line prekoncentrační techniky mohou být účinně kombinovány s elektrokinetickým dávkováním vzorku. To je velmi zajímavou alternativou vůči dávkování hydrodynamickému, kdy je celý roztok dávkován do kapiláry tlakem.

Elektrokinetické dávkování je prováděno na základě procesu elektromigrace [49]. Množství nadávkovaných složek vzorku je pak úměrné jejich zdánlivé mobilitě. Proto už jen samotné elektrokinetické dávkování může sloužit jako prekoncentrační technika pro ionty s nejvyššími zdánlivými mobilitami [105, 115, 116].

První vyvinutá technika, kdy je kombinováno elektrokinetické dávkování se „stacking“ efektem, se nazývá zakoncentrování s využitím elektrokinetického dávkování, „field-enhanced sample injection“ (FESI) nebo „field-amplified sample injection“ (FASI). Je tedy založena na elektrokinetickém dávkování vzorku připraveného v matrici s nízkou vodivostí [117-123]. Často je před dávkováním vzorku hydrodynamicky dávkována krátká zóna vody pro zvýšení intenzity elektrického pole.

Později byly představeny další kombinace s jinými technikami. Například Quirino a kol. [124] představili techniku nametení s využitím elektrokinetického dávkování kationtů, nazvanou „cation selective exhaustive injection – sweeping“ v micelární elektrokinetické chromatografii (CSEI-sweeping-MEKC). Při této metodě je kapilára nejprve naplněna nemicelárním elektrolytem, následuje dávkování pufru o vysoké vodivosti prostého organických rozpouštědel. Nakonec je dávkována krátká zóna vody. Po elektrokinetickém dávkování kationtových analytů (připravených v matrici s nízkou vodivostí) jsou oba konce kapiláry umístěny do micelárního elektrolytu a je aplikováno napětí o záporné polaritě. Micely z katodického rezervoáru při této metodě vstupují do kapiláry a fokusují analyty do úzkých zón. Analogií je pak nametení s využitím elektrokinetického dávkování aniontů – „anion selective exhaustive injection – sweeping“ v micelární elektrokinetické chromatografii (ASEI-sweeping-MEKC). Kombinace FESI a přechodné izotachoforézy byla představena Hirokawou a kol. [125]. Tato metoda je známá jako tzv. „electrokinetic supercharging“ Horáková a kol. [126] zase použili kombinaci FESI a „dynamic pH junction“, což vedlo (ve srovnání s klasickou CZE) k 4600-násobné prekoncentraci dvou slabých kyselin.



### 2.3.3 Teoretické aspekty migrace nanočástic v kapilární elektroforéze

Separace nanočástic v CE je důsledkem rozdílů jejich elektroforetických mobilit v závislosti na separačním médiu, v němž jsou dispergovány (rolí zde hraje náboj, velikost, ale i tvar NPs) [1, 127]. Pokud chceme nanočástice analyzovat pomocí CE, musí mít elektrický náboj. Tento (povrchový) náboj koloidů/nanočástic je tvořen buď ionizací povrchových funkčních skupin molekul (disociace, rozpouštění, nahrazením iontů v krystalové mřížce) nebo adsorpcí iontů přítomných v disperzním médiu na povrchu pevných částic [128]. Látky nesoucí elektrický náboj migrují vlivem elektrické energie separačním prostředím (pufrům) elektroforetickou rychlostí,  $v$ , která je dána vztahem:

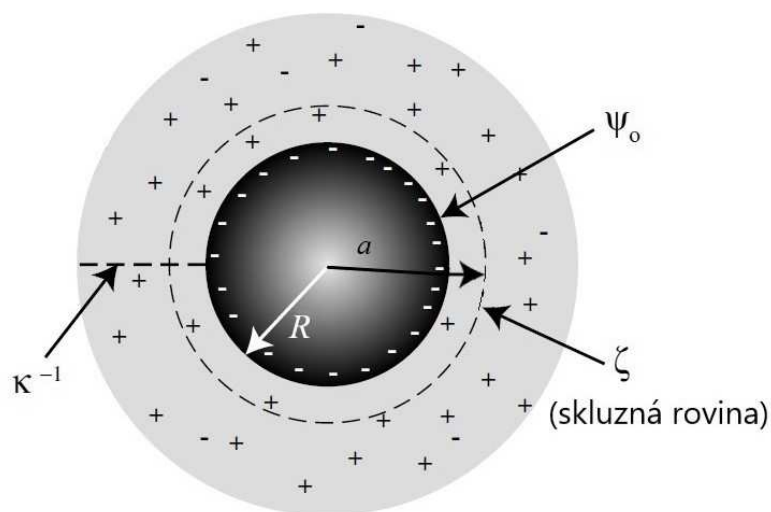
$$v = \mu_{eff} \cdot E \quad (8)$$

kde  $\mu_{eff}$  je elektroforetická pohyblivost (mobilita) a  $E$  aplikované elektrické pole. Separace je dosaženo, jestliže různé analyty migrují kapilárou různými rychlostmi. Elektroforetická mobilita je dána vztahem:

$$\mu_{eff} = q/6\pi\eta r \quad (9)$$

kde  $q$  je náboj ionizované látky,  $\eta$  je viskozita pufru a  $r$  hydrodynamický poloměr rozpuštěné látky [46].

To však není platné pro nanočástice. V roztoku elektrolytu je nabitá částice obklopena iontovou atmosférou, která je difúzní částí elektrické dvojvrstvy (EDL) vytvořené díky rozložení náboje na rozhraní povrch částice/roztok elektrolytu. Difúzní část EDL, kde jsou akumulovány proti-ionty, zatímco přítomnost ko-iontů je snížena, je charakterizována svou tloušťkou,  $\kappa^{-1}$  (Debyeho délka), jež je explicitní funkcí iontové síly,  $I$  ( $\kappa \sim I^{1/2}$ ) [129] (viz obrázek 15).



*Obrázek 15: Jednoduché schematické znázornění elektrické dvojvrstvy kolem koloidní/nano-částice. Převzato a upraveno z publikace [130].*

Podle teorie elektroforézy (izolovaných) nevodivých nabitých kulových částic (vyvinutých Overbeekem a Boothem [131]) musíme vzít v úvahu následující síly:

- (i) elektrostatickou sílu vyvíjenou na nabitě částice působením vnějšího pole
- (ii) Stokesovo tření způsobené viskozitou okolního média
- (iii) elektroforetickou retardaci způsobenou elektrostatickou silou vyvíjenou na iontovém oblaku proti-ionty vnějším polem (pohyb kapaliny obklopující částici je opačný než směr částice)
- (iv) relaxační účinek způsobený deformací iontového oblaku

Při použití vnějšího elektrického pole totiž není iontový oblak obklopující částice symetrický, a to z důvodu rozdílného pohybu částic vzhledem k iontům v iontovém oblaku. Tento deformovaný iontový oblak má za následek zpomalování migrujících částic, protože pro obnovení původní symetrie je nutný relaxační čas. Relaxační doba pak závisí na pohyblivostech iontů v iontovém oblaku. Proto, v případě významného relaxačního efektu, má pohyblivost iontů elektrolytu měřitelný dopad na elektroforetickou pohyblivost nanočástic [31]. Obecně platí, že mobilita nanočástic je dána Henryho rovnicí [132]:

$$\mu_{NPS} = (2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta)/(3\eta) f(\kappa a) \quad (10)$$

kde  $\varepsilon_r$  a  $\varepsilon_0$  je relativní elektrická permitivita elektrolytu a elektrická permitivita vakua,  $\zeta$  je elektrokinetický (zeta) potenciál,  $\eta$  je dynamická viskozita kapaliny a  $f(\kappa a)$  je Henryho funkce ( $a$  je vzdálenost od středu částice ke skluzné rovině), která nabývá hodnot od 1, při  $\kappa a \ll 1$  (Hückelův limit), do 1,5, při  $\kappa a \gg 1$  (Smoluchovského limit). V praxi může být ve většině případů  $a$  v Henryho rovnici nahrazena poloměrem částice  $R$ , protože je předpokládáno, že vzdálenost mezi „pevným“ okrajem částice a skluznou rovinou nepřesahuje 1 nm. Je pak tedy vyjadřována jako  $f(\kappa R)$ .

Henryho funkci lze určit dle teorie vyvinuté Ohshimou [133]. Ten zde spojuje teorie elektroforézy kulových „tvrdých“ koloidních částic (von Smoluchowski, Hückel, Henry, Overbeek, Booth, Dukhin, O'Brien, White a další), kulových polyelektrolytů (Hermans, Fujit, Overbeek, Stigter, Imai a Iwasa) a částic pokrytých vrstvou polyelektrolytů – „měkkých částic“ (Donath, Pastuschenko, Jones, Wunderlich, Levine, Sharp, Brooks, Ohshima a další) [133].

Stanovení elektroforetické mobility tak umožňuje získat informace o zeta potenciálu anebo velikosti částic [31]. CE nanočástic tudíž poskytuje informace o distribuci velikosti NPs, povrchovém náboji, difúzním koeficientu a umožňuje separaci různých populací nanočástic [134].

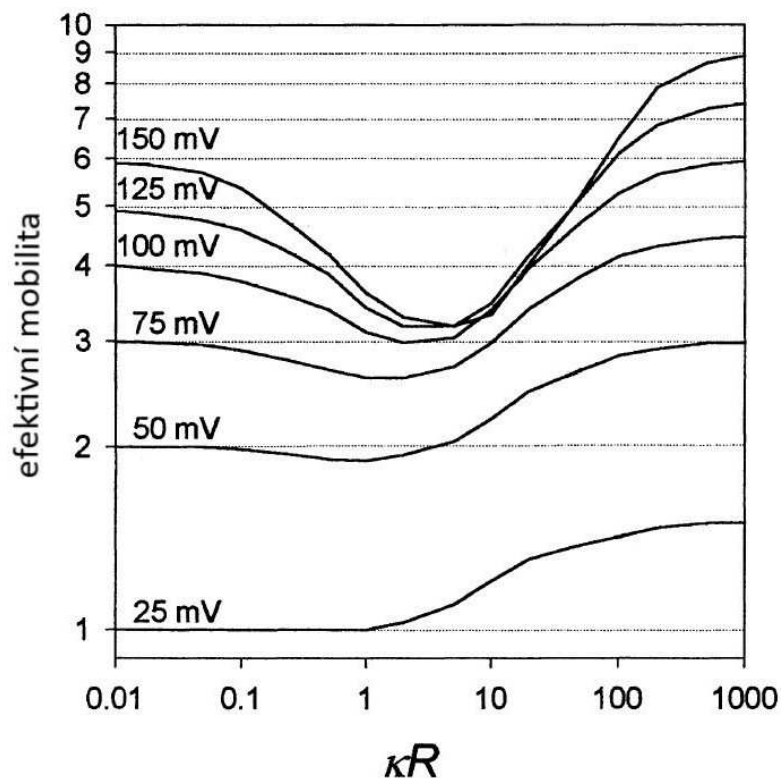
## 2.3.4 Faktory ovlivňující elektroforetickou mobilitu nanočástic

### 2.3.4.1 Velikost nanočástic

O'Brien a White ve své studii z roku 1978 ukázali, že elektroforetická mobilita koloidních částic jakéhokoliv tvaru je nezávislá na dielektrických vlastnostech částic. Závisí pouze na jejich velikosti, tvaru a na vlastnostech prostředí (pH, iontová síla), ve kterém jsou dispergovány, s čímž souvisí jejich zeta potenciál [135]. Je tedy zřejmé, že nanočástice které mají identické povrchové vlastnosti, mohou být separovány ve volném roztoku na základě jejich rozdílné velikosti (uvažujeme-li částice kulového tvaru) [136].

Podle Overbeek-Boothovy teorie je mobilita nanočástic explicitně závislá na produktu  $\kappa R$  (obrázek 16), přičemž se (dle prostředí a náboje částic) může zvětšovat, pokud roste velikost částic nebo naopak může být menší (bere v úvahu elektroforetickou retardaci i relaxační efekt) [70, 137]. Například Liu a kol. [138] prokázali lineární zvyšování mobility „core-shell“ Au/Ag nanočástic s jejich zvětšující se velikostí. Zatímco v práci d'Orlyé a kol.

[139], zkoumající maghemitové nanočástice o relativně malé velikosti (6-10 nm), je závislost opačná. Nicméně je naznačeno, že při vyšších iontových silách se tato závislost může obrátit. To však nebylo experimentálně potvrzeno, protože pufrý o takové iontové síle nejsou kompatibilní s CE analýzami.



*Obrázek 16: Závislost elektroforetické mobility kulových částic, o různých hodnotách  $\zeta$  potenciálu, na produktu  $\kappa R$ . Převzato z publikace [70].*

Velmi zajímavý přístup pro separaci různě velkých nanočástic kapilární elektroforézou je použití kolon, kde alespoň jeden rozměr kolony je menší než 150 nm. V těchto „nanokolónách“ je možno separovat nanočástice různých velikostí v tzv. „single particle“ módu s velmi dobrým rozlišením za velmi krátkou dobu. Například Weerakoon-Ratnayake a kol. [140] použili „nanošterbinu“ připravenou v polymethylmethakrylátu o rozměrech 100  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  x 150 nm (délka x šířka x hloubka). V této „nanokolóně“ bylo dosaženo separace jednotlivých nanočástic stříbra o velikosti 60 a 100 nm za méně než dvě vteřiny ( $R_s > 1$ ,  $E = 1500 \text{ V/cm}$ ).

Vzhledem k podobným pohyblivostem NPs ve volném roztoku může být velmi obtížné separovat částice s různými rozměry pouze pomocí CZE. Pro zlepšení účinnosti separace je tedy možno využít např. kapilární gelové elektroforézy (CGE), která spočívá v přidání polymerní látky do základního elektrolytu (polyethylenglykol, lineární polyakrylamid, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, ...). Separace je pak zlepšena síťovacím efektem [141, 142].

Pro separaci částic, kde se jejich rozměry liší jen velmi málo, se také ukázalo velmi vhodné spojení CE s odpařovacím detektorem rozptylu světla – ELSD („evaporative light scattering detector“). Takové uspořádání vede ke krátkým analýzám s dobrým rozlišením, což bylo ukázáno např. v případě zlatých nanočástic [89] nebo nanočástic z SiO<sub>2</sub> [143]. Pro lepší rozlišení u separace různě velkých nanočástic zlata vyvinuli Ciriello a kol. [144] novou metodu, při níž se při elektroforetické separaci aplikuje gradient elektrického pole. Při okamžité změně elektrického pole je polarizace vyvolaná relaxací dramaticky ovlivněna, a tudíž je ovlivněna i elektroforetická pohyblivost částic. Velikostní charakterizaci polyvinylalkoholových „mikrobublin“ (PVA-MB) v lidské krevní plazmě provedli Josefsson a kol. [145]. Takové útvary se používají jako kontrastní látky pro ultrazvukové zobrazování. Navíc je tato metoda použitelná pro Fe-PVA-MB obsahující superparamagnetické nanočástice oxidu železa, jež mohou sloužit jako multimodální kontrastní látky a jsou tak vhodné pro zesílení signálu v MRI.

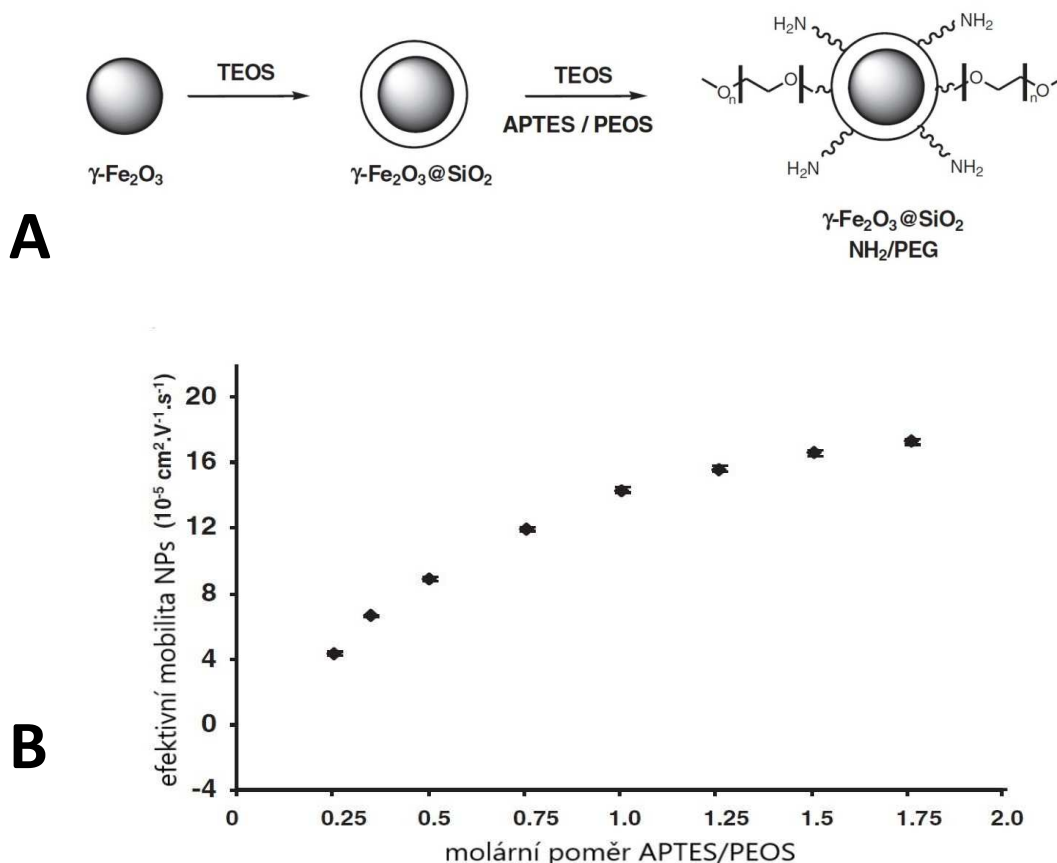
Oukacine a kol. [146] ve své práci doplnili separační vlastnosti CE o absolutní stanovení velikosti NPs, založené na Taylorově disperzní analýze (TDA). In-line spojení CE-TDA zde bylo úspěšně realizováno pro separaci s následnou charakterizací dvou typů latexových nanočástic s relativně malým rozdílem ve velikostech (56 a 70 nm). Je tedy důležité zmínit, že přístroje pro kapilární elektroforézu jsou také vhodné pro měření na základě teorie Taylorovy disperze [147-150].

Fichtner a kol. [151] zjistili, že data z elektroferogramů získané CE měřením mohou být bez kalibrační závislosti přímo přeměněny na určení rozložení velikosti částic ve zkoumaném vzorku (s malou relativní chybou  $\leq 12\%$  při srovnání výsledků z TEM měření). Toho lze dosáhnout za předpokladu, že zeta potenciál je na povrchu zkoumaných nanočástic homogenní a nezávislý na jejich velikosti a že elektroforetická mobilita různě velkých částic je závislá na relaxačním efektu.

### 2.3.4.2 Povrchová chemie nanočástic

#### Charakterizace povrchové chemie nanočástic pomocí CE

d'Orlyé a kol. [152] ukázali, jak může být CE využita pro stanovení hustoty povrchového náboje nanočástic. Ve své práci separovali „core-shell“ nanočástice  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$  funkcionalizované amino- skupinami a polyethylenglykolem v různém poměru. Takové nanočástice mají stejnou velikost, ale liší se hustotou povrchového náboje. Byl tedy sledován vztah mezi elektroforetickou pohyblivostí částic a množstvím připojených aminoskupin, kdy dochází k monotonnímu nárůstu efektivní pohyblivosti částic se vzrůstajícím poměrem APTES/PEOS látek v derivatizační směsi v rozmezí od 0,25 do 1,75 (obrázek 17). Podobné práce byly publikovány také s uhlíkovými kvantovými tečkami (Hu a kol. [153]) nebo s polystyrenovými nanočásticemi (Riley a kol. [154]).



*Obrázek 17: A) Reakční schéma syntézy APTES/PEOS funkcionalizovaných „core-shell“ ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ ) nanočástic a B) Vliv molárního poměru APTES/PEOS v reakční směsi na elektroforetickou mobilitu pro osm různých populací nanočástic pokrytých amino/PEG skupinami. Převzato a upraveno z publikace [152].*

Horská a kol. [155] zjistili, že dokonce samy pufrы používané v CE mohou ovlivnit povrchovou chemii nanočástic. V této práci je ukázáno, že přídavek MOPS (jež je běžně používán jako základní elektrolyt pro CE analýzy) k citrátem stabilizovaným zlatým nanočásticím, má za následek uvolňování citrátu z těchto částic. Kapilární elektroforéza, společně s laserovou Dopplerovou elektroforézou (LDE) a dynamickým rozptylem světla, byla také použita pro popis funkcionalizace a kontrolu koloidní a chemické stability nanočástic oxidu zinku a gallia dopovaných trojmocným chromem ( $\text{ZnGa}_{1,995}\text{O}_4:\text{Cr}_{0,005}$ ) [156]. To je nový perzistentně luminiscenční materiál pro *in vivo* zobrazování. Stejných metod bylo také použito pro charakterizaci kvantových teček funkcionalizovaných ftalocyaninem [157].

V současné době je pro charakterizaci nanočástic (z hlediska velikosti a povrchové chemie) velmi slibné spojení CE s ICP-MS detekcí, pracující v režimu jednotlivých částic, tzv. „single particle (SP) mode“. Ve srovnání s typickou ICP-MS analýzou, kde jsou v průběhu času signály analytu konstantní, citlivá SP-ICP-MS může být použita pro detekci jednotlivých NPs individuálně, pokud je vzorek dostatečně zředěn [158]. Vzhledem k tomu, že signál detekovaného iontového oblaku částice je považován za úměrný hmotnosti částic, může být odvozena velikost nanočástice (za předpokladu kulového tvaru, známé hustoty pevného materiálu atd.), a lze také zjistit koncentraci částic ve vzorku [159]. Pokroky v SP-ICP-MS analýzách byly nedávno shrnuty v přehledových člancích, jež publikovali Laborda a kol. [160] a Montano a kol. [161]. Například Mozhayeva a Engelhard použili CE-SP-ICP-MS pro separaci nanočástic stříbra s různými povrchovými modifikacemi [158]. V jejich další práci byla tato metoda vylepšena novým systémem, poskytujícím časové rozlišení v řádu mikrosekund a implementací on-line prekoncentrační metody, tzv. „reversed electrode polarity stacking mode“ (REPSM) [159], viz kapitola 2.3.2.3.

Některé další publikace [91, 162, 163] se také zabývají charakterizací povrchové chemie nanočástic ve smyslu náboje, nicméně také ukazují, jak se povrchová chemie částic mění při interakci s jinými molekulami. Poukazují tedy na možnost využití kapilárních elektromigračních technik pro popis takových interakcí.

## **Studium interakcí (nejen) pomocí kapilární elektroforézy**

### **Nekovalentní molekulární interakce s nanočásticemi**

Vzhledem k tomu, že je zkoumání interakcí mezi nanočásticemi a další složkou přítomnou v základním elektrolytu jedním z cílů disertační práce, budou možnosti studia interakcí probrány detailněji. Obecně hrají nekovalentní molekulární interakce zásadní roli v mnoha chemických a biologických systémech. Jako příklad lze uvést: zrychlení a uskutečnění chemických reakcí založených na tvorbě komplexních meziproductů reaktant-katalyzátor, signální transdukce zajištěná tvorbou vazby hormon-receptor, regulace enzymové aktivity vytvořením vazeb enzym-substrát nebo enzym-inhibitor, komplexace antigen-protilátka, transport iontů probíhající prostřednictvím interakcí ion-ionofor a mnoho dalších [62].

Jak bylo nastíněno, nanočástice mohou interagovat s mnoha (bio)molekulami, což je v současnosti intenzivně zkoumáno hlavně pro jejich interakce s proteiny. Výsledný „obal“ nanočástic (někdy nazývaný také jako „korona“) pak může tvořit ochrannou vrstvu, která zvyšuje stabilitu (zmíněno v kapitole 2.1.2.3), rozpustnost ve vodě nebo třeba biokompatibilitu NPs [164, 165]. Je tedy zřejmé, že přítomnost proteinové (nebo jiné) „korony“ způsobuje také zásadní změny chování nanočástic i v biologických systémech. Jako příklad lze uvést usnadnění vstupu takto modifikovaných částic do nitra buněk [166]. Navázání proteinů je tedy jedním z klíčových prvků, který pak ovlivňuje biodistribuci nanočástic v celém těle [167]. To může být přínosné pro NPs, jež jsou používány pro diagnostické nebo terapeutické účely.

Bylo však také zjištěno, že nanočástice mohou iniciovat a katalyzovat srážení proteinů, jejich denaturaci, změny jejich struktury [168, 169], a také mohou narušovat vzájemné interakce mezi proteiny [170]. To může mít za následek selhání funkcí proteinů, a tedy nepříznivé biologické účinky [59]. Z těchto důvodů je studium nekovalentních interakcí nanočástic s jinými látkami velmi důležité, a to hlavně kvůli jejich obrovskému významu nejen v různých (bio)chemických a biologických procesech, ale také v separačních a jiných analytických metodách.



## **Metody stanovení interakčních konstant**

Nejčastěji používanými technikami pro stanovení interakčních konstant jsou UV-Vis a fluorescenční spektrofotometrie [171, 172], metody pracující na základě fázové distribuce [173], infračervená spektroskopie [174], nukleární magnetická rezonance [64, 175, 176], hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) [173], rovnovážná dialýza [177], izotermická titrační kalorimetrie [61, 178], voltametrie [179], gelová elektroforéza [180], povrchová plasmonová rezonance [181, 182], cirkulární dichroismus, analytická ultracentrifugace [176], dynamický rozptyl světla, elektronová mikroskopie [172], mikroskopie atomárních sil [183], gelová permeační chromatografie [184], a jiné [185].

Obecně jsou tyto techniky při měření interakcí NP-ligand dominantní kvůli jednoduchosti při přímém měření interakční směsi. Některé z těchto metod však nemají dostatečnou citlivost, vyžadují, aby byly NPs luminiscenční nebo naopak luminiscenci zhasly. Jiné problémy mohou být způsobeny spektrálními interferencemi nebo nezbytností imobilizace ligandu anebo NPs [59].

## **ACE a ACE-ICP-MS pro stanovení interakčních konstant**

Kapilární elektroforéza je dobře známá nejen jako efektivní separační metoda, ale také jako výborná technika pro studium chemických reakcí a rovnováh, včetně jejich kinetiky [186] a má oproti uvedeným technikám mnoho již zmíněných výhod (zejména vysoká účinnost separace, krátká doba analýzy, velmi nízká spotřeba chemikálií a vzorků, měření interakcí ve volném roztoku, apod.) [187]. Může být tedy v afinitním módu (ACE) rovněž využita pro interakční studie mezi NPs a jinými (bio)molekulami (odhad vazebné nebo disociační konstanty komplexů, on-line snímání vazebného procesu nebo dokonce speciální změny nanočástic jako konjugátů se sérovými proteiny za mimobuněčných podmínek [188]). Další velkou výhodou ACE je, že není nutné mít dokonale čistý analyt, pokud obsažené nečistoty neinterferují se zónami analytů nebo možnost studia interakcí analytu s více než jedním ligandem zároveň (pokud se neovlivňují navzájem) [57].

Studium interakcí nanočástic bylo provedeno například s těmito látkami: kyselina lipoová a dihydrolipoová [9, 162], peptidy [189-191], proteiny [9, 91, 186, 188, 192-200], DNA [154], enzymy [201-203], protilátky [204, 205] nebo léky [206]. Lze také zkoumat

vazebné vlastnosti tzv. molekulárně vtištěných nanočástic [207, 208], o nichž bude pojednáno dále (kapitola 2.4.3).

Navíc, vzhledem k velikosti interakční konstanty lze odhadnout, o jaký typ interakce se jedná (elektrostatická, hydrofobní atd.) [191].

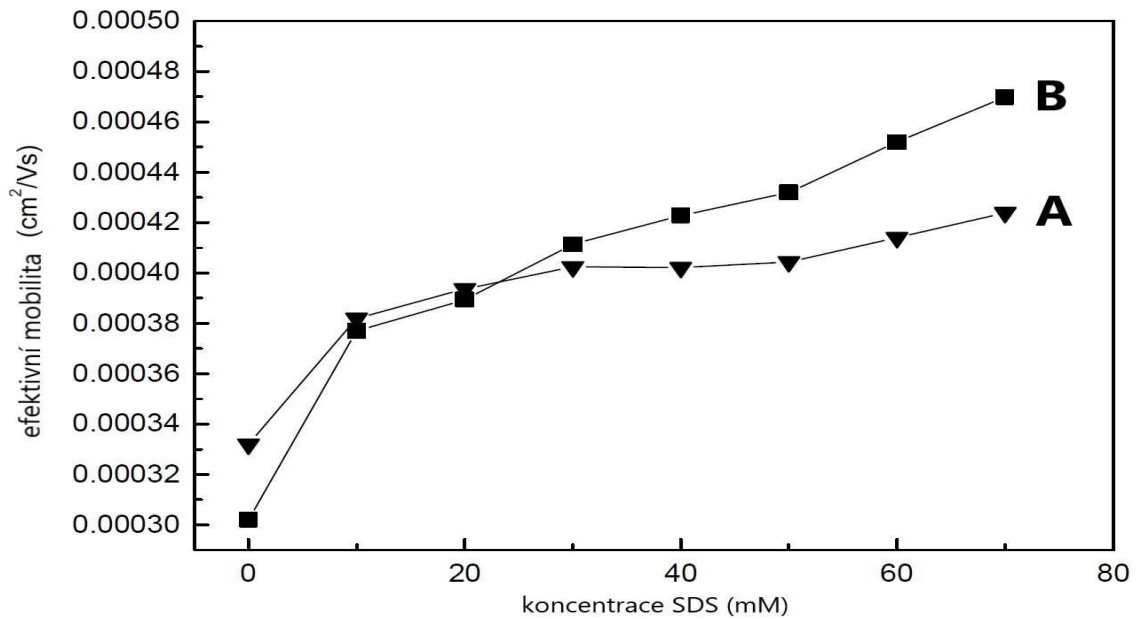
Maruszak a kol. [209] ukázali, že ACE může sloužit jako rychlá metoda pro „in-process“ kontrolu syntézy konjugátů účinných látek (API) se zlatými nanočásticemi. Pomocí CE zde bylo dohlíženo na to, jestli je reakčním krokem prováděným za účelem získání konjugátů Au NPs a API dosaženo očekávaného produktu bez přítomnosti volných API, což byl kritický parametr určující kvalitu syntetizovaného materiálu. Zajímavá bio-aplikace studia interakcí byla studována Beloborodovem a kol. [210]. Bylo zjištěno, že komplexy mezi tyčovitými viriony (které lze také považovat za nanoobjekty) a bivalentními protilátkami měly absolutní hodnoty elektroforetických pohyblivostí o mnohem větší než nevázané viriony nebo protilátky. To je způsobeno tvorbou zesíťovaných agregátů virionů, u nichž je náboj úměrný počtu zesíťovaných virionů, a frikční koeficient je zhruba úměrný druhé odmocnině tohoto počtu. Proto je elektroforetická pohyblivost přibližně úměrná druhé odmocnině počtu zesíťovaných virionů.

V mnoha, některých již zmíněných, publikacích [9, 63, 66, 91, 186, 188, 192, 194, 196], které se zabývají interakcemi mezi NPs a různými jinými molekulami je opět velmi výhodně využito spojení CE s ICP-MS (limity detekce, prvková specificita, široký lineární dynamický rozsah, atd.). Navíc, vzhledem k tomu, že takto spojené techniky stále poskytují stechiometrické, termodynamické a kinetické informace o interakcích mezi kovovými speciemi a (bio)molekulami, je tím výrazně rozšířeno aplikační pole atomové (hmotnostní) spektrometrie [66, 100]. Charakterizace interakcí kovových nanočástic nebo nanočástic obsahujících kovy (stále využívanějšími v medicíně) s biomolekulami pomocí CE (s důrazem právě na použití ICP-MS jako detektoru) pro studium biotransformací těchto částic, byly shrnuty v několika přehledových člancích. Ty publikovali například Aleksenko a kol. [211, 212], Songe a kol. [213] nebo Prange a kol. [97], kteří se mimo kombinaci CE a ICP-MS rovněž věnují spojení CE-ESI-MS pro tyto účely.

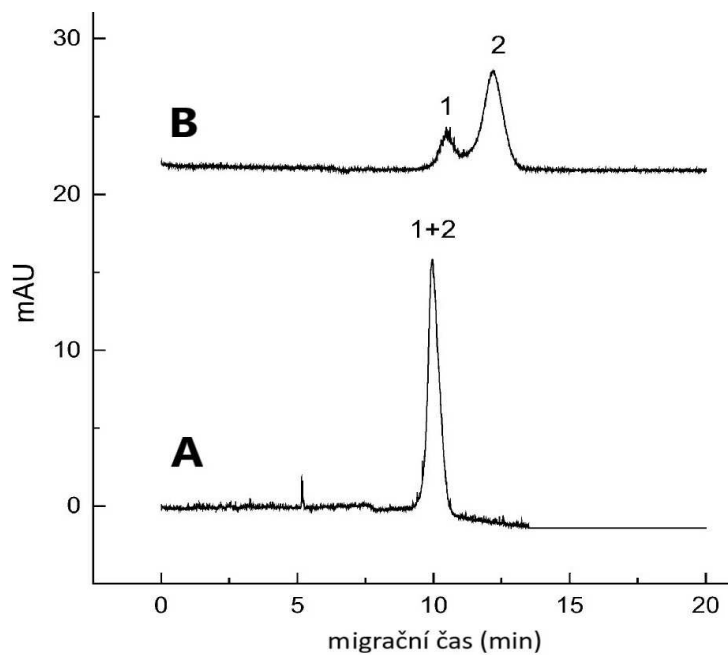
### 2.3.4.3 Další faktory ovlivňující mobilitu NPs

Chování nanočástic v kapilární elektroforéze nedávno komplexně popsali Pyell a kol. [214-216]. V jejich pracích byly studovány hydrofilně funkcionalizované nanočástice zlata, rovněž v kombinaci s Taylorovou disperzní analýzou (TDA). Tyto metody umožňují objektivní a přesné stanovení středního váženého hydrodynamického průměru, zeta potenciálu a efektivního počtu nábojů těchto nanočástic, přičemž musí být zohledněna polarizace elektrické dvojvrstvy a mobilita tak musí být korigována [215]. Rovněž potvrdili, že pozměněná (již zmíněná korekce na mobilitu) analytická rovnice vyvinutá Ohshimou [217] přibližně umožňuje výpočet průběhu kalibračních křivek a konverzi elektroferogramů na určení distribuce velikosti částic [216]. Ve svém dřívějším příspěvku také ukázali, jak může být kapilární izotachoforéza (CITP) použita k přímému měření náboje biomakromolekul nebo koloidních částic [214]. Gopmandal a Ohshima podrobně studovali elektroforetické chování „měkkých částic“ [218]. Lze předpokládat, že náboje vnitřního jádra a polymerové vrstvy jsou závislé na pH a mají opačně nabitě funkční skupiny. Byl tedy potvrzen významný vliv pH na hustotu náboje jádra i vrstvy polyelektrolytu, a tedy na celkové elektroforetické chování „měkkých částic“.

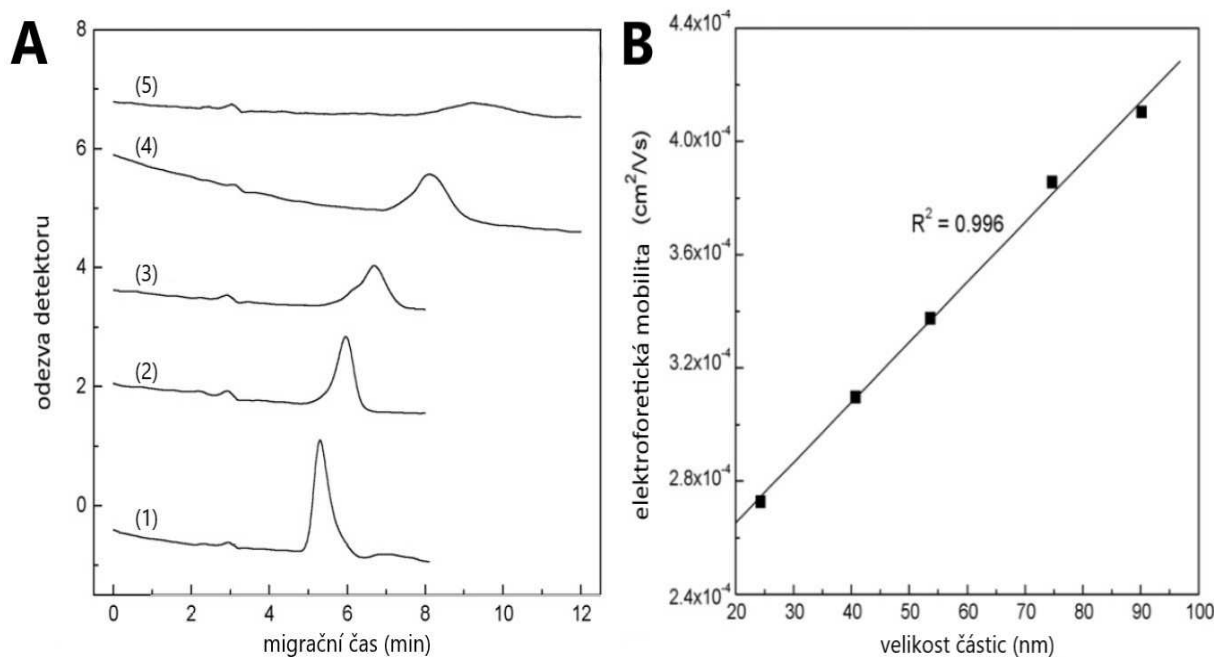
Dalším způsobem, jak lze ovlivnit elektroforetickou mobilitu nanočástic, je přidavek povrchově aktivní látky do roztoku základního elektrolytu. Vliv přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) na elektroforetické chování zlatých [219] (obrázek 18) a stříbrných [220] nanočástic (obrázek 19) zkoumali Liu a kol. Přídavkem SDS do elektrolytu je zvýšena schopnost CE separovat nanočástice těchto kovů. Nabité povrchově aktivní látky se váží k povrchu nanočástic zlata, resp. stříbra, a způsobují tak změnu poměru náboje k velikosti nanočástice (změna povrchové chemie). Při vysokých koncentracích SDS (povrch nanočástic je plně obsazen SDS) byl pozorován lineární vztah mezi elektroforetickou pohyblivostí a velikostí částic zlata o průměru 5,3 až 38 nm [219] nebo také Au/Ag „core-shell“ nanočástic o průměru 24,3 až 90,2 nm (obrázek 20) [138]. Jejich práce také demonstruje, že přítomnost povrchově aktivní látky zvyšuje rozlišení separace nanočástic, nebo může dokonce zabránit koagulaci NPs během separačního procesu [220].



*Obrázek 18: Vliv koncentrace SDS na elektroforetickou mobilitu zlatých nanočástic. (A) 5,3 nm, (B) 19 nm. BGE: 10 mM CAPS pH 10,0; aplikované napětí 20 kV. Převzato z publikace [219].*



*Obrázek 19: Vliv SDS na separaci Ag NPs o různé velikosti („1“ = 17,0 nm; „2“ = 49,7 nm). (A) 0 mM, (B) 20 mM SDS. BGE: 10 mM Tris pH 8,5; aplikované napětí 20 kV. Převzato z publikace [220].*



**Obrázek 20:** Vliv velikosti Au/Ag nanočástic typu „core-shell“ na elektroforetickou mobilitu při použití SDS. (A) Elektroferogramy Au/Ag nanočástic o různých velikostech („1“ = 24,3 nm; „2“ = 40,7 nm; „3“ = 53,6 nm; „4“ = 74,7 nm a „5“ = 90,2 nm). BGE: 10 mM CAPS + 40 mM SDS pH 9,7; aplikované napětí 20 kV; detekce 400 nm. (B) Závislost elektroforetických mobilit Au/Ag nanočástic na jejich velikosti. Převzato z publikace [138].

Nový přístup ke studiu sub-mikronových suspenzí částic oxidu křemičitého byl založen na současné aplikaci tlaku a napětí během elektroforetické separace. Není velkým překvapením, že současná aplikace napětí i tlaku během CZE ovlivňuje celkovou mobilitu částic (se zvyšujícím se tlakem a velikostí částic roste také celková mobilita NPs) [221].

Vanifatova a kol. [222] také studovali vliv doby nástřiku, tlaku při nástřiku, elektrického pole a typu elektrolytu na CE analýzu maghemitových ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) nanočástic. Naproti tomu, Radko a Chrambach sledovali faktory ovlivňující selektivitu, rozlišení a rozšiřování píků během analýzy karboxylovaných polystyrenových latexových sub-mikronových částic [74]. Vliv složení pufru, proti-iontu, pH a iontové síly na elektroforetické chování a mobilitu vzorku obsahujícího nanočástice oxidovaného uhlíku z plamene olejové lampy byly zase podrobně studovány Bakerem a Colónem [223].

## 2.4 APLIKACE NANOČÁSTIC V KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH TECHNIKÁCH

Aplikace nanočástic se nejen v kapilárních elektromigračních, ale i v ostatních separačních technikách těší velkému zájmu. To je způsobeno zejména jejich příznivým poměrem povrch/objem [224].

Pravděpodobně nejčastější aplikace nanočástic v kapilárních elektromigračních separačních technikách je jejich použití jako stacionární nebo „pseudostacionární“ fáze v chromatografických a elektrochromatografických separacích. Zde bývají využity zejména pro zlepšení selektivity, chemické stability a účinnosti separace [225]. Mohou však být také využity pro chirální separace, zakoncentrování různých analytů nebo úpravu vzorku před vlastní analýzou, pro zesílení signálu analytů, pokrytí vnitřní stěny kapiláry, v nových přístupech analýzy DNA pomocí CE nebo dokonce na jejich bázi mohou fungovat elektrochemické detektory.

### 2.4.1 „Pseudostacionární“ fáze v (micelární) elektrokinetické chromatografii

Nejčastěji používané nanočástice v elektrokinetické chromatografii (EKC) jsou částice uhlíku. Do základního elektrolytu je možno přidat uhlíkové nanotrubičky, jež navíc mohou být pro další zlepšení vlastností (např. selektivita) různě funkcionalizovány. Ty pak slouží jako „pseudostacionární“ fáze v CE, která může s různými analyty interagovat na základě van der Waalsových sil nebo elektrostatických interakcí polárních funkčních skupin. Také mohou být porézní, a proto se na ně mohou analyty adsorbovat. Například, karboxylované vícevláknové uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs) byly použity pro separaci nesteroidních protizánětlivých léčiv [226], grafitizované MWCNTs pokryté vrstvou povrchově aktivovaných látek pak byly použity pro analýzu fytochemických sloučenin v biologických tekutinách [227]. Jednovláknové uhlíkové nanotrubičky (SWCNTs) byly použity např. pro analýzu směsi vitaminů, chlorofenolů, penicilinů a pro zlepšení separace izomerů

norefedrinu [228, 229]. Dalším, pro tyto účely používaným, uhlíkovým materiálem je fulleren [230, 231] a grafenové kvantové tečky [232].

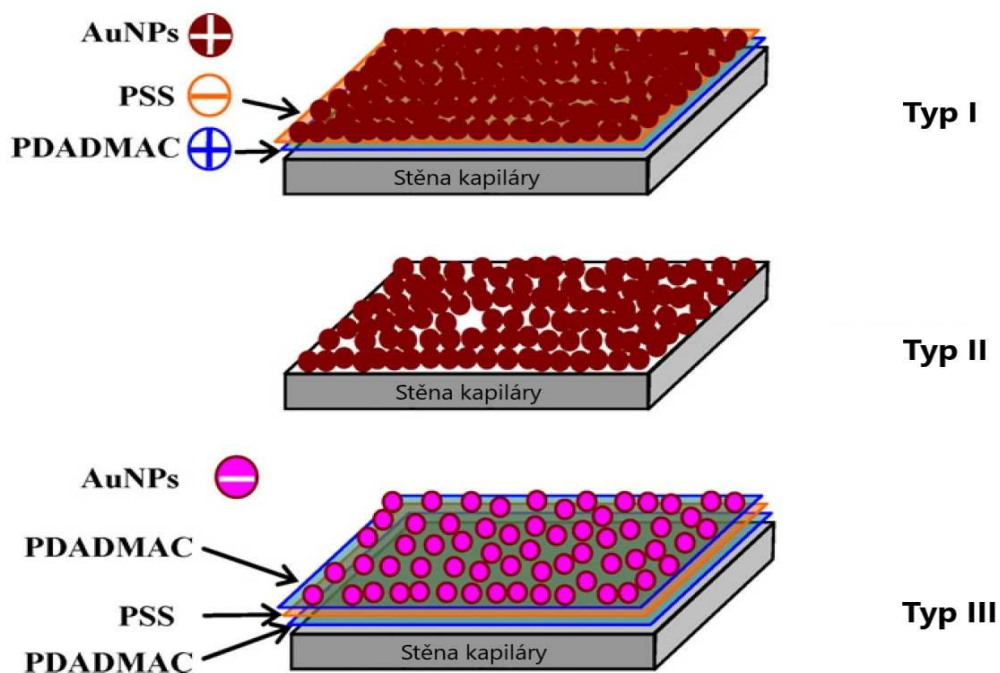
Lze však také použít mnoha jiných nanomateriálů, jako je Au [233], oxid křemičitý [234, 235], TiO<sub>2</sub> [236], kationtové latexové nanočástice [237] nebo organokovové nanokrystaly [238].

Další možností je přidání NPs do pufru při MEKC pro vnesení další interakční rovnováhy. Tímto způsobem je možno zvyšovat selektivitu podobně jako v cyklodextrinem modifikované EKC [239, 240].

Mohou být studovány také interakce mezi nanočásticemi (pokud jsou používány jako přísady v EKC) a analyty. Grela a kol. [191] studovali vliv polymerních částic na separaci peptidů. Rovněž zjistili, že interakce mezi použitými nanočásticemi a peptidy jsou převážně iontového charakteru.

## **2.4.2 Stacionární fáze v kapilární elektrochromatografii**

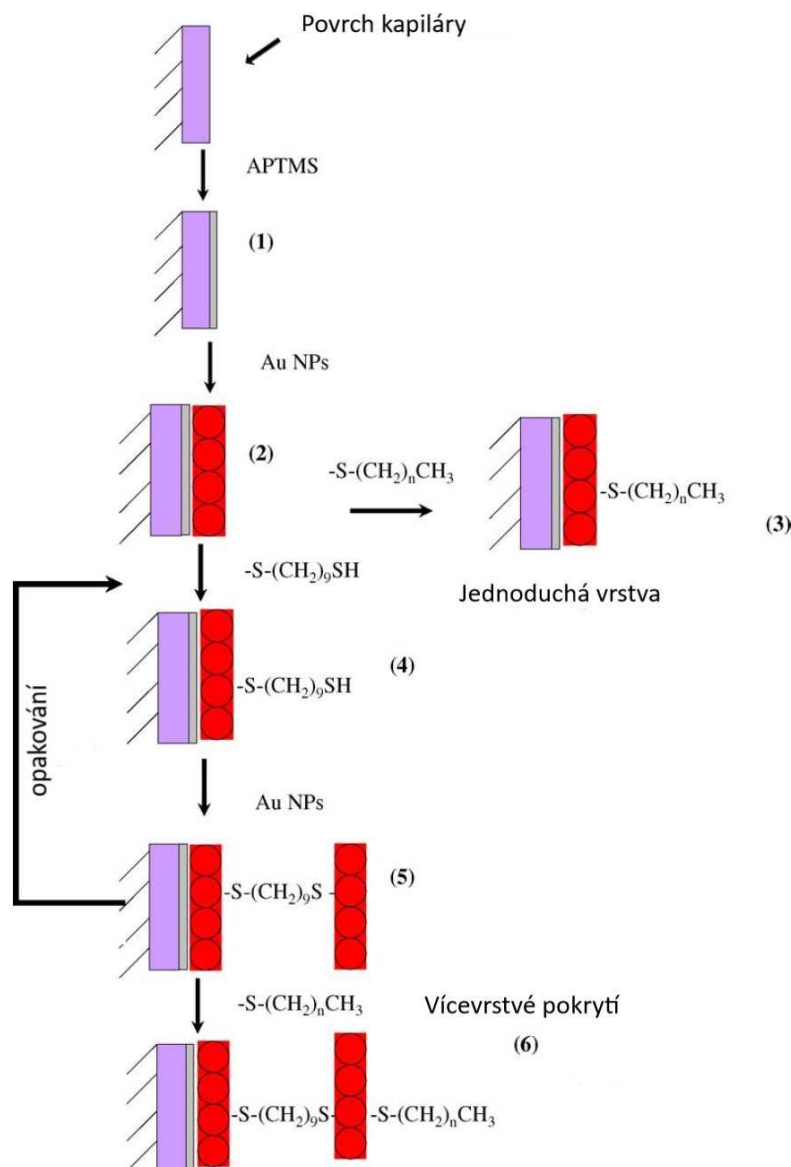
NPs používané v CEC mohou být k vnitřní stěně kapiláry vázány dynamicky (adsorpcí) [241, 242] nebo kovalentně [243-245]. Qu a kol. [246] připravili permanentně pokryté kolony iontovou adsorpcí Au NPs na stěnu kapiláry modifikovanou vrstvami polyelektrolytu („polyelectrolyte multilayer” – PEM). Takové pokrytí se ukázalo být velmi stabilní (pro více než 810 analýz). Kapilára je střídavě promývána roztokem polyelektrolytu (polydiallyldimethylammonium chlorid – PDADMAC a polystyren sulfonát - PSS) a disperzí kationových Au nanočástic. Kapilára je tedy pokryta vrstva po vrstvě („layer-by-layer“) několika vrstvami polyelektrolytu a nanočástic. Takto různě pokryté kapiláry (obrázek 21) byly potom použity pro separaci proteinů obsažených ve vaječných bílcích.



*Obrázek 21: Schéma přípravy třech typů kapilár pokrytých vrstvami polyelektrolytů a různě nabitých nanočástic zlata „self-assembly“ procesem. Převzato a upraveno z publikace [246].*

Podobný postup použili Liu a kol. [247] k přípravě tzv. „open tubular“ kolon pro kapilární elektrochromatografii (OTCEC) s navázanými zlatými nanočásticemi. Ty posléze využili k separaci třech neutrálních steroidů. Poslední vrstva však neobsahuje nanočástice, ale tzv. „self-assembly“ procesem jsou na ně navázány alkanthioly a dithioly s různě dlouhým uhlíkatým řetězcem. Schéma přípravy takto pokrytých kapilár je uvedeno na obrázku 22. V práci je také ukázáno, že délka řetězce a počet vrstev hraje pro separaci zásadní roli.





*Obrázek 22: Schéma přípravy kapilár jednovrstvě a vícevrstvě pokrytých alkanthioly a nanočásticemi zlata „self-assembly“ procesem. Převzato a upraveno z publikace [247].*

Liu a kol. [248] použili pro zlepšení enantioseparace vybraných léčiv (Naproxen, Warfarin, Pranoprofen) grafen oxidem kovalentně modifikovanou stacionární fázi na bázi glycidylmethakrylátu.

Další možností, jak využít nanočástic ve stacionárních fázích je příprava porézních polymerních monolitických kolon, kdy je povrch pórů díky NPs zvětšen. Pro srovnání: první generace monolitických kolon na bázi organických polymerů neobsahuje mezopóry a jejich povrch nepřesahuje  $50 \text{ m}^2/\text{g}$ , zatímco monolity na bázi částic oxidu křemičitého mají typicky

povrch kolem 300 m<sup>2</sup>/g. Navíc, pokud jsou použity zlaté nanočástice, tak mohou být opět dále modifikovány navázáním alkanthiolů [249].

Zhang a kol. [250] provedli chirální separaci tryptofanu mikročipovou elektroforézou za použití stacionární fáze, která byla vytvořena následnou imobilizací polydopaminu, Au NPs a DNA na povrchu skleněného mikrofluidního kanálu pomocí „layer-by-layer“ procesu. Výhody takto připraveného mikročipu spočívají nejen ve zvětšení specifické oblasti mikrofluidního čipového kanálu, ale především ve zjednodušení imobilizace chirálního selektoru.

Velký potenciál pro separaci biologických vzorků má stacionární fáze na bázi polymerem modifikovaných vláknových mezopórovitých SiO<sub>2</sub> nanočástic [251].

Hu a kol. [252] publikovali přehledový článek, který je zaměřen na nejnovější aplikace a pokroky v použití NPs ve stacionárních fázích pro CEC. Popsali zde různé postupy pro jejich imobilizaci, včetně fyzikální adsorpce NPs, možnosti kovalentního navázání NPs a další metody pro mnoho různých typů nanočástic. Také Tarongoy a kol. [253] se zabývali velmi nedávným vývojem v oblasti OTCEC, včetně použití různých typů NPs, zatímco Guihen publikovala podrobný přehled o aplikacích zlatých nanočástic s navázanými alkythioly v kapilární elektroforéze a kapilární elektrochromatografii [254]. Obecný přehled nejnovějších aplikací nanomateriálů používaných, jak pro „pseudostacionární“ fáze v elektrokinetické chromatografii, tak pro stacionární fáze v mikročipové elektroforéze a kapilární elektrochromatografii ve své publikaci shrnují Gonzáles-Curbelo a kol. [255].

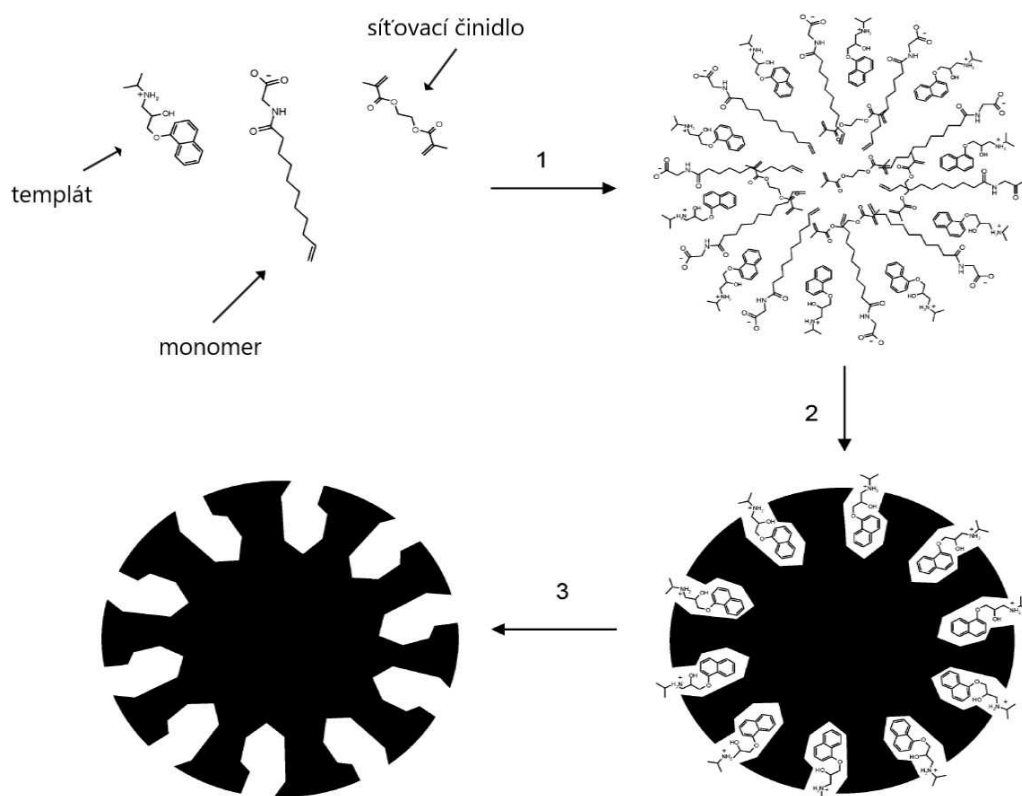
### 2.4.3 Nanočástice jako chirální selektory v CE

$\beta$ -cyklodextrin ( $\beta$ -CD), jež může být různě modifikován, je asi nejčastěji používaný chirální selektor v CE separacích. Má nepolární vnitřní dutinu, zatímco jeho vnější povrch je polární [256]. Jeho schopnost separovat enantiomery může být zvýšena, pokud je navázán na různé typy nanočástic, zejména MWCNTs, jak ukazuje Na a kol. [257].

Bylo však také ukázáno, že uhlíkové nanostruktury (SWCNTs a MWCNTs) mohou sloužit jako chirální selektory přímo. Například Moliner-Martinez a kol. [258] je využili pro separaci enantiomerů derivátů efedrinu.

Nový přístup k získání chirální separace optických izomerů aminokyselin studoval Huang a kol. [259]. Při této metodě byly zlaté nanočástice modifikovány chirálními iontovými kapalinami.

Velmi efektivním způsobem, jak provádět chirální separace, je využití polymerních nanočástic, do nichž jsou cílové analyty doslova „vtisknuty“. Jedná se o tzv. „molecularly imprinted polymer (nano)particles“ (MIPs). MIPs jsou tedy chirální selektory, jež jsou specifické vůči určitému analytu. Jsou vyráběny tak, že monomerní prekurzory jsou orientovány kolem templátu (analytu) a následně polymerovány v rozpouštědle, za přítomnosti iniciátoru a síťovacího („cross-linking“) monomeru. Tímto způsobem vzniká okolo templátu dobře definovaná chemicky komplementární 3D struktura [224, 260, 261]. Schématicky je vznik MIPs znázorněn na obrázku 23. Wu a kol. [262] pro separaci chirálních sloučenin využili stejný přístup, kde byly použity magnetické MIPs o velikosti 400 nm jako stacionární fáze pro mikročipovou kapilární elektrochromatografii. V tomto mikročipu byly tedy zmíněné MIPs drženy magnetem.



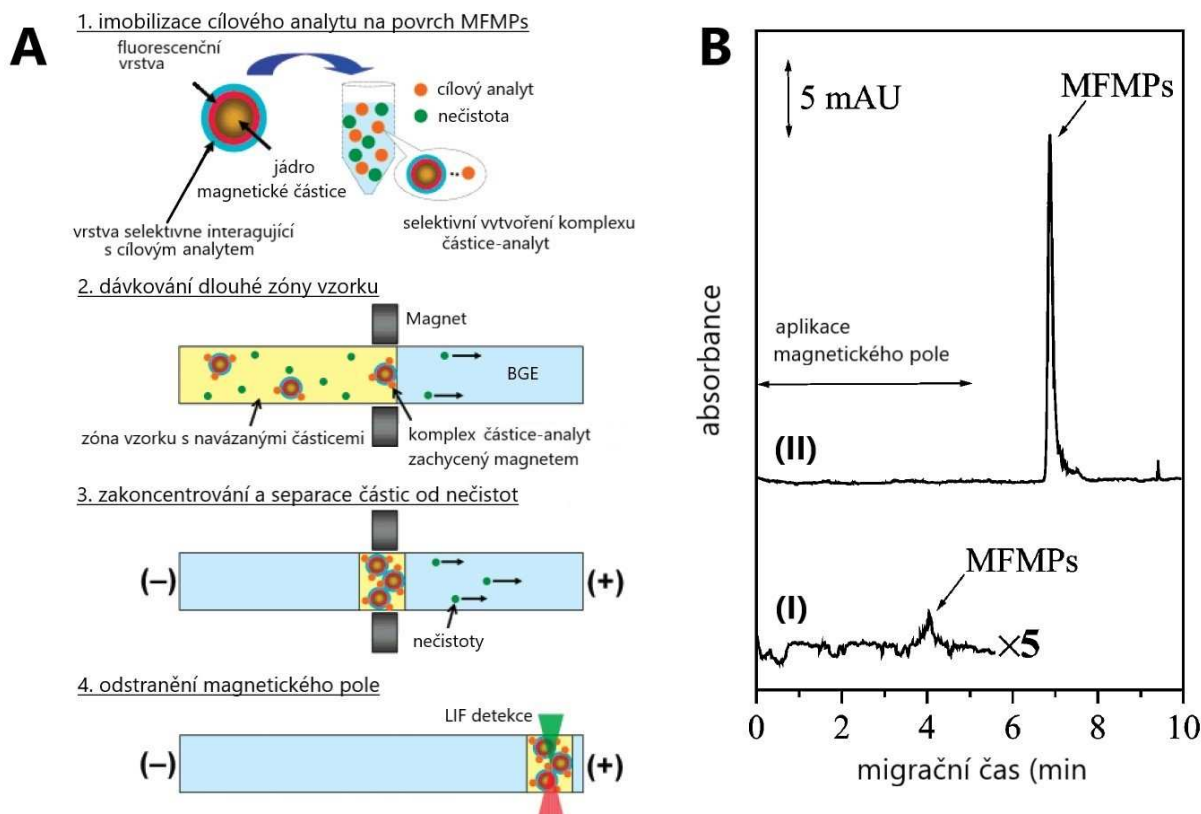
*Obrázek 23: Schéma přípravy MIPs. 1) samovolná orientace přítomných molekul v roztoku, 2) polymerace, 3) odstranění templátu. Převzato z publikace [261].*

## 2.4.4 Nanočástice pro prekoncentraci a úpravu analytů v CE

Pro off-line prekoncentraci analytů lze použít např. extrakci pevnou fází (SPE) nebo disperzní mikroextrakci tuhými fázemi (DMSPE). Například Contin a kol. [263] jako první představili vývoj MIPs pro selektivní extrakci koenzymu Q10 před CE analýzou. Ruiz-Palomero a kol. [264] pak využili nanomateriálu (sulfatovaná nanocelulóza) jako sorbentu, před CE stanovením analytu rovněž nanometrových rozměrů, což byly v tomto případě nanočástice stříbra.

Liu a kol. [265] stanovovali pomocí MEKC tři neutrální steroidy (testosteron, progesteron a testosteron propionát). Nejprve kombinovali off-line SPE prekoncentraci (jako sorpční materiál zde byl použit silikagel modifikovaný navázáním zlatých nanočástic) a on-line prekoncentrační techniku (tzv. „sweeping“). Při tomto postupu bylo dosaženo 700-, 1090-, a 1100-násobného zlepšení detekčních limitů pro zmíněné analyty. Ve své pozdější práci použili pro on-line prekoncentraci a separaci stejných steroidních analytů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie Au NPs funkcionalizované thiolovými skupinami. Tyto částice byly jednoduše přidány do základního elektrolytu použitého pro separaci [266].

Magnetické částice, reagující na magnetické pole, je možno využít pro separaci buněk [267], dynamickou DNA hybridizaci (metoda pro analýzu genové exprese) [268], pro prekoncentraci kovových iontů [269] a pro mnoho dalších aplikací [270-272]. Pro dosažení selektivní a citlivé CE analýzy lze rovněž použít tzv. multifunkčních magnetických částic (MFMPs). Pomocí těchto částic Okamoto a kol. [273] dosáhli při CE analýze v afinitním módu on-line prekoncentrace a selektivní separace nízkohustotních lipoproteinů od vysokohustotních (obrázek 24).



*Obrázek 24: A) Princip on-line preconcentrace a selektivní separace lipoproteinů za použití magnetických multifunkčních částic (MFMPs), B) CE analýza MFMPs bez použití magnetického pole (I) a při podmínek preconcentrace za použití magnetického pole (II); dávkování aplikací napětí 10 kV po dobu 10 (I) a 600 s (II). Převzato a upraveno z publikace [273].*

Kitagawa a kol. [274] prováděli on-line preconcentraci a separaci fosfopeptidů také pomocí metody „sweeping“. Je poměrně dobře známo, že částice oxidu titaničitého mohou v kyselém prostředí zachycovat fosfopeptidy, zatímco za alkalických podmínek jsou z těchto částic eluovány. Při této metodě byla kapilára naplněna alkalickým roztokem elektrolytu, poté byla nadávkována dlouhá zóna nanočástic TiO<sub>2</sub> (1%) rozptýlených rovněž v alkalickém roztoku. Nakonec byl do kapiláry dávkován velký objem vzorku fosfopeptidu (rozpuštěný v kyselém roztoku). Vzhledem ke komplexaci na povrchu částic, po aplikaci separačního napětí byly analyty zakoncentrovány do úzké zóny.

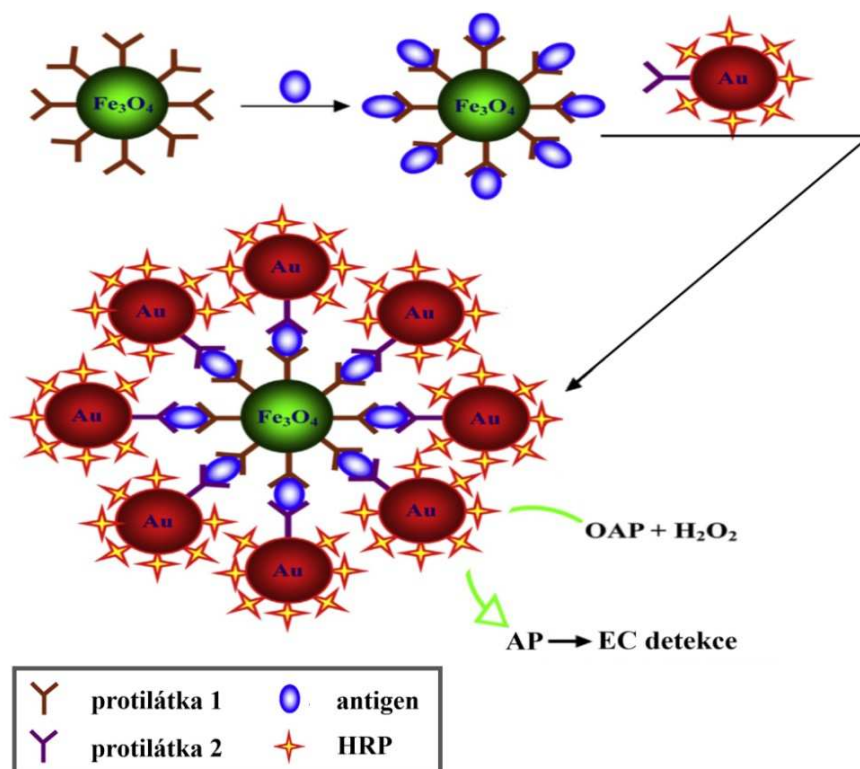
MIP magnetické nanočástice byly také použity pro preconcentraci a specifické stanovení ultra-stopového množství methylrtuti ve vzorku přírodních vod pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s ICP-MS [275]. Limit detekce zde byl stanoven na 0,084 pg/ml.

Wang a kol. [276] popsali novou strategii pro „screening“ inhibitorů enzymů z přírodních produktů kapilární elektroforézou s předkolonovým enzymovým vsádkovým reaktorem připraveným z magnetických Au nanočástic. Podobný přístup použili Liu a kol. [277], avšak za použití amino-skupinami funkcionalizovaných magnetických ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ) nanočástic.

Adam a Vaculovičová velmi nedávno shrnuli ve svém přehledovém článku využití nanomateriálů pro předběžnou úpravu vzorků v kapilární elektroforéze, zejména ve smyslu jejich použití pro extrakci a přečištění vzorků a v prekoncentračních technikách, ať už jde o on-line nebo off-line spojení těchto metod s kapilární elektroforézou [278].

## 2.4.5 Nanočástice pro zesílení signálu analytů v CE

Zlaté nanočástice mohou být velmi užitečné pro zesílení signálu v imunoanalýzách na bázi CE. Např. Zhang a kol. [279] představili technologii založenou na sendvičové imunoanalýze (IA) ciguatoxinu (CTX3C), která je znázorněná na obrázku 25. Při této metodě je použito dvou různých typů NPs. Prvním typem jsou magnetické, protilátkou (anti-CTX3C) funkcionalizované, nanočástice („imuno-snímací sondy“). Druhým typem jsou Au NPs, na jejichž povrch je navázána protilátka a několik molekul křenové peroxidázy (rozpoznávací prvky). On-line tvorba imunokomplexu je realizována přímo ve vstupním konci kapilárny na něž je přivedeno vnější rotující magnetické pole. Komplex může být pak účinně separován pomocí CE a citlivě detekován v elektrochemickém článku, protože HRP katalyzuje reakci mezi  $\text{H}_2\text{O}_2$  a o-aminofenolem za vzniku 2-aminophenoxazonu. Au NPs zde tedy slouží jako multienzymový nosič, jež umožňuje navázání více molekul křenové peroxidázy (HRP) na jednu nanočástici, čímž je při detekci vznikající elektrochemický signál značně amplifikován.



*Obrázek 25: Princip CE imunoanalýz na bázi nanočástic. Nejprve jsou vytvořeny magnetické sondy  $Fe_3O_4$ -protilátka 1, které jsou nadávkovány do kapiláry a za přítomnosti rotujícího magnetického pole jsou nadávkovány analyty (antigen). Potom jsou dávkovány předem připravené komplexy HRP-Au NPs-protilátka 2 a po inkubaci dojde k „sendvičovému“ imunokomplexu. Následuje separace a elektrochemická detekce. Převzato a upraveno z publikace [279].*

Další možností je využití fotoluminiscence, jež poskytují kyselinou thioglykolovou modifikované kvantové tečky CdTe. Tato fotoluminiscence je dále zvýšena v přítomnosti aminoglykosidů. Tímto způsobem provedli Khan a kol. [280] stanovení kanamycinu ve vzorcích mléka, vakcíně proti žluté zimnici a říční vodě. Navíc pro off-line prekoncentraci opět využili SPE kolon na bázi MIP NPs.

Alsudir a kol. [281] zase ukázali, že citlivost UV detekce nanočástic ZnO může být selektivně zvýšena adsorpcí dithiothreitolu a L-cysteinu na povrch NPs.

Nedávné aplikace kvantových teček nebo nanočástic ke zvýšení emise chemiluminiscence při detekci v kapilárních elektromigračních technikách poskytly významný pokrok při řešení analytických problémů v různých oblastech, jako je klinická, environmentální a potravinová analýza. Tyto pokroky jsou sumarizovány např. v přehledovém článku, který vypracovali Lara a kol. [282].

## 2.4.6. Nanočástice pro modifikace vnitřních stěn CE kapilár

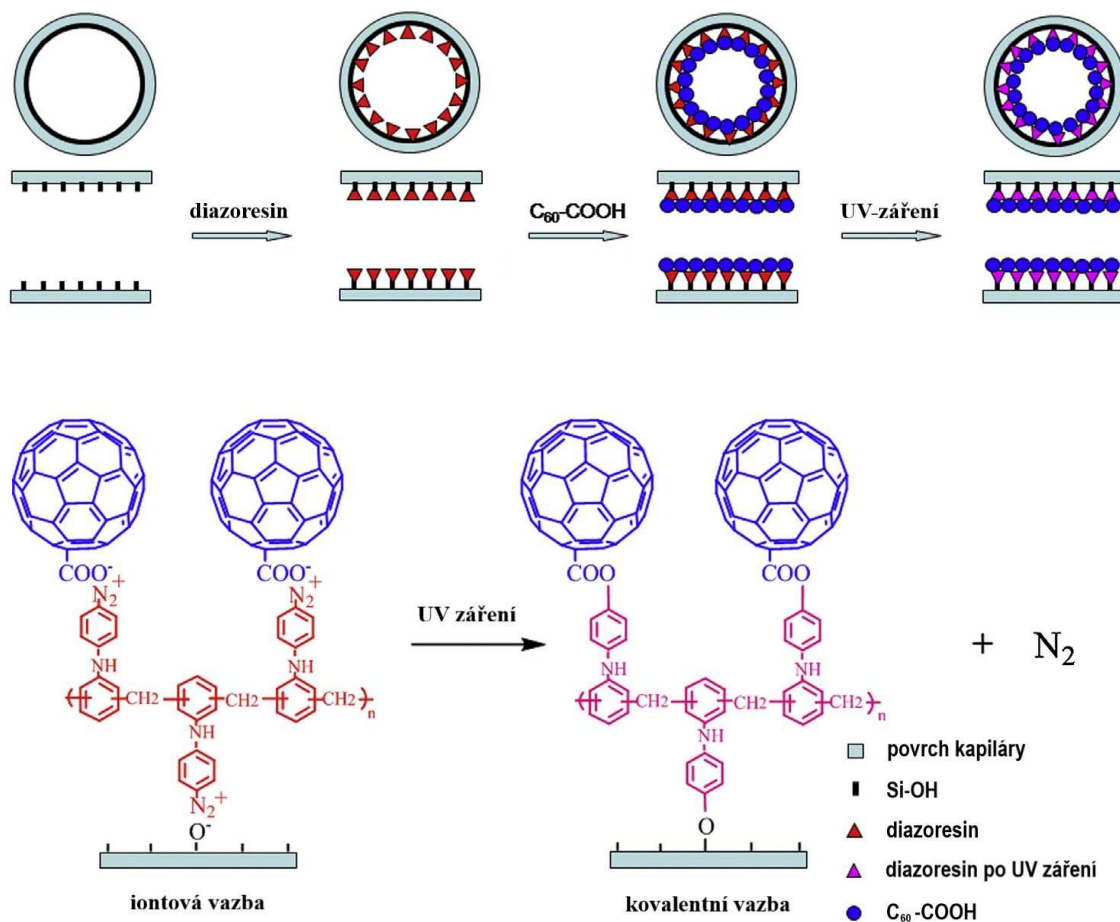
Jak již bylo zmíněno, v mnoha případech je analyt, velmi často proteiny, adsorbován na nijak neošetřených stěnách kapiláry, nejčastěji zhotovených z taveného křemene. To pak znemožňuje provedení spolehlivých analýz. Tento jev lze potlačit pokrytím vnitřních stěn kapilár polymery, čímž jsou přítomné silanolové skupiny odstraněny. Někdy může být pro takové pokrytí užitečné použití nanočástic.

Například Yu a kol. [283] vyvinuli a testovali kovalentně a „self-assembly“ procesem pokryté kapiláry karboxylovanými fullereny a grafen oxidem (obrázek 26). Ty byly připraveny za použití fotosenzitivního diazoresinu jako vazebného činidla tak, že na stěnu kapiláry byl nejprve navázán „layer-by-layer“ metodou diazoresin a fulleren 60, resp. grafen oxid. Toto pokrytí, založené na iontových vazbách, bylo následně fotochemicky (UV zářením) konvertováno na kovalentní vazbu. Jak bylo ukázáno, na rozdíl od grafen oxidem pokrytých kapilár, mají kapiláry ošetřené fullerem dobrou schopnost potlačit adsorpci proteinů na vnitřní povrch křemenných kapilár, takže bylo dosaženo separace vybraných proteinů s dobrým rozlišením. Další výhodou je, že diazoresin zde nahrazuje jindy používaná, vysoce toxická silanizační činidla.

Hajba a Guttman nedávno ve své publikaci zhodnotili nejnovější trendy v oblasti přípravy dynamicky a permanentně pokrytých kapilár, včetně využití nanočástic, jako nových materiálů, jež lze k těmto účelům použít [284]. Je zřejmé, že nanomateriály mají díky svým jedinečným vlastnostem (zejména příznivému poměru plocha/objem a díky tomu, že existuje spousta možností, z čeho mohou být vyrobeny a jak mohou být modifikovány) velký potenciál se v této oblasti uplatnit.

Dalším důvodem, proč modifikovat stěnu kapiláry nanočásticemi, může být příprava mikroreaktorů s imobilizovanými enzymy přímo v kapiláře, tzv. „immobilized microenzyme reactors“ (IMERs). Ty pak mohou být využity pro in-line enzymatické reakce. Ramana a kol. [285, 286] vyvinuli pro tyto účely metodu, kdy jsou na stěně kapiláry zachyceny magnetické NPs, na které jsou potom enzymy imobilizovány.





Obrázek 26: Schématické znázornění přípravy diazo-resin-fullerem pokrytých kapilár. Převzato z publikace [283].

## 2.4.7 Elektrochemické detektory na bázi nanočástic v CE

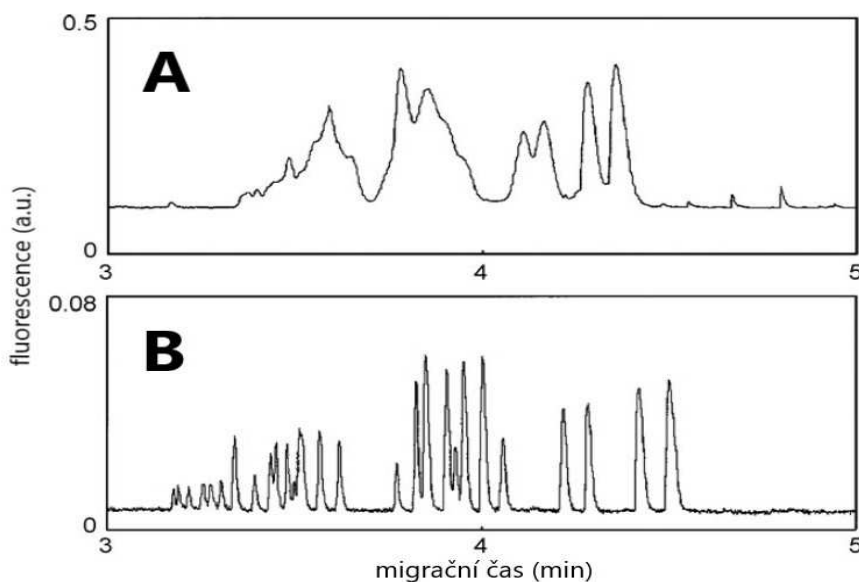
Také elektrochemické detektory používané pro CE analýzy mohou být na bázi nanočástic. Mezi vlastnosti takových detektorů pak patří zejména vysoká citlivost, jednoduchost zařízení, nízké náklady a možnost miniaturizace.

Například Zhang a kol. [88] vyvinuli kompozitní elektrodu na bázi uhlíkových nanotrubic (CNT) a polydimethylsiloxanu (PDMS) pro CE stanovení pěti fenolických bioaktivních složek v *Rhizoma Chuanxiong*, rostlině používané v tradiční čínské medicíně. Takto připravená elektroda se vyznačovala vysokou citlivostí, zdatně nižším aplikovaným potenciálem (ve srovnání s kompozitní elektrodou na bázi grafen-PDMS), dobrou reprodukovatelností, nízkými provozními náklady a dobrým rozlišením signálů. Wang a kol.

[287] použili mikro-diskové elektrody modifikované platinovými nanočásticemi pro stanovení peroxidu vodíku a kyseliny askorbové. Vlastnosti uhlíkových a kovových nanomateriálů použitých pro elektrochemickou detekci v CE, mikročipové elektroforéze a papírových mikrofluidních zařízení jsou shrnuty v publikaci, jež vypracovali García-Carmona a kol. [288].

## 2.4.8 Nanočástice pro zlepšení analýzy DNA pomocí CE

Ohno a kol. [289] diskutovali účinek různě velkých nanočástic oxidu křemičitého na separaci fragmentů DNA pomocí mikro-kapilární elektroforézy. Na obrázku 27 je ukázáno, jak přidavek různě velkých nanočástic ovlivňuje mobilitu DNA fragmentů. Nejlepší bylo použití částic o velikosti 20 nm (Huang a kol. [290]). Podobně lze separaci DNA fragmentů zlepšit použitím uhlíkových nanotrubic [291]. Pro zlepšení sekvenování DNA pomocí kapilární gelové elektroforézy byly také použity poly(N,N-dimethylakrylamidem) – PDMA funkcionalizované Au NPs. Tyto částice byly přidány do pufru obsahující „kvazi-propustnou síť“ vytvořenou lineárním polyakrylamidem a PDMA, za vzniku polymer/kovové kompozitní gelové matrice [292].



*Obrázek 27: Vliv přítomnosti zlatých nanočástic v elektrolytu na rozlišení separace fragmentů DNA. BGE: 25 mM glycin + 0,2 % PEO (8 MDa) + 0,5  $\mu$ g/ml ethidium bromid pH 9,0; aplikované napětí 15 kV; dávkování aplikací napětí 1 kV po dobu 10 s; fluorescenční detekce za použití He-Ne laseru (excitační vlnová délka 543,6 nm). A) pufr neobsahuje nanočástice, B) pufr obsahuje Au NPs (56 nm). Převzato z publikace [290].*

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tématem disertační práce bylo studium chování karboxylovaných magnetických nanočástic, na bázi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (možnost prekoncentrace a jejich charakterizace), v kapilárních elektromigračních technikách, přičemž byly stanoveny tři cíle:

1. Studium NPs při tzv. „stacking“ efektu, a tedy popis chování nanočástic na rozhraní dvou prostředí o různých vlastnostech. Navíc, protože je tohoto efektu nejčastěji využíváno pro on-line prekoncentraci analytů, bylo rovněž cílem zjistit, při jakém zředění lze tyto nanočástic pomocí „stacking“ efektu ještě detekovat.

2. Studium možnosti elektrokinetického dávkování zkoumaných nanočástic do kapiláry a nalezení vhodných podmínek pro dosažení maximálního prekoncentračního faktoru při použití on-line prekoncentrační techniky, tzv. zakoncentrování s využitím elektrokinetického dávkování (FESI).

3. Studium interakcí karboxylovaných  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočástic s polypeptidovým antibiotikem polymyxinem B (charakterizace povrchové chemie nanočástic), pomocí afinitní kapilární elektroforézy, která byla pro selektivní a citlivou detekci analytů spojena s ICP-MS.

Řešení cílů vedlo k publikačním výstupům:

1. **D. Baron**, P. Dolanská, Z. Medříková, R. Zbořil, J. Petr, On-line stacking of carboxylated magnetite core-shell nanoparticles in capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, 40 (2017) 2482-2487.

2. **D. Baron**, C. Cacho, J. Petr, Electrokinetic preconcentration of magnetite core - carboxylic shell nanoparticles by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1499 (2017) 217-221.

3. **D. Baron**, J. Rozsypal, A. Michel, J.M. Siaugue, T. Pluháček, J. Petr, Study of interactions between carboxylic magnetite nanoparticles and polymyxin B by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatogr A*, zasláno.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 STUDIUM „STACKING“ EFEKTU KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC

#### 4.1.1 Chemikálie

##### 4.1.1.1 Pufry

Základní elektrolyty pro studium „stacking“ efektu byly připraveny z kyseliny borité a hydroxidu sodného. Chlorid sodný byl využit pro studium stability nanočástic v závislosti na vzrůstající iontové síle. Všechny tyto chemikálie byly o čistotě p. a. a byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Použitá voda byla deionizovaná (18,2 MΩ.cm), čehož bylo dosaženo přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA). Při přípravě základních elektrolytů byly rovněž použity pufry pro kalibraci pH metru, které byly zakoupeny od společnosti Hanna Instruments (Woonsocket, RI, USA).

##### 4.1.1.2 Nanočástice

Studované nanočástice byly poskytnuty týmem prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. Tyto nanočástice byly připraveny v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) v Olomouci podle postupu, který popsali Bakandritsos a kol. [293].

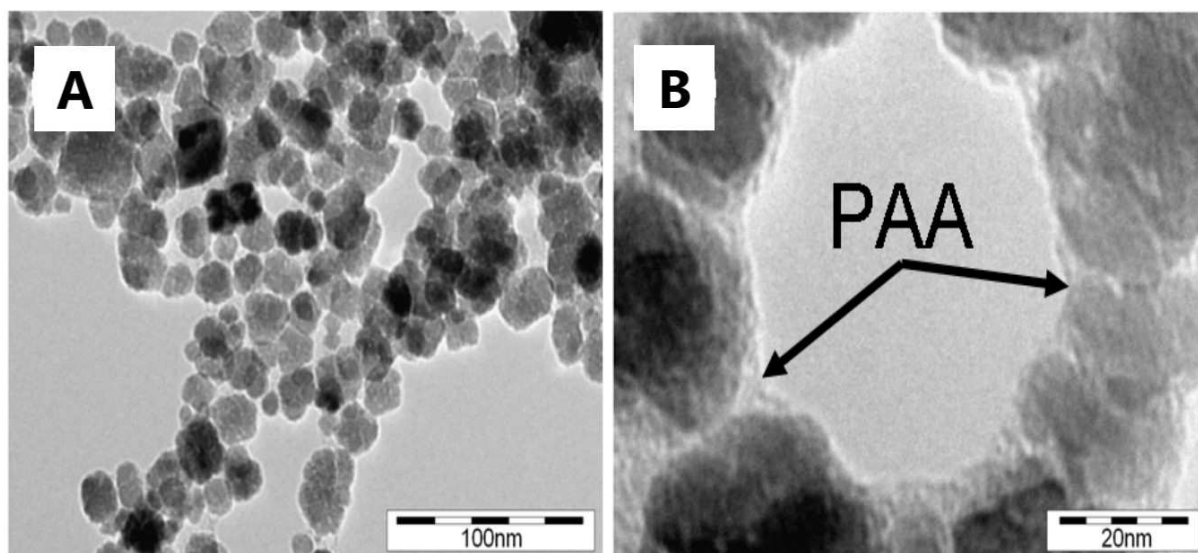
Karboxylované magnetické nanočástice (MNPs) byly připraveny syntézou, která zahrnuje hydrolytickou transformaci hydroxospecií  $\text{Fe}^{2+}$  v magnetitové nanočástice ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), za přítomnosti polykarboxylového polymeru (konkrétně polyakrylové kyseliny). 660 mg polyakrylové kyseliny (PAA) bylo rozpuštěno v redestilované vodě (30 ml). Do tohoto roztoku, který byl míchán (350 rpm) a zahříván na 40 °C byl přidán 1 ml roztoku NaOH o koncentraci 10 M. Připravený roztok síranu železnatého (720 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 20 ml redestilované vody, předem okyselené přídavkem 60  $\mu\text{l}$  37 % HCl) byl za stálého míchání přidán k roztoku PAA. Směs byla poté zahřáta na 60 °C a míchána dalších 90 minut. Potom byla směs volně ochlazená na laboratorní teplotu a utvořené NPs byly magneticky odděleny.

Odseparované nanočástice byly suspendovány v redestilované vodě (40 ml) a centrifugovány (10 000 g, 60 min). MNPs byly poté opět suspendovány v redestilované vodě a ultrazvukovány (15 min). Vzniklá disperze byla pro oddělení případných agregátů podrobena ještě jednou centrifugaci (2 000 g, 20 min). Nakonec byl odebrán supernatant, který byl uchován při 4 °C.

Morfologie připravených MNPs pokrytých polyakrylovou kyselinou (PAA) je uvedena na obrázku 28, kde je rovněž vyobrazena povrchová vrstva tvořená PAA.

#### 4.1.2 Charakterizace nanočástic

TEM snímky připravených karboxylovaných MNPs byly pořízeny mikroskopem JEOL JEM-2010 pracujícím při 160 kV a rozlišení 1,9 Å.



*Obrázek 28: TEM snímky PAA stabilizovaných MNPs.*

DLS měření bylo použito ke stanovení středního hydrodynamického průměru (75 nm) a hodnot zeta potenciálu (-46 mV), přístrojem Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Operační parametry byly následující: index lomu: 2,42; viskozita: 0,8872 cP; teplota: 25 °C, prostředí: voda, absorbance materiálu: 0,01; index lomu prostředí: 1,330; detekční úhel: 173°; vlnová délka: 633 nm). Měření bylo provedeno na Latvian Institute of Organic Synthesis (Laboratory of Membrane active compounds and  $\beta$ -Diketones) v Rize.

Poměr mezi magnetitem (92,6 %) a polymerem (7,4 %) byl určen termogravimetrickou analýzou (STA 449C Jupiter).

Koncentrace [Fe] = 0,0187 M, odpovídá 1,44 mg magnetitu/ml.

V práci je koncentrace NPs vyjádřena ředícím faktorem  $\rho$ , který je definován tak, že jeho hodnota je rovna jedné, pokud není výsledná přípravená disperze nijak ředěna (v případě těchto nanočástic tedy platí, že  $\rho = 1$  u částic o koncentraci 1,44 mg magnetitu/ml,  $\rho = 0,1$  pokud jsou ředěny 10x apod.).

Stabilita připravených MNPs byla stanovena pomocí DLS měření, kdy byla sledována závislost hodnot hydrodynamického průměru ( $d_H$ ) karboxylovaných MNPs na koncentraci přidaného NaCl. Významné destabilizace MNPs bylo dosaženo při koncentracích nad 0,5 M NaCl (vodný roztok).

### 4.1.3 Příprava základních elektrolytů

Všechny pufrы byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny borité ve vodě tak, aby vznikly roztoky o koncentraci 5 – 250 mM. Vzniklé roztoky byly potom za stálého míchání titrovány roztokem hydroxidu sodného o koncentracích 50 a 10 % (w/w) až na požadovanou hodnotu pH (9,5). Hodnota pH byla průběžně sledována pomocí pH metru. Pufrы byly uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

### 4.1.4 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny analýzy byly provedeny na přístroji HP 3DCE vybaveným detektorem s diodovým polem – DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Pro vyhodnocení naměřených dat byla použita vlnová délka 200 nm. Profily nanočástic byly vyhodnocovány vždy v 10 % výšky píku na jeho začátku a konci a v jeho vrcholu.

Analýzy byly provedeny v neupravených křemenných kapilárách, zakoupených od společnosti Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ . Celková délka kapiláry byla 33 cm, efektivní délka k detektoru byla 24,5 cm. Aplikované napětí bylo 10 kV a kazeta s kapilárou byla termostatována na teplotu 25 °C. Každý den byla kapilára před měřením propláchnuta roztokem NaOH o koncentraci 0,1 M po dobu 10 min a deionizovanou vodou po stejnou dobu. Před každou analýzou byla kapilára propláchnuta 0,1

M NaOH (2 minuty), deionizovanou vodou (2 minuty) a puftrem (3 minuty). Všechny proplachy byly provedeny tlakem 940 mbar.

Všechna měření byla opakována 3x, pokud není uvedeno jinak.

## **4.2 ELEKTROKINETICKÁ PREKONCENTRACE KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC**

### **4.2.1 Chemikálie**

#### **4.2.1.1 Pufry**

Základní elektrolyt byl opět složen z kyseliny borité a hydroxidu sodného, popřípadě byl modifikován přídavkem cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB). Pro obrácení EOF byl také použit didecyldimethylammonium bromid (DDAB).

Pro pokrytí kapilár polyakrylamidem byly použity následující chemikálie: hydroxid sodný, kyselina dusičná, 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát, absolutní ethanol, akrylamid, peroxidisíran draselný a tetramethylethylendiamin.

Všechny tyto chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Veškerá voda, která byla použita pro tuto část práce, byla získána ze stejné deionizační stanice, jako v případě studia „stacking“ efektu.

Rovněž pufry použité pro kalibraci pH metru byly stejné, jaké jsou uvedeny v kapitole 4.1.1.1.

#### **4.2.1.2 Nanočástice**

Pro studium možnosti elektrokinetického dávkování a prekoncentrace nanočástic byl použit stejný materiál jako v kapitole 4.1.1.2.



## 4.2.2 Příprava základních elektrolytů

Vzhledem k tomu, že byl v této části práce také použit pufr o složení  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5, byl připraven stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 4.1.3. Takto připravený pufr byl (pro obrácení elektroosmotického toku v kapiláře) modifikován rozpuštěním pevného cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB), tak aby vznikl roztok CTAB o koncentraci 5 mg/ml (viz kapitola 5.2.1.2). Didecyldimethylammonium bromid (DDAB) byl rozpouštěn ve vodě, koncentrace byla rovněž 5 mg/ml.

Pufry byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

## 4.2.3 Příprava polyakrylamidem pokrytých kapilár

Polyakrylamidem pokryté kapiláry byly připraveny podle postupu popsáným Maierem a kol. [294]. V prvním kroku je křemenná kapilára nejprve promývána hydroxidem sodným o koncentraci 1 M po dobu 3 hodin, následuje promytí deionizovanou vodou po dobu 30 min a nakonec  $\text{HNO}_3$  o koncentraci 1 M po dobu 90 min. Dalším krokem je silanizace hydroxylových skupin přítomných na povrchu kapiláry, kdy je kapilára po dobu 3 hodin promývána 1 % (v/v) roztokem 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylátu v absolutním etanolu. Po tomto procesu je kapilára opět 30 min promývána deionizovanou vodou. Posledním polymerizačním krokem je promytí 4 % (w/v) roztokem akrylamidu v čerstvě převařené a následně (na laboratorní teplotu) zchlazené deionizované vodě s přísávkem 0,1 % (w/v) peroxidisíranu draselného a 0,1 % (v/v) tetramethylethylendiaminu po dobu 12 hodin. Nakonec je kapilára promyta deionizovanou vodou po dobu 30 min a profouknuta vzduchem (20 min).

#### 4.2.4 Instrumentace a experimentální podmínky

Ke všem měřením bylo opět využito přístroje pro CE analýzy HP 3DCE s DAD detektorem (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Nanočástice byly v průběhu analýz monitorovány při vlnové délce 200 nm. Píky nanočástic byly při této vlnové délce vyhodnocovány v jejich nejvyšším bodě.

Všechny použité kapiláry měly vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$  a celkovou délku 33,5 cm (efektivní délka činila 25 cm). Křemenné kapiláry použité v části 5.2.1.1 (Elektrokinetické dávkování nanočástic za „normálních“ podmínek) byly také použity pro pokrytí polyakrylamidem a byly zakoupeny od společnosti Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). PVA pokryté kapiláry (G1600-67219) byly zakoupeny od společnosti Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). Analýzy probíhaly při aplikaci napětí -10 kV (neupravená kapilára, kapiláry s obráceným i potlačeným elektroosmotickým tokem) a 10 kV (pouze neupravená kapilára). Kapilára byla termostatována na teplotu 25 °C. Před prvním použitím byla nepokrytá kapilára promyta 0,1 M NaOH (30 min) a deionizovanou vodou (30 min), PAM a PVA pokryté kapiláry byly promyty jen deionizovanou vodou (60 min). Před každou analýzou byly všechny kapiláry promývány deionizovanou vodou (5 min) a použitým elektrolytem (5 min). V případě použití DDAB pro obrácení EOF (viz kapitola 5.2.1.2) byla před promytím pufrem kapilára promyta vodným roztokem DDAB o koncentraci 5 mg/ml (5 min). Promývací tlak byl 930 mbar.

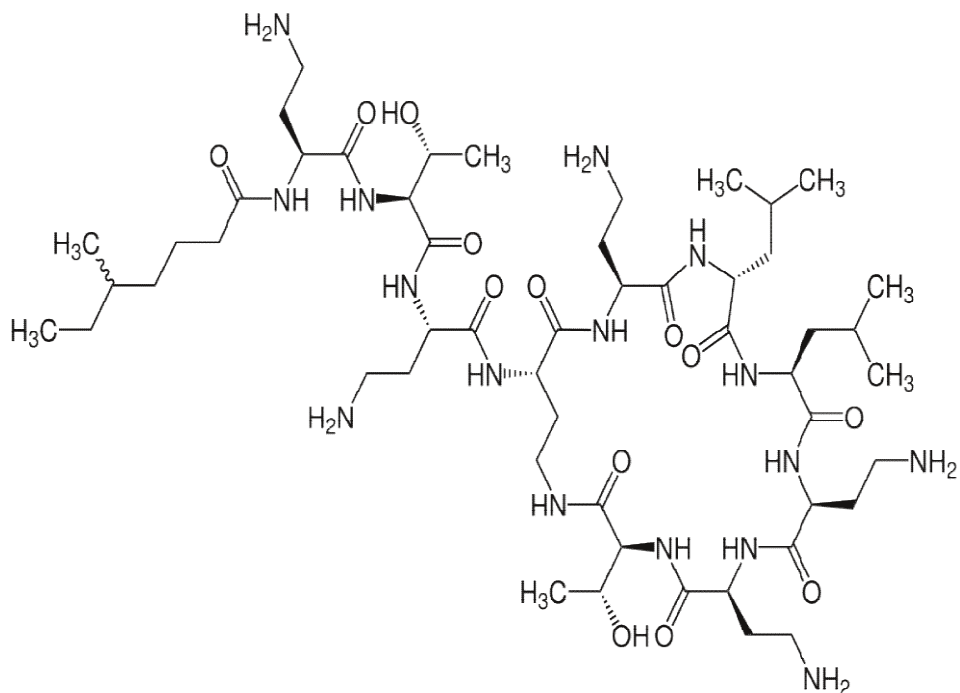
Pokud není uvedeno jinak, byla všechna měření opakována 3x.

## 4.3 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI KARBOXYLOVANÝMI MAGNETITOVÝMI NANOČÁSTICEMI A POLYMYXINEM B POMOCÍ CE-ICP-MS

### 4.3.1 Chemikálie

#### 4.3.1.1 Pufry

Základní elektrolyty použité v této části práce byly připraveny z imidazolu, kyseliny octové, kyseliny fosforečné a hydroxidu sodného. Tyto chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro studium interakcí byl připravený fosfát sodný modifikován přidavkem polymyxinu B, který byl zakoupen od společnosti SERVA FeinBiochemica (Heidelberg, Německo/New York, USA). Struktura polymyxinu B je na obrázku 29.



*Obrázek 29: Struktura polymyxinu B.*

### 4.3.1.2 Nanočástice

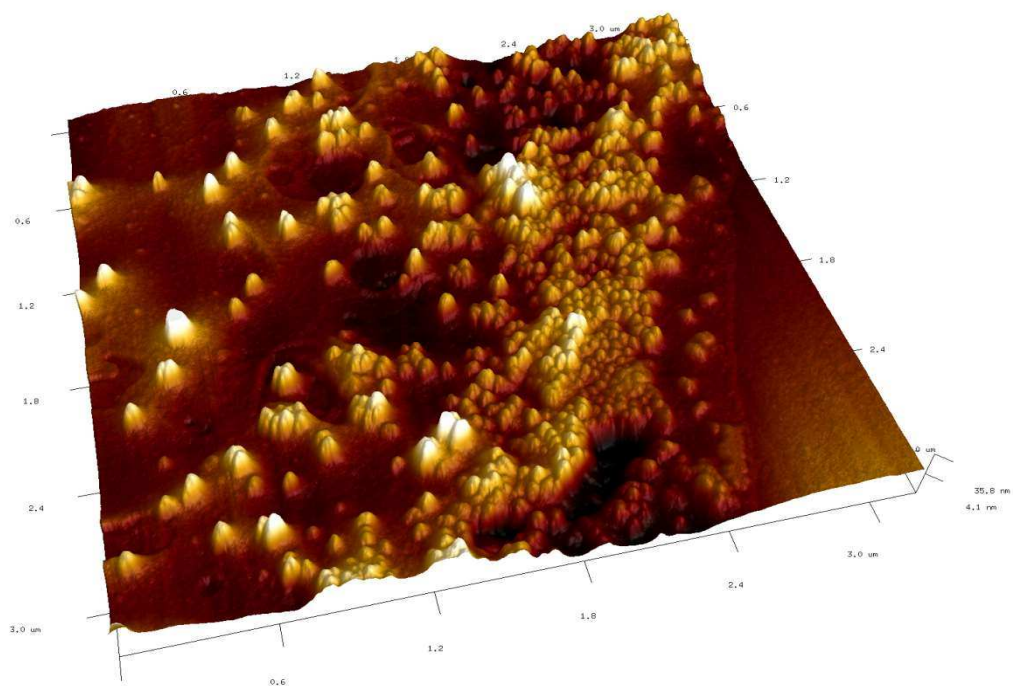
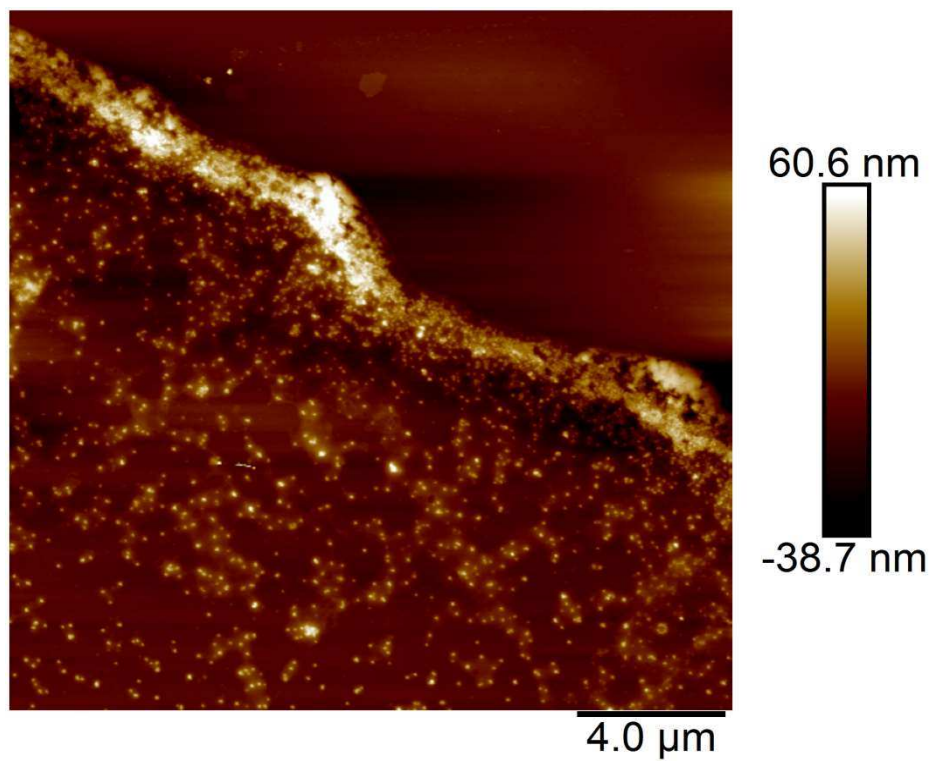
Nanočástice použité pro studium interakcí poskytl prof. Jean-Michel Siaugue (Sorbonne Universités, Paris, France).

### 4.3.2 Charakterizace nanočástic

Nanočástice byly po syntéze charakterizovány pomocí AFM, DLS a zetametří. Topografie nanočástic byla měřena pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) Dimension Icon (Bruker, Billerica, MA, USA) vybaveným softwarem NanoScope 9.1. Disperze nanočástic pro AFM měření byla 10 000x zředěna deionizovanou vodou a 5  $\mu$ l tohoto vzorku bylo nanášeno na čerstvě uštipnutý slídový substrát (SPI Chem Mica, muskovit třídy V-4, SPI supplies, West Chester, PA, USA). Vzorek byl poté vysušen v exsikátoru. Byl použit hrot ScanAsyst Air upevněný na nosníku pokrytém Al vrstvou (nominální rezonanční frekvence 70 kHz a nominální silová konstanta 0,4 N.m<sup>-1</sup>). Snímky byly získány měřením v PeakForce poklepovém módu (skenovací rychlost 0,501 Hz a rozlišení 512 pixelů). Pro zpracování a úpravu snímků bylo použito programu NanoScope Analysis 1.5. Touto technikou byla stanovena velikost jádra nanočástic: 60 ( $\pm$  5) nm. AFM snímky jsou na obrázku 30.

Zeta potenciál a hydrodynamický průměr, měřený pomocí Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) ve fosfátovém pufru, byl -13,9 ( $\pm$  1,1) mV a 71,05 ( $\pm$  0,1) nm (operační parametry byly stejné jako v kapitole 4.1.2). DLS Měření bylo rovněž provedeno na Latvian Institute of Organic Synthesis (Laboratory of Membrane active compounds and  $\beta$ -Diketones) v Rize.

Koncentrace [Fe] = 0,0078 M, odpovídá 0,602 mg magnetitu/ml.



*Obrázek 30: AFM snímky (2D a 3D) magnetitových karboxylovaných nanočástic použitých pro studium interakcí s polymyxinem B.*

### 4.3.3 Příprava vzorků

Jako „marker“ elektroosmotického toku byl ve vzorku NPs přítomen dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Vzorek směsi  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Cd}^{2+}$  kationtů byl připraven z certifikovaných referenčních materiálů (CRM) vodných kalibračních roztoků kovů Pb a Cd o koncentraci  $1\,000 \pm 2$  mg/l řady *ASTASOL*<sup>®</sup> od společnosti Analytika, spol. s.r.o. (Praha, Česká republika). Tyto roztoky, a také CRM roztok Fe o koncentraci 100 µg/l (od stejné společnosti) byly rovněž použity pro doladění ICP-MS parametrů. Ladící roztok Li, Y, Ce a Tl o koncentraci 1 µg/l byl dodán společností Agilent Technologies (Tokyo, Japan).

Deionizovaná voda (měrný odpor 18,2 MΩ.cm) byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water od firmy Millipore (Molsheim, Francie).

Pufry použité pro kalibraci pH metru byly zakoupeny od společnosti VWR International (Radnor, PA, USA).

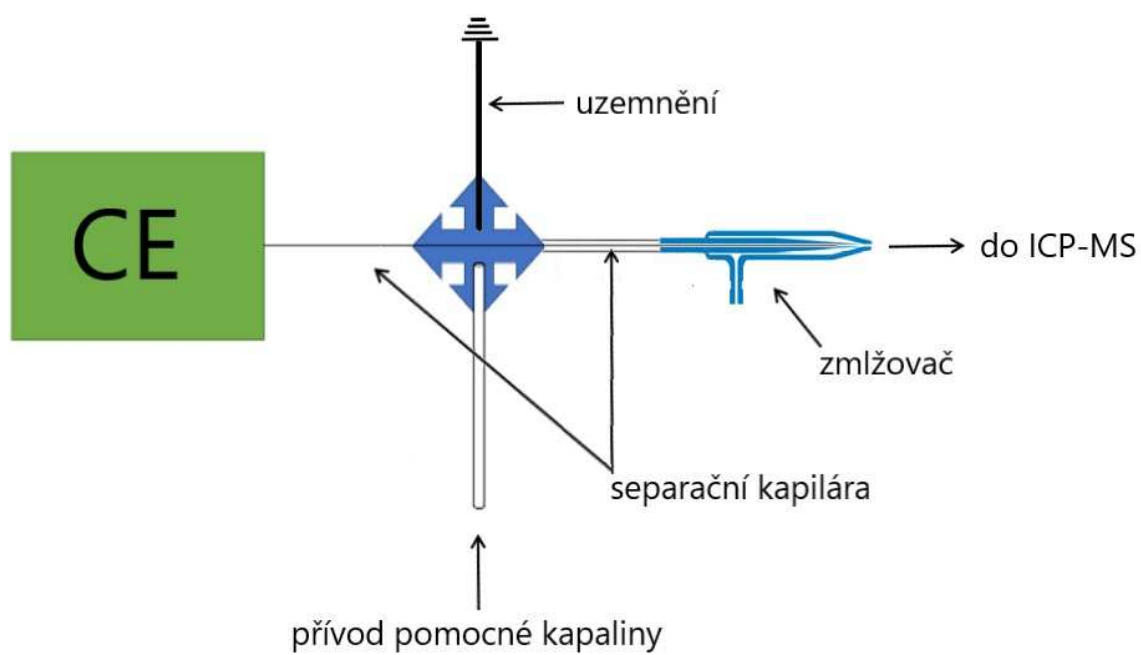
### 4.3.4 Příprava základních elektrolytů

Nejprve byly připraveny roztoky imidazolu (10 mM) a kyseliny fosforečné (25 mM) v deionizované vodě. Imidazol byl titrován kyselinou octovou na pH 4,5, zatímco roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4$  byl titrován 50 a 10 % (w/w) roztokem hydroxidu sodného na pH 7,4. Titrace probíhaly za stálého míchání, přičemž hodnota pH byla sledována pomocí pH metru. Fosfátový pufr byl pro studium interakcí modifikován přidavkem polymyxinu B. Nejprve byl připraven zásobní roztok PMB o koncentraci 1 mM rozpuštěním odpovídajícího množství PMB ve fosfátu. Tento zásobní roztok byl potom ředěn fosfátovým pufrům na požadované koncentrace 10 nM – 25 µM.

Všechny připravené základní elektrolyty byly uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

### 4.3.5 Instrumentace a experimentální podmínky

Pro všechny analýzy, které byly provedeny za účelem studia interakcí nanočástic s polymyxinem B bylo využito přístroje CE 7100 (Agilent technologies, Waldbronn, Germany), který byl pomocí rozhraní vyvinutého v laboratoři (obrázek 31 a 32) spojen s ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Tokyo, Japan).



*Obrázek 31: Schématické znázornění spojení CE s ICP-MS.*



*Obrázek 32: Fotografie spojení CE s ICP-MS.*

Rozhraní se skládá z čtyřcestného křížového spoje („cross-piece“), zemnicí elektrody, vstupu pro pomocnou kapalinu a „MicroMist“ mikrokoncentrického zmlžovače. Separační kapilára je tedy vedena skrz čtyřcestný křížový spoj, kde je uzemněna a její konec je omýván pomocnou kapalinou (20x ředěný použitý fosfátový pufr bez přídavku PMB). Výtok z „outletového“ konce CE kapiláry je pak mísen s pomocnou kapalinou přibližně 1 mm před zúžením vnitřní kapiláry zmlžovače. Výsledný roztok byl pak přes tento koncentrický zmlžovač a chlazenou mlžnou komoru dle Scotta přímo zaveden do indukčně vázaného plazmatu (ICP).

Interakce byly studovány v křemenných kapilárách o délce 47 cm a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  (Molex, Lisle, IL, USA) aplikováním napětí 25 kV při teplotě při 25 ° C. Před první použitím a každý den před začátkem měření byla kapilára promyta 0,1 M NaOH (20 min) a deionizovanou vodou (20 min). Před každou analýzou byla kapilára promyta 0,1 M NaOH (2 min), deionizovanou vodou (2 min) a použitým elektrolytem (4 min). Promývací tlak byl 935 mbar.

Vzorek nanočástic ( $\rho = 0,02$ ) s přídavkem DMSO (10 %) byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Profily nanočástic byly vyhodnocovány vždy v 10 % výšky píku na jeho začátku a konci a v jeho vrcholu.

Před spojením kapilární elektroforézy k ICP-MS byly optimalizovány ICP-MS podmínky (pozice plazmové hlavičky, příkon generátoru, iontová optika, průtok Ar, atd.), a to s využitím komerčně dostupného ladícího roztoku Li, Y, Ce a Tl o koncentraci 1  $\mu\text{g/l}$ , zatímco vodný kalibrační standard Fe o koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$  byl použit pro optimalizaci průtoku helia oktapólovou kolizní celou (potlačení spektrálních interferencí) a pro jemné doladění parametrů ICP-MS k dosažení maximální intenzity všech měřených izotopů železa

Optimalizované ICP-MS podmínky jsou následující: příkon generátoru: 1550 W, průtok vnějšího plazmového plynu: 14,95 l/min, průtok pomocného plynu/nosný Ar: 0,9 l/min, průtok středního plazmového plynu (do zmlžovače): 1,1 l/min, průtok přídavného („make up“) Ar: 0,25 l/min, průtok He v kolizní cele: 3 ml/min, integrační čas: 100 ms pro izotopy  $^{12}\text{C}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$  a  $^{57}\text{Fe}$ .



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 STUDIUM „STACKING“ EFEKTU KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC

#### 5.1.1 Úvod

„Stacking“ efekt MNPs byl studován v základním elektrolytu o složení  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5, protože tento elektrolyt poskytoval nejvíce reprodukovatelné profily analyzovaných nanočástic. „Stacking“ efekt byl studován při různé iontové síle jak BGE, tak i roztoku vzorku (tabulka 4) a při různé době dávkování 5, 10, 20, 30 a 60 s. Zeta potenciál karboxylovaných magnetitových nanočástice typu „core-shell“ je v  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pufru o pH 9,5 a koncentraci 50 mM roven -43 mV. V tomtéž pufru, avšak o koncentraci 5 mM, je zeta potenciál roven -38 mV.

*Tabulka 4: Studovaná prostředí*

Základní elektrolyt	Prostředí vzorku
100 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5	deionizovaná voda
	10 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
	100 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
50 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5	deionizovaná voda
	5 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
	50 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
	100 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
25 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5	deionizovaná voda
	25 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
	100 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
10 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5	deionizovaná voda
	10 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5
	100 mM $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5

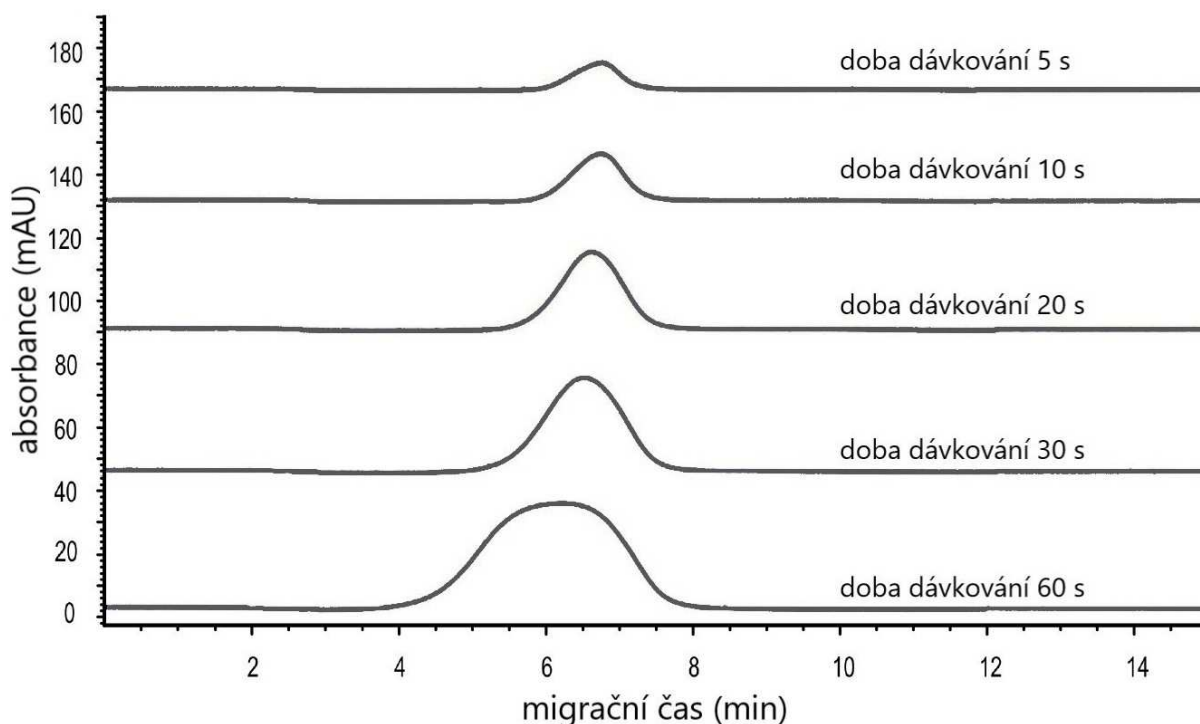
## 5.1.2 Studium chování nanočástic dispergovaných v různých prostředích

### 5.1.2.1 Homogenní elektrické pole

V této části práce bylo zkoumáno chování karboxylovaných MNPs, které byly při dávkování dispergovány ve stejném elektrolytu jako BGE. Obrázek 33 tedy představuje příklad analýzy nanočástic dispergovaných v 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH o pH 9,5 dávkovaných taktéž do 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH o pH 9,5. Byl pozorován lineární nárůst ploch píků ve všech případech použitých elektrolytů (100, 50, 25 a 10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH, pH 9,5), což je, mimo jiné, ukázáno v tabulce 5.

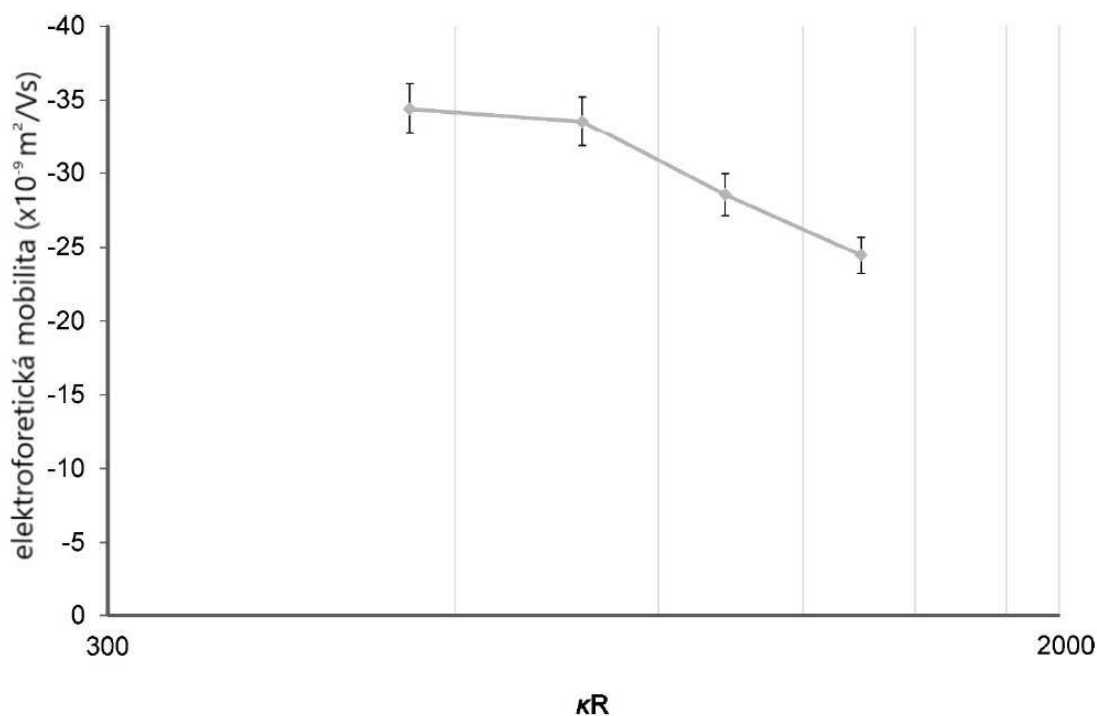
*Tabulka 5: Linearita závislosti mezi plochami píků a dobou dávkování ve studovaných elektrolytech. \* značí nelinearitu.*

Základní elektrolyt	Prostředí vzorku	Rovnice závislosti mezi plochou píku (y) a dobou dávkování (x)	R <sup>2</sup>
100 mM	deionizovaná voda	$y = 20,766x + 949,64$	0,3834*
	10 mM	$y = 81,159x + 244,13$	0,9840*
	100 mM	$y = 108,2x - 35,473$	0,9999
50 mM	deionizovaná voda	$y = 18,601x + 596,63$	0,6177*
	5 mM	$y = 54,976x + 326,34$	0,9705*
	50 mM	$y = 73,269x + 36,454$	0,9999
	100 mM	$y = 74,663x - 56,497$	0,9984
25 mM	deionizovaná voda	$y = 17,732x + 726,09$	0,7905*
	25 mM	$y = 91,911x + 56,264$	0,9999
	100 mM	$y = 64,414x - 4,127$	0,9985
10 mM	deionizovaná voda	$y = 23,962x + 203,55$	0,9735*
	10 mM	$y = 42,302x + 13,536$	0,9999
	100 mM	$y = 31,142x - 32,17$	0,9788



*Obrázek 33: Průběh analýz MNPs v homogenním elektrickém poli při různé době dávkování (5, 10, 20, 30 a 60 s). BGE: 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Jak je vidět na obrázku 34, vypočtené mobility NPs klesají se zvyšujícím se součinem  $\kappa R$ . Vzhledem k tomu, že produkt  $\kappa R$  je závislý na tloušťce elektrické dvojvrstvy nanočástic (čím vyšší  $I$ , tím vyšší hodnota  $\kappa$ ) a poloměru NPs ( $R$ ), lze předpokládat, že pokles mobilit NPs z  $-34 (\pm 2) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  na  $-24 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  při zvyšování iontové síly elektrolytu byl způsoben snížením tloušťky elektrické dvojvrstvy (ionizace karboxylovaných MNPs by měla zůstat stejná, tak jako i průměr jádra NPs).



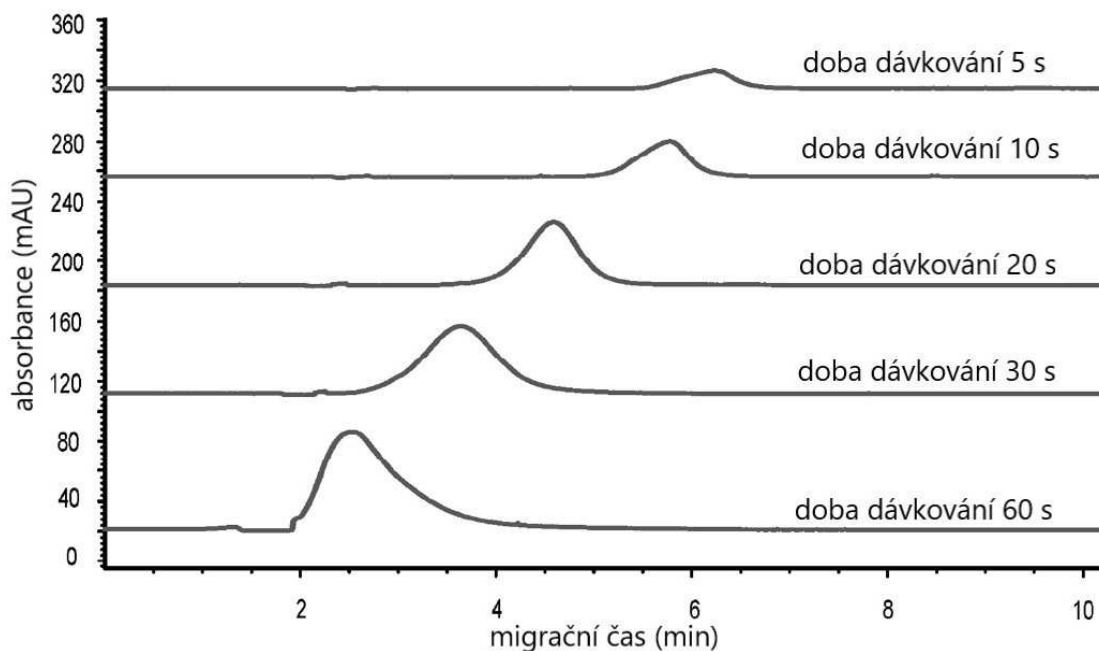
*Obrázek 34: Závislost elektroforetické mobility karboxylovaných MNPs na produktu  $\kappa R$ . MNPs dispergovány ( $\rho = 0,1$ ) v BGE: 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar po dobu 10 s; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Jak již bylo zmíněno (kapitola 2.3.3),  $\kappa$  je reciproká hodnota Debyeho délky (tloušťka elektrické dvojvrstvy), která je explicitní funkcí iontové síly roztoku elektrolytu ( $\kappa \sim I^{1/2}$ ). Iontová síla použitých pufrů byla vypočítána pomocí programu Peakmaster, hodnota  $\kappa$  pak podle následující rovnice [70]:

$$\kappa = 3,288\sqrt{I} \quad (11)$$

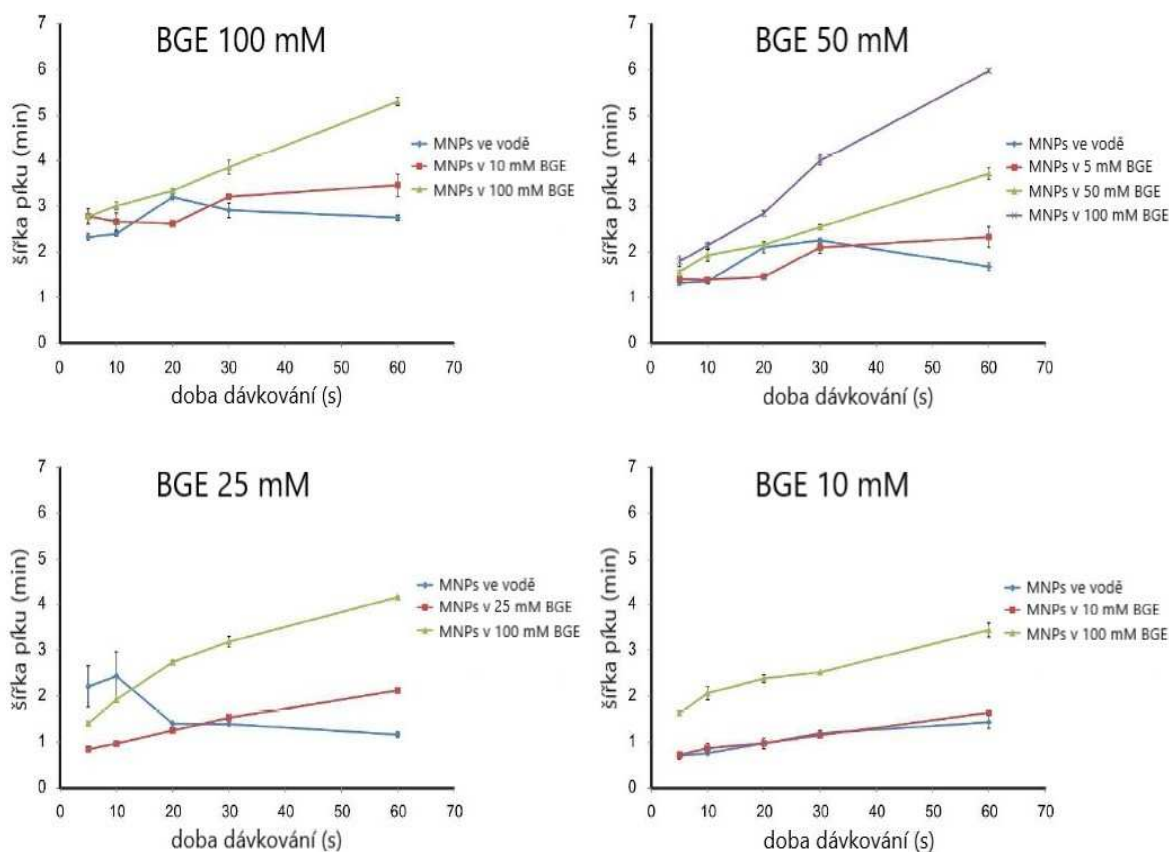
### 5.1.2.2 Studium „stacking“ efektu

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.2.3, „stacking“ efekt v CE nastane, pokud má zóna vzorku nižší vodivost, než je vodivost BGE. V tabulce 4, jsou uvedeny prostředí, ve kterých byl studován „stacking“ efekt pro karboxylované MNPs dispergované ve vodě nebo ve zředěném BGE (vždy  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5, avšak o různé koncentraci). Příklady profilů NPs při „stacking“ efektu jsou ukázány na obrázku 35.



*Obrázek 35: Vliv doby dávkování karboxylovaných MNPs na profily píků při „stacking“ efektu. MNPs dispergovány v 5 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ); BGE: 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Je zřejmé, že šířka píku (vyhodnocovaná vždy v 10 % výšky na začátku a konci píku) při „stacking“ efektu klesá, což je rovněž graficky znázorněno na obrázku 36. Z naměřených dat je také zřejmé (tabulka 5), že při „stacking“ efektu dochází přerušení linearit závislostí ploch píků NPs na době dávkování. To může být způsobeno ztenčením elektrické dvojvrstvy NPs, protože při tomto efektu dochází k „restrukturalizaci“ zóny nanočástic, kdy je snižována vzdálenost mezi NPs.



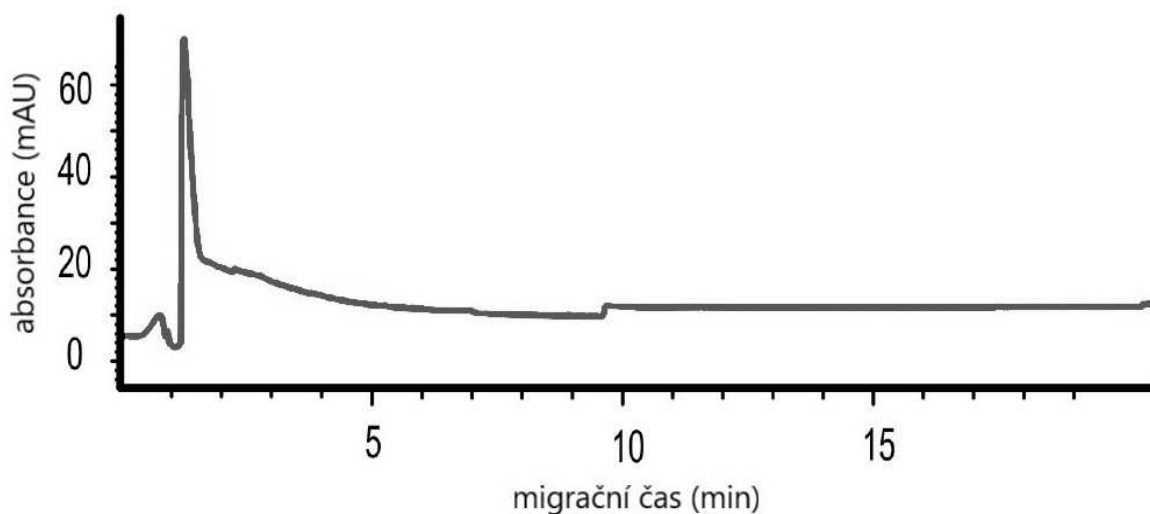
**Obrázek 36:** Vliv doby dávkování karboxylovaných MNPs na profily píků při „stacking“ efektu. MNPs dispergovány v 5 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ); BGE: 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.

Při větším množství nanočástic dávkovaných do kapiláry, je také pozorována změna mobilit (obrázek 35, 60 s). Ve srovnání s koncem píku ( $\mu_{eff} = -38 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) je mobilita NPs na jeho začátku téměř nulová ( $\mu_{eff} = -4,9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), a proto lze předpokládat, že mají za těchto podmínek nanočástice tendenci agregovat. To je v souladu s DLVO teorií [295-297], viz kapitola 2.1.2.3. Z té vyplývá, že snížení tloušťky elektrické dvojvrstvy zvyšováním iontové síly, kdy dochází k „restrukturalizaci“ zóny NPs, může snížit energetickou bariéru, kterou je pro agregaci částic potřeba překonat (viz kapitola 5.1.2.1). Protože je energetická bariéra dána součtem energií daných elektrostatickými odpuzivými silami a Van der Waalsovými silami, dochází snížením elektrické dvojvrstvy k poklesu příspěvku energie elektrostatických odpuzivých sil. To znamená celkové snížení energetické bariéry. Nicméně,

za těchto podmínek není agregace příliš výrazná (obrázek 35). Rozhodujícím faktorem ovlivňujícím šířku píku nanočástic tedy bude zřejmě distribuce částic v nadávkované zóně.

Je také zajímavé, že existuje rozdíl při dávkování karboxylovaných MNPs z borátového elektrolytu a vody (obrázek 36). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben jinými hodnotami pH zmíněných prostředí (voda má pH 7,0), a také změnou iontové atmosféry NPs (zeta potenciál karboxylovaných MNPs je -46 mV ve vodě a -38 mV v borátu o koncentraci 5 mM).

Obrovský rozdíl ve vodivostech (iontových silách) mezi oběma zónami (zóna vzorku a pufru) může vést také k tzv. indukované agregaci. Tento předpoklad byl potvrzen dávkováním karboxylovaných MNPs dispergovaných v 5 mM  $H_3BO_3/NaOH$  o pH 9,5 do BGE o stejném složení, avšak o koncentraci 250 mM. Za těchto podmínek byla pozorována indukovaná agregace použitých NPs (obrázek 37), na niž poukazuje vytváření úzkých profilů NPs s viditelnou adsorpcí NPs na kapilární stěnu. Mobilita na začátku píku je opět blízká nulové hodnotě, což znamená tvorbu zdánlivě téměř nenabitých NPs, které se na stěnu kapiláry mohou adsorbovat. Tento mechanismus může být opět přesněji vysvětlen snížením energetické bariéry, což umožňuje tvorbu agregátů anebo adsorpcí NPs na stěnu kapiláry (dochází rovněž k stlačení elektrické dvojvrstvy vytvořené na povrchu kapiláry).



*Obrázek 37: Analýza nanočástic, při níž dochází k indukované agregaci. MNPs dispergovány v 5 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ); BGE: 250 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar po dobu 30 s; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

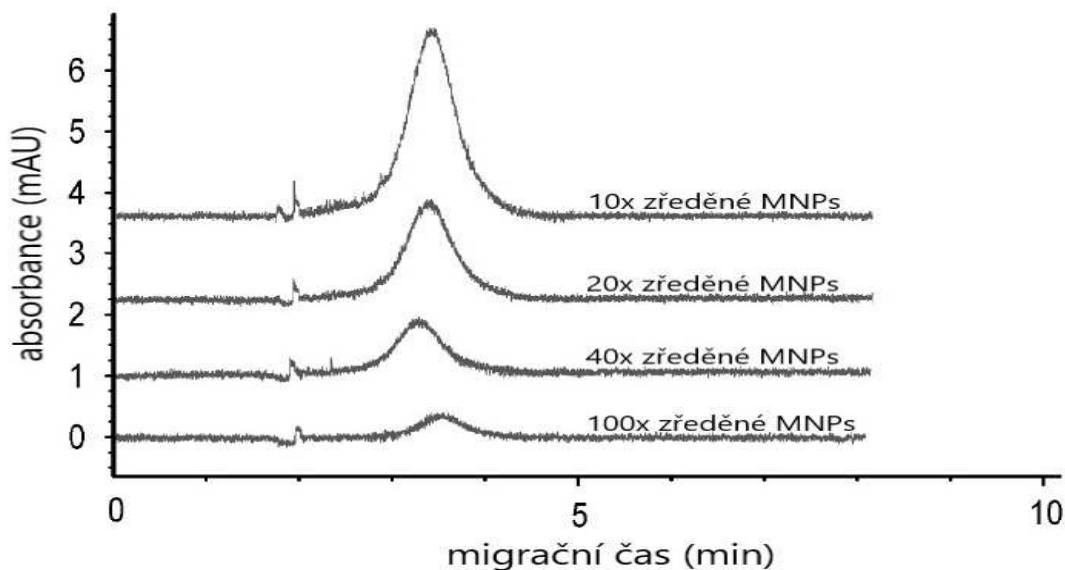
Z uvedených výsledků lze tedy rozlišit dva možné způsoby chování NPs při „stacking“ efektu, a to:

- (i) on-line prekoncentrace
- (ii) indukovaná agregace

Obecně řečeno, on-line prekoncentrace NPs je charakterizována zužováním píku, přičemž je udržena stabilní disperze NPs. V tomto případě tedy dochází pouze k poklesu vzájemné vzdálenosti mezi jednotlivými nanočásticemi, což je doprovázeno redukcí tloušťky elektrické dvojvrstvy. Naopak, indukovaná agregace NPs se vyznačuje takovou „restrukturalizací“ zóny nanočástic, která vede k tvorbě agregátů. Lze předpokládat, že taková agregace může být vyvolána nejen rozdíly ve vodivostech dávkované zóny NPs a BGE, jímž je naplněna kapilára, ale také může být způsobena například rozdílným pH obou zón.

Vzhledem k tomu, že „stacking“ efekt slouží v kapilárních elektromigračních technikách zejména k on-line prekoncentraci analytů, bylo také zkoumáno, při jak velkém zředění lze NPs při tomto efektu ještě detekovat. Toto měření bylo realizováno dispergováním různého množství karboxylovaných MNPs v 10 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5 a dávkováním takto připraveného vzorku po dobu 60 s do kapiláry naplněné BGE o složení 100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o stejné hodnotě pH. Z obrázku 38 je zřejmé, že dokonce 100-násobně zředěné MNPs ( $\rho = 0,01$ ) lze díky této metodě analyzovat. Navíc, závislost ploch píků MNPs na faktoru ředění je lineární, kde rovnice přímky je:  $y = 46,97 (\pm 0,72)x + 0,05 (\pm 0,04)$ . Hodnoty směrodatných odchylek pro čtyři opakování jsou uvedeny v závorkách, přičemž koeficient determinace ( $R^2$ ) je 0,9995. Za těchto podmínek byly MNPs 76-krát zakoncentrovány ve srovnání s „běžným“ dávkováním (50 mbar po dobu 10 s), kdy jsou použité MNPs dispergovány v BGE o stejném složení, jakým je naplněna kapilára (100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5).

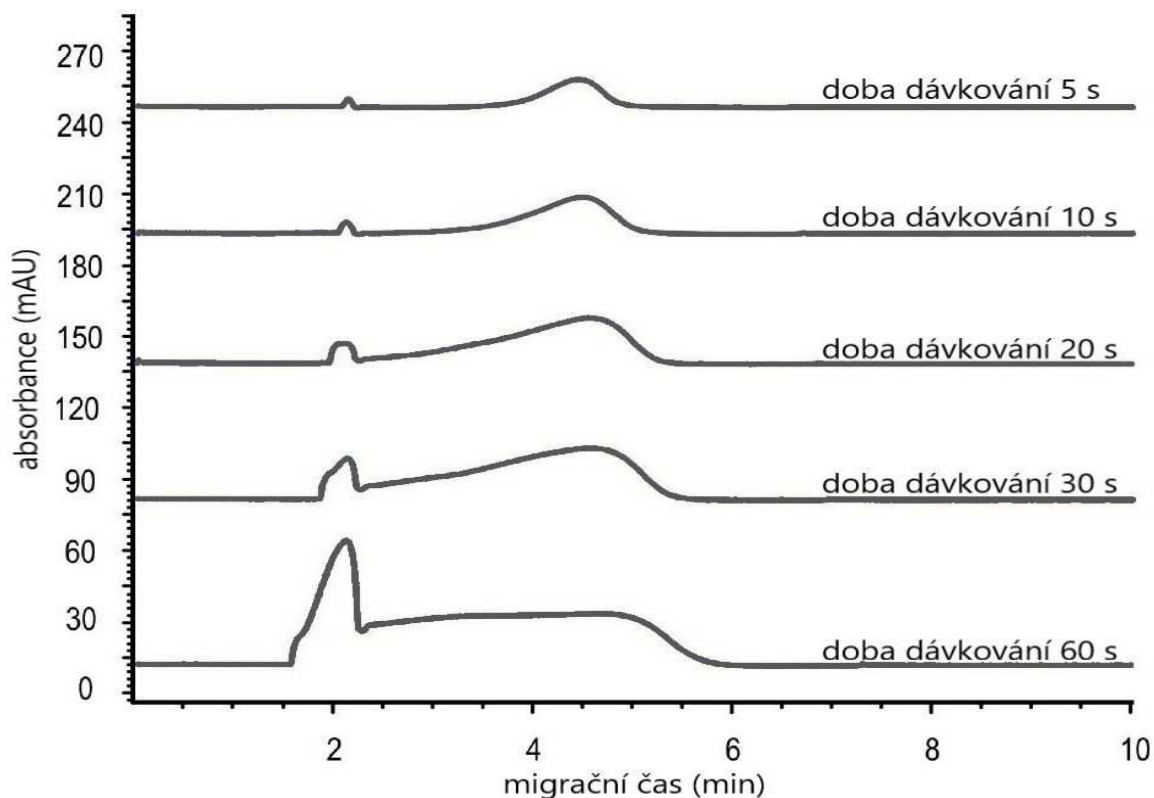




*Obrázek 38: Analýzy zředěných MNPs ( $\rho = 0,1; 0,05; 0,025$  a  $0,01$ ) při „stacking“ efektu. MNPs dispergovány v  $10 \text{ mM H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; BGE:  $100 \text{ mM H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; dávkování tlakem  $50 \text{ mbar}$  po dobu  $60 \text{ s}$ ; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka  $33,0 \text{ cm}$ , efektivní délka  $24,5 \text{ cm}$ ); aplikované napětí  $10 \text{ kV}$ ; teplota  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detekce při  $200 \text{ nm}$ .*

### 5.1.2.3 Studium „de-stacking“ efektu

Nakonec, byl zkoumán opačný efekt, tedy tzv. „de-stacking“, při němž je zóna vzorku vodivější než BGE, do něhož je dávkována. Podmínky, při kterých byl „destacking“ studován jsou popsány v tabulce 4. Příklady profilů NPs při „de-stackingu“ jsou uvedeny na obrázku 39. Je zřejmé, že při tomto efektu roste šířka píku, (viz obrázek 36) a jeho tvar je deformován. Můžeme předpokládat, že vysoká iontová síla (a tedy nízká intenzita elektrického pole) v zóně vzorku karboxylovaných MNPs způsobuje nízkou mobilitu částic („malá tloušťka“ elektrické dvojvrstvy). Mobilita částic pak na rozhraní obou zón (zóna vzorku a BGE) vzroste, takže nanočástice zde začnou migrovat rychleji. Toto vedlo ke dvěma účinkům: (i) některé z NPs byly tímto efektem zrychleny, což způsobilo rozšíření píků a (ii) některé z NPs si udržely stejnou hustotu náboje, která je blízko nulové hodnoty (tyto objekty nemohly být tak snadno „de-stackingem“ urychleny po dosažení prostředí s vyšší intenzitou elektrického pole), což způsobilo nárůst ploch píků s těmito nízkými mobilitami (tabulka 5).



*Obrázek 39: Analýza nanočástic, při níž dochází k „de-stackingu“. MNPs dispergovány ve 100 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ); BGE: 25 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar po dobu 30 s; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

### 5.1.3 Závěr

V této části práce bylo pomocí kapilární elektroforézy zkoumáno, jak se karboxylované magnetitové nanočástice chovají na rozhraní prostředí (elektrolytů), které se liší svými specifickými vodivostmi. Bylo zjištěno, že zóna dávkovaných nanočástic může být na tomto rozhraní v důsledku „stacking“ a „de-stacking“ efektů deformována, takže píky nanočástic mohou být zúženy nebo rozšířeny. Při „stacking“ efektu (často využívaná on-line prekoncentrační technika) těchto nanočástic lze obecně říci, že jsou možné dva způsoby chování NPs: (i) on-line prekoncentrace, která vede ke snížení šířky píku se zachováním stability disperze a (ii) indukovaná agregace, kdy je překonána energetická bariéra (definovaná elektrostatickými a Van der Waalsovými silami) zabráňující spojování nanočástic do větších útvarů.

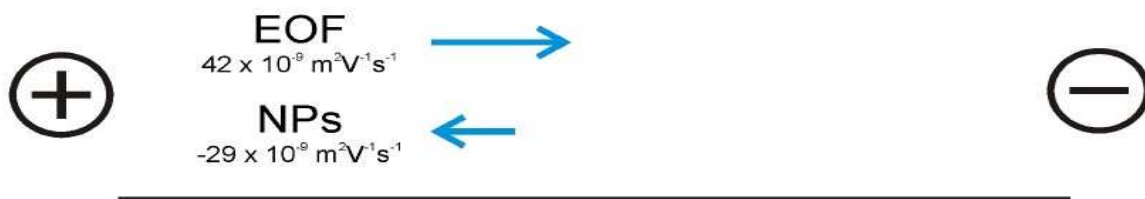
## **5.2 ELEKTROKINETICKÁ PREKONCENTRACE KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC**

### **5.2.1 Studium elektrokinetického dávkování NPs a jejich prekoncentrace za různých podmínek**

#### **5.2.1.1 Elektrokinetické dávkování nanočástic za „normálních“ podmínek**

Vzhledem k tomu, že v této části práce byl studován stejný typ karboxylovaných magnetických nanočástic jako v předchozím případě, bylo elektrokinetické dávkování vzorku studováno rovněž za použití  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5, jako základního elektrolytu. Při těchto podmínkách však nedošlo k elektrokinetickému nadávkování MNPs ( $\rho = 0,1$ ) do kapiláry při kladné ani záporné polaritě aplikovaného napětí (10 kV). To bylo pravděpodobně způsobeno přítomností silného EOF o mobilitě  $42 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pro stanovení byl jako tzv. „EOF marker“ použit mesityloxid) v kapiláře. Pro získání mobilit karboxylovaných MNPs byly tyto částice ( $\rho = 0,1$ ) analyzovány po jejich hydrodynamickém nadávkování (tlakem 50 mbar po dobu 5 s). Za těchto podmínek mají NPs efektivní mobilitu  $-29 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Při elektrokinetickém dávkování za použití napětí se zápornou polaritou, je směr elektroosmotického toku opačný, než je směr MNPs, tudíž podle vypočtených mobilit nemohou být nanočástice nadávkovány (obrázek 40). Při použití napětí o kladné polaritě je tedy EOF hnací silou a musí být brána v úvahu zdánlivá mobilita nanočástic a teoreticky by mělo dojít k nadávkování těchto částic do kapiláry. Protože však nebyl při analýze za těchto podmínek pozorován žádný signál, který by odpovídal přítomnosti NPs, zdá se, že jejich zdánlivá mobilita ( $\sim 13 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) je příliš nízká pro nadávkování těchto MNPs.

## Elektrokinetické dávkování



## Elektrokinetické dávkování s obráceným EOF



## Elektrokinetické dávkování s potlačeným EOF



*Obrázek 40: Schémata experimentálních uspořádání a mobilit NPs a elektroosmotického toku v neupravené kapiláře a v kapilárách s obráceným (CTAB) a potlačeným EOF.*

### 5.2.1.2 Elektrokinetické dávkování nanočástic při obráceném elektroosmotickém toku

Podle předchozích výsledků se tedy zdá, že analyzované MNPs nemohou být elektrokineticky dávkovány, pokud je k analýze použita nijak neupravená křemenná kapilára. Proto byl tento způsob dávkování dále studován, při použití dynamicky pokryté vnitřní stěny kapiláry. Z těchto důvodů byly vybrány dvě kationové povrchově aktivní látky, které byly již dříve pro dynamické pokrytí kapiláry při práci s většími objekty použity. První z nich byl cetyltrimethylammonium bromid (CTAB), který použili Petr a kol. [298] pro analýzu mikroorganismů pomocí CE po jejich elektrokinetickém nadávkování. Druhým použitým

tenzidem stejného typu byl didodecyldimethylammonium bromid (DDAB). Ten byl již dříve použit pro analýzu nanočástic pomocí kapilární elektroforézy (opět Petr a kol. [30]).

Na základě zmíněných publikací byly pro analýzu karboxylovaných MNPs testovány dva základní elektrolyty:

- (i) 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5 s přídavkem 5,0 mg/ml CTAB
- (ii) 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5, kdy byla kapilára před analýzou propláchnuta roztokem DDAB o koncentraci 5,0 mg/ml ve vodě.

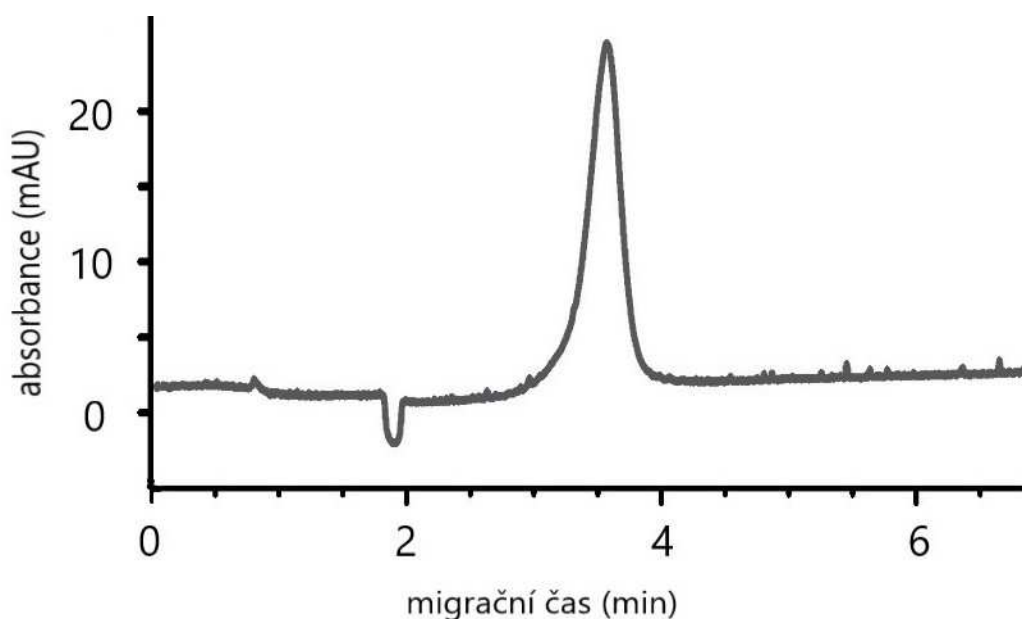
Naměřené mobility elektroosmotického toku byly  $-43 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (CTAB) a  $-52 (\pm 2) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (DDAB). Pro získání mobilit karboxylovaných MNPs byly částice ( $\rho = 0,1$ ) analyzovány v těchto pufrch po jejich hydrodynamickém nadávkování (tlakem 50 mbar po dobu 5 s). Stanovené mobility NPs měly následující hodnoty:  $22 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (CTAB) a  $26 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (DDAB). Z výsledků je patrné, že tyto kationtové povrchově aktivní látky elektrostaticky interagují s použitým typem nanočástic. Tyto samovolně probíhající („self-assembly“) interakce MNPs s CTAB nebo DDAB se zdají být velmi rychlé, což vede k tvorbě poměrně stabilní disperze MNPs, přičemž dochází k obrácení povrchového náboje (karboxylované MNPs mají na rozdíl od disperze ve vodě nebo pufru při těchto podmínkách kladnou efektivní mobilitu).

Lze tedy předpokládat, že analyzované karboxylované MNPs mohou být při podmínkách, kdy je EOF v důsledku přítomnosti CTAB a DDAB obrácen, elektrokineticky nadávkovány do kapiláry. Směr jejich migrace je pak stejný se směrem elektroosmotického toku. Také, pokud jsou brány v potaz hodnoty vypočtených zdánlivých mobilit MNPs ( $\sim -21 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro CTAB a  $\sim -26 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro DDAB), se zdá, že mohou být použité nanočástice za těchto podmínek nadávkovány. Absolutní hodnota zdánlivých mobilit částic je v obou případech vyšší, než při použití pufru bez tenzidů ( $\sim 13 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Bylo také zjištěno, že přítomnost CTAB v roztoku základního elektrolytu je pro vytvoření disperze MNPs, jež jsou elektrostaticky pokryty tímto tenzidem zásadní. Naopak, přítomnost DDAB v elektrolytu není pro elektrokinetické nadávkování analyzovaných nanočástic nutná.

Za těchto podmínek bylo dávkování prováděno po dobu 10 s při -10 kV (při použití obou tenzidů), přičemž odpovídající elektrický proud se pohyboval kolem 35  $\mu\text{A}$  (CTAB) a 45  $\mu\text{A}$  (DDAB). Nutnost přítomnosti CTAB oproti DDAB v základním elektrolytu při

analýze MNPs je pravděpodobně způsoben odlišným mechanismem „self-assembling“ procesu. Již dříve bylo popsáno, že DDAB na rozdíl od CTAB může vlivem elektrického pole ovlivnit disperzi NPs [30]. Je patrné (obrázek 41), že je za těchto podmínek možno MNPs nadávkovat. Nicméně, opakovatelnost elektrických proudů byla horší (byly získány neopakovatelné analýzy), proto použití CTAB a DDAB nebylo dále studováno. Také dávkování zóny vody (tlakem 50 mbar po dobu 5 s) před dávkováním vzorku nemělo na analýzu významný vliv.



*Obrázek 41: Analýza nanočástic při obráceném elektroosmotickém toku použitím DDAB. MNPs dispergovány ( $\rho = 0,1$ ) v BGE: 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování MNPs po dobu 10s aplikováním napětí -10 kV; analýza křemenné kapiláře propláchnuté před měřením roztokem DDAB o koncentraci 5,0 mg/ml ve vodě (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí -10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

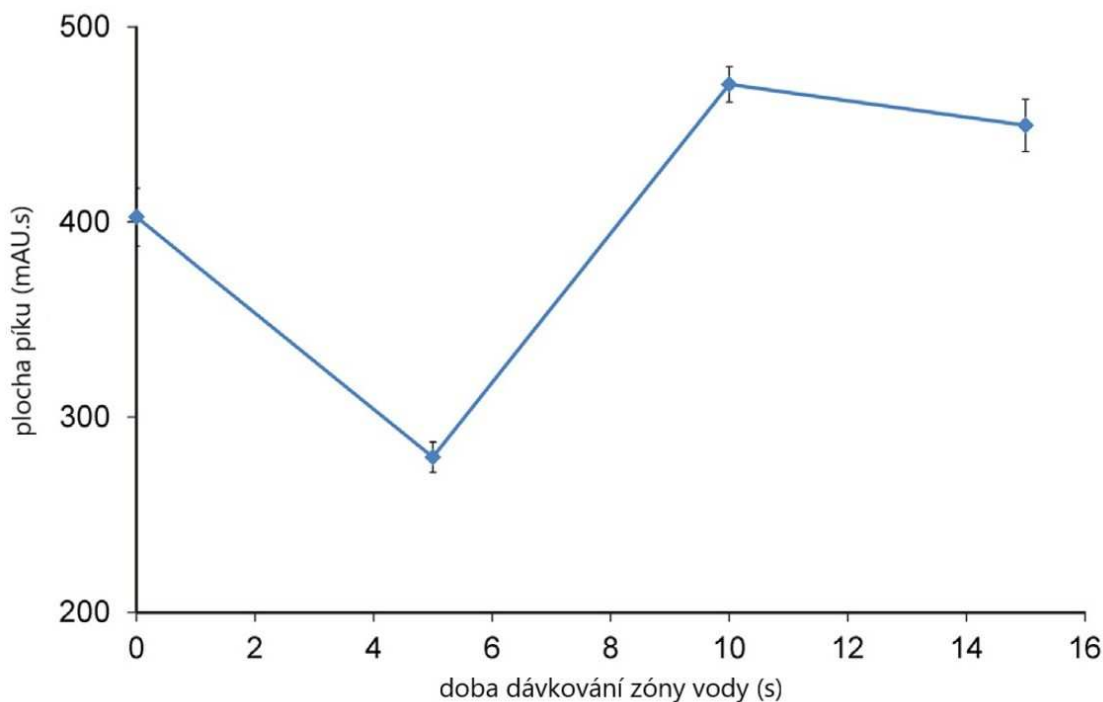
### 5.2.1.3 Elektrokinetické dávkování nanočástic při potlačeném elektroosmotickém toku

Vzhledem k tomu, že použití obráceného elektroosmotického toku není pro analýzu karboxylovaných MNPs výhodné, bylo dále pro tyto účely studováno využití permanentně pokrytých kapilár, kdy je EOF potlačen. Analyty by tedy měly migrovat pouze svou vlastní efektivní mobilitou ( $-29 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), a proto lze říci, že by jejich chování v takovém systému mělo být více předvídatelné (obrázek 40).

Je zajímavé, že kapiláry pokryté vrstvou polyakrylamidu, připravené podle postupu dříve popsaným Maierem a kol. [294], nebyly pro tyto analýzy opět vhodné, pravděpodobně kvůli adsorpci MNPs na takto ošetřený povrch kapiláry. Nicméně, díky komerčně dostupným kapilárám pokrytým vrstvou polyvinylalkoholu (PVA) od společnosti Agilent Technologies, byla analýza těchto nanočástic umožněna. V těchto PVA pokrytých kapilárách byl zbytkový EOF metodou dle Williamse a Vigha [299] změřen na  $0,27 (\pm 0,04) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ . To je hodnota téměř zanedbatelná, a proto MNPs migrují opravdu převážně jen svou vlastní efektivní mobilitou. Další studie elektrokinetického dávkování analyzovaných nanočástic tedy probíhala v těchto komerčně dostupných PVA kapilárách.

Protože bylo zjištěno, že elektrokinetické dávkování karboxylovaných MNPs dispergovaných v 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ) při použití PVA pokrytých kapilár je možné, bylo provedeno dávkování aplikováním napětí -10 kV po dobu 10 s (odpovídající elektrický proud byl přibližně 28  $\mu\text{A}$ ). V tomto případě byly i elektrické proudy při opakování poměrně stabilní, takže byla tato metoda použita pro další analýzy použitých MNPs.

V dalším kroku byl zkoumán vliv dávkování zóny vody před elektrokinetickým dávkováním vzorku MNPs ( $\rho = 0,1$ ). Zóna vody byla dávkována tlakem 50 mbar po dobu 0 až 15 s. Poté následovalo elektrokinetické dávkování karboxylovaných MNPs aplikací napětí -10 kV po dobu 60 s (obrázek 42). Z obrázku 42 je zřejmé, že je pro analýzu nejvhodnější (největší plocha píku MNPs), když je zóna vody dávkována po dobu 10 s, zatímco dávkování vody po dobu 5 s se jeví jako výrazně nejhorší. To je pravděpodobně způsobeno různými účinky prostředí na nanočástice. Jak bylo diskutováno, v prostředích o různé iontové síle (borátový pufr a voda) se mění tloušťka elektrické dvojvrstvy, avšak velmi důležitou roli mohou hrát také elektroforetická retardace a relaxační procesy iontového oblaku (kapitola 2.3.3).



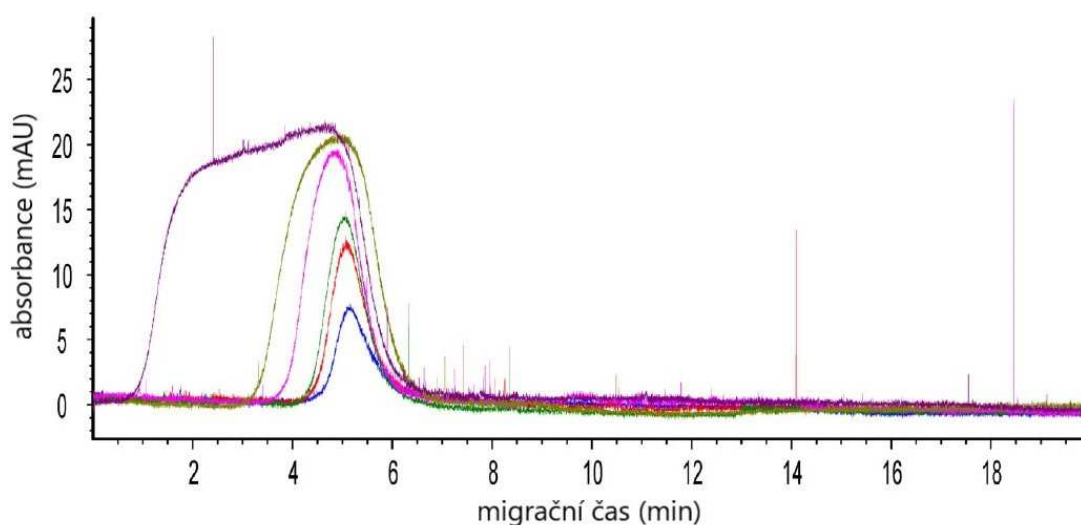
*Obrázek 42: Vliv doby dávkování zóny vody na plochu píku dávkovaných nanočástic. BGE: 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pH 9,5; dávkování MNPs po dobu 60 aplikováním napětí -10 kV,  $\rho = 0,01$ ; zóna vody dávkována tlakem 50 mbar; analýzy v PVA pokryté kapiláře (celková délka 33,5 cm, efektivní délka 25,0 cm); aplikované napětí -10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Poté bylo optimalizováno nejvýhodnější prostředí, ve kterém byly MNPs dispergovány ( $\rho = 0,01$ ), pro získání nejlepšího prekoncentračního faktoru. Mezi studované prostředí patřily H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pufrů o pH 9,5 a koncentracích 50, 20 a 5 mM a deionizovaná voda. Jak lze očekávat, pokles koncentrace elektrolytu, v němž byly MNPs dispergovány, vedlo k vyšším signálům těchto částic („stacking“ efekt). Nejlepší výsledky byly získány pro MNPs dispergované ve vodě. Efekt dávkování zóny vody byl stejný, jak bylo popsáno v předchozím odstavci. Optimální bylo tedy dávkování vody tlakem 50 mbar po dobu 10 s.

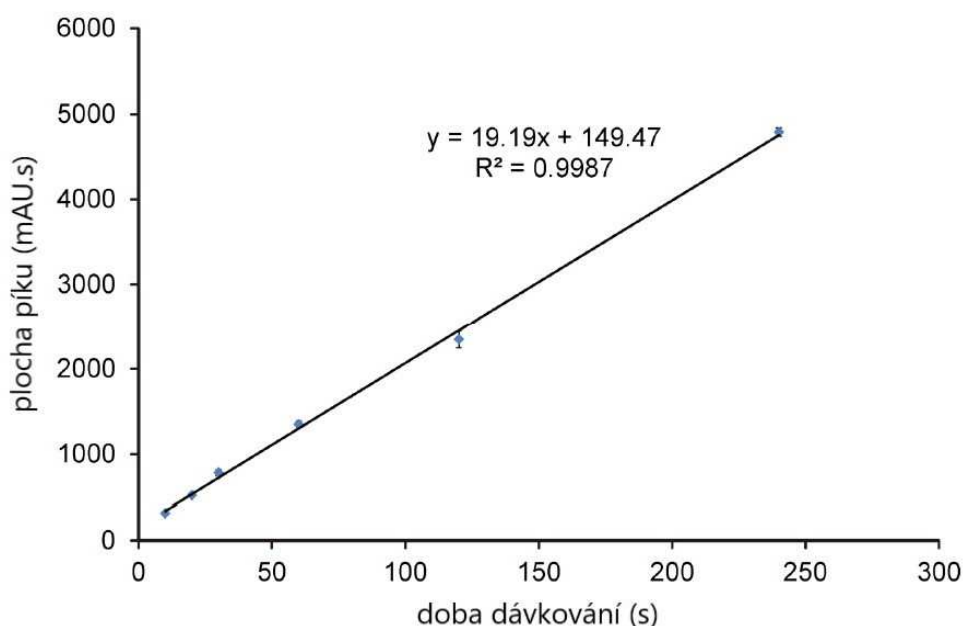
Dalším studovaným parametrem byl účinek dávkovacího napětí. Pro dávkování bylo použito -20, -10 a -5 kV (vše po dobu 60 s). Zvyšováním napětí dochází k většímu množství nadávkovaných MNPs ( $\rho = 0,01$ ), čímž je samozřejmě zvětšen i signál. Nicméně, tímto dochází rovněž i k nárůstu elektrického proudu, což způsobuje nestabilitu během dávkování (zřejmě kvůli většímu generování Jouleova tepla). Protože byly při napětí -20 kV příslušné elektrické proudy přibližně 78  $\mu$ A, bylo pro příští experimenty vybráno napětí -10 kV.



Jako poslední byla optimalizována doba dávkování. Karboxylované MNPs dispergované ve vodě ( $\rho = 0,001$ ) byly dávkovány napětím -10 kV po dobu od 10 s do 360 s (6 min) do 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  o pH 9,5, přičemž před elektrokinetickým dávkováním nanočástic proběhlo hydrodynamické dávkování zóny vody tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Obrázek 43 ukazuje elektroforetické profily MNPs při těchto podmínkách. Je zřejmé, že zvýšení doby dávkování vedlo k nárůstu množství nanočástic v kapiláře. Obrázek 44 ukazuje závislost ploch píků MNPs na době dávkování. Tato závislost je lineární v případě dávkování po dobu od 10 s do 240 s, kdy rovnice přímky je  $y = 19,19 (\pm 0,38)x + 149,47 (\pm 43,09)$ , s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9987$ . Jak je vidět na obrázku 43, při vyšší době dávkování (240 s), jsou pozorovány deformované profily MNPs. To může být způsobeno tím, že je zóna nanočástic příliš velká a tudíž není dostatek času na to, aby byla fokusována do píku Gaussovského tvaru před tím, než dosáhne detektoru. Proto ani doba dávkování 360 s nevedla k úspěšné analýze. MNPs totiž za těchto podmínek promigrovaly k detekčnímu okénku v kapiláře dříve, než byla doba dávkování ukončena.



*Obrázek 43: Profily píků nanočástic v závislosti na době dávkování. BGE: 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování MNPs po dobu 10, 20, 30, 60, 120 a 240 s aplikováním napětí -10 kV;  $\rho = 0,001$ ; zóna vody dávkována tlakem 50 mbar po dobu 10 s; analýzy v PVA pokryté kapiláře (celková délka 33,5 cm, efektivní délka 25,0 cm); aplikované napětí -10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*



*Obrázek 44: Závislost ploch píků MNPs na době dávkování. BGE: 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pH 9,5; dávkování aplikací napětí -10 kV;  $\rho = 0,001$  zóna vody dávkována tlakem 50 mbar po dobu 10 s; analýzy v PVA pokryté kapiláře (celková délka 33,5 cm, efektivní délka 25,0 cm); aplikované napětí -10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Nakonec byl odhadnut faktor prekoncentrace, jako poměr plochy píku MNPs za optimálních podmínek při elektrokinetickém dávkování vynásobený poměrem ředění při elektrokinetickém a hydrodynamickém dávkování (100) a plochy píku, jež byla získána použitím klasického dávkování. Optimalizované podmínky pro elektrokinetické dávkování jsou tedy následující: vzorek karboxylovaných MNPs byl dispergován ve vodě ( $\rho = 0,001$ ), a takto byl dávkován napětím -10 kV po dobu 120 s do 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pufru o pH 9,5, kdy elektrokinetickému dávkování vzorku nanočástic předcházelo hydrodynamické dávkování zóny vody tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Za klasické dávkování pro CE bylo považováno hydrodynamické dávkování nanočástic ( $\rho = 0,1$ ), tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Takto vypočtený prekoncentrační faktor činil 860.

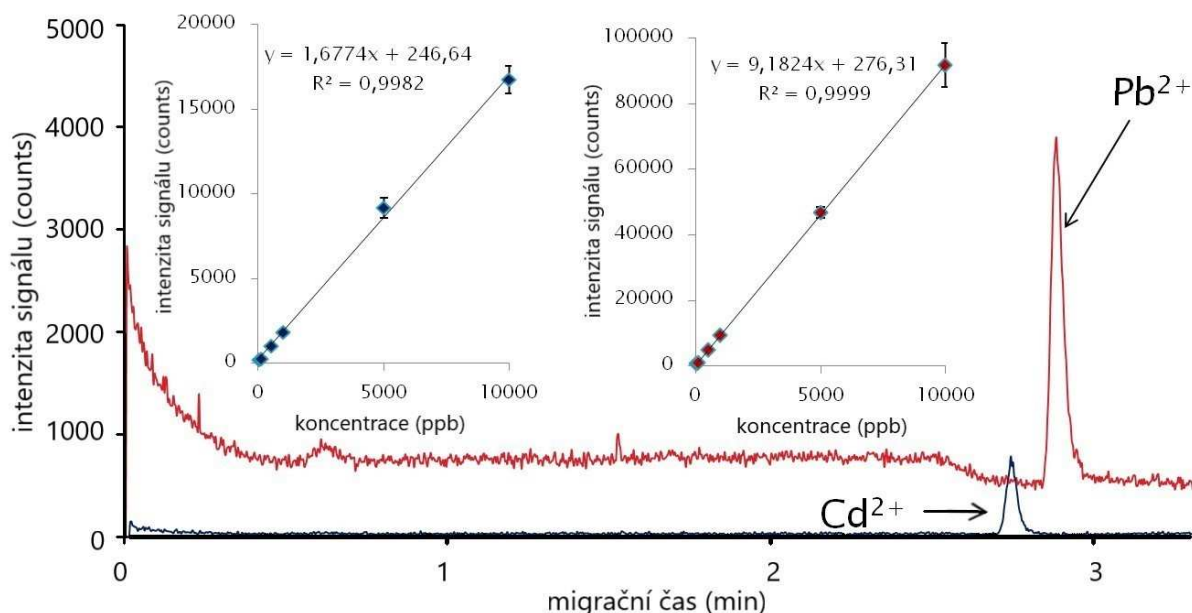
## 5.2.2 Závěr

V této části práce byla pomocí kapilární elektroforézy studována on-line elektrokinetická prekoncentrace karboxylovaných magnetitových NPs, za „normálních“ podmínek a za podmínek, kdy je elektroosmotický tok obrácen nebo potlačen. Jako základní elektrolyt byl použit 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5. Bylo zjištěno, že zdánlivé mobility NPs jsou pravděpodobně příliš nízké, aby mohly být tyto částice elektrokineticky nadávkovány za „normálních“ podmínek. Použití CTAB a DDAB pro dynamické pokrytí kapilár (obrácený EOF) a PVA kovalentně pokrytých kapilár (potlačený EOF) elektrokinetické dávkování použitých nanočástic umožnilo, avšak reprodukovatelných analýz bylo dosaženo pouze v případě použití PVA pokrytých kapilár. Za optimálních podmínek bylo touto metodou dosaženo 860-násobné prekoncentrace použitých nanočástic oproti standardnímu dávkování.

## 5.3 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI KARBOXYLOVANÝMI MAGNETITOVÝMI NANOČÁSTICEMI A POLYMYXINEM B POMOCÍ CE-ICP-MS

### 5.3.1 Testování spojení CE s ICP-MS

CE byla spojena s ICP-MS pomocí rozhraní vyvinutého v laboratoři (viz kapitola 4.3.5). Funkčnost spojení byla ověřena metodou používanou pro stanovení kationtů kovů [300]. Na obrázku 45 je ukázán příklad analýzy směsi  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$  iontů s příslušnými kalibračními závislostmi.



*Obrázek 45:* Příklad CE-ICP-MS analýzy směsi  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$  kationtů (1 ppm) s příslušnými kalibračními závislostmi. BGE: 10 mM imidazol/ $\text{CH}_3\text{COOH}$  pH 4,5; dávkování 50 mbar po dobu 5 s; analýza v křemenné kapiláře o délce 70 cm a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ ; aplikované napětí 30 kV; teplota 25  $^\circ\text{C}$ .

ICP-MS podmínky: příkon generátoru: 1550 W; průtok vnějšího plazmového plynu: 14,95 l/min; průtok pomocného plynu/nosný Ar: 0,9 l/min; průtok středního plazmového plynu (do zmlžovače): 1,09 l/min; průtok přidavného („make up“) Ar: 0,25 l/min; průtok He v kolizní cele: 3 ml/min; integrační čas: 70 ms pro izotopy  $^{111}\text{Cd}$  a  $^{208}\text{Pb}$ .

## 5.3.2 Interakční studie Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@COOH-PMB

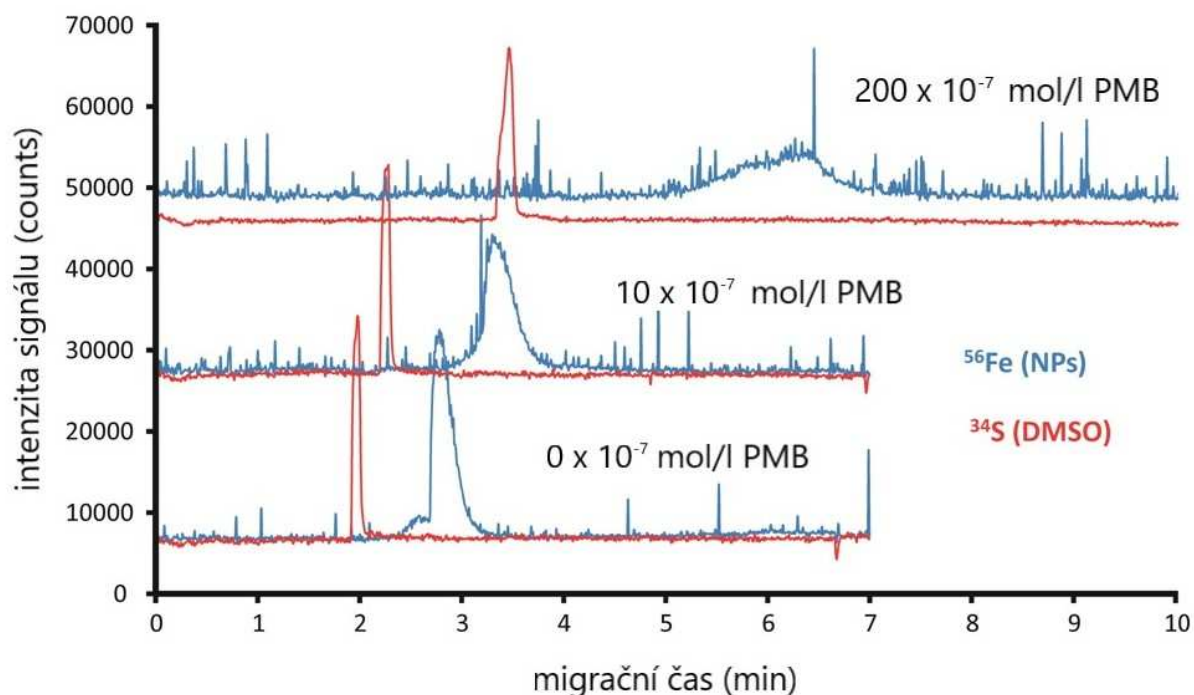
### 5.3.2.1 Experimentální část

Po otestování spojení byla provedena interakční studie magnetitových karboxylovaných nanočástic s polymyxinem B pomocí ACE-ICP-MS.

Polymyxin B (PMB) je antibiotikum primárně užívané pro léčbu infekcí způsobených rezistentními gram-negativními bakteriemi. Mechanismus účinku spočívá v navázání na lipopolysacharidovou buněčnou stěnu a její neutralizaci, čímž dojde k narušení její integrity. Jedná se o dekaeptidové cyklické kationtové antibiotikum obsahující lipofilní a hydrofilní skupinu (lipofobní). Jeho navázáním na lipid A, hlavní složku endotoxinu, dochází k deaktivaci endotoxinu [301].

Vzhledem k tomu, že je ideou vyvinout v laboratoři mikrofluidní zařízení na kterém by byla testována bakteriální rezistence vůči polymyxinu B, který by byl zachycen na tomto typu nanočástic, je důležité vědět, jak tyto nanočástice se zmíněným antibiotikem interagují.

Pro on-line interakční studie bylo použito typické uspořádání ACE. Polymyxin B byl postupně přidáván do základního elektrolytu, kterým byl 25 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH o fyziologickém pH (7,4). Za těchto podmínek byla z migračních časů nanočástic a „markeru“ elektroosmotického toku (DMSO) vypočítána efektivní mobilita nanočástic, resp. vznikajícího komplexu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@COOH-PMB. Složení pufru a jeho pH bylo vybráno na základě budoucího použití v navrhovaném mikrofluidním zařízení. Aplikované napětí bylo optimalizováno při použití 20, 25 a 30 kV, přičemž jako nejlepší se ukázalo 25 kV (stále reprodukovatelné analýzy v rozumném čase). Koncentrace polymyxinu B byla měněna od 0 do 250 x 10<sup>-7</sup> mol/l.



**Obrázek 46:** Příklad CE-ICP-MS analýz karboxylovaných magnetitových nanočástic ( $\rho = 0,02$ ) s různými koncentracemi přidaného PMB do základního elektrolytu.

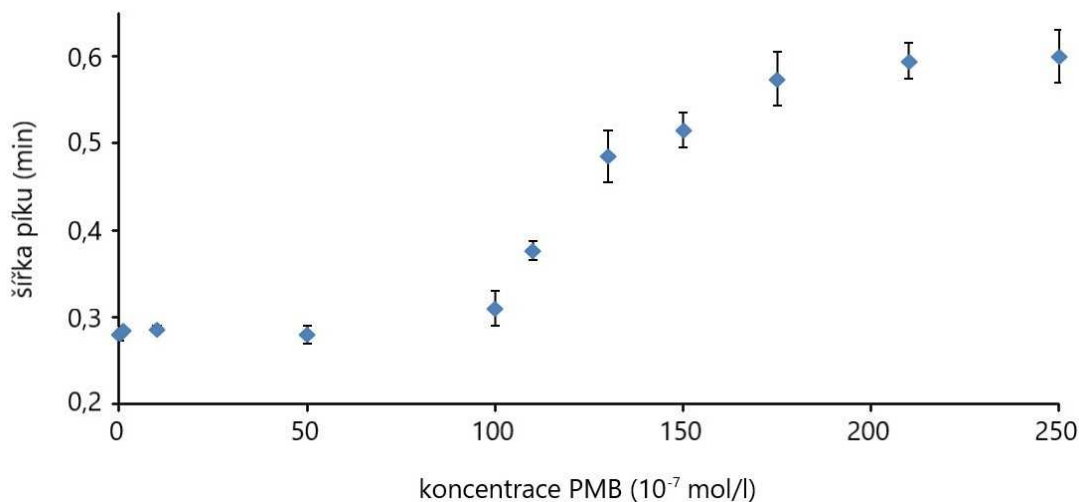
BGE: 25 mM  $H_3PO_4/NaOH$  pH 7,4; dávkování 50 mbar po dobu 5 s; analýza v křemenné kapiláře o délce 47 cm a vnitřním průměru 50  $\mu m$ ; aplikované napětí 25 kV; teplota 25°C.

ICP-MS podmínky: příkon generátoru: 1550 W; průtok vnějšího plazmového plynu: 14,95 l/min; průtok pomocného plynu/nosný Ar: 0,9 l/min; průtok středního plazmového plynu (do zmlžovače): 1,1 l/min; průtok přídavného („make up“) Ar: 0,25 l/min; průtok He v kolizní cele: 3 ml/min; integrační čas: 100 ms pro izotopy  $^{12}C$ ,  $^{34}S$ ,  $^{54}Fe$ ,  $^{56}Fe$  a  $^{57}Fe$ .

Obrázek 46 ukazuje příklad analýzy CE-ICP-MS  $Fe_3O_4@COOH$  NPs s různými koncentracemi polymyxinu B. Pro výpočet mobilit byly z důvodů největších odezev použity izotopy  $^{34}S$  (DMSO) a  $^{56}Fe$  (NPs). Z naměřených dat vyplývají dvě rozdílné oblasti interakcí (obrázek 49), a to:

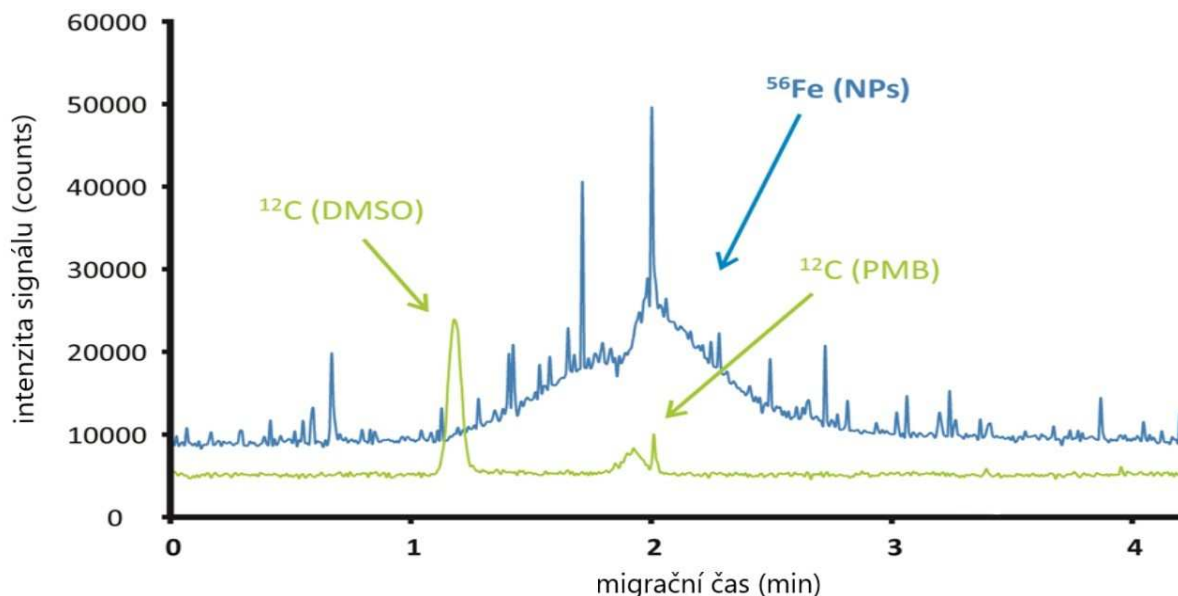
- (i) oblast koncentrace PMB 1-50  $\times 10^{-7}$  mol/l
- (ii) oblast koncentrace PMB 100-250  $\times 10^{-7}$  mol/l.

Je zajímavé, že se tyto oblasti liší také tvarem (šířkou) profilů NPs (obrázek 47). Zatímco NPs vytvářejí relativně ostré píky, když BGE obsahuje nízké koncentrace polymyxinu B, jsou tyto píky mnohem širší a jejich intenzita je rovněž nižší, pokud je v BGE obsažena vyšší koncentrace PMB (viz také obrázek 46).



*Obrázek 47: Závislost šířky píků na koncentraci přidaného PMB.*

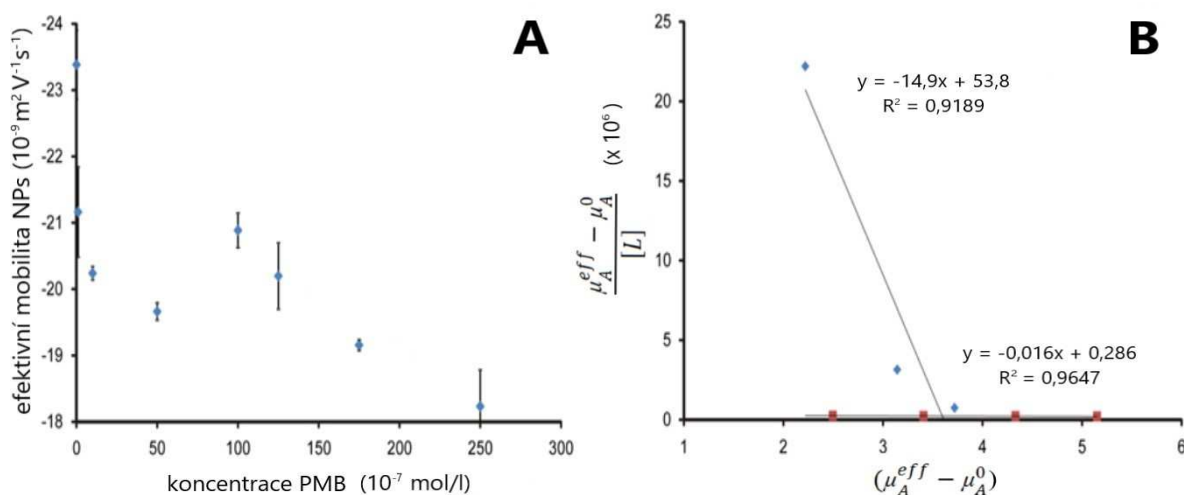
Pro ověření toho, že nanočástice skutečně interagují s PMB, byla rovněž provedena tlakem asistovaná (50 mbar) CE-ICP-MS. NPs byly analyzovány ve fosfátovém pufru, do něhož byl přidán polymyxin B o koncentraci  $300 \times 10^{-7}$  mol/l (obrázek 48). Pík, který odpovídá izotopu  $^{12}\text{C}$  v přibližně druhé minutě analýzy, kdy migrují i nanočástice (izotop  $^{56}\text{Fe}$ ), lze považovat za důkaz vzniku komplexu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH-PMB}$ . Izotop  $^{12}\text{C}$  zde odpovídá uhlíku z PMB, protože při koncentraci 0 mol/l PMB v pufru, nebyl v čase, kdy migrují NPs detekován žádný  $^{12}\text{C}$  pík. Lze tedy říci, že obsah uhlíku, který by pocházel ze vzorku  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$  nanočástic je příliš nízký na to, aby byl odlišen od signálu pozadí základního elektrolytu. Tato analýza ukazuje jedinečnost ICP-MS prvkově specifické detekce pro studium interakcí pomocí ACE.



*Obrázek 48: Tlakem asistovaná ACE-ICP-MS analýza – potvrzení interakce PMB s nanočásticemi. Doba dávkování: 100 mbar po dobu 10 s; koncentrace PMB:  $300 \times 10^{-7}$  mol/l.*

### 5.3.2.2 Vyhodnocení

Pro odhadnutí interakčních konstant a stechiometrie mezi karboxylovanými magnetitovými nanočásticemi byl sestaven graf závislosti efektivních mobilit nanočástic na koncentraci PMB (obrázek 49A). Tento graf byl potom linearizován (obrázek 49B) x-reciprokou metodou dle Scatcharda (viz kapitola 2.2.3.7, tabulka 3).



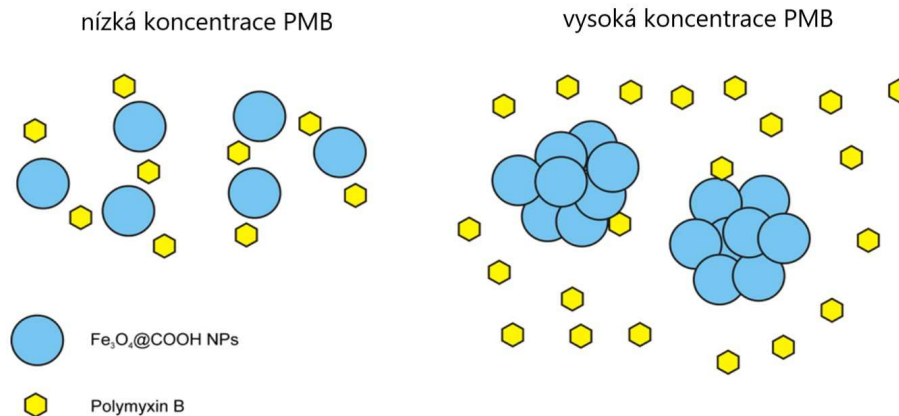
*Obrázek 49: A) Graf závislosti efektivních mobilit nanočástic v závislosti na koncentraci přidaného polymyxinu B B) linearizovaná forma grafu A dle Scatcharda (x-reciproká linearizace).*



Na linearizovaném grafu jsou opět zřetelné dvě různé oblasti interakce nanočástic s polymyxinem B (obrázek 49B), odpovídající nízké ( $1-50 \times 10^{-7}$  mol/l) a vyšší ( $100-250 \times 10^{-7}$  mol/l) koncentraci PMB. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. První oblast (nízká koncentrace polymyxinu B) je reprezentována poměrně vysokou interakční konstantou se stechiometrií, kde statisticky jedna nanočástice interaguje s několika molekulami polymyxinu B ( $n = 0,7$ ), zatímco v druhé oblasti (vyšší koncentrace polymyxinu B) se jedná o mnohem slabší interakci ( $K_b = 14,9 \times 10^6$  vs.  $K_b = 16,0 \times 10^3$ ), avšak stechiometrie je zde otočená, takže o mnoho více NPs interaguje s několika molekulami polymyxinu B ( $n = 3,5$ ). To je schématicky znázorněno na obrázku 50. Obrácený stechiometrický poměr v druhé oblasti může také znamenat, že NPs vytvářejí agregáty, které interagují s polymyxinem B. Tato hypotéza je v souladu s tím, že  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$  NPs jsou ve fosfátovém pufru záporně nabitě (zeta potenciál je zde roven  $-13,9$  mV) a interagují s kladně nabitým polymyxinem B (hodnoty pK jsou vyšší než 9 [302]). Tím dochází ke snižování jejich celkového zeta potenciálu, přičemž pokud je toto snížení dostatečné, může dojít k agregaci nanočástic (elektrostatické odpuzování NPs je překonáno přitažlivými silami).

*Tabulka 6: Výsledky ACE-ICP-MS.*

<i>Koncentrace polymyxinu B</i>	<i><math>K_b</math> (<math>M^{-1}</math>)</i>	<i>n</i>
$1 - 50 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$	$14,9 (\pm 4,4) \times 10^6$	$0,7 (\pm 0,3)$
$100 - 250 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$	$16,0 (\pm 2,2) \times 10^3$	$3,5 (\pm 0,5)$



*Obrázek 50: Znárodnění hypotézy, jak  $Fe_3O_4@COOH$  nanočástice interagují s polymyxinem při jeho nižších ( $1-50 \times 10^{-7}$  mol/l) a vyšších ( $100-250 \times 10^{-7}$  mol/l) koncentracích.*

### 5.3.3 Závěr

Tato část práce je nejprve zaměřena na testování spojení kapilární elektroforézy s ICP-MS, pro aplikace, kdy je výhodné mít citlivější a specifickou detekci. Testování spojení proběhlo na jednoduché metodě pro separaci dvou kovových kationtů ( $Cd^{2+}$  a  $Pb^{2+}$ ). Pomocí těchto spojených technik byly poté studovány interakce karboxylovaných magnetitových NPs s polymyxinem B v prostředí pufru o fyziologickém pH, aby se prokázalo, že tyto NPs mohou být použity pro zachycení polymyxinu B ve vyvíjeném zařízení pro testování bakteriální rezistence. Díky schopnosti ICP-MS analyzovat různé izotopy, mezi něž patří nejen  $^{54}Fe$ ,  $^{56}Fe$ ,  $^{57}Fe$  pocházející z nanočástic a  $^{34}S$  pocházející z „markeru“ elektroosmotického toku (DMSO), ale také  $^{12}C$  (PMB), lze tuto interakci dokázat. Bylo zjištěno, že použité nanočástice interagují se zmíněným antibiotikem dvěma různými způsoby, které se mezi sebou liší silou interakčních konstant ( $14,9 \times 10^6$  vs.  $16,0 \times 10^3$ ) a stechiometrickými poměry (0,7 vs. 3,5). Obrácení stechiometrie lze vysvětlit začátkem agregace NPs v důsledku snížení elektrostatického odpuzování mezi nanočásticemi, když je zvyšována koncentrace polymyxinu B. Z pohledu vyvíjeného zařízení pro testování bakteriální rezistence je tedy důležitá optimalizace koncentrace PMB. K úspěšnému zachycení PMB (vysoká hodnota  $K_b$ ) dojde pouze v nízkých koncentracích PMB, kdy nenastává agregace NPs. To je v rozporu se skutečností, že agregované NPs by byly pravděpodobně snadněji zachyceny v kanálu zařízení aplikací magnetického pole. Síla interakce mezi agregovanými NPs a PMB však pravděpodobně nebude stačit k úspěšnému zachycení PMB.

## 6 ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli bylo v rámci experimentální části předložené práce studováno chování karboxylovaných magnetitových nanočástic v kapilární elektroforéze, a to na rozhraní dvou prostředí s různými vlastnostmi (změna specifické vodivosti nebo přítomnost ligandu, s nímž mohou interagovat).

Nejprve bylo studováno chování nanočástic na rozhraní prostředí s různými specifickými vodivostmi, kdy dochází k tzv. „stacking“ efektu. V této části bylo zjištěno, že při „stacking“ efektu může docházet ke dvojímu chování, podle velikosti rozdílu iontové síly. Prvním možným chováním je prekoncentrace, jež je u „stacking“ efektu žádoucí. Nanočástice se mohou vyskytovat ve vzorcích ve velmi malém množství, a proto je velmi výhodné je tímto efektem zakoncentrovat. Dalším způsobem chování NPs na tomto rozhraní je tzv. indukovaná agregace, k níž dojde, pokud je rozdíl specifických vodivostí (iontové síly) obou elektrolytů velmi výrazná.

„Stacking“ efekt lze kombinovat s elektrokinetickým dávkováním vzorku, což bylo předmětem dalšího studia těchto nanočástic. Bylo zjištěno, že elektrokinetické dávkování těchto částic je možné pouze za podmínek, kdy je elektroosmotický tok obrácen nebo zastaven. To je způsobeno pravděpodobně tím, že za „normálních“ podmínek jsou vypočtené zdánlivé mobility dávkovaných nanočástic příliš nízké. Vzhledem k tomu, že při dynamickém pokrytí kapilár pomocí CTAB a DDAB (obrácený EOF) a kovalentním pokrytí pomocí polyakrylamidu (zastavený EOF) nebylo možno získat reprodukovatelné analýzy, byly pro tento účel použity komerčně dostupné PVA kovalentně pokryté kapiláry. Za optimálních podmínek došlo k 860-násobné prekoncentraci.

Jako poslední byla studována změna chování nanočástic v elektroforéze, pokud je v základním elektrolytu přítomen ligand, který s nimi může interagovat. Tím se mění povrchová chemie nanočástic, což při vyšších koncentracích může opět znamenat jejich agregaci. Pro důkaz interakce nanočástic s použitým ligandem (antibiotikum polymyxin B) a zlepšení detekce (nižší detekční limity, prvková specifita) bylo využito spojení CE s ICP-MS, jež bylo v laboratoři nejprve vyvinuto a testováno.

Vzhledem k tomu, že jsou nanotechnologie jedním z nejrychleji se rozvíjejících oblastí lidské činnosti, je charakterizace nanočástic (z pohledu jejich stability a povrchové

chemie) a jejich citlivá detekce (použití citlivých detektorů a prekoncentračních technik) velmi důležitá. Z těchto důvodů mohou dosažené výsledky přispět k lepšímu porozumění chování nanočástic v různých prostředí a při jejich pokročilejších aplikacích (např. připravované zařízení pro studium bakteriální rezistence).

Disertační práce jednoznačně ukazuje, že kapilární elektromigrační techniky jsou výborným nástrojem pro charakterizaci nanočástic, přičemž jejich vlastnosti lze ještě vylepšit, pokud je CE spojena s ICP-MS.

## 7 LITERATURA

- [1] A. Lopez-Serrano, R.M. Olivas, J.S. Landaluze, C. Camara, Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact, *Anal Methods-Uk*, 6 (2014) 38-56.
- [2] A.J. Chetwynd, E.J. Guggenheim, S.M. Briffa, J.A. Thorn, I. Lynch, E. Valsami-Jones, Current Application of Capillary Electrophoresis in Nanomaterial Characterisation and Its Potential to Characterise the Protein and Small Molecule Corona, *Nanomaterials-Basel*, 8 (2018).
- [3] E. Ban, Y.S. Yoo, E.J. Song, Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis, *Talanta*, 141 (2015) 15-20.
- [4] L. Bartovská, M. Šišková, *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, 5 ed., VŠCHT Praha, Praha, ČR, 2005.
- [5] D.H. Everett, *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry, London, London, UK, 1988.
- [6] B. Bhushan, *Handbook of Nanotechnology*, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, Berlin, Heidelberg, DE, 2010.
- [7] A.S. de Dios, M.E. Diaz-Garcia, Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects, *Anal Chim Acta*, 666 (2010) 1-22.
- [8] L. Kvítek, A. Panáček, *Základy koloidní chemie*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Olomouc, ČR, 2007.
- [9] H. Qu, S.W. Linder, T.K. Mudalige, Surface coating and matrix effect on the electrophoretic mobility of gold nanoparticles: a capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry study, *Anal Bioanal Chem*, 409 (2017) 979-988.
- [10] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment, *J Phys Chem B*, 107 (2003) 668-677.
- [11] S. Jiang, K.Y. Win, S.H. Liu, C.P. Teng, Y.G. Zheng, M.Y. Han, Surface-functionalized nanoparticles for biosensing and imaging-guided therapeutics, *Nanoscale*, 5 (2013) 3127-3148.
- [12] E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, Targeting of drugs and nanoparticles to tumors, *J Cell Biol*, 188 (2010) 759-768.
- [13] D. Pantarotto, C.D. Partidos, R. Graff, J. Hoebeker, J.P. Briand, M. Prato, A. Bianco, Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides, *J Am Chem Soc*, 125 (2003) 6160-6164.
- [14] S.P. Wang, N. Mamedova, N.A. Kotov, W. Chen, J. Studer, Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates, *Nano Lett*, 2 (2002) 817-822.
- [15] R.L. Edelstein, C.R. Tamanaha, P.E. Sheehan, M.M. Miller, D.R. Baselt, L.J. Whitman, R.J. Colton, The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents, *Biosens Bioelectron*, 14 (2000) 805-813.
- [16] Y.P. Bao, T.F. Wei, P.A. Lefebvre, H. An, L.X. He, G.T. Kunkel, U.R. Muller, Detection of protein analytes via nanoparticle-based bio bar code technology, *Anal Chem*, 78 (2006) 2055-2059.
- [17] R. Mahtab, J.P. Rogers, C.J. Murphy, Protein-Sized Quantum-Dot Luminescence Can Distinguish between Straight, Bent, and Kinked Oligonucleotides, *J Am Chem Soc*, 117 (1995) 9099-9100.

- [18] O.V. Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 2 (2004) 1-6.
- [19] R.S. Molday, D. Mackenzie, Immunospecific Ferromagnetic Iron-Dextran Reagents for the Labeling and Magnetic Separation of Cells, *J Immunol Methods*, 52 (1982) 353-367.
- [20] A.T. Elias, A., Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles, *Hematology*, 2009 (2009) 720-726.
- [21] K.S. Birdi, *Surface and Colloid Chemistry: Principles and Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2009.
- [22] C. Vollmer, C. Janiak, Naked metal nanoparticles from metal carbonyls in ionic liquids: Easy synthesis and stabilization, *Coordination Chemistry Reviews*, 255 (2011) 2039-2057.
- [23] J. Petr, V. Maier, Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis, *Trac-Trend Anal Chem*, 31 (2012) 9-22.
- [24] A.M. El Badawy, T.P. Luxton, R.G. Silva, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions, *Environ Sci Technol*, 44 (2010) 1260-1266.
- [25] A. Ivask, A. ElBadawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z.X. Ji, C.H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J.I. Zink, Y. Cohen, P.A. Holden, H.A. Godwin, Toxicity Mechanisms in *Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver, *Acs Nano*, 8 (2014) 374-386.
- [26] S.C. Nichols, M. Loewenberg, R.H. Davis, Electrophoretic particle aggregation, *J Colloid Interf Sci*, 176 (1995) 342-351.
- [27] K. Boldt, O.T. Bruns, N. Gaponik, A. Eychmuller, Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers, *J Phys Chem B*, 110 (2006) 1959-1963.
- [28] M. Sethi, G. Joung, M.R. Knecht, Stability and Electrostatic Assembly of Au Nanorods for Use in Biological Assays, *Langmuir*, 25 (2009) 317-325.
- [29] K. Petersson, D. Ilver, C. Johansson, A. Krozer, Brownian motion of aggregating nanoparticles studied by photon correlation spectroscopy and measurements of dynamic magnetic properties, *Anal Chim Acta*, 573 (2006) 138-146.
- [30] J. Petr, B. Teste, S. Descroix, J.M. Siaugue, P. Gareil, A. Varenne, Separation of alpha-lactalbumin grafted- and non-grafted maghemite core/silica shell nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2754-2761.
- [31] U. Pyell, Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques, *Electrophoresis*, 31 (2010) 814-831.
- [32] R.F. Domingos, M.A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M.M. Reid, N. Tufenkji, J.R. Lead, G.G. Leppard, K.J. Wilkinson, Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes, *Environ Sci Technol*, 43 (2009) 7277-7284.
- [33] Y. Dieckmann, H. Colfen, H. Hofmann, A. Petri-Fink, Particle Size Distribution Measurements of Manganese-Doped ZnS Nanoparticles, *Anal Chem*, 81 (2009) 3889-3895.
- [34] E.A. Campos, D.V.B.S. Pinto, J.I.S. de Oliveira, E.D. Mattos, R.D.L. Dutra, Synthesis, Characterization and Applications of Iron Oxide Nanoparticles - a Short Review, *J Aerosp Technol Man*, 7 (2015) 267-276.
- [35] R. Banerjee, Y. Katsenovich, L. Lagos, M. McIntosh, X. Zhang, C.Z. Li, Nanomedicine: Magnetic Nanoparticles and their Biomedical Applications, *Curr Med Chem*, 17 (2010) 3120-3141.

- [36] M. Holdrich, S.Y. Liu, M. Epe, M. Lammerhofer, Taylor dispersion analysis, resonant mass measurement and bioactivity of pepsin-coated gold nanoparticles, *Talanta*, 167 (2017) 67-74.
- [37] D. Roy, J. Fendler, Reflection and absorption techniques for optical characterization of chemically assembled nanomaterials, *Adv Mater*, 16 (2004) 479-508.
- [38] S.M. Majedi, H.K. Lee, Recent advances in the separation and quantification of metallic nanoparticles and ions in the environment, *Trac-Trend Anal Chem*, 75 (2016) 183-196.
- [39] M.A. Rodriguez, D.W. Armstrong, Separation and analysis of colloidal/nano-particles including microorganisms by capillary electrophoresis: a fundamental review, *J Chromatogr B*, 800 (2004) 7-25.
- [40] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1948/summary/>, staženo 22. 3. 2019.
- [41] J.P. Landers, *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3rd edition ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2007.
- [42] O. Vesterberg, History of Electrophoretic Methods, *J Chromatogr*, 480 (1989) 3-19.
- [43] K. Štulík, *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha, Praha, ČR, 2004.
- [44] H.H. Lauer, G.P. Rozing, *High Performance Capillary Electrophoresis, A Primer*, Agilent Technologies, DE, Waldbronn, DE, 2010.
- [45] K.D. Altria, *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*, Humana Press Inc., USA, Totowa, NJ, USA, 1996.
- [46] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1995.
- [47] J. Petersen, A.A. Mohammad, *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, Humana Press, USA, Springer Science + Business Media, New York, USA.
- [48] D. Kaniansky, M. Masar, J. Bielicikova, Electroosmotic flow suppressing additives for capillary zone electrophoresis in a hydrodynamically closed separation system, *J Chromatogr A*, 792 (1997) 483-494.
- [49] M.G. Khaledi, *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1998.
- [50] J.T. Smith, D.V. Vinjamoori, Rapid-Determination of Logarithmic Partition-Coefficients between N-Octanol and Water Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 669 (1995) 59-66.
- [51] A. Gavenda, P. Bednar, P. Bartak, P. Adamovsky, J. Sevcik, P. Tzoumas, J. Ulrichova, Estimation of partition coefficients by MEKC - Part I: Potential pharmaceuticals based on 2-guinolone and 2-indolone, *J Sep Sci*, 24 (2001) 723-728.
- [52] L. Muller, P. Bednar, P. Bartak, K. Lemr, J. Sevcik, Estimation of partition coefficients by MEKC - Part 2: Anthocyanins, *J Sep Sci*, 28 (2005) 1285-1290.
- [53] V. Kasicka, Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods, *Chem Listy*, 91 (1997) 320-329.
- [54] V. Pacáková, T. Vařilová, Afinitní techniky, in: *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*, VŠCHT, Praha, Praha, ČR, 2006, pp. 36-45.
- [55] A. Varenne, P. Gareil, S. Collic-Jouault, R. Daniel, Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins: study of the binding properties of fucoidan to antithrombin, *Anal Biochem*, 315 (2003) 152-159.
- [56] A.L. Marie, N.T. Tran, E.P. Bianchini, F. Sailer, S. Pautus, T. Abache, J.L. Plantier, R. Urbain, D. Borgel, M. Taverna, A fast capillary electrophoresis method to assess the

- binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants, *J Pharmaceut Biomed*, 111 (2015) 64-70.
- [57] M. Ruzicka, D. Koval, J. Vavra, P.E. Reyes-Gutierrez, F. Těplý, V. Kasicka, Interactions of helquats with chiral acidic aromatic analytes investigated by partial-filling affinity capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1467 (2016) 417-426.
- [58] K.L. Rundlett, D.W. Armstrong, Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 721 (1996) 173-186.
- [59] N. Li, S. Zeng, L. He, W.W. Zhong, Probing Nanoparticle-Protein Interaction by Capillary Electrophoresis, *Anal Chem*, 82 (2010) 7460-7466.
- [60] V.A. Galievsky, A.S. Stasheuski, S.N. Krylov, Capillary Electrophoresis for Quantitative Studies of Biomolecular Interactions, *Anal Chem*, 87 (2015) 157-171.
- [61] M. Andrási, G. Lehoczki, Z. Nagy, G. Gyemant, A. Pungor, A. Gaspar, A comparative study of capillary electrophoresis and isothermal titration calorimetry for the determination of binding constant of human serum albumin to monoclonal antibody, *Electrophoresis*, 36 (2015) 1274-1281.
- [62] S. Ehala, E. Marklik, P. Toman, V. Kasicka, ACE applied to the quantitative characterization of benzo-18-crown-6-ether binding with alkali metal ions in a methanol-water solvent system, *Electrophoresis*, 31 (2010) 702-708.
- [63] F. Varenne, M. Bourdillon, M. Meyer, Y. Lin, M. Brellier, R. Baati, L.J. Charbonniere, A. Wagner, E. Doris, F. Taran, A. Hagege, Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry hyphenation for the determination at the nanogram scale of metal affinities and binding constants of phosphorylated ligands, *J Chromatogr A*, 1229 (2012) 280-287.
- [64] L. Chankvetadze, A.C. Servais, M. Fillet, A. Salgado, J. Crommen, B. Chankvetadze, Comparative enantioseparation of talinolol in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis and study of related selector-selectand interactions by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Chromatogr A*, 1267 (2012) 206-216.
- [65] S. Ehala, V. Kasicka, E. Makrlik, Determination of stability constants of valinomycin complexes with ammonium and alkali metal ions by capillary affinity electrophoresis, *Electrophoresis*, 29 (2008) 652-657.
- [66] K. Polec-Pawlak, J.K. Abramski, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, M. Jarosz, Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins, *Electrophoresis*, 27 (2006) 1128-1135.
- [67] L. Valtcheva, J. Mohammad, G. Pettersson, S. Hjerten, Chiral Separation of Beta-Blockers by High-Performance Capillary Electrophoresis Based on Non-Immobilized Cellulase as Enantioselective Protein, *J Chromatogr*, 638 (1993) 263-267.
- [68] S. Hjerten, K. Elenbring, F. Kilar, J.L. Liao, A.J.C. Chen, C.J. Siebert, M.D. Zhu, Carrier-Free Zone Electrophoresis, Displacement Electrophoresis and Isoelectric-Focusing in a High-Performance Electrophoresis Apparatus, *J Chromatogr*, 403 (1987) 47-61.
- [69] B.B. Vanorman, G.L. McIntire, Size-Based Separation of Polystyrene Nanoparticles by Capillary Electrophoresis, *Am Lab*, 22 (1990) 66-67.
- [70] S.P. Radko, M. Stastna, A. Chrambach, Capillary zone electrophoresis of sub-micron sized particles in electrolyte solutions of various ionic strengths: Size-dependent



- electrophoretic migration and separation efficiency, *Electrophoresis*, 21 (2000) 3583-3592.
- [71] B.V. Huff, G.L. McIntire, Determination of the Electrophoretic Mobility of Polystyrene Particles by Capillary Electrophoresis, *J Microcolumn Sep*, 6 (1994) 591-594.
- [72] S.P. Radko, M.M. Garner, G. Caiafa, A. Chrambach, Molecular-Sieving of Polystyrene Carboxylate of a Diameter up to 10- $\mu$ m in Solutions of Uncrosslinked Polyacrylamide of M(R)-5x10<sup>6</sup> Using Capillary Zone Electrophoresis, *Anal Biochem*, 223 (1994) 82-87.
- [73] N.G. Vanifatova, B.Y. Spivakov, J. Mattusch, R. Wennrich, Separation of unmodified polystyrene nanosphere standards by capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr A*, 898 (2000) 257-263.
- [74] S.P. Radko, A. Chrambach, Capillary zone electrophoresis of rigid submicron-sized particles in polyacrylamide solution - Selectivity, peak spreading and resolution, *J Chromatogr A*, 848 (1999) 443-455.
- [75] W.M. Hwang, C.Y. Lee, D.W. Boo, J.G. Choi, Separation of nanoparticles in different sizes and compositions by capillary electrophoresis, *B Kor Chem Soc*, 24 (2003) 684-686.
- [76] S.P. Radko, A. Chrambach, Capillary electrophoresis of subcellular-sized particles, *Journal of Chromatography B*, 722 (1999) 1-10.
- [77] C. Quang, S.L. Petersen, G.R. Ducatte, N.E. Ballou, Characterization and separation of inorganic fine particles by capillary electrophoresis with an indifferent electrolyte system, *J Chromatogr A*, 732 (1996) 377-384.
- [78] S.L. Petersen, N.E. Ballou, Separation of micrometer-size oxide particles by capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr A*, 834 (1999) 445-452.
- [79] L. Trapiella-Alfonso, F. d'Orlye, A. Varenne, Recent advances in the development of capillary electrophoresis methodologies for optimizing, controlling, and characterizing the synthesis, functionalization, and physicochemical, properties of nanoparticles, *Anal Bioanal Chem*, 408 (2016) 2669-2675.
- [80] L. Trapiella-Alfonso, G. Ramirez-Garcia, F. d'Orlye, A. Varenne, Electromigration separation methodologies for the characterization of nanoparticles and the evaluation of their behaviour in biological systems, *Trac-Trend Anal Chem*, 84 (2016) 121-130.
- [81] F.K. Liu, Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles, *J Chromatogr A*, 1216 (2009) 9034-9047.
- [82] Q. Hu, X.J. Gong, L.Z. Liu, M.M.F. Choi, Characterization and Analytical Separation of Fluorescent Carbon Nanodots, *J Nanomater*, (2017).
- [83] A.I. Lopez-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcarcel, Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles, *Trac-Trend Anal Chem*, 30 (2011) 58-71.
- [84] V. Adam, M. Vaculovicova, Capillary electrophoresis and nanomaterials - Part I: Capillary electrophoresis of nanomaterials, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2389-2404.
- [85] V. Adam, M. Vaculovicova, CE and nanomaterials - PartII: Nanomaterials in CE, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2405-2430.
- [86] A.M. Mebert, M.V. Tuttolomondo, M.I.A. Echazu, M.L. Foglia, G.S. Alvarez, M.C. Vescina, P.L. Santo-Orihuela, M.F. Desimone, Nanoparticles and capillary electrophoresis: A marriage with environmental impact, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2196-2207.
- [87] J. Churáček, *Analytická separace látek*, SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha, Praha, ČR, 1990.

- [88] L.Y. Zhang, W. Zhang, W.L. Chen, G. Chen, Simultaneous determination of five bioactive constituents in *Rhizoma Chuanxiong* by capillary electrophoresis with a carbon nanotube-polydimethylsiloxane composite electrode, *J Pharmaceut Biomed*, 131 (2016) 107-112.
- [89] M. Bouri, R. Salghi, M. Algarra, M. Zougagh, A. Rios, A novel approach to size separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis-evaporative light scattering detection, *Rsc Adv*, 5 (2015) 16672-16677.
- [90] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepria, M.T. Gomez, M.S. Jimenez, J. Perez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal Chim Acta*, 904 (2016) 10-32.
- [91] H.O. Qu, T.K. Mudalige, S.W. Linder, Capillary electrophoresis coupled with inductively coupled mass spectrometry as an alternative to cloud point extraction based methods for rapid quantification of silver ions and surface coated silver nanoparticles, *J Chromatogr A*, 1429 (2016) 348-353.
- [92] L. Ebdon, E.H. Evans, A. Fisher, S.J. Hill, *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1998.
- [93] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2008.
- [94] A.L. Rosen, G.M. Hieftje, Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation, *Spectrochim Acta B*, 59 (2004) 135-146.
- [95] S.M. Nelms, *ICP Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2005.
- [96] J.W. Olesik, J.A. Kinzer, S.V. Olesik, Capillary Electrophoresis Inductively-Coupled Plasma Spectrometry for Rapid Elemental Speciation, *Anal Chem*, 67 (1995) 1-12.
- [97] A. Prange, D. Profrock, Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations, *Anal Bioanal Chem*, 383 (2005) 372-389.
- [98] A.R. Timerbaev, K. Pawlak, S.S. Aleksenko, L.S. Foteeva, M. Matczuk, M. Jarosz, Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs, *Talanta*, 102 (2012) 164-170.
- [99] C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: Advances and future challenges, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2023-2037.
- [100] X.B. Yin, Y. Li, X.P. Yan, CE-ICP-MS for studying interactions between metals and biomolecules, *Trac-Trend Anal Chem*, 27 (2008) 554-565.
- [101] C. Simo, V. Garcia-Canas, A. Cifuentes, Chiral CE-MS, *Electrophoresis*, 31 (2010) 1442-1456.
- [102] M. Mihaljevic, L. Strnad, O. Sebek, Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in geochemistry, *Chem Listy*, 98 (2004) 123-130.
- [103] I. Agilent Technologies, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, A Primer*, Agilent Technologies, DE, USA, 2005.
- [104] J.R. Dean, *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., USA, Northumbria University, Newcastle, UK, 2005.
- [105] Z. He, *Capillary Electrophoresis: Fundamentals, Techniques and Applications*, Nova Science Publishers, USA, Hauppauge, NY, USA, 2012.

- [106] F.K. Liu, Extremely highly efficient on-line concentration and separation of gold nanoparticles using the reversed electrode polarity stacking mode and surfactant-modified capillary electrophoresis, *Anal Chim Acta*, 694 (2011) 167-173.
- [107] F.K. Liu, Monitoring the On-line Concentration and Separation of Gold Nanoparticles Using the Reversed Electrode Polarity Stacking Mode and Micellar Electrokinetic Chromatography, *Anal Sci*, 26 (2010) 1145-1150.
- [108] C.H. Lin, T. Kaneta, On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules, *Electrophoresis*, 25 (2004) 4058-4073.
- [109] K.H. Lin, T.C. Chu, F.K. Liu, On-line enhancement and separation of nanoparticles using capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1161 (2007) 314-321.
- [110] Z.Y. Liu, P. Sam, S.R. Sirimanne, P.C. McClure, J. Grainger, D.G. Patterson, Field-Amplified Sample Stacking in Micellar Electrokinetic Chromatography for on-Column Sample Concentration of Neutral Molecules, *J Chromatogr A*, 673 (1994) 125-132.
- [111] J.P. Quirino, S. Terabe, On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography .1. Normal stacking mode, *J Chromatogr A*, 781 (1997) 119-128.
- [112] J.P. Quirino, S. Terabe, On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography - II. Reversed electrode polarity stacking mode, *J Chromatogr A*, 791 (1997) 255-267.
- [113] C. Cacho, Z. Markova, J. Sevcik, R. Zboril, J. Petr, Study of behavior of carboxylic magnetite core shell nanoparticles on a pH boundary, *J Chromatogr A*, 1364 (2014) 59-63.
- [114] K.R. Riley, H.E. Hadri, J. Tan, V.A. Hackley, W.A. MacCrehan, Improved detection and separation of gold nanomaterials using capillary transient isotachopheresis, in, 2017.
- [115] F. Kitagawa, K. Otsuka, Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1335 (2014) 43-60.
- [116] M.C. Breadmore, R.M. Tubaon, A.I. Shallan, S.C. Phung, A.S.A. Keyon, D. Gstoettenmayr, P. Prapatpong, A.A. Alhusban, L. Ranjbar, H.H. See, M. Dawod, J.P. Quirino, Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2012-2014), *Electrophoresis*, 36 (2015) 36-61.
- [117] R.L. Chien, D.S. Burgi, Field Amplified Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis, *J Chromatogr*, 559 (1991) 141-152.
- [118] R.L. Chien, D.S. Burgi, Field-Amplified Polarity-Switching Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis, *J Chromatogr*, 559 (1991) 153-161.
- [119] D.S. Burgi, R.L. Chien, Optimization in Sample Stacking for High-Performance Capillary Electrophoresis, *Anal Chem*, 63 (1991) 2042-2047.
- [120] R.L. Chien, D.S. Burgi, Sample Stacking of an Extremely Large Injection Volume in High-Performance Capillary Electrophoresis, *Anal Chem*, 64 (1992) 1046-1050.
- [121] D.S. Burgi, Large-Volume Stacking of Anions in Capillary Electrophoresis Using an Electroosmotic Flow Modifier as a Pump, *Anal Chem*, 65 (1993) 3726-3729.
- [122] J. Palmer, D.S. Burgi, N.J. Munro, J.P. Landers, Electrokinetic injection for stacking neutral analytes in capillary and microchip electrophoresis, *Anal Chem*, 73 (2001) 725-731.
- [123] J. Palmer, D.S. Burgi, J.P. Landers, Electrokinetic stacking injection of neutral analytes under continuous conductivity conditions, *Anal Chem*, 74 (2002) 632-638.

- [124] J.P. Quirino, S. Terabe, Approaching a million-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: Cation-selective exhaustive injection and sweeping, *Anal Chem*, 72 (2000) 1023-1030.
- [125] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gas, High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: Electrokinetic supercharging, *Electrophoresis*, 24 (2003) 498-504.
- [126] J. Horakova, J. Petr, V. Maier, E. Tesarova, L. Veis, D.W. Armstrong, B. Gas, J. Sevcik, On-line preconcentration of weak electrolytes by electrokinetic accumulation in CE: Experiment and simulation, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1540-1547.
- [127] H.K. Jones, N.E. Ballou, Separations of Chemically Different Particles by Capillary Electrophoresis, *Anal Chem*, 62 (1990) 2484-2490.
- [128] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Huhn, C. Carrillo-Carrion, D.J. de Aberasturi, V. Merk, S. Barcikowski, W.J. Parak, Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles, *J R Soc Interface*, 11 (2014).
- [129] S.P. Radko, A. Chrambach, Separation and characterization of sub- $\mu$ m- and  $\mu$ m-sized particles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1957-1972.
- [130] T. Cosgrove, *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., USA, School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, UK, 2010.
- [131] F. Booth, The Cataphoresis of Spherical, Solid Non-Conducting Particles in a Symmetrical Electrolyte, *Proc R Soc Lon Ser-A*, 203 (1950) 514-533.
- [132] D.C. Henry, The Cataphoresis of Suspended Particles. Part I. The Equation of Cataphoresis, *Proc R Soc Lon Ser-A*, 133 (1931) 106-129.
- [133] H. Ohshima, Electrophoretic Mobility of Soft Particles, *J Colloid Interf Sci*, 163 (1994) 474-483.
- [134] M. Girardot, F. d'Orlye, A. Varenne, Electrokinetic characterization of superparamagnetic nanoparticle-aptamer conjugates: design of new highly specific probes for miniaturized molecular diagnostics, *Anal Bioanal Chem*, 406 (2014) 1089-1098.
- [135] U. Pyell, CE characterization of semiconductor nanocrystals encapsulated with amorphous silicon dioxide, *Electrophoresis*, 29 (2008) 576-589.
- [136] H. Ohshima, Approximate analytic expression for the electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle, *J Colloid Interf Sci*, 239 (2001) 587-590.
- [137] N.G. Vanifatova, B.Y. Spivakov, J. Mattusch, R. Wennrich, Size separation of silica nanospheres by means of capillary zone electrophoresis, *Talanta*, 59 (2003) 345-353.
- [138] F.K. Liu, M.H. Tsai, Y.C. Hsu, T.C. Chu, Analytical separation of Au/Ag core/shell nanoparticles by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1133 (2006) 340-346.
- [139] F. d'Orlye, A. Varenne, P. Gareil, Size-based characterization of nanometric cationic maghemite particles using capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 29 (2008) 3768-3778.
- [140] K.M. Weerakoon-Ratnayake, F.I. Uba, N.J. Oliver-Calixte, S.A. Soper, Electrophoretic Separation of Single Particles Using Nanoscale Thermoplastic Columns, *Anal Chem*, 88 (2016) 3569-3577.
- [141] X.T. Song, L. Li, H.F. Chan, N.H. Fang, J.C. Ren, Highly efficient size separation of CdTe quantum dots by capillary gel electrophoresis using polymer solution as sieving medium, *Electrophoresis*, 27 (2006) 1341-1346.

- [142] Y.Q. Li, H.Q. Wang, J.H. Wang, L.Y. Guan, B.F. Liu, Y.D. Zhao, H. Chen, A highly efficient capillary electrophoresis-based method for size determination of water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots, *Anal Chim Acta*, 647 (2009) 219-225.
- [143] C. Adelantado, N. Rodriguez-Farinas, R.C.R. Martin-Doimeadios, M. Zougagh, A. Rios, Analysis of silica nanoparticles by capillary electrophoresis coupled to an evaporative light scattering detector, *Anal Chim Acta*, 923 (2016) 82-88.
- [144] R. Ciriello, P.T. Iallorezi, A. Laurita, A. Guerrieri, Improved separation and size characterization of gold nanoparticles through a novel capillary zone electrophoresis method using poly(sodium4-styrenesulfonate) as stabiliser and a stepwise field strength gradient, *Electrophoresis*, 38 (2017) 922-929.
- [145] L. Josefsson, M.K. Larsson, A. Bjallmark, A. Emmer, Analysis of polyvinyl alcohol microbubbles in human blood plasma using capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, 39 (2016) 1551-1558.
- [146] F. Oukacine, A. Morel, I. Desvignes, H. Cottet, Size-based characterization of nanoparticle mixtures by the inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *J Chromatogr A*, 1426 (2015) 220-225.
- [147] F. d'Orlye, A. Varenne, P. Gareil, Determination of nanoparticle diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis using a capillary electrophoresis instrument, *J Chromatogr A*, 1204 (2008) 226-232.
- [148] J. Chamieh, L. Leclercq, M. Martin, S. Slaoui, H. Jensen, J. Ostergaard, H. Cottet, Limits in Size of Taylor Dispersion Analysis: Representation of the Different Hydrodynamic Regimes and Application to the Size-Characterization of Cubosomes, *Anal Chem*, 89 (2017) 13487-13493.
- [149] L. Cipelletti, J.P. Biron, M. Martin, H. Cottet, Polydispersity Analysis of Taylor Dispersion Data: The Cumulant Method, *Anal Chem*, 86 (2014) 6471-6478.
- [150] J. Petr, Rapid determination of the critical micelle concentration by Taylor dispersion analysis in capillaries using both direct and indirect detection, *J Sep Sci*, 40 (2017) 1421-1426.
- [151] A. Fichtner, A. Jalil, U. Pyell, Determination of the Exact Particle Radius Distribution for Silica Nanoparticles via Capillary Electrophoresis and Modeling the Electrophoretic Mobility with a Modified Analytic Approximation, *Langmuir*, 33 (2017) 2325-2339.
- [152] F. d'Orlye, A. Varenne, T. Georgelin, J.M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, P. Gareil, Charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell particles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2572-2582.
- [153] Q. Hu, M.C. Paau, Y. Zhang, W. Chan, X.J. Gong, L. Zhang, M.M.F. Choi, Capillary electrophoretic study of amine/carboxylic acid-functionalized carbon nanodots, *J Chromatogr A*, 1304 (2013) 234-240.
- [154] K.R. Riley, S. Liu, G. Yu, K. Libby, R. Cubicciotti, C.L. Colyer, Using capillary electrophoresis to characterize polymeric particles, *J Chromatogr A*, 1463 (2016) 169-175.
- [155] J. Horska, J. Sevcik, J. Petr, Determination of citrate released from stabilized gold nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Chem Pap*, 72 (2018) 419-424.
- [156] G. Ramirez-Garcia, F. d'Orlye, S. Gutierrez-Granados, M. Martinez-Alfaro, N. Mignet, C. Richard, A. Varenne, Functionalization and characterization of persistent luminescence nanoparticles by dynamic light scattering, laser Doppler and capillary electrophoresis, *Colloid Surface B*, 136 (2015) 272-281.

- [157] G. Ramirez-Garcia, D.O. Oluwole, S.R. Nxele, F. d'Orlye, T. Nyokong, F. Bedioui, A. Varenne, Characterization of phthalocyanine functionalized quantum dots by dynamic light scattering, laser Doppler, and capillary electrophoresis, *Anal Bioanal Chem*, 409 (2017) 1707-1715.
- [158] D. Mozhayeva, C. Engelhard, Separation of Silver Nanoparticles with Different Coatings by Capillary Electrophoresis Coupled to ICP-MS in Single Particle Mode, *Anal Chem*, 89 (2017) 9767-9774.
- [159] D. Mozhayeva, I. Streng, C. Engelhard, Implementation of Online Preconcentration and Microsecond Time Resolution to Capillary Electrophoresis Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (CE-SP-ICP-MS) and Its Application in Silver Nanoparticle Analysis, *Anal Chem*, 89 (2017) 7152-7159.
- [160] F. Laborda, E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis, *Anal Chem*, 86 (2014) 2270-2278.
- [161] M.D. Montano, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal Bioanal Chem*, 408 (2016) 5053-5074.
- [162] A. Pallotta, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control, *J Chromatogr A*, 1461 (2016) 179-184.
- [163] A. Tekrony, D. Cramb, Determination of the mobility of amine- and carboxy-terminated fluospheres and quantum dots by capillary electrophoresis, *Can J Chem*, 94 (2016) 430-435.
- [164] S. Deguchi, T. Yamazaki, S. Mukai, R. Usami, K. Horikoshi, Stabilization of C-60 nanoparticles by protein adsorption and its implications for toxicity studies, *Chem Res Toxicol*, 20 (2007) 854-858.
- [165] B. Samanta, H. Yan, N.O. Fischer, J. Shi, D.J. Jerry, V.M. Rotello, Protein-passivated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy, *J Mater Chem*, 18 (2008) 1204-1208.
- [166] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K.A. Dawson, The nanoparticle - protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century, *Adv Colloid Interfac*, 134-35 (2007) 167-174.
- [167] P. Aggarwal, J.B. Hall, C.B. McLeland, M.A. Dobrovolskaia, S.E. McNeil, Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Adv Drug Deliver Rev*, 61 (2009) 428-437.
- [168] D.M. Zhang, O. Neumann, H. Wang, V.M. Yuwono, A. Barhoumi, M. Perham, J.D. Hartgerink, P. Wittung-Stafshede, N.J. Halas, Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-based Aggregates at Physiological pH, *Nano Lett*, 9 (2009) 666-671.
- [169] C.C. You, M. De, G. Han, V.M. Rotello, Tunable inhibition and denaturation of alpha-chymotrypsin with amino acid-functionalized gold nanoparticles, *J Am Chem Soc*, 127 (2005) 12873-12881.
- [170] H. Bayraktar, P.S. Ghosh, V.M. Rotello, M.J. Knapp, Disruption of protein-protein interactions using nanoparticles: inhibition of cytochrome c peroxidase, *Chem Commun*, (2006) 1390-1392.
- [171] J.J.N. Segoviano-Garfias, G. Mendoza-Diaz, R. Moreno-Esparza, Spectrophotometric determination of the formation constants of the cupric halogen complexes with 1,3-

- propanediamine and 1,4-butanediamine in methanol solution and their activity on the oxidative coupling of the 2,6-di-tert-butylphenol, *Inorg Chim Acta*, 400 (2013) 184-190.
- [172] S.H.D. Lacerda, J.J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M.L. Becker, A. Karim, J.F. Douglas, Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins, *Acs Nano*, 4 (2010) 365-379.
- [173] Z. Chen, S.G. Weber, Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods, *Trac-Trend Anal Chem*, 27 (2008) 738-748.
- [174] Y.I. Tarasevich, L.I. Monakhova, Interaction between globular proteins and silica surfaces, *Colloid J+*, 64 (2002) 482-487.
- [175] M.P. Williamson, Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding, *Prog Nucl Mag Res Sp*, 73 (2013) 1-16.
- [176] M. Lundqvist, I. Sethson, B.H. Jonsson, Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability, *Langmuir*, 20 (2004) 10639-10647.
- [177] K.W. Vanstraelen, J.; De Loor, J.; Vercammen, I.; Annaert, P.; Lagrou, K.; Spriet, I., Protein-binding characteristics of voriconazole determined by high-throughput equilibrium dialysis, *J Pharm Sci*, 103 (2014) 2565-2570.
- [178] M. De, C.C. You, S. Srivastava, V.M. Rotello, Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: A thermodynamic study, *J Am Chem Soc*, 129 (2007) 10747-10753.
- [179] M. Erk, B. Raspor, Anodic stripping voltammetry in the complexation study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I and cadmium: application in determination of the complexing capacity and stability constant, *J Electroanal Chem*, 502 (2001) 174-179.
- [180] F. Krause, Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes, *Electrophoresis*, 27 (2006) 2759-2781.
- [181] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *P Natl Acad Sci USA*, 104 (2007) 2050-2055.
- [182] G. Doyle, B. Ashall, M. Galvin, M. Berndt, S. Crosbie, D. Zerulla, Mie scattering and surface plasmon based spectroscopy for the detection of nanoparticle-protein interactions, *Appl Phys a-Mater*, 89 (2007) 351-355.
- [183] D.T. Kim, H.W. Blanch, C.J. Radke, Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy, *Langmuir*, 18 (2002) 5841-5850.
- [184] D.J. Winzor, Determination of binding constants by analogous procedures in size exclusion chromatography and capillary electrophoresis, *Anal Biochem*, 383 (2008) 1-17.
- [185] P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J Pharmaceut Biomed*, 101 (2014) 238-250.
- [186] M. Matczuk, J. Legat, S.N. Shtykov, M. Jarosz, A.R. Timerbaev, Characterization of the protein corona of gold nanoparticles by an advanced treatment of CE-ICP-MS data, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2257-2259.
- [187] M.Č. Růžicka, M.; Jirásek, M.; Teplý, F.; Koval, D.; Kašička, V., Study of deoxyribonucleic acid-ligand interactions by partial filling affinity capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1349 (2014) 116-121.

- [188] J. Legat, M. Matczuk, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, Cellular processing of gold nanoparticles: CE-ICP-MS evidence for the speciation changes in human cytosol, *Anal Bioanal Chem*, 410 (2018) 1151-1156.
- [189] J.H. Wang, J. Fan, L. Liu, S.M. Ding, X.Q. Liu, J.P. Wang, L.Q. Gao, S. Chattopadhyaya, P. Miao, J. Xia, L. Qiu, P.J. Jiang, Developing a capillary electrophoresis based method for dynamically monitoring enzyme cleavage activity using quantum dots-peptide assembly, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2530-2535.
- [190] F.F. Liu, J.H. Wang, L. Yang, L. Liu, S.M. Ding, M.L. Fu, L.H. Deng, L.Q. Gao, Developing a fluorescence-coupled capillary electrophoresis based method to probe interactions between QDs and colorectal cancer targeting peptides, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2170-2174.
- [191] D.A. Grela, V. Zannoni, N.M. Vizioli, Studying the interaction between peptides and polymeric nanoparticles used as pseudostationary phase in capillary electrochromatography, *Microchem J*, 130 (2017) 153-156.
- [192] M. Matczuk, J. Legat, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, A sensitive and versatile method for characterization of protein-mediated transformations of quantum dots, *Analyst*, 141 (2016) 2574-2580.
- [193] J.H. Wang, C.C. Zhang, L. Liu, K.A. Kalesh, L. Qiu, S.M. Ding, M.L. Fu, L.Q. Gao, P.J. Jiang, A capillary electrophoresis method to explore the self-assembly of a novel polypeptide ligand with quantum dots, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2156-2162.
- [194] J. Legat, M. Matczuk, A. Timerbaev, M. Jarosz, CE Separation and ICP-MS Detection of Gold Nanoparticles and Their Protein Conjugates, *Chromatographia*, 80 (2017) 1695-1700.
- [195] G. Ramirez-Garcia, F. d'Orlye, S. Gutierrez-Granados, M. Martinez-Alfaro, N. Mignet, C. Richard, A. Varenne, Electrokinetic Hummel-Dreyer characterization of nanoparticle-plasma protein corona: The non-specific interactions between PEG-modified persistent luminescence nanoparticles and albumin, *Colloid Surface B*, 159 (2017) 437-444.
- [196] M. Matczuk, J. Legat, F. Scaletti, L. Messori, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, The fate of differently functionalized gold nanorods in human serum: A response from capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1499 (2017) 222-225.
- [197] J.P. Simeunovic, J. Pekarkova, J. Zak, I. Chamradova, J. Hubalek, Studying of quantum dot luminescence quenching effect caused by covalent conjugation with protein, *Monatsh Chem*, 148 (2017) 1901-1909.
- [198] K.R. Riley, C.M. Sims, I.T. Wood, D.J. Vanderah, M.L. Walker, Short-chained oligo(ethylene oxide)-functionalized gold nanoparticles: realization of significant protein resistance, *Anal Bioanal Chem*, 410 (2018) 145-154.
- [199] Z. Liu, P. Li, W.W. Bian, J.K. Yu, J.H. Zhan, Revealing the role of oxidation state in interaction between nitro/amino-derived particulate matter and blood proteins, *Sci Rep-Uk*, 6 (2016).
- [200] J. Huhn, C. Fedeli, Q. Zhang, A. Masood, P. del Pino, N.M. Khashab, E. Papini, W.J. Parak, Dissociation coefficients of protein adsorption to nanoparticles as quantitative metrics for description of the protein corona: A comparison of experimental techniques and methodological relevance, *Int J Biochem Cell B*, 75 (2016) 148-161.
- [201] J.H. Wang, J.C. Li, J.P. Wang, C.L. Wang, T.W. Teng, Y. Chen, J.P. Li, B.Y. Dong, L. Qiu, P. Jiang, Online probing quantum dots and engineered enzyme self-assembly in a nanoliter scale, *Electrophoresis*, 37 (2016) 438-443.



- [202] D.M. Liu, J. Chen, Y.P. Shi, alpha-Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening, *Int J Biol Macromol*, 105 (2017) 308-316.
- [203] D.M. Liu, J. Chen, Y.P. Shi, Screening of enzyme inhibitors from traditional Chinese medicine by magnetic immobilized a-glucosidase coupled with capillary electrophoresis, *Talanta*, 164 (2017) 548-555.
- [204] S.T. Li, M. Shi, J.J. Zhao, L.L. Zhang, Y. Huang, S.L. Zhao, A highly sensitive capillary electrophoresis immunoassay strategy based on dual-labeled gold nanoparticles enhancing chemiluminescence for the detection of prostate-specific antigen, *Electrophoresis*, 38 (2017) 1780-1787.
- [205] Y.Y. Wu, V.T. Remcho, A capillary electrophoretic method for separation and characterization of carbon dots and carbon dot-antibody bioconjugates, *Talanta*, 161 (2016) 854-859.
- [206] C.H. Salamanca, D.F. Castillo, J.D. Villada, G.R. Rivera, Physicochemical characterization of in situ drug-polymer nanocomplex formed between zwitterionic drug and ionomeric material in aqueous solution, *Mat Sci Eng C-Mater*, 72 (2017) 405-414.
- [207] G. Musile, L. Cenci, E. Andreetto, E. Ambrosi, F. Tagliaro, A.M. Bossi, Screening of the binding properties of molecularly imprinted nanoparticles via capillary electrophoresis, *Anal Bioanal Chem*, 408 (2016) 3435-3443.
- [208] E.F. Romano, J.P. Quirino, J.L. Holdsworth, R.C. So, C.I. Holdsworth, Assessment of the binding performance of histamine-imprinted microspheres by frontal analysis capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 38 (2017) 1251-1259.
- [209] W. Maruszak, E.U. Stolarczyk, K. Stolarczyk, CE method for the in-process control of the synthesis of active substances conjugated with gold nanoparticles, *J Pharmaceut Biomed*, 141 (2017) 52-58.
- [210] S.S. Beloborodov, V.G. Panferov, I.V. Safenkova, S.M. Krylova, B.B. Dzantiev, S.N. Krylov, Unexpected Electrophoretic Behavior of Complexes between Rod-like Virions and Bivalent Antibodies, *Anal Chem*, 88 (2016) 11908-11912.
- [211] S.S. Aleksenko, A.Y. Shmykov, S. Oszwaldowski, A.R. Timerbaev, Interactions of tumour-targeting nanoparticles with proteins: potential of using capillary electrophoresis as a direct probe, *Metallomics*, 4 (2012) 1141-1148.
- [212] S.S. Aleksenko, M. Matczuk, A.R. Timerbaev, Characterization of interactions of metal-containing nanoparticles with biomolecules by CE: An update (2012-2016), *Electrophoresis*, 38 (2017) 1661-1668.
- [213] J.E. Sonke, V.J.M. Salters, Capillary electrophoresis-high resolution sector field inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1159 (2007) 63-74.
- [214] U. Pyell, W. Bucking, C. Huhn, B. Herrmann, A. Merkoulou, J. Mannhardt, H. Jungclas, T. Nann, Calibration-free concentration determination of charged colloidal nanoparticles and determination of effective charges by capillary isotachopheresis, *Anal Bioanal Chem*, 395 (2009) 1681-1691.
- [215] U. Pyell, A.H. Jalil, C. Pfeiffer, B. Pelaz, W.J. Parak, Characterization of gold nanoparticles with different hydrophilic coatings via capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis. Part I: Determination of the zeta potential employing a modified analytic approximation, *J Colloid Interf Sci*, 450 (2015) 288-300.
- [216] U. Pyell, A.H. Jalil, D.A. Urban, C. Pfeiffer, B. Pelaz, W.J. Parak, Characterization of hydrophilic coated gold nanoparticles via capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis. Part II: Determination of the hydrodynamic radius distribution - Comparison with asymmetric flow field-flow fractionation, *J Colloid Interf Sci*, 457 (2015) 131-140.

- [217] H. Ohshima, Electrokinetic phenomena in a concentrated suspension of soft particles, *Colloid Surface A*, 195 (2001) 129-134.
- [218] P.P. Gopmandal, H. Ohshima, Importance of pH-regulated charge density on the electrophoresis of soft particles, *Chem Phys*, 483 (2017) 165-171.
- [219] F.K. Liu, G.T. Wei, Adding sodium dodecylsulfate to the running electrolyte enhances the separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis, *Anal Chim Acta*, 510 (2004) 77-83.
- [220] F.K. Liu, F.H. Ko, P.W. Huang, C.H. Wu, T.C. Chu, Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1062 (2005) 139-145.
- [221] N. Vanifatova, A. Rudnev, B. Spivakov, A new approach to the studies of submicron particle suspensions based on the effect of pressure in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 34 (2013) 2145-2151.
- [222] N.G. Vanifatova, B.Y. Spivakov, J. Mattusch, U. Franck, R. Wennrich, Investigation of iron oxide nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Talanta*, 66 (2005) 605-610.
- [223] J.S. Baker, L.A. Colon, Influence of buffer composition on the capillary electrophoretic separation of carbon nanoparticles, *J Chromatogr A*, 1216 (2009) 9048-9054.
- [224] C. Nilsson, S. Birnbaum, S. Nilsson, Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography, *J Chromatogr A*, 1168 (2007) 212-224.
- [225] A.H. Duan, S.M. Xie, L.M. Yuan, Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations, *Trac-Trend Anal Chem*, 30 (2011) 484-491.
- [226] Y.J. Huang, G.R. Wang, K.P. Huang, Y.F. Hsieh, C.Y. Liu, Functionalized carbon nanotubes as the pseudostationary phase for capillary EKC separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Electrophoresis*, 30 (2009) 3964-3970.
- [227] W. Cao, S.S. Hu, X.Z. Ying, L.H. Ye, J. Cao, Surfactant-coated graphitized multiwalled carbon nanotubes as the pseudostationary phase in electrokinetic chromatography for the analysis of phytochemical compounds in biological fluids, *Electrophoresis*, 36 (2015) 1055-1063.
- [228] J.M. Jimenez-Soto, Y. Moliner-Martinez, S. Cardenas, M. Valcarcel, Evaluation of the performance of singlewalled carbon nanohorns in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 31 (2010) 1681-1688.
- [229] B. Suarez, B.M. Simonet, S. Cardenas, M. Valcarcel, Surfactant-coated single-walled carbon nanotubes as a novel pseudostationary phase in capillary EKC, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1714-1722.
- [230] Y. Moliner-Martinez, S. Cardenas, A. Valcarcel, Surfactant coated fullerenes C-60 as pseudostationary phase in electrokinetic chromatography, *J Chromatogr A*, 1167 (2007) 210-216.
- [231] Y. Moliner-Martinez, M. Barrios, S. Cardenas, M. Valcarcel, Comparative study of carbon nanotubes and C-60 fullerenes as pseudo stationary phases in electrokinetic chromatography, *J Chromatogr A*, 1194 (2008) 128-133.
- [232] Y.M. Sun, Q. Bi, X.L. Zhang, L.T. Wang, X. Zhang, S.Q. Dong, L. Zhao, Graphene quantum dots as additives in capillary electrophoresis for separation cinnamic acid and its derivatives, *Anal Biochem*, 500 (2016) 38-44.
- [233] C.J. Yu, C.L. Su, W.L. Tseng, Separation of acidic and basic proteins by nanoparticle-filled capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 78 (2006) 8004-8010.
- [234] B. Neiman, E. Grushka, J. Gun, O. Lev, Organically modified silica sol-mediated capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 74 (2002) 3484-3491.

- [235] W.D. Qin, Silica nanoparticles as pseudostationary phase for protein separation, *Electrophoresis*, 28 (2007) 3017-3023.
- [236] S.S. Zhou, Y.Q. Wang, T. De Beer, W.R.G. Baeyens, G.T. Fei, M. Dilinuer, J. Ouyang, Simultaneous separation of eight beta-adrenergic drugs using titanium dioxide nanoparticles as additive in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 29 (2008) 2321-2329.
- [237] J.R. McGettrick, N.H. Williamson, A.T. Sutton, C.P. Palmer, Performance and selectivity of cationic nanoparticle pseudo-stationary phases in electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, 38 (2017) 730-737.
- [238] Y. Liu, J. Hu, Y. Li, Y.T. Shang, J.Q. Wang, Y. Zhang, Z.L. Wang, Microwave assisted synthesis of metal-organic framework MIL-101 nanocrystals as sorbent and pseudostationary phase in capillary electrophoresis for the separation of anthraquinones in environmental water samples, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2521-2529.
- [239] B. Neiman, E. Grushka, O. Lev, Use of gold nanoparticles to enhance capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 73 (2001) 5220-5227.
- [240] M. Pumera, J. Wang, E. Grushka, R. Polsky, Gold nanoparticle-enhanced microchip capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 73 (2001) 5625-5628.
- [241] J.H.T. Luong, P. Bouvrette, Y.L. Liu, D.Q. Yang, E. Sacher, Electrophoretic separation of aniline derivatives using fused silica capillaries coated with acid treated single-walled carbon nanotubes, *J Chromatogr A*, 1074 (2005) 187-194.
- [242] A.M. Al-Hossaini, L. Suntornsuk, S.M. Lunte, Separation of dynorphin peptides by capillary electrochromatography using a polydiallyldimethylammonium chloride gold nanoparticle-modified capillary, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2297-2304.
- [243] T. O'Mahony, V.P. Owens, J.P. Murrphy, E. Guihen, J.D. Holmes, J.D. Glennon, Alkylthiol gold nanoparticles in open-tubular capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*, 1004 (2003) 181-193.
- [244] L. Sombra, Y. Moliner-Martinez, S. Cardenas, M. Valcarcel, Carboxylic multi-walled carbon nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 29 (2008) 3850-3857.
- [245] P.W. Stage, L.L. Sombra, G. Messina, L.D. Martinez, M.F. Silya, Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2242-2248.
- [246] Q.S. Qu, D.P. Liu, D. Mangelings, C. Yang, X.Y. Hu, Permanent gold nanoparticle coatings on polyelectrolyte multilayer modified capillaries for open-tubular capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*, 1217 (2010) 6588-6594.
- [247] F.K. Liu, Y.T. Hsu, C.H. Wu, Open tubular capillary electrochromatography using capillaries coated with films of alkanethiol-self-assembled gold nanoparticle layers, *J Chromatogr A*, 1083 (2005) 205-214.
- [248] Z.R. Liu, Y.X. Du, Z.J. Feng, Enantioseparation of drugs by capillary electrochromatography using a stationary phase covalently modified with graphene oxide, *Microchim Acta*, 184 (2017) 583-593.
- [249] Y.Q. Lv, F.M. Alejandro, J.M.J. Frechet, F. Svec, Preparation of porous polymer monoliths featuring enhanced surface coverage with gold nanoparticles, *J Chromatogr A*, 1261 (2012) 121-128.
- [250] Y. Zhang, Y. Zhang, W.J. Chen, Y.T. Zhang, L.Q. Zhu, P.G. He, Q.J. Wang, Enantiomeric separation of tryptophan by open-tubular microchip capillary

- electrophoresis using polydopamine/gold nanoparticles conjugated DNA as stationary phase, *Anal Methods-Uk*, 9 (2017) 3561-3568.
- [251] Y.Y. Liu, Q. Liu, H.Y. Yu, S.J. Sun, Y. Xue, Y. Wang, Q.S. Qu, C. Yan, Polymer-modified fibrous mesoporous silica nanoparticles as coating material for open-tubular capillary electrochromatography, *J Chromatogr A*, 1499 (2017) 196-202.
- [252] W.W. Hu, T.T. Hong, X. Gao, Y.B. Ji, Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography, *Trac-Trend Anal Chem*, 61 (2014) 29-39.
- [253] F.M. Tarongoy, P.R. Haddad, J.P. Quirino, Recent developments in open tubular capillary electrochromatography from 2016 to 2017, *Electrophoresis*, 39 (2018) 34-52.
- [254] E. Guihen, Recent highlights in electro-driven separations- selected applications of alkylthiol gold nanoparticles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2184-2192.
- [255] M.A. Gonzalez-Curbelo, D.A. Varela-Martinez, B. Socas-Rodriguez, J. Hernandez-Borges, Recent applications of nanomaterials in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2431-2446.
- [256] C. Pak, P.J. Marriott, P.D. Carpenter, R.G. Amiet, Enantiomeric separation of propranolol and selected metabolites by using capillary electrophoresis with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as chiral selector, *J Chromatogr A*, 793 (1998) 357-364.
- [257] N. Na, Y.P. Hu, O.Y. Jin, W.R.G. Baeyens, J.R. Delanghe, Y.E.C. Taes, M.X. Xie, H.Y. Chen, Y.P. Yang, On the use of dispersed nanoparticles modified with single layer beta-cyclodextrin as chiral selector to enhance enantioseparation of clenbuterol with capillary electrophoresis, *Talanta*, 69 (2006) 866-872.
- [258] Y. Moliner-Martinez, S. Cardenas, M. Valcarcel, Evaluation of carbon nanostructures as chiral selectors for direct enantiomeric separation of ephedrine by EKC, *Electrophoresis*, 28 (2007) 2573-2579.
- [259] L. Huang, Y.T. Chen, Y.X. Li, L.S. Yu, Application of Chiral Ionic Liquid-Modified Gold Nanoparticles in the Chiral Recognition of Amino Acid Enantiomers, *Appl Spectrosc*, 70 (2016) 1649-1654.
- [260] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting, *Anal Chem*, 69 (1997) 1179-1183.
- [261] F. Priego-Capote, L. Ye, S. Shakil, S.A. Shamsi, S. Nilsson, Monoclonal Behavior of molecularly imprinted polymer nanoparticles in capillary electrochromatography, *Anal Chem*, 80 (2008) 2881-2887.
- [262] L.L. Wu, R.P. Liang, J. Chen, J.D. Qiu, Separation of chiral compounds using magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles as stationary phase by microchip capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 39 (2018) 356-362.
- [263] M. Contin, P. Bonelli, S. Lucangioli, A. Cukierman, V. Tripodi, Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer nanoparticles for coenzyme Q10 dispersive micro solid phase extraction, *J Chromatogr A*, 1456 (2016) 1-9.
- [264] C. Ruiz-Palomero, M.L. Soriano, M. Valcarcel, Sulfonated nanocellulose for the efficient dispersive micro solid-phase extraction and determination of silver nanoparticles in food products, *J Chromatogr A*, 1428 (2016) 352-358.
- [265] F.K. Liu, Preconcentration and separation of neutral steroid analytes using a combination of sweeping micellar electrokinetic chromatography and a Au nanoparticle-coated solid phase extraction sorbent, *J Chromatogr A*, 1215 (2008) 194-202.

- [266] F.K. Liu, Y.C. Chang, Using Thiol-Capped Gold Nanoparticles in the Background Solution of MEKC to Concentrate and Separate Neutral Steroids, *Chromatographia*, 72 (2010) 1129-1135.
- [267] V.I. Furdui, D.J. Harrison, Immunomagnetic T cell capture from blood for PCR analysis using microfluidic systems, *Lab Chip*, 4 (2004) 614-618.
- [268] Z.H. Fan, S. Mangru, R. Granzow, P. Heaney, W. Ho, Q.P. Dong, R. Kumar, Dynamic DNA hybridization on a chip using paramagnetic beads, *Anal Chem*, 71 (1999) 4851-4859.
- [269] Y.H. Kim, G.Y. Kim, H.B. Lim, Micro Pre-concentration and Separation of Metal Ions Using Microchip Column Packed with Magnetic Particles Immobilized by Aminobenzyl Ethylenediaminetetraacetic Acid, *B Kor Chem Soc*, 31 (2010) 905-909.
- [270] Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J Phys D Appl Phys*, 36 (2003) R167-R181.
- [271] M.A.M. Gijs, Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications, *Microfluid Nanofluid*, 1 (2004) 22-40.
- [272] N. Pamme, Magnetism and microfluidics, *Lab Chip*, 6 (2006) 24-38.
- [273] Y. Okamoto, F. Kitagawa, K. Otsuka, Online concentration and affinity separation of biomolecules using multifunctional particles in capillary electrophoresis under magnetic field, *Anal Chem*, 79 (2007) 3041-3047.
- [274] F. Kitagawa, A. Matsuo, K. Sueyoshi, K. Otsuka, Sensitivity Enhancement by Sweeping via Solid Phase Extraction Using Titania Nanoparticles in Capillary Electrophoretic Analysis of Phosphopeptides, *Chromatography*, 38 (2017) 39-43.
- [275] W.J. Jiang, X. Jin, X.H. Yu, W.H. Wu, L.J. Xu, F.F. Fu, Ion-imprinted magnetic nanoparticles for specific separation and concentration of ultra-trace methyl mercury from aqueous sample, *J Chromatogr A*, 1496 (2017) 167-173.
- [276] H.S. Wang, P.T. Lin, S.L. Zhao, S.T. Li, X. Lu, H. Liang, Preparation of Magnetic Microsphere-Gold Nanoparticle-Immobilized Enzyme Batch Reactor and Its Application to Enzyme Inhibitor Screening in Natural Extracts by Capillary Electrophoresis, *Chinese J Chem*, 35 (2017) 943-948.
- [277] D.M. Liu, J. Chen, Y.P. Shi, Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability, *Anal Chim Acta*, 1006 (2018) 90-98.
- [278] V. Adam, M. Vaculovicova, Nanomaterials for sample pretreatment prior to capillary electrophoretic analysis, *Analyst*, 142 (2017) 849-857.
- [279] Z.X. Zhang, C.Y. Zhang, W.X. Luan, X.F. Li, Y. Liu, X.L. Luo, Ultrasensitive and accelerated detection of ciguatoxin by capillary electrophoresis via on-line sandwich immunoassay with rotating magnetic field and nanoparticles signal enhancement, *Anal Chim Acta*, 888 (2015) 27-35.
- [280] S. Khan, E.M. Miguel, C.F. Souza, A.R. Silva, R.Q. Aucelioa, Thioglycolic acid-CdTe quantum dots sensing and molecularly imprinted polymer based solid phase extraction for the determination of kanamycin in milk, vaccine and stream water samples, *Sensor Actuat B-Chem*, 246 (2017) 444-454.
- [281] S. Alsudir, E.P.C. Lai, Selective detection of ZnO nanoparticles in aqueous suspension by capillary electrophoresis analysis using dithiothreitol and L-cysteine adsorbates, *Talanta*, 169 (2017) 115-122.
- [282] F.J. Lara, D. Airado-Rodriguez, D. Moreno-Gonzalez, J.F. Huertas-Perez, A.M. Garcia-Campana, Applications of capillary electrophoresis with chemiluminescence detection in clinical, environmental and food analysis. A review, *Anal Chim Acta*, 913 (2016) 22-40.

- [283] B. Yu, X. Shu, H.L. Cong, X. Chen, H.W. Liu, H. Yuan, M. Chi, Self-assembled covalent capillary coating of diazoresin/carboxyl fullerene for analysis of proteins by capillary electrophoresis and a comparison with diazoresin/graphene oxide coating, *J Chromatogr A*, 1437 (2016) 226-233.
- [284] L. Hajba, A. Guttman, Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins, *Trac-Trend Anal Chem*, 90 (2017) 38-44.
- [285] P. Ramana, E. Adams, P. Augustijns, A. Van Schepdael, Trapping magnetic nanoparticles for in-line capillary electrophoresis in a liquid based capillary coolant system, *Talanta*, 164 (2017) 148-153.
- [286] P. Ramana, W. Herman, C. Hiroux, E. Adams, P. Augustijns, A. Van Schepdael, Evaluation of immobilized hFMO3 on magnetic nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Bioanalysis*, 9 (2017) 289-296.
- [287] J. Wang, M. Zhou, R. Dong, X. Cong, R. Zhang, X. Wang, Simultaneous Determination of Peroxide Hydrogen and Ascorbic Acid by Capillary Electrophoresis with Platinum Nanoparticles Modified Micro-disk Electrode, *Electroanal*, 29 (2017) 2483-2490.
- [288] L. Garcia-Carmona, A. Martin, T. Sierra, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, Electrochemical detectors based on carbon and metallic nanostructures in capillary and microchip electrophoresis, *Electrophoresis*, 38 (2017) 80-94.
- [289] T. Ohno, T. Matsuda, H. Suzuki, M. Fujimoto, Effect of monodispersed silica nanoparticles on DNA separation by micro-capillary electrophoresis, *Adv Powder Technol*, 17 (2006) 167-179.
- [290] M.F. Huang, C.C. Huang, H.T. Chang, Improved separation of double-stranded DNA fragments by capillary electrophoresis using poly(ethylene oxide) solution containing colloids, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2896-2902.
- [291] Y. Xu, S.F.Y. Li, Carbon nanotube-enhanced separation of DNA fragments by a portable capillary electrophoresis system with contactless conductivity detection, *Electrophoresis*, 27 (2006) 4025-4028.
- [292] D. Zhou, L.P. Yang, R.M. Yang, W.H. Song, S.H. Peng, Y.M. Wang, Functionalized gold nanoparticles as additive to form polymer/metal composite matrix for improved DNA sequencing by capillary electrophoresis, *Talanta*, 80 (2009) 195-201.
- [293] A. Bakandritsos, G. Mattheolabakis, G. Chatzikyriakos, T. Szabo, V. Tzitzios, D. Kouzoudis, S. Couris, K. Avgoustakis, Doxorubicin Nanocarriers Based on Magnetic Colloids with a Bio-polyelectrolyte Corona and High Non-linear Optical Response: Synthesis, Characterization, and Properties, *Adv Funct Mater*, 21 (2011) 1465-1475.
- [294] V. Maier, J. Petr, R. Knob, J. Horakova, J. Sevcik, Electrokinetic partial filling technique as a powerful tool for enantiomeric separation of DL-lactic acid by CE with contactless conductivity detection, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1815-1822.
- [295] J.K. Lim, S.A. Majetich, R.D. Tilton, Stabilization of Superparamagnetic Iron Oxide Core-Gold Shell Nanoparticles in High Ionic Strength Media, *Langmuir*, 25 (2009) 13384-13393.
- [296] D.W. Wang, B. Tejerina, I. Lagzi, B. Kowalczyk, B.A. Grzybowski, Bridging Interactions and Selective Nanoparticle Aggregation Mediated by Monovalent Cations, *ACS Nano*, 5 (2011) 530-536.
- [297] X. Li, J.J. Lenhart, H.W. Walker, Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles, *Langmuir*, 28 (2012) 1095-1104.
- [298] J. Petr, C.X. Jiang, J. Sevcik, E. Tesarova, D.W. Armstrong, Sterility testing by CE: A comparison of online preconcentration approaches in capillaries with greater internal diameters, *Electrophoresis*, 30 (2009) 3870-3876.

- [299] B.A. Williams, C. Vigh, Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 68 (1996) 1174-1180.
- [300] Y.H. Lee, T.I. Lin, Determination of Metal Cations by Capillary Electrophoresis - Effect of Background Carrier and Complexing Agents, *J Chromatogr A*, 675 (1994) 227-236.
- [301] L.S. Cardoso, M.I. Araujo, A.M. Goes, L.G. Pacifico, R.R. Oliveira, S.C. Oliveira, Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis, *Microb Cell Fact*, 6 (2007).
- [302] D. Petsch, T.C. Beeskow, F.B. Anspach, W.D. Deckwer, Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin, *Journal of Chromatography B*, 693 (1997) 79-91.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
AD	amperometrická detekce
AF-FFF (AF4)	frakcionace tokem v asymetrickém tokovém poli
AFM	mikroskopie atomárních sil
API	aktivní farmaceutická ingredience
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilan
ASEI	elektrokinetické dávkování aniontů („anion selective exhaustive injection“)
AUC	analytická ultracentrifugace
BGE	základní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE	kapilárn elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CNT	uhlíkové nanotrubic
CRM	certifikovaný referenční materiál
CSEI	elektrokinetické dávkování kationtů („cation selective exhaustive injection“)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CTX3C	ciguatoxin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DDAB	didodecyldimethylammonium bromid
DLS	dynamický rozptyl světla



DLVO	zkratka teorie, kterou vyvinuli <u>Derjaguin</u> a <u>Landau</u> (1941) + <u>Verwey</u> a <u>Overbeek</u> (1948)
DMA	diferenční mobilní analýza
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSPE	disperzní mikroextrakce tuhou fází
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EDL	elektrická dvojrstva
EKC	elektrokinetická chromatografie
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
ETA	elektrotermická atomizace
FAA	plamenová atomová absorpce
FASI	polem zesílené dávkování vzorku („field-amplified sample injection“)
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FESI	polem zesílené dávkování vzorku („field-amplified sample injection“)
FFF	frakcionace polem
FT-IR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HEC	hydroxyethylcelulóza
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidáza
IA	imunoanalýza
ICP	indukčně vázané plazma
OES	optická emisní spektrometrie
IMERs	mikroreaktory s imobilizovanými enzymy
LBL	vrstva po vrstvě („layer-by-layer“)
LDE	laserová Dopplerova elektroforéza
LDV	laserová Dopplerova velocimetrie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MEKC (MECC)	micelární elektrokinetická chromatografie

MFMPs	multifunkční magnetické (nano)částice
MHEC	methylhydroxyethylcelulóza
MIPs	molekulárně vtištěné polymery
MNPs	magnetické nanočástice
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
MS	hmotnostní spektrometrie
MWCNTs	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
NPs	nanočástice
NTA	„nanoparticle tracking“ analýza
ORS	oktapólový reakční systém
OTCEC	„open tubular“ kolony pro kapilární elektrochromatografii
PAA	polyakrylová kyselina
PAM	polyakrylamid
PDA	detektor s diodovým polem
PDADMAC	polydiallyldimethylammonium chlorid
PDMA	poly(N,N-dimethylakrylamid)
PDMS	polydimethylsiloxan
PEG	polyethylenglykol (polyethylenoxid)
PEM	vícevrstvé pokrytí vrstvami polyelektrolytů
PEO	polyethylenoxid (polyethylenglykol)
PEOS	2-[methoxy(polyethylenoxy)propyl]trimethoxysilan
PMB	polymyxin B
PSS	polystyren sulfonát
PVA	polyvinylalkohol
PVA-MB	polyvinylalkoholové „mikrobubliny“
PVPP	polyvinylpyrolidon
RCPTM	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
REPSM	zakoncentrování s přepínáním polarit (,,reversed electrode polarity stacking mode“)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
SDS	dodecylsulfát sodný

SPE	extrakce tuhou fází
SPR	povrchová plasmonová rezonance
STM	řádkovací tunelová mikroskopie
STS	řádkovací tunelová spektroskopie
SWCNTs	jednotěnné uhlíkové nanotrubic
tCITP	přechodná kapilární izotachoforéza
TDA	Taylorova disperzní analýza
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEOS	tetraethylortosilikát
TMV	virus tabákové mozaiky
TWEEN	polyoxyethylensorbitan
UHPLC (UPLC)	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialový
Vis	viditelný
XRD	rentgenová difrakce

## 9 ŽIVOTOPIS

### OSOBNÍ ÚDAJE

---

Jméno: Daniel Baron  
Adresa: Fügnerova 50/16, 794 01 Krnov  
E-mail: BaronDaniel@email.cz

### VZDĚLÁNÍ

---

- 09/2008 – 06/2012  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.  
bakalářská práce: „Analýza a využití fluoreskujících nanočástic v kapilární elektroforéze“
- 09/2012 – 06/2014  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.  
diplomová práce: „Charakterizace nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik“
- 09/2014 – současnost  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie

### STÁŽE

---

- 04 – 06/2015  
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES, s.r.o. Získání praktických zkušeností na oddělení TSA QC.

- 03 – 06/2016

Vědecko-výzkumná stáž – Latvian Institute of Organic Synthesis (Laboratory of Membrane active compounds and  $\beta$ -Diketones).

Vedoucí: Dr. Aiva Plotniece. Analýza a stanovení log P dihydropyridinových derivátů pomocí CE a analýza a charakterizace nanočástic pomocí CE a DLS.

## PROJEKTY

---

- Grantová agentura ČR, 16-23938Y, „Charakterizace nanočástic kapilární elektroforézou“, člen řešitelského týmu
- Grantová agentura ČR, 19-23033S, „Zlepšení citlivosti detekce v chirálních separacích pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s ESI-MS nebo ICP-MS“, člen řešitelského týmu
- OP PIK, „TFC-X – Charakterizace, optimalizace a validace GMP-grade výroby nového biotechnologického léčivého přípravku“, CZ.01.1.02/0.0/0.0/16\_084/0010317
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2015\_020, Matricový efekt a jeho potlačení při analýze vzorků, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2016\_016, „Bioanalýza a analýza potravin“, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2017\_020, „Matricový efekt a mez detekce“, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2018\_027, „Efektivní zpracování vzorků se složitými maticemi“, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2019\_028, „Inovativní metody analýzy vzorků se složitými maticemi“, člen řešitelského týmu

## PEDAGOGICKÁ ČINNOST

---

- LS 2014/2015 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie 6 hod./týd.)
- ZS 2016/2017 – ACH/CHI (Cvičení z chemické instrumentace 5 hod./týd.)
- ZS 2018/2019 – ACH/CHI (Cvičení z chemické instrumentace 5 hod./týd.)
- ZS 2018/2019 – ACH/CHV (Vyučující předmětu Chemie vody 1 hod./týd.)

- Každoročně (od roku 2014 – ZS): ACH/ZZV (Základy zpracování výsledků – vedení vybraných výpočtových seminářů), ACH/APCHC (Cvičení z aplikované analytické chemie – vedení úloh pro stanovení konzervačních látek pomocí CE)

## **PUBLIKACE**

---

- **Daniel Baron**, Carmen Cacho, Jan Petr, Electrokinetic preconcentration of magnetite core – carboxylic shell nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1499 (2017) 217-221.
- **Daniel Baron**, Petra Dolanská, Zdenka Medříková, Radek Zbořil, Jan Petr, On-line stacking of carboxylated magnetite core-shell nanoparticles in capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 40 (2017) 2482-2487.
- Lenka Hárendarčíková, **Daniel Baron**, Andrea Šebestová, Jan Rozsypal, Jan Petr, True lab-in-a-syringe technology for bioassays. *Talanta*, 174 (2017) 285-288.
- Martins Rucins, **Daniel Baron**, Aiva Plotniece, Jan Petr, Determination of hormone antagonists in waste-water samples by micellar electrokinetic chromatography. *Chromatographia*, 81 (2018) 1607-1612.
- Andrea Šebestová, **Daniel Baron**, Radka Pechancová, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Separation of oxaliplatin enantiomers at attomolar levels by capillary electrophoresis connected with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, zasláno (ACA-19-330).
- **Daniel Baron**, Jan Rozsypal, Aude Michel, Jean-Michel Siaugue, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Study of interactions between carboxylic magnetite nanoparticles and polymyxin B by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, zasláno.

## **KONFERENCE**

---

- **Daniel Baron**, Jana Horská, Jan Petr, Poster: Layer – by – layer capillary coating for modification of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. Mezinárodní interdisciplinární konference o bioanalýze CECE – Brno 20. – 22. 10. 2014.
- **Daniel Baron**, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Aiva Plotniece, Arkadij Sobolev, Jan Petr, Poster: Separation of some 1,4-dihydropyridine derivatives by micellar

electrokinetic chromatography. Mezinárodní interdisciplinární konference o bioanalýze CECE – Brno 17. – 19. 10. 2016 .

- **Daniel Baron**, Tomáš Pluháček, Vítězslav Maier, Jan Petr, Poster: CE separation of (nano)metals with ICP-MS detection. Euroanalysis 2017 – Stockholm (Švédsko) 28. 8. – 1. 9. 2017.
- **Daniel Baron**, Jana Horská, Martins Rucins, Karlis Pajuste, Aiva Plotniece, Arkadij Sobolev, Jan Petr, Poster: Characterization of nanoparticles via CE and DLS. Pokroky v chromatografii a elektroforéze & Chiranal – Olomouc 29. 1. – 1. 2. 2018.
- **Daniel Baron**, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Poster: Study of interactions between maghemite core/carboxylic shell nanoparticles and polymyxin B via ACE-ICP-MS. International Symposium on Separation Sciences ISSS 2018 – Jasná, Demänovská Dolina (Slovensko) 17. – 20. 6. 2018.
- **Daniel Baron**, Tomáš Pluháček, Andrea Šebestová, Radka Pechancová, Jan Petr, Přednáška: Využití ICP-MS jako detektoru pro CE analýzy. Sjezd chemiků 2018 – Zlín 9. – 12. 9. 2018.

## **DALŠÍ AKTIVITY**

---

- Organizace a účast popularizačních akcí (např. Veletrh vědy a výzkumu, Muzejní noc, Noc vědců, Dětská univerzita, atd.) a exkurzí škol.
- Recenzent bakalářských prací (Kristýna Jarčíková, Iveta Hloušková).
- Smluvní výzkum – Vývoj CE metody a stanovení chloridů a chlorečnanů jako vedlejších produktů ve vzorcích chloristanu draselného pro firmu EMS-PATVAG.

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

**AUTOREFERÁT K DISERTAČNÍ  
PRÁCI**

**Nanočástice v kapilární elektroforéze**

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Daniel Baron

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

**Olomouc 2019**



## SOUHRN

Předložená disertační práce je zaměřena na problematiku nanočástic v kapilárních elektromigračních analytických technikách.

Nejprve bylo studováno, jak se nanočástice chovají na rozhraní dvou prostředí s různými specifickými vodivostmi. S tím souvisí tzv. „stacking“ a „de-stacking“ efekt. Oba tyto efekty byly pozorovány, pokud je iontová síla zóny, ve kterém jsou nanočástice dispergovány, rozdílná od iontové síly elektrolytu, do něhož jsou při analýze dávkovány. Při těchto efektech může rovněž docházet k agregaci nanočástic. Toto chování lze vysvětlit pomocí DLVO teorie, která předpokládá, že nanočástice agregují, pokud je překročena energetická bariéra definovaná elektrostatickými a Van der Waalsovými silami. Navíc bylo zjištěno, že za optimálních podmínek, lze vzorek nanočástic „stacking“ efektem 76-krát zakonzentrovat (srovnání se standardním dávkováním).

Další možností, jak prekoncentrační faktor nanočástic zvýšit, je kombinace „stacking“ efektu s elektrokinetickým dávkováním vzorku. On-line elektrokinetická prekoncentrace karboxylovaných magnetitových nanočástic byla studována za „normálních“ podmínek, a také v křemenných kapilárách, ve kterých je elektroosmotický tok obrácen nebo potlačen. Bylo zjištěno, že k reprodukovatelným analýzám vede pouze použití kapilár kovalentně pokrytých polyvinylalkoholem. Srovnáním s běžným hydrodynamickým dávkováním došlo tímto způsobem k 860-násobné prekoncentraci nanočástic.

V poslední části práce jsou studovány pomocí afinitní kapilární elektroforézy interakce nanočástic s polypeptidovým antibiotikem (polymyxin B). Pro specifickou a citlivou detekci byla kapilární elektroforéza spojena s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Samotnému studiu interakcí tedy předcházelo testování funkčnosti spojení těchto dvou technik. Při interakční studii byla sestrojena závislost efektivní mobility nanočástic na koncentraci ligandu v základním elektrolytu. Analýzou naměřených dat ( $x$ -reciproká linearizace dle Scatcharda) byly zjištěny dvě různé interakční oblasti, jež se liší svými interakčními konstantami a rovněž stechiometrií vznikajícího komplexu. Tyto rozdíly mohou být opět vysvětleny začátkem agregace nanočástic, a to z důvodu snížení elektrostatického odpuzování nanočástic (záporný náboj je kompenzován polymyxinem B, takže se mění hodnota zeta potenciálu). Tato hypotéza je rovněž v souladu s tvary profilů nanočástic. Píky nanočástic jsou úzké při nízkých koncentracích ligandu, zatímco při vysokých koncentracích jsou rozšířeny.

## SUMMARY

The submitted dissertation thesis is focused on problematics of nanoparticles in capillary electromigration analytical techniques.

Firstly, nanoparticles' behaviour at the interface of two environments with different specific conductivities was explored. This is related to the stacking and de-stacking effects. Both of these effects have been observed when the ionic strength of the zone in which nanoparticles are dispersed differed from the ionic strength of the running electrolyte. These effects may also result in aggregation of nanoparticles. This behaviour can be explained by the DLVO theory, which assumes that nanoparticles aggregate when the energetic barrier defined by electrostatic and Van der Waals forces is exceeded. In addition, it has been found that under optimal conditions, stacking effect allowed 76-fold preconcentration of nanoparticles (compared to standard injection).

Another way to increase the preconcentration factor of nanoparticles is combination of the stacking effect with the electrokinetic injection of the sample. On-line electrokinetic preconcentration of carboxylated magnetite nanoparticles has been studied in fused silica capillaries and also in silica capillaries with reversed or suppressed electroosmotic flow. It has been found that analyzes in polyvinylalcohol covalently coated capillaries were most reproducible. In comparison with the standard hydrodynamic injection, the electrokinetic injection allowed 860-fold preconcentration of nanoparticles.

Lastly, the interaction study of nanoparticles with the polypeptide antibiotic (polymyxin B) via affinity capillary electrophoresis has been performed. For specific and sensitive detection, inductively coupled plasma mass spectrometry instrument has been hyphenated to capillary electrophoresis instrument. After testing of the interface of these two techniques, interactions between nanoparticles and ligand were studied. The analysis of interaction data ( $x$ -reciprocal Scatchard linearization of dependence between effective mobility of nanoparticles and ligand concentration in running electrolyte) showed two distinct interaction regions. These regions differed in the strength of the interaction, and in the stoichiometry of emerging complex. These differences can be explained by the start of aggregation of nanoparticles due to the decrease of electrostatic repulsion of nanoparticles (nanoparticles' negative charge is compensated by polymyxin B, so the value of zeta potential changes). This hypothesis is also in the agreement with the peak shapes of nanoparticles. Peaks are narrow at low ligand concentrations and broadened at high ligand concentrations.

# 1 ÚVOD

Objev materiálů nanometrových rozměrů, a také procesů a jevů probíhajících na „nanourovni“, otevřel dokořán dveře jejich rozsáhlému využití v řadě průmyslových a vědeckých odvětví. Díky svým rozměrům a nepřehlednému množství materiálů, z nichž mohou být v nejrůznějších tvarech připraveny, poskytují nanočástice velmi zajímavé vlastnosti. Ty je navíc možno ještě měnit jejich povrchovými modifikacemi. Proto jsou nanomateriály stále vyhledávanější v široké škále oblastí lidské činnosti. Z těchto důvodů mají nanotechnologie obrovský hospodářský dopad a jsou jedním z nejrychleji se rozvíjejících technologických odvětví.

Nicméně, znalosti o mechanismu působení nebo nepříznivých účincích těchto nově používaných materiálů na živočichy nebo životní prostředí jsou v současnosti stále velmi omezené. Proto je velmi důležité mít k dispozici velmi přesné techniky pro jejich charakterizaci (distribuce velikosti částic, tvar, chemické složení apod.) a kvantifikaci v reálných podmínkách [1].

V tomto ohledu nabízí kapilární elektromigrační techniky velmi efektivní řešení, protože poskytují rychlé analýzy nanočástic, včetně polydisperzních systémů nebo částic nekulových tvarů, přičemž náklady jsou relativně nízké. Kapilární elektroforéza (CE) může být tedy využita pro separaci a kvantifikaci nanomateriálů s rozdílnými tvary, velikostmi, chemickým složením a povrchovými úpravami. CE však také poskytuje podle tvaru záznamu nanočástic nebo třeba změny jejich elektroforetických mobilit v závislosti na měnících se experimentálních podmínkách mnoho informací i o chování nanočástic v různých prostředích (základních elektrolytech, jejichž složení může být nasimulováno tak aby přibližně odpovídalo např. tělním tekutinám), na rozhraní různých prostředí nebo může být dokonce využita k interakčním studiím nanočástic s různými typy (bio)molekul. Při takových studiích je velmi výhodné kombinovat CE s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). ICP-MS pak dovoluje stanovení prvkového složení nanomateriálů s velmi nízkými detekčními limity (ng/l) v komplexních matricích [2].

Protože nemusí být nanočástice vnímány v analytické chemii jen jako analyt, ale lze je použít také pro zlepšení vlastností (nejen) separačních metod (prekoncentrace, rozlišení, detekce, atd.) je jejich problematika v této vědecké disciplíně velmi atraktivní.

## 2 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA NANOČÁSTIC

### 2.1 Historie zkoumání nanočástic pomocí CE

Historicky první pokus analyzovat větší objekty pomocí CE je datován do roku 1987, kdy Hjertén a kol. [3] ukázali možnosti analýzy buněk a virů kapilární elektroforézou. Ve své práci popsali, jakým způsobem byly virus tabákové mozaiky (TMV) a bakterie kmene *Lactobacillus casei* unášeny elektroosmotickým tokem (EOF) uvnitř kapiláry.

Zatímco velká část počátečních prací zabývajících se analýzou koloidů kapilární elektroforézou byla provedena na částicích polystyrenu [4-11] a částicích oxidů kovů mikrometrových a sub-mikrometrových velikostí [12-14], jsou v dnešní době pomocí CE analyzovány téměř všechny typy nanoobjektů [15].

### 2.2 Detekce nanočástic a možnosti jejího zlepšení v kapilární elektroforéze

#### 2.2.1 UV/Vis detektory a jejich vlastnosti

Detektory pracující na principu absorpce záření v UV/Vis (zejména DAD) jsou pro svou univerzálnost, a také díky možnosti měření přímo v kapiláře, nejpoužívanějšími detektory v CE.

Velkou výhodou tohoto detektoru je simultánní záznam v celé oblasti UV/Vis spektra. Nicméně, jeho výhody bývají zastíněny nízkou citlivostí (velmi malá optická dráha daná vnitřním průměrem kapiláry). Detekční limity jsou proto vyšší, typicky v řádu 10  $\mu\text{M}$  [16]. Navíc lze očekávat, že koncentrace nanočástic v biologických vzorcích a ve vzorcích životního prostředí budou velmi malé, a proto je často potřeba, aby byla detekce těchto analytů citlivější [17]. Toho lze docílit použitím jiných detektorů, např. amperometrických nebo detektorů s laserem indukovanou fluorescencí (LIF) [18-21]. Poslední dobou se však pro tyto účely jeví jako velmi slibné spojení CE s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), protože dovoluje přímou analýzu nanomateriálů ve složitých matricích, často bez nutnosti extrakce nebo jiných náročných úprav vzorku [22].

## 2.2.2 CE-ICP-MS

Práci, kde jsou oba přístroje spojeny, poprvé publikoval v roce 1995 Olesik a kol. [23]. Rozhraní musí udržet elektrický kontakt s výstupním koncem CE kapiláry, aby byl zajištěn stabilní elektrický proud, což je nutné pro získání reprodukovatelných elektroforetických separací. Schématické znázornění podobného rozhraní vyvinutého v naší laboratoři je ukázáno v kapitole 4.3.5 na obrázku 3. Problematika spojení CE s ICP-MS je detailně rozebrána v přehledovém článku, který publikovali Prange a Pröfrock [24].

Dnes je CE-ICP-MS využíváno zejména pro speciální analýzy zejména kovových prvků ve složitých matricích [25]. Typickým příkladem je analýza léčiva (na bázi kovu) v tělních tekutinách, kdy CE- ICP-MS rozlišuje signál užitého léčiva a jeho metabolitů. Lze tedy říci, že CE-ICP-MS je jedním z mála analytických nástrojů, které lze použít k detailnímu studiu transportu a interakci takového léčiva s biomolekulami v lidském těle, a který tak může napomoci vysvětlit mechanismus jeho účinku na molekulární úrovni [26, 27].

## 2.2.3 On-line prekoncentrační techniky v CE

Dalším způsobem, jak zvýšit citlivost elektroforetických technik, je využití tzv. on-line prekoncentračních technik. Ty jsou povětšinou založeny na tom, že probíhají v tzv. diskontinuálních systémech (kapilára je naplněna dvěma nebo více různými elektrolyty s různými vlastnostmi). Po aplikaci napětí dojde k vytvoření heterogenního elektrického pole v kapiláře a analyt se chová v každé zóně jinak. Intenzita elektrického pole je nepřímo úměrná koncentraci a mobilitě složek elektrolytu. Proto je větší ve zředěných elektrolytech než v koncentrovaných. To je typické pro dávkování vzorku, který je rozpuštěn v méně vodivé matrici, než je elektrolyt. Po aplikaci napětí začne analyt migrovat v zóně matrice a po dosažení koncentrovanějšího elektrolytu se zpomalí (na tomto rozhraní se tedy zakoncentruje), protože mobilita je vlastně konstantní. Na tomto principu je založeno zakoncentrování, tzv. normální „stacking“ efekt, jež může být různě modifikován [28].

### **Elektrokinetické dávkování a kombinace s dalšími on-line prekoncentračními technikami**

On-line prekoncentrační techniky mohou být účinně kombinovány s elektrokinetickým dávkováním vzorku. První vyvinutá technika, kdy je kombinováno elektrokinetické dávkování se „stacking“ efektem, se nazývá zakoncentrování s využitím

elektrokinetického dávkování, „field-enhanced sample injection“ (FESI) nebo „field-amplified sample injection“ (FASI). Je tedy založena na elektrokinetickém dávkování vzorku připraveného v matrici s nízkou vodivostí [29-35].

## 2.3 Teoretické aspekty migrace nanočástic v kapilární elektroforéze

Obecně platí, že mobilita nanočástic je dána Henryho rovnicí [36]:

$$\mu_{NPS} = (2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta)/(3\eta) f(\kappa R) \quad (1)$$

kde  $\varepsilon_r$  a  $\varepsilon_0$  je relativní elektrická permitivita elektrolytu a elektrická permitivita vakua,  $\zeta$  je elektrokinetický (zeta) potenciál,  $\eta$  je dynamická viskozita kapaliny a  $f(\kappa R)$  je Henryho funkce ( $\kappa$  je reciproká hodnota Debyeho délky – tloušťka elektrické dvojvrstvy a  $R$  je poloměr částice).

Stanovení elektroforetické mobility tak umožňuje získat informace o zeta potenciálu anebo velikosti částic [37]. CE nanočástic tudíž poskytuje informace o distribuci velikosti NPs, povrchovém náboji, difúzním koeficientu a umožňuje separaci různých populací nanočástic [38].

## 2.4 Studium interakcí pomocí kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza je dobře známá nejen jako efektivní separační metoda, ale také jako výborná technika pro studium chemických reakcí a rovnováh, včetně jejich kinetiky [39]. Může být tedy v afinitním módu (ACE) rovněž využita pro interakční studie mezi NPs a jinými (bio)molekulami [40].

Pro interakce NPs s různými jinými molekulami je často výhodně využito spojení CE s ICP-MS (limity detekce, prvková specificita, široký lineární dynamický rozsah, atd.).

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tématem disertační práce bylo studium chování karboxylovaných magnetických nanočástic, na bázi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (možnost prekoncentrace a jejich charakterizace), v kapilárních elektromigračních technikách, přičemž byly stanoveny tři cíle:

1. Studium NPs při tzv. „stacking“ efektu, a tedy popis chování nanočástic na rozhraní dvou prostředí o různých vlastnostech. Navíc, protože je tohoto efektu nejčastěji využíváno pro on-line prekoncentraci analytů, bylo rovněž cílem zjistit, při jakém zředění lze tyto nanočástic pomocí „stacking“ efektu ještě detekovat.

2. Studium možnosti elektrokinetického dávkování zkoumaných nanočástic do kapiláry a nalezení vhodných podmínek pro dosažení maximálního prekoncentračního faktoru při použití on-line prekoncentrační techniky, tzv. zakoncentrování s využitím elektrokinetického dávkování (FESI).

3. Studium interakcí karboxylovaných  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočástic s polypeptidovým antibiotikem polymyxinem B (charakterizace povrchové chemie nanočástic), pomocí afinitní kapilární elektroforézy, která byla pro selektivní a citlivou detekci analytů spojena s ICP-MS.

Řešení cílů vedlo k publikačním výstupům:

1. **D. Baron**, P. Dolanská, Z. Medříková, R. Zbořil, J. Petr, On-line stacking of carboxylated magnetite core-shell nanoparticles in capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, 40 (2017) 2482-2487.

2. **D. Baron**, C. Cacho, J. Petr, Electrokinetic preconcentration of magnetite core - carboxylic shell nanoparticles by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, 1499 (2017) 217-221.

3. **D. Baron**, J. Rozsypal, A. Michel, J.M. Siaugue, T. Pluháček, J. Petr, Study of interactions between carboxylic magnetite nanoparticles and polymyxin B by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatogr A*, zasláno.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 STUDIUM „STACKING“ EFEKTU**

### **KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC**

#### **4.1.1 Chemikálie**

##### **4.1.1.1 Pufry**

Základní elektrolyty pro studium „stacking“ efektu byly připraveny z kyseliny borité a hydroxidu sodného. Chlorid sodný byl využit pro studium stability nanočástic v závislosti na vzrůstající iontové síle. Všechny tyto chemikálie byly o čistotě p. a. a byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Použitá voda byla deionizovaná (18,2 M $\Omega$ .cm), čehož bylo dosaženo přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA). Při přípravě základních elektrolytů byly rovněž použity pufry pro kalibraci pH metru, které byly zakoupeny od společnosti Hanna Instruments (Woonsocket, RI, USA).

##### **4.1.1.2 Nanočástice**

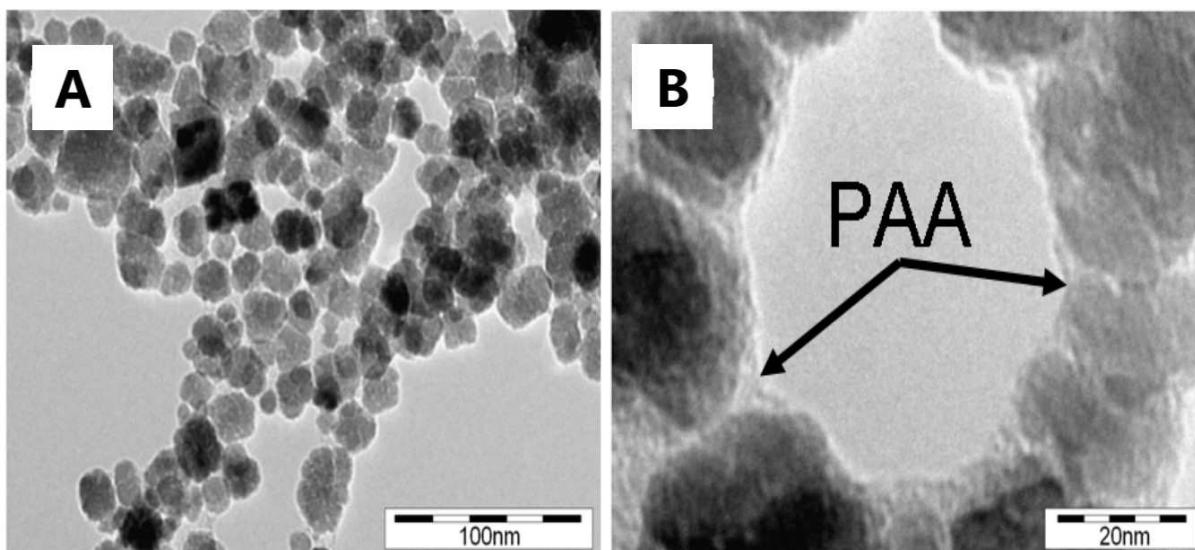
Studované nanočástice byly poskytnuty týmem prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. Tyto nanočástice byly připraveny v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů (RCPTM) v Olomouci podle postupu, který popsali Bakandritsos a kol. [43].

Morfologie připravených MNPs pokrytých polyakrylovou kyselinou (PAA) je uvedena na obrázku 1, kde je rovněž vyobrazena povrchová vrstva tvořená PAA.

#### **4.1.2 Charakterizace nanočástic**

TEM snímky připravených karboxylovaných MNPs byly pořízeny mikroskopem JEOL JEM-2010 pracujícím při 160 kV a rozlišení 1,9 Å.





*Obrázek 1: TEM snímky PAA stabilizovaných MNPs.*

DLS měření bylo použito ke stanovení středního hydrodynamického průměru (75 nm) a hodnot zeta potenciálu (-46 mV), přístrojem Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Měření bylo provedeno na Latvian Institute of Organic Synthesis (Laboratory of Membrane active compounds and  $\beta$ -Diketones) v Rize.

Poměr mezi magnetitem (92,6 %) a polymerem (7,4 %) byl určen termogravimetrickou analýzou (STA 449C Jupiter).

Koncentrace  $[\text{Fe}] = 0,0187 \text{ M}$ , odpovídá 1,44 mg magnetitu/ml.

V práci je koncentrace NPs vyjádřena ředícím faktorem  $\rho$ , který je definován tak, že jeho hodnota je rovna jedné, pokud není výsledná připravená disperze nijak ředěna (v případě těchto nanočástic tedy platí, že  $\rho = 1$  u částic o koncentraci 1,44 mg magnetitu/ml).

Stabilita připravených MNPs byla stanovena pomocí DLS měření, kdy byla sledována závislost hodnot hydrodynamického průměru ( $d_H$ ) karboxylovaných MNPs na koncentraci přidaného NaCl. Významné destabilizace MNPs bylo dosaženo při koncentracích nad 0,5 M NaCl (vodný roztok).

### 4.1.3 Příprava základních elektrolytů

Všechny pufrы byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny borité ve vodě tak, aby vznikly roztoky o koncentraci 5 – 250 mM. Vzniklé roztoky byly potom za stálého míchání titrovány roztokem hydroxidu sodného o koncentracích 50 a 10 % (w/w) až na požadovanou hodnotu pH (9,5). Hodnota pH byla průběžně sledována pomocí pH metru. Pufrы byly uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

### 4.1.4 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny analýzy byly provedeny na přístroji HP 3DCE vybaveným detektorem s diodovým polem – DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Pro vyhodnocení naměřených dat byla použita vlnová délka 200 nm. Profily nanočástic byly vyhodnocovány vždy v 10 % výšky píku na jeho začátku a konci a v jeho vrcholu.

Analýzy byly provedeny v neupravených křemenných kapilárách, zakoupených od společnosti Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), s vnitřním průměrem 50 μm. Celková délka kapiláry byla 33 cm, efektivní délka k detektoru byla 24,5 cm. Aplikované napětí bylo 10 kV a kazeta s kapilárou byla termostatována na teplotu 25 °C. Každý den byla kapilára před měřením propláchnuta roztokem NaOH o koncentraci 0,1 M po dobu 10 min a deionizovanou vodou po stejnou dobu. Před každou analýzou byla kapilára propláchnuta 0,1 M NaOH (2 minuty), deionizovanou vodou (2 minuty) a pufrém (3 minuty). Všechny proplachy byly provedeny tlakem 940 mbar.

Všechna měření byla opakována 3x, pokud není uvedeno jinak.

## **4.2 ELEKTROKINETICKÁ PREKONCENTRACE KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC**

### **4.2.1 Chemikálie**

#### **4.2.1.1 Pufry**

Základní elektrolyt byl opět složen z kyseliny borité a hydroxidu sodného, popřípadě byl modifikován přidavkem cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB). Pro obrácení EOF byl také použit didecyldimethylammonium bromid (DDAB).

Pro pokrytí kapilár polyakrylamidem (PAM) byly použity následující chemikálie: hydroxid sodný, kyselina dusičná, 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát, absolutní ethanol, akrylamid, peroxodisíran draselný a tetramethylethylendiamin.

Chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Veškerá voda, která byla použita pro tuto část práce, byla získána ze stejné deionizační stanice, jako v případě studia „stacking“ efektu.

Rovněž pufry použité pro kalibraci pH metru byly stejné, jaké jsou uvedeny v kapitole 4.1.1.1.

#### **4.2.1.2 Nanočástice**

Pro studium možnosti elektrokinetického dávkování a prekoncentrace nanočástic byl použit stejný materiál jako v kapitole 4.1.1.2.

### **4.2.2 Příprava základních elektrolytů**

Vzhledem k tomu, že byl v této části práce také použit pufr o složení  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5, byl připravený stejným způsobem, jako v kapitole 4.1.3. Takto připravený pufr byl (pro obrácení elektroosmotického toku v kapiláře) modifikován rozpuštěním pevného cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB), tak aby vznikl roztok CTAB o koncentraci 5 mg/ml Didecyldimethylammonium bromid (DDAB) byl rozpouštěn ve vodě, koncentrace byla rovněž 5 mg/ml (viz kapitola 5.2.1.2).

Pufry byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

### 4.2.3 Instrumentace a experimentální podmínky

Ke všem měřením bylo opět využito přístroje pro CE analýzy HP 3DCE s DAD detektorem (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Nanočástice byly v průběhu analýz monitorovány při vlnové délce 200 nm. Píky nanočástic byly při této vlnové délce vyhodnocovány v jejich nejvyšším bodě.

Všechny použité kapiláry měly vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$  a celkovou délku 33,5 cm (efektivní délka činila 25 cm). Křemenné kapiláry použité v části 5.2.1.1 (Elektrokinetické dávkování nanočástic za „normálních“ podmínek) byly také použity pro pokrytí polyakrylamidem a byly zakoupeny od společnosti Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). PVA pokryté kapiláry (G1600-67219) byly zakoupeny od společnosti Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). Analýzy probíhaly při aplikaci napětí -10 kV (neupravená kapilára, kapiláry s obráceným i potlačeným elektroosmotickým tokem) a 10 kV (pouze neupravená kapilára). Kapilára byla termostatována na teplotu 25 °C. Před prvním použitím byla nepokrytá kapilára promyta 0,1 M NaOH (30 min) a deionizovanou vodou (30 min), PAM a PVA pokryté kapiláry byly promyty jen deionizovanou vodou (60 min). Před každou analýzou byly všechny kapiláry promývány deionizovanou vodou (5 min) a použitým elektrolytem (5 min). V případě použití DDAB pro obrácení EOF (viz kapitola 5.2.1.2) byla před promytím pufrům kapilára promyta vodným roztokem DDAB o koncentraci 5 mg/ml (5 min). Promývací tlak byl 930 mbar.

Pokud není uvedeno jinak, byla všechna měření opakována 3x.

## **4.3 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI KARBOXYLOVANÝMI MAGNETITOVÝMI NANOČÁSTICEMI A POLYMYXINEM B POMOCÍ CE-ICP-MS**

### **4.3.1 Chemikálie**

#### **4.3.1.1 Pufry**

Základní elektrolyty použité v této části práce byly připraveny z imidazolu, kyseliny octové, kyseliny fosforečné a hydroxidu sodného. Tyto chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro studium interakcí byl připravený fosfát sodný modifikován přidavkem polymyxinu B, který byl zakoupen od společnosti SERVA FeinBiochemica (Heidelberg, Německo/New York, USA).

#### **4.3.1.2 Nanočástice**

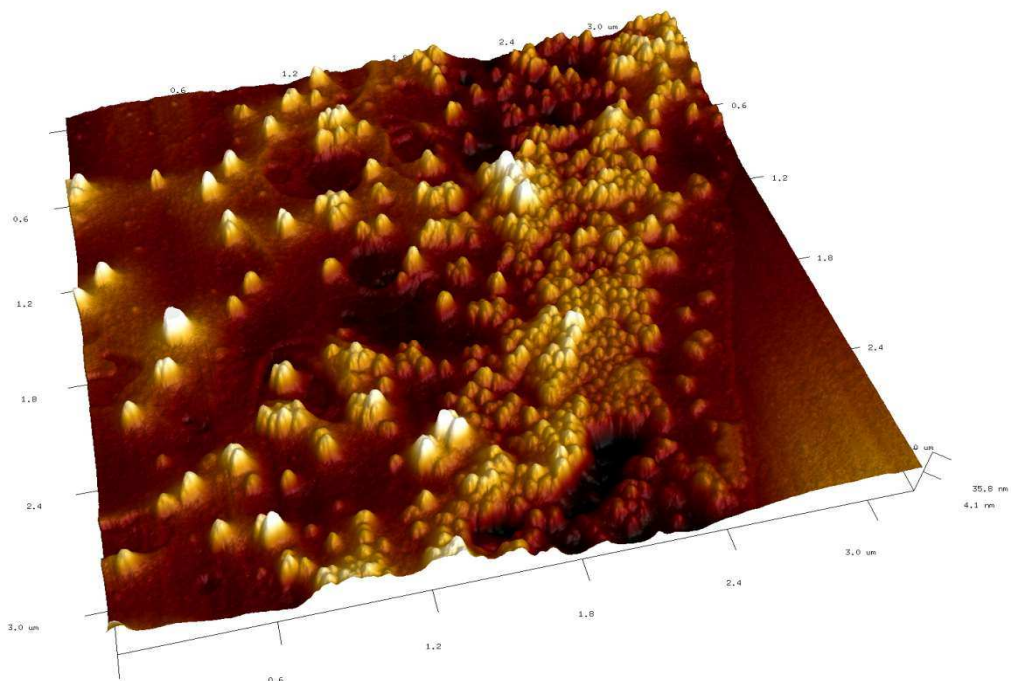
Nanočástice použité pro studium interakcí poskytnul prof. Jean-Michel Siaugue (Sorbonne Universités, Paris, France).

### **4.3.2 Charakterizace nanočástic**

Nanočástice byly po syntéze charakterizovány pomocí AFM, DLS a zetametrií. Topografie nanočástic byla měřena pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) Dimension Icon (Bruker, Billerica, MA, USA) vybaveným softwarem NanoScope 9.1. Touto technikou byla stanovena velikost jádra nanočástic: 60 ( $\pm$  5) nm. AFM snímek jsou na obrázku 2.

Zeta potenciál a hydrodynamický průměr, měřený pomocí Malvern Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) ve fosfátovém pufru, byl -13,9 ( $\pm$  1,1) mV a 71,05 ( $\pm$  0,1) nm. DLS Měření bylo provedeno na Latvian Institute of Organic Synthesis (Laboratory of Membrane active compounds and  $\beta$ -Diketones) v Rize.

Koncentrace [Fe] = 0,0078 M, odpovídá 0,602 mg magnetitu/ml.



*Obrázek 2: AFM snímek magnetitových karboxylovaných nanočástic použitých pro studium interakcí s polymyxinem B.*

### 4.3.3 Příprava vzorků

Jako „marker“ elektroosmotického toku byl ve vzorku NPs přítomen dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Vzorek směsi  $Pb^{2+}$  a  $Cd^{2+}$  kationtů byl připraven z certifikovaných referenčních materiálů (CRM) vodných kalibračních roztoků kovů Pb a Cd o koncentraci  $1\ 000 \pm 2$  mg/l řady *ASTASOL*<sup>®</sup> od společnosti Analytika, spol. s.r.o. (Praha, Česká republika). Tyto roztoky, a také CRM roztok Fe o koncentraci 100  $\mu$ g/l (od stejné společnosti) byly rovněž použity pro doladění ICP-MS parametrů. Ladící roztok Li, Y, Ce a Tl o koncentraci 1  $\mu$ g/l byl dodán společností Agilent Technologies (Tokyo, Japan).

Deionizovaná voda (měrný odpor 18,2  $M\Omega$ .cm) byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water od firmy Millipore (Molsheim, Francie).

Pufry použité pro kalibraci pH metru byly zakoupeny od společnosti VWR International (Radnor, PA, USA).

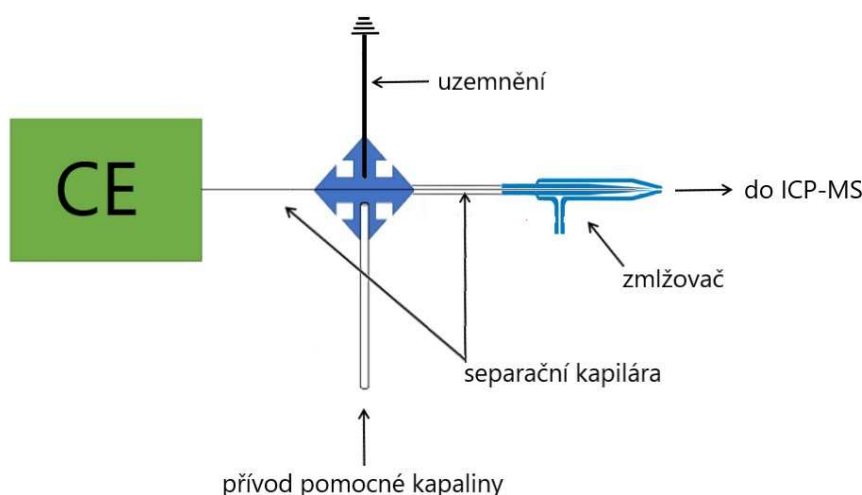
### 4.3.4 Příprava základních elektrolytů

Nejprve byly připraveny roztoky imidazolu (10 mM) a kyseliny fosforečné (25 mM) v deionizované vodě. Imidazol byl titrován kyselinou octovou na pH 4,5, zatímco roztok  $H_3PO_4$  byl titrován 50 a 10 % (w/w) roztokem hydroxidu sodného na pH 7,4. Titrace probíhaly za stálého míchání, přičemž hodnota pH byla sledována pomocí pH metru. Fosfátový pufr byl pro studium interakcí modifikován přidávkem polymyxinu B. Nejprve byl připraven zásobní roztok PMB o koncentraci 1 mM rozpuštěním odpovídajícího množství PMB ve fosfátu. Tento zásobní roztok byl potom ředěn fosfátovým pufrem na požadované koncentrace 10 nM – 25  $\mu$ M.

Všechny připravené základní elektrolyty byly uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

### 4.3.5 Instrumentace a experimentální podmínky

Pro všechny analýzy, které byly provedeny za účelem studia interakcí nanočástic s polymyxinem B bylo využito přístroje CE 7100 (Agilent technologies, Waldbronn, Germany), který byl pomocí rozhraní vyvinutého v laboratoři (obrázek 3) spojen s ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Tokyo, Japan).



*Obrázek 3: Schématické znázornění spojení CE s ICP-MS.*

Rozhraní se skládá z čtyřcestného křížového spoje („cross-piece“), zemnicí elektrody, vstupu pro pomocnou kapalinu a „MicroMist“ mikrokonzentrického zmlžovače. Separační kapilára je tedy vedena skrz čtyřcestný křížový spoj, kde je uzemněna a její konec je omýván pomocnou kapalinou (20x ředěný použitý fosfátový pufr bez přídavku PMB).

Výtok z „outletového“ konce CE kapiláry je pak mísen s pomocnou kapalinou přibližně 1 mm před zúžením vnitřní kapiláry zmlžovače. Výsledný roztok byl pak přes tento koncentrický zmlžovač a chlazenou mlžnou komoru dle Scotta přímo zaveden do indukčně vázaného plazmatu (ICP).

Interakce byly studovány v křemenných kapilárách o délce 47 cm a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  (Molex, Lisle, IL, USA) aplikováním napětí 25 kV při teplotě při 25 ° C. Před první použitím a každý den před začátkem měření byla kapilára promyta 0,1 M NaOH (20 min) a deionizovanou vodou (20 min). Před každou analýzou byla kapilára promyta 0,1 M NaOH (2 min), deionizovanou vodou (2 min) a použitým elektrolytem (4 min). Promývací tlak byl 935 mbar.

Vzorek nanočástic ( $\rho = 0,02$ ) s přídavkem DMSO (10 %) byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Profily nanočástic byly vyhodnocovány vždy v 10 % výšky píku na jeho začátku a konci a v jeho vrcholu.

Před spojením kapilární elektroforézy k ICP-MS byly optimalizovány ICP-MS podmínky (pozice plazmové hlavice, příkon generátoru, iontová optika, průtok Ar, atd.), a to s využitím komerčně dostupného ladícího roztoku Li, Y, Ce a Tl o koncentraci 1  $\mu\text{g/l}$ , zatímco vodný kalibrační standard Fe o koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$  byl použit pro optimalizaci průtoku helia oktapólovou kolizní celou (potlačení spektrálních interferencí) a pro jemné doladění parametrů ICP-MS k dosažení maximální intenzity všech měřených izotopů železa

Optimalizované ICP-MS podmínky jsou následující: příkon generátoru: 1550 W, průtok vnějšího plazmového plynu: 14,95 l/min, průtok pomocného plynu/nosný Ar: 0,9 l/min, průtok středního plazmového plynu (do zmlžovače): 1,1 l/min, průtok přídavného („make up“) Ar: 0,25 l/min, průtok He v kolizní cele: 3 ml/min, integrační čas: 100 ms pro izotopy  $^{12}\text{C}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$  a  $^{57}\text{Fe}$ .



## **5 VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **5.1 STUDIUM „STACKING“ EFEKTU**

#### **KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC**

##### **5.1.1 Úvod**

„Stacking“ efekt modelových MNPs byl studován v základním elektrolytu o složení  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5, protože tento elektrolyt poskytoval nejvíce reprodukovatelné profily analyzovaných nanočástic. „Stacking“ efekt byl studován při různé iontové síle jak BGE, tak i roztoku vzorku a při různé době dávkování 5, 10, 20, 30 a 60 s. Zeta potenciál karboxylovaných magnetitových nanočástice typu „core-shell“ je v  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pufru o pH 9,5 a koncentraci 50 mM roven -43 mV. V tomtéž pufru, avšak o koncentraci 5 mM, je zeta potenciál roven -38 mV.

##### **5.1.2 Studium chování nanočástic dispergovaných v různých prostředích**

###### **5.1.2.1 Homogenní elektrické pole**

V této části práce bylo zkoumáno chování karboxylovaných MNPs, které byly při dávkování dispergovány ve stejném elektrolytu jako BGE. Byl pozorován lineární nárůst ploch píků ve všech případech použitých elektrolytů (100, 50, 25 a 10 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ , pH 9,5), což je, mimo jiné, ukázáno v tabulce 1.

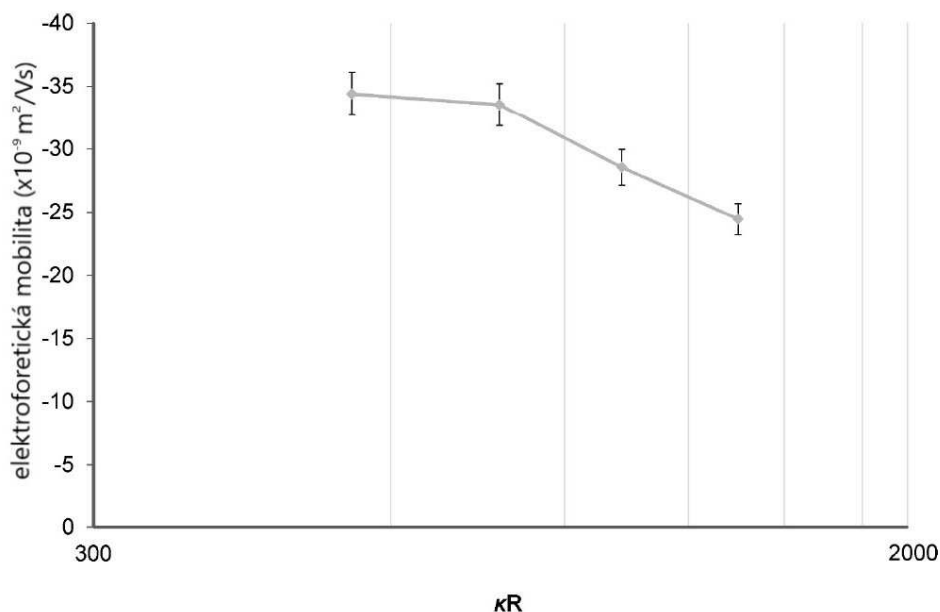
*Tabulka 1: Linearita závislosti mezi plochami píků a dobou dávkování ve studovaných elektrolytech. \* značí nelinearitu.*

Základní elektrolyt	Prostředí vzorku	Rovnice závislosti mezi plochou píku (y) a dobou dávkování (x)	R <sup>2</sup>
100 mM	deionizovaná voda	$y = 20,766x + 949,64$	0,3834*
	10 mM	$y = 81,159x + 244,13$	0,9840*
	100 mM	$y = 108,2x - 35,473$	0,9999
50 mM	deionizovaná voda	$y = 18,601x + 596,63$	0,6177*
	5 mM	$y = 54,976x + 326,34$	0,9705*
	50 mM	$y = 73,269x + 36,454$	0,9999
	100 mM	$y = 74,663x - 56,497$	0,9984
25 mM	deionizovaná voda	$y = 17,732x + 726,09$	0,7905*
	25 mM	$y = 91,911x + 56,264$	0,9999
	100 mM	$y = 64,414x - 4,127$	0,9985
10 mM	deionizovaná voda	$y = 23,962x + 203,55$	0,9735*
	10 mM	$y = 42,302x + 13,536$	0,9999
	100 mM	$y = 31,142x - 32,17$	0,9788

Jak je vidět na obrázku 4, vypočtené mobility NPs klesají se zvyšujícím se součinem  $\kappa R$ . Vzhledem k tomu, že produkt  $\kappa R$  je závislý na tloušťce elektrické dvojvrstvy nanočástic (čím vyšší  $I$ , tím vyšší hodnota  $\kappa$ ) a poloměru NPs ( $R$ ), lze předpokládat, že pokles mobilit NPs z  $-34 (\pm 2) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  na  $-24 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  při zvyšování iontové síly elektrolytu byl způsoben snížením tloušťky elektrické dvojvrstvy (ionizace karboxylovaných MNPs by měla zůstat stejná, tak jako i průměr jádra NPs).

Iontová síla použitých pufrů byla vypočítána pomocí programu Peakmaster, hodnota  $\kappa$  pak podle následující rovnice [6]:

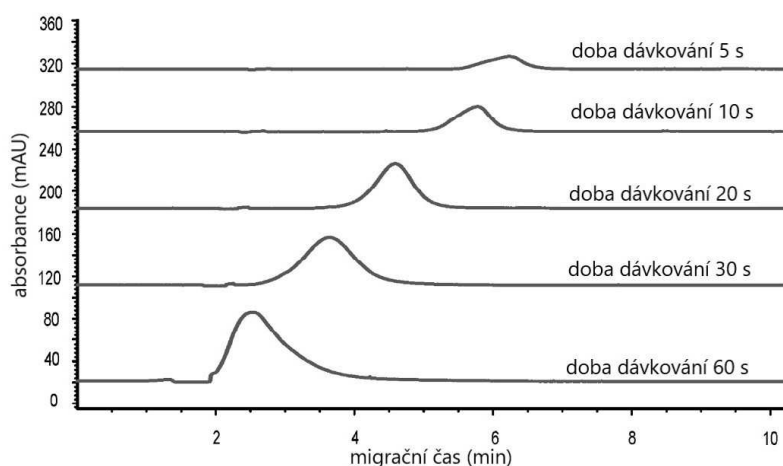
$$\kappa = 3,288\sqrt{I} \quad (2)$$



*Obrázek 4: Závislost elektroforetické mobility karboxylovaných MNPs na produktu  $\kappa R$ . MNPs dispergovány ( $\rho = 0,1$ ) v BGE: 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar po dobu 10 s; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

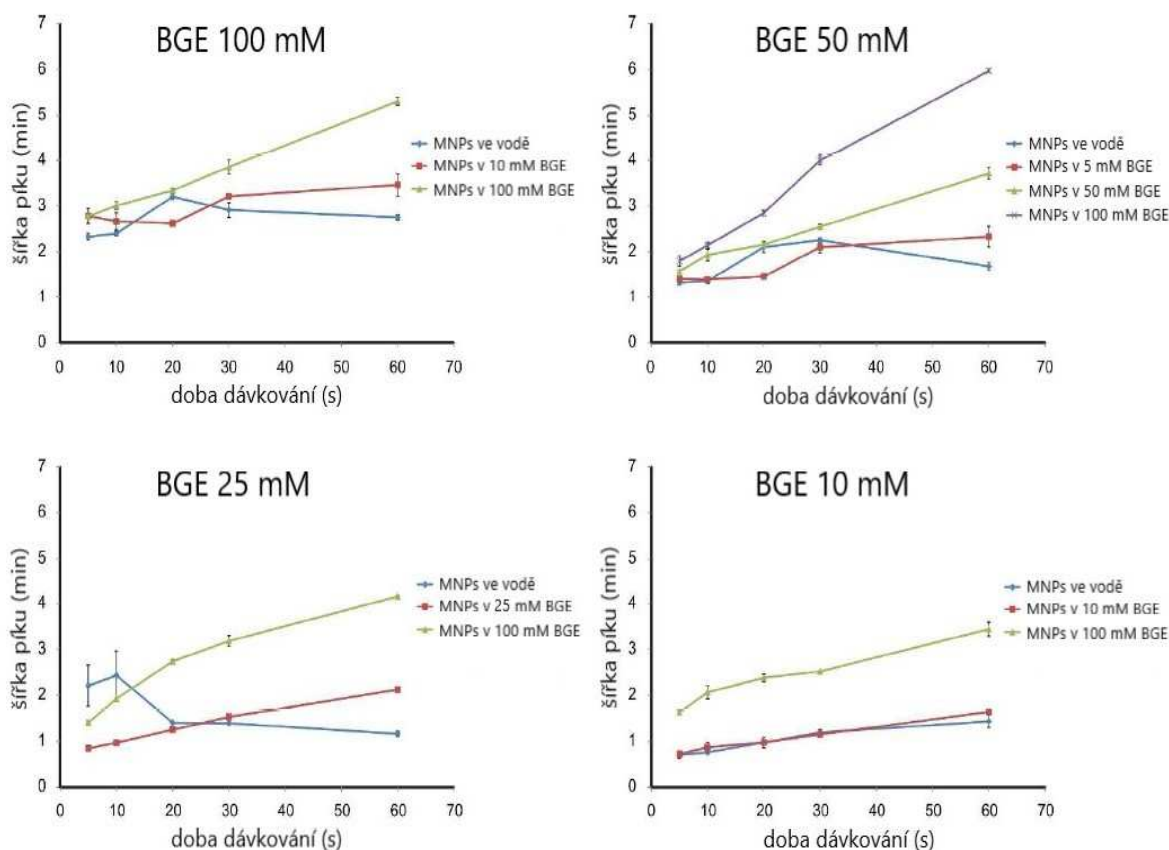
### 5.1.2.2 Studium „stacking“ efektu

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.2.3, „stacking“ efekt v CE nastane, pokud má zóna vzorku nižší vodivost, než je vodivost BGE. Příklady profilů NPs při „stacking“ efektu jsou ukázány na obrázku 5.



*Obrázek 5: Vliv doby dávkování karboxylovaných MNPs na profily píků při „stacking“ efektu. MNPs dispergovány v 5 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ); BGE: 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Je zřejmé, že šířka píku (vyhodnocovaná vždy v 10 % výšky na začátku a konci píku) při „stacking“ efektu klesá, což je rovněž graficky znázorněno na obrázku 6. Je také zřetelné (tabulka 1), že při „stacking“ efektu dochází přerušení linearity závislosti ploch píků NPs na době dávkování. To může být způsobeno ztenčením elektrické dvojvrstvy NPs, protože při tomto efektu dochází k „restrukturalizaci“ zóny nanočástic, kdy je snižována vzdálenost mezi NPs.



**Obrázek 6:** Vliv doby dávkování karboxylovaných MNPs na profily píků při „stacking“ efektu. MNPs dispergovány v 5 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ); BGE: 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování tlakem 50 mbar; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka 33,0 cm, efektivní délka 24,5 cm); aplikované napětí 10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.

Při větším množství nanočástic dávkovaných do kapiláry, je také pozorována změna tvaru píku (obrázek 5, 60 s). Ve srovnání s koncem píku ( $\mu_{eff} = -38 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) je mobilita NPs na jeho začátku téměř nulová ( $\mu_{eff} = -4,9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), a proto lze předpokládat, že mají za těchto podmínek nanočástice tendenci agregovat (DLVO teorie). Za těchto podmínek však není agregace tak výrazná, a proto rozhodujícím faktorem ovlivňujícím šířku píku nanočástic bude zřejmě distribuce částic v nadávkované zóně.

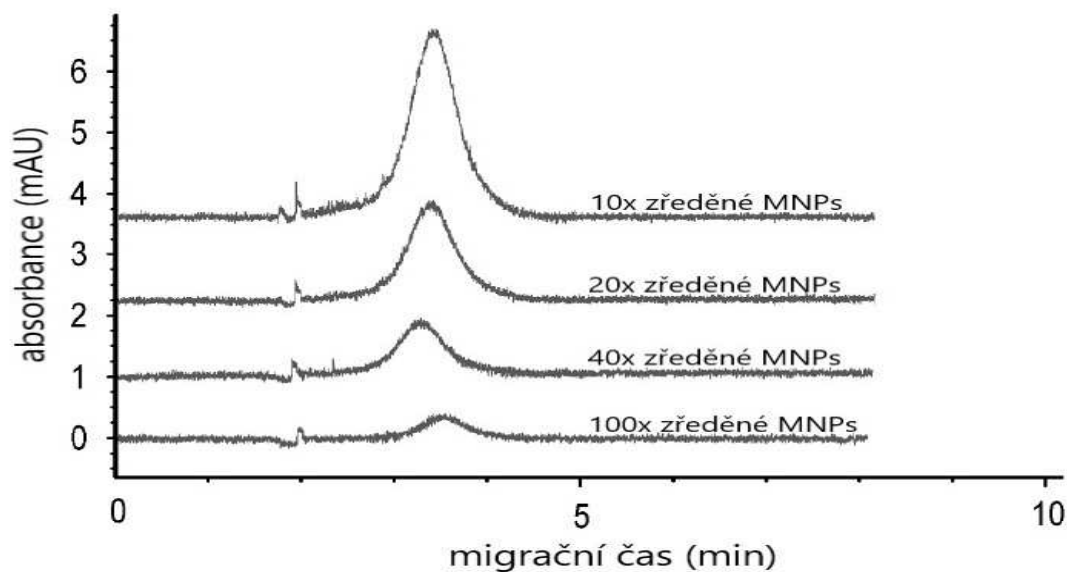
Obrovský rozdíl ve vodivostech (iontových silách) mezi oběma zónami (zóna vzorku a pufru) může vést také k tzv. indukované agregaci. Tento předpoklad byl potvrzen dávkováním karboxylovaných MNPs dispergovaných v 5 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5 do BGE o stejném složení, avšak o koncentraci 250 mM. Za těchto podmínek byla pozorována indukovaná agregace použitých NPs, na niž poukazuje vytváření úzkých profilů NPs s viditelnou adsorpcí NPs na kapilární stěnu. Mobilita na začátku píku je opět blízká nulové hodnotě, což znamená tvorbu zdánlivě téměř nenabitých NPs, které se na stěnu kapiláry mohou adsorbovat. Tento mechanismus může být opět přesněji vysvětlen snížením energetické bariéry, což umožňuje tvorbu agregátů anebo adsorpci NPs na stěnu kapiláry (dochází rovněž k stlačení elektrické dvojvrstvy vytvořené na povrchu kapiláry).

Z uvedených výsledků lze tedy rozlišit dva možné způsoby chování NPs při „stacking“ efektu, a to:

- (i) on-line prekoncentrace
- (ii) indukovaná agregace

Obecně řečeno, on-line prekoncentrace NPs je charakterizována zužováním píku, přičemž je udržena stabilní disperze NPs. V tomto případě tedy dochází pouze k poklesu vzájemné vzdálenosti mezi jednotlivými nanočásticemi, což je doprovázeno redukcí tloušťky elektrické dvojvrstvy. Naopak, indukovaná agregace NPs se vyznačuje takovou „restrukturalizací“ zóny nanočástic, která vede k tvorbě agregátů.

Vzhledem k tomu, že „stacking“ efekt slouží v kapilárních elektromigračních technikách zejména k on-line prekoncentraci analytů, bylo také zkoumáno, při jak velkém zředění lze NPs při tomto efektu ještě detekovat. Toto měření bylo realizováno dispergováním různého množství karboxylovaných MNPs v 10 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5 a dávkováním takto připraveného vzorku po dobu 60 s do kapiláry naplněné BGE o složení 100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o stejné hodnotě pH. Z obrázku 7 je zřejmé, že dokonce 100-násobně zředěné MNPs ( $\rho = 0,01$ ) lze díky této metodě analyzovat. Navíc, závislost ploch píků MNPs na faktoru ředění je lineární ( $R^2 = 0,9995$ ). Za těchto podmínek byly MNPs 76-krát zakoncentrovány ve srovnání s „běžným“ dávkováním (50 mbar po dobu 10 s), kdy jsou použité MNPs dispergovány v BGE o stejném složení, jakým je naplněna kapilára (100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5).



*Obrázek 7: Analýzy zředěných MNPs ( $\rho = 0,1; 0,05; 0,025$  a  $0,01$ ) při „stacking“ efektu. MNPs dispergovány v  $10 \text{ mM H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; BGE:  $100 \text{ mM H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  pH 9,5; dávkování tlakem  $50 \text{ mbar}$  po dobu  $60 \text{ s}$ ; analýzy v neupravené křemenné kapiláře (celková délka  $33,0 \text{ cm}$ , efektivní délka  $24,5 \text{ cm}$ ); aplikované napětí  $10 \text{ kV}$ ; teplota  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detekce při  $200 \text{ nm}$ .*

### 5.1.2.3 Studium „de-stacking“ efektu

Nakonec, byl zkoumán opačný efekt, tedy tzv. „de-stacking“, při němž je zóna vzorku vodivější než BGE, do něhož je dávkována. Je zřejmé, že při tomto efektu roste šířka píku, (viz obrázek 6) a jeho tvar je deformován. Můžeme předpokládat, že vysoká iontová síla (a tedy nízká intenzita elektrického pole) v zóně vzorku karboxylovaných MNPs způsobuje nízkou mobilitu částic („malá tloušťka“ elektrické dvojvrstvy). Mobilita částic pak na rozhraní obou zón (zóna vzorku a BGE) vzroste, takže nanočástice zde začnou migrovat rychleji. Toto vedlo ke dvěma účinkům: (i) některé z NPs byly tímto efektem zrychleny, což způsobilo rozšíření píků a (ii) některé z NPs si udržely stejnou hustotu náboje, která je blízko nulové hodnoty (tyto objekty nemohly být tak snadno „de-stackingem“ urychleny po dosažení prostředí s vyšší intenzitou elektrického pole), což způsobilo nárůst ploch píků s těmito nízkými mobilitami (tabulka 1).

## **5.2 ELEKTROKINETICKÁ PREKONCENTRACE KARBOXYLOVANÝCH MAGNETITOVÝCH NANOČÁSTIC**

### **5.2.1 Studium elektrokinetického dávkování NPs a jejich prekoncentrace za různých podmínek**

#### **5.2.1.1 Elektrokinetické dávkování nanočástic za „normálních“ podmínek**

Vzhledem k tomu, že v této části práce byl studován stejný typ karboxylovaných magnetických nanočástic jako v předchozím případě, bylo elektrokinetické dávkování vzorku studováno rovněž za použití  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5, jako základního elektrolytu. Při těchto podmínkách však nedošlo k elektrokinetickému nadávkování MNPs ( $\rho = 0,1$ ) do kapiláry při kladné ani záporné polaritě aplikovaného napětí (10 kV). To bylo pravděpodobně způsobeno přítomností silného EOF o mobilitě  $42 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pro stanovení byl jako tzv. „EOF marker“ použit mesityloxid) v kapiláře. Karboxylované MNPs mají za těchto podmínek efektivní mobilitu  $-29 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Při elektrokinetickém dávkování za použití napětí se zápornou polaritou, je směr elektroosmotického toku opačný, než je směr MNPs, tudíž podle vypočtených mobilit nemohou být nanočástice nadávkovány. Při použití napětí o kladné polaritě je tedy EOF hnací silou a musí být brána v úvahu zdánlivá mobilita nanočástic a teoreticky by mělo dojít k nadávkování těchto částic do kapiláry. Protože však nebyl při analýze za těchto podmínek pozorován žádný signál, který by odpovídal přítomnosti NPs, zdá se, že jejich zdánlivá mobilita ( $\sim 13 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) je příliš nízká pro nadávkování těchto MNPs.

#### **5.2.1.2 Elektrokinetické dávkování nanočástic při obráceném elektroosmotickém toku**

Podle předchozích výsledků se tedy zdá, že analyzované MNPs nemohou být elektrokineticky dávkovány, pokud je k analýze použita nijak neupravená křemenná kapilára. Proto byl tento způsob dávkování dále studován, při použití dynamicky pokryté vnitřní stěny kapiláry. Z těchto důvodů byly dále pro analýzu karboxylovaných MNPs testovány dva základní elektrolyty:

- (i) 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH o pH 9,5 s přídatkem 5,0 mg/ml CTAB
- (ii) 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH o pH 9,5, kdy byla kapilára před analýzou propláchnuta roztokem DDAB o koncentraci 5,0 mg/ml ve vodě.

Naměřené mobility elektroosmotického toku byly  $-43 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (CTAB) a  $-52 (\pm 2) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (DDAB). Pro získání mobilit karboxylovaných MNPs byly částice ( $\rho = 0,1$ ) analyzovány v těchto pufrech po jejich hydrodynamickém nadávkování (tlakem 50 mbar po dobu 5 s). Stanovené mobility NPs měly následující hodnoty:  $22 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (CTAB) a  $26 (\pm 1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (DDAB). Z výsledků je patrné, že tyto kationtové povrchově aktivní látky elektrostaticky interagují s použitým typem nanočástic. Tyto samovolně probíhající („self-assembly“) interakce MNPs s CTAB nebo DDAB se zdají být velmi rychlé, což vede k tvorbě poměrně stabilní disperze MNPs, přičemž dochází k obrácení povrchového náboje (karboxylované MNPs mají na rozdíl od disperze ve vodě nebo pufru při těchto podmínkách kladnou efektivní mobilitu).

Lze tedy předpokládat, že analyzované karboxylované MNPs mohou být při podmínkách, kdy je EOF v důsledku přítomnosti CTAB a DDAB obrácen, elektrokineticky nadávkovány do kapiláry. Směr jejich migrace je pak stejný se směrem elektroosmotického toku. Také, pokud jsou brány v potaz hodnoty vypočtených zdánlivých mobilit MNPs ( $\sim -21 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro CTAB a  $\sim -26 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  pro DDAB), se zdá, že mohou být použité nanočástice za těchto podmínek nadávkovány. Absolutní hodnota zdánlivých mobilit částic je v obou případech vyšší, než při použití pufru bez tenzidů ( $\sim 13 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Bylo také zjištěno, že přítomnost CTAB v roztoku základního elektrolytu je pro vytvoření disperze MNPs, jež jsou elektrostaticky pokryty tímto tenzidem zásadní. Naopak, přítomnost DDAB v elektrolytu není pro elektrokinetické nadávkování analyzovaných nanočástic nutná.

Za těchto podmínek bylo dávkování prováděno po dobu 10 s při -10 kV (při použití obou tenzidů), přičemž odpovídající elektrický proud se pohyboval kolem 35  $\mu\text{A}$  (CTAB) a 45  $\mu\text{A}$  (DDAB). Nutnost přítomnosti CTAB oproti DDAB v základním elektrolytu při analýze MNPs je pravděpodobně způsoben odlišným mechanismem „self-assembling“ procesu. Již dříve bylo popsáno, že DDAB na rozdíl od CTAB může vlivem elektrického pole ovlivnit disperzi NPs [44]. Za těchto podmínek možno MNPs nadávkovat. Nicméně, opakovatelnost elektrických proudů byla horší (byly získány neopakovatelné analýzy), proto



použití CTAB a DDAB nebylo dále studováno. Také dávkování zóny vody (tlakem 50 mbar po dobu 5 s) před dávkováním vzorku nemělo na analýzu významný vliv.

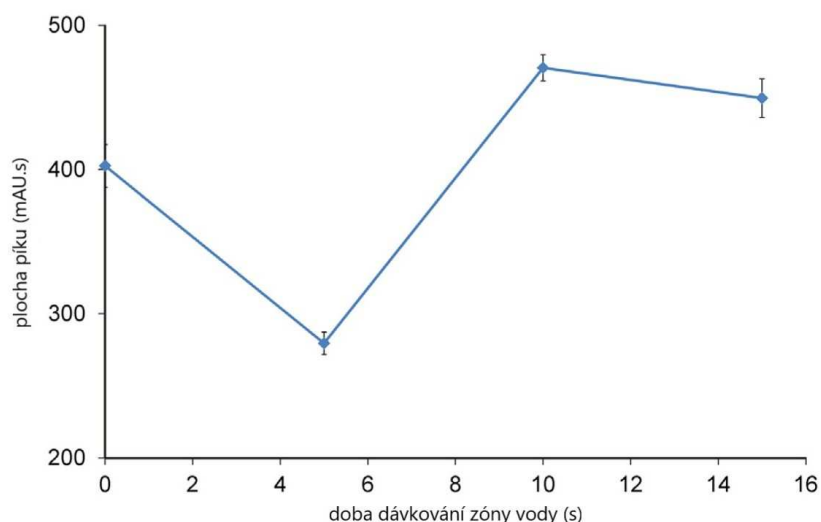
### **5.2.1.3 Elektrokinetické dávkování nanočástic při potlačeném elektroosmotickém toku**

Při potlačeném elektroosmotickém toku migrují analyty pouze svou vlastní efektivní mobilitou ( $-29 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), a proto lze říci, že by jejich chování v takovém systému mělo být více předvídatelné.

Díky komerčně dostupným kapilárám pokrytým vrstvou polyvinylalkoholu (PVA) od společnosti Agilent Technologies, byla analýza těchto nanočástic umožněna. Další studie elektrokinetického dávkování analyzovaných nanočástic tedy probíhala v těchto kapilárách.

Protože bylo zjištěno, že elektrokinetické dávkování karboxylovaných MNPs dispergovaných v 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  o pH 9,5 ( $\rho = 0,1$ ) při použití PVA pokrytých kapilár je možné, bylo provedeno dávkování aplikováním napětí -10 kV po dobu 10 s (odpovídající elektrický proud byl přibližně 28  $\mu\text{A}$ ). V tomto případě byly i elektrické proudy při opakování poměrně stabilní, takže byla tato metoda použita pro další analýzy použitých MNPs.

V dalším kroku byl zkoumán vliv dávkování zóny vody před elektrokinetickým dávkováním vzorku MNPs ( $\rho = 0,1$ ). Zóna vody byla dávkována tlakem 50 mbar po dobu 0 až 15 s (obrázek 8). Poté následovalo elektrokinetické dávkování karboxylovaných MNPs aplikací napětí -10 kV po dobu 60 s. Z obrázku 8 je zřejmé, že je pro analýzu nejvhodnější (největší plocha píku MNPs), když je zóna vody dávkována po dobu 10 s, zatímco dávkování vody po dobu 5 s se jeví jako výrazně nejhorší. To je pravděpodobně způsobeno různými účinky prostředí na nanočástice. V prostředích o různé iontové síle (borátový pufr versus voda) se mění tloušťka elektrické dvojvrstvy, avšak velmi důležitou roli mohou hrát také elektroforetická retardace a relaxační procesy iontového oblaku.



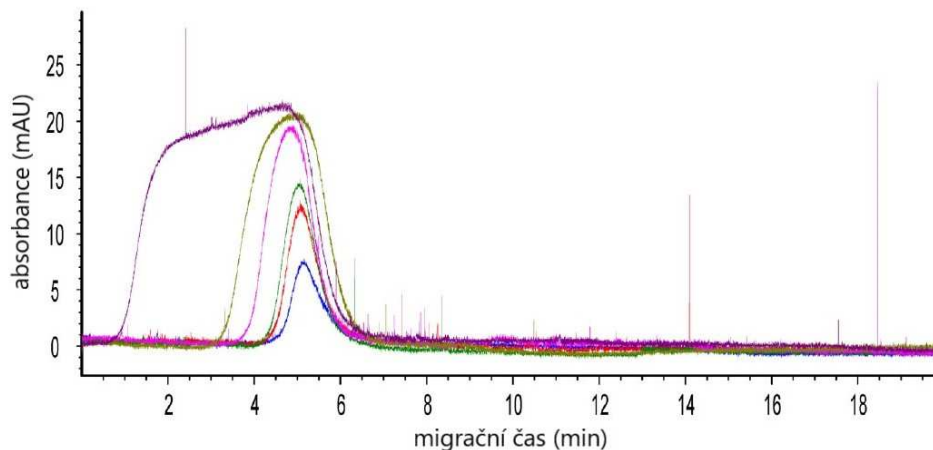
*Obrázek 8: Vliv doby dávkování zóny vody na plochu píku dávkovaných nanočástic. BGE: 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pH 9,5; dávkování MNPs po dobu 60 aplikováním napětí -10 kV,  $\rho = 0,01$ ; zóna vody dávkována tlakem 50 mbar; analýzy v PVA pokryté kapiláře (celková délka 33,5 cm, efektivní délka 25,0 cm); aplikované napětí -10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Poté bylo optimalizováno nejvýhodnější prostředí, ve kterém byly MNPs dispergovány ( $\rho = 0,01$ ), pro získání nejlepšího prekoncentračního faktoru. Mezi studované prostředí patřily H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH pufrů o pH 9,5 a koncentracích 50, 20 a 5 mM a deionizovaná voda. Jak lze očekávat, pokles koncentrace elektrolytu, v němž byly MNPs dispergovány, vedlo k vyšším signálům těchto částic („stacking“ efekt). Nejlepší výsledky byly získány pro MNPs dispergované ve vodě. Efekt dávkování zóny vody byl stejný, jak bylo popsáno v předchozím odstavci. Optimální bylo tedy dávkování vody tlakem 50 mbar po dobu 10 s.

Dalším studovaným parametrem byl účinek dávkovacího napětí. Pro dávkování bylo použito -20, -10 a -5 kV (vše po dobu 60 s). Zvyšováním napětí dochází k většímu množství nadávkovaných MNPs ( $\rho = 0,01$ ), čímž je samozřejmě zvětšen i signál. Nicméně, tímto dochází rovněž i k nárůstu elektrického proudu během dávkování, což způsobuje nestabilitu během dávkování (zřejmě kvůli většímu generování Jouleova tepla). Protože byly při napětí -20 kV příslušné elektrické proudy přibližně 78  $\mu$ A, bylo pro příští experimenty vybráno napětí -10 kV.

Jako poslední byla optimalizována doba dávkování. Karboxylované MNPs dispergované ve vodě ( $\rho = 0,001$ ) byly dávkovány napětím -10 kV po dobu od 10 s do 360 s (6 min) do 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH o pH 9,5, přičemž před elektrokinetickým dávkováním nanočástic proběhlo hydrodynamické dávkování zóny vody tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Obrázek 9 ukazuje elektroforetické profily MNPs při těchto podmínkách. Je zřejmé, že

zvýšení doby dávkování vedlo k nárůstu množství nanočástic v kapiláře. Závislost ploch píků MNPs na době dávkování je lineární od 10 s do 240 s ( $R^2 = 0,9987$ ). Jak je vidět na obrázku 9, při vyšší době dávkování (240 s), jsou pozorovány deformované profily MNPs. To může být způsobeno tím, že je zóna nanočástic příliš velká a tudíž není dostatek času na to, aby byla fokusována do píku Gaussovského tvaru před tím, než dosáhne detektoru. Proto ani doba dávkování 360 s nevedla k úspěšné analýze. MNPs totiž za těchto podmínek promigrovaly k detekčnímu okénku v kapiláře dříve, než byla doba dávkování ukončena.



*Obrázek 9: Profily píků nanočástic v závislosti na době dávkování. BGE: 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pH 9,5; dávkování MNPs po dobu 10, 20, 30, 60, 120 a 240 s aplikováním napětí -10 kV;  $\rho = 0,001$ ; zóna vody dávkována tlakem 50 mbar po dobu 10 s; analýzy v PVA pokryté kapiláře (celková délka 33,5 cm, efektivní délka 25,0 cm); aplikované napětí -10 kV; teplota 25 °C; detekce při 200 nm.*

Nakonec byl odhadnut faktor prekoncentrace, jako poměr plochy píku MNPs za optimálních podmínek při elektrokinetickém dávkování vynásobený poměrem ředění při elektrokinetickém a hydrodynamickém dávkování (100) a plochy píku, jež byla získána použitím klasického dávkování. Optimalizované podmínky pro elektrokinetické dávkování jsou tedy následující: vzorek karboxylovaných MNPs byl dispergován ve vodě ( $\rho = 0,001$ ), a takto byl dávkován napětím -10 kV po dobu 120 s do 50 mM  $H_3BO_3/NaOH$  pufru o pH 9,5, kdy elektrokinetickému dávkování vzorku nanočástic předcházelo hydrodynamické dávkování zóny vody tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Za klasické dávkování pro CE bylo považováno hydrodynamické dávkování nanočástic ( $\rho = 0,1$ ), tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Takto vypočtený prekoncentrační faktor činil 860.

## **5.3 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI KARBOXYLOVANÝMI MAGNETITOVÝMI NANOČÁSTICEMI A POLYMYXINEM B POMOCÍ CE-ICP-MS**

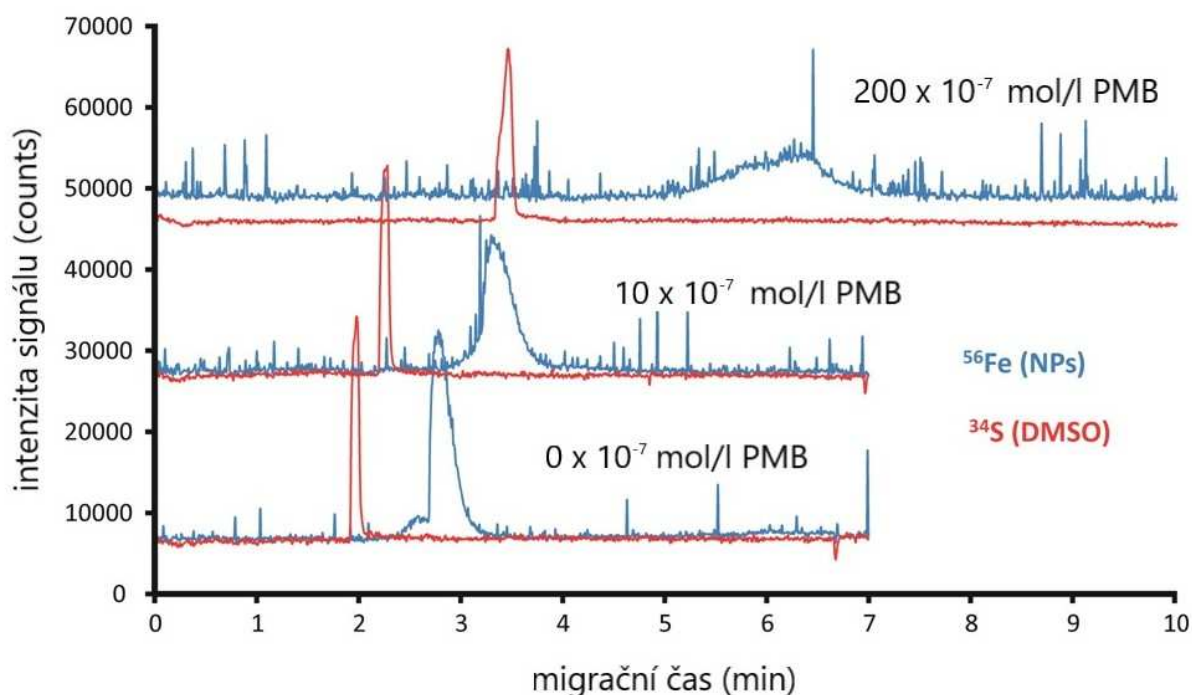
### **5.3.1 Interakční studie Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@COOH-PMB**

#### **5.3.1.1 Experimentální část**

Po otestování spojení byla provedena interakční studie magnetitových karboxylovaných nanočástic s polymyxinem B pomocí ACE-ICP-MS.

Vzhledem k tomu, že je ideou vyvinout v laboratoři mikrofluidní zařízení na kterém by byla testována bakteriální rezistence vůči polymyxinu B, který by byl zachycen na tomto typu nanočástic, je důležité vědět, jak tyto nanočástice se zmíněným antibiotikem interagují.

Pro on-line interakční studie bylo použito typické uspořádání ACE. Polymyxin B byl postupně přidáván do základního elektrolytu, kterým byl 25 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH o fyziologickém pH (7,4). Za těchto podmínek byla z migračních časů nanočástic a „markeru“ elektroosmotického toku (DMSO) vypočítána efektivní mobilita nanočástic, resp. vznikajícího komplexu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@COOH-PMB. Složení pufru a jeho pH bylo vybráno na základě budoucího použití v navrhovaném mikrofluidním zařízení. Aplikované napětí bylo optimalizováno při použití 20, 25 a 30 kV, přičemž jako nejlepší se ukázalo 25 kV (stále reprodukovatelné analýzy v rozumném čase). Koncentrace polymyxinu B byla měněna od 0 do 250 x10<sup>-7</sup> mol/l.



*Obrázek 10: Příklad CE-ICP-MS analýz karboxylovaných magnetitových nanočástic ( $\rho = 0,02$ ) s různými koncentracemi přidaného PMB do základního elektrolytu.*

*BGE: 25 mM  $H_3PO_4/NaOH$  pH 7,4; dávkování 50 mbar po dobu 5 s; analýza v křemenné kapiláře o délce 47 cm a vnitřním průměru 50  $\mu m$ ; aplikované napětí 25 kV; teplota 25°C.*

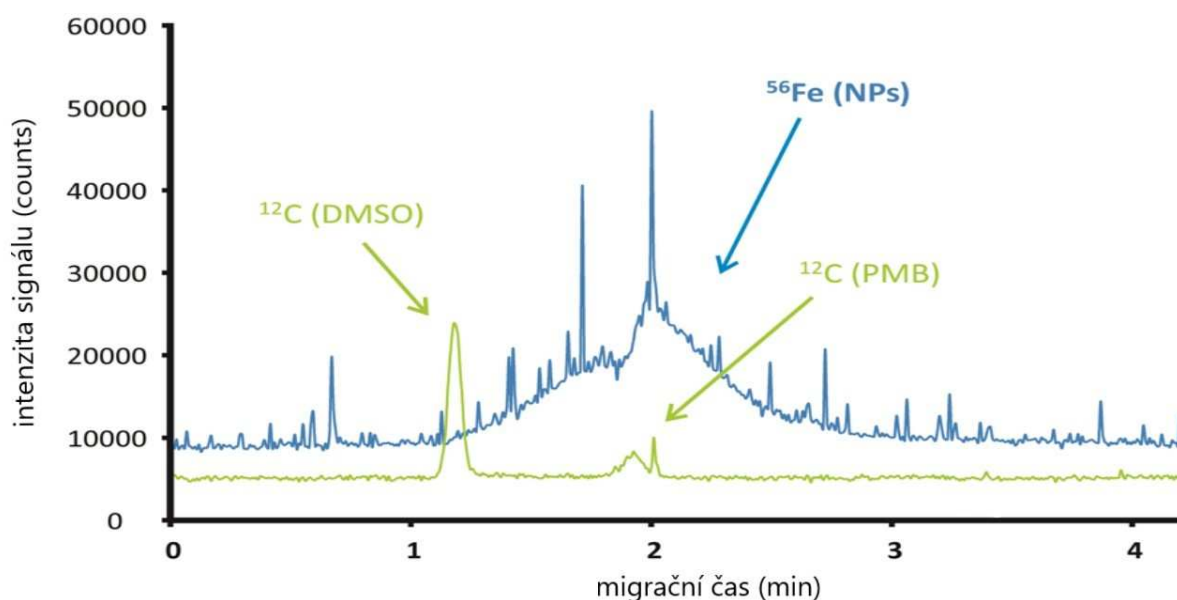
*ICP-MS podmínky: výkon generátoru: 1550 W; průtok vnějšího plazmového plynu: 14,95 l/min; průtok pomocného plynu/nosný Ar: 0,9 l/min; průtok středního plazmového plynu (do zmlžovače): 1,1 l/min; průtok přidavného („make up“) Ar: 0,25 l/min; průtok He v kolizní cele: 3 ml/min; integrační čas: 100 ms pro izotopy  $^{12}C$ ,  $^{34}S$ ,  $^{54}Fe$ ,  $^{56}Fe$  a  $^{57}Fe$ .*

Obrázek 10 ukazuje příklad analýzy CE-ICP-MS  $Fe_3O_4@COOH$  NPs s různými koncentracemi polymyxinu B. Pro výpočet mobilit byly z důvodů největších odezev použity izotopy  $^{34}S$  (DMSO) a  $^{56}Fe$  (NPs). Z naměřených dat vyplývají dvě rozdílné oblasti interakcí (obrázek 12), a to:

- (i) oblast koncentrace PMB  $1-50 \times 10^{-7}$  mol/l
- (ii) oblast koncentrace PMB  $100-250 \times 10^{-7}$  mol/l.

Je zajímavé, že se tyto oblasti liší také tvarem (šířkou) profilů NPs. Zatímco NPs vytvářejí relativně ostré píky, když BGE obsahuje nízké koncentrace polymyxinu B, jsou tyto píky mnohem širší a jejich intenzita je rovněž nižší, pokud je v BGE obsažena vyšší koncentrace PMB.

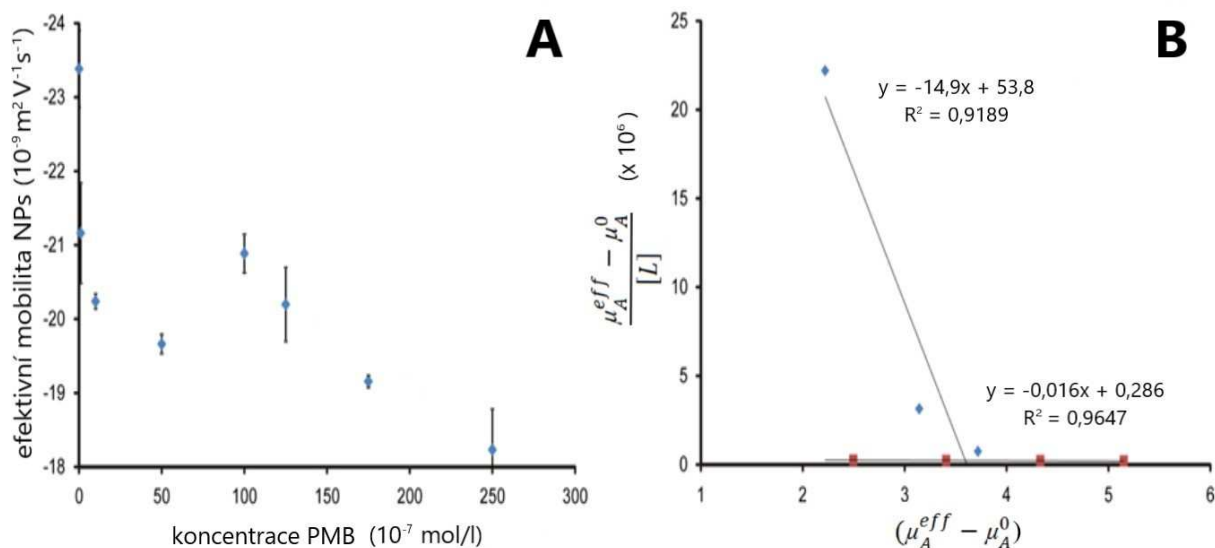
Pro ověření toho, že nanočástice skutečně interagují s PMB, byla rovněž provedena tlakem asistovaná (50 mbar) CE-ICP-MS. NPs byly analyzovány ve fosfátovém pufru, do něhož byl přidán polymyxin B o koncentraci  $300 \times 10^{-7}$  mol/l (obrázek 11). Pík, který odpovídá izotopu  $^{12}\text{C}$  v přibližně druhé minutě analýzy, kdy migrují i nanočástice (izotop  $^{56}\text{Fe}$ ), lze považovat za důkaz vzniku komplexu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH-PMB}$ . Izotop  $^{12}\text{C}$  zde odpovídá uhlíku z PMB, protože při koncentraci 0 mol/l PMB v pufru, nebyl v čase, kdy migrují NPs detekován žádný  $^{12}\text{C}$  pík. Lze tedy říci, že obsah uhlíku, který by pocházel ze vzorku  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$  nanočástic je příliš nízký na to, aby byl odlišen od signálu pozadí základního elektrolytu. Tato analýza ukazuje jedinečnost ICP-MS prvkově specifické detekce pro studium interakcí pomocí ACE.



*Obrázek 11: Tlakem asistovaná ACE-ICP-MS analýza – potvrzení interakce PMB s nanočásticemi. Doba dávkování: 100 mbar po dobu 10 s; koncentrace PMB:  $300 \times 10^{-7}$  mol/l.*

### 5.3.1.2 Vyhodnocení

Pro odhadnutí interakčních konstant a stechiometrie mezi karboxylovanými magnetitovými nanočásticemi byl sestaven graf závislosti efektivních mobilit nanočástic na koncentraci PMB (obrázek 12A). Tento graf byl potom linearizován (obrázek 12B) x-reciprokou metodou dle Scatcharda.

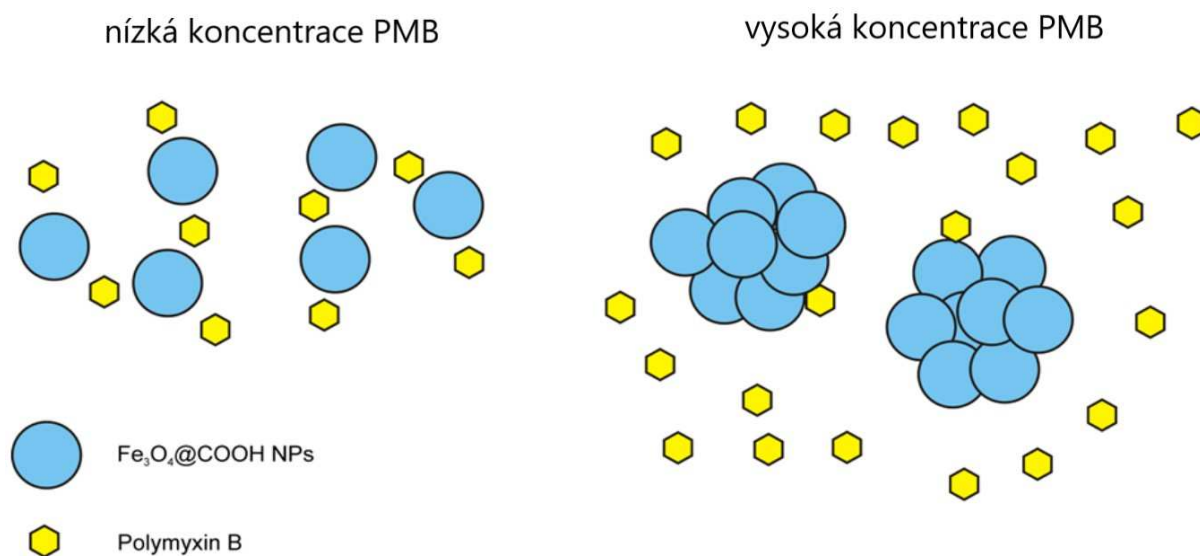


*Obrázek 12: A) Graf závislosti efektivních mobilit nanočástic v závislosti na koncentraci přidaného polymyxinu B  
B) linearizovaná forma grafu A dle Scatcharda (x-reciproká linearizace).*

Na linearizovaném grafu jsou opět zřetelné dvě různé oblasti interakce nanočástic s polymyxinem B (obrázek 12B), odpovídající nízké ( $1-50 \times 10^{-7}$  mol/l) a vyšší ( $100-250 \times 10^{-7}$  mol/l) koncentraci PMB. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. První oblast (nízká koncentrace polymyxinu B) je reprezentována poměrně vysokou interakční konstantou se stechiometrií, kde statisticky jedna nanočástice interaguje s několika molekulami polymyxinu B ( $n = 0,7$ ), zatímco v druhé oblasti (vyšší koncentrace polymyxinu B) se jedná o mnohem slabší interakci ( $K_b = 14,9 \times 10^6$  vs.  $K_b = 16,0 \times 10^3$ ), avšak stechiometrie je zde otočená, takže o mnoho více NPs interaguje s několika molekulami polymyxinu B ( $n = 3,5$ ). To je schématicky znázorněno na obrázku 13. Obrácený stechiometrický poměr v druhé oblasti může také znamenat, že NPs vytvářejí agregáty, které interagují s polymyxinem B. Tato hypotéza je v souladu s tím, že  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{COOH}$  NPs jsou ve fosfátovém pufru záporně nabitě (zeta potenciál je zde roven  $-13,9$  mV) a interagují s kladně nabitým polymyxinem B (hodnoty pK jsou vyšší než 9 [47]). Tím dochází ke snižování jejich celkového zeta potenciálu, přičemž pokud je toto snížení dostatečné, může dojít k agregaci nanočástic (elektrostatické odpuzování NPs je překonáno přitažlivými silami).

*Tabulka 2: Výsledky ACE-ICP-MS.*

<i>Koncentrace polymyxinu B</i>	<i>K<sub>b</sub> (M<sup>-1</sup>)</i>	<i>N</i>
1 – 50 x10 <sup>-7</sup> mol.L <sup>-1</sup>	14,9 (± 4,4) x10 <sup>6</sup>	0,7 (± 0,3)
100 – 250 x10 <sup>-7</sup> mol.L <sup>-1</sup>	16,0 (± 2,2) x10 <sup>3</sup>	3,5 (± 0,5)



*Obrázek 13: Znárodnění hypotézy, jak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@COOH nanočástice interagují s polymyxinem při jeho nižších (1-50 x10<sup>-7</sup> mol/l ) a vyšších (100-250 x10<sup>-7</sup> mol/l) koncentracích.*



## 6 ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli bylo v rámci experimentální části předložené práce studováno chování karboxylovaných magnetitových nanočástic v kapilární elektroforéze, a to na rozhraní dvou prostředí s různými vlastnostmi (změna specifické vodivosti nebo přítomnost ligandu, s nímž mohou interagovat).

Nejprve bylo studováno chování nanočástic na rozhraní prostředí s různými specifickými vodivostmi, kdy dochází k tzv. „stacking“ efektu. V této části bylo zjištěno, že při „stacking“ efektu může docházet ke dvojímu chování, podle velikosti rozdílu iontové síly. Prvním možným chováním je prekoncentrace, jež je u „stacking“ efektu žádoucí. Dalším možným způsobem chování NPs na tomto rozhraní je tzv. indukovaná agregace, k níž dojde, pokud je rozdíl specifických vodivostí (iontové síly) obou elektrolytů velmi výrazná.

„Stacking“ efekt lze kombinovat s elektrokinetickým dávkováním vzorku, což bylo předmětem dalšího studia těchto nanočástic. Bylo zjištěno, že elektrokinetické dávkování těchto částic je možné pouze za podmínek, kdy je elektroosmotický tok obrácen nebo zastaven. Za optimálních podmínek při použití PVA pokrytých kapilár došlo k 860-násobné prekoncentraci.

Jako poslední byla studována změna chování nanočástic v elektroforéze, pokud je v základním elektrolytu přítomen ligand, který s nimi může interagovat. Tím se mění povrchová chemie nanočástic, což při vyšších koncentracích může opět znamenat jejich agregaci. Pro důkaz interakce nanočástic s použitým ligandem (antibiotikum polymyxin B) a zlepšení detekce (nižší detekční limity, prvková specificita) bylo využito spojení CE s ICP-MS, jež bylo v laboratoři nejprve vyvinuto a testováno.

Vzhledem k tomu, že jsou nanotechnologie jedním z nejrychleji se rozvíjejících oblastí lidské činnosti, je charakterizace nanočástic (z pohledu jejich stability a povrchové chemie) a jejich citlivá detekce (použití citlivých detektorů a prekoncentračních technik) velmi důležitá. Z těchto důvodů mohou dosažené výsledky přispět k lepšímu porozumění chování nanočástic v různých prostředí a při jejich pokročilejších aplikacích (např. připravované zařízení pro studium bakteriální rezistence).

Disertační práce jednoznačně ukazuje, že kapilární elektromigrační techniky jsou výborným nástrojem pro charakterizaci nanočástic, přičemž jejich vlastnosti lze ještě vylepšit, pokud je CE spojena s ICP-MS.

## 7 LITERATURA

- [1] A. Lopez-Serrano, R.M. Olivas, J.S. Landaluze, C. Camara, Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact, *Anal Methods-Uk*, 6 (2014) 38-56.
- [2] A.J. Chetwynd, E.J. Guggenheim, S.M. Briffa, J.A. Thorn, I. Lynch, E. Valsami-Jones, Current Application of Capillary Electrophoresis in Nanomaterial Characterisation and Its Potential to Characterise the Protein and Small Molecule Corona, *Nanomaterials-Basel*, 8 (2018).
- [3] S. Hjerten, K. Elenbring, F. Kilar, J.L. Liao, A.J.C. Chen, C.J. Siebert, M.D. Zhu, Carrier-Free Zone Electrophoresis, Displacement Electrophoresis and Isoelectric-Focusing in a High-Performance Electrophoresis Apparatus, *J Chromatogr*, 403 (1987) 47-61.
- [4] M.A. Rodriguez, D.W. Armstrong, Separation and analysis of colloidal/nano-particles including microorganisms by capillary electrophoresis: a fundamental review, *J Chromatogr B*, 800 (2004) 7-25.
- [5] B.B. Vanorman, G.L. McIntire, Size-Based Separation of Polystyrene Nanoparticles by Capillary Electrophoresis, *Am Lab*, 22 (1990) 66-67.
- [6] S.P. Radko, M. Stastna, A. Chrambach, Capillary zone electrophoresis of sub- $\mu$ m-sized particles in electrolyte solutions of various ionic strengths: Size-dependent electrophoretic migration and separation efficiency, *Electrophoresis*, 21 (2000) 3583-3592.
- [7] B.V. Huff, G.L. McIntire, Determination of the Electrophoretic Mobility of Polystyrene Particles by Capillary Electrophoresis, *J Microcolumn Sep*, 6 (1994) 591-594.
- [8] S.P. Radko, M.M. Garner, G. Caiafa, A. Chrambach, Molecular-Sieving of Polystyrene Carboxylate of a Diameter up to 10- $\mu$ m in Solutions of Uncrosslinked Polyacrylamide of M(R)-5x10(6) Using Capillary Zone Electrophoresis, *Anal Biochem*, 223 (1994) 82-87.
- [9] N.G. Vanifatova, B.Y. Spivakov, J. Mattusch, R. Wennrich, Separation of unmodified polystyrene nanosphere standards by capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr A*, 898 (2000) 257-263.
- [10] S.P. Radko, A. Chrambach, Capillary zone electrophoresis of rigid submicron-sized particles in polyacrylamide solution - Selectivity, peak spreading and resolution, *J Chromatogr A*, 848 (1999) 443-455.
- [11] W.M. Hwang, C.Y. Lee, D.W. Boo, J.G. Choi, Separation of nanoparticles in different sizes and compositions by capillary electrophoresis, *B Kor Chem Soc*, 24 (2003) 684-686.
- [12] S.P. Radko, A. Chrambach, Capillary electrophoresis of subcellular-sized particles, *Journal of Chromatography B*, 722 (1999) 1-10.
- [13] C. Quang, S.L. Petersen, G.R. Ducatte, N.E. Ballou, Characterization and separation of inorganic fine particles by capillary electrophoresis with an indifferent electrolyte system, *J Chromatogr A*, 732 (1996) 377-384.
- [14] S.L. Petersen, N.E. Ballou, Separation of micrometer-size oxide particles by capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr A*, 834 (1999) 445-452.
- [15] E. Ban, Y.S. Yoo, E.J. Song, Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis, *Talanta*, 141 (2015) 15-20.
- [16] L.Y. Zhang, W. Zhang, W.L. Chen, G. Chen, Simultaneous determination of five bioactive constituents in *Rhizoma Chuanxiong* by capillary electrophoresis with a carbon

- nanotube-polydimethylsiloxane composite electrode, *J Pharmaceut Biomed*, 131 (2016) 107-112.
- [17] M. Bouri, R. Salghi, M. Algarra, M. Zougagh, A. Rios, A novel approach to size separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis-evaporative light scattering detection, *Rsc Adv*, 5 (2015) 16672-16677.
- [18] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1995.
- [19] H.H. Lauer, G.P. Rozing, *High Performance Capillary Electrophoresis, A Primer*, Agilent Technologies, DE, Waldbronn, DE, 2010.
- [20] J. Churáček, *Analytická separace látek*, SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha, Praha, ČR, 1990.
- [21] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepria, M.T. Gomez, M.S. Jimenez, J. Perez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal Chim Acta*, 904 (2016) 10-32.
- [22] H.O. Qu, T.K. Mudalige, S.W. Linder, Capillary electrophoresis coupled with inductively coupled mass spectrometry as an alternative to cloud point extraction based methods for rapid quantification of silver ions and surface coated silver nanoparticles, *J Chromatogr A*, 1429 (2016) 348-353.
- [23] J.W. Olesik, J.A. Kinzer, S.V. Olesik, Capillary Electrophoresis Inductively-Coupled Plasma Spectrometry for Rapid Elemental Speciation, *Anal Chem*, 67 (1995) 1-12.
- [24] A. Prange, D. Profrock, Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations, *Anal Bioanal Chem*, 383 (2005) 372-389.
- [25] A.R. Timerbaev, K. Pawlak, S.S. Aleksenko, L.S. Foteeva, M. Matczuk, M. Jarosz, Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs, *Talanta*, 102 (2012) 164-170.
- [26] K. Polec-Pawlak, J.K. Abramski, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, M. Jarosz, Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins, *Electrophoresis*, 27 (2006) 1128-1135.
- [27] C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: Advances and future challenges, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2023-2037.
- [28] Z. He, *Capillary Electrophoresis: Fundamentals, Techniques and Applications*, Nova Science Publishers, USA, Hauppauge, NY, USA, 2012.
- [29] R.L. Chien, D.S. Burgi, Field Amplified Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis, *J Chromatogr*, 559 (1991) 141-152.
- [30] R.L. Chien, D.S. Burgi, Field-Amplified Polarity-Switching Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis, *J Chromatogr*, 559 (1991) 153-161.
- [31] D.S. Burgi, R.L. Chien, Optimization in Sample Stacking for High-Performance Capillary Electrophoresis, *Anal Chem*, 63 (1991) 2042-2047.
- [32] R.L. Chien, D.S. Burgi, Sample Stacking of an Extremely Large Injection Volume in High-Performance Capillary Electrophoresis, *Anal Chem*, 64 (1992) 1046-1050.
- [33] D.S. Burgi, Large-Volume Stacking of Anions in Capillary Electrophoresis Using an Electroosmotic Flow Modifier as a Pump, *Anal Chem*, 65 (1993) 3726-3729.
- [34] J. Palmer, D.S. Burgi, N.J. Munro, J.P. Landers, Electrokinetic injection for stacking neutral analytes in capillary and microchip electrophoresis, *Anal Chem*, 73 (2001) 725-731.

- [35] J. Palmer, D.S. Burgi, J.P. Landers, Electrokinetic stacking injection of neutral analytes under continuous conductivity conditions, *Anal Chem*, 74 (2002) 632-638.
- [36] D.C. Henry, The Cataphoresis of Suspended Particles. Part I. The Equation of Cataphoresis, *Proc R Soc Lon Ser-A*, 133 (1931) 106-129.
- [37] U. Pyell, Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques, *Electrophoresis*, 31 (2010) 814-831.
- [38] M. Girardot, F. d'Orlye, A. Varenne, Electrokinetic characterization of superparamagnetic nanoparticle-aptamer conjugates: design of new highly specific probes for miniaturized molecular diagnostics, *Anal Bioanal Chem*, 406 (2014) 1089-1098.
- [39] M. Matczuk, J. Legat, S.N. Shtykov, M. Jarosz, A.R. Timerbaev, Characterization of the protein corona of gold nanoparticles by an advanced treatment of CE-ICP-MS data, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2257-2259.
- [40] J. Legat, M. Matczuk, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, Cellular processing of gold nanoparticles: CE-ICP-MS evidence for the speciation changes in human cytosol, *Anal Bioanal Chem*, 410 (2018) 1151-1156.
- [41] C. Nilsson, S. Birnbaum, S. Nilsson, Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography, *J Chromatogr A*, 1168 (2007) 212-224.
- [42] A.H. Duan, S.M. Xie, L.M. Yuan, Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations, *Trac-Trend Anal Chem*, 30 (2011) 484-491.
- [43] A. Bakandritsos, G. Mattheolabakis, G. Chatzikyriakos, T. Szabo, V. Tzitzios, D. Kouzoudis, S. Couris, K. Avgoustakis, Doxorubicin Nanocarriers Based on Magnetic Colloids with a Bio-polyelectrolyte Corona and High Non-linear Optical Response: Synthesis, Characterization, and Properties, *Adv Funct Mater*, 21 (2011) 1465-1475.
- [44] J. Petr, B. Teste, S. Descroix, J.M. Siaugue, P. Gareil, A. Varenne, Separation of alpha-lactalbumin grafted- and non-grafted maghemite core/silica shell nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2754-2761.
- [45] B.A. Williams, C. Vigh, Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 68 (1996) 1174-1180.
- [46] Y.H. Lee, T.I. Lin, Determination of Metal Cations by Capillary Electrophoresis - Effect of Background Carrier and Complexing Agents, *J Chromatogr A*, 675 (1994) 227-236.
- [47] D. Petsch, T.C. Beeskow, F.B. Anspach, W.D. Deckwer, Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin, *Journal of Chromatography B*, 693 (1997) 79-91.

## 8 ŽIVOTOPIS

### OSOBNÍ ÚDAJE

---

Jméno: Daniel Baron  
Adresa: Fügnerova 50/16, 794 01 Krnov  
E-mail: BaronDaniel@email.cz

### VZDĚLÁNÍ

---

- 09/2008 – 06/2012  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.  
bakalářská práce: „Analýza a využití fluoreskujících nanočástic v kapilární elektroforéze“
- 09/2012 – 06/2014  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.  
diplomová práce: „Charakterizace nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik“
- 09/2014 – současnost  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie

### STÁŽE

---

- 04 – 06/2015  
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES, s.r.o. Získání praktických zkušeností na oddělení TSA QC.
- 03 – 06/2016  
Vědecko-výzkumná stáž – Latvian Institute of Organic Synthesis (Laboratory of Membrane active compounds and  $\beta$ -Diketones).  
Vedoucí: Dr. Aiva Plotniece. Analýza a stanovení log P dihydropyridinových derivátů pomocí CE a analýza a charakterizace nanočástic pomocí CE a DLS.

## PROJEKTY

---

- Grantová agentura ČR, 16-23938Y, „Charakterizace nanočástic kapilární elektroforézou“, člen řešitelského týmu
- Grantová agentura ČR, 19-23033S, „Zlepšení citlivosti detekce v chirálních separacích pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s ESI-MS nebo ICP-MS“, člen řešitelského týmu
- OP PIK, „TFC-X – Charakterizace, optimalizace a validace GMP-grade výroby nového biotechnologického léčivého přípravku“, CZ.01.1.02/0.0/0.0/16\_084/0010317
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2015\_020, Matricový efekt a jeho potlačení při analýze vzorků, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2016\_016, „Bioanalýza a analýza potravin“, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2017\_020, „Matricový efekt a mez detekce“, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2018\_027, „Efektivní zpracování vzorků se složitými maticemi“, člen řešitelského týmu
- Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2019\_028, „Inovativní metody analýzy vzorků se složitými maticemi“, člen řešitelského týmu

## PEDAGOGICKÁ ČINNOST

---

- LS 2014/2015 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie 6 hod./týd.)
- ZS 2016/2017 – ACH/CHI (Cvičení z chemické instrumentace 5 hod./týd.)
- ZS 2018/2019 – ACH/CHI (Cvičení z chemické instrumentace 5 hod./týd.)
- ZS 2018/2019 – ACH/CHV (Vyučující předmětu Chemie vody 1 hod./týd.)
- Každoročně (od roku 2014 – ZS): ACH/ZZV (Základy zpracování výsledků – vedení vybraných výpočtových seminářů), ACH/APCHC (Cvičení z aplikované analytické chemie – vedení úloh pro stanovení konzervačních látek pomocí CE)

## PUBLIKACE

---

- **Daniel Baron**, Carmen Cacho, Jan Petr, Electrokinetic preconcentration of magnetite core – carboxylic shell nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1499 (2017) 217-221.

- **Daniel Baron**, Petra Dolanská, Zdenka Medříková, Radek Zbořil, Jan Petr, On-line stacking of carboxylated magnetite core-shell nanoparticles in capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 40 (2017) 2482-2487.
- Lenka Hárendarčíková, **Daniel Baron**, Andrea Šebestová, Jan Rozsypal, Jan Petr, True lab-in-a-syringe technology for bioassays. *Talanta*, 174 (2017) 285-288.
- Martins Rucins, **Daniel Baron**, Aiva Plotniece, Jan Petr, Determination of hormone antagonists in waste-water samples by micellar electrokinetic chromatography. *Chromatographia*, 81 (2018) 1607-1612.
- Andrea Šebestová, **Daniel Baron**, Radka Pechancová, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Separation of oxaliplatin enantiomers at attomolar levels by capillary electrophoresis connected with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, zasláno (ACA-19-330).
- **Daniel Baron**, Jan Rozsypal, Aude Michel, Jean-Michel Siaugue, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Study of interactions between carboxylic magnetite nanoparticles and polymyxin B by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, zasláno.

## KONFERENCE

---

- **Daniel Baron**, Jana Horská, Jan Petr, Poster: Layer – by – layer capillary coating for modification of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. Mezinárodní interdisciplinární konference o bioanalýze CECE – Brno 20. – 22. 10. 2014.
- **Daniel Baron**, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Aiva Plotniece, Arkadij Sobolev, Jan Petr, Poster: Separation of some 1,4-dihydropyridine derivatives by micellar electrokinetic chromatography. Mezinárodní interdisciplinární konference o bioanalýze CECE – Brno 17. – 19. 10. 2016 .
- **Daniel Baron**, Tomáš Pluháček, Vítězslav Maier, Jan Petr, Poster: CE separation of (nano)metals with ICP-MS detection. Euroanalysis 2017 – Stockholm (Švédsko) 28. 8. – 1. 9. 2017.
- **Daniel Baron**, Jana Horská, Martins Rucins, Karlis Pajuste, Aiva Plotniece, Arkadij Sobolev, Jan Petr, Poster: Characterization of nanoparticles via CE and DLS. Pokroky v chromatografii a elektroforéze & Chiranal – Olomouc 29. 1. – 1. 2. 2018.
- **Daniel Baron**, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Poster: Study of interactions between maghemite core/carboxylic shell nanoparticles and polymyxin B via ACE-ICP-MS.

International Symposium on Separation Sciences ISSS 2018 – Jasná, Demänovská Dolina (Slovensko) 17. – 20. 6. 2018.

- **Daniel Baron**, Tomáš Pluháček, Andrea Šebestová, Radka Pechancová, Jan Petr, Přednáška: Využití ICP-MS jako detektoru pro CE analýzy. Sjezd chemiků 2018 – Zlín 9. – 12. 9. 2018.

## **DALŠÍ AKTIVITY**

---

- Organizace a účast popularizačních akcí (např. Veletrh vědy a výzkumu, Muzejní noc, Noc vědců, Dětská univerzita, atd.) a exkurzí škol.
- Recenzent bakalářských prací (Kristýna Jarčíková, Iveta Hloušková).
- Smluvní výzkum – Vývoj CE metody a stanovení chloridů a chlorečnanů jako vedlejších produktů ve vzorcích chloristanu draselného pro firmu EMS-PATVAG.